

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด Small scale mud carp, *Cirrhinus
microlepis* แบบระยะสั้นและแบบระยะยาว

นางสาวดวงจันทร์ ดอกพอง



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2553

**SHORT-TERM AND LONG-TERM STORAGE OF SMALL
SCALE MUD CARP, *Cirrhinus microlepis* SPERM**

Duangchan Dokpong



**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Animal Production Technology**

Suranaree University of Technology

Academic Year 2010

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis*
แบบระยะสั้นและแบบระยะยาว

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(รศ. ดร.พงษ์ชาญ ฌ ลำปาง)

ประธานกรรมการ

(อ. ดร.สมร พรชัยชูวงศ์)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. น. สพ. ดร.บุญชร ลิขิตเดชาโรจน์)

กรรมการ

(ผศ. ดร.สุรินทร์ บุญอนันตสาร)

กรรมการ

(อ. ดร.อมรรัตน์ โมฬี)

กรรมการ

(อ. ดร.วุฒิ คำนาคิตติกุล)

รักษาการแทนรองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ดวงจันทร์ ดอกพอง : การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* แบบระยะสั้นและแบบระยะยาว (SHORT-TERM AND LONG-TERM STORAGE OF SMALL SCALE MUD CARP, *Cirrhinus microlepis* SPERM)
อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์, 113 หน้า.

การศึกษาความเป็นไปได้ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดได้ทำการศึกษาทั้งการเก็บรักษาแบบระยะสั้นและการเก็บรักษาแบบระยะยาว แบ่งการศึกษออกเป็น 3 การทดลอง โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้ (1.1) ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด (1.2) ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาวได้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้ (2.1) ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง (2.2) ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง และการทดลองที่ 3 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

การศึกษาผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น โดยใช้สาร extender 10 ชนิด (Kurokura medium-KU, modified cortland solution-MC, Calcium-Free Hanks' balanced salt solution-C-F HBSS, modified fish ringer's solution-MFR, 0.9% NaCl, Hanks' balanced salt solution-HBSS, sperm motility inhibiting saline medium-SM, Immobilizing Saad solution-Saad, 350 mM glucose and Immobilizing solution-IM) ทำการเจือจางน้ำเชื้อในสาร extender แต่ละชนิด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นทำการทดสอบผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง พบว่าการเก็บที่ระยะเวลา 6-24 ชั่วโมง การใช้สาร extender ทั้ง 10 ชนิด ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ($P>0.05$) ยกเว้นการใช้ Saad และ SM ที่ระยะเวลาการเก็บ 12 และ 24 ชั่วโมง มีอัตราการมีชีวิตต่ำกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ และเมื่อทำการเก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นที่ 48-96 ชั่วโมง พบว่าการใช้ MC และ IM ยังมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 50% และสูงกว่าสาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อนำสาร extender ทั้ง 10 ชนิด มาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ ณ เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้สาร extender 3 ชนิด (HBSS, MC และ KU) ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) จากนั้นนำสาร

extender ทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว (HBSS, MC และ KU) มาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ ณ เวลาการเก็บที่ 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้ HBSS ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงสุด $28.39 \pm 3.44\%$ (55% ของน้ำเชื้อสด) จากนั้นนำสาร extender ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1.1 (HBSS) มาศึกษาอัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่าง ๆ คือ 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วน 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ และให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (undiluted sperm, $P > 0.05$) ที่ระยะเวลาการเก็บเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) และพบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง และเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 1: 10 และ 1: 15 ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 และ 1: 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, glycerol and methanol-MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% และใช้ HBSS เป็นสาร extender พบว่าการใช้ 5% glycerol มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด $64.97 \pm 1.82\%$ (74% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าวิธีหมื่นตัวอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากนั้นเลือกสาร cryoprotectant ที่ให้ผลดีที่สุด คือ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS มาทำการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้วิธีอัตราการลดอุณหภูมิ 3 แบบ (One-step, Two-steps และ Three-steps) พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step และ Two-steps มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการมีชีวิตสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

การศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิทั้งในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด ในน้ำเชื้อสดพบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 1×10^6 : 1 และ 1.5×10^6 : 1 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ($P < 0.05$) ส่วนในน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ที่อัตราส่วน 1.30×10^6 : 1, 1.95×10^6 : 1 และ 2.60×10^6 : 1 ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่เมื่อมีการเพิ่มหรือลดจำนวน sperm: egg ratio ทั้งในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง มีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

DUANGCHAN DOKPONG : SHORT-TERM AND LONG-TERM STORAGE
OF SMALL SCALE MUD CARP, *Cirrhinus microlepis* SPERM. THESIS
ADVISOR : SAMORN PONCHUNCHOOVONG, Ph.D., 113 PP.

SHORT-TERM STORAGE/LONG-TERM STORAGE/FREEZING RATE/
SPERM: EGG RATIO/SPERM/*Cirrhinus microlepis*

This study examined the feasibility of short-term and long-term storage of small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* sperm. Three major experiments were carried out. The first experiment was subdivided into two parts for short-term storage: (1.1) the effect of extenders and times storage on short term storage of *C. microlepis* sperm, (1.2) the effect of dilution ratios (sperm: extender) and times storage on short-term storage of *C. microlepis* sperm. The second experiment was also divided into two parts for long-term storage: (2.1) the effect of cryoprotectants and their concentrations on cryopreservation of *C. microlepis* sperm, (2.2) and the effect of freezing procedures on cryopreservation of *C. microlepis* sperm. The third experiment was to investigate the effects of fresh and cryopreserved sperm on fertilization rates of *C. microlepis*.

The effects of ten extenders (Kurokura medium-KU, modified cortland solution-MC, Calcium-Free Hanks' balanced salt solution-C-F HBSS, modified fish ringer's solution-MFR, 0.9% NaCl, Hanks' balanced salt solution-HBSS, sperm motility inhibiting saline medium-SM, Immobilizing Saad solution-Saad, 350 mM glucose and Immobilizing solution-IM) on the short term storage of *C. microlepis* sperm were investigated. Sperm samples were diluted with each extender and stored for 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 and 120 h at 4°C, motility and viability rates were assessed. Ten of the extenders

used did not affect motility and viability rates after storage for 6-24 h ($P>0.05$), except Saad and SM diluents in which viability rates were significantly lower than other extenders after storage for 12 and 24 h. With increasing storage time from 48 to 96 h, the sperm diluted with MC and IM retained motility rate more than 50%, and was significantly higher than the other extenders ($P<0.05$). After storage for 48 h, the effects of ten extenders on the fertilization rate were investigated. Three extenders (HBSS, MC and KU) did not affect the fertilization rates of *C. microlepis* sperm and produced no significant difference from the control ($P>0.05$). These three extenders (KU, MC and HBSS) were used to investigate the fertilization rate, at 72 h of storage. The highest fertilization rate $28.39\pm3.44\%$ (55% of control) resulted from HBSS diluent. The best extender from the experiment 1.1 (HBSS) was used to evaluate the effects of four dilution ratios (sperm: extender) at 1:3, 1:5, 1:10 and 1:15 and times storage at 0, 48 and 72 h. At the beginning of the time storage (0 h), dilution ratios among 1:3, 1:5, 1:10 and 1:15 did not affect the percentages of fertilization, viability and motility. These results were not significantly different from the control treatment (undiluted sperm, $P>0.05$). Increasing dilution ratios up to 1:10 and 1:15 resulted in lower fertilization, viability and motility rates than those of 1:3 and 1:5 ratios ($P<0.05$), when stored for 48 h.

The effects of four cryoprotectants (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, glycerol and methanol-MeOH) at three concentrations (5, 10 and 15%) on the cryopreservation of *C. microlepis* sperm were investigated. HBSS diluent was used as an extender. The highest fertilization rate $64.97\pm1.82\%$ (74% of control) was achieved with 5% glycerol. This had a significantly higher result than the other treatments ($P<0.05$). Since the combination of 5% glycerol and HBSS yielded the best

fertilization percentage, it was chosen to investigate the effect of three freezing procedures (one-step, two-steps and three-steps) on the cryopreservation of *C. microlepis* sperm. The percentage of fertilization and viability of frozen sperm resulting from one-step and two-step freezing procedures yielded a higher rate of fertilization and viability than that of the three-step freezing procedures ($P<0.05$).

The optimal sperm: egg ratios for fresh and cryopreserved sperm of *C. microlepis* were determined. The sperm: egg ratios of $1\times 10^6:1$ and 1.5×10^6 did not affect the fertilization rates of fresh sperm ($P>0.05$). In frozen sperm, the fertilization rates obtained from the sperm: egg ratios of $1.30\times 10^6:1$, $1.95\times 10^6:1$ and $2.60\times 10^6:1$ were not significantly different ($P>0.05$). Both excessive and insufficient sperm concentrations from both fresh and frozen sperm resulted in reduced fertilization rates of *C. microlepis* sperm ($P<0.05$).

School of Animal Production Technology

Academic Year 2010

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____

Co-advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ โดยได้รับคำแนะนำ ช่วยเหลือ และตรวจแก้ไขของผู้มีพระคุณหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งได้ให้โอกาสทางการศึกษา ให้คำปรึกษา คำแนะนำ ช่วยเหลือเอาใจใส่อย่างยิ่ง และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น. สพ. ดร.ปัญญา ลิขิตเดชาโรจน์ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อวิทยานิพนธ์ และช่วยตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และอาจารย์ ดร.อมรรัตน์ โมฬี ที่ได้ให้คำปรึกษาในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ให้สำเร็จลงได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ทุกท่าน ที่ได้อบรมสั่งสอนถ่ายทอดความรู้และประสบการณ์

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พงษ์ชาญ ฦ ลำปาง หัวหน้าสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรินทร์ บุญอนันตฉัตร กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีการสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ขอขอบคุณ คุณอรณพ อัมศิลป์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดหนองคาย คุณสมบัติ สิงห์สี หัวหน้าสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม คุณอุไรวรรณ เปียสูงเนิน นักวิชาการประมงสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม รวมถึงบุคลากรและพนักงานของสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และสัตว์ทดลอง และให้คำแนะนำจนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อมานพ และคุณแม่พัตน์ ดอกพอง ตลอดจนน้องชาย น้องสาว น้องสะใภ้ ญาติพี่น้องทุกท่านที่ให้ความรักและสนับสนุนในการศึกษาของข้าพเจ้าตลอดมา และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ได้ให้ความรู้แก่ข้าพเจ้า

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนามหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ น้อง ๆ สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ทุกคน ที่ช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา จนวิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จเรียบร้อยทุกประการ

ดวงจันทร์ ดอกพอง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ท
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและปัญหาการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานของการวิจัย.....	4
1.4 ขอบเขตของการวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2 ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	6
2.1 ชีววิทยาปลานวลจันทร์น้ำจืด.....	6
2.2 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา.....	8
2.2.1 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น (short-term storage).....	8
2.2.1 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะยาว (long-term storage) หรือ โดยวิธีการแช่แข็ง (cryopreservation)	9
2.3 ผลของสาร extender ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น	9
2.4 ผลของอัตราการเจือจางน้ำเชื้อต่อสาร extender (sperm: extender) และ ระยะเวลาในการเก็บ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น	15
2.5 ผลของชนิด และความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษา น้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง	18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.6	ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา โดยวิธีการแช่แข็ง	25
2.7	จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราปฏิสนธิ	30
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	38
3.1	วัสดุและอุปกรณ์	39
3.2	สารเคมี	40
3.3	วิธีการศึกษา	41
3.3.1	การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์	41
3.3.2	การศึกษาส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี และค่า pH ของ น้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด	44
3.3.3	การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ	44
1.3.3.1	ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ	44
1.3.3.2	การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)	44
1.3.3.3	การศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility)	45
1.3.3.4	การศึกษาการมีชีวิตของอสุจิ (viability)	46
1.3.3.5	การศึกษาการปฏิสนธิ (fertilization)	47
3.3.4	ขั้นตอนและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา	49
1)	ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น	49
1.1)	ศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บ รักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น	49
1.2)	ศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลา ในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา นวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น	53

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2)	ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง	55
2.1)	ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่ เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยวิธีการแช่แข็ง	55
2.2)	ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสม สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธี การแช่แข็ง	59
3)	ศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่อ อัตราการปฏิสนธิ.....	60
3.1)	ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการ ปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด.....	60
3.2)	ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการ ปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด	61
4	ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	64
4.1	ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี และค่า pH ของน้ำเชื้อ ปลานวลจันทร์น้ำจืด	64
4.2	ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น.....	65
4.2.1	ผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น.....	65
4.2.2	ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่ เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น	71
4.3	ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บ โดยวิธีการแช่แข็ง.....	73
4.3.1	ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสม สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง	73

สารบัญ (ต่อ)

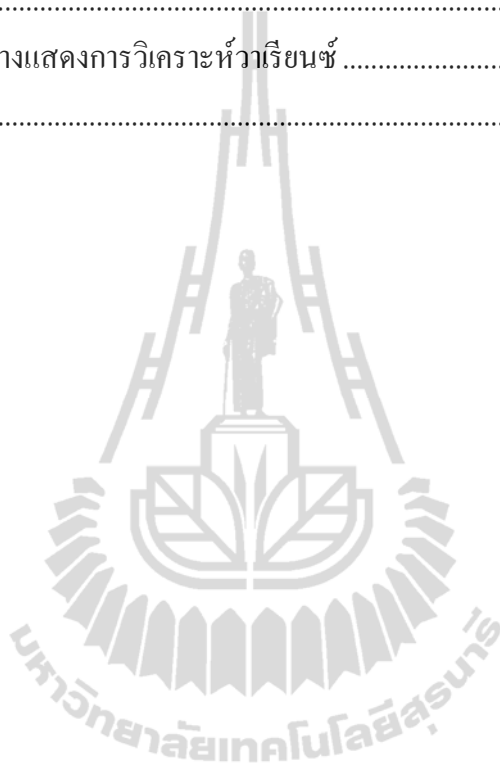
หน้า

4.3.2	ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บ น้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยวิธีการแช่แข็ง	75
4.4	จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ	76
4.4.1	ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของ น้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด	76
4.4.2	ผลของจำนวนอสุจิ sperm: egg ratio ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของ น้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด	77
5	อภิปรายผล	78
5.1	ผลของชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น	78
5.2	ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่ เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น	81
5.3	ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บ โดยวิธีการแช่แข็ง	82
5.3.1	ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสม สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยวิธีการแช่แข็ง	82
5.3.2	ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บ น้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยวิธีการแช่แข็ง	84
5.4	จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ	85
5.4.1	ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของ น้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด	85
5.4.2	ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของ น้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด	86
6	สรุปและข้อเสนอแนะ	88
6.1	สรุป	88
6.2	ข้อเสนอแนะ	88

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

รายการอ้างอิง.....	90
ภาคผนวก ก. ตารางแสดงการวิเคราะห์หัวข้อเรียนชี้	98
ประวัติผู้เขียน	113



สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ส่วนประกอบของไอออนชนิดต่าง ๆ ที่พบใน seminal plasma ปลากลุ่ม carp.....	11
2.2 ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ของน้ำเชื้อที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา แบบระยะสั้นในปลา <i>Brycon orbignyanus</i>	13
2.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นสาร cryoprotectant ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ในน้ำเชื้อแช่แข็งของ ปลา <i>Brycon orthotaenia</i>	21
2.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่ออัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟัก ในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา <i>Tor khudree</i> และ <i>Tor putitora</i>	25
2.5 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ One-step และ Two-steps ต่ออัตราการปฏิสนธิ ในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา <i>Pangasius hypophthalmus</i>	29
2.6 ผลของ sperm: egg ratio ต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็ง.....	34
2.7 ผลของ sperm: egg ratio ต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักในน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา <i>Lota lota</i>	35
2.8 ผลของ sperm: egg ratio ต่ออัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลากลุ่ม carp.....	36
3.1 หลักเกณฑ์การสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ.....	45
3.2 ส่วนประกอบของสีย้อม eosin-nigrosin	46
3.3 ส่วนประกอบทางเคมีของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด	50
3.4 แผนการทดลองการศึกษาชนิดของสาร extender 10 ชนิด (KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM) ที่เหมาะสม สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น โดยทำการทดสอบ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง	51
3.5 แผนการทดลองการศึกษ้อัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ (0, 48 และ 72 ชั่วโมง) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น โดยมี HBSS เป็นสาร extender.....	54

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.6	แผนการทดลองการศึกษาชนิดของสาร cryoprotectant 4 ชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (5, 10 และ 15%) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ HBSS เป็นสาร extender.....
3.7	แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing rate โดยใช้ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง.....
3.8	แผนการทดลองการศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด.....
3.9	แผนการทดลองการศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด
4.1	ปริมาตร ความเข้มข้น ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด
4.2	ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (mean±S.E.) ต่อการเก็บที่ระยะเวลาต่าง ๆ
4.3	ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการมีชีวิต (mean±S.E.) ต่อการเก็บที่ระยะเวลาต่าง ๆ
4.4	ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดที่อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่าง ๆ (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15)
4.5	ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดในสาร extender (HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15%.....

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	ลักษณะภายนอกของปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศผู้และเพศเมีย 6
2.2	ไข่ที่ดูดซึมน้ำเข้าไปประมาณ 30 นาที (ก) ไข่ที่พัฒนาถึงระยะ gastrula stage (ข) 7
2.3	ปลานวลจันทร์น้ำจืดที่ฟักฟักออกในระยะ hatch-out stage..... 8
2.4	ผลของสาร extender ต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลา <i>Centropomus undecimalis</i> 12
2.5	ผลของความเข้มข้นของ NaCl ในส่วนประกอบของ Kurokura solution ต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักของน้ำเชื้อปลา <i>Tinca tinca</i> L..... 14
2.6	ผลของอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ของน้ำเชื้อปลา <i>Macrozoarces americanus</i> L..... 17
2.7	ผลของอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ของน้ำเชื้อปลา <i>Perca fluviatilis</i> L..... 18
2.8	ผลของการใช้ DMSO และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 6, 10 และ 14% ต่ออัตราการเคลื่อนที่ในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา <i>Xiphophorus couchianus</i> 22
2.9	ผลของการใช้ DMSO และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 6, 10 และ 14% ต่ออัตราการเคลื่อนที่ในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา <i>Xiphophorus helleri</i> 23
2.10	ผลของการลดอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ 26
2.11	ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ One-step freezing rate ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา <i>Pangasius larnaudii</i> 28
2.12	การเกิด polyspermy (ก) และจำนวนอสุจิที่น้อยเกินไป (ข) 31
2.13	ปัจจัยที่มีผลต่อเซลล์อสุจิ ณ อุณหภูมิต่าง ๆ ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ 32
2.14	ลักษณะโครงสร้างของอสุจิในปลา Sea perch ถ่ายโดยกล้อง SEM ในน้ำเชื้อสด (A) และในน้ำเชื้อแช่แข็ง (B) 33
3.1	การฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของอสุจิ และการพัฒนาของไข่ ปลานวลจันทร์น้ำจืด..... 43
3.2	การรีดน้ำเชื้อ (ก) การรีดไข่ (ข)..... 43

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
3.3 สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (hemacytometer, (ก)) ภาพแสดงตำแหน่งที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1, 2, 3, 4 และ 5, (ข)).....	45
3.4 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตัวตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี eosin-nigrosin ต่อกายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า.....	47
3.5 ขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร และระบบการฟักไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืด	48
3.6 การพัฒนาของคัพพะปลานวลจันทร์น้ำจืดระยะ gastrula stage (8 ชั่วโมง)	48
3.7 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น	52
3.8 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง.....	56
3.9 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis Version 4	58
4.1 ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ (6-120 ชั่วโมง).....	69
4.2 อัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ทำการเก็บรักษาด้วยสาร extender 10 ชนิด ที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง	70
4.3 อัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ทำการเก็บรักษาด้วยสาร extender 3 ชนิด ที่ระยะเวลาการเก็บ 72 ชั่วโมง	71
4.4 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ	75
4.5 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ต่ออัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืด.....	76
4.6 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ต่ออัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อแช่แข็งปลานวลจันทร์น้ำจืด.....	77

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาในการทํารววจัย

ปลานวลจันทร์น้ำจืด หรือปลาพอน (*Cirrhinus microlepis*) Sauvage เป็นปลาพื้นเมืองของไทย ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน มีรูปร่างเพรียวยาวลำตัวค่อนข้างกลม ปากเล็ก เกือบเล็ก สีของลำตัวมีตั้งแต่สีส้มปนเทาจนถึงสีน้ำตาลปนสีขาวเงิน ท้องสีขาว ครีบหลังและครีบหางสีน้ำตาลปนเทา ปลาขี้หนึ่พบมากตามแม่น้ำเจ้าพระยาตั้งแต่จังหวัดอยุธยาขึ้นไปถึงจังหวัดนครสวรรค์ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบมากในแม่น้ำโขง (กรมประมง, 2530) แต่ในปัจจุบันปลานวลจันทร์น้ำจืดในธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลง (Rainboth, 1996) เนื่องจากถิ่นที่อยู่อาศัยถูกทำลาย และสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรม จากการขยายตัวของชุมชน และพื้นที่การเกษตรที่ก่อกมลพิษสู่แหล่งน้ำ รวมถึงการทำประมงเกินขนาด และการจับปลาในฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งในปัจจุบันจากฐานข้อมูลชนิดพันธุ์ที่ถูกคุกคามในประเทศไทย (Red Data of Thailand, 2005) ของสำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ได้จัดให้ปลานวลจันทร์น้ำจืดอยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ ต่อมา มีหลายหน่วยงานที่เห็นความสำคัญของสถานการณ์ดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากรายงานของสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม มีการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืดจากแม่น้ำโขงในเขตจังหวัดนครพนมและจังหวัดมุกดาหารมาทำการทดลองเลี้ยงในบ่อดิน และพบว่าปลาชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดีสามารถเลี้ยงเพื่อบริโภคได้ จึงทำการศึกษาเพาะพันธุ์เพื่อผลิตปลาชนิดนี้ปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติเป็นการฟื้นฟูพันธุ์สัตว์น้ำให้คงมีอยู่ต่อไป และสามารถส่งเสริมอาชีพให้แก่เกษตรกรได้ โดยจากการศึกษาพบว่าฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa) ที่อัตราความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม มีความเหมาะสมต่อการกระตุ้นการตกไข่ของแม่ปลานวลจันทร์น้ำจืด (เจริญ อุดมการ, อรรณพ อัมศิลป์, สมบัติ สิงห์สี, มาลัย อัมศิลป์ และ พิน พลไชย, 2547) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศผู้มีปริมาณน้ำเชื้อน้อย โดยมีปริมาณน้ำเชื้อประมาณ 0.2-0.4 มิลลิลิตร/ตัว แต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อถึง $1.65 \pm 0.25 \times 10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร จากสาเหตุดังกล่าวจึงเป็นอุปสรรคสำหรับการเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้ เหตุนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดจึงน่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่จะช่วยในการแก้ปัญหาดังกล่าว ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อมีวิธีการเก็บ 2 วิธี คือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้น จะใช้สาร extender ในการเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณ เป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิเพื่อใช้ใน

กระบวนการเมแทบอลิซึม อีกทั้งสาร extender ยังช่วยยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ให้กับตัวอสุจิโดยการเลือกชนิดของสาร extender นั้น ควรมีค่า pH และค่าออสโมลาลิตีใกล้เคียงกับ seminal plasma ของน้ำเชื้อปลาที่ทำการศึกษาโดยทั่วไปค่าออสโมลาลิตีที่เหมาะสมในปลากลุ่ม carp จะอยู่ในช่วงระหว่าง 254-346 mOsmol/kg (Alavi and Cosson, 2006) หากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีต่ำ (hypotonic) จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ซึ่งสารละลายที่มีค่าออสโมลาลิตีต่ำกว่า 200 mOsmol/kg จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในปลากลุ่ม carp และต่อมาเซลล์อสุจิจะหยุดการเคลื่อนไหว และเซลล์อาจแตกหรือถูกทำลายเนื่องจากเซลล์บวม (Alavi and Cosson, 2005) และสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตีสูง (hypertonic) ทำให้เซลล์มีการสูญเสียน้ำเกิดสภาวะเซลล์เหี่ยว ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุทำให้โครงสร้างของ phospholipids bilayer และเซลล์เมมเบรนของตัวอสุจิถูกทำลาย (Jenking-Keeran and Woods, 2002) ส่งผลให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้ สำหรับผลของ pH พบว่าหากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มี pH ต่ำ จะทำให้อสุจิมีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น และมีการผลิตกรดแลกติก ส่งผลให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ลดลง และหากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มี pH สูง จะส่งผลให้อสุจิมีอัตราเมแทบอลิซึมสูงขึ้น ดังนั้นการเลือกสาร extender ให้มีค่า pH และออสโมลาลิตีที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็นสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นเพราะสาร extender นอกจากสามารถยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ให้กับตัวอสุจิแล้ว ยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อได้อีกด้วย จึงน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาและประยุกต์ใช้กับปลานวลจันทร์น้ำจืด ซึ่งพบว่ามีปริมาณน้ำเชื่อน้อย แต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อสูง จึงได้มีการศึกษาอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อ ให้สามารถนำไปผสมเทียมกับไข่ได้ง่ายขึ้น และในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาวหรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยดำรงพันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืด เพราะเป็นวิธีที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดไว้ได้นานเป็นระยะเวลาหลายปีโดยการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) ซึ่งอาศัยการทำงานของสาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant โดยสาร cryoprotectant มีหน้าที่ป้องกันอันตรายของเซลล์ระหว่างกระบวนการแช่แข็ง นอกจากนี้อัตราการลดอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่จะทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาวประสบความสำเร็จ เนื่องจากการลดอุณหภูมิช้าหรือเร็วเกินไปก็จะทำให้เกิดอันตรายต่อตัวอสุจิได้ หากมีการลดอุณหภูมิช้าเกินไปก็จะทำให้มีการสูญเสียน้ำจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ในปริมาณที่มาก ส่งผลให้เกิดสภาวะเซลล์เหี่ยว และอาจทำให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายภายในเซลล์สูงเกินไป เมื่อตัวอสุจิสัมผัสอยู่กับสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงเป็นเวลานาน ก็จะทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์อสุจิได้ และหากมีการลดอุณหภูมิเร็วเกินไปจะทำให้ภายในเซลล์เคลื่อนที่ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้น้อย ส่งผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์และอแกเนลล์ถูกผลึกน้ำแข็งทิ่มแทงได้ (Yang, Carmichael, Varga and Tiersch, 2007) และนอกจากนี้เพื่อให้เกิดการใช้ น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุด จึงควรทราบอัตราส่วน

น้ำเชื้อปลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผสมกับไข่ (sperm: egg ratio) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อไข่ที่มากเกินไปส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง เนื่องจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้อสุจิไม่สามารถจะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Silveira, Foresti, Silveira and Senhorini, 2006; Rurangwa et al., 1998; Tambassen-Cheong, Tan-Fermin, Garcia and Baldevarona, 1995; Rosenthal, Klumpp and Willfuhr, 1998) ในทางตรงกันข้ามพบว่าปริมาณน้ำเชื้อที่ไม่เพียงพอก็ส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเช่นเดียวกัน (Linhart, Rodina, Kocour and Gela, 2006; Rurangwa et al., 1998; Silveira et al., 2006; Bart, Wolfe and Dunham, 1998) อย่างไรก็ตามที่ผ่านมา ยังมีการศึกษาเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นน้อยมาก และพบว่ายังไม่มีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว รวมถึงการศึกษาในเรื่องของอัตราส่วนน้ำเชื้อปลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผสมกับไข่ (sperm: egg ratio)

การวิจัยในครั้งนี้จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น อัตราการเจือจาง (dilution rate) ระหว่าง sperm: extender เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อ และระยะเวลาในการเก็บ (time storage) และมีแนวคิดที่จะศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดนี้แบบระยะยาวโดยหาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง พร้อมทั้งศึกษาอัตราส่วนระหว่าง sperm: egg ratio ทั้งส่วนที่เป็นน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อประโยชน์ในการใช้น้ำเชื้อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาชนิดของสาร extender และอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

1.2.3 เพื่อศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสมสำหรับการปฏิสนธิ (sperm: egg ratio) ของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งของปลานวลจันทร์น้ำจืด

1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 ค่าออสโมลาลิตี และค่า pH ของสาร extender มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ทำการเก็บรักษาแบบระยะสั้น

1.3.2 อัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ ที่ทำการเก็บแบบระยะสั้น

1.3.3 ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งของปลานวลจันทร์น้ำจืด

1.3.4 จำนวน sperm: egg ratio มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่แข็งของ ปลานวลจันทร์น้ำจืด

1.4 ขอบเขตของงานวิจัย

ในการวิจัยครั้งนี้ได้มุ่งเน้นเพื่อศึกษาชนิดของสาร extender, อัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น และศึกษาถึงชนิด และความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ ที่เหมาะสม สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ แช่แข็งจากอัตราการเคลื่อนที่ (motility rate) อัตราการมีชีวิต (viability rate) และอัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) จากนั้นนำผลที่ได้ไปศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสมสำหรับการผสมกับไข่ (sperm: egg ratio) ของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบชนิดของสาร extender ทราบอัตราการเจือจางของ sperm: extender และระยะเวลา ในการเก็บ ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น ทราบชนิด และความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษา น้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง อีกทั้งทราบถึงอัตราส่วน sperm: egg ratio ที่เหมาะสม สำหรับน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งของปลานวลจันทร์น้ำจืด เพื่อให้มีการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัด ของปลานวลจันทร์น้ำจืดให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งประโยชน์จากการศึกษาดังกล่าวนี้นี้เพื่อนำไปสู่ การเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิต ส่งเสริมการเลี้ยงให้กับเกษตรกร ตลอดจนการอนุรักษ์พันธุ์ ปลาต่อไป จะเห็นได้ว่าผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ดังต่อไปนี้คือ

1. สามารถแก้ปัญหาให้กับสถานีประมง หรือฟาร์มเอกชนที่เพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้ โดย สามารถเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อจากการใช้สาร extender และสามารถใช้น้ำเชื้อได้อย่างเหมาะสม

(Insemination dose) ทั้งน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อให้มีการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดของปลานวลจันทร์น้ำจืดให้เกิดประโยชน์สูงสุด

2. จัดเป็นองค์ความรู้ใหม่ และเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป เพราะยังไม่มีการศึกษาและวิจัยการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืดมาก่อน และสามารถพัฒนาเทคนิคและวิธีการที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในกลุ่มเดียวกันที่มีปัญหาด້ายคล้ายคลึงกัน อีกทั้งนำเทคนิคที่ได้นี้ไปเผยแพร่บริการวิชาการแก่ประชาชน (เกษตรกรที่เลี้ยงปลา) และฟาร์มเอกชนที่สนใจ อีกทั้งมีประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุ์ปลาต่อไป

สำหรับหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ สถาบันการศึกษาต่าง ๆ กรมประมง สถานีประมง ผู้ประกอบการธุรกิจสัตว์น้ำ ตลอดจนหน่วยงานของรัฐและเอกชนที่สนใจ



บทที่ 2

ปรัทัศนัวรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาปลานวลจันทร์น้ำจืด

ปลานวลจันทร์น้ำจืด หรือปลาพอน มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Cirrhinus microlepis* Sauvage ชื่อสามัญ Small scale mud carp เป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน มีรูปร่างเพรียวยาวลำตัวค่อนข้างกลม ปากเล็ก สีของลำตัวมีตั้งแต่สีส้มปนเทาจนถึงสีน้ำตาลปนสีขาวยเงิน ท้องสีขาว ครีบหลังและครีบท้องสีน้ำตาลปนเทา ปลายครีบลีชมพู (ภาพที่ 2.1) ปลานวลจันทร์น้ำจืดสามารถจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้

ไฟลัม Chordata

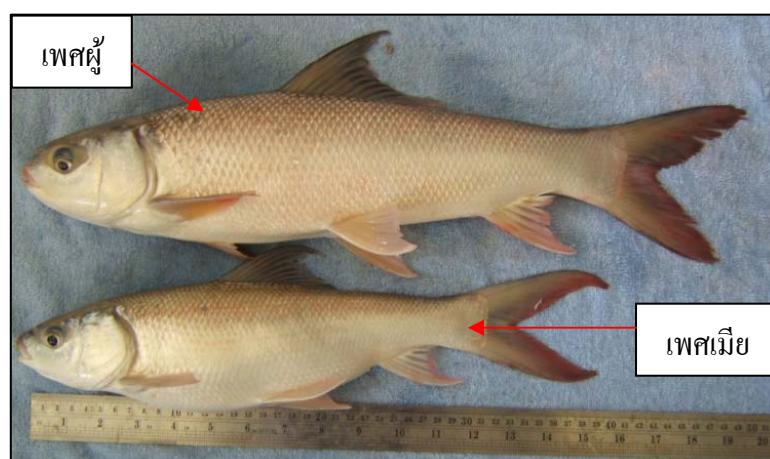
ชั้น Actinopterygii

อันดับ Cypriniformes

วงศ์ Cyprinidae

สกุล *Cirrhinus*

สปีชีส์ *Cirrhinus microlepis*



ภาพที่ 2.1 ลักษณะภายนอกของปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศผู้และเพศเมีย

ปลานวลจันทร์น้ำจืดมีช่วงฤดูผสมพันธุ์อยู่ระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนสิงหาคม โดยพ่อพันธุ์มีน้ำหนัก 0.96 ± 0.32 กิโลกรัม/ตัว ส่วนแม่พันธุ์มีน้ำหนัก 0.89 ± 0.19 กิโลกรัม/ตัว ไข่ของปลานวลจันทร์น้ำจืดมีลักษณะกลม สีเขียวอมเทา หรือสีเหลืองอำพัน เป็นไข่ครึ่งจมครึ่งลอย (semibouyant egg) ไข่ที่เพิ่งได้รับการผสมมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.06 ± 0.02 มิลลิเมตร ต่อมาเมื่อไข่ดูดซึมน้ำเข้าไปประมาณ 30 นาที ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้นมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 4.08 ± 0.07 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2.2, ก) และจะใช้เวลาในการพัฒนาถึงระยะ gastrula stage (ภาพที่ 2.2, ข) 8 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะที่ใช้นับอัตราการปฏิสนธิ เนื่องจากเป็นระยะที่มีการแบ่งเซลล์และจัดเรียงตัวขึ้นเป็นเนื้อเยื่อของตัวอ่อนในรูปของ extoderm, mesoderm และ endoderm ซึ่งเจริญไปเป็นอวัยวะส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย และกลุ่มเซลล์เคลื่อนลงมาคลุม yolk เตรียมสร้าง head bud และ tail bud ไข่ใช้เวลาในการพัฒนาตัวอ่อนจนฟักออกเป็นตัวประมาณ 14 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ $26-27^{\circ}\text{C}$ ลูกปลาเมื่อฟักออกจากไข่ ลำตัวใส มีความยาว 6.04 ± 0.47 มิลลิเมตร ในระยะแรกลูกปลานอนอยู่ที่พื้นเพราะอาหารสะสมในถุงไข่แดงมีขนาดใหญ่ มีการเคลื่อนไหวเล็กน้อย (ภาพที่ 2.3) (เจริญ อุดมการ และคณะ, 2547)



(ก)



(ข)

ภาพที่ 2.2 ไข่ที่ดูดซึมน้ำเข้าไปประมาณ 30 นาที (ก) ไข่ที่พัฒนาถึงระยะ gastrula stage (ข)

ที่มา: เจริญ อุดมการ และคณะ (2547)



ภาพที่ 2.3 ปลานวลจันทร์น้ำจืดที่ฟักฟักออกในระยะ hatch-out stage
ที่มา: เจริญ อุดมการ และคณะ (2547)

ปลานวลจันทร์น้ำจืดเดิมพบมากตามแม่น้ำใหญ่ เช่น แม่น้ำเจ้าพระยาตั้งแต่จังหวัดอยุธยาขึ้นไปถึง จังหวัดนครสวรรค์ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบมากในแม่น้ำโขง (กรมประมง, 2530) ต่อมา มีการขยายตัวของชุมชน และพื้นที่การเกษตรที่ก่อกมลพิษสู่แหล่งน้ำ อีกทั้งวิธีการจับปลาที่ผิดกฎหมาย ทำให้ทรัพยากรสัตว์น้ำจืดมีจำนวนลดลงมาก และจากการศึกษาพบว่าประชากรของปลานวลจันทร์น้ำจืดในแต่ละแหล่งมีจำนวนลดลงมาก (Rainboth, 1996) ซึ่งต่อมา เจริญ อุดมการ และคณะ (2547) จึงได้มีการศึกษาการเพาะพันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืด และพบว่าฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa) ที่อัตราความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม มีความเหมาะสมต่อการกระตุ้นการตกไข่ของแม่ปลานวลจันทร์น้ำจืด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศผู้มีน้ำเชื้อน้อยจึงเป็นอุปสรรคสำหรับการเพาะพันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืด ด้วยเหตุนี้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นและแบบระยะยาว โดยใช้สาร extender ที่เหมาะสมสำหรับเชื้อจางน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษาเพื่อไม่ให้น้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป และยังเป็นการเพิ่มปริมาณของน้ำเชื้ออีกด้วย อีกทั้งมีบทบาทในการยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ และลดการใช้พลังงานของตัวสุจิในปลานวลจันทร์น้ำจืด

2.2 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา แบ่งได้เป็น 2 ประเภท คือ

2.2.1 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น (short-term storage) เป็นการเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4°C โดยสารสำคัญที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น คือ สาร extender ซึ่งเป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษาเพื่อไม่ให้น้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป อีกทั้งมีบทบาท

ในการยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่และลดการใช้พลังงานของตัวอสุจิ

2.2.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะยาว (long-term storage) หรือโดยวิธีการแช่แข็ง (cryopreservation) เป็นการเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C การเก็บโดยวิธีนี้ต้องใช้สาร extender ในการเจือจางน้ำเชื้อ และใช้สาร cryoprotectant เพื่อช่วยป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ระหว่างกระบวนการลดอุณหภูมิ การเก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งต้องกำหนดระยะเวลาให้สารซึมผ่านเข้าไปในเซลล์เพื่อรักษาสภาพเซลล์ไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง (equilibration time) กำหนดอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) และภาชนะสำหรับบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็ง ซึ่งถ้ามีการปฏิบัติถูกต้องและเหมาะสมกับสัตว์น้ำแต่ละชนิดจะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานหลายปี (กฤษณ์มงคลปัญญา, 2536)

2.3 ผลของสาร extender ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น

สาร extender เป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษาเพื่อไม่ให้น้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป อีกทั้งมีบทบาทในการยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ และยังเป็นสารที่ให้พลังงาน เป็นตัวปรับความเป็นกลางจากขบวนการเมแทบอลิซึมของอสุจิ ช่วยรักษาความดันออสโมติก ซึ่งโดยปกติตัวอสุจิปลาจะไม่มีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ใน seminal plasma หรือในอันทะ แต่จะมีการเคลื่อนที่เมื่อได้รับการกระตุ้นโดยน้ำในขณะการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ถ้าจะเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยสาร extender ใด ๆ ก็ตาม สาร extender ชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ดังนั้นการใช้สาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจึงควรมีส่วนประกอบทางเคมี ค่าออสโมลาลิตี และ pH ใกล้เคียงกับ seminal plasma ทั้งนี้เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนไหวหรือการใช้พลังงานของตัวอสุจิ ตลอดจนการรักษาให้ตัวอสุจิจึงรูป และมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา (Kang, Shao, Kho and Zhaug, 2004; Baynes, Scott and Dawson, 1981) โดยจากการรวบรวมเอกสารงานวิจัยพบว่าในปลาน้ำจืดสารละลายที่เป็น hypotonic คือ สารละลายนอกเซลล์มีความเข้มข้นน้อยกว่าภายในเซลล์ (ค่าออสโมลาลิตีของสารละลายภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์) จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ซึ่งสารละลายที่มีค่าออสโมลาลิตีต่ำกว่า 200 mOsmol/kg จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในปลากลุ่ม carp และต่อมาเซลล์อสุจิจะหยุดการเคลื่อนไหว และเซลล์อาจแตกหรือถูกทำลายเนื่องจากเซลล์บวม (Alavi and Cosson, 2005) ในทางตรงข้ามสารละลายที่เป็น hypertonic คือ สารละลายนอกเซลล์ที่มีความเข้มข้นมากกว่าภายในเซลล์ (ค่าออสโมลาลิตีของสารละลายภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในเซลล์) ทำให้มีการสูญเสียน้ำทำให้เซลล์เหี่ยว ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุให้เกิดความเสียหายต่อโครงสร้างของ phospholipids bilayer และเซลล์เมมเบรน (Jenking-Keeran and Woods, 2002) ส่งผลให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้ ซึ่งค่าออสโมลาลิตีของ seminal plasma ในน้ำเชื้อปลาน้ำจืดของปลากลุ่ม carp อยู่ในช่วง $254\text{--}346\text{ mOsmol/kg}$ (Alavi and Cosson, 2006) และ $200\text{--}300\text{ mOsmol/kg}$

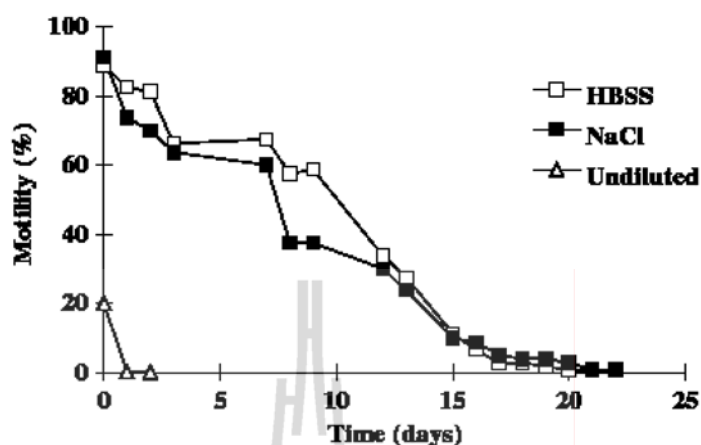
สำหรับปลาทะเล (Wayman and Tiersch, 2000) นอกจากนี้จากการรวบรวมเอกสารยังพบว่าระดับของ pH ในสาร extender มีผลต่อคุณภาพของตัวอสุจิในระหว่างการเก็บรักษา โดยมีผลต่ออัตราเมแทบอลิซึมและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ หากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ จะทำให้อสุจิมีการใช้ออกซิเจนสูง มีการผลิตกรดแลคติก และส่งผลให้การเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง และมีการรายงานว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นจะทำให้อสุจิมีการผลิตกรดแลคติกออกมามากขึ้น ส่งผลให้อสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ ดังนั้นการเคลื่อนที่ของอสุจิจึงลดลง และถ้าอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่า pH สูงจะส่งผลให้อสุจิมีอัตราเมแทบอลิซึมสูงขึ้น ซึ่งการเติมสารประเภท buffer ได้แก่ phosphate, citrate และสารที่จัดอยู่ในประเภท zwitterionic (สารที่มีทั้งประจุบวกและประจุลบ) ได้แก่ N, N-bis (2-hydroxyethyl)-2-aminoethane sulfonic acid (BES) และ N-Tris (hydroxyethyl) methyl-2-aminoethane sulfonic acid (TES) จะสามารถช่วยป้องกันการเปลี่ยนแปลงค่า pH ได้ (Donoghue and Wishart, 2000) ซึ่งสาร extender นอกจากควรมีค่าออสโมลาลิตี และ pH ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลาแล้ว สาร extender ที่ใช้เมื่อเจือจางน้ำเชื้อแล้วควรให้ออออนชนิดที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลา หรือใกล้เคียงกับ seminal plasma (Muchlisin, Hashim and Chong, 2004) ซึ่งโดยปกติแล้วใน seminal plasma ของน้ำเชื้อปลาจะมีส่วนประกอบที่เป็น K^+ , Na^+ และ Cl^- อยู่สูง แต่จะมีส่วนประกอบที่เป็น Ca^{2+} และ Mg^{2+} ต่ำ (Tan-Fermin, Miura, Adachi and Yamauchi, 1999) ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของไอออนชนิดต่าง ๆ ที่พบใน seminal plasma ปลากลุ่ม carp

ชนิดปลา	ชนิดไอออน (mM)					อ้างอิง
	K ⁺	Na ⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	Mg ²⁺	
<i>Cyprinus carpio</i>	78.87	71.25	10.69	110.62		Kruger et al., 1984
	73.01	59.00	11.54	96.25		
	77.56	58.12	8.47	102.12		
	67.8	94	12.5	-	0.02	Clemens and Grant, 1965
	82.4	75	2	-	0.8	Morisawa et al., 1983
	43.5	51.3	0.7	-	0.27	Plouidy and Billard, 1982
	87	63		-		Emri et al., 1998
	64	83		-		
	63	78	43.5			Krasznai et al., 2003b
	20	18	73			
<i>Ctenopharyngodon idella</i>	35.1	81.1	1.0		1.6	Gosh, 1985
	2.1	35.7	2.6		1.3	
<i>Alburnus alburnus</i>	40.6	66.6				Lahnsteiner et al., 1996
<i>Tinca tinca</i>	1.93	18.40	0.60		0.45	Linhart et al., 2003a,b,c

ที่มา: Alavi and Cosson (2006)

ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าได้มีการใช้สาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาหลายชนิด อย่างเช่นในปลา Common snook, *Centropomus undecimalis* โดยการใช้สาร extender สองชนิด ได้แก่ HBSS และ 0.6% NaCl พบว่าเมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วย HBSS มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ 0.6% NaCl (Tiersch, Wayman, Skapura, Neidig and Grier, 2004) ดังแสดงในภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 ผลของสาร extender ต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลา *Centropomus undecimalis*

ที่มา: Tiersch et al. (2004)

และการศึกษาในปลา Walking catfish, *Clarias macrocephalus* โดยการใช้สาร extender 5 ชนิด ได้แก่ C-F HBSS, HBSS, extender 7, extender 13 และ Modified Cortland พบว่า การใช้ HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ โดยยังมีอัตราการเคลื่อนที่ $11.1 \pm 3.3\%$ ที่ระยะเวลาการเก็บ 10 วัน (Vuthiphandchai, Thadsri and Nimrat, 2009) นอกจากนี้การศึกษาในปลา Tropical bagrid catfish, *Mystus nemurus* พบว่า การใช้ Ringer และ Physiological saline เป็นสาร extender มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงกว่าการใช้ Saline (Muchlisin et al., 2004) นอกจากนี้ในการศึกษาผลของสาร extender ในปลา Abant trout, *Salmo trutta abanticus* หลังจากการเก็บ 24 ชั่วโมง พบว่าเมื่อใช้ glucose เป็นสาร extender ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ Ringer (Hatipoglu and Akcay, 2010) และในการศึกษาของ Park and Chapman (2005) ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Short-nose sturgeon, *Acipenser brevirostrum* โดยใช้ Extender medium ซึ่งพบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Extender medium มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า และสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานกว่าน้ำเชื้อที่ไม่มีการเจือจางด้วย Extender medium และในการศึกษาในปลา Piracanjuba, *Brycon orbignyanus* โดยการใช้สาร extender 6 ชนิด ได้แก่ NaCl 154 mM, NaCl 200 mM, Immobilizing Saad solution (Saad), Kurokura solution, Commercial coconut water Kero-cocoTM และ Ginsburg fish Ringer พบว่า การใช้ Saad สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ โดยยังมีอัตราการเคลื่อนที่สูงถึง $80 \pm 10\%$ ที่ระยะเวลาการเก็บ 24 ชั่วโมง (Maria, Viveiros, Freitas and Oliveira, 2006) ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบ
ระยะสั้นในปลา *Brycon orbignyanus*

ชนิดปลา	สาร extender	การเคลื่อนที่ (%)			
		ระยะเวลาการเก็บ (ชั่วโมง)			
		0	1	24	48
<i>Brycon</i>	NaCl 154 mM	100±0	100±0 ^a	57±15 ^b	0
<i>orbignyanus</i>	NaCl 200 mM	97±3	92±6 ^a	53±15 ^b	13±6
	Saad	100±0	92±6 ^a	80±10 ^a	17±6
	Kurokura	100±0	88±13 ^a	23±15 ^{cd}	0
	Coconut water	90±10	83±15 ^a	8±6 ^d	0
	Ginsburg fish Ringer	87±6	63±11 ^b	20±10 ^{cd}	0
	Undiluted semen	100±0	83±6 ^a	33±21 ^c	12±8

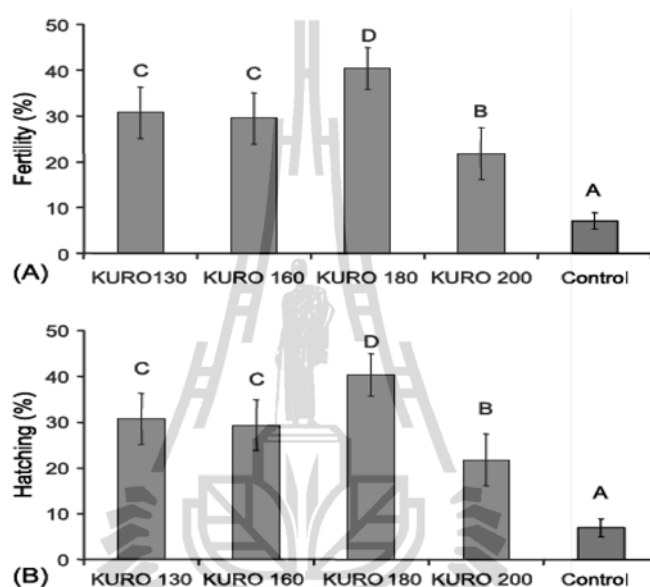
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P < 0.05$)

ที่มา: Maria et al. (2006)

และสำหรับในปลากลุ่ม carp ก็มีการศึกษาถึงการใช้สาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นเช่นเดียวกัน ซึ่งได้แก่ การศึกษาในปลา Colorado pikeminnow, *Ptychocheilus lucius* โดยใช้ HBSS เป็นสาร extender พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 24 ชั่วโมง น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย HBSS มีอัตราการเคลื่อนที่ 77±22% ซึ่งให้ผลสูงกว่าน้ำเชื้อที่ไม่ได้ทำการเจือจางกับสาร extender โดยมีอัตราการเคลื่อนที่เพียง 12±30% (Tiersch, Figiel and Wayman, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Jing, Huang, Bai, Tanguay and Dong (2009) ที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Zebrafish, *Danio rerio* โดยใช้ HBSS และ Buffered sperm motility-inhibiting solution (BSMIS) เป็นสาร extender พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 10 ชั่วโมง การใช้ HBSS ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ 70% ซึ่งให้ผลสูงกว่าการใช้ BSMIS ที่มีอัตราการเคลื่อนที่เพียง 5% นอกจากนี้ยังมีการใช้สาร extender ชนิดอื่นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากลุ่ม carp อย่างเช่นการใช้ Kurokura solution เป็นสาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Tench, *Tinca tinca* L. โดยทำการศึกษาถึงความเข้มข้นของ NaCl 4 ระดับ คือ 130 mM, 160 mM, 180 mM และ 200 mM ในส่วนประกอบของ Kurokura solution พบว่าน้ำเชื้อที่ทำการเจือจางกับ Kurokura solution ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 180 mM มีอัตราการปฏิสนธิ (41%) และอัตราการฟัก (41%) สูง

กว่าการเจือจางกับ Kurokura solution ที่มีความเข้มข้นของ NaCl ที่ระดับอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$ (Rodina, Cosson, Gela and Linhart, 2004) ดังแสดงในภาพที่ 2.5



ภาพที่ 2.5 ผลของความเข้มข้นของ NaCl ในส่วนประกอบของ Kurokura solution ต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักของน้ำเชื้อปลา *Tinca tinca* L.

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ที่มา: Rodina et al. (2004)

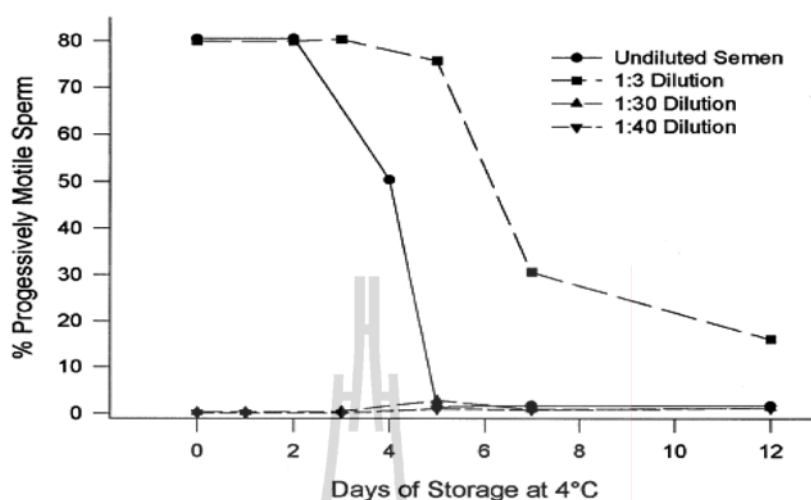
และการใช้ Modified Cortland's solution เป็นสาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* พบว่าหลังจากการเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟัก ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (Singsee, Imsilp, Pewnane and Sukumasavin, 2005) และการใช้ Rinsing solution ซึ่งประกอบด้วย 0.3% urea และ 0.4% NaCl เป็นสาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Common carp, *Cyprinus carpio* พบว่าสามารถเก็บได้นานถึง 45 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ $0-4^{\circ}\text{C}$ โดยมีอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด (Hulata and Rothbard, 1979) เช่นเดียวกับการศึกษาของ อุทัยรัตน์ ณ นคร (2525) ซึ่งทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยเจือจางน้ำเชื้อในสาร extender 2 ชนิด ได้แก่ Ringer's solution และ Rinsing solution พบว่า Ringer's solution เป็นสารละลายที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อปลา

ตะเพียนขาว โดยมีอัตราการปฏิสนธิ 80.64% และ 38.68% ที่ระยะเวลาการเก็บ 24 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสูงกว่าการใช้ Rinsing solution ที่มีอัตราการปฏิสนธิเพียง 60.17% และ 3.71% ที่ระยะเวลาการเก็บ 24 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ และในการศึกษาของ Bozkurt and Secer (2005) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Mirror carp, *Cyprinus carpio* แบบระยะสั้น โดยการใช้สาร extender 2 ชนิด ซึ่งได้แก่ extender 1 (440 mg NaCl, 620 mg KCl, 22 mg CaCl₂, 20 mg NaHCO₃ และ 8 mg MgCl₂) และ extender 2 (350 mM glucose และ 30 mM Tris) หลังจากการเก็บ 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้สาร extender ทั้งสองชนิดมีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน จากการศึกษาผลของการใช้สาร extender ยังมีความหลากหลายซึ่งผลที่ได้ก็แตกต่างกันออกไปตามชนิดของปลา ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการหาสาร extender ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดซึ่งยังมีการศึกษาน้อยมาก

2.4 ผลของอัตราการเจือจางน้ำเชื้อต่อสาร extender (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น

ชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมนั้นนอกจากจะสามารถยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นแล้ว ยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อได้อีกด้วย จึงน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาและประยุกต์ใช้กับปลานวลจันทร์น้ำจืด ซึ่งพบว่ามีปริมาตรน้ำเชื้อน้อย (0.2-0.4 มิลลิลิตร/ตัว) แต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อสูงถึง $1.65 \pm 0.25 \times 10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร จึงได้มีการศึกษาอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ ทั้งนี้เพื่อความสะดวกในการผสมเทียมกับไข่ จากการรวบรวมเอกสารงานวิจัยพบว่าเมื่อมีการเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น น้ำเชื้อที่ทำการเก็บในอัตราการเจือจาง sperm: extender สูง จะมีอัตราการเคลื่อนที่ลดลงเร็วกว่าน้ำเชื้อที่เก็บในอัตราการเจือจาง sperm: extender ต่ำ (Jing et al., 2009; DeGraaf, King, Benton and Berlinsky, 2004) ซึ่งจากเหตุการณ์ดังกล่าวจะเห็นได้ว่าระยะเวลาในการเก็บกับอัตราการเจือจางมีอิทธิพลร่วมกัน และมีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ ดังนั้นในการศึกษาอัตราการเจือจาง sperm: extender จึงควรคำนึงถึงระยะเวลาในการเก็บรักษาด้วย ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าได้มีการศึกษาอัตราการเจือจาง sperm: extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาหลายชนิด อย่างเช่นในปลา Black sea bass, *Centropristis striata* L. โดยใช้ Modified mounib's extender ในอัตราการเจือจาง 4 ระดับ ได้แก่ 1: 1, 1: 3, 1: 5 และ 1: 10 พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 5 และ 10 วัน น้ำเชื้อที่เก็บในอัตราการเจือจาง 1: 1 และ 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าและแตกต่างจากน้ำเชื้อที่เก็บในอัตราการเจือจาง 1: 5 และ 1: 10 ในขณะเดียวกันเมื่อทำการเก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น 20 และ 25 วัน พบว่าอัตราการเจือจาง ทั้ง 4 ระดับ มีอัตราการเคลื่อนที่ลดลงอย่างรวดเร็ว (DeGraaf et al., 2004) และในปีเดียวกัน DeGraaf and Berlinsky (2004) ได้ศึกษาอัตราการเจือจาง sperm: extender ในการเก็บรักษา

น้ำเชื้อปลา Atlantic cod, *Gadus morhua* โดยใช้ Modified Mounib's extender เป็นสาร extender ในอัตราการเจือจาง 1: 1, 1: 2, 1: 3, 1: 5 และ 1: 10 หลังจากการเก็บ 2 และ 10 วัน พบว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่ $74 \pm 0.3\%$ และ $42 \pm 4.5\%$ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการเจือจางที่ระดับอื่น ๆ และเมื่อทำการเก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น 20 และ 30 วัน น้ำเชื้อที่เก็บในอัตราการเจือจางที่ระดับต่าง ๆ มีอัตราการเคลื่อนที่ลดลงอย่างรวดเร็ว และพบว่าไม่มีอัตราการเคลื่อนที่ในอัตราการเจือจางที่ระดับต่าง ๆ หลังจากการเก็บ 40 วัน ยกเว้นการใช้อัตราการเจือจางที่ระดับ 1: 3 ยังมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิอยู่ 3% นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาอัตราการเจือจาง sperm: extender ในปลา Haddock, *Melanogrammus aeglefinus* โดยใช้ Modified Mounib's extender เป็นสาร extender ในอัตราการเจือจาง 1: 1, 1: 2, 1: 3, 1: 5 และ 1: 10 พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน การใช้อัตราการเจือจาง 1: 2 และ 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงถึง $71 \pm 1.2\%$ และ $77 \pm 0.6\%$ ตามลำดับ แต่ให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้อัตราการเจือจางที่ 1: 5 และ 1: 10 ($66 \pm 0.3\%$ และ $67 \pm 5.9\%$ ตามลำดับ) และเมื่อทำการเก็บยาวนานขึ้นถึง 10 วัน น้ำเชื้อที่ใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่ $52 \pm 2.2\%$ ซึ่งให้ผลสูงกว่าและแตกต่างจากน้ำเชื้อที่ใช้อัตราการเจือจางที่ระดับอื่น ๆ ที่มีอัตราการเคลื่อนที่เพียง 23-34% และเมื่อทำการเก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น 20 และ 30 วัน น้ำเชื้อที่เก็บในอัตราการเจือจางที่ระดับต่าง ๆ มีอัตราการเคลื่อนที่ลดลงอย่างรวดเร็ว และพบว่าไม่มีอัตราการเคลื่อนที่หลังจากการเก็บ 38 วัน ยกเว้นการใช้อัตราการเจือจางที่ 1: 3 ที่ยังมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ 3% และจากการศึกษาในปลา Ocean pout, *Macrozoarces americanus* L. โดยใช้สาร extender ที่มีส่วนประกอบดังต่อไปนี้ 183.0 mmol/l NaCl, 10.25 mmol/l KHCO_3 , 1.45 mmol/l CaCO_3 , 0.84 mmol/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.15 mmol/l glucose, pH 7.2-7.5, ออสโมลาลิตี 302 mOsm/kg ในอัตราการเจือจาง sperm: extender 3 ระดับ 1: 3, 1: 30 และ 1: 40 พบว่าหลังจากการเก็บ 0-2 วัน น้ำเชื้อที่ใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อที่ไม่ได้ทำการเจือจางกับสาร extender ($>70\%$) ในขณะที่การใช้อัตราการเจือจาง sperm: extender 1: 30 และ 1: 40 มีอัตราการเคลื่อนที่ลดลงต่ำกว่า 5% เมื่อทำการเก็บยาวนานขึ้น 5 วัน พบว่าน้ำเชื้อที่ไม่ได้ทำการเจือจางกับสาร extender มีอัตราการเคลื่อนที่ลดลงต่ำกว่า 5% ในขณะที่การใช้อัตราการเจือจาง sperm: extender 1: 3 ยังมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 70% (Yao, Richardson and Crim, 1999) ดังแสดงในภาพที่ 2.6 เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Walking catfish, *Clarias macrocephalus* โดยใช้ C-F HBSS เป็นสาร extender ในอัตราการเจือจาง sperm: extender 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 9 และ 1: 19 พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) การใช้อัตราการเจือจางแต่ละระดับมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน แต่ที่ระยะเวลาการเก็บตั้งแต่ 1-10 วัน พบว่าการใช้อัตราการเจือจางที่ระดับ 1: 1, 1: 2 และ 1: 4 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 9 และ 1: 19 (Vuthiphandchai, Thadsri and Nimrat, 2009)

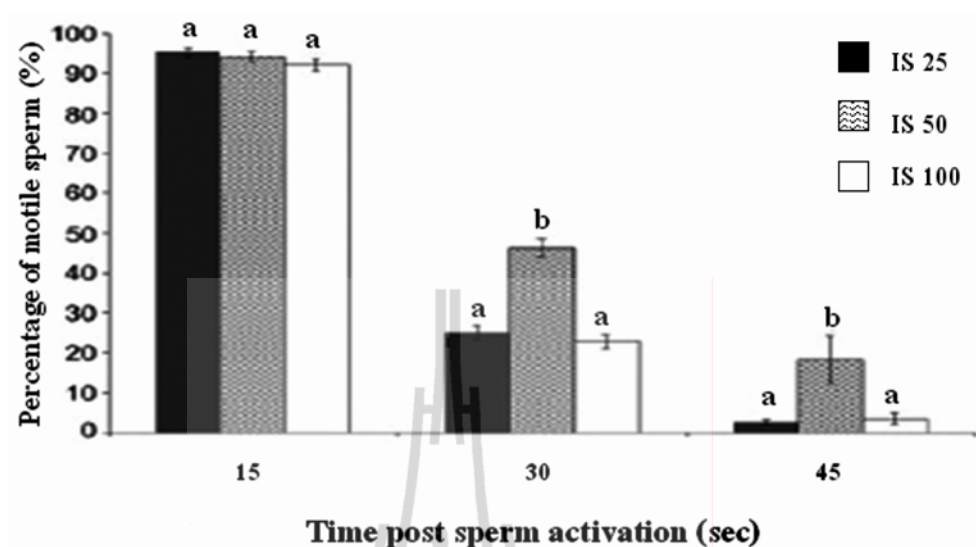


ภาพที่ 2.6 ผลของอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลา

Macrozoarces americanus L.

ที่มา: Yao et al. (1999)

และจากการศึกษาในปลา Tropical bagrid catfish, *Mystus nemurus* โดยการใช้ Physiological saline, Ringer และ Saline เป็นสาร extender ในอัตราการเจือจาง sperm: extender 1: 20, 1: 30 และ 1: 40 พบว่าการใช้ Physiological saline และ Ringer ที่อัตราการเจือจาง 1: 20 และ 1: 30 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ (Muchlisin et al., 2004) และจากการศึกษาในปลา European perch, *Perca fluviatilis* L. โดยใช้อิมโมบิลไลซิง โซลูชัน เป็นสาร extender ในอัตราการเจือจาง sperm: extender 1: 25, 1: 50 และ 1: 100 พบว่าหลังจากการกระตุ้นการเคลื่อนที่ 15 วินาที การใช้อัตราการเจือจางแต่ละระดับมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน แต่หลังจากการกระตุ้นการเคลื่อนที่ 30 และ 45 วินาที พบว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 50 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 25 และ 1: 100 (Alavi et al., 2007) ดังแสดงในภาพที่ 2.7



ภาพที่ 2.7 ผลของอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลา *Perca fluviatilis* L.

หมายเหตุ: ตัวอักษร ^{a, b} แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ที่มา: Alavi et al. (2007)

จากการศึกษาผลของอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น พบว่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสมจะขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เช่น ในช่วงระหว่าง 1: 1-1: 4 ซึ่งได้แก่ปลา Black sea bass, Atlantic cod, Haddock, Ocean pout และ Walking catfish และอัตราการเจือจาง sperm: extender ในช่วง 1: 20-1: 50 ได้แก่ ปลา Tropical bagrid catfish และ European perch แต่อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานในการศึกษาอัตราการเจือจาง sperm: extender ในปลานวลจันทร์น้ำจืด

2.5 ผลของชนิด และความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง

สาร cryoprotectant เป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็ง เนื่องจากสาร cryoprotectant สามารถป้องกันการแข็งตัวของน้ำภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งจะทำให้เสียคุณสมบัติ permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์ และความเป็นกรด-ด่าง สาร cryoprotectant มีหลายชนิด สารเหล่านี้มีความจำเป็นอย่างยิ่งต่อการมีชีวิตของน้ำเชื้อที่เก็บแบบแช่แข็ง ซึ่งแบ่งเป็น 2 กลุ่มดังนี้

2.5.1 สาร cryoprotectant ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (permeating cryoprotectant) คือ สารเคมีที่ต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ในขณะแช่แข็ง และละลาย สารเคมีกลุ่มนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M) ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), glycerol, methanol (MeOH) และ dimethyl acetamide (DMA) เป็นต้น สารเคมีในกลุ่มนี้มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่ง คือ เป็นพิษต่อเซลล์ และเนื้อเยื่อหากใช้ในระดับความเข้มข้นที่ไม่เหมาะสม

2.5.2 สาร cryoprotectant ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (non-permeating cryoprotectant) คือ สารเคมีที่ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์ และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าสาร cryoprotectant ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ ได้แก่ sucrose, polymers, starch และ proteins (egg-yolk and skim milk) เป็นต้น

กลไกการออกฤทธิ์ของสาร cryoprotectant สาร cryoprotectant จะมีผลกระทบต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งเมื่อเติมสาร cryoprotectant จะเกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของของเหลวภายในเซลล์ โดยเป็นเหตุให้ “จุดเยือกแข็ง” (boiling point) ลดลง ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวมีความสำคัญมากในการออกฤทธิ์ของสารเคมีเหล่านี้ โดยปกติตัวทำละลายในธรรมชาติ คือ น้ำ ที่แรงดัน 1 บรรยากาศ น้ำจะแข็งตัวที่ 0°C อย่างไรก็ตามธรรมชาติของของเหลวในร่างกาย และในเซลล์มีจุดเยือกแข็งต่ำกว่าของน้ำ และถ้ามีการเติมสาร cryoprotectant เข้าไปด้วยแล้ว จะยิ่งทำให้จุดเยือกแข็งต่ำลงไป ทำให้ของเหลวนั้น “เย็นจัดยิ่ง” ก่อนจะแข็งหรือก่อนการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง นอกจากนี้สาร cryoprotectant ยังช่วยเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกของของเหลวทั้งภายในหรือภายนอกเซลล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่เข้าสู่เซลล์ได้มากน้อยหรือไม่ได้เลย ซึ่งจากการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของของเหลวดังกล่าว จะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้ ทั้งนี้เนื่องจาก

- ป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ เนื่องจากการลดอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ส่งผลต่อของเหลวที่อยู่รอบเซลล์ และภายในเซลล์ ทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และนอกเซลล์ได้ หรือแม้แต่ทำให้เซลล์สูญเสียน้ำส่งผลให้ของเหลวภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูงจนเป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ ดังนั้นสาร cryoprotectant ที่เติมเข้าไปจะส่งผลให้ของเหลวภายในเซลล์แข็งตัวช้ากว่าปกติ และทำให้ในเซลล์มีปริมาณน้ำน้อยลง การเกิดเกล็ดน้ำแข็งก็ย่อมเกิดขึ้นน้อยตามไปด้วย (ปริมาณน้ำในเซลล์มากเกิดผลึกมากซึ่งเป็นผลเสียต่อเซลล์)

- ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ อันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของเกลือแร่ และอิเล็กโทรไลต์ เช่น glycerol ช่วยปรับเปลี่ยนความสมดุลของ Na^+ จากภายในเซลล์ และภายนอกเซลล์ โดยการขนส่ง Na^+ เข้าสู่เซลล์ เพราะขณะขนส่ง Na^+ เข้าสู่เซลล์ Na^+ สามารถจับกับน้ำ จึงเป็นการนำน้ำเข้าสู่เซลล์ด้วย อีกประการคือการแพร่ของสาร cryoprotectant เข้าสู่เซลล์เป็นการเข้าไปแทนที่น้ำที่แพร่

ออกจากเซลล์ เพราะความแตกต่างของแรงดันออสโมติกที่เปลี่ยนไป เนื่องจากการเกิดเกลือค้ำแข็งภายนอกเซลล์ก่อนที่ของเหลวภายในเซลล์จะแข็งตัว

- ช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ ยังไม่มีการอธิบายถึงกลไกการทำงาน อย่างไรก็ตามการควบคุมปริมาณและขนาดของเกลือค้ำแข็งที่เกิดขึ้น ย่อมเป็นกลไกอันหนึ่งที่ช่วยคงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ต่าง ๆ

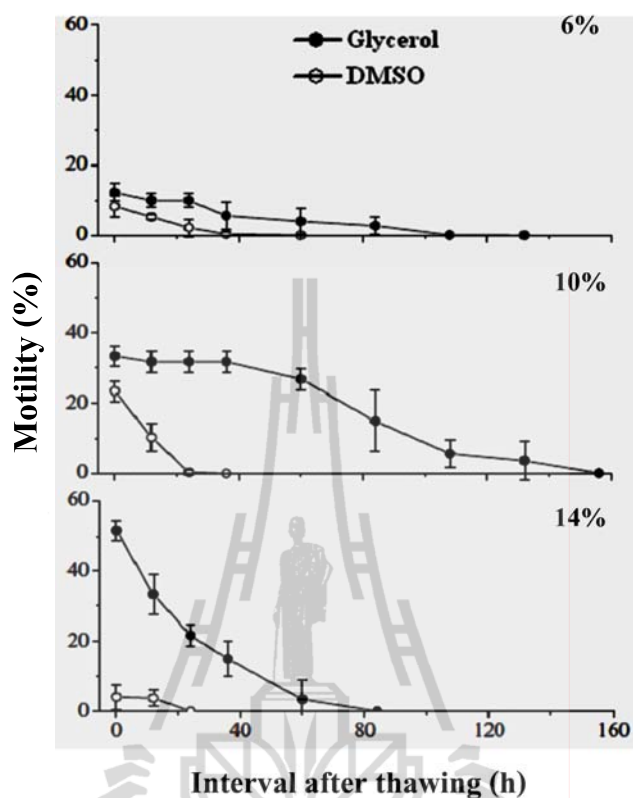
จากการรวบรวมเอกสารงานวิจัยพบว่านอกจากชนิดของสาร cryoprotectant แล้ว ระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ก็มีผลต่อคุณภาพของอสุจิในขณะการแช่แข็งเช่นเดียวกัน โดยจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Bagrid catfish, *Mystus nemurus* เมื่อใช้ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10% และ 15% ($32 \pm 2.8\%$ และ $28 \pm 2.8\%$ ตามลำดับ) ส่งผลให้เป็นพิษต่อเซลล์อสุจิมากกว่าที่ระดับความเข้มข้น 5% ($48 \pm 2.8\%$) โดยดูจากอัตราการเคลื่อนที่ลดลง (Muchlisin et al., 2004) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Christensen and Tiersch (2005) ศึกษาในปลา Channel catfish, *Ictalurus punctatus* พบว่าเมื่อใช้ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5% ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 48% ซึ่งให้ผลสูงกว่าที่ระดับความเข้มข้น 10% ที่มีอัตราการเคลื่อนที่เพียง 28% ดังนั้นในการศึกษาชนิดของสาร cryoprotectant จึงควรคำนึงถึงระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ด้วย ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสาร cryoprotectant หลายชนิด เช่น DMSO, DMA, MeOH และ glycerol ได้มีการใช้ และให้ผลดีในปลาหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานว่า DMSO เป็นสารที่นิยมใช้กันแพร่หลายในปลาหลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่ออัตราการปฏิสนธิประมาณ 50% (Horvath and Urbanyi, 2000; Kwantong and Bart, 2003) อย่างเช่นในปลา Common snook, *Centropomus undecimalis* ได้ใช้ DMA, DMSO, glycerol และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10% และใช้ Artificial seawater (ASW, 205 mOsmol/kg) เป็นสาร extender พบว่าการใช้ 5, 10% DMSO และ 5% MeOH มีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน (Tiersch, Wayman et al., 2004) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Matrinxa, *Brycon orthotaenia* โดยใช้สาร cryoprotectant 5 ชนิด ได้แก่ DMSO, propanediol, ethylene glycol, MeOH และ DMA ในระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ร่วมกับการใช้ 5% glucose+10% hen egg yolk เป็นสาร extender พบว่าการใช้ DMSO, propanediol, ethylene glycol ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ แต่พบว่าการใช้ MeOH และ DMA ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10% มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ที่ระดับความเข้มข้น 15% (Melo and Godinho, 2006) ดังแสดงในตารางที่ 2.3

ตารางที่ 2.3 ผลของชนิดและความเข้มข้นสาร cryoprotectant ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา *Brycon orthotaenia*

ความเข้มข้น (%)	สาร cryoprotectant				
	DMSO	propanediol	ethylene glycol	methanol	DMA
5	88.3±10.8	82.5±17.5	89.2±10.2	78.3±4.1 ^a	85.0±17.6 ^a
10	86.7±14.4	80.0±13.8	81.7±14.0	65.0±22.4 ^a	84.2±13.2 ^a
15	83.3±19.1	71.7±22.3	76.7±12.5	17.0±31.0 ^b	65.0±28.1 ^b

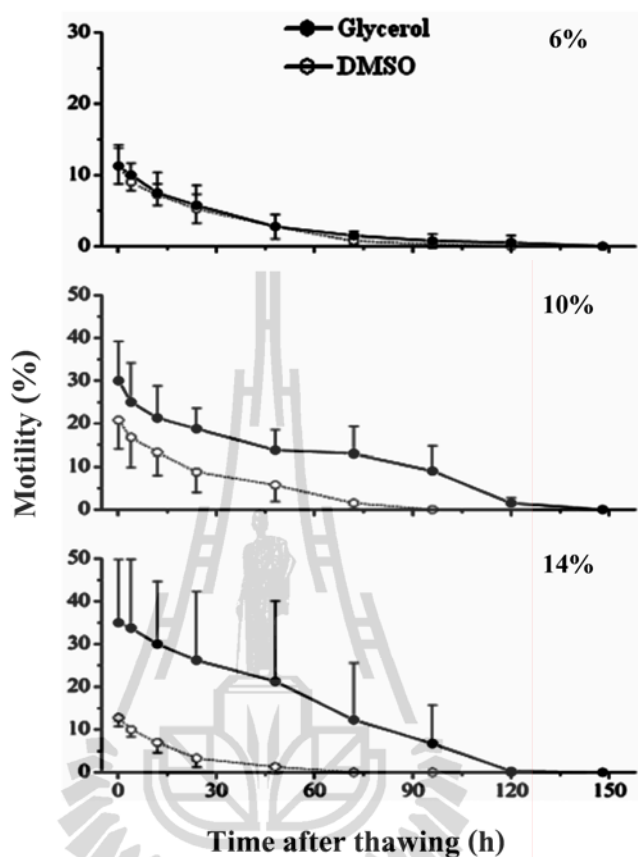
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$)
ที่มา: Melo and Godinho (2006)

ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Dreanno et al. (1997) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Turbot, *Scophthalmus maximus* แบบแช่แข็ง พบว่าการใช้ 10 และ 15% DMSO มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ glycerol, ethylene glycol และ MeOH เช่นเดียวกับการศึกษาของ Riley, Holladay, Chesney and Tiersch (2004) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Red snapper, *Lutjanus campechanus* แบบแช่แข็ง พบว่าการใช้ 10% DMSO มีอัตราการเคลื่อนที่ 71% ซึ่งให้ผลสูงกว่าการใช้ MeOH, DMA ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10% ที่มีอัตราการเคลื่อนที่เพียง 28-58% ($P < 0.05$) ตามลำดับ และจากการศึกษาในปลา Mandarin fish, *Siniperca chuatsi* โดยการใช้ DMSO, glycerol และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 8, 10 และ 12% พบว่าการใช้ DMSO ทั้ง 3 ความเข้มข้นมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ (Ding et al., 2008) นอกจากนี้จากการศึกษาในปลา Tropical bagrid catfish, *Mystus nemurus* โดยการใช้ MeOH, ethanol, glycerol และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% พบว่าการใช้ 10% MeOH มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ (Muchlisin et al., 2004) และจากการศึกษาของ Huang, Dong and Tiersch (2004) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Platyfish, *Xiphophorus couchianus* พบว่าการใช้ glycerol ที่ความเข้มข้น 6, 10 และ 14% ร่วมกับ HBSS (300 mOsm/kg) มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ DMSO ร่วมกับ HBSS (240 mOsm/kg) (ภาพที่ 2.8)



ภาพที่ 2.8 ผลของการใช้ DMSO และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 6, 10 และ 14% ต่ออัตราการเคลื่อนที่ในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา *Xiphophorus couchianus*
ที่มา: Huang, Dong and Tiersch (2004)

ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Huang, Dong, Walter and Tiersch (2004) ที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลา Green swordtail, *Xiphophorus helleri* พบว่าการใช้ 10 และ 14% glycerol มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ 10 และ 14% DMSO (ภาพที่ 2.9) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Yang, Hazlewood, Walter and Tiersch (2006) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Green swordtail, *Xiphophorus helleri* พบว่าการใช้ 10 และ 15% glycerol มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ 5% glycerol



ภาพที่ 2.9 ผลของการใช้ DMSO และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 6, 10 และ 14% ต่ออัตราการเคลื่อนที่ในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา *Xiphophorus helleri*

ที่มา: Huang, Dong, Walter et al. (2004)

แต่อย่างไรก็ตามสาร cryoprotectant ชนิดต่าง ๆ เหล่านี้ยังมีการศึกษากันน้อยมากในปลากลุ่ม carp ซึ่งได้แก่ การศึกษาในปลาไนพบว่าการใช้ 10% DMA ร่วมกับการใช้ BE2 original extender (ซึ่งประกอบด้วย 85 mM NaCl, 50 mM KCl, 3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂ ร่วมกับ 10% DMA และ 10% hen's egg yolk)+10% yolk เป็นสาร extender และ 15% DMA ร่วมกับการใช้ Kurokura+10% yolk เป็นสาร extender มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (Babiak, Glogowski, Brzuska, Szumiec and Adamk, 1997) และจากการศึกษาของ Linhart, Rodina and Cosson (2000) ได้ทำการศึกษาในปลาไนเช่นเดียวกัน โดยใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant ใช้ร่วมกับ Kurokura ซึ่งพบว่าให้อัตราการฟักไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด) และจากการศึกษาในปลาไนเช่นเดียวกันโดยการใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด ได้แก่ 15% DMSO, 15% DMA และ 15% glycerol ร่วมกับสาร extender 3 ชนิด ได้แก่ extender 1 (Kurokura et al., 1984), extender 2 (Zhang and Liu, 1991) และ

extender 3 (Cognie et al., 1989) พบว่าเมื่อใช้ 15% DMSO ร่วมกับ extender 1 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ แต่เมื่อผลอัตราการปฏิสนธิพบว่าการใช้ 15% DMA ร่วมกับ extender 3 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด (Akçay, Bozkurt, Secer and Tekin, 2004) และจากการศึกษาของ Horvath, Miskolczi and Urbanyi (2003) ซึ่งทำการศึกษาในปลาไนเช่นเดียวกัน โดยใช้สาร cryoprotectant 2 ชนิด ได้แก่ 10% MeOH และ 10% DMSO ร่วมกับสาร extender 5 ชนิด ได้แก่ sucrose, fructose, glucose, KCl และ Saline carp sperm extender พบว่า การใช้ 10% MeOH ร่วมกับการใช้ fructose และ glucose มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P>0.05$) นอกจากนี้ในการศึกษาในปลากลุ่ม carp ชนิดอื่น ๆ ซึ่งได้แก่การศึกษาในปลา Bleak, *Chalcalburnus chalcoides* โดยใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด ได้แก่ DMSO, MeOH และ ethylene glycol ในระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ร่วมกับ Buffered sperm motility-inhibiting saline พบว่า การใช้ 10% DMSO มีอัตราการเคลื่อนที่ $35.2\pm7.1\%$ ซึ่งสูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ (MeOH และ ethylene glycol ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% และ DMSO ที่ความเข้มข้น 5% และ 15%, $P<0.05$) (Lahnsteiner, Berger, Horvath, Urbanyi and Weismann, 2000) และจากการศึกษาในปลา Silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* โดยใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด ได้แก่ glycerol, methanol และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5, 7 และ 10% ร่วมกับสาร extender ที่มีส่วนประกอบของ NaCl 68.38 mmol/l, sodium citrate 27.20 mmol/l และ dextrose 11.01 mmol/l พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO มีอัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด ($>75\%$) และให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด, $>75\%$) (Alvarez et al., 2003) และการศึกษาในปลา Deccan mahseer, *Tor khudree* พบว่า การใช้ 10% DMSO ร่วมกับ extender 1, 2, 3 และ 4 มีอัตราการเคลื่อนที่หลังจากการเก็บ 5 และ 50 วัน สูงกว่าการใช้ 10% MeOH และ 10% propylene glycol (Basavaraja and Hegde, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Patil and Lakra (2005) ในปลา Deccan mahseer, *Tor khudree* เช่นเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO และ 9% DMSO+11% glycerol มีอัตราการปฏิสนธิ 73.5 ± 1.1 และ $73.0\pm2.0\%$ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ สำหรับอัตราการฟักพบว่า การใช้ 9% DMSO+10% glycerol และ 9% DMSO+11% glycerol มีอัตราการฟัก $42.4\pm1.2\%$ และ $45.6\pm1.9\%$ ตามลำดับ ซึ่งให้ผลสูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ (ตารางที่ 2.4) นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาในปลา Golden mahseer, *Tor putitora* ซึ่งพบว่า การใช้ 8% DMSO มีอัตราการปฏิสนธิ $73.3\pm1.7\%$ ซึ่งสูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ แต่สำหรับผลของอัตราการฟักพบว่า การใช้ 9% DMSO+10% glycerol และ 9% DMSO+11% glycerol มีอัตราการฟัก $42.1\pm1.6\%$ และ $45.0\pm1.3\%$ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ ($P<0.05$, ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่ออัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟัก
ในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา *Tor khudree* และ *Tor putitora*

สาร cryoprotectant	การปฏิสนธิ (%)		การฟัก (%)	
	<i>Tor khudree</i>	<i>Tor putitora</i>	<i>Tor khudree</i>	<i>Tor putitora</i>
8% DMSO	73.5±1.1 ^a	73.3±1.7 ^a	32.3±0.5 ^b	32.4±0.5 ^b
9% DMSO	64.2±3.5 ^{bc}	64.8±1.4 ^b	30.6±1.4 ^b	33.1±1.6 ^b
10% glycerol	48.7±1.8 ^c	51.6±2.2 ^c	25.9±1.6 ^c	26.0±1.5 ^c
11% glycerol	61.5±0.7 ^c	63.7±0.7 ^b	23.4±1.1 ^c	22.9±0.9 ^c
8% DMSO+10% glycerol	53.1±0.9 ^d	54.5±1.7 ^c	28.9±1.3 ^b	29.5±1.8 ^{bc}
8% DMSO+11% glycerol	49.0±0.8 ^c	53.2±1.7 ^c	30.1±1.1 ^b	30.7±1.5 ^b
9% DMSO+10% glycerol	68.1±1.3 ^b	66.8±3.5 ^b	42.4±1.2 ^a	42.1±1.6 ^a
9% DMSO+11% glycerol	73.0±2.0 ^a	65.5±2.9 ^b	45.6±1.9 ^a	45.0±1.3 ^a
กลุ่มควบคุม	86.1±1.3	84.3±1.9	71.1±0.6	73.5±1.2

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

($P < 0.05$) extender คือ modified BWB (Biggers et al. 1971) extenders

ที่มา: Patil and Lakra (2005)

จากการศึกษาผลของการใช้สาร cryoprotectant ในปลากลุ่ม carp พบว่าประสิทธิภาพของสาร cryoprotectant ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และยังขึ้นอยู่กับชนิดของสาร extender และชนิดของปลา

2.6 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมเท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย (Mazur, 1997) ในขบวนการแช่แข็ง และการละลายน้ำเชื้อปลาเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และเคมีของความร้อน และการแพร่เข้า-ออกของน้ำระหว่างเซลล์ และตัวกลาง โดยเมื่อมีการลดอุณหภูมิต่ำถึง 0°C หรือต่ำกว่าเพียงเล็กน้อย (ประมาณ -0.5°C) ของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์จะยังไม่แข็งตัว ดังนั้น

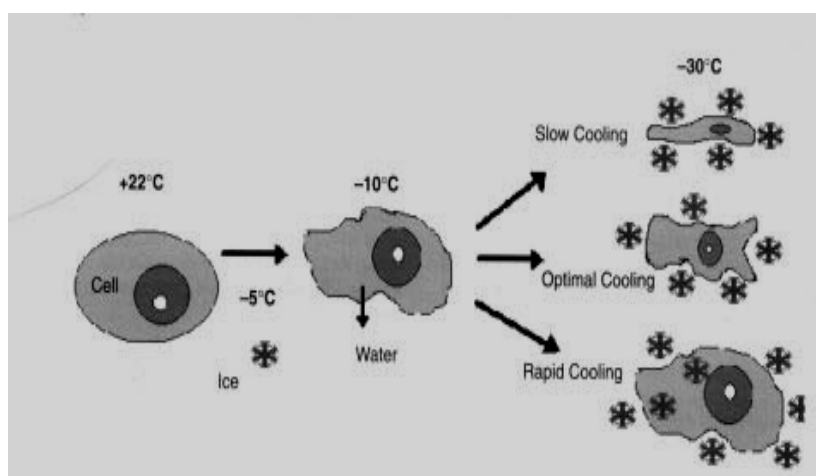
ของเหลวรอบเซลล์และเซลล์จะอยู่ในสภาพที่เย็นจัด ปกติเซลล์จะคงอยู่ในสภาพเย็นจัดได้นานต่อไป ขณะที่ของเหลวรอบ ๆ เซลล์เริ่มมีเกล็ดน้ำแข็งหรืออีกนัยหนึ่งก็คือการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ เกิดขึ้นช้ากว่าการเกิดเกล็ดน้ำแข็งในของเหลวรอบ ๆ เซลล์ ผลต่อเนื่องมาจากปรากฏการณ์นี้ก็คือ

- ตัวถูกละลายในของเหลวรอบ ๆ เซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้นตามปริมาณการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง ในขณะที่ยังไม่เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงสูญเสียน้ำเพราะความไม่สมดุลของแรงดันออสโมติก

- ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิช้าเกินไป เซลล์ก็จะสูญเสียน้ำ ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง หรือทำให้เซลล์เหี่ยว และทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ถูกทำลายเนื่องจากเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์ถูกตีแตกโดยเกล็ดน้ำแข็ง (ภาพที่ 2.10) วิธีหนึ่งที่จะช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำมากเกินไป อาจทำได้โดยการชักนำให้เกิดผลึกน้ำแข็งเร็วขึ้น

- ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเร็วเกินไป จะทำให้น้ำภายในเซลล์เคลื่อนที่ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้น้อย ส่งผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์ และออร์แกเนลล์ถูกผลึกน้ำแข็งตีแตกได้ หรืออาจจะมีการช็อค (cold shock, ภาพที่ 2.10)

จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการแช่แข็งอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าหรือเร็วต่างก็ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ทั้งนั้น ดังนั้นอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมย่อมจะทำให้ตัวอย่างเซลล์แช่แข็งมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้นได้ ซึ่งอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้น คืออัตราการลดอุณหภูมิที่พอเหมาะที่จะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ หรือถ้าเกิดขึ้นก็ให้น้อยที่สุด



ภาพที่ 2.10 ผลของการลดอุณหภูมิต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

ที่มา: www.dels.nas.edu/.../41_4/Mechanisms.shtml

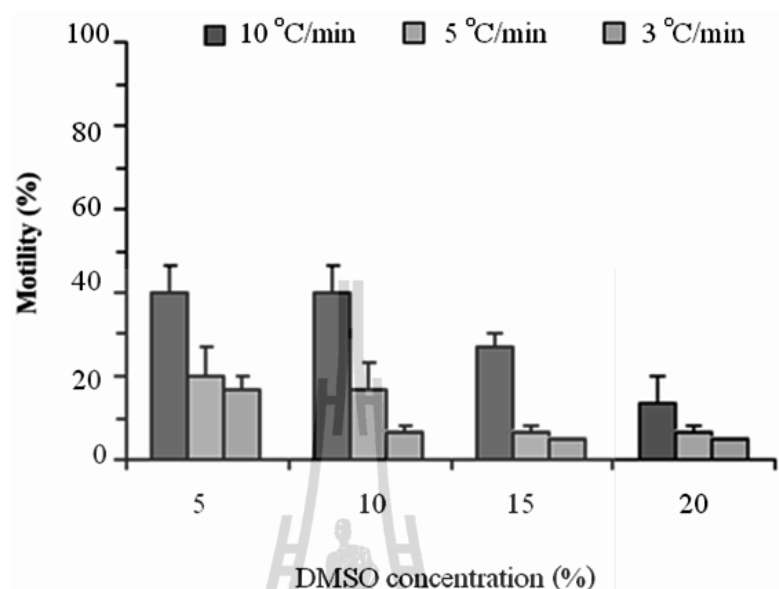
โดยทั่ว ๆ ไปการลดอุณหภูมิ แบ่งออกเป็น 3 วิธี คือ

1) การอิงไอน์โตรเจนเหลว (LN_2 vapour) โดยจะมีตะแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อเหนือระดับไอน์โตรเจนเหลวที่บรรจุอยู่ในภาชนะ และสามารถปรับระดับตะแกรงสำหรับวางหลอดน้ำเชื้อขึ้นลงได้ตามระดับ และอุณหภูมิที่ต้องการ ซึ่งวิธีนี้มีข้อเสีย คือ ในกรณีที่มียาวอย่างมากเกินไปอาจทำให้การกระจายของไอน์โตรเจนเหลวไม่ทั่วถึง ซึ่งจะทำให้ น้ำเชื้อที่เก็บรักษานั้นมีคุณภาพต่ำ

2) การใช้ freezer control วิธีการนี้มีหลักการ คือ การพ่นไอน์โตรเจนเหลวเข้าไปในห้องเล็ก ๆ (chamber) ที่มีฉนวนอยู่โดยรอบ อัตราการพ่นไอน์โตรเจนเหลวเข้าไปขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่ต้องการ ซึ่งการใช้ freezer control ในการลดอุณหภูมิจึงเป็นวิธีที่สะดวกในการนำไปใช้ และการแช่แข็งด้วยวิธีนี้นิยมบรรจุน้ำเชื้อในหลอดฟาง (straw)

3) การลดอุณหภูมิแบบ pellet method ทำได้โดยหยดตัวอย่างลงบนภาชนะมีลักษณะเป็นถาดหลุม ที่วางอยู่บนน้ำแข็งแห้ง (-79°C) ประมาณ 10 นาที ตัวอย่างจะแข็งตัว และมีลักษณะเป็นเม็ด และนำเม็دنน้ำเชื้อนั้นไปเก็บในไอน์โตรเจนเหลว (-196°C) (พริสคัลล์, 2529) ในปัจจุบันไม่เป็นที่นิยม เพราะไม่สะดวกในการละลาย ซึ่งจะต้องผสมสารละลายเจือจางแล้วบรรจุหลอดน้ำเชื้อก่อนนำไปใช้ อีกทั้งไม่สะดวกในการบันทึกข้อมูลของตัวอย่างที่ศึกษา

ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าได้มีการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในปลาหลายชนิด อย่างเช่นในปลา Black ear catfish, *Pangasius larnaudii* โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ $10^\circ\text{C min}^{-1}$ จาก 25°C ถึง -20°C เมื่อใช้ DMSO ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับการใช้ C-F HBSS เป็นสาร extender พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^\circ\text{C min}^{-1}$ มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าและแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 และ 5°C min^{-1} ในทุกระดับความเข้มข้นของ DMSO (Codcharat, Nimrat and Vuthiphandchai, 2005) ดังแสดงในภาพที่ 2.11



ภาพที่ 2.11 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ One-step freezing rate ต่ออัตราการเคลื่อนที่ในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา *Pangasius larnaudii*

ที่มา: Codcharat et al. (2005)

ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Medaka, *Oryzias latipes* เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 5°C ถึง -80°C โดยใช้ 10% MeOH เป็นสาร cryoprotectant มีอัตราการเคลื่อนที่ $(50 \pm 10\%)$ สูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 5, 15, 20 และ $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 5°C ถึง -80°C (Yang, Norris, Winn and Tiersch, 2010) และยังให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 25°C ถึง -80°C มีอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ $12^{\circ}\text{C min}^{-1}$ เมื่อใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant (Vuthiphandchai, Chomphuthawach and Nimrat, 2009) และการศึกษาในปลา Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* โดย Kwantong and Bart (2003) พบว่าเมื่อใช้การลดอุณหภูมิ One-step freezing rate ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C) มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ Two-step freezing rate ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 3°C ถึง -4°C , $11^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -4°C ถึง -80°C ; $P > 0.05$, ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ One-step และ Two-steps ต่ออัตราการปฏิสนธิ ในน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา *Pangasius hypophthalmus*

สาร extender	DMSO (%)	การปฏิสนธิ (%)	
		One-step	Two-steps
HBSS	8	26.00±3.83	14.36±2.13
	10	28.49±0.74	16.26±4.49
	12	18.34±0.71	13.71±1.00
C-F HBSS	8	33.13±6.67	23.5±8.04
	10	27.11±1.02	21.64±3.25
	12	39.14±3.76	16.28±1.01
0.9% NaCl	8	29.14±1.04	13.98±1.69
	10	37.94±2.05	19.24±1.15
	12	40.77±1.65	24.79±3.43
กลุ่มควบคุม		50.58±3.75	50.58±3.75

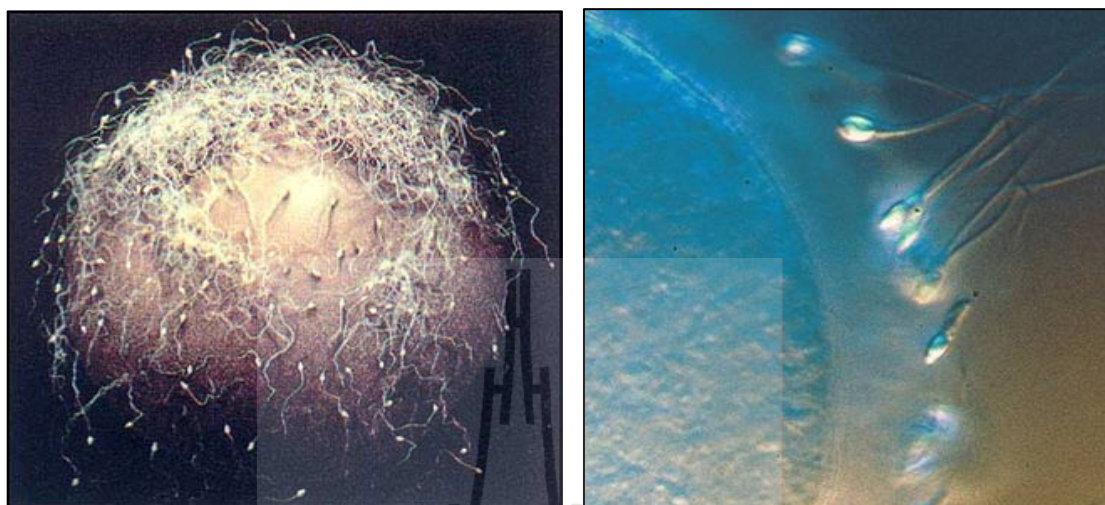
ที่มา: Kwantong and Bart (2003)

นอกจากนี้ในปลา Platyfish, *Xiphophorus couchianus* พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 5°C ถึง -80°C มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 5 และ $45^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ($P<0.05$) (Huang, Dong and Tiersch, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Huang, Dong, Walter et al. (2004) ที่ทำการศึกษาในปลา Green swordtail, *Xiphophorus helleri* พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 5°C ถึง -80°C มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 5 และ $45^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ($P<0.05$) สำหรับการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในปลากลุ่ม carp ได้แก่ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน โดยใช้ น้ำแข็งแห้ง (Dry ice, อุณหภูมิ -79°C) พบอัตราการรอดสูงที่สุด 90.6% เมื่อใช้ Kurokura extender+10% egg yolk และมี 10% DMA เป็นสาร cryoprotectant (Babiak et al., 1997) นอกจากนี้ Linhart et al. (2000) พบว่าอัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไน ($52\pm9\%$) ไม่มีความแตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($50\pm18\%$) เมื่อใช้การลดอุณหภูมิที่ Two-steps และ Akcay et al. (2004) พบว่าเมื่อใช้การลดอุณหภูมิโดยการอิง ไอไนโตรเจนเหลว โดยให้ straw เหนือจาก liquid nitrogen 3 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที มีอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไนเพียง 26% และจากการศึกษาของ Warnecke and Pluta (2003) ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในปลาไนเช่นเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ Three-steps

($5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 2°C ถึง -7°C , $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -7°C ถึง -30°C และ $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -30°C ถึง -80°C) มีอัตราการเคลื่อนที่ $40\pm 6\%$ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ One-step ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 2°C ถึง -50°C) เมื่อใช้ Modified Kurokura's extender 2 (MK2)+200 mM Sucrose และ MK2+300 mM Sucrose นอกจากนี้ในการศึกษาในปลา Zebrafish, *Danio rerio* ซึ่งเป็นปลากลุ่ม carp เช่นเดียวกัน พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 5°C ถึง -80°C มีอัตราการเคลื่อนที่ 35% ซึ่งให้ผลสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ที่พบอัตราการเคลื่อนที่เพียง 1% เท่านั้น เมื่อใช้ 8% MeOH เป็นสาร cryoprotectant (Yang et al., 2007) จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าวิธีการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากลุ่ม carp ยังมีความหลากหลายและผลที่ได้ก็แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการหาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงจำเป็นสำหรับปลากลุ่มนี้ โดยเฉพาะในปลานวลจันทร์น้ำจืดซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อน

2.7 จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

ในการผสมเทียมจะต้องใช้จำนวนอสุจิต่อไข่หนึ่งฟอง หรือ sperm: egg ratio ที่เหมาะสม ทั้งนี้เนื่องจากหากจำนวน sperm: egg ratio มากเกินไป จะส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง เนื่องจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้ไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Rurangwa, Volckaert, Huyskens, Kime and Ollevier, 2001; Silveira et al., 2006; Butts, Trippel and Litvak, 2009) แต่ในทางกลับกันพบว่าหากจำนวน sperm: egg ratio น้อยเกินไป ทำให้จำนวนอสุจิไม่เพียงพอที่จะส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเช่นเดียวกัน (Linhardt et al., 2006; Rurangwa et al., 2001; Silveira et al., 2006) ดังแสดงในภาพที่ 2.12 และจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีการใช้ปริมาณน้ำเชื้อผสมกับไข่เกินความจำเป็น (Lahnsteiner and Patzner, 1996) อีกทั้งการศึกษ้อัตราส่วนของ sperm: egg ratio ที่เหมาะสมสำหรับปลาแต่ละชนิดมีน้อยมาก ด้วยเหตุนี้ในการศึกษาล้างนี้จึงได้ทำการศึกษ้อัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำเชื้อแช่แข็ง และน้ำเชื้อสด ที่ใช้ผสมกับไข่หนึ่งใบในปลานวลจันทร์น้ำจืด ซึ่งพบว่ามีน้ำเชื้อน้อย จึงควรทราบอัตราส่วนน้ำเชื้อปลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผสมกับไข่หนึ่งใบ เพื่อให้เกิดการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุด



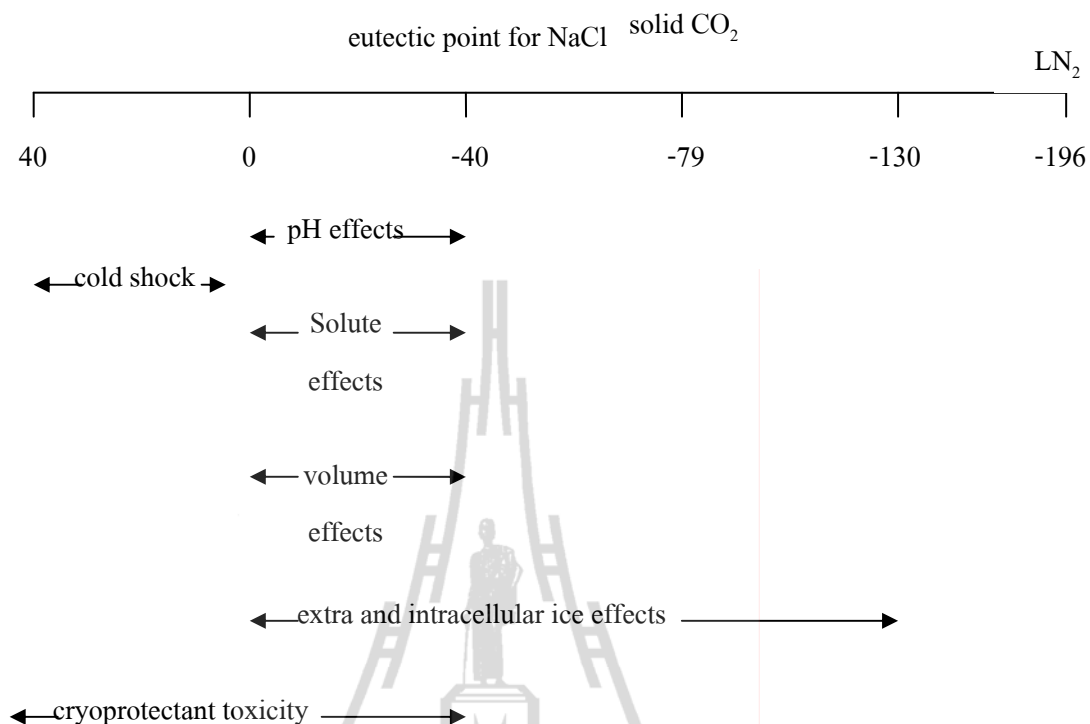
(ก)

(ข)

ภาพที่ 2.12 การเกิด polyspermy (ก) และ จำนวนอสุจิที่น้อยเกินไป (ข)

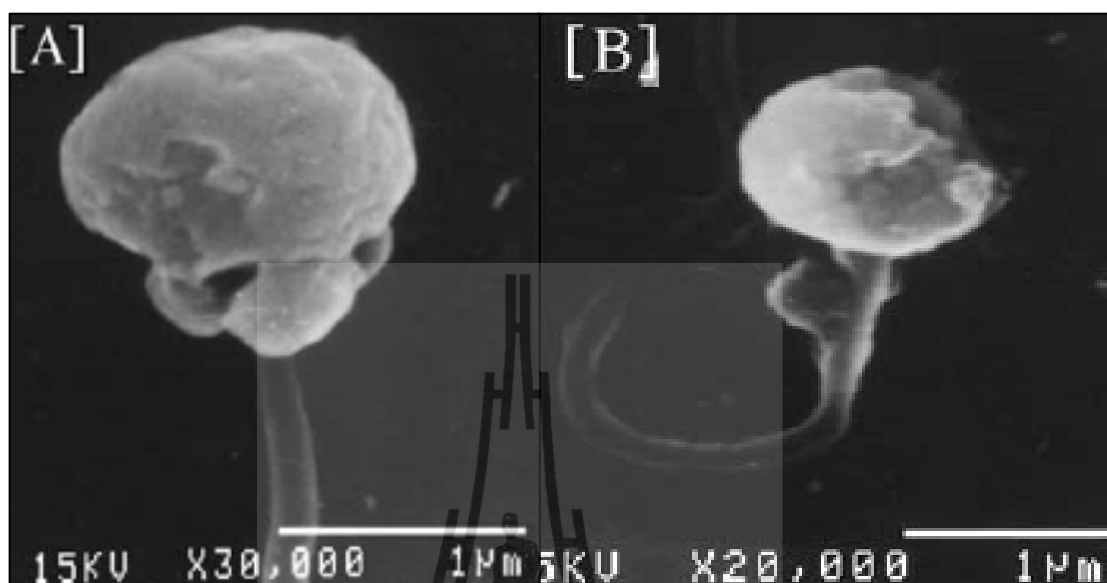
ที่มา: www.dhushara.com/paradoxhtm/biology/ovtst.jpg

โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งพบว่าจะต้องใช้จำนวนอสุจิมากกว่าการใช้น้ำเชื้อสด ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีอัตราการตาย และความผิดปกติของอสุจิมากกว่าในน้ำเชื้อสด (Dreanno et al., 1997; Lahnsteiner, Weismann and Patzner, 1997; Ding et al., 2008; Lahnsteine, Berger and Weismann 2003; Lahnsteiner, Mansour and Weismann, 2002) เนื่องจากในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ จะเกิดอันตรายกับเซลล์อสุจิ เช่น อันตรายจากผลของ pH, solute, อันตรายที่เกิดจากความเป็นพิษของสาร cryoprotectant และอันตรายที่เกิดจากการสูญเสียน้ำ และการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และนอกเซลล์ดังแสดงในภาพที่ 2.13 (Leung in Jamieson, 1991)



ภาพที่ 2.13 ปัจจัยที่มีผลต่อเซลล์อสุจิ ณ อุณหภูมิต่าง ๆ ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ
ที่มา: Leung in Jamieson (1991)

อย่างเช่น ในการศึกษาของ Muchlisin and Azizah (2009) ได้ศึกษาลักษณะของอสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง และเก็บในไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 1 ปี 1 เดือน พบว่าการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างอสุจิ โดยเฉพาะส่วนหัว พบมีรอยแตกหรือบวมของเซลล์เมมเบรนบริเวณ cytoplasmic membrane และส่วนกลางของอสุจิ (midpiece) ซึ่งเป็นที่อยู่ของ mitochondria จะมีลักษณะบวม และอสุจิบางตัวพบว่าส่วนของเซลล์เมมเบรนขาดหายไป หรือในบางเซลล์พบว่าการบวมของ cytoplasm ซึ่งจะแตกต่างกับโครงสร้างของอสุจิที่ปกติ และจากการศึกษาดังกล่าวยังพบว่าในน้ำเชื้อแช่แข็งมีจำนวนอสุจิที่ผิดปกติถึง 60-80% ในขณะที่น้ำเชื้อสดมีความผิดปกติเพียง 13% เท่านั้น ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Ji et al. (2004) ที่ทำการศึกษาโครงสร้างของอสุจิหลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็งพบว่าในน้ำเชื้อแช่แข็งมีการเปลี่ยนแปลงโดยเฉพาะที่บริเวณส่วนหัว จะเห็นได้ว่าในส่วนของเซลล์เมมเบรนขาดหายไป และในส่วนของ midpiece จะมีลักษณะบวม (ภาพที่ 2.14B) เมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด (ภาพที่ 2.14A)



ภาพที่ 2.14 ลักษณะโครงสร้างของอสุจิในปลา Sea perch ถ่ายโดยกล้อง SEM ในน้ำเชื้อสด (A) และในน้ำเชื้อแช่แข็ง (B)

ที่มา: Ji et al. (2004)

ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าได้มีการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ในปลาบางชนิด ได้แก่ ปลา Sea bass, *Dicentrarchus labrax* พบว่าการใช้น้ำเชื้อสด 3.5×10^4 - 2.0×10^5 sperm: egg ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ แต่ในการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 7.0×10^4 และ 2.0×10^5 sperm: egg มีอัตราการปฏิสนธิ 30% และ 35% ตามลำดับ ซึ่งมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 3.5×10^4 ซึ่งมีอัตราการปฏิสนธิที่เพียง 22% และยังพบว่ามีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด (34%) (Fauvel, Suquet, Dreanno, Zonno and Menu, 1998) ต่อมา Dreanno et al. (1997) ศึกษาในปลา Turbot, *Scophthalmus maximus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเพิ่มขึ้น 2×10^4 sperm: egg ทำให้อัตราการปฏิสนธิเพิ่มขึ้นกว่าการใช้ที่ระดับ 3×10^3 และ 6×10^3 sperm: egg ทั้งในการใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง (ตารางที่ 2.6) แต่ในปลาชนิดเดียวกันในการศึกษาของ Chen, Ji, Yu, Tian and Sha (2004) พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อสด 1×10^3 - 5×10^3 sperm: egg ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ แต่ในการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 2×10^3 และ 5×10^3 sperm: egg ($50.5 \pm 0.21\%$ และ $52.1 \pm 0.84\%$ ตามลำดับ) มีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 1×10^3 sperm: egg ($47.9 \pm 0.35\%$) (ตารางที่ 2.6) แต่จากการศึกษาในปลา Sea perch, *Lateolabrax japonicus* พบว่าในการใช้จำนวน sperm: egg ratio ที่ระดับ 2×10^4 - 3.2×10^5 sperm: egg ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักทั้งการใช้น้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อแช่แข็ง (ตารางที่ 2.6) (Ji et al., 2004) ต่อมาจากการศึกษาในปลา Mandarin

fish, *Siniperca chuatsi* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อสด 1×10^4 - 1×10^5 sperm: egg ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟัก แต่ในการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 1×10^5 sperm: egg มีอัตราการปฏิสนธิ $66.01 \pm 5.14\%$ และอัตราการฟัก $54.76 \pm 4.40\%$ ซึ่งให้ผลสูงกว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 1×10^4 - 5×10^4 sperm: egg ซึ่งมีอัตราการปฏิสนธิเพียง 38-56% และอัตราการฟัก 32-45% และยังไม่ให้ผลแตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (ตารางที่ 2.6) (Ding et al., 2008)

ตารางที่ 2.6 ผลของ sperm: egg ratio ต่ออัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็ง

ชนิดปลา	sperm: egg ratio	การปฏิสนธิ (%)		การฟัก (%)		อ้างอิง
		น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อแช่แข็ง	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อแช่แข็ง	
<i>Scophthalmus maximus</i>	3×10^3 : 1	63.7 ± 5.2^b	52.6 ± 6.8^b			Dreanno et al. (1997)
	6×10^3 : 1	66.7 ± 4.7^b	52.3 ± 6.2^b	-	-	
	2×10^4 : 1	70.2 ± 4.6^a	67.5 ± 3.8^a			Chen et al. (2004)
	1×10^3 : 1	56.4 ± 2.33	$47.9 \pm 0.35^*$			
	2×10^3 : 1	56.8 ± 0.63	50.5 ± 0.21	-	-	
<i>Lateolabrax japonicus</i>	5×10^3 : 1	58.9 ± 16.0	52.1 ± 0.84			Ji et al. (2004)
	2×10^4 : 1	67.2 ± 4.2^a	61.3 ± 5.6^c	79.9 ± 8.3^b	91.5 ± 1.3^d	
	4×10^4 : 1	67.7 ± 0.9^a	61.5 ± 1.5^c	79.9 ± 12.5^b	87.2 ± 10.2^d	
	8×10^4 : 1	65.0 ± 3.3^a	64.1 ± 0.7^c	81.8 ± 9.3^b	91.7 ± 8.3^d	
<i>Siniperca chuatsi</i>	3.2×10^5 : 1	66.9 ± 5.4^a	63.2 ± 1.9^c	85.8 ± 2.0^b	89.8 ± 0.4^d	Ding et al. (2008)
	1×10^4 : 1	54.91 ± 4.95^{aA}	38.76 ± 4.25^{cB}	44.18 ± 5.13^{aA}	32.16 ± 7.14^{cA}	
	2×10^4 : 1	59.39 ± 8.16^{aA}	42.81 ± 2.23^{cB}	48.94 ± 8.79^{aA}	36.15 ± 3.14^{cA}	
	5×10^4 : 1	69.06 ± 15.70^{aA}	56.50 ± 2.10^{bA}	59.40 ± 17.26^{aA}	45.50 ± 2.31^{bA}	
	1×10^5 : 1	69.42 ± 8.11^{aA}	66.01 ± 5.14^{aA}	59.82 ± 5.27^{aA}	54.76 ± 4.40^{aA}	

หมายเหตุ: ตัวอักษร ^{a, b, c, d, *} ในแถวแนวนั่ง และ ^{A, B} ในแถวแนวนอน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Lahnsteiner et al. (2002) ที่ทำการศึกษาในปลา Burbot, *Lota lota* พบว่าเมื่อมีการใช้จำนวน sperm: egg ratio ที่ระดับ 1.7×10^6 - 6.9×10^6 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักสำหรับการใช้น้ำเชื้อสด แต่ในการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งกลับพบว่าจะต้องใช้ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งถึง 2 และ 4 เท่า ของน้ำเชื้อสด คือ ต้องใช้ถึง 3.5×10^6 และ 6.9×10^6 sperm: egg ตามลำดับ จึงจะมีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับการใช้น้ำเชื้อสด แต่ทั้งนี้ไม่มีผลต่ออัตราการฟัก (ตารางที่ 2.7) และใน

การศึกษาของ Rana and MaAndrew (1989) ทำการศึกษาอัตราส่วน sperm: egg ratio ของปลานิล พบว่าอัตราส่วนน้ำเชื้อแช่แข็ง 0.14×10^6 : 1 เป็นสัดส่วนที่เหมาะสม

ตารางที่ 2.7 ผลของ sperm: egg ratio ต่ออัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งของปลา *Lota lota*

sperm: egg ratio	การปฏิสนธิ (%)	การฟัก (%)
control (น้ำเชื้อสด)		
6.9×10^6 : 1	61.5 ± 2.9^a	52.0 ± 5.6^a
3.5×10^6 : 1	63.0 ± 2.7^a	53.6 ± 0.6^a
1.7×10^6 : 1	60.9 ± 5.2^a	54.6 ± 3.1^a
น้ำเชื้อแช่แข็ง		
6.9×10^6 : 1	56.9 ± 4.5^{ab}	55.2 ± 3.8^a
3.5×10^6 : 1	55.0 ± 2.1^{ab}	56.1 ± 5.3^a
1.7×10^6 : 1	52.9 ± 6.5^b	51.8 ± 4.1^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ที่มา: Lahnsteiner et al. (2002)

นอกจากนี้สำหรับในปลากลุ่ม carp ซึ่งยังมีการศึกษาอัตราส่วน sperm: egg ratio น้อยมาก ได้แก่ การศึกษาของ Lahnsteiner et al. (2003) ซึ่งทำการศึกษาในปลา 5 ชนิด ได้แก่ *Chalcalburnus chalcalburnus*, *Chondrostoma nasus*, *Rutilus meidingerii*, *Barbus barbatus* และ *Cyprinus carpio* ซึ่งพบว่าการใช้จำนวน sperm: egg ratio ที่ระดับต่าง ๆ ในปลาแต่ละชนิดไม่มีผลต่ออัตราการฟักสำหรับการใช้น้ำเชื้อสด แต่ในการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งในปลาแต่ละชนิดพบว่าเมื่อมีการเพิ่มจำนวน sperm: egg ratio ขึ้นจากเดิมครั้งหนึ่งทำให้มีอัตราการฟักเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ยกเว้นในปลา *Cyprinus carpio* พบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ที่ระดับ 2.6×10^6 sperm: egg ให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ที่ระดับ 1.3×10^6 (ตารางที่ 2.8)

ตารางที่ 2.8 ผลของ sperm: egg ratio ต่ออัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลากลุ่ม carp

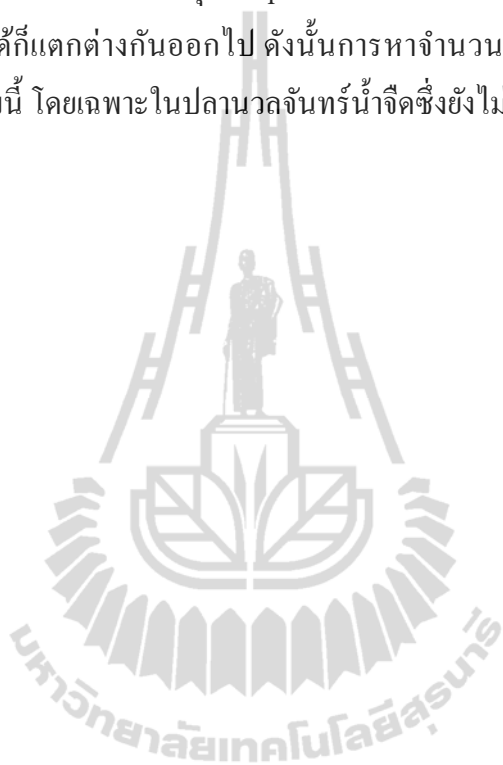
ชนิดปลา	sperm: egg ratio	การฟัก (%)		
		น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อแช่แข็ง	
			straw 0.5 ml	straw 1.2 ml
<i>Chalcalburnus chalcalburnus</i>				
Trial 1	2.5×10 ⁶ : 1	97.5±0.8 ^a	75.2±6.3 ^b	n.i.
	1.2×10 ⁶ : 1	98.5±0.5 ^a	62.7±8.6 ^c	n.i.
Trial 2	2.3×10 ⁶ : 1	68.5±7.7 ^a	63.1±2.6 ^a	63.3±5.2 ^a
	1.2×10 ⁶ : 1	66.2±3.5 ^a	49.9±5.5 ^b	n.i.
Trial 3	1.3×10 ⁶ : 1	91.4±1.2 ^a	79.2±8.5 ^b	76.5±4.5 ^b
	0.7×10 ⁶ : 1	88.0±3.5 ^a	68.5±7.3 ^c	n.i.
<i>Chondrostoma nasus</i>	2.2×10 ⁶ : 1	70.9±5.2 ^a	66.4±1.8 ^a	75.4±1.0 ^a
	1.1×10 ⁶ : 1	72.5±11.4 ^a	36.9±1.7 ^b	n.i.
	0.6×10 ⁶ : 1	65.0±4.3 ^a	28.6±2.8 ^c	n.i.
<i>Rutilus meidingerii</i>	2.5×10 ⁶ : 1	74.5±5.8 ^a	63.6±2.9 ^b	66.6±5.3 ^b
	1.3×10 ⁶ : 1	77.0±5.3 ^a	55.4±5.4 ^c	n.i.
<i>Barbus barbatus</i>	2.6 × 10 ⁶ : 1	90.9±0.4 ^a	80.3±5.8 ^b	82.5±7.9 ^b
	1.3 × 10 ⁶ : 1	89.3±4.7 ^a	54.9±4.5 ^c	n.i.
<i>Cyprinus carpio</i>	2.6 × 10 ⁶ : 1	57.5±18.2 ^a	55.1±12.4 ^a	60.3±2.4 ^a
	1.3 × 10 ⁶ : 1	59.2±10.5 ^a	20.4±8.7 ^a	n.i.

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในปลาแต่ละชนิด, n.i.: not investigated

ที่มา: Lahnsteiner et al. (2003)

จากการรวบรวมและวิเคราะห์เอกสารงานวิจัยครั้งนี้ พบว่าเมื่อมีการใช้จำนวน sperm: egg ratio ลดลง จะทำให้มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักลดลง ทั้งนี้เป็นเพราะถ้ามีจำนวน sperm: egg ratio ที่น้อยเกินไป ทำให้จำนวนอสุจิไม่เพียงพอ ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักลดลง

และยังพบว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจะต้องใช้ในจำนวนที่มากกว่าการใช้น้ำเชื้อสด ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีอัตราการตาย และความผิดปกติของอสุจิมากกว่าในน้ำเชื้อสด ซึ่งพบว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจะใช้ในจำนวนที่มากกว่าการใช้น้ำเชื้อสดประมาณ 2 เท่า นอกจากนี้ยังพบว่าจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมยังขึ้นอยู่กับชนิดของปลาอีกด้วย จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมในปลากลุ่ม carp ยังมีการศึกษาน้อยอยู่ และแต่ละชนิดยังมีความหลากหลาย ซึ่งผลที่ได้ก็แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการหาจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมจึงจำเป็นสำหรับปลากลุ่มนี้ โดยเฉพาะในปลานวลจันทร์น้ำจืดซึ่งยังไม่มีการศึกษา



บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษากการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด (*Cirrhinus microlepis*) โดยวิธีการเก็บแบบระยะสั้นและแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง มีการดำเนินงานวิจัยทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ในส่วนของห้องปฏิบัติการใช้ห้องปฏิบัติการสรีรและกายวิภาคสัตว์ อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และห้องปฏิบัติการของสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม และภาคสนามสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม เป็นสถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย โดยการศึกษาครั้งนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

- 1.1 ศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น
- 1.2 ศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ (time storage) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

- 2.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง
- 2.2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทั้งแบบระยะสั้นและระยะยาว มีการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ

การทดลองที่ 3 ศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

3.1 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

3.2 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

โดยใช้วัสดุอุปกรณ์หลัก สารเคมี พร้อมทั้งวิธีการศึกษาดังนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

- 1) หลอดนํ้าจืดและเข็มฉีด
- 2) โกร่งบดฮอร์โมน
- 3) เปลใส่ปลา
- 4) ถังพลาสติกขนาด 30×80 เซนติเมตร
- 5) ผ้าขนหนู
- 6) กระดาษ
- 7) ขวดพลาสติกขนาด 1.25 ลิตร
- 8) glass petri dish
- 9) ขนไก่
- 10) กระดิกน้ำแข็ง
- 11) หลอดพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด
- 12) vortex mixer
- 13) Fiske Associates Osmometer รุ่น 210
- 14) ตู้เย็น
- 15) slides และ cover slips
- 16) ไม้จิ้มฟัน
- 17) micro pipettes ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
- 18) small and large pipette tips
- 19) hemacytometer
- 20) หลอดแช่แข็ง (french straws) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร
- 21) forcept

- 22) ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 23) beaker ขนาด 25, 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
- 24) graduated cylinders ขนาด 250 มิลลิลิตร
- 25) glass stirring rod
- 26) volumetric flask ขนาด 25 และ 250 มิลลิลิตร
- 27) ขวดสีชา ขนาด 50 มิลลิลิตร
- 28) ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร
- 29) liquid nitrogen containers dewar 20 XT (Taylor-Wharton U.S.A.)
- 30) liquid nitrogen storage with dispenser
- 31) cryobath
- 32) cryochamber
- 33) cryocane
- 34) cryo gloves
- 35) freezer control (CL 3300)
- 36) compound microscope and stereo microscope
- 37) computer and software operating manual (cryogenesis version 4 for windows)
- 38) Hach pH Meter รุ่น EC10
- 39) universal high speed centrifuges รุ่น Z 323 K

3.2 สารเคมี

- 1) น้ำกลั่น
- 2) ไนโตรเจนเหลว
- 3) sodium chloride (NaCl)
- 4) potassium chloride (KCl)
- 5) calcium chloride dihydrate ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
- 6) sodium hydrogen carbonate (NaHCO_3)
- 7) magnesium sulphate heptahydrate ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 8) disodium hydrogen phosphate heptahydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)
- 9) potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
- 10) sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)
- 11) tris-Hydroxymethyl-Methylamine ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)

- 12) glucose ($C_6H_{12}O_6$)
- 13) dimethyl sulfoxide (DMSO, $(CH_3)_2SO$)
- 14) dimethyl acetamide (DMA, $CH_3C(O)N(CH_3)_2$)
- 15) glycerol ($C_3H_5(OH)_3$)
- 16) methanol (MeOH, CH_3OH)
- 17) luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRHa; Suprefact)
- 18) domperidone (Motilium M)
- 19) human chorionic gonadotropin (HCG)
- 20) eosin B
- 21) nigrosin
- 22) sodium citrate dihydrate
- 23) gilson solution
- 24) น้ำยาเช็ดเลนส์
- 25) น้ำยาเคลือบเลนส์
- 26) oil

3.3 วิธีการศึกษา

3.3.1 การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์

เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม ก่อนทำการทดลองต้องคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืดที่สมบูรณ์เพศ และแข็งแรง จากบ่อดินมาพักไว้ในถังไฟเบอร์กลาส ขนาด 2 ลูกบาศก์เมตร โดยแยกเพศผู้และเพศเมียเพื่อทำการฉีดฮอร์โมน โดยมีวิธีการตรวจสอบความสมบูรณ์เพศ และวิธีการฉีดฮอร์โมนของพ่อแม่พันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืดดังต่อไปนี้ คือ

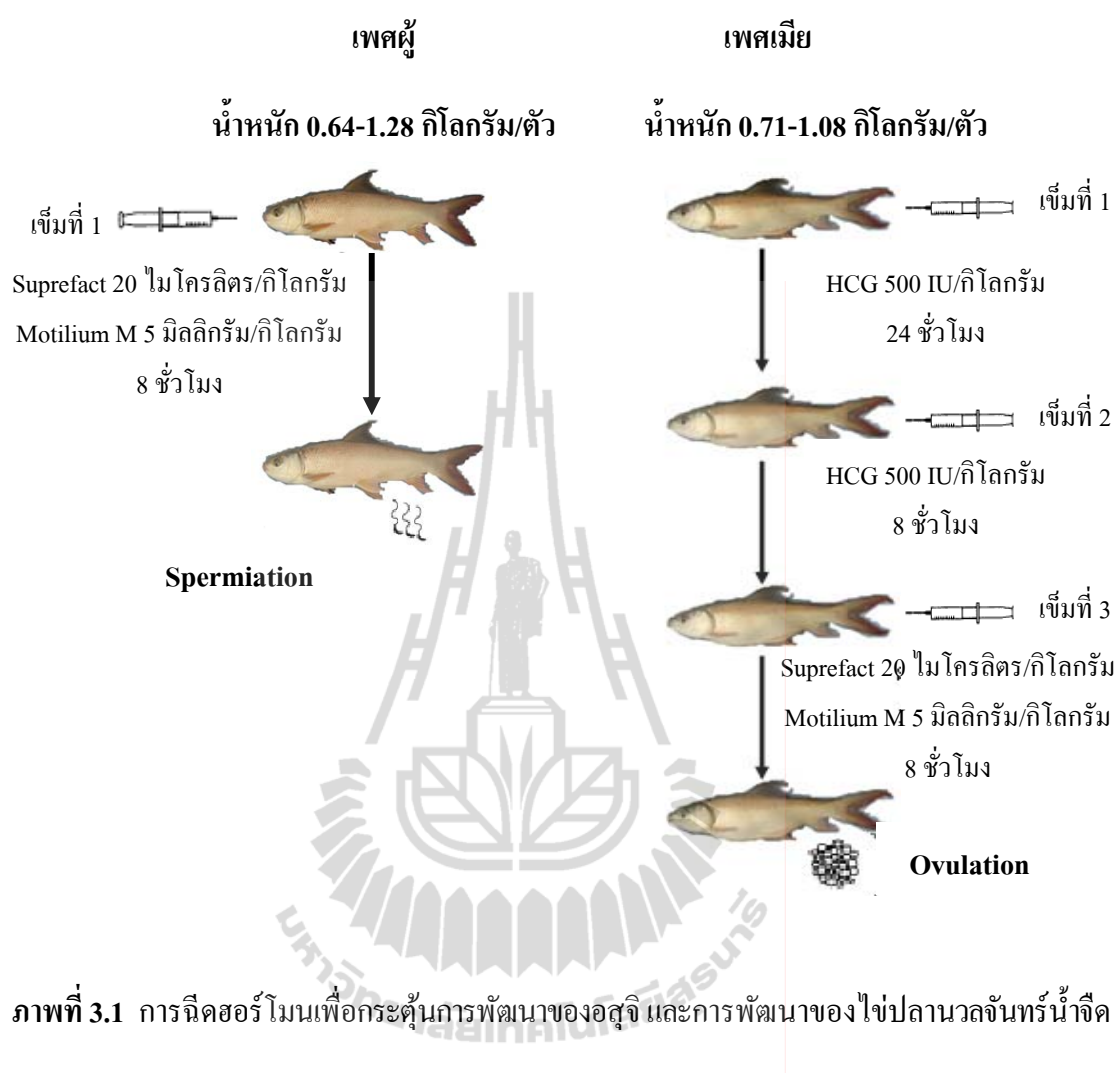
- ปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศผู้

ลักษณะส่วนท้องไม่มน พื้นท้องจะแข็งกว่าเพศเมีย ช่องเพศมีลักษณะเป็นรูปวงรี แคบ เล็กสีแดงอ่อน เมื่อใช้มือบีบที่ช่องเพศเบา ๆ จะมีน้ำเชื้อสีขาวไหลออกมาเห็นได้ชัดเจน นำพ่อแม่พันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืดที่แข็งแรงสมบูรณ์เพศมาทำการฉีดฮอร์โมน โดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa, Suprefact) ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ domperidone (Motilium M) โดยใช้ Suprefact 20 ไมโครลิตร/กิโลกรัม ร่วมกับ Motilium M 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หลังจากนั้น 6-8 ชั่วโมง ทำการรีดน้ำเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 3.1 โดยใช้ micro pipettes ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ดูดน้ำเชื้อ (ภาพที่ 3.2, ก) ก่อนทำการรีดน้ำเชื้อควรใช้ผ้าขนหนูสะอาดเช็ดตัวปลาให้แห้ง และใช้กระดาษทิชชูซับบริเวณตึงเพศ (urogenital pore) เพื่อ

ป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ เลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ น้ำเชื้อที่นำมาทำการเก็บรักษาจะต้องไม่ปนเปื้อนจากสิ่งดังกล่าว และมีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป

- ปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศเมีย

ลักษณะส่วนท้องอูมเป่ง กลม นูนออกมาเห็นได้ชัด พื้นท้องนูนมาก ลักษณะช่องเพศเป็นรูปวงรี กว้างและใหญ่กว่าเพศผู้ นอกจากการสังเกตภายนอกแล้ว ยังต้องมีการสุมตัวอย่าง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไข่ด้วยเวอร์เนียร์มิเตอร์ โดยใช้ flexible catheter ดูดไข่ออกมาใส่ในขวดที่มีน้ำยา gillson เพื่อเป็นการ fix ไข่ จากนั้นนำมาวัดขนาดไข่ ถ้าพบว่าไข่มีขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอ และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ประมาณ 1.4 มิลลิเมตร จึงนำมาฉีดฮอร์โมนเร่งการตกไข่ โดยใช้ human chorionic gonadotropin (HCG) ฉีด HCG 2 เข็ม เข็มละ 500 IU/กิโลกรัม โดยเข็มที่ 2 ห่างจากเข็มแรก 24 ชั่วโมง หลังจากฉีดเข็มที่ 2 แล้ว 8 ชั่วโมง ฉีด Suprefact 20 ไมโครลิตร/กิโลกรัม ร่วมกับ Motilium M 5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หลังจากนั้น 8 ชั่วโมง ทำการรีดไข่ดังแสดงในภาพที่ 3.1 ก่อนทำการรีดไข่ควรใช้ผ้าขนหนูที่สะอาดทำความสะอาดตัวปลา และใช้กระดาษทิชชูซับบริเวณดังเพศ แล้วใช้ภาชนะที่แห้ง และสะอาดรองรับไข่ (ภาพที่ 3.2, ข) เพื่อนำไปทดสอบอัตราการปฏิสนธิ โดยไข่ที่นำมาใช้ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิจะต้องไม่มีการปนเปื้อนจากน้ำ เลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ ซึ่งไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืดควรมีลักษณะกลม มีขนาดที่สม่ำเสมอ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.6 มิลลิเมตร สีเขียวอมเทา หรือสีเหลืองอำพัน และไข่ไม่เกาะกันเป็นก้อน



(ก)



(ข)

ภาพที่ 3.2 การรีดน้ำเชื้อ (ก) การรีดไข่ (ข)

3.3.2 การศึกษาส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาทำการ centrifuged ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที โดยการใช้เครื่อง universal high speed centrifuges รุ่น Z 323 K (Hermle Labortechnik, Wehingen, Germany) หลังจากการ centrifuged จะสังเกตเห็นได้ว่าตัวอย่างน้ำเชื้อมีการแยกออกเป็นสองส่วน โดยส่วนล่างจะมีลักษณะสีขาวขุ่น คือ ตัวอสุจิ และส่วนบนจะมีลักษณะเป็นน้ำใส คือ seminal plasma ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนของ seminal plasma ใส่ cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร สำหรับนำมาวัดค่าออสโมลาลิตี และค่า pH โดยทำการวัดค่าออสโมลาลิตีด้วยเครื่อง Fiske Associates Osmometer รุ่น 210 (Fiske Associates, Massachusetts, USA) และวัดค่า pH ด้วยเครื่อง Hach pH Meter รุ่น EC10 (Hach, Loveland, USA) ส่วน seminal plasma ที่เหลือนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°C สำหรับนำไปศึกษาส่วนประกอบของไอออนชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำเชื้อปลา ซึ่งได้แก่ แคลเซียม และแมกนีเซียม โดยใช้เครื่อง Cobas Integra 800 (Roche, Mannheim, Germany) และทำการวิเคราะห์ โซเดียม, โพแทสเซียม, และคลอไรด์ ด้วยเครื่อง NOVA 4 CRT (Nova Biomedical, Waltham, USA)

3.3.3 การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ โดยศึกษาจากลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

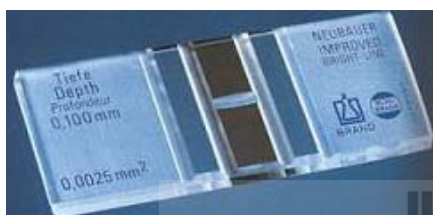
3.3.3.1 ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

ควรสังเกตทันทีหลังจากรีดน้ำเชื้อออกมา โดยดูสี ความเข้มข้น และสิ่งเจือปน เช่น น้ำเลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น และไม่มีสิ่งเจือปน

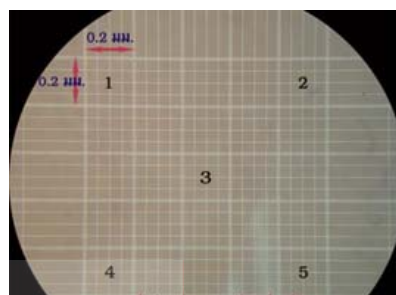
3.3.3.2 การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)

การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อหาได้โดยเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยสาร extender (0.9% NaCl) ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสาร extender เท่ากับ 1: 1,500 เท่า ขณะที่ทำการดูน้ำเชื้อควรใช้กระดาศที่ชุบน้ำเชื้อส่วนเกินที่ติดมากับ pipette tips จากนั้นนับจำนวนอสุจิ โดยใช้สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (hemacytometer) ภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 40 เท่า นับจำนวนอสุจิจากมุมบน-ล่าง ทั้ง 4 มุม และช่องตรงกลาง รวม 5 ช่อง ดังแสดงในภาพที่ 3.3 แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตร ดังนี้

$$\text{จำนวนอสุจิ/มิลลิลิตร} = (\text{รวมจำนวนอสุจิที่นับได้ทั้ง 5 บริเวณ}/5) \times 25 \times \text{dilution rate} \times 10^4$$



(ก)



(ข)

ภาพที่ 3.3 สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (hemacytometer, (ก)) ภาพแสดงตำแหน่งที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1, 2, 3, 4 และ 5, (ข))

ที่มา: <http://shopping.akasdoctor.com/onlinestore/detail.cfm?ID=MEDICARECNR>

3.3.3.3 การศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility)

นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ เพื่อดูอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ การศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิทำได้โดยการหยดน้ำกลั่น 1 หยด (5 ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ และหยดน้ำเชื้อ 1 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยน้ำมาแตะกับน้ำเชื้อเพียงเล็กน้อย แล้วสังเกต การเคลื่อนที่ภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 10 เท่า โดยมีเกณฑ์การเคลื่อนที่ของ อสุจิ ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 หลักเกณฑ์การสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

หลักเกณฑ์	คะแนน	การเคลื่อนที่ (%)
อสุจิทุกตัวเคลื่อนที่	4	100
อสุจิส่วนใหญ่เคลื่อนที่ (3/4)	3	75
อสุจิบางตัวเคลื่อนที่ (2/4)	2	50
อสุจิส่วนใหญ่ไม่เคลื่อนที่ มีเพียงเล็กน้อยที่เคลื่อนที่ (1/4)	1	25
อสุจิไม่มีการเคลื่อนที่	0	0

ดัดแปลงจาก: Guest (1973)

3.3.3.4 การศึกษาการมีชีวิตของอสุจิ (viability)

การศึกษาการมีชีวิตของอสุจิทำได้โดยวิธีการย้อมสี eosin-nigrosin ซึ่งส่วนประกอบสีย้อมแสดงในตารางที่ 3.2 และมีวิธีการเตรียมสีย้อมดังนี้

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบของสีย้อม eosin-nigrosin

ส่วนประกอบสารเคมี	ปริมาณ
eosin B	1 กรัม
nigrosin	5 กรัม
sodium citrate dihydrate	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

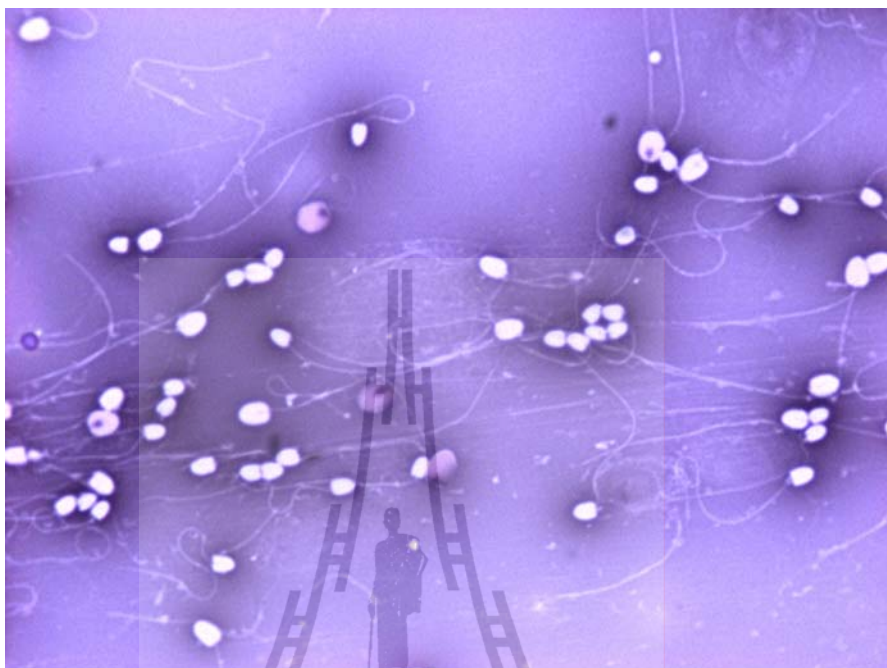
ที่มา: Hambananda (1996)

วิธีการเตรียมสีย้อมสำหรับดูตัวเป็นตัวตายสามารถเตรียมได้ดังนี้

ชั่ง eosin B 1 กรัม nigrosin 5 กรัม sodium citrate dehydrate 1.5 กรัม ใส่ใน beaker และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้องให้ความร้อนขณะเตรียมสาร เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรองจนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ แล้วนำสีย้อมที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนการศึกษาอัตราการมีชีวิตมีขั้นตอนดังนี้

- หยดสี eosin-nigrosin ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) แล้วหยดน้ำเชื้อลงข้าง ๆ สีย้อมประมาณ 1 ไมโครลิตร
- ใช้เข็มเขี่ยคนน้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากัน จากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบาง ๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว
- นำแผ่นสไลด์ที่เกลี่ยแล้ว ผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง
- หยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยดแล้วปิดด้วย cover slips จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า
- นับจำนวนอสุจิตัวเป็นและตัวตายโดยการสุ่มนับ 5 บริเวณ ๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่อสุจิตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาวไม่ติดสีย้อม ส่วนอสุจิตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม ดังแสดงในภาพที่ 3.4

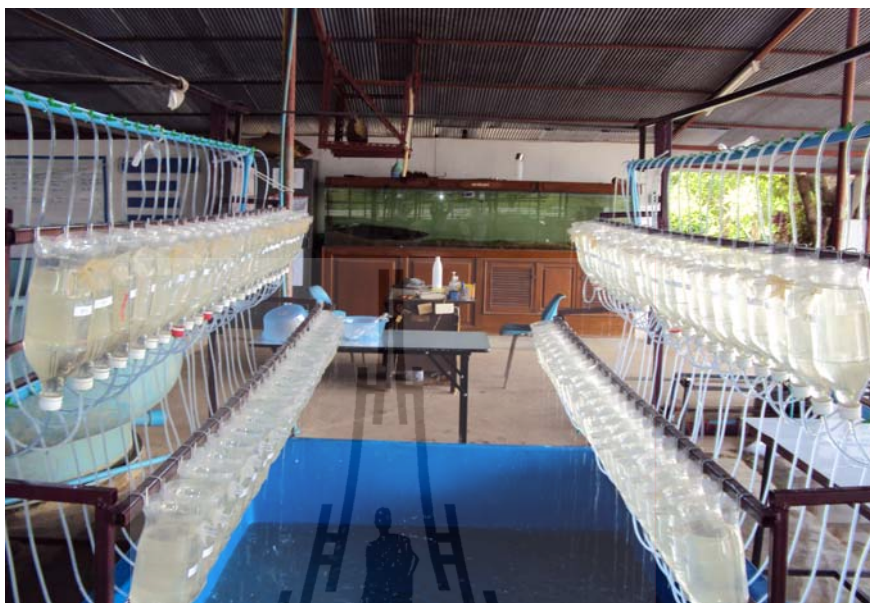


ภาพที่ 3.4 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิที่ตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี eosin-nigrosin ส่องภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า

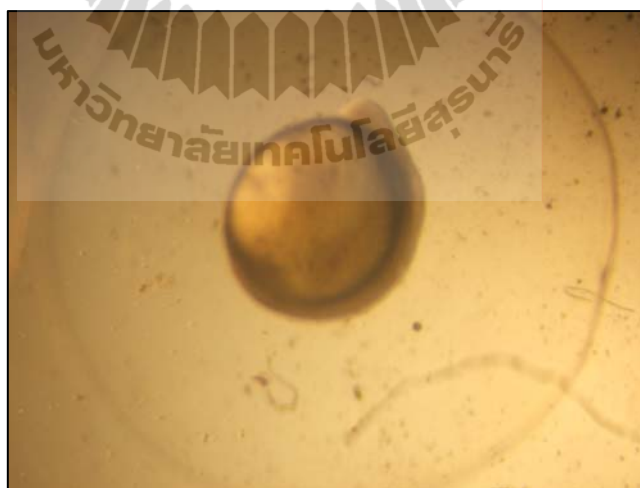
3.3.3.5 การศึกษาการปฏิสนธิ (fertilization)

การศึกษาการปฏิสนธิเป็นการทดสอบความสามารถของอสุจิในการผสมกับไข่ โดยการนำแม่ปลานวลจันทร์น้ำจืดมารีดไข่ หลังจากการฉีดฮอร์โมนเข็มที่ 3 แล้ว 8 ชั่วโมง ซึ่งลักษณะไข่ปลาที่ดีจะมีสีเขียว หรือสีเหลืองอำพัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.6 มิลลิเมตร ใช้ไมโครปิเปตดูดไข่ 200 ไมโครลิตร (มีไข่จำนวน 129 ± 6.69 ฟอง) ใส่จานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตร คุณน้ำเชื้อสด หรือน้ำเชื้อที่ทำการเก็บรักษาทั้งแบบระยะสั้น และแบบระยะยาว (ตามรายละเอียดในแต่ละการทดลอง) ลงไปผสมกับไข่ ใช้ชนไก่คนไข่ และน้ำเชื้อให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำเพาะฟักลงไป 5 มิลลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที แล้วใช้ชนไก่เขี่ยไข่จากจานแก้วใส่ลงในขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร ที่มีการไหลเวียนของน้ำตลอดเวลาขณะทำการเพาะฟัก ดังแสดงในภาพที่ 3.5 หลังจากนั้น 8 ชั่วโมง ทำการตรวจนับการปฏิสนธิที่ระยะ gastrula stage ดังแสดงในภาพที่ 3.6 และคำนวณหาอัตราการปฏิสนธิตามสมการดังนี้

$$\text{การปฏิสนธิ (\%)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่เจริญถึงระยะ gastrula stage} \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}}$$



ภาพที่ 3.5 ขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร และระบบการฟักไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืด



ภาพที่ 3.6 การพัฒนาของคัพภะปลานวลจันทร์น้ำจืดระยะ gastrula stage (8 ชั่วโมง)

3.3.4 ขั้นตอนและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ

1) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

1.1 ศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

นวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) ทำการเตรียมสาร extender 10 ชนิด ได้แก่ Kurokura medium (KU), Modified Cortland solution (MC), Calcium-Free Hanks' balanced salt solution (C-F HBSS), Modified fish Ringer' s solution (MFR), 0.9% NaCl, Hanks' balanced salt solution (HBSS), Sperm motility inhibiting saline medium (SM), Immobilizing Saad solution (Saad), glucose (350 mM) และ Immobilizing solution (IM) ตามส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.3 วัดค่าออสโมลาลิตี และค่า pH หลังจากนั้นนำสาร extender ที่เตรียมแล้วใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

2) นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาเจือจางกับสาร extender ทั้ง 10 ชนิด ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender 1: 3 ใน cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการปั่นด้วยเครื่อง mixer และเก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4°C จากนั้นทำการทดสอบการเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของน้ำเชื้อที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ (6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง) ดังแผนการทดลองในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบทางเคมีของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

สารเคมี (mM)	สาร extender									
	KU	MC	C-F HBSS	MFR	0.9% NaCl	HBSS	SM	Saad	glucose (350 mM)	IM
NaCl	128.4	112.07	153.28	129.31	155.17	137.93	75.00	200.00	-	200.00
KCl	2.70	40.54	5.95	13.51	-	5.41	70.00	-	-	-
CaCl ₂ .2H ₂ O	1.40	2.06	-	1.46	-	1.10	2.00	-	-	-
NaHCO ₃	2.40	2.38	4.64	-	-	4.17	-	-	-	2.38
MgSO ₄ .7 H ₂ O	-	-	0.89	1.92	-	0.81	1.00	-	-	-
Na ₂ HPO ₄ . 7 H ₂ O	-	-	0.49	-	-	0.45	-	-	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	0.52	-	-	0.44	-	-	-	-
Glucose	-	-	6.17	5.56	-	5.56	-	-	350.00	-
NaH ₂ PO ₄	-	-	-	3.42	-	-	-	-	-	-
Tris-Hydro*	-	-	-	-	-	-	20.00	30.00	30.00	-
pH	8.11±0.1	8.00±0.04	7.84±0.04	5.25±0.04	6.88±0.2	8.00±0.02	9.90±0.04	9.63±0.1	8.54±0.1	8.55±0.04
Osmolality	250.33±1.5	285.33±0.6	308.33±0.6	280.67±1.5	286.00±1	280.33±0.6	291.67±1.5	397.00±2	403.67±0.6	369.00±1

หมายเหตุ : * Tris-Hydroxymethyl-Methylamine (NH₂C(CH₂OH)₃), KU; Kurokura medium, MC; Modified Cortland solution, C-F HBSS; Calcium-Free Hanks' balanced salt solution, MFR; Modified fish Ringer's solution, HBSS; Hanks' balanced salt solution, SM; Sperm motility inhibiting saline medium, Saad; Immobilizing Saad solution, IM; Immobilizing solution

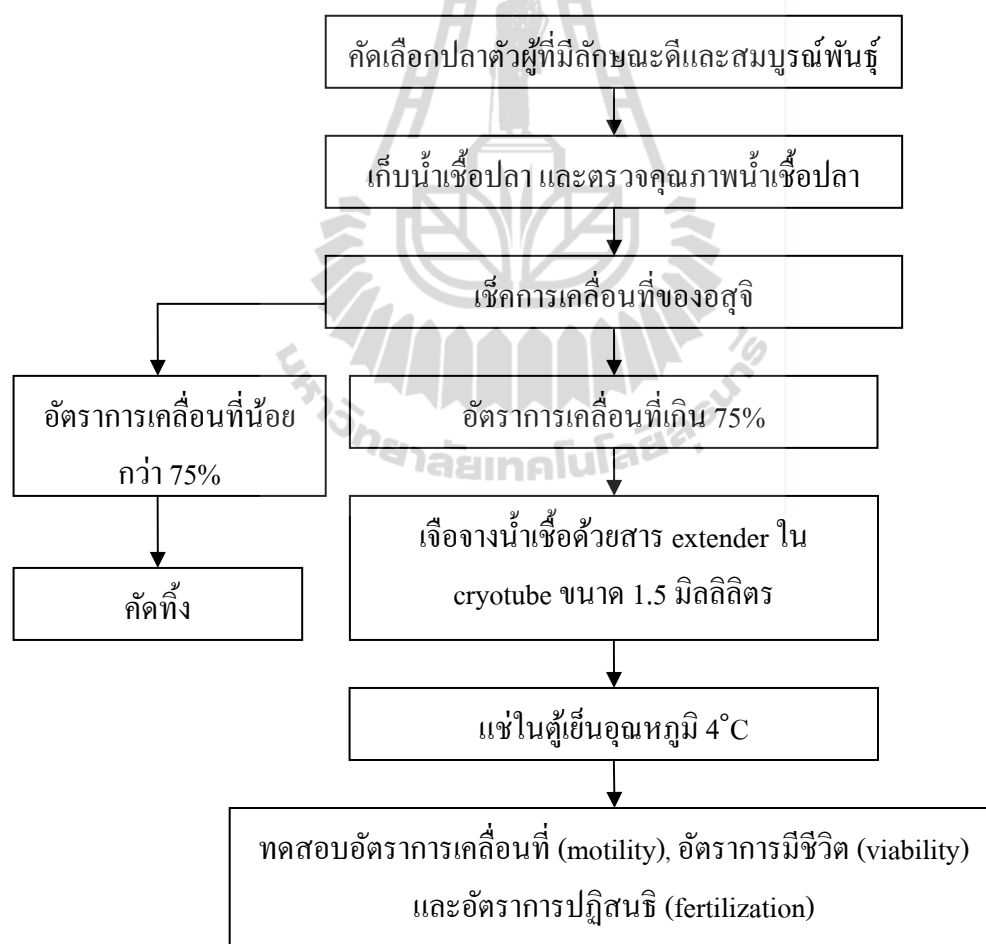
ตารางที่ 3.4 แผนการทดลองผลของสาร extender 10 ชนิด (KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น โดยทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง

กลุ่มการทดลอง	สาร extender	การเคลื่อนที่ (%)												การมีชีวิต (%)											
		ระยะเวลาการเก็บ (ชั่วโมง)												ระยะเวลาการเก็บ (ชั่วโมง)											
		6	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	6	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120		
1	KU																								
2	MC																								
3	C-F HBSS																								
4	0.9% NaCl																								
5	MFR																								
6	HBSS																								
7	SM																								
8	Saad																								
9	glucose																								
10	IM																								

หมายเหตุ: KU; Kurokura medium, MC; Modified Cortland solution, C-F HBSS; Calcium-Free Hanks' balanced salt solution, MFR; Modified fish Ringer's solution, HBSS; Hanks' balanced salt solution, SM; Sperm motility inhibiting saline medium, Saad; Immobilizing Saad solution, glucose (350 mM), IM; Immobilizing solution

3) ทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิในสาร extender 10 ชนิด (KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM) ที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง

4) นำสาร extender ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม หลังจากการเก็บ 48 ชั่วโมง ซึ่งได้แก่ KU, MC และ HBSS มาทำการทดสอบการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ 72 ชั่วโมง ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ มีการใช้น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) และน้ำเชื้อที่เจือจางกับสาร extender แต่ละชนิด มีจำนวนอสุจิ หรือ Insemination dose เท่ากัน คือ 1.29×10^8 ตัว โดยขั้นตอนและขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นแสดงในแผนภาพที่ 3.7



ภาพที่ 3.7 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของสาร extender 10 ชนิด (KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements) โดยมีจำนวนซ้ำ 6 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการปฏิสนธิ ไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างทรีทเมนต์ (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการวัดซ้ำ และเปรียบเทียบผลของสาร extender แต่ละชนิดในระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL)

1.2 ศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่ 1.1 โดยเลือกสาร extender ที่ให้ผลดีที่สุดคือ HBSS มาศึกษาอัตราการเจือจาง sperm: extender และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น โดยทำการศึกษาอัตราการเจือจาง 4 อัตราส่วน ดังนี้ 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง และใช้ undiluted sperm เป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไปมาเจือจางกับสาร extender (HBSS) ในอัตราส่วน sperm: extender 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ใน cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยการปั่นด้วยเครื่อง mixer และทำการเก็บที่ระยะเวลา 0, 48 และ 72 ชั่วโมง ดังแสดงในแผนการทดลองตารางที่ 3.5

2) หลังจากนั้นนำมาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิใช้ undiluted sperm เป็นกลุ่มควบคุม โดยมีจำนวนอสุจิ หรือ Insemination dose เท่ากัน คือ 1.29×10^8 ตัว

ตารางที่ 3.5 แผนการทดลองการศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ (0, 48 และ 72 ชั่วโมง) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นโดยมี HBSS เป็นสาร extender

กลุ่มการทดลอง	อัตราการเจือจาง (sperm: extender)	ระยะเวลาในการเก็บ (ชั่วโมง)
1	1: 3	0
2		48
3		72
4	1: 5	0
5		48
6		72
7	1: 10	0
8		48
9		72
10	1: 15	0
11		48
12		72
13	กลุ่มควบคุม (undiluted sperm)	

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาอัตราการเจือจางของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการจัด treatment แบบ 4×3 factorial คือ 4 dilution ratio ของ sperm: extender (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15) และ 3 ระยะเวลาการเก็บที่ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยใช้น้ำเชื้อสดที่ไม่ได้เจือจางเป็นตัวควบคุม และแต่ละกลุ่มทดลองมีจำนวน 9 ซ้ำ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวน นำผลอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL)

2) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

2.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

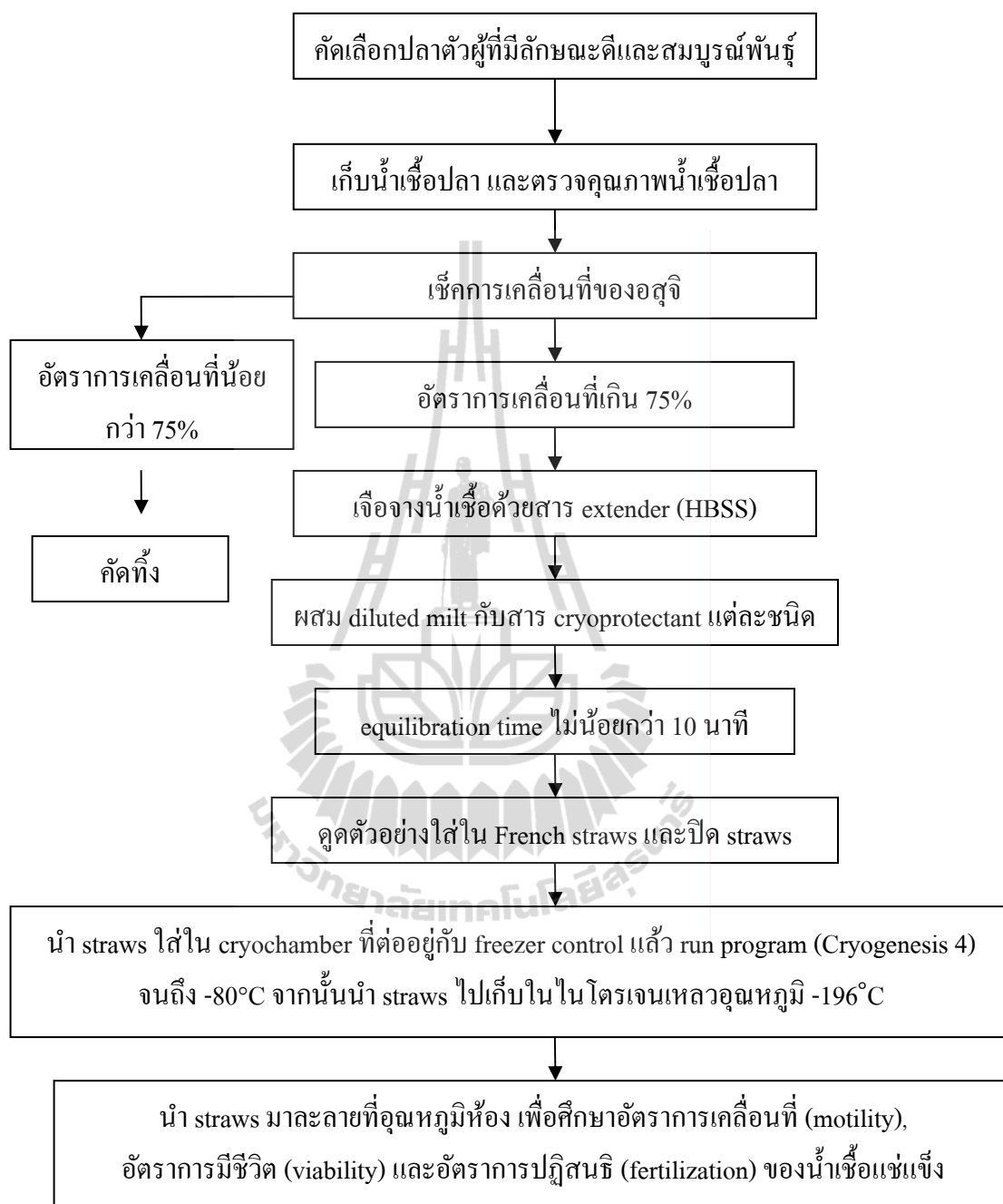
เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่ 1.1 โดยการเลือกสาร extender ที่ให้ผลดีที่สุดคือ HBSS มาทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง ในครั้งนี้ทำการศึกษาใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMA), glycerol และ Methanol (MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) ทำการเตรียมสาร extender (HBSS) วัดค่าออสโมลาลิตี และ pH นำสาร extender ที่เตรียมแล้วใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C เพื่อใช้ในการเจือจางกับน้ำเชื้อ

2) เตรียมสาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ DMSO, DMA, glycerol และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้สาร extender ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 เป็นตัวทำละลายในการเตรียมสาร cryoprotectant ทั้ง 4 ชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) นำสาร cryoprotectant ที่เตรียมแล้วใส่ขวดสีชาปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

3) นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาเจือจางด้วยสาร extender ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender 1: 3 ผสมให้เข้ากัน (diluted milt) หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMSO, DMA, glycerol หรือ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้สัดส่วน 1: 3 โดยมีขั้นตอนและขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็งแสดงในแผนภาพที่ 3.8 และแผนการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3.6

4) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 3 ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (French straws ขนาด 250 ไมโครลิตร) แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ forcep ดึงไฟจนร้อนแล้วหนีปากหลอดแช่แข็ง ซึ่งหลังจากที่เติมสาร cryoprotectant จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดแช่แข็งใส่ลงใน cryochamber ใช้เวลาประมาณ 10 นาที

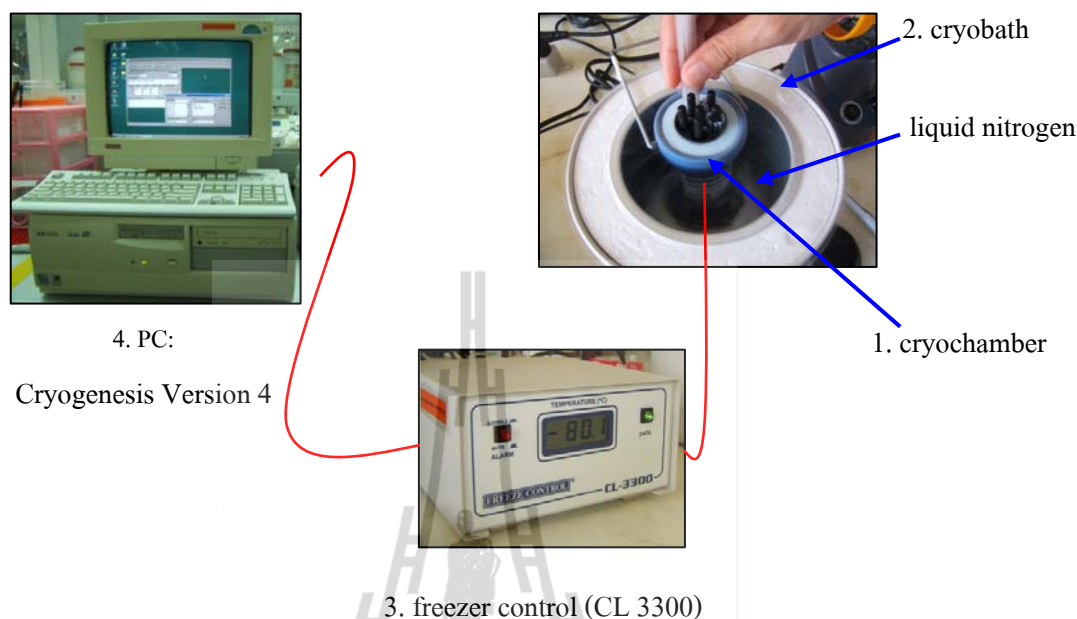


ภาพที่ 3.8 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

ตารางที่ 3.6 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร cryoprotectant 4 ชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (5, 10 และ 15%) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ HBSS เป็นสาร extender

กลุ่มการทดลอง	สาร cryoprotectant	ความเข้มข้น (%)
1	DMSO	5
2		10
3		15
4	DMA	5
5		10
6		15
7	glycerol	5
8		10
9		15
10	MeOH	5
11		10
12		15
13	กลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด)	

5) การเตรียม freezer control และคอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ โดยเติมไนโตรเจนเหลว (LN_2) ลงใน cryobath ให้สูงประมาณ 15 เซนติเมตร จากนั้นใส่ cryochamber ลงใน cryobath แล้วปิดฝา โดยที่ cryochamber ต่อกับ freezer control (CL 3300) และ freezer control ต่อกับคอมพิวเตอร์อีกทีเพื่อควบคุมการทำงานของ freezer control จากนั้นเลือกอัตราการลดอุณหภูมิ $10^\circ\text{C min}^{-1}$ โดยทำการลดอุณหภูมิจาก 20°C ถึง -80°C โดยใช้เมนู execute จากโปรแกรม Cryogenesis 4 นำตัวอย่างน้ำเชื้อที่ดูดใส่ straws ใส่ลงใน cryochamber ปิดฝา แล้วทำการ run program จากนั้นรอให้คอมพิวเตอร์ และ freezer control ทำงานจนอุณหภูมิที่ freezer control ถึง -80°C (ภาพที่ 3.9) จึงนำ straws ออกจาก cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C เพื่อนำไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ มีการใช้น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) และน้ำเชื้อแช่แข็งมีจำนวนอสุจิ หรือ Insemination dose เท่ากัน คือ 1.29×10^8 ตัว



ภาพที่ 3.9 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis Version 4

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษานี้และความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการจัด treatment แบบ 4×3 factorial คือใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ DMSO, DMA, glycerol และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้น้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งในแต่ละทรีทเมนต์ได้ทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต 12 ชั่วโมงต่อทรีทเมนต์ ส่วนอัตราการปฏิสนธิได้ทำการทดสอบ 16 ชั่วโมงต่อทรีทเมนต์ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL)

2.2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่ 2.1 โดยการเลือกสาร extender และสาร cryoprotectant ที่ให้ผลดีที่สุดคือ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS มาทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ 3 แบบ ได้แก่ One-step ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C), Two-steps ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 3°C ถึง -4°C และ $11^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -4°C ถึง -80°C) และ Three-steps freezing rate ($5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 2°C ถึง -7°C , $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -7°C ถึง -30°C และ $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -30°C ถึง -80°C) ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาเจือจางด้วยสาร extender (HBSS) ที่อัตราส่วน sperm: extender 1: 3 (diluted milt) จากนั้นนำมาผสมกับ 5% glycerol โดยใช้สัดส่วน 1: 3

2) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1 ปริมาตร 240 ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (french straws ขนาด 250 ไมโครลิตร) แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ forcep ลนไฟจนร้อนแล้วหนีบปากหลอดแช่แข็ง

3) นำ straws ใส่ลงใน cryochamber ปิดฝา เลือกอัตราการลดอุณหภูมิที่ต้องการศึกษาทั้ง 3 แบบ ได้แก่ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing rate ดังแสดงในแผนการทดลองตารางที่ 3.7 จากนั้น run program จนอุณหภูมิที่ freezer control ถึง -80°C จึงนำ straws ออกจาก cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ มีการใช้น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) และน้ำเชื้อแช่แข็งมีจำนวนอสุจิหรือ Insemination dose เท่ากัน คือ 1.29×10^8 ตัว โดยทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ 16 ซ้ำต่อทรีทเมนต์

ตารางที่ 3.7 แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing rate โดยใช้ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

กลุ่มการทดลอง	อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate)
1	One-step
2	Two-steps
3	Three-steps
4 กลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด)	

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ 3 แบบ ได้แก่ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing rate และใช้น้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งในแต่ละทรีทเมนต์ได้ทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต 6 ชั่วโมงต่อทรีทเมนต์ ส่วนอัตราการปฏิสนธิได้ทำการทดสอบ 16 ชั่วโมงต่อทรีทเมนต์ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL)

3) ศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

3.1 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ โดยใช้จำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อสด 7 อัตราส่วน ได้แก่ 0.5×10^6 : 1, 1×10^6 : 1, 1.5×10^6 : 1, 0.5×10^7 : 1, 0.75×10^7 : 1, 1×10^7 : 1 และ 0.25×10^8 : 1 ซึ่งมีจำนวน Insemination dose หรือจำนวนอสุจิ ดังแสดงในแผนการทดลองตารางที่ 3.8 มาผสมกับไข่จำนวน 104 ฟอง

ตารางที่ 3.8 แผนการทดลองการศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

กลุ่มการทดลอง	Number sperm: egg ratio	Insemination dose (number of sperm)
1	$0.50 \times 10^6 : 1$	0.52×10^8
2	$1.00 \times 10^6 : 1$	1.04×10^8
3	$1.50 \times 10^6 : 1$	1.56×10^8
4	$0.50 \times 10^7 : 1$	0.52×10^9
5	$0.75 \times 10^7 : 1$	0.78×10^9
6	$1.00 \times 10^7 : 1$	1.04×10^9
7	$0.25 \times 10^8 : 1$	0.26×10^{10}

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อสด 7 อัตราส่วน ได้แก่ $0.5 \times 10^6 : 1$, $1 \times 10^6 : 1$, $1.5 \times 10^6 : 1$, $0.5 \times 10^7 : 1$, $0.75 \times 10^7 : 1$, $1 \times 10^7 : 1$ และ $0.25 \times 10^8 : 1$ และแต่ละกลุ่มทดลองมีจำนวน 6 ซ้ำ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราปฏิสนธิไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL)

3.2 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

การศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยใช้ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS และอัตราการลดอุณหภูมิ One-step freezing rate ($10^\circ\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C) มาทำการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 5 อัตราส่วน ได้แก่ $1.3 \times 10^6 : 1$, $1.95 \times 10^6 : 1$, $2.6 \times 10^6 : 1$, $3.25 \times 10^6 : 1$ และ $3.9 \times 10^6 : 1$ และใช้น้ำเชื้อสด $1.00 \times 10^6 : 1$ (ซึ่งเป็นจำนวน sperm: egg ratio

ของน้ำเชื้อสดที่เหมาะสมต่อการปฏิสนธิของปลานวลจันทร์น้ำจืดเป็นกลุ่มควบคุม) ดังแสดงในแผนการทดลองตารางที่ 3.9

ตารางที่ 3.9 แผนการทดลองการศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

กลุ่มการทดลอง	Number sperm: egg ratio	Insemination dose (number of sperm)
1	$1.3 \times 10^6 : 1$	1.35×10^8
2	$1.95 \times 10^6 : 1$	2.03×10^8
3	$2.6 \times 10^6 : 1$	2.70×10^8
4	$3.25 \times 10^6 : 1$	3.38×10^8
5	$3.9 \times 10^6 : 1$	4.06×10^8
6 กลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด)	$1.0 \times 10^6 : 1$	1.04×10^8

ขั้นตอนการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบแช่แข็ง มีดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาเจือจางด้วยสาร HBSS ที่อัตราส่วน sperm: extender 1: 3 (diluted milt) จากนั้นนำมาผสมกับ 5% glycerol โดยใช้สัดส่วน 1: 3

2) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1 ใส่หลอดแช่แข็ง (French straws ขนาด 250 ไมโครลิตร) ตามจำนวน Insemination dose หรือจำนวนอสุจิ ดังแสดงในตารางที่ 3.9 แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ forcep ลนไฟจนร้อนแล้วหนีบปากหลอดแช่แข็ง

3) นำ straws ใส่ลงใน cryochamber ปิดฝา ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ One-step freezing rate ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C) จากนั้น run program จนอุณหภูมิที่ freezer control ถึง -80°C จึงนำ straws ออกจาก cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ โดยผสมกับไข่จำนวน 104 ฟอง

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อแช่แข็ง 5 อัตราส่วน ได้แก่ $1.3 \times 10^6: 1$, $1.95 \times 10^6: 1$, $2.6 \times 10^6: 1$, $3.25 \times 10^6: 1$ และ $3.9 \times 10^6: 1$ และใช้น้ำเชื้อสด $1.00 \times 10^6: 1$ เป็นกลุ่มควบคุม และแต่ละกลุ่มทดลองมีจำนวน 15 ซ้ำ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการปฏิสนธิไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS Version 10 (SPSS Inc., Chicago, IL)



บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

จากการศึกษาพบว่าปลานวลจันทร์น้ำจืดมีปริมาณน้ำเชื้อประมาณ 0.2-0.4 มิลลิลิตร/ตัว โดยมีความเข้มข้นของน้ำเชื้อ $1.65 \pm 0.25 \times 10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 7.15 ± 0.07 มีค่าออสโมลาลิตี (osmolality) 255.00 ± 0.89 mOsmol/kg และในน้ำเชื้อมีส่วนประกอบของไอออนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โซเดียม (Na^+), โพแทสเซียม (K^+), แคลเซียม (Ca^{2+}), แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และคลอไรด์ (Cl^-) ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ปริมาตร ความเข้มข้น ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

Parameter	N	Minimum	Maximum	Mean	S.D.
ความยาวปลาเพศผู้ (เซ็นติเมตร)	127	40.00	70.00	46.88	5.49
น้ำหนักปลาเพศผู้ (กิโลกรัม)	127	0.60	2.00	0.96	0.32
ปริมาตรน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)	7	0.20	0.4	0.30	0.10
ความเข้มข้นน้ำเชื้อ ($\times 10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร)	7	1.30	1.98	1.65	0.25
คุณลักษณะของ seminal plasma					
โซเดียม (mM)	3	71.00	73.00	72.33	1.15
คลอไรด์ (mM)	3	96.00	100.00	97.67	2.08
โพแทสเซียม (mM)	3	31.00	35.50	33.80	2.44
แคลเซียม (mM)	3	0.48	0.63	0.54	0.08
แมกนีเซียม (mM)	3	0.53	0.66	0.60	0.06
osmolality (mOsmol/kg)	6	254	256	255	0.89
pH	6	7.09	7.26	7.15	0.07

4.2 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

4.2.1 ผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นด้วยสาร extender 10 ชนิด ได้แก่ Kurokura medium (KU), Modified Cortland solution (MC), Calcium-Free Hanks' balanced salt solution (C-F HBSS), Modified fish Ringer's solution (MFR), 0.9% NaCl, Hanks' balanced salt solution (HBSS), Sperm motility inhibiting saline medium (SM), Immobilizing Saad solution (Saad), glucose (350 mM) และ Immobilizing solution (IM) หลังจากทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง พบว่าการเก็บที่ระยะเวลา 6-24 ชั่วโมง เมื่อใช้สาร extender ทั้ง 10 ชนิด มีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และเมื่อทำการเก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นที่ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ KU, MC, C-F HBSS, HBSS และ IM ยังมีอัตราการเคลื่อนที่ถึง 100% และเมื่อทำการเก็บที่ระยะเวลา 72-96 ชั่วโมง พบว่าการใช้ MC และ IM มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, ตารางที่ 4.2)

สำหรับผลของอัตราการมีชีวิตพบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 24 และ 48 ชั่วโมง การใช้ KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, glucose (350 mM) และ IM มีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และเมื่อทำการเก็บผ่านไปถึง 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้สาร extender แต่ละชนิด มีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ยกเว้นการใช้ Saad และ glucose (350 mM) ที่มีอัตราการมีชีวิตลดลงต่ำกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อทำการเก็บยาวนานขึ้นถึง 84 ชั่วโมง พบว่าการใช้ KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS และ IM ยังให้ผลอัตราการมีชีวิตสูงกว่า 50% และให้ผลไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$, ตารางที่ 4.3) แต่หลังจากการเก็บที่ 96-120 ชั่วโมง พบว่าการเก็บด้วยสาร extender แต่ละชนิดมีอัตราการมีชีวิตลดลงต่ำกว่า 50% (ตารางที่ 4.3)

ตารางที่ 4.2 ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (mean±S.E.) ต่อการเก็บที่ระยะเวลาต่าง ๆ

สาร extender	ระยะเวลาการเก็บ (ชั่วโมง)										
	6	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
KU	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	83.3±5.3 ^{bc}	66.7±5.3 ^b	33.3±8.3 ^b	4.2±4.2 ^b	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b
MC	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	95.8±4.2 ^a	79.2±7.7 ^a	66.7±8.3 ^a	41.7±5.3 ^a	20.8±4.2 ^a
C-F HBSS	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	87.5±5.6 ^{ab}	62.5±5.6 ^b	33.3±5.3 ^b	4.2±4.2 ^b	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b
0.9% NaCl	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	87.5±5.6 ^b	75.0±11.2 ^b	58.3±15.4 ^{cd}	29.2±13.6 ^c	8.3±5.3 ^c	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b
MFR	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	75.0±0.0 ^b	50.0±0.0 ^d	25.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b
HBSS	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	83.3±5.3 ^{bc}	62.5±5.6 ^b	25.0±0.0 ^b	4.2±4.2 ^b	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b
SM	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	95.8±4.2 ^a	75.0±0.0 ^c	54.2±4.2 ^c	8.3±5.3 ^c	0.0±0.0 ^d	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b
Saad	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	95.8±4.2 ^a	75.0±0.0 ^c	54.2±4.2 ^c	16.7±5.3 ^c	0.0±0.0 ^d	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b
glucose	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	79.2±4.2 ^c	54.2±4.2 ^c	8.3±5.3 ^c	0.0±0.0 ^d	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^b
IM	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	100.0±0.0 ^a	87.5±5.6 ^a	75.0±11.2 ^a	62.5±14.1 ^a	12.5±5.6 ^b	0.0±0.0 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

KU; Kurokura medium, MC; Modified Cortland solution, C-F HBSS; Calcium-Free Hanks' balanced salt solution, MFR; Modified fish Ringer's solution, HBSS; Hanks' balanced salt solution, SM; Sperm motility inhibiting saline medium, Saad; Immobilizing Saad solution, glucose (350 mM), IM; Immobilizing solution

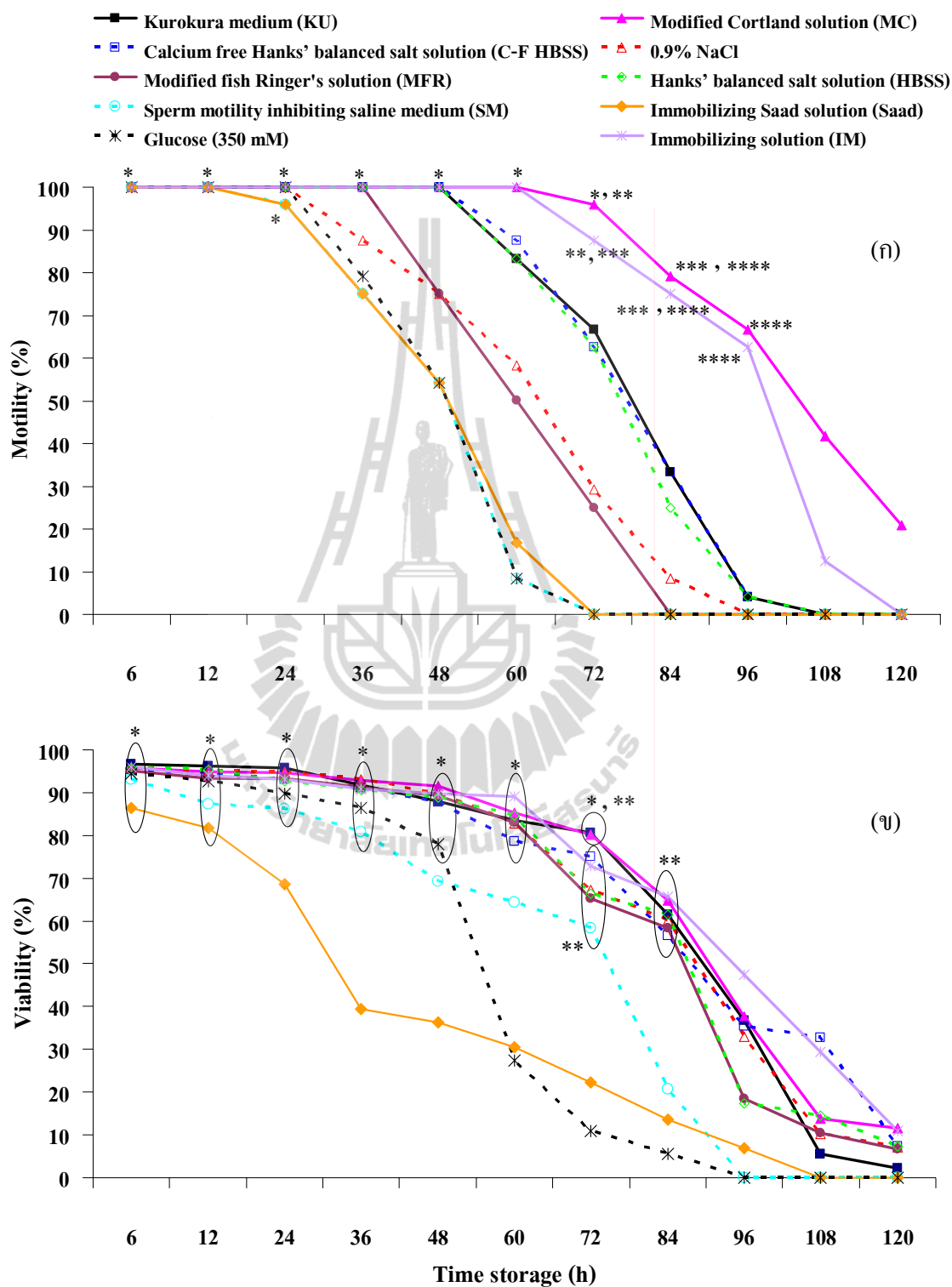
ตารางที่ 4.3 ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการมีชีวิต (mean±S.E.) ต่อการเก็บที่ระยะเวลาต่าง ๆ

สาร	ระยะเวลาการเก็บ (ชั่วโมง)										
extender	6	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
KU	96.7±1.2 ^a	96.2±1.1 ^a	95.7±1.4 ^a	91.7±1.9 ^a	88.0±1.6 ^{ab}	83.5±4.5 ^{ab}	80.7±4.3 ^a	61.5±7.6 ^a	36.8±16.3 ^{ab}	5.7±2.7 ^{bc}	2.3±1.1 ^a
MC	95.7±1.3 ^a	94.83±1.9 ^a	94.7±2.0 ^a	92.8±1.7 ^a	91.5±1.6 ^a	85.3±2.1 ^{ab}	80.2±3.1 ^a	64.8±7.4 ^a	37.7±16.9 ^{ab}	13.8±6.5 ^{abc}	11.7±5.8 ^a
C-F HBSS	95.3±1.9 ^a	94.2±2.0 ^a	93.2±2.1 ^{ab}	91.0±1.9 ^a	87.7±2.6 ^{ab}	78.7±3.0 ^{ab}	75.0±2.4 ^a	56.7±7.6 ^a	35.3±15.8 ^{ab}	32.8±15.1 ^{ab}	7.3±3.8 ^a
0.9% NaCl	95.7±1.1 ^a	95.2±1.0 ^a	94.8±0.8 ^a	93.2±0.9 ^a	89.7±1.1 ^{ab}	82.8±1.8 ^{ab}	67.3±6.0 ^a	60.2±8.0 ^a	33.0±7.8 ^{ab}	10.2±5.0 ^{bc}	7.2±3.8 ^a
MFR	95.2±1.7 ^a	93.3±2.3 ^{ab}	93.3±1.8 ^{ab}	91.3±2.2 ^a	89.3±2.5 ^{ab}	83.2±4.9 ^{ab}	65.3±7.5 ^a	58.3±6.9 ^a	18.5±9.2 ^{abc}	10.5±4.8 ^{bc}	6.7±4.2 ^a
HBSS	95.7±1.7 ^a	95.3±1.5 ^a	92.7±2.9 ^{ab}	90.7±2.7 ^a	88.8±2.4 ^{ab}	84.7±2.1 ^{ab}	66.3±7.7 ^a	61.5±8.2 ^a	17.3±7.9 ^{abc}	14.5±6.7 ^{abc}	7.3±3.5 ^a
SM	93.0±1.8 ^a	87.3±2.6 ^{bc}	86.2±2.7 ^b	80.8±1.6 ^a	69.2±2.6 ^b	64.3±1.5 ^b	58.3±2.9 ^a	20.7±9.3 ^b	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^a
Saad	86.3±2.1 ^b	81.7±2.8 ^c	68.5±6.8 ^c	39.5±17.7 ^b	36.3±16.3 ^c	30.5±13.6 ^c	22.2±10.1 ^b	13.7±6.3 ^b	6.8±4.3 ^{bc}	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^a
glucose	94.5±1.5 ^a	92.7±1.4 ^{ab}	89.8±2.4 ^{ab}	86.5±2.1 ^a	78.0±6.1 ^{ab}	27.3±12.3 ^c	10.8±4.9 ^b	5.7±2.8 ^b	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^c	0.0±0.0 ^a
IM	96.0±1.6 ^a	94.0±2.0 ^a	93.2±1.7 ^{ab}	90.8±1.3 ^a	89.8±1.9 ^a	89.2±1.3 ^a	72.8±6.0 ^a	65.7±5.0 ^a	47.5±4.0 ^a	29.5±3.3 ^a	11.0±5.2 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

KU; Kurokura medium, MC; Modified Cortland solution, C-F HBSS; Calcium-Free Hanks' balanced salt solution, MFR; Modified fish Ringer's solution, HBSS; Hanks' balanced salt solution, SM; Sperm motility inhibiting saline medium, Saad; Immobilizing Saad solution, glucose (350 mM), IM; Immobilizing solution

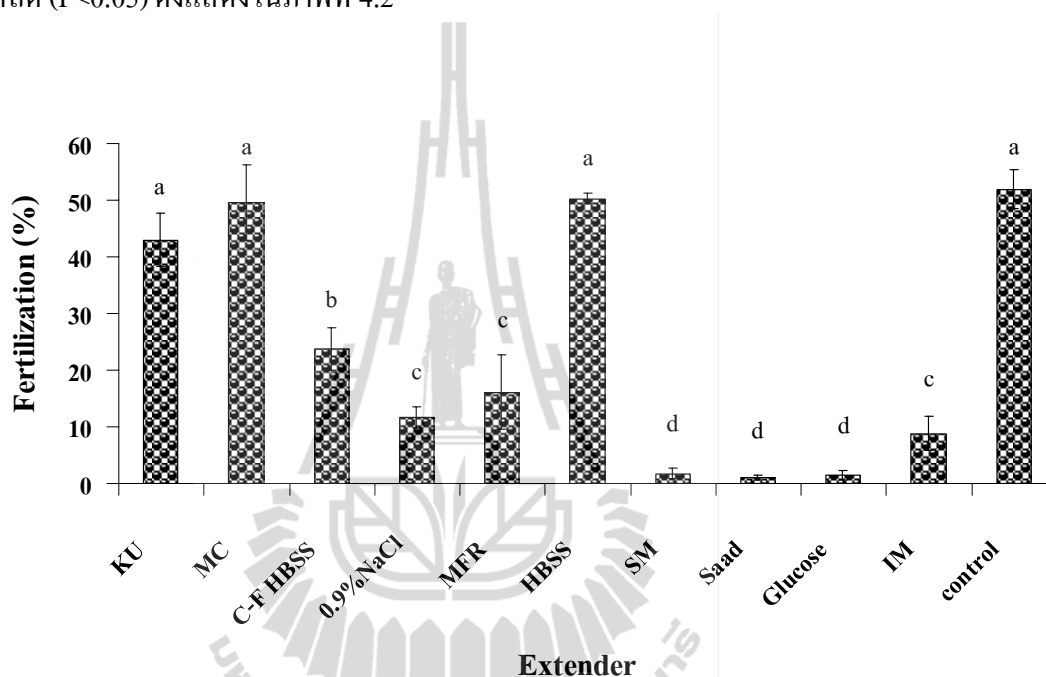
นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าการใช้สาร extender แต่ละชนิด มีแนวโน้มของอัตราการเคลื่อนที่ลดลงเป็นแบบเส้นโค้งขาลง (nonic trend) เมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) และพบว่าการใช้ MC สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานถึง 72 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ $95.8 \pm 4.2\%$ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างจากการเก็บที่ระยะเวลาเริ่มต้นที่ 6 ชั่วโมง (100%) ซึ่งพบว่าให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ IM โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ $87.5 \pm 5.6\%$ และเมื่อทำการเก็บที่ 84 และ 96 ชั่วโมง พบว่า การใช้ MC และ IM ยังมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 50% และมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ภาพที่ 4.1ก) สำหรับผลของการศึกษาอัตราการมีชีวิตพบว่าในการใช้สาร extender แต่ละชนิด มีแนวโน้มของอัตราการมีชีวิตลดลงเป็นแบบเส้นโค้งขาลง (nonic trend) เช่นเดียวกัน เมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) ซึ่งพบว่า การใช้ KU และ MC สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานถึง 72 ชั่วโมง โดยมีอัตราการมีชีวิต $80.7 \pm 4.3\%$ และ $80.2 \pm 3.1\%$ ตามลำดับ ให้ผลไม่แตกต่างจากการเก็บที่ระยะเวลาเริ่มต้นที่ 6 ชั่วโมง ($P > 0.05$) ที่มีอัตราการเคลื่อนที่ $96.7 \pm 1.2\%$ และ $95.7 \pm 1.3\%$ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM และ IM ($P > 0.05$) และที่ระยะเวลาการเก็บ 84 ชั่วโมง พบว่า การใช้สาร extender แต่ละชนิดมีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ยกเว้นการใช้ SM, Saad และ glucose (350 mM) ซึ่งมีอัตราการมีชีวิตต่ำกว่า 50% และให้ผลต่ำกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ภาพที่ 4.1ข)



ภาพที่ 4.1 ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ (6-120 ชั่วโมง)

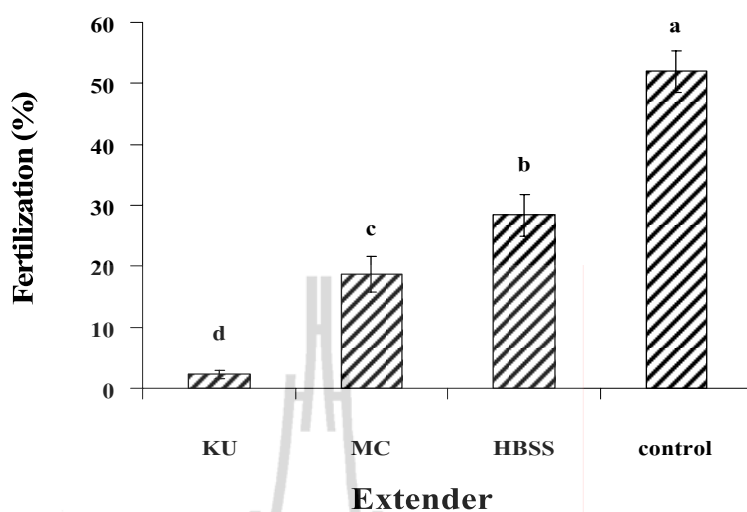
หมายเหตุ: *, **, ***, **** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

จากการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง ในสาร extender ทั้ง 10 ชนิด (KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM) พบว่าการใช้ HBSS, MC และ KU ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด และมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าและแตกต่างจากการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.2



ภาพที่ 4.2 อัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ทำการเก็บรักษาด้วยสาร extender 10 ชนิด ที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

จากนั้นได้นำสาร extender ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมหลังจากการเก็บ 48 ชั่วโมง ซึ่งได้แก่ KU, MC และ HBSS มาทำการทดสอบการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ 72 ชั่วโมง หลังจากทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิพบว่าการใช้สาร extender ทั้ง 3 ชนิด ให้ผลอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าและแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ HBSS ให้ผลอัตราการปฏิสนธิ $28.39\pm3.44\%$ ซึ่งสูงกว่าการใช้ KU ($2.30\pm0.67\%$) และ MC ($18.70\pm2.89\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.3



ภาพที่ 4.3 อัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดที่ทำการเก็บรักษาด้วยสาร extender 3 ชนิด ที่ระยะเวลาการเก็บ 72 ชั่วโมง
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.2.2 ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

จากการนำสาร extender (HBSS) มาทำการศึกษาอัตราการเจือจาง sperm: extender ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ในระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง มาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยดูผลของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ พบว่ามีอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ระหว่างอัตราการเจือจางกับระยะเวลาการเก็บ ($P<0.05$) และพบว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วน 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ undiluted sperm (กลุ่มควบคุม, $P>0.05$) ที่ระยะเวลาการเก็บ 0 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.4) และที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 5 มีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ไม่แตกต่างจากการใช้ undiluted sperm ($P>0.05$) และนอกจากนี้ที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง ยังพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นถึง 1: 10 และ 1: 15 ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 และ 1: 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, ตารางที่ 4.4) และเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นถึง 72 ชั่วโมง พบว่าในแต่ละอัตราการเจือจาง (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 5) มีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้ undiluted sperm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตาม ณ เวลา 72 ชั่วโมง การใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 และ 1: 5 ยังคงมีอัตราการปฏิสนธิ

สูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 10 และ 1: 15 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ของ น้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดที่อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15)

ระยะเวลาในการเก็บ (ชั่วโมง)	อัตราการเจือจาง (sperm: extender)	การปฏิสนธิ (%)	การมีชีวิต (%)	การเคลื่อนที่ (%)
0	1: 3	82.98±1.43 ^a	96.89±0.39 ^a	100.00±0.00 ^a
		(98.24)	(99.54)	(100.00)
	1: 5	83.57±1.13 ^a	97.00±0.47 ^a	100.00±0.00 ^a
		(98.94)	(99.66)	(100.00)
48	1: 10	87.87±1.78 ^a	97.00±0.44 ^a	100.00±0.00 ^a
		(104.03)	(99.66)	(100.00)
	1: 15	83.72±1.38 ^a	97.33±0.41 ^a	100.00±0.00 ^a
		(99.12)	(100.00)	(100.00)
	1: 3	83.54±1.31 ^a	93.00±1.24 ^b	91.67±4.17 ^b
		(98.90)	(95.55)	(91.67)
	1: 5	82.95±1.46 ^a	95.22±0.80 ^{ab}	94.44±3.67 ^{ab}
		(98.21)	(97.83)	(94.44)
72	1: 10	63.56±1.47 ^b	84.67±1.29 ^{cd}	66.67±4.17 ^c
		(75.24)	(86.99)	(66.67)
	1: 15	61.08±2.56 ^{bc}	85.33±1.21 ^c	61.11±4.39 ^{cd}
		(72.31)	(87.67)	(61.11)
72	1: 3	54.35±6.01 ^{bc}	81.44±1.53 ^{de}	58.33±4.17 ^{cd}
		(64.34)	(83.68)	(58.33)
	1: 5	52.89±5.26 ^c	76.89±1.31 ^f	61.11±4.39 ^{cd}
		(62.62)	(79.00)	(61.11)
72	1: 10	43.93±3.61 ^d	77.89±0.99 ^{ef}	58.33±4.17 ^{cd}
		(52.01)	(80.02)	(58.33)
72	1: 15	40.93±2.49 ^d	78.44±2.13 ^f	50.00±4.17 ^d
		(48.46)	(80.59)	(50.00)
กลุ่มควบคุม (undiluted sperm)		84.47±2.08 ^a	97.33±0.44 ^a	100.00±0.00 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตัวเลขในวงเล็บ คือเปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.3 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

4.3.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ DMSO, DMA, glycerol และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ร่วมกับ HBSS เป็นสาร extender และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C จากผลของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ พบว่ามีอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ระหว่างชนิดของสาร cryoprotectant กับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ($P<0.05$) และพบว่าการใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับ ดังกล่าวมีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบการใช้สาร cryoprotectant แต่ละชนิดพบว่าเมื่อใช้ 5% glycerol ให้อัตราการปฏิสนธิ $64.97\pm 1.82\%$ (74% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, ตารางที่ 4.5) สำหรับผลของอัตราการมีชีวิตพบว่าการใช้ 5% glycerol, 5% DMA และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ให้อัตราการมีชีวิตสูงกว่าและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ยกเว้น 5% DMSO ที่มีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากการใช้ 5% DMA และ 5% MeOH แต่ผลของอัตราการเคลื่อนที่พบว่าการใช้สาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 15% มีอัตราการเคลื่อนที่ ($68.75\pm 3.26\%$, 69% ของน้ำเชื้อสด และ $66.67\pm 3.55\%$, 67% ของน้ำเชื้อสด ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.5

จากการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ พบความสัมพันธ์ในระดับปานกลางระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการมีชีวิต ($r=0.707$, $P<0.05$) อัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิ ($r=0.521$, $P<0.05$) และอัตราการมีชีวิตกับอัตราการปฏิสนธิ ($r=0.655$, $P<0.05$)

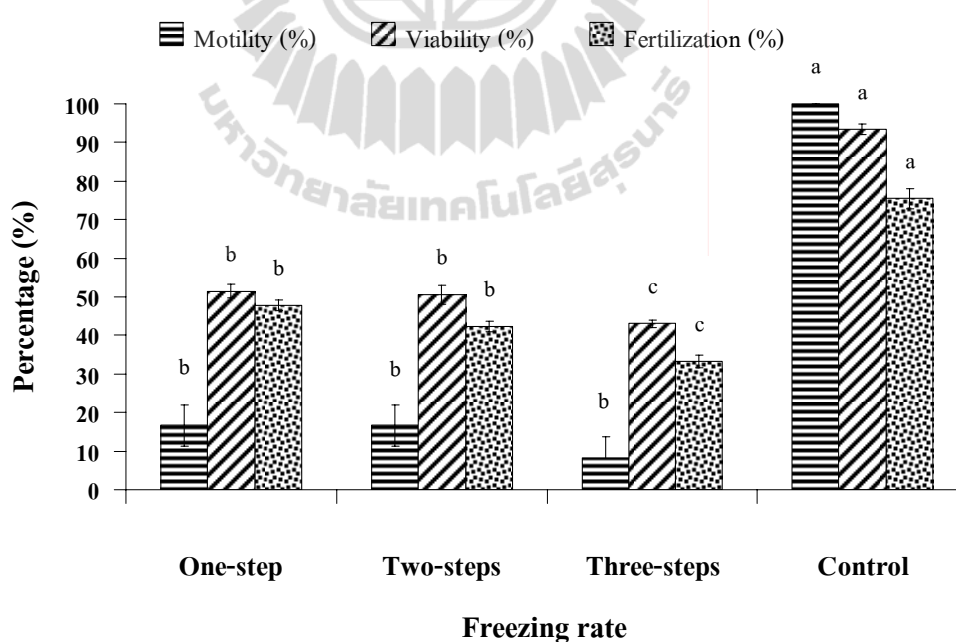
ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราเคลื่อนที่ ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดในสาร extender (HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

สาร cryoprotectant	ความเข้มข้น (%)	การปฏิสนธิ (%)	การมีชีวิต (%)	การเคลื่อนที่ (%)
DMSO	5	54.03±2.36 ^{cde} (61.94)	41.58±2.20 ^{cde} (42.36)	47.92±2.08 ^c (47.92)
DMSO	10	46.95±2.09 ^{efg} (53.83)	36.75±1.90 ^{ef} (37.44)	68.75±3.26 ^b (68.75)
DMSO	15	56.72±2.51 ^c (65.03)	29.67±1.91 ^g (30.22)	66.67±3.55 ^b (66.67)
DMA	5	48.15±3.84 ^{def} (55.20)	44.25±2.08 ^{bcd} (45.08)	39.58±5.72 ^c (39.58)
DMA	10	48.50±3.46 ^{def} (55.61)	38.67±1.81 ^{def} (39.39)	39.58±3.72 ^c (39.58)
DMA	15	39.52±3.24 ^{gh} (45.31)	20.42±1.15 ^h (20.80)	20.83±2.81 ^d (20.83)
glycerol	5	64.97±1.82 ^b (74.49)	50.25±1.75 ^b (51.19)	25.00±0.00 ^d (25.00)
glycerol	10	55.22±1.64 ^{cd} (63.31)	33.75±2.62 ^{fg} (34.38)	22.92±2.08 ^d (22.92)
glycerol	15	41.42±1.85 ^{fgh} (47.50)	19.00±0.94 ^h (19.35)	22.92±2.08 ^d (22.92)
MeOH	5	46.41±2.19 ^{efgh} (53.21)	45.08±1.25 ^{bc} (45.93)	47.92±3.72 ^c (47.92)
MeOH	10	42.23±2.58 ^{fgh} (48.42)	47.58±2.36 ^b (48.47)	45.83±2.81 ^c (45.83)
MeOH	15	38.79±1.64 ^h (44.47)	47.83±2.58 ^b (48.73)	47.92±2.08 ^c (47.92)
กลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด)		87.22±1.54 ^a	98.17±0.24 ^a	100.00±0.00 ^a

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ตัวเลขในวงเล็บ คือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

4.3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา นวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา นวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง ที่อัตราการลดอุณหภูมิ One-step ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C), Two-steps ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 3°C ถึง -4°C และ $11^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -4°C ถึง -80°C) และ Three-steps freezing rate ($5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 2°C ถึง -7°C , $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -7°C ถึง -30°C และ $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -30°C ถึง -80°C) โดยใช้ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 แบบดังกล่าว ให้ผลอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step และ Two-steps ให้ผลไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) โดยมีอัตราการปฏิสนธิ $47.84 \pm 1.42\%$ และ $42.37 \pm 1.44\%$ และอัตราการมีชีวิต $51.50 \pm 1.71\%$ และ $50.66 \pm 2.49\%$ ตามลำดับ แต่ให้ผลสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps สำหรับอัตราการเคลื่อนที่พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 แบบดังกล่าวไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลา นวลจันทร์น้ำจืด ($P > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.4



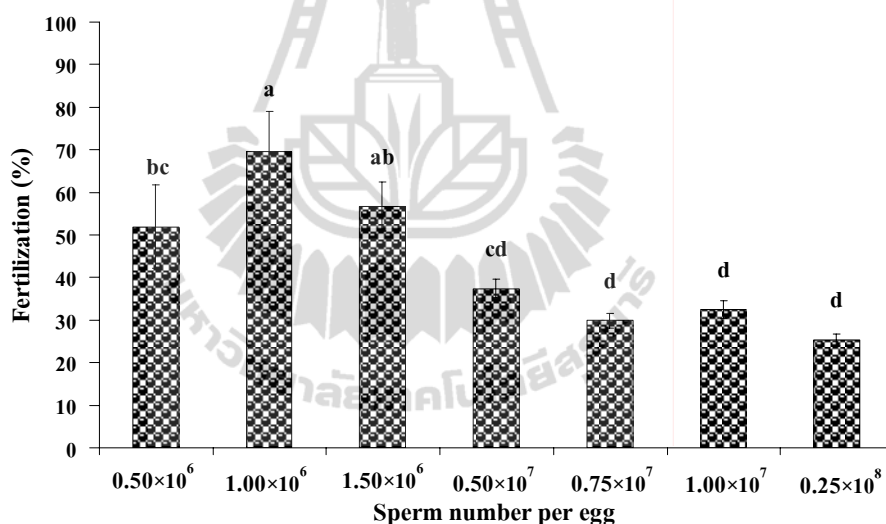
ภาพที่ 4.4 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลา นวลจันทร์น้ำจืด ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.4 จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

4.4.1 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลา นวลจันทร์น้ำจืด

จากการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยใช้ sperm: egg ratio ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน ดังนี้ $0.5 \times 10^6: 1$, $1 \times 10^6: 1$, $1.5 \times 10^6: 1$, $0.5 \times 10^7: 1$, $0.75 \times 10^7: 1$, $1 \times 10^7: 1$ และ $0.25 \times 10^8: 1$ พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ $1 \times 10^6: 1$ และ $1.5 \times 10^6: 1$ มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน ($69.62 \pm 9.31\%$ และ $56.65 \pm 5.75\%$ ตามลำดับ, $P > 0.05$) แต่เมื่อมีการเพิ่มหรือลดจำนวน sperm: egg ratio มีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 4.5

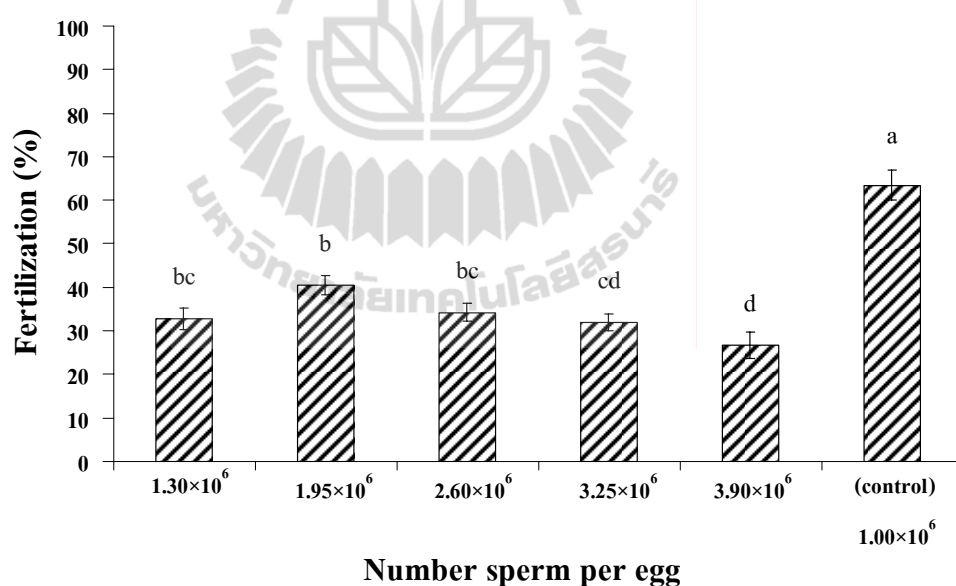


ภาพที่ 4.5 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ต่ออัตราการปฏิสนธิ (mean $\pm$ S.E.) ของน้ำเชื้อสด ปลานวลจันทร์น้ำจืด

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.4.2 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

จากการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมของน้ำเชื้อแช่แข็งปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยใช้ sperm: egg ratio ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ $1.3 \times 10^6: 1$, $1.95 \times 10^6: 1$, $2.6 \times 10^6: 1$, $3.25 \times 10^6: 1$ และ $3.9 \times 10^6: 1$ และใช้น้ำเชื้อสด $1.00 \times 10^6: 1$ ซึ่งเป็นจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อสดที่เหมาะสมต่อการปฏิสนธิของปลานวลจันทร์น้ำจืด เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ทั้ง 5 อัตราส่วน ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, ภาพที่ 4.6) แต่เมื่อเปรียบเทียบการใช้จำนวน sperm: egg ratio แต่ละอัตราส่วน พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง $1.95 \times 10^6: 1$, $1.30 \times 10^6: 1$ และ $2.60 \times 10^6: 1$ มีอัตราการปฏิสนธิ ($40.61 \pm 2.22\%$, 32.77 ± 2.40 และ $34.25 \pm 2.05\%$ ตามลำดับ) ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่เมื่อใช้น้ำเชื้อเพิ่มขึ้น $3.9 \times 10^6: 1$ ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงต่ำสุด ($26.77 \pm 2.96\%$) ดังแสดงในภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.6 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ต่ออัตราการปฏิสนธิ (mean $\pm$ S.E.) ของน้ำเชื้อแช่แข็งปลานวลจันทร์น้ำจืด

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

บทที่ 5

อภิปรายผล

5.1 ผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

โดยปกติตัวอสุจิปลาจะไม่มีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ใน seminal plasma หรือในอัมพา แต่จะมีการเคลื่อนที่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยน้ำในขณะการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ถ้าจะเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยสาร extender ใด ๆ ก็ตาม สาร extender ชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ดังนั้นการใช้สาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจึงควรมีส่วนประกอบทางเคมี ค่าออสโมลาลิตี และ pH ใกล้เคียงกับ seminal plasma ของปลาชนิดนั้น ๆ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนที่หรือการใช้พลังงานของตัวอสุจิ ตลอดจนการรักษาให้ตัวอสุจิกงรูป และมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา (Kang et al., 2004) ซึ่งจากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นด้วยสาร extender 10 ชนิด ได้แก่ KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM หลังจากทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง พบว่าการใช้สาร extender แต่ละชนิด มีแนวโน้มของอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตลดลงเป็นแบบเส้นโค้งยกกำลังเกา (nonic trend) เมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากในขณะที่ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่จะมีการเผาผลาญพลังงานทั้งแบบใช้ก๊าซออกซิเจน และไม่ใช้ก๊าซออกซิเจน ซึ่งการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ก๊าซออกซิเจนนี้เองทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น (Lahnsteiner et al., 1999) กรดแลคติกที่เกิดขึ้นนี้จะทำให้ pH ของน้ำเชื้อเปลี่ยนไป และเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้น ทำให้มีปริมาณของกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีค่า pH ลดลง ทำให้เมแทบอลิซึมและการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง นอกจากนี้ขบวนการเผาผลาญพลังงานยังส่งผลให้แหล่งพลังงานของเซลล์ซึ่ง ได้แก่ glucose หรือน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เช่น galactose, fructose, ribose และ trehalose ลดลงหรืออาจมีการใช้แหล่งพลังงานเหล่านี้หมดไปเมื่อทำการเก็บที่ยาวนานขึ้น ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิลดลง แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าการเก็บที่ระยะเวลา 6-24 ชั่วโมง เมื่อใช้สาร extender ทั้ง 10 ชนิด มีอัตราการเคลื่อนที่ ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษาการเผาผลาญพลังงานของตัวอสุจิยังเกิดขึ้นน้อย ส่งผลให้ค่า pH ของน้ำเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงน้อย รวมถึงแหล่งพลังงานของเซลล์ยังมีปริมาณเพียงพอ จึงไม่

ส่งผลต่อตัวอสุจิ ดังนั้นหากมีความต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพียง 24 ชั่วโมง สาร extender ที่ควรเลือกใช้ คือ 0.9% NaCl เพราะเป็นสาร extender ที่เตรียมง่าย และมีส่วนประกอบเพียงอย่างเดียว ทำให้ประหยัด เวลาและค่าใช้จ่าย และเมื่อทำการเก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นที่ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ KU, MC, C-F HBSS, HBSS และ IM ยังมีอัตราการเคลื่อนที่ถึง 100% และให้ผลอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน และมีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากการใช้ 0.9% NaCl, MFR และ glucose (350 mM) ($P>0.05$) นอกจากนี้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 84 และ 96 ชั่วโมง พบว่าการใช้ MC และ IM มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 50% และมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อพิจารณาผลของอัตราการมีชีวิตที่ระยะเวลาการเก็บ 84 และ 96 ชั่วโมง เช่นเดียวกันพบว่าการใช้ MC และ IM มีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากการใช้ KU, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR และ HBSS แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำสาร extender ทั้ง 10 ชนิดมาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ HBSS, MC และ KU ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด และมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าและแตกต่างจากการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังนั้นหากพิจารณาทั้งผลของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ แล้วพบว่าถ้าต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ 48 ชั่วโมง สามารถเลือกใช้ KU, MC และ HBSS เป็นสาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจาก HBSS มีค่าออสโมลาลิตี 280 mOsmol/kg และ pH 8 ส่วน KU มีค่าออสโมลาลิตี 250 mOsmol/kg และ pH 8.11 และ MC ซึ่งมีค่าออสโมลาลิตี 285 mOsmol/kg และ pH 8 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ seminal plasma ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดซึ่งมีค่าออสโมลาลิตี 255 mOsmol/kg และค่า pH 7.15 ซึ่งค่าออสโมลาลิตีมีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิ ในปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่เป็น hypotonic คือสารละลายนอกเซลล์มีความเข้มข้นน้อยกว่าภายในเซลล์ (ค่าออสโมลาลิตีของสารละลายภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์) จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยพบว่าสารละลายที่มีค่าออสโมลาลิตีต่ำกว่า 200 mOsmol/kg จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในปลากลุ่ม carp และต่อมาเซลล์อสุจิจะหยุดการเคลื่อนที่ และเซลล์อาจแตกหรือถูกทำลายเนื่องจากเซลล์บวม (Alavi and Cosson, 2005) ในทางตรงข้ามสารละลายที่เป็น hypertonic คือ สารละลายนอกเซลล์ที่มีความเข้มข้นมากกว่าภายในเซลล์ (ค่าออสโมลาลิตีของสารละลายภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในเซลล์) ทำให้มีการสูญเสียน้ำส่งผลให้เซลล์เหี่ยว และเสียสภาพทำให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้ ซึ่งอสุจิของปลาน้ำจืดในปลากลุ่ม carp สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าออสโมลาลิตีได้ อยู่ใน ช่วง 254-346 mOsmol/kg (Alavi and cosson, 2006) แต่จากการศึกษาค่าออสโมลาลิตีของ IM พบว่ามีค่าออสโมลาลิตี 369 mOsmol/kg ซึ่งสูงกว่าค่าออสโมลาลิตีของ seminal plasma ของ

น้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด (255 mOsmol/kg) ค่อนข้างมาก โดยค่าออสโมลลิตีที่ระดับนี้อาจมีผลต่อ ส่วนหัวของตัวอสุจิ ทำให้มีการสูญเสียน้ำส่งผลให้เซลล์เหี่ยว และเสียสภาพทำให้ไม่สามารถผสม กับไข่ได้ ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิต่ำ แต่ไม่มีผลทำลายในส่วนหาง ทั้งนี้เนื่องจากส่วนหัวเป็นส่วนที่มีขนาดใหญ่ และมีส่วนประกอบที่ซับซ้อนกว่าส่วนหางซึ่งง่ายต่อการถูกทำลายได้เร็วกว่า ทำให้ตัวอสุจิสามารถเคลื่อนที่ได้ขึ้นอยู่กับว่าส่วนหางไม่ถูกทำลาย แต่เมื่อพิจารณาเพิ่มเติมจากผลของการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่การเก็บ 72 ชั่วโมง โดยการนำสาร extender ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมหลังจากการเก็บ 48 ชั่วโมง ซึ่งได้แก่ KU, MC และ HBSS มาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ พบว่าการใช้ HBSS ให้ผลอัตราการปฏิสนธิ $28.39 \pm 3.44\%$ ซึ่งสูงกว่าการใช้ KU ($2.30 \pm 0.67\%$) และ MC ($18.70 \pm 2.89\%$) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจาก HBSS มีน้ำตาล glucose เป็นองค์ประกอบ จึงสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของอสุจิปลาได้ ทั้งนี้เป็นเพราะอสุจิของปลาสามารถใช้สารภายนอกเซลล์ในขบวนการเผาผลาญพลังงานได้ (De W. Kruger, Smit, Van vuren and Ferreira, 1984; Yao et al., 1999) ในกรณีที่มีการเก็บน้ำเชื้อไว้ใช้ในระยะเวลาซึ่งอาจทำให้แหล่งพลังงานภายในตัวอสุจิหมดไป จึงทำให้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย HBSS ยังคงมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่า KU และ MC ซึ่งไม่มี glucose เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดที่ 72 ชั่วโมง ควรเลือกใช้ HBSS เนื่องจากให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงสุด และจากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่า HBSS เป็นสาร extender ที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดได้ดีที่สุด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้ HBSS ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นมีหลายรายงานที่ประสบผลสำเร็จ ได้แก่ การศึกษาของ Jing et al. (2009) ซึ่งได้ใช้ HBSS และ Buffered sperm motility-inhibiting solution (BSMIS) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Zebrafish, *Danio rerio* พบว่าการใช้ HBSS ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ BSMIS เช่นเดียวกับการศึกษาของ Tiersch, Figiel et al. (2004) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Colorado pikeminnow, *Ptychocheilus lucius* แบบระยะสั้นโดยใช้ HBSS เป็นสาร extender พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย HBSS มีอัตราการเคลื่อนที่ ($77 \pm 22\%$) สูงกว่าน้ำเชื้อที่ไม่มีการเจือจางด้วย HBSS ($12 \pm 30\%$) และในปีเดียวกัน Tiersch, Wayman et al. (2004) ได้ศึกษาผลของสาร extender 2 ชนิด ได้แก่ HBSS และ 0.6% NaCl ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา common snook, *Centropomus undecimalis* พบว่าเมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วย HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานกว่าการใช้ 0.6% NaCl

5.2 ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมนั้นนอกจากจะสามารถยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นแล้ว ยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อได้อีกด้วย จึงน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาและประยุกต์ใช้กับปลานวลจันทร์น้ำจืด ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำเชื้อน้อย (0.2-0.4 มิลลิลิตร/ตัว) แต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อสูงถึง $1.65 \pm 0.25 \times 10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร จึงได้มีการศึกษาอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อ โดยเลือกสาร extender ที่ให้ผลดีที่สุด คือ HBSS มาศึกษาอัตราการเจือจาง sperm: extender ที่ 4 อัตราส่วน ได้แก่ 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ในระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วน 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ undiluted sperm (กลุ่มควบคุม, $P > 0.05$) ที่ระยะเวลาการเก็บ 0 ชั่วโมง ทั้งนี้ในขณะที่ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่จะมีการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ก๊าซออกซิเจนทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น (Lahnsteiner, Thadsri et al., 1999) ซึ่งกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะทำให้ค่า pH ของน้ำเชื้อเปลี่ยนไป ซึ่งถ้าค่า pH เปลี่ยนแปลงมาก ๆ จะทำให้ตัวอสุจิตายได้ และในขบวนการเผาผลาญพลังงานยังส่งผลให้แหล่งพลังงานของเซลล์ลดลงเช่นเดียวกัน แต่ในช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษาการเผาผลาญพลังงานของตัวอสุจิยังเกิดขึ้นไม่มาก ส่งผลให้ค่า pH ของน้ำเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงน้อย รวมถึงแหล่งพลังงานของเซลล์ก็ยังคงไม่ลดลงมาก จึงไม่ส่งผลต่อตัวอสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลา walking catfish, *Clarias macrocephalus* พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) การใช้อัตราการเจือจาง 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 9 และ 1: 19 ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (Vuthiphandchai et al., 2009) และจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเมื่อทำการเก็บยาวนานขึ้นถึง 48 ชั่วโมง และใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนสูง (1: 10 และ 1: 15) ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่ำ (1: 3 และ 1: 5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และสำหรับการเก็บที่ 72 ชั่วโมง ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผลของ dilution factor ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Ocean pout, *Macrozoarces americanus* L. พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน เมื่อใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 30 และ 1: 40 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Yao et al., 1999) และจากการศึกษาในปลา Atlantic halibut, *Hippoglossu hippoglossus* พบว่าเมื่อใช้อัตราการเจือจาง 1: 5 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 9, 1: 19, 1: 49 และ 1: 99 (Babiak, Ottesen, Rudolfson and Johnsen, 2006) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Atlantic cod, *Gadus morhua* ที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน พบว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 1 และ 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่

49±0.24 และ 51±0.6% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 5 และ 1: 10 (43±0.3 และ 39±5.9% ตามลำดับ) (DeGraaf et al., 2004) และจากการศึกษาในปลาชนิดเดียวกันพบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน การใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่ (74±0.3%) ซึ่งสูงกว่าและแตกต่าง $P<0.05$ จากการใช้อัตราการเจือจาง 1: 1, 1: 2, 1: 5 และ 1: 10 ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง 42-66% (DeGraaf and Berlinsky, 2004)

5.3 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

5.3.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ DMSO, DMA, glycerol และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ร่วมกับ HBSS เป็นสาร extender พบว่าเมื่อใช้ 5% glycerol มีอัตราการปฏิสนธิ 64.97±1.82% ซึ่งสูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ glycerol ช่วยป้องกันการลดขนาดของเซลล์ และอันตรายต่อเซลล์อันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของอิเล็คโทรไลต์ในขณะที่ทำการแช่แข็ง ซึ่งมีรายงานว่า glycerol ที่เติมลงไปจะเป็นตัวการที่ช่วยปรับเปลี่ยนให้เกิดความสมดุลระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมภายในและภายนอกเซลล์ ด้วยการส่งถ่ายโซเดียมเข้าสู่ภายในเซลล์ และเนื่องจากโซเดียมไอออนมีความสามารถจับกับน้ำ ทำให้มีการส่งถ่ายน้ำเข้าสู่เซลล์ เป็นการช่วยป้องกันการลดขนาดของเซลล์ระหว่างขบวนการแช่แข็ง (Rall et al., 1978) นอกจากนี้การใช้ glycerol ยังช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจาก glycerol เมื่อรวมกับน้ำจะทำให้จุดเยือกแข็งของสารละลายนั้นลดต่ำลง ทำให้ของเหลวนั้น “เย็นจัดยิ่ง” ก่อนจะแข็งหรือก่อนการเกิดเกล็ดน้ำแข็งหรืออีกนัยหนึ่งคือส่งผลให้ของเหลวภายในเซลล์แข็งตัวช้ากว่าปกติ และทำให้ในเซลล์มีปริมาณน้ำน้อยลง การเกิดเกล็ดน้ำแข็งก็ย่อมเกิดขึ้นน้อยตามไปด้วย (ปริมาณน้ำในเซลล์มากเกิดผลึกมากซึ่งเป็นผลเสียต่อเซลล์) ซึ่งมีหลายรายงานที่ประสบความสำเร็จในการใช้ glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง เช่น จากการศึกษาในปลา Platyfish, *Xiphophorus couchianus* (Huan, Dong and Tiersch, 2004) และจากการศึกษาในปลา Green swordtail, *Xiphophorus helleri* (Huang, Dong, Walter et al., 2004) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการใช้ 5% glycerol ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ glycerol ที่ความเข้มข้น 10 และ 15% ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของ glycerol ที่สูงเกินไป ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อใช้ glycerol ที่ความเข้มข้น 10 และ 15% ทำให้มีการแพร่ของ glycerol เข้าสู่เซลล์ได้

เร็วกว่าที่ความเข้มข้น 5% ที่ equilibration time 10 นาทีเท่ากัน ซึ่งส่งผลให้มีปริมาณของ glycerol สูงเกินไปจนเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิได้ อย่างไรก็ตามสาร cryoprotectant ยังมีความเฉพาะเจาะจงกับ ชนิดของปลา โดยการใช้ 5% glycerol นั้นแม้ว่าจะใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดได้ดี แต่ กลับไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบางชนิด ได้แก่ น้ำเชื้อปลา Silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* โดยพบว่าเมื่อใช้ 5% glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็งทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้ 10% DMSO (Alvarez et al., 2003) เช่นเดียวกับการศึกษาใน ปลา Common snook, *Centropomus undecimalis* พบว่าการใช้ 5% glycerol มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้ 5%, 10% DMSO และ 5% MeOH (Tiersch, Wayman et al., 2004) และจากการศึกษาใน ปลา Tropical bagrid catfish, *Mystus nemurus* พบว่าการใช้ 5% glycerol มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้ 10% MeOH (Muchlisin et al., 2004) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในปลาแต่ละชนิดมีลักษณะและขนาดของตัวอสุจิที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจทำให้โครงสร้างของส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรน ซึ่งได้แก่ ฟอสโฟลิปิด โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต มีปริมาณแตกต่างกัน จึงอาจส่งผลให้การแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์แตกต่างกันออกไปตามชนิดของปลา และจากการศึกษายังพบว่า ถึงแม้การใช้ 5% glycerol จะให้ผลอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการมีชีวิตสูง แต่กลับให้ผลของอัตราการเคลื่อนที่ต่ำ ($25.0 \pm 0.0\%$) ซึ่งในการทดลองพบว่าน้ำเชื้อที่ใช้ 5% glycerol มีลักษณะเป็นเจล ซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้อสุจิไม่สามารถเคลื่อนที่ได้สะดวก แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาทดสอบอัตราการปฏิสนธิแล้วพบว่าอัตราการปฏิสนธิสูง นั้นอาจเป็นเพราะปัจจัยบางอย่าง ซึ่งได้แก่ ไข่ หรือ ovarian fluid ซึ่งเป็นตัวที่สามารถกระตุ้นให้อสุจิมีการเคลื่อนที่เข้าไปผสมกับไข่ได้ ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิสูง ซึ่งจากการศึกษาของ Yanagimachi, Chrr, Pillai and Baldwin (1992) พบว่ามี sperm-activating factor ในไข่ของปลา rainbow trout และปลา coho salmon, *Oncorhynchus kisutch* เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Pacific herring, *Clupea pallasii* (Morisawa, Tanimoto and Ohtake, 1992) และจากการศึกษาในปลา muskellunge, *Esox masquinongy* (Ciereszko et al., 1999) และในปลา striped bass (Kerby, 1983) พบว่าไม่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ แต่กลับให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูง ซึ่งในกรณีดังกล่าว สอดคล้องกับการใช้ 5% glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบแช่แข็งในครั้งนี้ คือมีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำ แต่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูง และเมื่อทดสอบคู่ค่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิพบว่าอยู่ในระดับปานกลาง ($r = 0.52, P < 0.05$)

5.3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา นวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมเท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย ซึ่งจากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง ที่อัตราการลดอุณหภูมิ One-step ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 20°C ถึง -80°C), Two-steps ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 3°C ถึง -4°C และ $11^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -4°C ถึง -80°C) และ Three-steps freezing rate ($5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 2°C ถึง -7°C , $3^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -7°C ถึง -30°C และ $2^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -30°C ถึง -80°C) พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว คือ One-step และ Two-steps มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน และให้ผลสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่ำ (Three-steps) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลาซวาย (Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus*) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step ($10^{\circ}\text{C min}^{-1}$) และแบบ Two-steps ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 3°C ถึง -4°C , $11^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -4°C ถึง -80°C) พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน (Kwantong and Bart, 2003) และจากการศึกษาในปลา Zebrafish, *Danio rerio* พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 5°C ถึง -80°C มีอัตราการเคลื่อนที่ 35% ซึ่งให้ผลสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $20^{\circ}\text{C min}^{-1}$ ที่พบอัตราการเคลื่อนที่เพียง 1% เท่านั้น เมื่อใช้ 8% MeOH เป็นสาร cryoprotectant (Yang et al., 2007) และยังสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Medaka, *Oryzias latipes* เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 5°C ถึง -80°C โดยใช้ 10% MeOH เป็นสาร cryoprotectant มีอัตราการเคลื่อนที่ ($50\pm 10\%$) ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 5, 15, 20 และ $25^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 5°C ถึง -80°C (Yang et al., 2010) และในการศึกษาของ Codcharat et al., (2005) ทำการศึกษาในปลา Black ear catfish, *Pangasius larnaudii* โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 25°C ถึง -20°C พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าและแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 และ $5^{\circ}\text{C min}^{-1}$ และยังให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ $10^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 25°C ถึง -80°C มีอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ $12^{\circ}\text{C min}^{-1}$ เมื่อใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant (Vuthiphandchai et al., 2009) และจากการศึกษาของ Linhart et al. (2000) พบว่าอัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไนไม่มีความแตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($52\pm 9\%$ และ $50\pm 18\%$ ตามลำดับ) เมื่อใช้การลดอุณหภูมิที่ Two-steps freezing rates ($4^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก 4°C ถึง -9°C และ $11^{\circ}\text{C min}^{-1}$ จาก -9°C ถึง -80°C) จะเห็นได้ว่าในขบวนการแช่แข็งอัตราการลดอุณหภูมามีส่วนสำคัญต่อเซลล์ หากช้าหรือเร็วเกินไปต่างก็ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่ำ Three-steps ใช้เวลาในการลด

อุณหภูมิถึง 37 นาที่ เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว One-step และ Two-steps ซึ่งใช้เวลาเพียง 10 และ 11 นาที่ ตามลำดับ ซึ่งการลดอุณหภูมิอย่างช้าจะส่งผลให้เซลล์มีการสูญเสียน้ำทำให้เซลล์เหี่ยว และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์สูงเกินไป จึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลทำให้มีอัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิต่ำ เนื่องจากตัวอสุจิเสียสภาพทำให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้

5.4 จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

5.4.1 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลา

นวลจันทร์น้ำจืด

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อไข่ที่มากเกินไปส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง เนื่องจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้อสุจิไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Silveira et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Tambassen-Cheong et al., 1995; Rosenthal et al., 1998) ในทางตรงกันข้ามพบว่าปริมาณน้ำเชื้อที่ไม่เพียงพอก็ส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเช่นเดียวกัน (Linhart et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Silveira et al., 2006; Bart et al., 1998) และด้วยเหตุนี้จึงควรทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำเชื้อสด ที่ใช้ผสมกับไข่หนึ่งใบ (sperm: egg ratio) เพื่อให้เกิดการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยเฉพาะปลานวลจันทร์น้ำจืดซึ่งพบว่ามีน้ำเขื่อน้อย จึงควรทราบอัตราส่วนน้ำเชื้อปลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผสมกับไข่หนึ่งใบ จากการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยใช้ sperm: egg ratio ที่อัตราส่วน $0.5 \times 10^6 : 1$, $1 \times 10^6 : 1$, $1.5 \times 10^6 : 1$, $0.5 \times 10^7 : 1$, $0.75 \times 10^7 : 1$, $1 \times 10^7 : 1$ และ $0.25 \times 10^8 : 1$ พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ $1 \times 10^6 : 1$ และ $1.5 \times 10^6 : 1$ มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน ($69.62 \pm 9.31\%$ และ $56.65 \pm 5.75\%$ ตามลำดับ) แต่เมื่อใช้น้ำเชื้อลดลงถึง $0.5 \times 10^6 : 1$ ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ ($51.86 \pm 9.79\%$) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำเชื้อที่ใช้ไม่เพียงพอจึงส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อสดในปลา Turbot, *Scophthalmus maximus* พบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ลดลงถึง $3 \times 10^3 : 1$ และ $6 \times 10^3 : 1$ มีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้จำนวน sperm: egg ratio $2 \times 10^4 : 1$ (Dreanno et al., 1997) และจากการศึกษาในปลา Sea lamprey, *Petromyzon marinus* พบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio $1.0 \times 10^5 : 1$ มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด (97%) แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ลดลงต่ำกว่า $5 \times 10^4 : 1$ ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงต่ำกว่า 80% (Ciereszko et al., 2000) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในปลา African catfish, *Clarias gariepinus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อสด $1.5 \times 10^4 : 1$ มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด (80%) แต่เมื่อใช้

จำนวน sperm: egg ratio ลดลงต่ำกว่า 3×10^3 : 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลง (45%) (Rurangwa et al., 1998) ในขณะเดียวกันจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเมื่อมีการใช้น้ำเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 0.50×10^7 - 0.25×10^8 : 1 พบว่ามีแนวโน้มของอัตราการปฏิสนธิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้อสุจิไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Silveira et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Tambassen-Cheong et al., 1995; Rosenthal et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อสดปลา Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 1.89×10^5 : 1 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด $44.56 \pm 11.48\%$ แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio เพิ่มขึ้นถึง 1.89×10^8 : 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงเหลือเพียง $2.90 \pm 0.36\%$ (Kwantong and Bart, 2009) และยังให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในปลา African catfish, *Clarias gariepinus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อสด 1.5×10^4 : 1 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด (80%) แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio เพิ่มขึ้นเป็น 3.75×10^5 : 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลง (71%) (Rurangwa et al., 1998)

5.4.2 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

ในการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากส่งผลโดยตรงต่ออัตราการปฏิสนธิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งพบว่าจะต้องใช้จำนวนอสุจิมากกว่าการใช้ น้ำเชื้อสด ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีอัตราการตายและความผิดปกติของอสุจิมากกว่าใน น้ำเชื้อสด (Dreanno et al., 1997; Lahnsteiner et al., 1997; Ding et al., 2008; Lahnsteiner et al., 2003; Lahnsteiner et al., 2002) เนื่องจากในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ จะเกิดอันตรายกับ เซลล์อสุจิ เช่น อันตรายจากผลของ pH, solute, อันตรายที่เกิดจากความเป็นพิษของสาร cryoprotectant และอันตรายที่เกิดจากการสูญเสียน้ำ และการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และนอกเซลล์ (Leung in Jamieson, 1991; Muchlisin and Azizah, 2009; Ji et al., 2004) ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษา จำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยใช้ sperm: egg ratio ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1.3×10^6 : 1, 1.95×10^6 : 1, 2.6×10^6 : 1, 3.25×10^6 : 1 และ 3.9×10^6 : 1 โดย ใช้น้ำเชื้อสด 1.00×10^6 : 1 เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 1.95×10^6 : 1, 1.30×10^6 : 1 และ 2.60×10^6 : 1 มีอัตราการปฏิสนธิ ($40.61 \pm 2.22\%$, 32.77 ± 2.40 และ $34.25 \pm 2.05\%$ ตามลำดับ) ซึ่งให้ผล ไม่แตกต่างกัน ($P < 0.05$) แต่เมื่อใช้น้ำเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 3.9×10^6 : 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงต่ำสุด ($26.77 \pm 2.96\%$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีจำนวน sperm: egg ratio ที่มากเกินไปส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิ ลดลง ซึ่งเกิดจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้ไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* พบว่า

เมื่อใช้น้ำเชื้อ 6.94×10^6 : 1 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด $53.75 \pm 1.62\%$ แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio เพิ่มขึ้นจาก 3.47×10^7 : 1- 6.94×10^8 : 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงจาก $26.07 \pm 0.59\%$ เหลือเพียง $1.50 \pm 0.68\%$ (Kwantong and Bart, 2009) และในบางกรณีพบว่าเมื่อมีการใช้จำนวน sperm: egg ratio น้อยเกินไปส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลง ทั้งนี้เนื่องจากมีจำนวนอสุจิไม่เพียงพอที่จะผสมกับไข่ (Linhart et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Silveira et al., 2006; Bart et al., 1998) ได้แก่ ปลา Turbot, *Scophthalmus maximus* (Dreanno et al., 1997 and Chen et al., 2004), Mandarin fish, *Siniperca chuatsi* (Ding et al., 2008), *Chalcalburnus chalcalburnus*, *Chondrostoma nasus*, *Rutilus meidingerii*, *Barbus barbatus* และ *Cyprinus carpio* (Lahnsteiner et al., 2003) และ Sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Fauvel et al., 1998)



บทที่ 6

สรุป และข้อเสนอแนะ

6.1 สรุป

6.1.1 จากการศึกษาชนิดของสาร extender พบว่าการใช้ KU, MC และ HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้ 48 ชั่วโมง แต่เมื่อทำการเก็บยาวนานขึ้นเป็น 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้ HBSS เป็นสาร extender ที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดได้ดีที่สุด

6.1.2 จากการศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) พบอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ระหว่างอัตราการเจือจางกับระยะเวลาการเก็บ และพบว่าที่ระยะเวลาการเก็บเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) การใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วน 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ไม่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บยาวนานขึ้น 48 และ 72 ชั่วโมง การใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนเพิ่มขึ้นส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อลดลง

6.1.3 จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant พบว่ามีอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ระหว่างชนิดของสาร cryoprotectant กับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และพบว่า 5% glycerol เป็นสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

6.1.4 อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step และ Two-steps freezing procedures มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

6.1.5 จำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมในน้ำเชื้อสด คือ $1.0-1.5 \times 10^6$: 1 สำหรับในน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีจำนวนน้ำเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของน้ำเชื้อสด คือ อยู่ในช่วง $1.3-2.6 \times 10^6$: 1

6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ เนื่องจากไข่ของปลานวลจันทร์น้ำจืดเป็นไข่ครั้งจมครั้งลอย และมีเปลือกไข่บางมาก ดังนั้นการติดตั้งระบบเพาะฟักไข่ควรมีการไหลเวียนของน้ำตลอดเวลา โดยมีการปล่อยน้ำจากด้านล่างของขวดเพาะฟักและมีวาล์วสำหรับปรับระดับความแรงของน้ำ เพื่อให้ไข่ลอยขึ้นเพียงเล็กน้อยป้องกันการช้อนทับกันของไข่ และในขณะเดียวกันในส่วนบนของขวดเพาะฟักมีการเจาะรูเพื่อเป็นทางให้น้ำไหลออก และต้องบดด้วยตาข่าย เพื่อป้องกันไข่ไหลออก

6.2.2 ในขั้นตอนของการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ เนื่องจากเปลือกไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืดมี

ลักษณะบางมาก หากมีการกระทบกระเทือนมากเกินไปอาจทำให้เปลือกไข่แตกได้ ดังนั้นขณะที่ทำการ load ไข่เพื่อผสมกับน้ำเชื้อนั้นควรทำด้วยความระมัดระวัง นอกจากนี้ในการนับระยะไข่ควรใช้ความเร็ว และควรนำไข่ออกมานับครั้งละหนึ่งทรีตเมนต์ เพราะจะส่งผลต่อการพัฒนาของไข่

6.2.3 จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการมีชีวิตกับอัตราการปฏิสนธิ พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อควรทำการทดสอบแค่เพียง อัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิ เนื่องจากการทดสอบอัตราการมีชีวิตเป็นวิธีการที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน ทั้งนี้เพื่อเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย



รายการอ้างอิง

- กรมประมง. (2530). *ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย*. กรุงเทพมหานคร. องค์การค้าของคุรุสภา.
- กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เจริญ อุดมการ, อรรณพ อิมศิริ, สมบัติ สิงห์สี, มัลย์ อิมศิริ และ พิน พลไชย. (2547). *การเพาะพันธุ์ปลานวลจันทร์*. กรุงเทพมหานคร. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด.
- พีรศักดิ์ สุทธิโยธิน. (2529). *การผสมเทียม*. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (วิทยาเขตหาดใหญ่).
- อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2525). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในช่วงเวลาสั้น*. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 17: 53-67.
- Akcaý, E., Bozkurt, Y., Secer, S. and Tekin, N. (2004). Cryopreservation of mirror carp semen. **Research Article**. 28: 837-843.
- Alavi, S.M.H. and Cosson J. (2005). Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**. 29: 101-110.
- Alavi, S.M.H. and Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. **Cell Biology International**. 30: 1-14.
- Alavi, S.M.H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M. and Linhart, O. (2007). Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility. **Theriogenology**. 68: 276-283.
- Alvarez, B., Fuentes, R., Pimentel, R., Abad, Z., Cabrera, E., Pimentel, E. and Arenal, A. (2003). High fry production rates using post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa under farming conditions. **Aquaculture Research**. 220: 195-201.
- Babiak, I., Glogowski, J., Brzuska, E., Szumiec, J. and Adamk, J. (1997). Cryopreservation of sperm of common carp, *Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**. 28: 567-571.
- Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfson, G. and Johnsen, S. (2006). Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. I: Optimizing the protocol. **Theriogenology**. 66: 2025-2035.

- Bart, A.N., Wolfe, D.F. and Dunham, R.A. (1998). Effects of cryoprotectant, sperm density and straw size on cryopreservation of blue catfish, *Ictalurus furcatus*, sperm. **Transactions of the African Fisheries Society**. 127: 819-824.
- Basavaraja, N. and Hegde, S.N. (2004). Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. **Cryobiology**. 49: 149-156.
- Baynes, S.M., Scott, A.P. and Dawson, A.P. (1981). Rainbow trout, *Salmo gairdnerii* Richardson spermatozoa: effects of cations and pH on motility. **Journal of Fish Biology**. 19: 259-267.
- Bozkurt, Y. and Secer, S. (2005). Effect of short-term preservation of mirror carp (*Cyprinus carpio*) semen on motility, fertilization, and hatching rate. **The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh**. 57: 207-212.
- Butts, L.A.E., Trippel, E.A. and Litvak, M.K. (2009). The effect of sperm to egg ratio and gamete contact time on fertilization success in Atlantic cod *Gadus morhua* L. **Aquaculture Research**. 286: 89-94.
- Chen, S.L., Jia, X. S. and Yua, G.C. (2004). Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. **Aquaculture Research**. 236: 547-556.
- Christensen, J.M. and Tiersch, T.R. (2005). Cryopreservation of channel catfish sperm: effects of cryoprotectant exposure time, cooling rate, thawing conditions, and male-to-male variation. **Theriogenology**. 63: 2103-2112.
- Ciereszko, A., Dabrowski, K., Lin, F., Christ, S.A. and Toth, G.P. (1999). Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved muskellunge spermatozoa. **Transactions of the American Fisheries Society**. 128: 542-548.
- Ciereszko, A., Glogowski, J. and Dabrowski, K. (2000). Fertilization in landlocked sea lamprey: storage of gametes, optimal sperm: egg ratio, and methods of assessing fertilization success. **Journal of Fish Biology**. 56: 495-505.
- Codcharat, S., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. (2005). Cryopreservation of common black ear catfish (*Pangasius larnaudii*) spermatozoa. **Burapha University, Thailand**. 8 p.
- DeGraaf, J.D. and Berlinsky, D.L. (2004). Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. **Aquaculture Research**. 234: 527-540.

- DeGraaf, J.D., King, W.V., Benton, C. and Berlinsky, D.L. (2004). Production and storage of sperm from the black sea bass *Centropomus striata* L. **Aquaculture Research**. 35: 1457-1465.
- De W. Kruger, J.C., Smit, G.L., Van vuren, J.H.J. and Ferreira, J.T. (1984). Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peter). **J. Fish Biol.** 24: 263-272.
- Ding, S., Ge, J., Hao, C., Zhang, M., Yan, W., Xu, Z., Pan, J., Chen, S., Tian, Y. and Huang, Y. (2008). Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*. **Animal Reproduction Science**. 7 p.
- Donoghue, A.M. and Wishart, G.J. (2000). Storage of poultry semen. **Animal Reproduction Science**. 62: 213-232.
- Dreanno, C., Suguet, M., Quemener, L., Cosson, J., Fierville, F., Normant, Y. Billard, R. (1997). Cryopreservation of Turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. **Theriogenology**. 48: 589-603.
- Fauvel, C., Suquet, M., Dreanno, C., Zonno, V. and Menu, B. (1998). Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. **Aquat. Living Resour.** 11: 387-394.
- Guest, W. C. (1973). Spermatology and sperm preservation of Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. M.S. thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical college United States of America.
- Hambananda, A. (1996). Cryopreservation of milt of striped catfish, *Pangasius sutchi* Fowler. Ph.D. Dissertation, Kasetsart University, Thailand.
- Hatipoglu, T. and Akcay, E. (2010). Fertilizing ability of short-term preserved spermatozoa Abant trout (*Salmo trutta abanticus* T, 1954). **Ankara Univ Vet Fak Derg.** 57: 33-38.
- Horvath, A., Miskolczi, E. and Urbanyi, B. (2003). Cryopreservation of common carp sperm. **Aquatic Living Resources**. 16: 457-460.
- Horvath, A. and Urbanyi, B. (2000). The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved of African catfish sperm, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). **Aquaculture Research**. 31: 317-324.
- Huang, C., Dong, Q. and Tiersch, T.R. (2004). Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the platyfish *Xiphophorus couchianus*. **Theriogenology**. 62: 971-989.

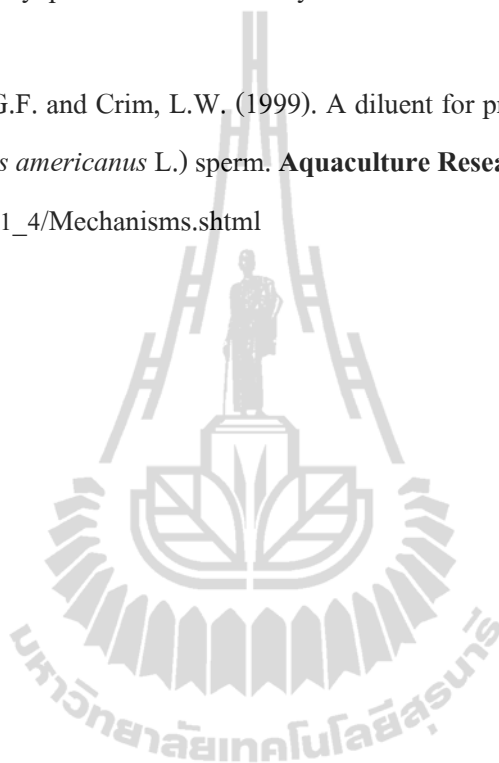
- Huang, C., Dong, Q., Walter, R.B. and Tiersch, T.R. (2004). Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. **Cryobiology**. 48: 295-308.
- Hulata, G. and Rothbard, S. (1979). Cold storage of carp semen for short periods. **Aquaculture Research**. 16: 267-269.
- Jenkins-keeran, K. and Woods, L.C. (2002). An Evaluation of Extenders for the Short-Term Storage of Striped Bass Milt. **North American Journal of Aquaculture**. 64: 248-256.
- Ji, X.S., Chen, S.L., Tian, Y.S., Yu, G.C., Sha, Z.X., Xu, M.Y. and Zhang S.C. (2004). Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. **Aquaculture Research**. 241: 517-528.
- Jing, R., Huang, C., Bai, C., Tanguay, R. and Dong, Q. (2009). Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm. **Aquaculture**. 290: 165-171.
- Kang, H.K., Shao, M.Y., Kho, K.H. and Zhang, Z.F. (2004). Short-term storage and cryopreservation of *Urechis unicinctus* (Echiura: Urechidae) sperm. **Aquaculture Research**. 35: 1195-1201.
- Kerby, J.H. (1983). Cryogenic preservation of sperm from striped bass. **Transactions of the American Fisheries Society**. 112: 86-94.
- Kwantong, S. and Bart, A. N. (2003). Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rate of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. **Aquaculture Research**. 34: 887-893.
- Kwantong, S. and Bart, A.N. (2009). Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage). **Aquaculture Research**. 40: 292-297.
- Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B. and Weismann, T. (2000). Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. **Theriogenology**. 54: 1477-1498.
- Lahnsteiner, F., Berger, B. and Weismann, T. (1999). Sperm metabolism of the teleost fish *chalcaburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability. **Journal of experimental zoology**. 284: 454-465.
- Lahnsteiner, F., Berger, B. and Weismann, T. (2003). Effects of media, fertilization technique, extender, straw volum, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. **Theriogenology**. 60: 829-841.
- Lahnsteiner, F., Mansour, N. and Weismann, T. (2002). The cryopreservation of spermatozoa of the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei). **Cryobiology**. 45: 195-203.

- Lahnsteiner, F. and Patzner, R.A. (1996). Changes in morphology, physiology, metabolism and fertilization capacity of semen of rainbow trout following cryopreservation. **The progressive Fish-Culturist**. 58: 149-159.
- Lahnsteiner, F., Weismann, T. and Patzner, R.A. (1997). Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. **Aquaculture Research**. 28: 247-479.
- Leung, L.K.P. (1991). Principles of biological cryopreservation. In B.G.M. Jaemison (eds.). **Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa** (231-244). Cambridge: University Press.
- Linhart, O., Rodina, M. and Cosson, J. (2000). Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. **Cryobiology**. 41: 241 -250.
- Linhart, O., Rodina, M., Kocour, M. and Gela, D. (2006). Insemination, fertilization and gamete management in tench, *Tinca tinca* (L.). **Aquaculture Research**. 14: 61-73.
- Maria, A.N., Viveiros, A.T.M., Freitas, R.T.F. and Oliveira, A.V. (2006). Extender and cryoprotectants for cooling and freezing of piracajuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aquaculture Research**. 260: 298-306.
- Mazur, P. (1997). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**. 14: 251-272.
- Melo, F.C.S.A. and Godinho, H.P. (2006). A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Brycon orthotaenia*. **Anim. Reprod.** 3: 380-385.
- Morisawa, M., Tanimoto, S. and Ohtake, H. (1992). Characterization and partial purification of sperm activation and partial purification of sperm activating substance from eggs of the herring, *Clupea pallasii*. **Journal of Experimental Zoology**. 264: 225-230.
- Muchlisin, Z.A. and Azizah, M.N.S. (2009). Influence of cryoprotectants on abnormality and motility of baung (*Mystus nemurus*) spermatozoa after long-term cryopreservation. **Cryobiology**. 58: 166-169.
- Muchlisin, Z.A., Hashim, R. and Chong, A.S.C. (2004). Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. **Theriogenology**. 62: 25-34.
- Park, C. and Chapman, F.A. (2005). An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. **North American Journal of Aquaculture**. 67: 52-57.

- Patil, R. and Lakra, W.S. (2005). Effect of cryoprotectants, equilibration periods and freezing rates on cryopreservation of spermatozoa of mahseer, *Tor khudree* (Sykes) and *T. putitora* (Hamilton). **Aquaculture Research**. 36: 1465-1472.
- Rainboth, W. J. (1996). **The taxonomy, systematics, and zoogeography of *Hypsibarbus*, a new genus of Large Barbs (Pisces, Cyprinidae) from the rivers of southeastern asia**. Los Angeles: University of California Press.
- Rall, W.F., Mazur, P. and Souzur, H. (1978). Physical-chemical basic of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol. **Biophys. J.** 23: 101-120.
- Rana, K. J. and McAndrew, B. J. (1989). The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. **Aquaculture Research**. 76: 335-345.
- Riley, K., Holladay, C.G., Chesney, E.J. and Tiersch, T.R. (2004). Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). **Aquaculture**. 238: 183-194.
- Rodina, M., Cosson, J., Gela, D. and Linhart, O. (2004). Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.). **Aquaculture International**. 12: 119-131.
- Rosenthal, H., Klumpp, D. and Willfuhr, J. (1998). Influence of sperm density and contact time on herring egg fertilization. **Journal of Applied Ichthyology**. 4: 79-86.
- Rurangwa, E., Roelants, I., Huyskens, G., Ebrahimi, M., Kime, D.E. and Ollevier, F. (1998). The minimum effective spermatozoa : egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **Fish Biology**. 53: 402-413.
- Rurangwa, E., Volckaert, F.A.M., Huyskens, G., Kime, D.E. and Ollevier, F. (2001). Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). **Theriogenology**. 55: 751-769.
- Silveira, A.N., Foresti, F., Silveira, R.V. and Senhorini, J.A. (2006). Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in Matrinza Fish, *Brycon cephalus* (Gunther, 1986). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 49: 651-659.
- Singsee, S., Imsilp, U., Pewnane, P. and Sukumasavin, N. (2005). Preservation of *Cirrhinus microlepis* sperm. In **Proceedings of 7th Technical Symposium on Mekong Fisheries 2005** (pp. 205-211). Thailand: Ubon Ratchathani.

- Tambassen-Cheong, M.V.P., Tan-Fermin, J.D., Garcia, L.M.B. and Baldevarona, R.B. (1995). Milt-egg ratio in artificial fertilization of the Asian freshwater catfish (*Clarias macrocephalus*) injected salmon gonadotropin-releasing hormone and domperidone. **Aquatic Living Resources**. 8: 303-307.
- Tan-Fermin, J.D. (1999). Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in the Asian catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther). **Aquaculture**. 171: 232-338.
- Tiersch, T.R., Figiel, C.R. and And, J.R. (2004). Cryopreservation of sperm from the Endangered Colorado Pikeminnow. **Aquaculture Research**. 66: 8-14.
- Tiersch, T.R., Wayman, W.R., Skapura, D.P., Neidig, C.L. and Grier, H.J. (2004). Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). **Aquaculture Research**. 35: 278-288.
- Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. (2009). Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. **Theriogenology**. 10 pages.
- Vuthiphandchai, V., Thadsri, I. and Nimrat, S. (2009). Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. **Aquaculture**. 269: 58-64.
- Warnecke, D. and Pluta, H.J. (2003). Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio* L.) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. **Aquaculture Research**. 215: 167-185.
- Wayman, W.R., and Tiersch, T.R. (2000). Research methods for cryopreservation of sperm In: cryopreservation in aquatic species. Tiersch, T.R., and Mazik, P.M. (Eds.). World aquaculture society, Baton Rouge, Louisiana, 264-275.
- Yanagimachi, R., Cherr, G.N., Pillai, M.C. and Baldwin, J.D. (1992). Factors controlling sperm entry into the micropyles of salmonid and herring eggs. **Development, Growth, and Differentiation**. 34: 447-461.
- Yang, H., Carmichael, C., Varga, Z.M. and Tiersch, T.R. (2007). Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. **Theriogenology**. 68: 128-136.
- Yang, H., Hazlewood, L., Walter, R.B. and Tiersch, T.R. (2006). Effect of osmotic immobilization on refrigerated storage and cryopreservation of sperm from a viviparous fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. **Cryobiology**. 52: 209-218.

- Yang, H., Hazlewood, L., Walter, R.B. and Tiersch, T.R. (2008). Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, *Xiphophorus couchianus*: Male-to-male variation in post-thaw motility and production of F₁ hybrid offspring. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 7 p.
- Yang, H., Norris, M., Winn, R. and Tiersch, T.R. (2010). Evaluation of cryoprotectant and cooling rate for sperm cryopreservation in the euryhaline fish medaka *Oryzias latipes*. **Cryobiology**. 61: 211-219.
- Yao, Z., Richardson, G.F. and Crim, L.W. (1999). A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. **Aquaculture Research**. 174: 183-193.
- www.dels.nas.edu/.../41_4/Mechanisms.shtml



ภาคผนวก ก.

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์หาเรียนรู้



ตารางแสดงผลการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์

1. การศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

1.1 อัตราการเคลื่อนที่

ตารางที่ ก. 1 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 24 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	240.000	9	26.667	.889	.542
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1500.000	50	30.000		
Total	1740.000	59			

ตารางที่ ก. 2 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 36 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	9900.000	9	1100.000	26.190	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	2100.000	50	42.000		
Total	12000.000	59			

ตารางที่ ก. 3 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 48 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	21510.000	9	2390.000	33.194	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	3600.000	50	72.000		
Total	25110.000	59			

ตารางที่ ก. 4 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 60 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	51915.000	9	5768.333	24.651	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	11700.000	50	234.000		
Total	63615.000	59			

ตารางที่ ก. 5 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 72 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	53100.000	9	5900.000	42.294	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	6975.000	50	139.500		
Total	60075.000	59			

ตารางที่ ก. 6 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 84 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	39078.750	9	4342.083	27.968	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	7762.500	50	155.250		
Total	46841.250	59			

ตารางที่ ก. 7 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 96 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	28683.750	9	3187.083	23.478	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	6787.500	50	135.750		
Total	35471.250	59			

ตารางที่ ก. 8 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 108 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	9135.000	9	1015.000	30.758	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1650.000	50	33.000		
Total	10785.000	59			

ตารางที่ ก. 9 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 120 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	3375.000	9	375.000	25.000	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	750.000	50	15.000		
Total	4125.000	59			

1.2 อัตราการมีชีวิต

ตารางที่ ก. 10 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 6 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	683.380	9	75.931	1.891	.075
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	2007.348	50	40.147		
Total	2690.727	59			

ตารางที่ ก. 11 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 12 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	1103.858	9	122.651	4.151	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1477.338	50	29.547		
Total	2581.196	59			

ตารางที่ ก. 12 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 24 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	2329.183	9	258.798	6.471	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1999.659	50	39.993		
Total	4328.842	59			

ตารางที่ ก. 13 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 36 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	9521.559	9	1057.951	5.341	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	9904.447	50	198.089		
Total	19426.006	59			

ตารางที่ ก. 14 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 48 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	9825.993	9	1091.777	8.363	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	6527.276	50	130.546		
Total	16353.269	59			

ตารางที่ ก. 15 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 60 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	16817.580	9	1868.620	11.024	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	8475.405	50	169.508		
Total	25292.985	59			

ตารางที่ ก. 16 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 72 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	16985.097	9	1887.233	13.975	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	6752.389	50	135.048		
Total	23737.486	59			

ตารางที่ ก. 17 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 84 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	17492.245	9	1943.583	11.221	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	8660.219	50	173.204		
Total	26152.464	59			

ตารางที่ ก. 18 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 96 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	11496.214	9	1277.357	2.900	.008
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	22025.620	50	440.512		
Total	33521.835	59			

ตารางที่ ก. 19 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 108 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	6760.263	9	751.140	3.508	.002
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	10705.564	50	214.111		
Total	17465.826	59			

ตารางที่ ก. 20 แสดงการวิเคราะห์ห้ำวเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 120 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	1778.171	9	197.575	1.628	.133
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	6067.064	50	121.341		
Total	7845.235	59			

1.3 อัตราการปฏิสนธิ

ตารางที่ ก. 21 แสดงการวิเคราะห์ห่าเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการปฏิสนธิ ที่การเก็บ 48 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	16997.103	10	1699.710	32.978	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	2834.776	55	51.541		
Total	19831.879	65			

ตารางที่ ก. 22 แสดงการวิเคราะห์ห่าเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการปฏิสนธิ ที่การเก็บ 72 ชั่วโมง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	4439.395	3	1479.798	65.249	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	453.586	20	22.679		
Total	4892.981	23			

2. การศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ (time storage) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ตารางที่ ก. 23 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ ต่ออัตราการปฏิสนธิ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	13082.261	12	1090.188	37.692	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	3008.077	104	28.924		
Total	16090.338	116			

หมายเหตุ: Treatment คือ อัตราการเจือจาง (sperm: extender) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15) ที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ ก. 24 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ ต่ออัตราการมีชีวิต ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	7197.312	12	599.776	67.134	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	929.131	104	8.934		
Total	8126.442	116			

หมายเหตุ: Treatment คือ อัตราการเจือจาง (sperm: extender) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15) ที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ ก. 25 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	41369.231	12	3447.436	59.756	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	6000.000	104	57.692		
Total	47369.231	116			

หมายเหตุ: Treatment คือ อัตราการเจือจาง (sperm: extender) ที่อัตราส่วนต่าง ๆ (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15) ที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง

3. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

นวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

ตารางที่ ก. 26 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่ออัตราการปฏิสนธิ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	13273.692	12	1106.141	31.557	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	6800.142	194	35.052		
Total	20073.834	206			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร cryoprotectant 4 ชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก. 27 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อ อัตราการมีชีวิต ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	27585.853	12	2298.821	149.365	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	2200.858	143	15.391		
Total	29786.711	155			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร cryoprotectant 4 ชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

ตารางที่ ก. 28 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อ อัตราการเคลื่อนที่ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	42470.192	12	3539.183	63.962	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	7912.500	143	55.332		
Total	50382.692	155			

หมายเหตุ: Treatment คือ สาร cryoprotectant 4 ชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

4. ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

ตารางที่ ก. 29 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่ออัตราการปฏิสนธิ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (อัตราการลดอุณหภูมิ)	5890.359	3	1963.453	89.783	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1312.133	60	21.869		
Total	7202.492	63			

ตารางที่ ก. 30 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่ออัตราการมีชีวิตในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (อัตราการลดอุณหภูมิ)	4398.840	3	1466.280	169.065	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	173.458	20	8.673		
Total	4572.298	23			

ตารางที่ ก. 31 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่ออัตราการเคลื่อนที่ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (อัตราการลดอุณหภูมิ)	24600.000	3	8200.000	45.556	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	3600.000	20	180.000		
Total	28200.000	23			

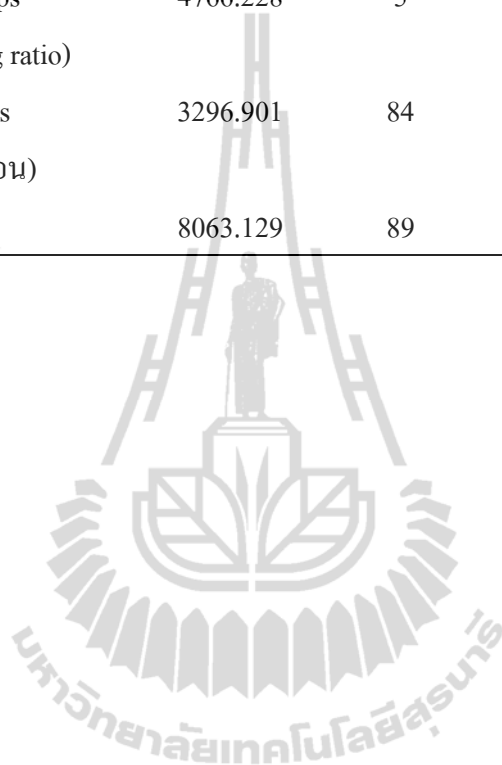
5. ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

ตารางที่ ก. 32 แสดงการวิเคราะห์หว่าเรียนซ์ผลของจำนวน sperm: egg ratio ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืด

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (จำนวน sperm: egg ratio)	3678.053	6	613.009	8.073	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	2657.725	35	75.935		
Total	6335.777	41			

ตารางที่ ก. 33 แสดงการวิเคราะห์ห้วเรีนยผลของจำนวน sperm: egg ratio ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งปลานวลจันทร์น้ำจืด

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (จำนวน sperm: egg ratio)	4766.228	5	953.246	24.287	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	3296.901	84	39.249		
Total	8063.129	89			



ประวัติผู้เขียน

นางสาวดวงจันทร์ เกิดเมื่อวันที่ 8 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดศรีสะเกษ เริ่มศึกษาชั้นประถมศึกษาที่โรงเรียนบ้านหนองคู อำเภอนาทม จังหวัดศรีสะเกษ ได้ศึกษาต่อชั้นมัธยมศึกษาตอนต้นที่โรงเรียนศรีตระกูลวิทยา อำเภอนาทม จังหวัดศรีสะเกษ และมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนขุนหาญวิทยาสรรค์ อำเภอนาทม จังหวัดศรีสะเกษ และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา เมื่อปี พ.ศ. 2549 และได้เข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2550

