รหัสโครงการ SUT3-303-48-24-39

รายงานการวิจัย

ผลของสาร Cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

(Effect of cryoprotectants and freezing rates on cryopreservation of Black eared catfish, *Pangasius larnaudii and* Striped catfish *Pangasinodon hypophthalmus* sperm)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-303-48-24-39

รายงานการวิจัย

ผลของสาร Cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

(Effect of cryoprotectants and freezing rates on cryopreservation of Black eared catfish, *Pangasius larnaudii and* Striped catfish *Pangasinodon hypophthalmus* sperm)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ผู้ร่วมวิจัย

นายสุนัย พลายมี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2548-2549

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2552

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2548–2549 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่และอุปกรณ์สำหรับการวิจัย ขอขอบคุณ นางสาว นิศารัตน์ ปุณณารักษ์ ผู้ช่วยวิจัย และฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่ในการเพาะเลี้ยงพ่อ-แม่พันธุ์ปลาสวาย และขอขอบพระคุณผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดสุรินทร์ (ว่าที่ร้อยตรี สมศักดิ์ เขตสมุทร) ที่ให้ความอนุเคราะห์พ่อ-แม่พันธุ์ปลาเทโพ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดสุรินทร์ ทุกๆ ท่านที่ได้มีส่วนช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2552

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของสาร Cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็งโดยเปรียบเทียบการใช้สาร cryoprotectant เพียงชนิดเดียวหรือใช้ combination cryoprotectants โดยมี 0.9% NaCl เป็นสาร extenders ร่วมกับอัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} เลือก cryoprotectant ที่ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมในปลาสวายมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ และศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปลาทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว โดยใช้ French straw ขนาด 250 µl เป็นตัวเก็บรักษาน้ำเชื้อ และมี Freezer control (CL 3300) และ Cryogenesis Version 4 เป็นตัวควบคุมการลดอุณหภูมิระหว่างขบวนการแช่แข็ง นำน้ำเชื้อปลาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 °C) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสาร cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่า combination cryoprotectants ระหว่าง10%DMSO+20%DMA, 10%DMSO+10%DMA และ 20%DMA+5%MeOH ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในปลาสวายไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด ($p>0.05$) เมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ พบว่า Combination cryoprotectants ในแต่ละทรีตเมนต์ ดังกล่าวนั้น ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน แต่ต่ำและแตกต่างจากน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) การลดอุณหภูมิที่ 5 และ 10 °C min^{-1} ในปลาสวาย มีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด; $p>0.05$) ส่วนในปลาเทโพนั้นพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min^{-1} ร่วมกับการใช้ 10% DMSO+ 10% DMA เป็นสาร Cryoprotectant มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม จากงานวิจัยในครั้งนี้สรุปได้ว่าการใช้ combination cryoprotectants ร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิด ในขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งนั้นสามารถเพิ่มอัตราการปฏิสนธิให้สูงกว่าการใช้ Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้พบว่าเทคนิคและวิธีการ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย สามารถไปประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ ซึ่งเป็นปลาในกลุ่มเดียวกันได้ และพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการลดอุณหภูมิเป็น 40 °C min^{-1} นั้นมีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิในปลาทั้งสองชนิดมีแนวโน้มลดลง

ABSTRACT

This present study examined the feasibility of cryopreservation of striped catfish, *Pangasinodon hypophthalmus* sperm. Two studies were carried out: (1) the effects of cryoprotectants and combination cryoprotectants on cryopreservation of *P. hypophthalmus* sperm and (2) the excellent treatments combination cryoprotectants from the study one, which showed high fertilization rates and did not difference from the control on the cryopreservation of *P. hypophthalmus* were applied to cryopreserve *P. larnaudii* sperm and investigate the effect of freezing rates on cryopreservation of both species. A controlled freezer (CL 3300) and Cryogenesis, version 4 was used to regulate the rate of freezing. Sperm were frozen using French straw (250 μL) and stored for one week in a liquid nitrogen container. They were then air thawed at room temperature, and the effect of cryoprotectants and freezing rates on cryopreservation of *P. hypophthalmus* and *P. larnaudii* sperm were assessed. The fertilization rates of striped catfish sperm achieved with these three combination cryoprotectants (10% DMSO + 10% DMA, 10% DMSO + 20% DMA or 20%DMA + 5%MeOH) were not significantly different from the control (fresh sperm), ($p>0.05$). These treatments were applied to cryopreserve *P. larnaudii* and found that fertilization rates among three treatments were not significantly different from the control (fresh sperm), $p>0.05$, but fertilization rate lower than the control. Fertilization rates of *P. hypophthalmus*, resulting from 5 and 10 °C min^{-1} were not significantly different from the control (fresh sperm), $p>0.05$. Similar result to the *P. larnaudii*, which showed that at 5 °Cmin^{-1} of freezing rate with the combination cryoprotectants of 10% DMSO + 10% DMA yield similar fertilization rate to the control. The results from this study indicated that combination cryoprotectants used can be improved fertilization rates of Pangasiids fish. In addition, increasing freezing rate up to 40 °C min^{-1} resulted in decrease of fertilizing ability of both species.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
• วัตถุประสงค์	2
• ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย	4
• วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย	4
• วิธีการศึกษา	5
• ผลของสาร Cryoprotectant, combination cryoprotectants และFreezing rates ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง	12
• ผลของสาร Cryoprotectant, combination cryoprotectants และFreezing rates ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยวิธีการแช่แข็ง	16
บทที่ 3 ผลการศึกษา	19
• ผลของสาร Cryoprotectant และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง	19
• ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง	22
• ผลของ Combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง	24
• ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยวิธีการแช่แข็ง	25

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ	28
• ผลของสาร Cryoprotectant และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง	28
• ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง	30
• ผลของ Combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง	32
• ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยวิธีการแช่แข็ง	32
• สรุป และข้อเสนอแนะ	33
บรรณานุกรม	34
ภาคผนวก	38
ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย	50

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	เกณฑ์การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ	7
ตารางที่ 2	ส่วนประกอบของสีย้อม Eosin-nigrosin	11
ตารางที่ 3	ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus)* ในสาร Extender 2 ชนิด (0.9%NaCl และ modified extender) ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} ตัวเลขในวงเล็บคือเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุม (น้ำเชื้อสด)	13
ตารางที่ 4	แผนการทดลองผลของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง	14
ตารางที่ 5	แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย โดยมี 0.9% NaCl เป็นสาร Extender	15
ตารางที่ 6	แผนการทดลอง combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยมี 0.9% NaCl เป็นสาร extender	17
ตารางที่ 7	แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยมี 0.9%NaCl เป็นสาร Extender	18
ตารางที่ 8	ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร Extender (0.9% NaCl) ร่วมกับสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด หรือ combination cryoprotectants โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}	21
ตารางที่ 9	ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) อัตราการปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาเทโพ (P. *larnaudii*) โดยใช้ combination cryoprotectants แต่ละชนิด (DMSO, DMA และ MeOH) และมี 0.9% NaCl เป็นสาร Extender โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}	24
ตารางที่ 10	ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลา เทโพ *(P. larnaudii)* ที่อัตราการลดอุณหภูมิในระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1})	27

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แม่พันธุ์ปลาเทโพและพ่อพันธุ์ปลาเทโพ	7
ภาพที่ 2	แผนภาพแสดงกระบวนการการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง	8
ภาพที่ 3	ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ Freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis	9
ภาพที่ 4	กระชัง และ Tank สำหรับฟักไข่ปลา	10
ภาพที่ 5	ภาพน้ำเชื้อมีชีวิต และน้ำเชื้อไม่มีชีวิต	12
ภาพที่ 6	อัตราการปฏิสนธิ (Mean ± SE) ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่ระดับการลดอุณหภูมิต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1})	22
ภาพที่ 7	อัตราการมีชีวิต (Mean ± SE) ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่ระดับการลดอุณหภูมิต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1})	23
ภาพที่ 8	อัตราการเคลื่อนที่ (Mean ± SE) ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่ระดับการลดอุณหภูมิต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1})	23
ภาพที่ 9	อัตราการปฏิสนธิ (Mean ± SE) ที่ระดับการลดอุณหภูมิต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*P. larnaudii*) โดยวิธีการแช่แข็ง	25
ภาพที่ 10	Cryopreservation model with different cooling rates (low, moderate, high and rapid freezing rates)	30

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลของสาร Cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็งโดยเปรียบเทียบการใช้สาร cryoprotectant เพียงชนิดเดียว (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA และ methanol-MeOH หรือใช้ combination cryoprotectants โดยมี 0.9% NaCl เป็นสาร extenders และอัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} จากนั้นเลือกทรีตเมนต์ที่ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมในปลาสวายมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ และศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปลาทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว โดยใช้ French straw ขนาด 250 µl เป็นตัวเก็บรักษาน้ำเชื้อ และมี Freezer control (CL 3300) และ Cryogenesis Version 4 เป็นตัวควบคุมการลดอุณหภูมิระหว่างขบวนการแช่แข็ง นำน้ำเชื้อปลาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (-196 °C) เป็นเวลา 1 สัปดาห์ จากนั้นนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิห้อง เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสาร cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่า combination cryoprotectants ระหว่าง 10%DMSO+20%DMA, 10%DMSO+10%DMA และ 20%DMA+5%MeOH ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในปลาสวายไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด ($p>0.05$) และเมื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ พบว่า Combination cryoprotectants ในแต่ละทรีตเมนต์ ดังกล่าวนั้นให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน แต่ต่ำและแตกต่างจากน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) และพบว่าการลดอุณหภูมิที่ 5 และ 10 °C min^{-1} มีผลให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด; $p>0.05$) สำหรับปลาสวาย ส่วนในปลาเทโพนั้นพบว่าการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min^{-1} โดยมี 10% DMSO+ 10% DMA เป็นสาร Cryoprotectant ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมและสูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการลดอุณหภูมิที่ระดับอื่นๆ (10, 20 และ 40 °C min^{-1}, $P<0.05$) จากงานวิจัยในครั้งนี้สรุปได้ว่าการใช้ combination cryoprotectants ร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิด ในขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งนั้นสามารถเพิ่มอัตราการปฏิสนธิให้สูงกว่าการใช้ Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้พบว่าเทคนิคและวิธีการ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย สามารถไปประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ ซึ่งเป็นปลาในกลุ่มเดียวกันได้ และพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการลดอุณหภูมิเป็น 40 °C min^{-1} นั้นมีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิในปลาทั้งสองชนิดมีแนวโน้มลดลง

ABSTRACT

This present study examined the feasibility of cryopreservation of striped catfish, *Pangasinodon hypophthalmus* sperm. Two studies were carried out: (1) the effects of cryoprotectants and combination cryoprotectants on cryopreservation of *P. hypophthalmus* sperm and (2) the excellent treatments combination cryoprotectants from the study one, which showed high fertilization rates and did not difference from the control on the cryopreservation of *P. hypophthalmus* were applied to cryopreserve *P. larnaudii* sperm and investigate the effect of freezing rates on cryopreservation of both species. A controlled freezer (CL 3300) and Cryogenesis, version 4 was used to regulate the rate of freezing. Sperm were frozen using French straw (250 μL) and stored for one week in a liquid nitrogen container. They were then air thawed at room temperature, and the effect of cryoprotectants and freezing rates on cryopreservation of *P. hypophthalmus* and *P. larnaudii* sperm were assessed. The fertilization rates of striped catfish sperm achieved with these three combination cryoprotectants (10% DMSO + 10% DMA, 10% DMSO + 20% DMA or 20%DMA + 5%MeOH) were not significantly different from the control (fresh sperm), ($p>0.05$). These treatments were applied to cryopreserve *P. larnaudii* and found that fertilization rates among three treatments were no significant difference $p>0.05$, but the fertilization rate was lower than the control. Fertilization rates of *P. hypophthalmus*, resulting from 5 and 10 °C min^{-1} were not significantly different from the control (fresh sperm), $p>0.05$. Similar result to the *P. larnaudii*, which showed that at 5 °Cmin^{-1} of freezing rate with the combination cryoprotectants of 10% DMSO + 10% DMA resulted in higher fertilization rate compared to the other freezing rates 10, 20 and 40 °C min^{-1} ($p<0.05$). This result was not significantly different from the control ($p>0.05$). The results from this study indicated that combination cryoprotectants used can be improved fertilization rates of Pangasiids fish. In addition, increasing freezing rate up to 40 °C min^{-1} resulted in decrease of fertilizing ability of both species.

บทที่ 1
บทนำ

ในอดีตงานวิจัยเพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยยังมีการศึกษากันน้อยมากเนื่องจากการประยุกต์เอาเทคนิคและวิธีการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้กับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมาใช้ ยังปรับวิธีการได้ไม่เหมาะสม (กฤษณ์, 2536) อีกทั้งยังไม่มีความจำเป็นอย่างแท้จริง เนื่องจากในอดีตสภาพแวดล้อมอุดมสมบูรณ์สามารถจับพ่อแม่พันธุ์และรวบรวมลูกปลาได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันประสบปัญหาแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำเสื่อมโทรมอันเนื่องมาจากผลกระทบของสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และการเกิดมลพิษในแหล่งน้ำซึ่งจะเป็นอันตรายต่อปลาโดยตรง จึงทำให้ปริมาณปลาลดลง โดยเฉพาะปลาในสกุล *Pangasius* เช่นปลาบึก ปลาเทโพและปลาเทพา (สำนักงานสำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2539) อีกทั้งปลาในสกุล *Pangasius* บางชนิดมีช่วงสืบพันธุ์ไม่ตรงกันระหว่างเพศผู้และเพศเมีย (เพศผู้เจริญพันธุ์เร็วกว่าเพศเมีย) พบในปลาโมง, *Pangasius bocourti* (Khanh et al., 1999) และปลาบึก, *Pangasinodon gigas* ได้จัดอยู่ในบัญชีปลาหายาก (Mongkonpunya et al., 1992) อีกทั้งได้มีการนำเข้าปลาเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเนื้อหมู และเนื้อไก่ ตั้งแต่ปี 1975 (Safina, 1995) ซึ่งเป็นการชี้ให้เห็นว่าปริมาณการผลิตยังไม่เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค และคาดว่าความต้องการผลิตภัณฑ์ประมงตั้งแต่ปี ค.ศ. 2000 จะอยู่ในช่วง 120 – 130 ล้านตัน ซึ่งจะสูงกว่าปริมาณที่ผลิตได้ 30 – 40% ด้วยเหตุนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยทำให้ธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดมีการขยายตัวเพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังช่วยชะลอการเพาะเลี้ยงในช่วงที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม สามารถใช้แก้ปัญหาในปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (Endangered species) หรือแก้ปัญหาสำหรับปลาที่ไข่และน้ำเชื้อสุกไม่พร้อมกัน ใช้ในโปรแกรมการผสมพันธุ์ปลา หรือการผลิตปลาข้ามสายพันธุ์ นอกจากนี้ประโยชน์ของน้ำเชื้อแช่แข็งยังมีความสะดวกในการขนย้ายมากกว่าเมื่อเทียบกับการขนย้ายปลามีชีวิต

ปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแช่แข็งได้แก่ Freezing-thawing rates สาร extender (เป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ และลดการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาก่อนกระบวนการแช่แข็ง) ซึ่งควรมีค่าออสโมลาริตี้ใกล้เคียงกับเลือด หรือ seminal fluid ของน้ำเชื้อปลา และสาร cryoprotectant (เป็นสารป้องกันการเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง) ซึ่งสาร cryoprotectant แต่ละชนิดจะต้องมีความเข้มข้น และระยะเวลา (equilibration time) ที่เหมาะสม เพื่อที่จะออกฤทธิ์และป้องกันการเซลล์ถูกทำลาย (Rana, 1995) สาร cryoprotectant หลายชนิด เช่น DMSO, DMA, MeOH และ glycerol ได้มีการใช้และให้ผลดีในปลาหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานว่า DMSO เป็นสารที่นิยมใช้กันแพร่หลายในปลาหลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการปฏิสนธิประมาณ 50% (Horvath and Urbanyi, 2000; Urbanyi et al., 1999; Chereguini et al., 2001 and Kwantong and Bart, 2003) อย่างไร

ก็ตามสารต่างๆ เหล่านี้ยังมีการศึกษากันน้อยมากในปลากลุ่ม Pangasiid และพบว่า สารcryoprotectant ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Wayman and Tiersch, 2000) จากการศึกษาของ Monkonpunya et al. (1995) รายงานว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร cryoprotectant (MeOH) เป็น 14% พบว่าไม่การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็ง ทำนองเดียวกับ Bart et al. (1998) พบว่าการปฏิสนธิของ blue catfish, *Ictalurus furcatus* ลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ MeOH จาก 5% เป็น 10% อย่างไรก็ตาม Kwantong and Bart (2003) พบว่าเมื่อใช้ MeOH (5%) การปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็งให้ผลการศึกษาดีที่สุด (38%) เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 8 และ 10% ซึ่งอัตราการปฏิสนธิลดลงเป็น 16 และ 10% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามการ ใช้ combination ของสาร cryoprotectant แต่ละชนิดที่มี น้ำหนักโมเลกุลต่างกันยังไม่มีการศึกษามาก่อน

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมของสาร cryoprotectant และสาร extender เท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย (Mazur, 1977) ในขบวนการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาเป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ และทางเคมี และการแพร่เข้า-ออกของน้ำระหว่างเซลล์และตัวกลาง พบว่าถ้าลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ ในระหว่างขบวนการแช่แข็งจะทำให้เกิดผลึกของน้ำแข็ง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย ในทางกลับกันถ้ามีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเซลล์อาจจะมีการช็อค (cold shock) (Lueng in Jamieson, 1991)

ในขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา อัตราการลดอุณหภูมิจะมีความแตกต่างกัน (Tiersch et al., 1994; Linhart et al., 1993 และ Urbanyi et al., 1999) การลดอุณหภูมิที่ 5, 12, 22 and 120 °C min^{-1} ได้มีการศึกษาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึก โดยมีอัตราการปฏิสนธิเป็น 3, 66, 19 และ 0% ตามลำดับ (Mongkonpunya et al., 1992) นอกจากนี้ Kwantong and Bart (2003) ได้มีการศึกษาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย โดยการลดอุณหภูมิ 10 °C min^{-1} (one step freezing rate) และลดอุณหภูมิที่ two-step freezing rates โดยการลดอุณหภูมิ 4 °C min^{-1} จาก 3° C ถึง -4° C และลดอุณหภูมิที่ 11°C min^{-1} จาก -4° C ถึง -80° C ซึ่งผลการวิจัยพบว่า การลดอุณหภูมิที่ one step freezing rate ให้ผลการศึกษาดีกว่า two-step freezing rates แต่อย่างไรก็ตามอัตราการปฏิสนธิน้อยกว่า 50% การศึกษาในครั้งนี้จึงมีแนวคิดในการลดอุณหภูมิโดยใช้ one step freezing rate ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ คือ 5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1} เพื่อที่จะหาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับปลาสวายและปลาเทโพต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสาร Cryoprotectant และ Combinations cryoprotectants ชนิดต่างๆ ที่มีผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา
2. เพื่อศึกษาความเหมาะสมของการลดอุณหภูมิ (Freezing rates) ในระหว่างขบวนการแช่แข็ง
3. เพื่อศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อภายหลังการแช่แข็ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบชนิดของสาร Cryoprotectant ความเข้มข้นที่เหมาะสม และอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็ง เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ หรือปลาเศรษฐกิจ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพัฒนาเทคนิคและวิธีการที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึก และปลาเทพา ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งยวดในปัจจุบัน งานวิจัยนี้จึงเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป เพื่อนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต และ การอนุรักษ์พันธุ์ปลาต่อไป

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ สถาบันการศึกษาต่างๆ กรมประมง ตลอดจนหน่วยงานของรัฐและเอกชนที่สนใจ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย (*Pangasinodon hypophthalmus*) และปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) โดยวิธีการแช่เย็น มีระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัยทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ในส่วนของห้องปฏิบัติการ ใช้ห้องปฏิบัติการสรีรและกายวิภาคศาสตร์สัตว์ อาคารเครื่องมือ 3 และภาคสนามใช้ฟาร์ม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดสุรินทร์ เป็นสถานที่ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย โดยมีวัสดุ - อุปกรณ์ และสารเคมี พร้อมทั้งวิธีการศึกษา ดังนี้

2.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยประกอบด้วย

2.1.1 วัสดุและอุปกรณ์

1) หลอดแช่แข็ง (French straws) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร
2) กระติกน้ำแข็ง
3) Heated hemostat
4) Slides และ cover slides
5) ตะเกียงแอลกอฮอร์
6) กรรไกร และเข็มเขี่ย
7) Beakers (ขนาด 25, 50, 150 และ 250 มิลลิลิตร)
8) Volumetric flash (ขนาด 250 มิลลิลิตร)
9) กระบอกตวง (ขนาด 25 มิลลิลิตร)
10) ขวดสีชา
11) กระบอกฉีดยาและเข็มฉีดยา
12) โกร่งบดฮอร์โมน
13) กระชังผ้าไนลอนขนาด 15 x 20 เซนติเมตร
14) Glass Petri dish
15) Micro pipettes (ขนาด 20, 200, 1000 ไมโครลิตร)
16) Small and large pipettes tips
17) Liquid nitrogen containers dewar 20 XT (Taylor- Wharton U.S.A)
18) LN_2 storage with dispensers
19) Cryobath
20) Cryochamber

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

21) Cryocanes

22) Cryogloves

23) Freeze control (CL 3300)

24) Compound and Stereo microscope

25) Computer and Software operating manual (Cryogenesis version 4 for windows)

26) ตู้เย็นปรับอุณหภูมิ 0-6 องศาเซลเซียส

27) สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer)

28) Vortex mixer

29) Timer

2.1.2 สารเคมี

สารเคมีสำหรับศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ และปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

1) น้ำกลั่น
2) ไนโตรเจนเหลว
3) Sodium chloride (NaCl)
4) Dimethyl acetamide (DMA)
5) Dimethyl sulfoxide (DMSO)
6) Methanol (MeOH)
7) Luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRHa; Suprefact)
8) Domperidone (Motilium)
9) Eosin-B
10) Nigrosin

2.2 วิธีการศึกษา

การศึกษาชนิดของสาร Cryoprotectant, combination cryoprotectants และ อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย และปลาเทโพโดยวิธีการแช่แข็ง มี 2 ขั้นตอนดังนี้คือ

2.2.1 ภาคสนาม

การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาสวาย มีแนวปฏิบัติดังนี้

1) การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาสวาย

เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาสวายให้มีน้ำหนักเฉลี่ย 2.5 กิโลกรัม/ตัว ยาวประมาณ 55 เซนติเมตร ในบ่อดิน โดยให้อาหารเม็ดลอยน้ำที่มีโปรตีน 35% และให้อาหาร 1 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักตัว วัน

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ละ 1 ครั้ง และเมื่อถึงฤดูสืบพันธุ์นำปลามาแยกเพศผู้ และเพศเมีย และนำไปเลี้ยงไว้ในกระชังที่ความหนาแน่น 5-10 กิโลกรัม/ตารางเมตร โดยเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลา ณ ฟาร์มประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2) การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาสวาย

คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาสวายที่สมบูรณ์พันธุ์ มาแยกเพศผู้ และเพศเมีย โดยการคัดเลือกพ่อพันธุ์ปลาและแม่พันธุ์ปลาควรมีอุปกรณ์ช่วยในการจับ เช่น เปลผ้าใบ หรือถังลำเลียงพ่อแม่พันธุ์ เพื่อช่วยลดความบอบช้ำ โดยพ่อแม่พันธุ์ที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

พ่อพันธุ์ปลาสวาย ลักษณะติ่งเพศ มีสีชมพู หรือสีแดงอ่อน และเมื่อใช้มือบีบที่ช่องเพศเบาๆ จะมีน้ำเชื้อสีขาวไหลออกมา

แม่พันธุ์ปลาสวาย ลักษณะท้องอูมเป่งเห็นได้ชัดเจน พื้นท้องนิ่ม ติ่งเพศมีลักษณะกลมนูนกว้างและใหญ่กว่าเพศผู้ มีสีชมพู หรือสีแดง

3) การฉีดฮอร์โมน พ่อแม่พันธุ์ปลา อ้างอิงวิธีของ Kwantong (2003) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

ก่อนทำการฉีดฮอร์โมนนำพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในกระชัง มาใส่ในกระชังเหล็กขนาด 1 ตารางเมตร โดยแยกเพศผู้และเพศเมีย และควรงดอาหารอย่างน้อยเป็นเวลา 6-12 ชั่วโมง โดยนำพ่อแม่พันธุ์ปลาที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ มาฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa, Suprefact) ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์, Domperidone (Motilium) โดยใช้ Suprefact 15 µg/kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/kg สำหรับพ่อพันธุ์หลังจากนั้น 6-8 ชั่วโมง ทำการรีดน้ำเชื้อโดยใช้หลอดฉีดยา ขนาด 5 มิลลิลิตรดูดน้ำเชื้อ ก่อนการรีดน้ำเชื้อใช้ผ้าขนหนูสะอาดซับตัวปลา และใช้กระดาษทิชชูซับบริเวณติ่งเพศ (Urogenital pore) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำเลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ ส่วนแม่พันธุ์ปลานั้นนำมาฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์เช่นเดียวกับพ่อพันธุ์ปลา แต่ทำการฉีดฮอร์โมน 2 เข็ม เข็มแรกฉีดเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของไข่ โดยใช้ Suprefact 10 µg/kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/kg หลังจากนั้น 6 - 8 ชั่วโมง จึงฉีดเข็มที่ 2 เพื่อกระตุ้นการตกไข่ ซึ่งใช้ Suprefact 30 µg/kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/kg จากนั้น 8 - 10 ชั่วโมง ทำการรีดไข่ ก่อนรีดไข่ใช้ผ้าขนหนูที่สะอาดทำความสะอาดตัวปลา และใช้กระดาษทิชชูซับบริเวณติ่งเพศ แล้วใช้ภาชนะที่แห้งและสะอาดรองรับไข่ เพื่อนำไปทดสอบการปฏิสนธิต่อไป

การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาเทโพ

นำพ่อแม่พันธุ์ปลาเทโพที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ มีน้ำหนักเฉลี่ย 1.5 กิโลกรัม/ตัวสำหรับปลาเพศผู้ และน้ำหนักเฉลี่ย 2.2 กิโลกรัม/ตัวสำหรับปลาเพศเมีย และ จากบ่อดินมาพักในบ่อซีเมนต์ของโรงเพาะฟัก ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดจังหวัดสุรินทร์ โดยแยกเพศผู้และเพศเมีย ทั้งนี้เพื่อสะดวกในการฉีดฮอร์โมน ก่อนฉีดฮอร์โมนควรงดอาหารอย่างน้อย 6–12 ชั่วโมง ซึ่ง

หลักการในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาเทโพ การฉีดฮอร์โมนกระตุ้นพ่อแม่พันธุ์ปลา ชนิดและโดส ที่ใช้ในการฉีดฮอร์โมนใช้หลักการเดียวกับปลาสวาย

ภาพที่ 1 แม่พันธุ์ปลาเทโพ (ซ้าย) และพ่อพันธุ์ปลาเทโพ (ขวา)

2.2.2 ในห้องปฏิบัติการ ทำการศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลาโดยดูจากลักษณะต่างๆ ดังนี้

1. ศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ เพื่อดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ น้ำเชื้อที่จะนำไปเก็บรักษาน้ำเชื้อจะต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่น้อยกว่า 75% การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิทำได้โดยการหยดน้ำกลั่น 1 หยด (20 µl) ลงบนสไลด์ และหยดน้ำเชื้อ 1 µl ผสมให้เข้ากัน แล้วสังเกตการเคลื่อนที่ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40×) โดยเกณฑ์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกณฑ์การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

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

ดัดแปลงมาจาก: Guest (1973)

2. การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)

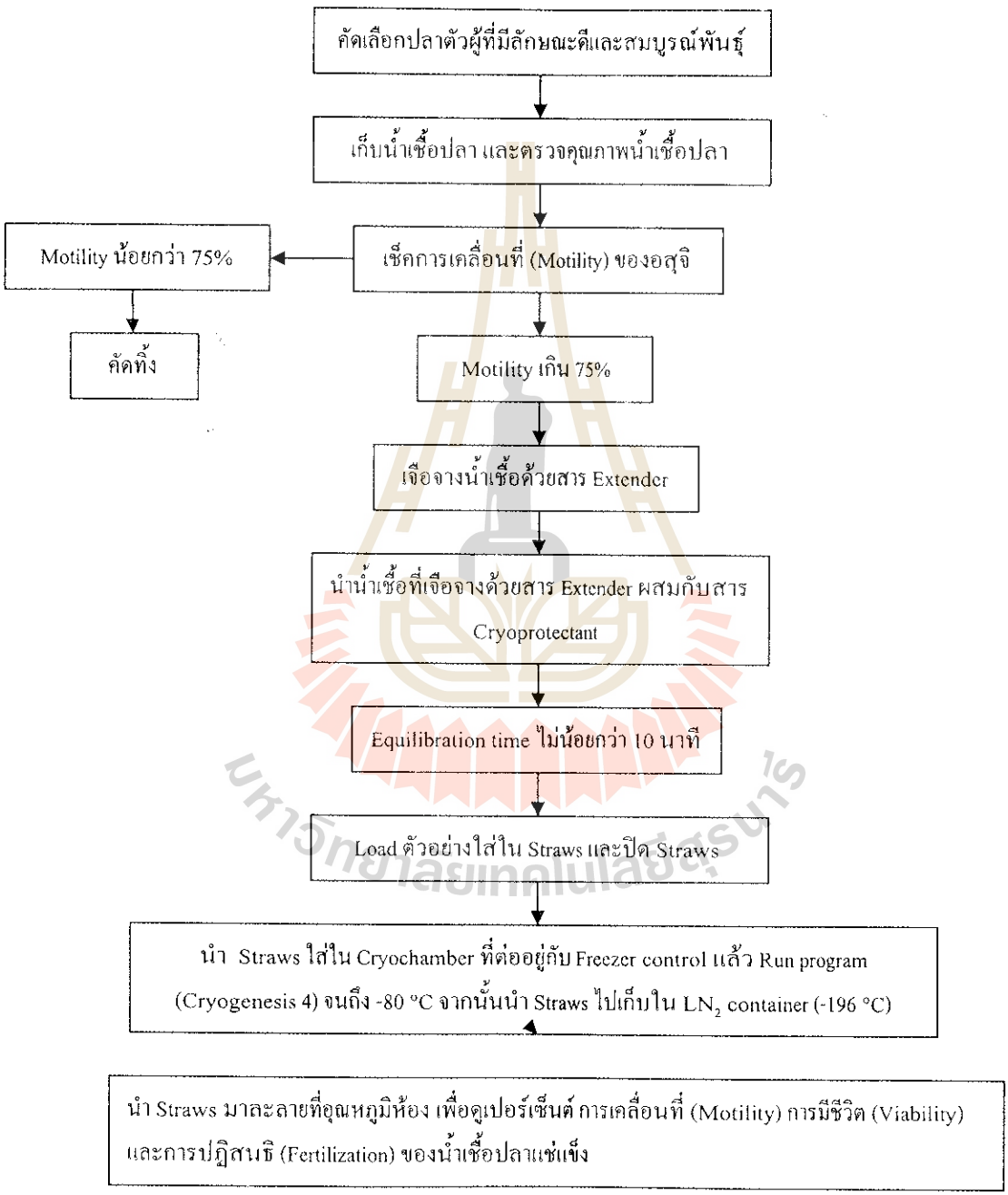
การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ ทำได้โดยเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1: 1500 เท่า แล้วนับจำนวนอสุจิ โดยใช้สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (Hemacytometer counting chamber) นับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40×) โดยนับจำนวนอสุจิจาก 5 บริเวณ คือ มุม บน-ล่าง ทั้งซ้ายและขวา และช่องตรงกลาง แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ ต่อ 1 มิลลิลิตร ดังนี้

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

จำนวนอสุจิ/มิลลิลิตร = (รวมจำนวนอสุจิที่นับได้ทั้ง 5 บริเวณ/5)×dilution rate×25×10^4

3. ขั้นตอนและวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

นำน้ำเชื้อที่มี เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่า 75% มาเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย และปลาเทโพโดยวิธีการแช่แข็ง มีขั้นตอนและระเบียบวิธีการวิจัยดังแสดงในแผนภาพที่ 2

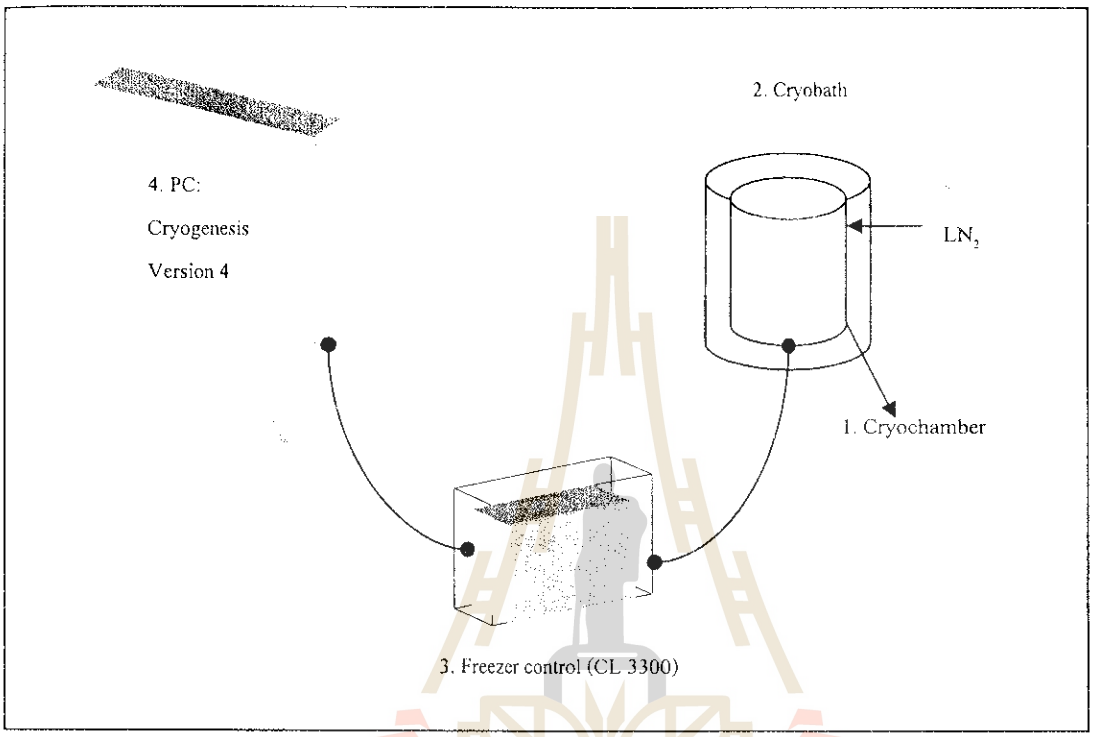


ภาพที่ 2. แผนภาพแสดงกระบวนการการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง

ดัดแปลงจาก Kwantong (2003)

4. Freezing instrumentation

ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง ใช้ Freezer control (CL 3300) ร่วมกับ Cryogenesis version 4 for windows (Cryologic, Pty Ltd., Australia 1998 and 1999) เป็นตัวช่วยในการควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างการแช่แข็ง (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ Freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis

ขั้นตอนการ Run program และการใช้คอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ มีขั้นตอนดังนี้

1) นำไนโตรเจนเหลว (LN_2) สูงประมาณ 15 เซนติเมตร ใส่ใน Cryobath จากนั้นใส่ Cryochamber ลงใน Cryobath ปิดฝา ต่อสาย Cryochamber เข้ากับ Freezer control (CL 3300) จากนั้นต่อ Freezer control เข้ากับคอมพิวเตอร์ เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ ดังแสดงในภาพที่ 3

2) เลือกช่วงอุณหภูมิที่ต้องการ โดยใช้เมนู EXCUTE จากโปรแกรม Cryogenesis

3) นำตัวอย่างของน้ำเชื้อที่ Load ใส่ French straws เรียบร้อยแล้วบรรจุใน Cryochamber Run program จนอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80 °C จึงนำเอาตัวอย่างน้ำเชื้อออกจาก Cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งนี้ไปทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของอสุจิต่อไป

5. การศึกษาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) รีดไข่ปลาสวาย หรือ ปลาเทโพหลังจากการฉีดฮอร์โมนเข็มที่ 2 มาแล้ว 8 – 10 ชั่วโมง ซึ่งลักษณะไข่ปลาที่ดีมีสีเหลืองนวลและโปร่งแสง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 - 1.2 มิลลิเมตร

2) ใช้ไมโครปิเปตดูดไข่ 120 µl (มีไข่ประมาณ 130-150 ฟอง) ใส่จานแก้ว (Glass petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร

3) ดูดน้ำเชื้อสด 30 µl (ตัวควบคุม) และน้ำเชื้อแช่แข็ง 230 µl ลงไปผสมกับไข่ โดยทำการทดลอง 4 ซ้ำต่อทรีตเมนต์

4) ใช้ขนไก่คนไข่และน้ำเชื้อให้เข้ากัน หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำสำหรับการเพาะฟักลงไปประมาณ 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที

5) นำจานแก้วใส่ลงในกระชังเพาะฟักขนาด 15 x 20 เซนติเมตร (ภาพที่ 4) มีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาทำการเพาะฟัก ช่วงอุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 25 - 29 °C หลังจากนั้น 7 ชั่วโมง ทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ที่ระยะ gastrula stage

ภาพที่ 4 กระชัง และ Tank สำหรับฟักไข่ปลา

6. การศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (Viability)

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ทำได้โดยวิธีการย้อมสี Eosin-Nigrosin (ส่วนประกอบสีย้อมแสดงในตารางที่ 2)

ตารางที่ 2. ส่วนประกอบของสีย้อม Eosin-Nigrosin

ส่วนประกอบสารเคมี	ปริมาณ
Eosin Y disodium salt	1 (g)
Nigrosin water soluble	5 (g)
Distilled water	100 (ml)

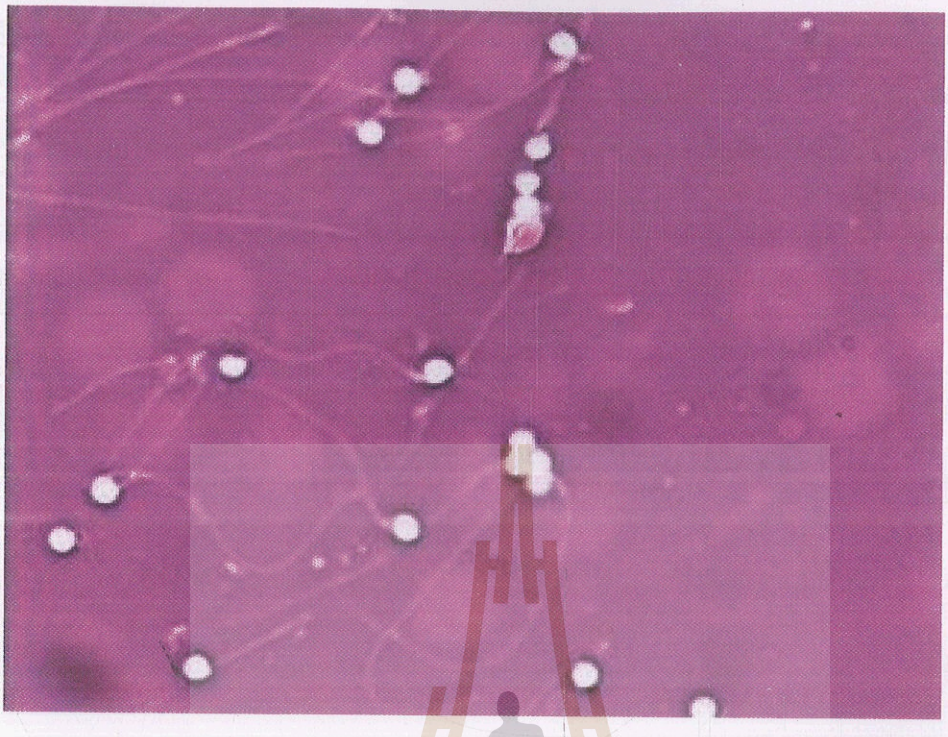
วิธีการเตรียมสีย้อมสำหรับดูตัวเป็นตัวตายสามารถเตรียมได้ดังนี้

1. ละลาย Nigrosin 5 กรัม ในน้ำอุ่น 50 มิลลิลิตร
2. ละลาย Eosin Y 1 กรัม ในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร
3. นำสารละลายที่ได้ในข้อ 1 และ 2 มาคนให้เข้ากันเมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองจนไม่มีตะกอนเหลืออยู่
4. นำสีย้อมที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง

ขั้นตอนการศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมีขั้นตอนดังนี้

1. หยดสี Eosin – Nigrosin ลงบนแผ่นสไลด์ 5 µl แล้วหยดน้ำเชื้อแช่แข็งของแต่ละกลุ่มการทดลองลงข้างๆ สีย้อมประมาณ 1 µl
2. ใช้เข็มเขี่ย Smear น้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากัน จากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบางๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว รอจนแผ่นสไลด์แห้ง
3. หยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1-2 หยด แล้วปิดด้วย Cover slide แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
4. นับจำนวนอสุจิตัวเป็นและตัวตาย โดยการสุ่มนับ 5 บริเวณๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่เซลล์ตัวเป็นจะติดสีขาว (ไม่ติดสีย้อม) ส่วนอสุจิตัวตายจะติดสีย้อมมีสีชมพูแดงหรือสีม่วง ภาพที่ 5

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 5 น้ำเชื้อมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และน้ำเชื้อตายจะติดสีม่วงหรือสีชมพูแดง

การทดลองที่ 1. ผลของ Cryoprotectant และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อมาเจือจางด้วยสาร Extender (0.9%NaCl) ทั้งนี้เนื่องจาก 0.9%NaCl เป็นสาร extender ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายไม่แตกต่างกับการใช้สาร modified extender (ซึ่งเป็นสารละลายน้ำเชื้อที่ผู้วิจัยได้จัดเตรียมขึ้น) และมีค่าออสโมลิตี้ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อปลา ดังผลในตารางที่ 3 (สมรและคณะ, 2550) โดยละลายในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร Extender เท่ากับ 1:3 หลังจากนั้นเติมสาร Cryoprotectant (10%DMA, 10%DMSO และ 5%MeOH) ที่อัตราส่วนของสาร cryoprotectant ที่สัดส่วนต่างๆ ดังแผนการทดลองแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร Extender 2 ชนิด (0.9%NaCl และ modified extender) ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} ตัวเลขในวงเล็บคือเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุม (น้ำเชื้อสด)

Treatment	Extender	Cryoprotectant	Fertilization (%)
1	0.9%NaCl	10%DMSO	54.33 ± 6.01^{ab} (90.55)
2	0.9%NaCl	10%DMA	38.00 ± 4.93^{bc} (63.33)
3	0.9%NaCl	5%MeOH	39.00 ± 3.15^{bc} (65.00)
4	Modified Extender	10%DMSO	41.33 ± 6.17^{bc} (68.88)
5	Modified Extender	10%DMA	47.33 ± 2.33^{abc} (78.88)
6	Modified Extender	5%MeOH	30.67 ± 8.37^{c} (51.12)
7	Control		60.00 ± 3.21^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ที่มา: สมรและคณะ 2550

2) ดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1. ปริมาตร 230 µl ใส่ French straw ขนาด 250 µl) โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วปิดหลอดโดยใช้ Heated hemostat ซึ่งหลังจากที่เติมสาร Cryoprotectant จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดแช่แข็งใส่ลงใน Cryochamber ใช้เวลาไม่น้อยกว่า 10 นาที

3) นำ Straws ใส่ลงใน Cryochamber ปิดฝา Run program โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 °C min^{-1} จากนั้นรอให้คอมพิวเตอร์และ Freezer control ทำงาน จนอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80 °C จึงนำ Straws ออกจาก Cryochamber แล้วไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์จากนั้นน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป

ตารางที่ 4 แผนการทดลองผลของสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

Treatment	สาร Extender	สาร cryoprotectant
1	0.9%NaCl	10%DMSO
2	0.9%NaCl	10%DMA
3	0.9%NaCl	5%MeOH
4	0.9%NaCl	10%DMSO+10%DMA
5	0.9%NaCl	10%DMSO+5%MeOH
6	0.9%NaCl	10%DMA+5%MeOH
7	0.9%NaCl	10%DMSO+20%DMA
8	0.9%NaCl	10%DMSO+10%MeOH
9	0.9%NaCl	10%DMA+10%MeOH
10	0.9%NaCl	20%DMSO+10%DMA
11	0.9%NaCl	20%DMSO+5%MeOH
12	0.9%NaCl	20%DMA+5%MeOH
13 (Control)		

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ CRD (completely randomized design) ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวน นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิในแต่ละทรีตเมนต์ไป transformed โดยใช้วิธี arcsine transformation จากนั้นเปรียบเทียบผลของสาร Cryoprotectant และ combination cryoprotectants ในแต่ละทรีตเมนต์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

การทดลองที่ 2. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการตรวจสอบเอกสารพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันจะส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิของปลาในระหว่างขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง ในการทดลองที่ 2 นี้ จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาความเหมาะสมของการลดอุณหภูมิโดยใช้ one step freezing rate ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ กันดังนี้ 5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1} เพื่อที่จะหาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป โดยการ

เลือกทรีตเมนต์ที่ให้ผลการศึกษาไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมในการทดลองที่ 1. ดังนี้ [10% DMSO + 10% DMA, 10% DMSO + 20% DMA และ 20% DMA + 5% MeOH] มาศึกษาถึงผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อมาเจือจางด้วยสาร Extenders (0.9% NaCl) ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร Extender เท่ากับ 1:3 หลังจากนั้นเติมสาร Cryoprotectant (DMA, DMSO และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ในตารางที่ 5
2) ดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1. ปริมาตร 230 µl ใส่หลอด French straw โดยใช้ไมโครปิเปตแล้วปิดหลอด โดยใช้ Heated hemostat
3) นำ Straws ใส่ลงใน Cryochamber ปิดฝา เลือกอุณหภูมิที่ต้องการศึกษาดังนี้

5, 10, 20 หรือ 40 °C min^{-1} จากนั้น Run program จนอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80 °C จึงนำ Straws ออกจาก Cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป

ตารางที่ 5. แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย มี 0.9% NaCl เป็นสาร Extender ร่วมกับการใช้สาร cryoprotectants ที่ให้ผลไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมจากการทดลองที่ 1

Treatment	Freezing rate (°C min^{-1})	combination cryoprotectants
1	5	10%DMSO + 10%DMA
2		10%DMSO + 20%DMA
3		20%DMA + 5%MeOH
4	10	10%DMSO + 10%DMA
5		10%DMSO + 20%DMA
6		20%DMA + 5%MeOH
7	20	10%DMSO + 10%DMA
8		10%DMSO + 20%DMA
9		20%DMA + 5%MeOH
10	40	10%DMSO + 10%DMA
11		10%DMSO + 20%DMA
12		20%DMA + 5%MeOH
13 (Control)		

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

ปลาเทโพ

การศึกษาผลของ Cryoprotectant และ combination cryoprotectants ที่มีผลในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii)* และผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพนั้น ผู้วิจัยได้ประยุกต์เอาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายมาใช้ โดยเลือกผลการศึกษาหรือทรีตเมนต์ ที่ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มน้ำเชื้อสด (Control) จากการทดลองที่ 1. [10% DMSO + 10% DMA, 10% DMSO + 20% DMA และ 20% DMA + 5% MeOH] ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายมาประยุกต์ใช้กับปลาเทโพ โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองดังนี้

การทดลองที่ 3. ศึกษาผลของ Combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ

มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อมาเจือจางด้วย 0.9% NaCl ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร Extenders เท่ากับ 1:3 หลังจากนั้นเติมสาร combination cryoprotectants ที่ให้ผลการศึกษาไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมในการทดลองที่ 1. (การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย) ดังแผนการทดลองในตารางที่ 6

2) ดูดสารละลายน้ำเชื้อปริมาตร 230 µl ใส่หลอดแช่แข็ง โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ Heated hemostat

3) นำ Straws ใส่ลงใน Cryochamber แล้ว Run program โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} จากนั้นรอ จนอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80 °C จึงนำ Straws ออกจาก Cryochamber แล้วนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป

ตารางที่ 6 แผนการทดลอง combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยมี 0.9% NaCl เป็นสาร extender

Treatment	Combination cryoprotectants
1	10%DMSO + 10%DMA
2	10%DMSO + 20%DMA
3	20%DMA + 5%MeOH
4 (Control)	

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผล Combination cryoprotectants ในแต่ละทรีตเมนต์ โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

การทดลองที่ 4. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ

การศึกษาถึงผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพในครั้งนี้ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย มาใช้ ซึ่งมีขั้นตอนและแผนการทดลองดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อมาเจือจางด้วยสาร Extenders (0.9% NaCl) ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร Extender เท่ากับ 1:3 หลังจากนั้นเติมสาร Cryoprotectant (DMA, DMSO และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD) ในตารางที่ 7

2) ดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1. ปริมาตร 230 µl ใส่หลอดแช่แข็ง โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ Heated hemostat ซึ่งหลังจากที่เติมสาร Cryoprotectant จะเริ่มจับเวลาจนถึงการนำหลอดแช่แข็งใส่ลงใน Cryochamber ใช้เวลาประมาณ 10 นาที

3) นำ Straws ใส่ลงใน Cryochamber ปิดฝา เลือกอุณหภูมิที่ต้องการศึกษาดังนี้ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) จากนั้น Run program จนอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80 °C จึงนำ Straws ออกจาก Cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป

ตารางที่ 7. แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ มี 0.9%NaCl เป็นสาร Extender ร่วมกับการใช้สาร cryoprotectants ที่ให้ผลไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมจากการทดลองที่ 1

Treatment	Freezing rate (°C min^{-1})	สาร Cryoprotectant
	5	
1		10%DMSO + 10%DMA
2		10%DMSO + 20%DMA
3		20%DMA + 5%MeOH
	10	
4		10%DMSO + 10%DMA
5		10%DMSO + 20%DMA
6		20%DMA + 5%MeOH
	20	
7		10%DMSO + 10%DMA
8		10%DMSO + 20%DMA
9		20%DMA + 5%MeOH
	40	
10		10%DMSO + 10%DMA
11		10%DMSO + 20%DMA
12		20%DMA + 5%MeOH
13 Control		

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3

ผลการศึกษา

3.1. ผลของสาร Cryoprotectant และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สาร Cryoprotectant ชนิดเดียว (10% DMSO, 10% DMA และ 5% MeOH) หรือใช้ combination cryoprotectants ร่วมกับ 0.9% NaCl เป็นสาร Extender และใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} พบว่าเมื่อใช้ combination cryoprotectants ระหว่าง 10% DMSO + 20% DMA , 10% DMSO + 10% DMA หรือใช้ 20% DMA + 5% MeOH ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($p>0.05$; ตารางที่ 8) โดย combination cryoprotectants ระหว่าง 10% DMSO + 20% DMA ให้อัตราการปฏิสนธิสูงสุด 58.89 ± 3.32% (99% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าการใช้สาร cryoprotectant เพียงชนิดเดียว และเมื่อใช้ 5% MeOH ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำสุดเท่ากับ 25.85± 2.28% (43% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$; ตารางที่ 8) เมื่อทดสอบการมีชีวิตพบว่าเมื่อใช้ combination cryoprotectants 10% DMSO + 20% DMA ให้อัตราการมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 30.01 ± 2.74% (34% ของน้ำเชื้อสด) และพบว่าการใช้สาร Cryoprotectant แต่ละชนิด หรือการใช้ combination cryoprotectants นั้นให้อัตราการมีชีวิตต่ำกว่ากลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด; $p<0.05$ ดังตารางที่ 1) เมื่อทดสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant มีอัตราการเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 50.00 ± 3.54% (50% ของน้ำเชื้อสด) และเมื่อใช้ 5% MeOH มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำสุดเท่ากับ 3.02 ± 5.00% (3% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งพบว่าการใช้สาร cryoprotectant แต่ละชนิด หรือเมื่อใช้ combination cryoprotectants นั้น ให้อัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($p<0.05$; ตารางที่ 8)

เมื่อวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรตั้งแต่ 2 ตัวขึ้นไปคือความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปฏิสนธิและอัตราการเคลื่อนที่ หรือระหว่างอัตราการปฏิสนธิและอัตราการมีชีวิต หรือระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต โดยเมื่อพิจารณาจากการใช้สาร Cryoprotectant แต่ละชนิด นั้นพบว่ามีเพียงอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตเท่านั้นที่มีความสัมพันธ์กันโดยความสัมพันธ์อยู่ในระดับปานกลาง ($r=0.53$; $p<0.01$) แต่เมื่อใช้ combination cryoprotectants นั้นพบว่า อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิต หรืออัตราการปฏิสนธิกับอัตราการมีชีวิตนั้นมีความสัมพันธ์กันในระดับปานกลาง ($r=0.51$ และ $r=0.50$, $p<0.01$) ตามลำดับ ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปฏิสนธิและอัตราการเคลื่อนที่นั้นมีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ ($r=0.26$; $p<0.05$)

เมื่อวิเคราะห์ Contrast เพื่อเปรียบเทียบผลของการใช้ Cryoprotectant แต่ละชนิด (DMSO, DMA และ MeOH) กับการใช้ combination cryoprotectants ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่เย็นนั้นพบว่าการใช้ combination cryoprotectants ให้ผลของอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ Cryoprotectant ชนิดเดียว ($p<0.05$) แต่ไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ ($p>0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 8. ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ในสาร Extender (0.9% NaCl) ร่วมกับสาร Cryoprotectant แต่ละชนิด หรือ combination cryoprotectants โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}

สาร Cryoprotectant	การปฏิสนธิ (%)	การมีชีวิต (%)	การเคลื่อนที่ (%)
10% DMSO	41.18 ± 3.04^{bc}	25.88 ± 2.42^{bc}	50.00± 3.54^{b}
	(69.06)	(28.92)	(50.00)
10% DMA	36.42 ± 3.44^{bc}	20.41 ± 2.30^{bc}	38.46 ± 7.95^{bc}
	(61.08)	(22.81)	(38.46)
5% MeOH	25.85 ± 2.28^{c}	16.40 ± 1.96^{c}	3.02± 5.00^{d}
	(43.35)	(18.33)	(3.02)
10% DMSO + 10% DMA	45.61 ± 2.93^{ab}	25.29 ± 2.97^{bc}	35.67 ± 7.55^{bc}
	(76.48)	(28.26)	(35.67)
10% DMSO + 5% MeOH	35.72 ± 3.20^{bc}	21.45 ± 3.19^{bc}	30.19 ± 4.86^{bc}
	(59.90)	(23.97)	(30.19)
10% DMA + 5% MeOH	37.08 ± 2.74^{bc}	20.47 ± 1.91^{bc}	20.15 ± 5.46^{bcd}
	(62.18)	(22.87)	(20.15)
10% DMSO + 20% DMA	58.89 ± 3.32^{a}	30.01 ± 2.74^{b}	32.90 ± 7.07^{bc}
	(98.76)	(33.54)	(32.90)
10% DMSO + 10% MeOH	39.06 ± 3.31^{bc}	21.64 ± 2.76^{bc}	25.00 ± 5.00^{bc}
	(65.50)	(24.18)	(25.00)
10% DMA + 10% MeOH	33.19 ± 3.66^{bc}	16.78 ± 3.40^{c}	11.70 ± 7.07^{cd}
	(55.67)	(18.75)	(11.70)
20% DMSO + 10% DMA	42.80 ± 2.29^{b}	23.56 ± 3.22^{bc}	22.52 ± 7.26^{bcd}
	(71.78)	(26.33)	(22.52)
20% DMSO + 5% MeOH	39.45 ± 2.78^{bc}	23.24 ± 2.72^{bc}	25.00 ± 6.12^{bc}
	(66.16)	(25.97)	(25.00)
20% DMA + 5% MeOH	48.20 ± 2.13^{ab}	26.57 ± 2.16^{bc}	25.00 ± 6.61^{bc}
	(80.84)	(29.69)	(25.00)
Control	59.63 ± 2.03^{a}	89.49 ± 0.89^{a}	100 ±0.00^{a}

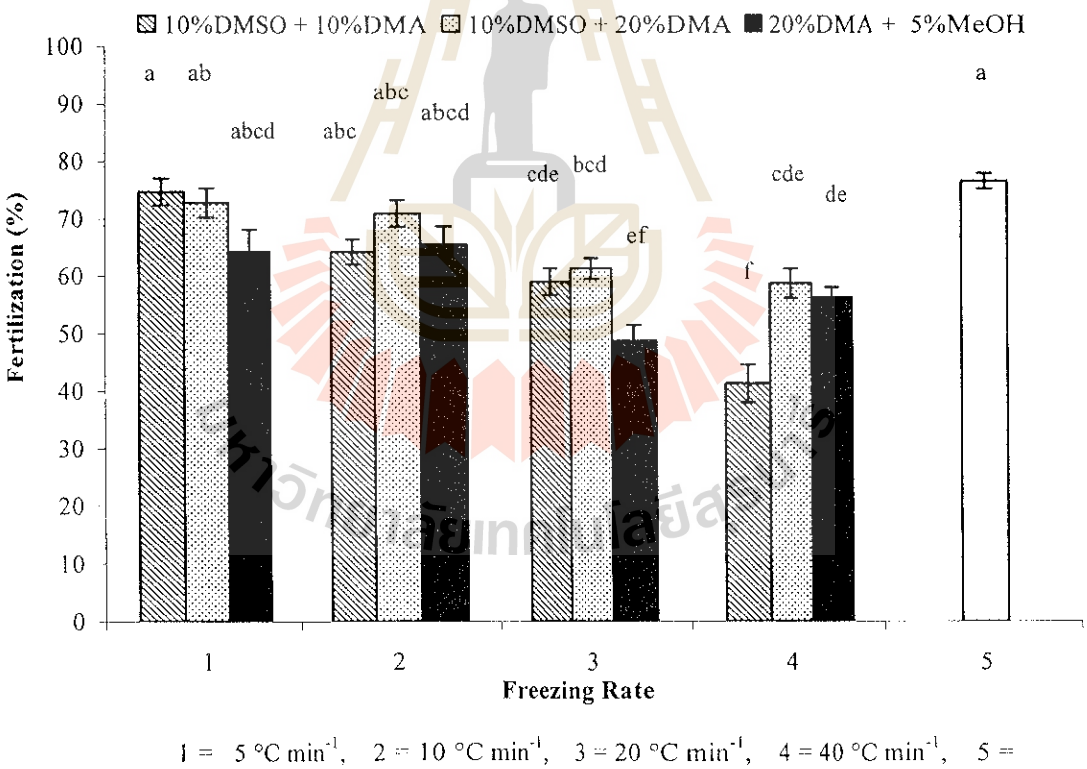
หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of Control)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

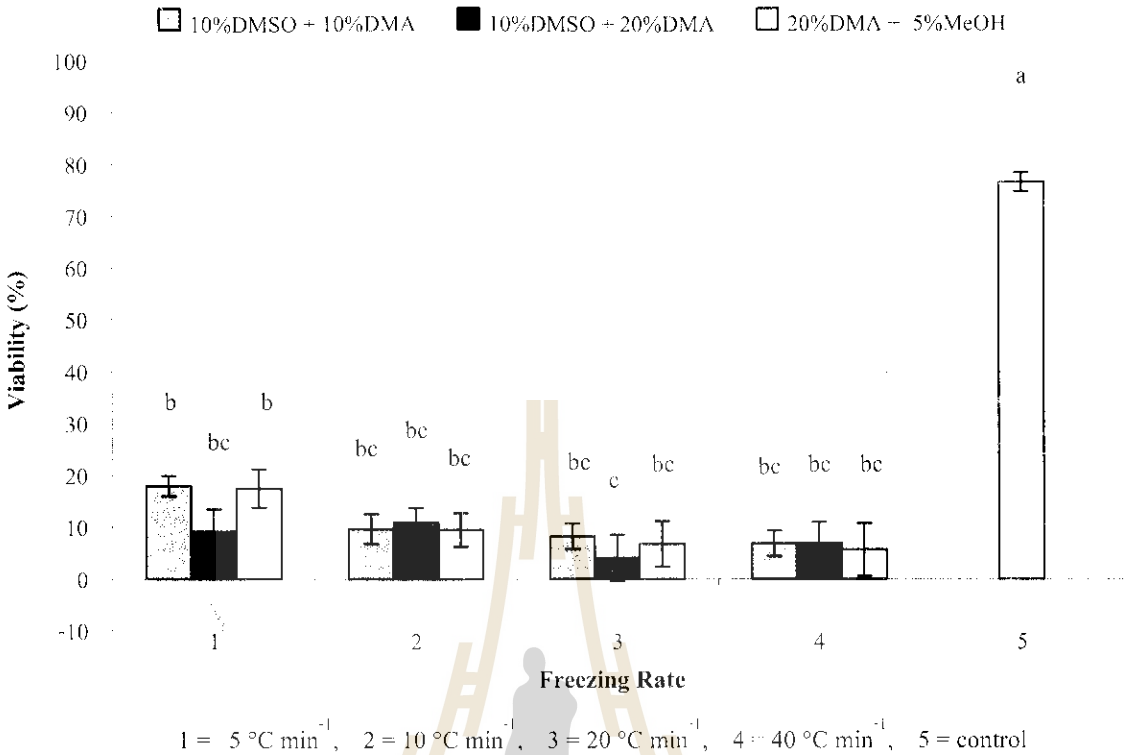
จากการศึกษาความเหมาะสมของการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) พบว่าการลดอุณหภูมิที่ 5 และ 10 °C min^{-1} มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด; $p<0.05$ ภาพที่ 6) แต่เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 40 °C min^{-1} ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำสุดเท่ากับ 41.32 ± 3.33% และแตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) เมื่อทดสอบอัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่พบว่า การลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) นั้นให้อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ต่ำ และแตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$; ภาพที่ 7 และ 8 ตามลำดับ)

เมื่อดูผลของการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) นั้นพบว่าอัตราการปฏิสนธิไม่มีความสัมพันธ์กับอัตราการมีชีวิต แต่พบความสัมพันธ์ในระดับปานกลาง ($r=0.65$, $p<0.01$) ระหว่างอัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ หรือความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ ($r=0.23$; $p<0.05$) ระหว่างอัตราการปฏิสนธิกับอัตราการเคลื่อนที่

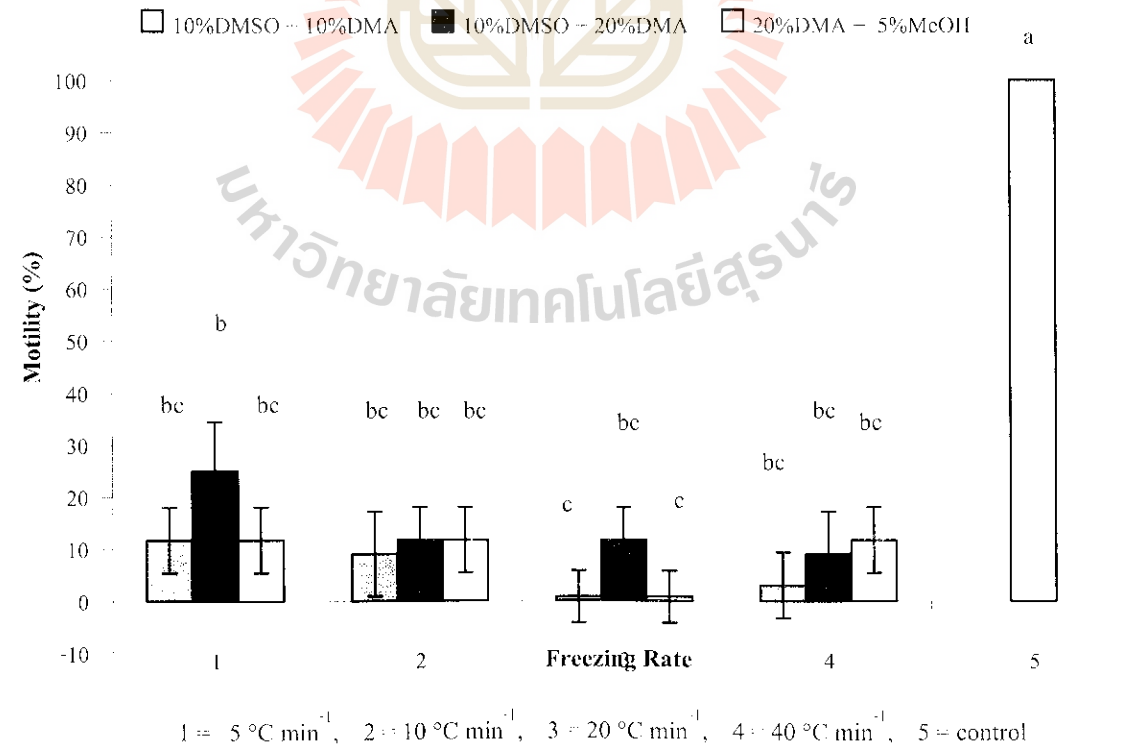


1 = 5 °C min^{-1}, 2 = 10 °C min^{-1}, 3 = 20 °C min^{-1}, 4 = 40 °C min^{-1}, 5 =

ภาพที่ 6. อัตราการปฏิสนธิ (Mean ± SE) ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่ระดับการลดอุณหภูมิต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1})



ภาพที่ 7. อัตราการมีชีวิต (Mean + SE) ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่ระดับการลดอุณหภูมิต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1})



ภาพที่ 8. อัตราการเคลื่อนที่ (Mean ± SE) ของน้ำเชื้อปลาสวาย (*P. hypophthalmus*) ที่ระดับการลดอุณหภูมิต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1})

3.3 ผลของ Combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*P. larnaudii*) โดยประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการประยุกต์ใช้เทคนิคและวิธีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย มาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยการเลือกทรีตเมนต์ ที่ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มน้ำเชื้อสดของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย ซึ่งได้แก่ Combination cryoprotectants เหล่านี้ (10% DMSO + 10% DMA, 10% DMSO + 20% DMA และ 20% DMA + 5% MeOH) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิในแต่ละทรีตเมนต์อยู่ในช่วงระหว่าง 50-57% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) แต่อัตราการปฏิสนธิดังกล่าวต่ำแตกต่างจากน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) (ดังตารางที่ 9) เมื่อทดสอบอัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ พบว่าอัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9. ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) อัตราการปฏิสนธิ การมีชีวิต และการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาเทโพ *(P. larnaudii)* โดยใช้ combination cryoprotectants แต่ละชนิด (DMSO, DMA และ MeOH) และมี 0.9% NaCl เป็นสาร Extender โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}

Combination cryoprotectants	การปฏิสนธิ (%)	การมีชีวิต (%)	การเคลื่อนที่ (%)
10% DMSO + 10% DMA	57.45 ± 2.71[b] (66.25)	8.98 ± 0.58[b] (14.00)	3.02 ± 10.00[b] (3.02)
10% DMSO + 20% DMA	54.18 ± 2.86[b] (62.48)	0.65 ± 2.41[c] (1.01)	3.02 ± 10.00[b] (3.02)
20% DMA + 5% MeOH	50.13 ± 3.04[b] (57.81)	1.49 ± 3.77[c] (2.33)	3.02 ± 10.00[b] (3.02)
Control	86.71 ± 1.48[a]	64.18 ± 3.38[a]	100.00 ± 0.00[a]

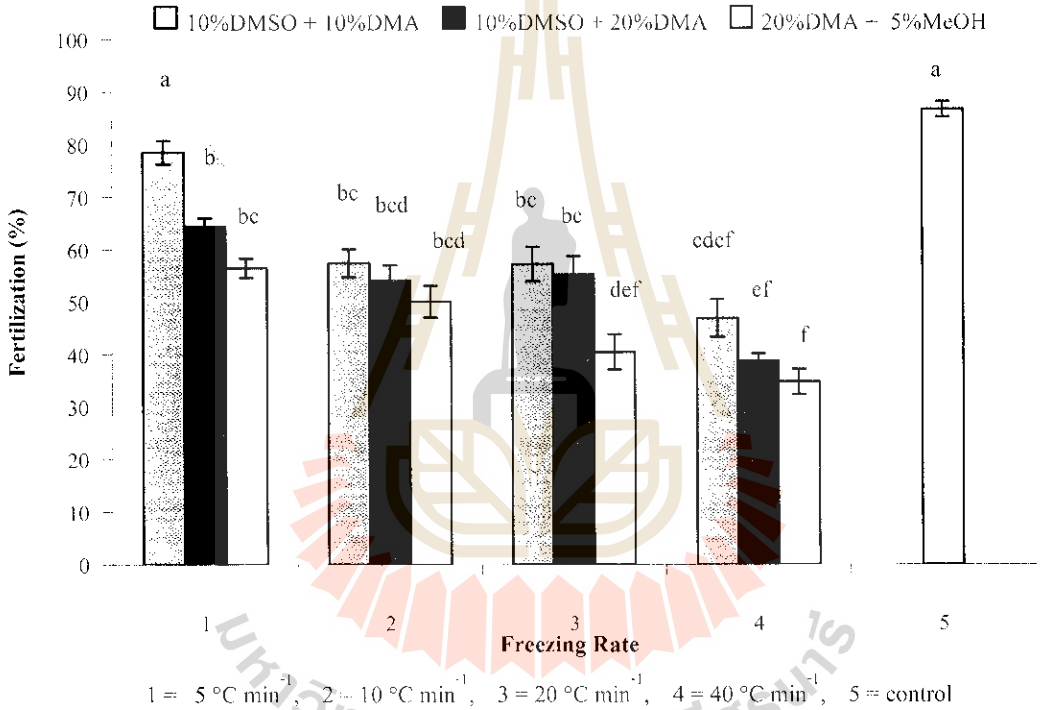
หมายเหตุ: อักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขในวงเล็บคือเปอร์เซ็นต์ของตัวควบคุม (น้ำเชื้อสด)

เมื่อพิจารณาผลของ Combination cryoprotectants ต่อความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการปฏิสนธิและอัตราการเคลื่อนที่ หรือระหว่างอัตราการปฏิสนธิและอัตราการมีชีวิต หรือระหว่างอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตในปลาเทโพนั้นพบว่า มีความสัมพันธ์กันในระดับสูง ($r=0.78$, $r=0.86$ และ $r=0.91$; $p<0.01$) ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.4 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ *(P. larnaudii)* โดยวิธีการแช่แข็ง

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO + 10% DMA ที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min^{-1} มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 78.52 ± 2.23% (91% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้น้ำเชื้อสด ($p>0.05$) แต่เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 40 °C min^{-1} ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำสุดเท่ากับ 34.82 ± 2.40% หรือ 40% ของน้ำเชื้อสด เมื่อทดสอบด้วย 20% DMA + 5% MeOH ซึ่งต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ดังภาพที่ 9)



ภาพที่ 9. เปอร์เซ็นการปฏิสนธิ (Mean ± SE) ที่ระดับการลดอุณหภูมิต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*P. larnaudii*) โดยวิธีการแช่แข็ง

เมื่อทดสอบการมีชีวิต พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO + 10% DMA ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 20 °C min^{-1} การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 11.49 ± 3.38% ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) กับอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 และ 10 °C min^{-1} พบว่าอัตราการลดของอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) นั้นมีอัตราการมีชีวิตต่ำแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้น้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ดังตารางที่ 10) และพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) นั้นไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาเทโพ ($p>0.05$) อีกทั้งอัตราการลดของอุณหภูมิทั้ง 4 ระดับดังกล่าวมีอัตรา

การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อต่ำและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้น้ำเชื้อสด ($p<0.05$) (ตารางที่ 10)

เมื่อดูผลของการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ นั้นพบว่าอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตมีความสัมพันธ์กันในระดับสูง ($r=0.80$; $p<0.01$) หรือพบความสัมพันธ์กันในระดับปานกลาง ($r=0.61$; $p<0.01$) ระหว่างอัตราการปฏิสนธิและอัตราการมีชีวิต ส่วนอัตราการปฏิสนธิและอัตราการเคลื่อนที่นั้นมีความสัมพันธ์กันในระดับต่ำ ($r=0.35$; $p<0.05$)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 10. ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาเทโพ *(P. larnaudii)* ที่อัตราการลดอุณหภูมิในระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1})

อัตราการลดอุณหภูมิ	สาร Cryoprotectant	การมีชีวิต (%)	การเคลื่อนที่ (%)
5 °C min^{-1}	10%DMSO+10%DMA	9.96 ± 3.86 ^{b} (15.52)	11.70 ± 10.00 ^{b} (11.70)
	10%DMSO+ 20%DMA	2.41 ± 2.11 ^{cd} (3.75)	3.02 ± 10.00 ^{b} (3.02)
	20%DMA + 5%MeOH	1.01 ± 3.33 ^{d} (1.57)	3.02 ± 10.00 ^{b} (3.02)
10 °C min^{-1}	10%DMSO+ 10%DMA	8.98 ± 0.58 ^{bc} (14.00)	3.02 ± 10.00 ^{b} (3.02)
	10%DMSO+ 20%DMA	0.65 ± 2.41 ^{d} (1.01)	3.02 ± 10.00 ^{b} (3.02)
	20%DMA + 5%MeOH	1.49 ± 3.77 ^{d} (2.33)	3.02 ± 10.00 ^{b} (3.02)
20 °C min^{-1}	10%DMSO+ 10%DMA	11.49 ± 3.38 ^{b} (17.90)	17.86 ± 13.23 ^{b} (17.86)
	10%DMSO+ 20%DMA	4.42 ± 2.12 ^{bcd} (6.88)	3.02 ± 10.00 ^{b} (3.02)
	20%DMA + 5%MeOH	0.65 ± 2.41 ^{d} (1.01)	3.02 ± 10.00 ^{b} (3.02)
40 °C min^{-1}	10%DMSO+ 10%DMA	1.30 ± 3.42 ^{d} (2.03)	3.02 ± 10.00 ^{b} (3.02)
	10%DMSO+ 20%DMA	0.45 ± 1.91 ^{d} (0.69)	3.02 ± 10.00 ^{b} (3.02)
	20%DMA + 5%MeOH	1.76 ± 3.91 ^{d} (2.75)	11.70 ± 10.00 ^{b} (11.70)
Control		64.18 ± 3.38 ^{a}	100.00 ± 0.00 ^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันในแต่ละคอลัมน์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)
ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ

4.1 ผลของสาร Cryoprotectant และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

จากผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ combination cryoprotectants ระหว่าง 10%DMSO+20% DMA, 10%DMSO+10%DMA หรือใช้ 20%DMA+5%MeOH ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด ($p>0.05$) อีกทั้งพบว่าเมื่อใช้สาร cryoprotectant สองชนิดรวมกัน (10%DMSO+20% DMA) นั้นให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (59%) ซึ่งสูงกว่าการใช้สาร cryoprotectant เพียงชนิดเดียว (10%DMSO, 10%DMA และ 5%MeOH) ซึ่งให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเป็น 41, 36 และ 26 ตามลำดับ ผลอาจเนื่องมาจากเมื่อใช้ combination cryoprotectants นั้นสามารถลดจำนวนการเกิดผลึกน้ำแข็ง อีกทั้งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้ External cryoprotectant (Proteins, sugars, egg yolk หรือ Phospholipids) ร่วมกับ Internal cryoprotectant นั้นสามารถลดการถูกทำลายของเซลล์แมมเบรน ที่อาจเกิดมาจาก cold shock หรือ osmotic stress นอกจากนี้พบว่าการใช้สาร cryoprotectant สองกลุ่มนี้รวมกันสามารถป้องกันการเกิด lipid peroxidation, loss of membrane fluidity, lipip phase transitions, loss of membrane compounds หรือ stabilization of membrane proteins ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Babiak et al. (2001) ที่ทำการศึกษาในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) และพบว่าเมื่อใช้ 10%DMA ร่วมกับ 10%egg yolk เป็นสาร Cryoprotectant ให้ผลของอัตราการฟัก 81% ซึ่งผลที่ได้ไม่แตกต่างจากตัวควบคุม(น้ำเชื้อสด) ($P>0.05$) ซึ่งอัตราการฟักดังกล่าวมีค่าสูงกว่าอัตราการฟักที่เกิดจากการใช้ DMSO, DMA, Glycerol, EG, Propanediol หรือ Methanol ที่เป็นสาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว เช่นเดียวกันกับรายงานของ Cabrita et al. (2001) ที่ศึกษาในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าเมื่อใช้ combination cryoprotectants (7%DMSO ร่วมกับ soybean protein complex) เป็นสาร Cryoprotectant นั้นให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ 7%DMSO เป็นสาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว ($P<0.05$) และ Linhart et al. (2005) ได้ทำการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา European catfish (*Silurus glanis*) แบบแช่แข็ง พบว่า เมื่อใช้ combination cryoprotectants ระหว่าง 6%DMSO+6%propandiole หรือ 4%DMSO+4% propandiole ให้อัตราการฟักสูงไม่แตกต่างกับตัวควบคุม ($P>0.05$) และอัตราการฟักนี้สูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว (10 และ 12% สำหรับ DMSO หรือ 5, 7.5 และ 10% สำหรับ MeOH) และการศึกษาของ Mansour et al. (2006) ที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) พบว่าเมื่อใช้ combination cryoprotectants (7%egg yolk

+10%DMA)ให้ผลของอัตราการปฏิสนธิ (48%) ซึ่งสูงกว่า การใช้ DMA ที่เป็นสาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว (33%) แต่ combination cryoprotectants ระหว่าง 7%egg yolk +10%MeOH ให้อัตราการปฏิสนธิ (70%) ซึ่งไม่แตกต่างกับการใช้ 10%MeOH เพียงชนิดเดียว (59%) (P>0.05)

ในส่วนของการทดสอบอัตราการมีชีวิต พบว่าเมื่อใช้ 10%DMSO + 20% DMA พบอัตราการมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 30.78 ± 4.24% โดยอัตราการมีชีวิตดังกล่าวไม่มีความแตกต่างจากชุดการทดลองที่มีการใช้สาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว เช่นเดียวกันกับผลการศึกษาของ Cabrita et al. (2001) ที่ศึกษาในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าการใช้ 7%DMSO เป็นสาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว ให้ผลของอัตราการมีชีวิตที่ไม่แตกต่างจากการใช้ combination cryoprotectants ระหว่าง 7%DMSO ร่วมกับ soybean protein complex (P>0.05)

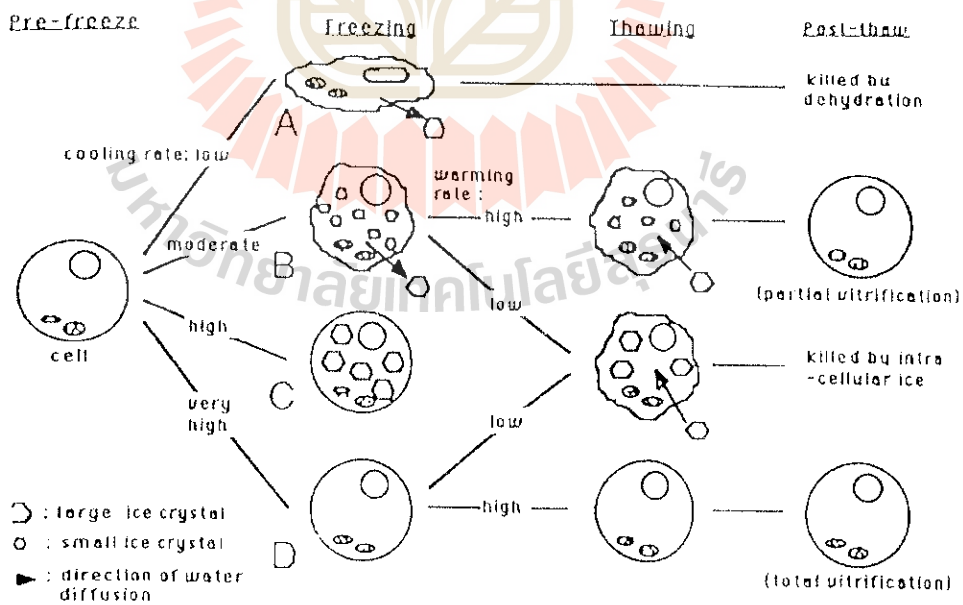
จากการทดสอบหาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าเมื่อใช้ 10%DMSO มีการเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 50.00 ± 5.89% ซึ่งค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างจากการใช้ combination cryoprotectants ร่วมกันสองชนิด ซึ่งขัดแย้งกับผลการศึกษาของ Mansour et al. (2006) ที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) พบว่าเมื่อใช้ MeOH ร่วมกับ 7%egg yolk ให้ motility score (2.5) ซึ่งสูงกว่าการใช้ MeOH เป็นสาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียวซึ่งมี motility score 2.0 (P<0.05) อย่างไรก็ตามการใช้ DMSO ร่วมกับ 7%egg yolk ไม่มีผลต่อ motility score หรือใช้ DMSO เป็นสาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Lahnsteiner et al. (2002) ที่ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Burbot, *Lota lota* พบว่าเมื่อใช้ combination cryoprotectants (10%MeOH หรือ 10%DMSO) ร่วมกับ 1.5%glucose + 7%egg yolk ให้อัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกับตัวควบคุม (น้ำเชื้อสด, P>0.05) และให้อัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ MeOH เป็นสาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว นอกจากนี้ Cabrita et al. (2001) ได้ทดสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิภายหลังจากการแช่แข็ง ในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าในการใช้ 10%egg yolk ร่วมกับ 7%DMSO ให้ผลการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ 7%DMSO เป็นสาร Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว (P<0.05)

จากผลการศึกษาในครั้งนี้เมื่อวิเคราะห์ Contrast เพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบผลของการใช้ Cryoprotectant แต่ละชนิด (DMSO, DMA และ MeOH) กับการใช้ combination cryoprotectants ร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิดนั้นโดยในงานวิจัยนี้ใช้ combination cryoprotectants ที่เป็น permeable cryoprotectant ร่วมกันสองชนิดเพื่อศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งนั้น พบว่าการใช้ combination cryoprotectants ให้ผลของอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ Cryoprotectant ชนิดเดียว (p<0.05) แต่ไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ (p>0.05) และจากงานวิจัยสรุปได้ว่าหากนักวิจัยต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant นั้นควร

ใช้ร่วมกับ 20% DMA เพราะให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมาซึ่งพบว่าการประยุกต์ใช้ Combination cryoprotectants ร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิดนั้นไม่ว่าจะเป็นการรวมกันของกลุ่ม permeable cryoprotectant กับ non-permeable cryoprotectant หรือเป็นกลุ่ม permeable cryoprotectant ด้วยกันเองล้วนมีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟัก อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ สูงขึ้นได้

4.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งนั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารละลายสำหรับเจือจางน้ำเชื้อ (สาร extender) หรือสารที่ป้องกันเซลล์ถูกทำลายในระหว่างขบวนการแช่แข็ง (สาร cryoprotectant) เท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็ง หากลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (-0.1 ถึง -0.5°C min^{-1}) เป็นสาเหตุให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และน้ำจะแพร่ออกจากเซลล์เพราะความไม่สมดุลของแรงดันออสโมติก เซลล์เกิดการสูญเสียน้ำและทำให้เซลล์เหี่ยว (Dehydration) ซึ่งอาจทำให้เซลล์ตายได้ นอกจากนี้ยังพบว่าถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างรวดเร็วทำให้ไม่มีเวลามากพอที่จะให้เซลล์ปรับสภาพ



ดังนั้นเซลล์อาจเกิด Cold shock ได้ดังแสดงในภาพที่ 10

ภาพที่ 10. Cryopreservation model with different cooling rates (low, moderate, high and rapid freezing rates) ที่มา: Leung (1991)

สำหรับการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) พบว่าการลดอุณหภูมิที่ 5 และ 10 °C min^{-1} มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด; $p>0.05$) ผลอาจเนื่องมาจากการลดอุณหภูมิที่ระดับ 5 และ 10 °C min^{-1} นั้นเป็นอุณหภูมิที่ป้องกันไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งกับเซลล์ในระหว่างขบวนการแช่แข็ง ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Viveiros et al. (2000) ที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลา African catfish (*Clarias gariepinus*) โดยทำการลดอุณหภูมิที่ 3 ระดับ คือ (2, 5 และ 10 °C min^{-1}) พบว่า การใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min^{-1} และ 10 °C min^{-1} ส่งผลให้มีอัตราการฟักที่ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) ซึ่งอัตราการฟักดังกล่าวมีค่าสูงกว่าอัตราการฟักที่เกิดจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2 °C min^{-1} อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการลดอุณหภูมิเป็น 40 °C min^{-1} ทำให้อัตราการปฏิสนธิลดต่ำลงและแตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาอัตราการลดอุณหภูมิดังกล่าว เร็วเกินไป จึงมีเวลาไม่เพียงพอที่จะทำให้น้ำซึมผ่านออกจากเซลล์ มีผลทำให้ภายในเซลล์เกิดผลึกน้ำแข็งขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งเป็นสาเหตุอาจทำให้เซลล์ตายได้ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์มีการฉีกขาด (Leung, 1991)

เมื่อทดสอบอัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่พบว่า การลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) นั้นไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ แต่ผลดังกล่าวต่ำและแตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($p<0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Thirumala et al. (2006) ที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Striped bass (*Morone saxatilis*) พบว่าการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (4, 16 และ 40 °C min^{-1}) ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาของ Christensen and Tiersch (2005) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) พบว่า การลดอุณหภูมิอย่างช้าๆที่ 3 °C min^{-1} ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ 83% ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างจากการใช้อัตราลดอุณหภูมิอย่างเร็วที่ 45 °C min^{-1} ที่มีอัตราการเคลื่อนที่เพียง 33% เท่านั้น ($P = 0.001$) และ Sansone et al. (2002) ทำการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 15 °C min^{-1} ให้ผลของการเคลื่อนที่สูงและแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10, 12 และ 24 °C min^{-1} ($P<0.01$) ในขณะที่ผลการศึกษาของ Huang et al. (2004a) ที่ทำการศึกษาในปลา Platyfish (*Xiphophorus couchianus*) พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 25 °C min^{-1} ให้ผลของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ 68% ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 45 °C min^{-1} (59%) ($P = 0.014$) และ 5 °C min^{-1} (43%) ($P = 0.008$) ต่อมา Huang et al. (2004b) ได้ใช้อัตราการลดอุณหภูมิเดียวกันนี้ 5, 25 และ 45 °C min^{-1} ทำการศึกษาในปลา Swordtail (*Xiphophorus helleri*) พบว่าผลการศึกษาที่ได้เป็นไปในทำนองเดียวกันคือเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 25 °C min^{-1} ให้ผลของอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ 71% ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 45 °C min^{-1} (49%) และ 5 °C min^{-1}

(49%) ($P \leq 0.004$) จากผลการศึกษาในครั้งนี้และจากการตรวจสอบเอกสารที่เกี่ยวข้องสรุปได้ว่า การลดอุณหภูมิที่ช้าหรือเร็วเกินไปนั้นล้วนส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อปลามีค่าต่ำ อีกทั้งการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นขึ้นยังอยู่กับชนิดของปลาอีกด้วย

4.3 ผลของ Combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*P. larnaudii*) โดยประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการประยุกต์ใช้เทคนิคและวิธีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายที่ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มน้ำเชื้อสด มาศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพนั้น พบว่า Combination cryoprotectants ในแต่ละทรีตเมนต์ นั้นไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาเทโพ แต่ผลการศึกษาดังกล่าวต่ำและแตกต่างจากน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในแต่ละทรีตเมนต์ดังกล่าวอยู่ในช่วงระหว่าง 50-57% ซึ่งก็ไม่แตกต่างกับปลาสวายที่มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิในแต่ละทรีตเมนต์อยู่ในช่วง 46-59% ด้วยเหตุนี้การประยุกต์ใช้วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายจึงน่าจะมีประโยชน์ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพด้วย หรืออาจนำวิธีการนี้ไปประยุกต์ใช้กับการเก็บน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในสกุลเดียวกัน ดังที่ Kwantong and Bart (2006) ได้ประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายมาเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยใช้สาร cryoprotectant เพียงชนิดเดียว (10%DMSO, 10%DMA หรือ5%MeOH) ซึ่งก็ให้ผลการศึกษาไปในทิศทางเดียวกันกับปลาสวาย

4.4 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ *(P. larnaudii)* โดยวิธีการแช่แข็ง

จากการประยุกต์ใช้เทคนิคและวิธีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวาย มาศึกษาผลของการลดอุณหภูมิที่มีต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min^{-1}) เช่นเดียวกับปลาสวาย พบว่าการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min^{-1} โดยมี 10% DMSO+ 10% DMA เป็นสาร Cryoprotectant ให้ผลของอัตราการปฏิสนธิสูงกว่า และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการลดอุณหภูมิที่ระดับอื่นๆ (10, 20 และ 40 °C min^{-1}) ในส่วนของอัตราการมีชีวิต การใช้ 10% DMSO+ 10% DMA เป็นสาร Cryoprotectant โดยมีอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 10 และ 20 °C min^{-1} ให้ผลที่ไม่แตกต่างกัน และพบว่าการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ ซึ่งผลที่ได้มีความสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Viveiros et al. (2001) ได้ทำการศึกษาใน *Clarias gariepinus* โดยใช้ Ginzburg fish Ringer + 2.47M MeOH พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} ให้ผลของอัตราการฟักสูงที่สุด 86.2 ± 5.7% ซึ่งผลของอัตราการฟักดังกล่าวไม่มีความแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min^{-1} (84.8 ± 3.8%) แต่ให้ผล

ของอัตราการฟักที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2 °C min^{-1} (56.7 ± 18.2%) ($P < 0.05$) แต่มีความแตกต่างจากผลการศึกษาของ Tiersch et al. (2004) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อของ Colorado pikeminnow *(Ptychocheilus lucius)* โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 4 °C min^{-1} และ 40 °C min^{-1} พบว่าการลดอุณหภูมิที่ 40 °C min^{-1} ให้ผลการเคลื่อนที่สูงกว่า (56%) ในขณะที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 4 °C min^{-1} ให้ผลการเคลื่อนที่เพียง 14% เมื่อใช้ 5% MeOH + HBSS จะเห็นได้ว่าการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในขบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานั้นไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา แต่ยังขึ้นอยู่กับสาร Cryoprotectant และสาร extender ที่นำมาทำการศึกษาด้วย

สรุป และข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การใช้ combination cryoprotectants ร่วมกันมากกว่าหนึ่งชนิด ในขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งนั้นสามารถเพิ่มอัตราการปฏิสนธิให้สูงกว่าการใช้ Cryoprotectant เพียงชนิดเดียว

2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งควรใช้ 10% DMSO + 20% DMA , 10% DMSO + 10% DMA หรือใช้ 20% DMA + 5% MeOH เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 หรือ 10 °C min^{-1}

3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพแบบแช่แข็งควรใช้ 10% DMSO + 10% DMA เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับอัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min^{-1}

4. เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งนี้ สามารถประยุกต์ใช้กับปลาเทโพ และน่าจะนำไปประยุกต์ใช้กับปลาชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในสกุลเดียวกันได้

ข้อเสนอแนะ

1. เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายแบบแช่แข็งนี้ สามารถใช้ได้กับปลาเทโพโดยทำให้มีอัตราการปฏิสนธิประมาณ 50% ซึ่งน่าจะนำไปประยุกต์ใช้กับปลาชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในสกุลเดียวกันได้เช่นกัน

2. หากนักวิจัยต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant นั้นควรใช้ร่วมกับ 20% DMA เพราะให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 128 หน้า.

สำนักงานสถิติแห่งชาติ. (2539). สมุดสถิติรายปีประเทศไทย 2539 (ฉบับย่อ). โรงพิมพ์ดอกเบี้ย หน้า 32.

สมร พรชื่นชูวงศ์, สุพรรณ ขันน้ำเที่ยง, สุรชัย ภาสดา, สุคนธา เลขะพันธ์รัตน์, นิศารัตน์ ปุณณารักษ์ และนฤพล สุขุมาสวิน. 2550. ผลของสาร extenders และสาร cryoprotectants ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. ปีที่ 1 เล่มที่ 1: 11-22.

Babiak, I., Glogowski, J., Goryczko, K., Dobosz, S., Kuzminski, H., Strzezek, J. and Demianowicz, W. (2001). Effect of extender composition and equilibration time on fertilization ability and enzymatic activity of rainbow trout cryopreserved spermatozoa. Theriogenology. 56. 177-192.

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(5). 819-824.

Cabrita, E., Anel, L. and Herraéz, M.P. (2001). Effect of external cryoprotectants as membrane stabilizers on cryopreserved rainbow trout sperm. Theriogenology. 56. 623-635.

Chereguini, O., Banda, I., Rasines, I. and Fernandez, A. (2001). Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. Aquaculture Research. 32. 133-143.

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.

Cryologic Pty Ltd. (1998). Cryogenesis Version 4. For Windows. Software operating manual.Victoria, Australia. 8 pp.

Cryologic Pty Ltd. (1999). Freezer control model – 863 operating manual. Victoria, Australia. 11 pp.

Guest, W.C. (1973). Spermatology and sperm preservation of Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. Master thesis. School of Forestry and wildlife management. Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College. 92 pp.

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. (2004a) 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. (2004b). Initial studies on sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the green swordtail *Xiphophorus helleri*. Theriogenology. 62. 179-194

Khanh, P.V., Tuan, N., Hao, N.V., Jeney, Z., Trong, T.Q. and Thanh, N.M. (1999). Review of biology and breeding of some indigenous fish species in the Mekong delta of Vietnam. Cai Be. Tien Giang. Vietnam. 32 pp.

Kwantong, S. (2003). Cryopreservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm. Doctoral thesis. School of Environment, Resources and Development. Asian Institute of Technology, Thailand. 65 pp.

Kwantong, S. and Bart, A.N. (2003). Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rates of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. Aquaculture research. 34. 887-893.

Kwantong, S. and Bart, A.N. (2006). Cryopreservation of black ear catfish, *Pangasius larnaudii*, (Bocourt) sperm. Aquaculture Research. 37. 955-957

Lahnsteiner, F., Mansour, N. and Weismann, T. (2002). The cryopreservation of spermatozoa of the burbot, *Lota lota* (Gadidae, Teleostei). Cryobiology. 45. 195-203

Leung, L.K.P. (1991). Principles of biological cryopreservation. In: Fish evolution and systematics: Evidence from spermatozoa. Jaemison, B.G.M. (Eds.). Cambridge: University Press. London, 231-244.

Linhart, O., Billard, R. and Proteau, J.P. (1993). Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. Aquaculture. 115(3-4). 347-359.

Linhart, O., Rodina, M., Flajshans, M., Gela, D. and Kocour, M. (2005). Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: sperm motility, viability and hatching success of embryos. Cryobiology. 51. 250–261.

Mansour, N., Richardson, G.F. and McNiven, M.A. (2006). Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa. Aquaculture Research. 37. 862-868

Mazur, P. (1977). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. Cryobiology. 14. 251-272.

Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T., Tiersch,T.R. (1995). Cryopreservation of sperm of the Mekong Giant catfish. Asian fisheries science. Metro Manila. 8(3-4). 211-221.

Mongkonpunya, K., Pupipat, T., Pholprasith, S., Chantasut, M, Rittaporn, R., Pimolboot, S.,Wiwatcharakoses, S. and Chaengkij, M. (1992). Cryopreservation of sperm of the Mekong giant catfish, *Pangasinodon gigas* Chevey. Aquaculture and Schistosomiasis. Proceedings of a network meeting held in Manila, Phillipines August 6-10, 56-60.

Rana, K.J. (1995). Preservation of gamete. In: Broostock management and egg an larval quality. Bromage, N.R., and Roberts, R.J. (Eds.). London: Blackwell Science Ltd., 53-76.

Safina, C. (1995). The world's imperiled fish. Scientific American. 273(5). 46-53.

Sansone, G., Fabbrocini, A., Ieropoli, S., Langellotti, A., Occidente, M. and Matassino, D. (2002). Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa after thawing. Cryobiology. 44. 229–39.

Thirumala, S., Campbell, W.T., Vicknair, M.R., Tiersch, T.R. and Devireddy, R.V. (2006) Freezing response and optimal cooling rates for cryopreserving sperm cells of striped bass, *Morone saxatilis*. Theriogenology. 66. 964–973.

Tiersch, T.R., Figiel, C.R.,Wayman, W.R.,Williamson, J.H., Gorman, O.T. and Carmichael, G.J. (2004). Cryopreservation of sperm of the endangered Colorado pikeminnow. North American Journal of Aquaculture. 66. 8-14.

Tiersch, R., Goudie, C.A. and Carmichael, G.J. (1994). Cryopreservation of channel catfish sperm:storage in cryoprotectants, fertilization trials, and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. Transactions of the American Fisheries Society. 123(4). 580-586.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

Urbanyi, B., Horvath, A., Varga, Z., Horvath, L., Magyary, I. and Radics, F. (1999). Effect of Extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Aquaculture Research. 30(2). 145-151.

Viveiros, A. T. M., So, N., and Komen, J. (2000). Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus:* Cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ratio. Theriogenology. 54. 1395–1408.

Viveiros, A. T. M., Lock, E. J., Woelders, H. and Komen, J. (2001). Influence of Cooling Rates and Plunging Temperatures in an Interrupted Slow-Freezing Procedure for Semen of the African Catfish, *Clarias gariepinus*. Cryobiology. 43. 276-287.

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, Lousiana, 264-275.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก

ตารางผนวกที่ 1 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของ Cryoprotectant และ combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

1.1 อัตราการปฏิสนธิ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5647.337	12	470.611	3.719	.00
Within Groups	23027.958	182	126.527		
Total	28675.295	194			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
tr3	15	30.5640		
tr9	15	35.1800	35.1800	
tr5	15	36.7020	36.7020	
tr2	15	37.1180	37.1180	
tr6	15	37.5060	37.5060	
tr8	15	38.6780	38.6780	
tr11	15	38.9113	38.9113	
tr1	15	39.9153	39.9153	
tr10	15		40.8573	
tr4	15		42.4800	42.4800
tr12	15		43.9740	43.9740
tr7	15			50.1233
control	15			50.5460
Sig.		.051	.074	.072

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

1.2 อัตราการมีชีวิต

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	15920.237	12	1326.686	21.903	.000
Within Groups	6299.369	104	60.571		
Total	22219.607	116			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
tr3	9	23.8911		
tr9	9	24.1789		
tr2	9	26.8556	26.8556	
tr6	9	26.8967	26.8967	
tr5	9	27.5933	27.5933	
tr8	9	27.7211	27.7211	
tr11	9	28.8178	28.8178	
tr10	9	29.0367	29.0367	
tr4	9	30.1922	30.1922	
tr1	9	30.5844	30.5844	
tr12	9	31.0300	31.0300	
tr7	9		33.2233	
control	9			71.0767
Sig.		.109	.152	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.3 อัตราการเคลื่อนที่

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	37623.077	12	3135.256	9.633	.000
Within Groups	33850.000	104	325.481		
Total	71473.077	116			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
tr3	9	10.0000			
tr9	9	20.0000	20.0000		
tr6	9	26.6667	26.6667	26.6667	
tr10	9	28.3333	28.3333	28.3333	
tr8	9		30.0000	30.0000	
tr11	9		30.0000	30.0000	
tr12	9		30.0000	30.0000	
tr5	9		33.3333	33.3333	
tr7	9		35.0000	35.0000	
tr4	9		36.6667	36.6667	
tr2	9		38.3333	38.3333	
tr1	9			45.0000	
control	9				90.0000
Sig.		.050	.073	.073	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 2 แสดงการวิเคราะห์ว่าเรียนซ์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการ แช่แข็ง

2.1 อัตราการปฏิสนธิ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7087.567	12	590.631	5.637	.000
Within Groups	20432.754	195	104.783		
Total	27520.320	207			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
tr10	16	40.0037					
tr9	16	44.2756	44.2756				
tr12	16		48.5925	48.5925			
tr11	16		50.0262	50.0262	50.0262		
tr7	16		50.1850	50.1850	50.1850		
tr8	16		51.5375	51.5375	51.5375	51.5375	
tr4	16			53.2688	53.2688	53.2688	53.2688
tr3	16			53.2769	53.2769	53.2769	53.2769
tr6	16			54.0825	54.0825	54.0825	54.0825
tr5	16				57.3919	57.3919	57.3919
tr2	16					58.5725	58.5725
tr1	16						59.8400
control	16						61.0519
Sig.		.238	.073	.198	.080	.090	.063

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 16.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.2 อัตราการมีชีวิต

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	11579.723	12	964.977	12.949	.000
Within Groups	4843.761	65	74.519		
Total	16423.484	77			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
tr8	6	11.6367		
tr12	6	13.7800	13.7800	
tr9	6	15.0450	15.0450	
tr10	6	15.2067	15.2067	
tr11	6	15.2117	15.2117	
tr7	6	16.6767	16.6767	
tr2	6	17.6200	17.6200	
tr6	6	17.9550	17.9550	
tr4	6	18.0983	18.0983	
tr5	6	19.2750	19.2750	
tr3	6		24.7083	
tr1	6		25.0767	
control	6			61.0833
Sig.		.206	.061	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 6.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

2.3 อัตราการเคลื่อนที่

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	32809.615	12	2734.135	10.72	.00
Within Groups	16575.000	65	255.000		
Total	49384.615	77			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
tr3	9	10.0000			
tr9	9	20.0000	20.0000		
tr6	9	26.6667	26.6667	26.6667	
tr10	9	28.3333	28.3333	28.3333	
tr8	9		30.0000	30.0000	
tr11	9		30.0000	30.0000	
tr12	9		30.0000	30.0000	
tr5	9		33.3333	33.3333	
tr7	9		35.0000	35.0000	
tr4	9		36.6667	36.6667	
tr2	9		38.3333	38.3333	
tr1	9			45.0000	
control	9				90.0000
Sig.		.050	.073	.073	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 3 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของ Combination cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลโพ (*P. larnaudii*) โดยประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง

3.1 อัตราการปฏิสนธิ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	2811.380	3	937.127	17.368	.000
Within Groups	1510.784	28	53.957		
Total	4322.164	31			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
tr3	8	45.0737	
tr2	8	47.3950	
tr1	8	49.2825	
control	8		68.6213
Sig.		.289	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.2 อัตราการมีชีวิต

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4544.690	3	1514.897	63.52	.000
Within Groups	190.778	8	23.847		
Total	4735.468	11			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05		
		1	2	3
tr2	3	4.6233		
tr3	3	7.0167		
tr1	3		17.4400	
control	3			53.2367
Sig.		.565	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3 อัตราการเคลื่อนที่

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	14400.000	3	4800.000	21.33	.000
Within Groups	1800.000	8	225.000		
Total	16200.000	11			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
tr1	3	10.0000	
tr2	3	10.0000	
tr3	3	10.0000	
control	3		90.0000
Sig.		1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางผนวกที่ 4 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ (5, 10, 20 และ 40 °C min $^{-1}$) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ *(P. larnaudii)* โดยวิธีการแช่แข็ง

4.1 อัตราการปฏิสนธิ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7971.678	12	664.307	11.676	.000
Within Groups	5177.431	91	56.895		
Total	13149.109	103			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05					
		1	2	3	4	5	6
tr12	8	36.1650					
tr11	8	38.5250	38.5250				
tr9	8	39.5150	39.5150	39.5150			
tr10	8	43.2150	43.2150	43.2150	43.2150		
tr6	8		45.0737	45.0737	45.0737	45.0737	
tr5	8			47.3950	47.3950	47.3950	
tr8	8				48.0013	48.0013	
tr3	8				48.7538	48.7538	
tr7	8				49.1600	49.1600	
tr4	8				49.2825	49.2825	
tr2	8					53.4025	
tr1	8						62.3925
control	8						68.6213
Sig.		.091	.117	.058	.172	.058	.102

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 8.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 อัตราการมีชีวิต

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	6343.528	12	528.627	19.98	.000
Within Groups	687.700	26	26.450		
Total	7031.228	38			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05			
		1	2	3	4
tr11	3	3.8267			
tr5	3	4.6233			
tr9	3	4.6233			
tr3	3	5.7600			
tr10	3	6.5567			
tr6	3	7.0167			
tr12	3	7.6300			
tr2	3	8.9300	8.9300		
tr8	3	12.1300	12.1300	12.1300	
tr4	3		17.4400	17.4400	
tr1	3			18.3967	
tr7	3			19.8100	
control	3				53.2367
Sig.		.100	.065	.105	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.3 อัตราการเคลื่อนที่

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	17423.077	12	1451.923	4.93	.000
Within Groups	7650.000	26	294.231		
Total	25073.077	38			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha = .05	
		1	2
tr2	3	10.0000	
tr3	3	10.0000	
tr4	3	10.0000	
tr5	3	10.0000	
tr6	3	10.0000	
tr8	3	10.0000	
tr9	3	10.0000	
tr10	3	10.0000	
tr11	3	10.0000	
tr1	3	20.0000	
tr12	3	20.0000	
tr7	3	25.0000	
control	3		90.0000
Sig.		.368	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 3.000.

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัตินักวิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ: (ภาษาไทย) อ.ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Samorn Ponchunchoovong

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3 9201 00947 09 0

3. ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. สถานที่ติดต่อ:

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จ.นครราชสีมา 30000

Tel: (044) 224377-8 Fax: (044) 224150 E-mail: samorn@sut.ac.th

5. ประวัติการศึกษา:

Degree	Institution	Year	Country
B.Sc. (Biology)	Prince of Songkhla University	1992	Thailand
M.Sc. (Zoology)	Chulalongkorn University	1995	Thailand
Ph.D (Aquaculture)	Asian Institute of Technology	2003	Thailand

6. สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา):

Cryopreservation of fish spermatozoa

Aquaculture (seed production)

7. ประสบการณ์วิจัย:

7.1 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว และได้รับการตีพิมพ์ ดังเอกสารแนบ และอีก 1 เรื่องอยู่ระหว่างการตีพิมพ์ (โดยเป็นหัวหน้าโครงการ 3 เรื่อง)

สมร ขวัญทอง. 2540. การกระจายของแมลงกินได้ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือตอนล่างของประเทศไทย. วารสารเทคโนโลยีสุรนารี 4: 211-217.

สมร ขวัญทอง และ สุรีลักษณ์ รอดทอง. 2545. รายงานการวิจัย การศึกษาความผันแปรทางพันธุกรรมของปูนาในสกุล *Esanthelphusa*, ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยโดยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส 50 หน้า

สมร พรชื่นชูวงศ์. 2547. รายงานการวิจัย การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง 47 หน้า.

Kwantong S. and Bart, A. N. 2003. Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rates of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. Aquaculture research, 34: 887-893.

Samorn Kwantong and Sureelak Rodtong. 2004. Species identification of Thai rice-field crab using stereomicroscopy and scanning electron microscopy. 8 th Asia- Pacific conference on electron microscopy (8APEM). June 7-14, 2004. Kanazawa, Japan. P. 83.

Sureelak Rodtong and Samorn Kwantong. 2004. scanning electron microscopy and nucleic acid technique aid the identification and diversity study of Thai rice-field crab. 8 th Asia-Pacific conference on electron microscopy (8APEM). June 7-14, 2004. Kanazawa, Japan. P. 122.

Samorn Kwantong and Bart, A. N. 2004. Cryoperservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm. International symposium on animal and plant production for food and environmental security. August 9-11, 2004, Chaophya park hotel, Bangkok. Thailand. P. 105-109.

Kwantong S. and Bart, A. N. 2006. Cryopreservation of black eared catfish, A *Pangasius larnaudii* sperm. Aquaculture research, 37: 955-957.

Pongchunchoovong, S. 2006. Species identification of Thai rice-field crab in the lower north-eastern region of Thailand. ประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาประมง) ครั้งที่ 44 ระหว่างวันที่ 30 มกราคม – 2 กุมภาพันธ์ 2549. หน้า 400-406. (Oral presentation).

Ponchunchoovong, S. 2006. Species identification of Thai rice-field crab in the lower north-eastern region of Thailand Suranaree J. Sci. Technol. 13(3): 245-249.

สมร พรชื่นชูวงศ์ สุพรรณ ขันน้ำเที่ยง สุรชัย ภาสดา สุคนธา เลขะพันธ์รัตน์ นิศารัตน์ ปุณณารักษ์ และ นฤพล สุขุมาสวิน. 2550. ผลของสาร extenders และสาร cryoprotectants ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง. วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง. ปีที่ 1 เล่มที่ 1: 11-22.

Pongchunchoovong, S. 2007. Effects of equilibration times on the fertilization rate of cryopreserved striped catfish, *Pangasius hpophthalmus* (Sauvage, 1878) sperm. First international conference on sustainable animal agriculture in developing countries. 27-29 September, Guandu Hotel, Kunming, China. P. 341-344.

Kwantong S. and Bart, A. N. 2008. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage) Aquaculture research. 40: 292-297.

7.2 งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ มี 3 เรื่อง

1. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) โดยวิธีการแช่แข็ง (Cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* sperm)

(เป็นผู้หัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 60%)

2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด, Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* และการศึกษาระดับที่เหมาะสมของ sperm: egg ratio ของการใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง (Preservation of Small scale mud carp, Cirrhinus microlepis sperm and the suitable of sperm: egg ratio of fresh or cryopreserved sperm)

(เป็นผู้หัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 60%)

3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง (Cryopreservation of giant barb, *Catlocarpio siamensis* sperm)

(เป็นผู้หัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 70%)

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ: (ภาษาไทย) นายสุนัย พลายมี

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Sunai Plime

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3 7201 0100 4247

3. ตำแหน่งปัจจุบัน: นักวิชาการเกษตร ประจำฟาร์มประมงมหาวิทยาลัย

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4. สถานที่ติดต่อ:

ฟาร์มประมงมหาวิทยาลัย สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จ.นครราชสีมา 30000

Tel: (044) 225520 Fax: (044) 224150

5. ประวัติการศึกษา และการทำงาน

- ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง (เกษตรกรรม) วิทยาลัยเกษตรกรรมสุพรรณบุรี
- ปริญญาตรี (ประมงน้ำจืด) สถาบันเทคโนโลยีการเกษตรแม่โจ้
- ปริญญาตรี (ส่งเสริมการเกษตร) วิทยาลัยครูจันทรเกษม
- ปริญญาโท (การจัดการสำหรับนักบริหาร) สถาบันบัณฑิตพัฒนาบริหารศาสตร์

ประวัติการทำงาน

ปี	สถานที่	ตำแหน่ง
2529	โรงเรียนนนทรีวิทยา (ช่องนนทรี กทม.)	ครูอัตราจ้าง
2531	กรมประมง (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์)	นักวิชาการประมง
2533	สถานีประมงน้ำจืด (จังหวัดนครราชสีมา)	นักวิชาการประมง
2538 -- ปัจจุบัน	ฟาร์มมหาวิทยาลัย	นักวิชาการเกษตร

6. สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ

การเพาะพันธุ์ปลา และการจัดการฟาร์มประมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี