รหัสโครงการ SUT3-303-50-24-12

รายงานการวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ, *Pangasius bocourti* โดยวิธีการแช่แข็ง

(Cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* sperm

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. นายอรรณพ อิ่มศิลป์

2. นายสมบัติ สิงห์สี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2550-2551

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

กันยายน 2553

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2550-2551 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิจัย ขอขอบพระคุณ หัวหน้าสถานีประมงน้ำจืด จังหวัดนครพนม (นายอรรณพ อิ่มศิลป์) ที่ให้ความอนุเคราะห์พ่อ-แม่พันธุ์ปลาเผาะ ขอขอบพระคุณ คุณอุไรวรรณ เปียสูงเนิน คุณสุขสันต์ ปียะนันท์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม ทุกๆท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2553

บทคัดย่อ

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ (Mekong catfish, *Pangasius bocourti*) โดยวิธีการแช่แข็ง ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง ดังนี้ การทดลองที่ 1) ศึกษาผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีผลต่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง ซึ่งในการทดลองนี้ได้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มการทดลองย่อยตามชนิดของสาร cryoprotectant คือ (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, methanol-MeOH, และ Glycerol) ร่วมกับสาร extender 3 ชนิดคือ (Ginzburg fish ringer, Calcium- Free Hanks' Balanced Salt Solution-C-F HBSS และ 0.9% Sodium Chloride-NaCl) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที และเก็บน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำเชื้อมาละลายที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) และประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (motility) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (viability) และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (fertilization) ผลการศึกษาพบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS, 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS, 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด (76, 60, 54 และ 45% ตามลำดับ) โดยเมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด (P>0.05) นำผลการศึกษาที่ให้อัตราการปฏิสนธิสูงสุดในแต่ละชนิดของสาร cryoprotectant จากการทดลองที่ 1 (10% DMSO+C-F HBSS, 10% DMA+C-F HBSS, 5% MeOH+0.9% NaCl และ 10% glycerol+Ginzburg fish ringer) มาศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ (การทดลองที่ 2) พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) ให้ผลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตไม่แตกต่างกันเมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS (P>0.05) และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step, Two-steps และ Three-steps พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step (10 องศาเซลเซียสต่อนาที) ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps หรือ Three-steps (P<0.05)

ABSTRACT

This present study examined the feasibility cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* sperm. Two experiment studies were carried out: (1) the effects of four cryoprotectants (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, methanol-MeOH, and Glycerol) with three extenders (Ginzburg fish ringer, Calcium- Free Hanks' Balanced Salt Solution-C-F HBSS and 0.9% Sodium Chloride-NaCl), at 10 °C min^{-1} freezing rate on fertilization, motility and viability of *P. bocourti* sperm were investigated. Sperm were stored for 24 h in a liquid nitrogen container (-196 °C). They were then airthawed at room temperature (25 °C), and motility viability and fertilization rates were assessed. The highest fertilization rates of 76, 60, 54 and 45% were achieved with the combination of 10% DMSO+C-F HBSS, 10% DMA+C-F HBSS, 5% MeOH+0.9% NaCl and 10% glycerol+Ginzburg fish ringer, respectively. In addition, fertilization percentage was not difference with the control (fresh sperm) when using the combination of 10% DMSO and C-F HBSS ($P>0.05$). The highest fertilization rates in each cryoprotectant from the first study (10% DMSO+C-F HBSS, 10% DMA+C-F HBSS, 5% MeOH+0.9% NaCl and 10% glycerol+Ginzburg fish ringer) were used to investigate the effect of freezing rates on cryopreservation of *P. bocourti* sperm (experiment 2). One step freezing procedure at 6, 8 and 10 °C min^{-1} did not affect fertilization, motility and viability percentages when using 10% DMSO+C-F HBSS ($P>0.05$). Regarding to freezing procedures at One-step, Two-steps and Three-steps, found that One-step freezing procedure (10 °C min^{-1}) yielded a higher fertilization and viability rates than that of Two-steps or Three-steps freezing procedures ($P<0.05$).

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	1
• วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
• ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	5
• วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย	5
• วิธีการศึกษา	7
• ผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง	13
• ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง	16
บทที่ 4 ผลการศึกษา	19
• ผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง	19
• ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง	25
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ	28
• ผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง	28
• ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
• สรุป และข้อเสนอแนะ	33
เอกสารอ้างอิง	34
ภาคผนวก	39
ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย	57

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	หลักเกณฑ์การสังเกตเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ	8
ตารางที่ 2	ส่วนประกอบของสีย้อม Eosin-nigrosin	12
ตารางที่ 3	ส่วนประกอบทางเคมี ออสโมลาริตี และ pH ของสาร extenders ที่ใช้ในการศึกษา	14
ตารางที่ 4	แผนการทดลองศึกษาชนิดของสาร extenders และสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง	15
ตารางที่ 5	แผนการทดลองการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (6, 8 และ 10 °C min^{-1}) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง	17
ตารางที่ 6	แผนการทดลองการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedures โดยใช้สาร 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS	18
ตารางที่ 7	ส่วนประกอบของอิออนชนิดต่าง ๆ ที่พบในน้ำเชื้อปลาเผาะ	19
ตารางที่ 8	ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ DMSO เป็นสาร Cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้ อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}	20
ตารางที่ 9	ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ DMA เป็นสาร Cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}	21
ตารางที่ 10	ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ MeOH เป็นสารCryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}	22

สารบัญตาราง (ต่อ)

		หน้า
ตารางที่ 11	ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ Glycerol เป็นสาร Cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}	23
ตารางที่ 12	ความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ของชนิดสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง	24
ตารางที่ 13	ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ที่ระดับการลดอุณหภูมิ 6, 8 และ 10 °C min^{-1}	26
ตารางที่ 14	ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) โดยใช้สาร 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS และที่ระดับการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (One-step, Two-steps และ Three-steps)	27

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แผนภาพแสดงกระบวนการการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง	9
ภาพที่ 2	ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ Freezer control (CL 3300) ร่วมกับ Cryogenesis version 4 for window	10
ภาพที่ 3	กระชัง และTank สำหรับฟักไข่ปลาเผาะ	11
ภาพที่ 4	อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีม่วงหรือสีชมพูแดง	13

บทที่ 1
บทนำ

ตามที่รัฐบาลได้ประกาศนโยบายและให้ความสำคัญต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารของประเทศ ในฐานะที่เป็นอุตสาหกรรมยุทธศาสตร์หลักในการสร้างเสถียรภาพทางเศรษฐกิจให้กับสังคม /ชุมชน ภายใต้บริบทของการพัฒนาเศรษฐกิจอุตสาหกรรมแนวใหม่ที่เน้นระบบเศรษฐกิจแบบสมดุล และชุมชนเข้มแข็ง ในช่วงที่ผ่านมา อุตสาหกรรมอาหารของประเทศได้ประสบกับวิกฤตการณ์และปัญหา การกีดกันทางการค้า ในรูปแบบต่างๆ อันเป็นผลมาจากนโยบายและมาตรการการคุ้มครองผู้บริโภค รวมถึงปัญหาโรคระบาด ทำให้สินค้าเกษตร อาหารของไทยบางชนิดมียอดการส่งออกลดลง เช่น สินค้ากุ้ง ที่ประสบกับปัญหาเรื่องสารเคมี ยาปฏิชีวนะ ตกค้าง และการระบาดของไข้หวัดนกในไก่ เป็นต้น ซึ่งกรณีดังกล่าวได้ส่งผลกระทบต่อภาคเศรษฐกิจของไทยโดยส่วนรวม

สถาบันอาหารในฐานะหน่วยงานที่มีบทบาทหลักในการสนับสนุนการพัฒนาอุตสาหกรรมอาหารของประเทศ จึงได้ประสานความร่วมมือกับภาคเอกชน โดยสมาคมผู้ผลิตอาหารสำเร็จรูป สมาคมอาหารแช่เยือกแข็งไทย และเกษตรกร ภายใต้การสนับสนุนจากกรมประมง และสำนักงานมาตรฐานสินค้าเกษตรและอาหารแห่งชาติ จัดทำโครงการพัฒนาปลาเศรษฐกิจตัวใหม่เพื่อการส่งออก: ปลาเผาะ หรือปลาโมง *(Pangasius bocourti)* ขึ้น เพื่อสนับสนุนนโยบายของรัฐบาลในการแก้ไขปัญหาและเพิ่มมูลค่าการส่งออกให้กับประเทศ พบว่ากลุ่มประเทศสหภาพยุโรป และสหรัฐอเมริกาเป็นตลาดใหญ่ที่มีความต้องการในการบริโภคสูงมาก โดยสหภาพยุโรป ต้องการนำเข้าเพื่อทดแทนปลา Halibut ซึ่งมีคุณลักษณะของเนื้อสีขาวเหมือนกับปลากลุ่ม *Pangasius* รองลงมาได้แก่ ประเทศรัสเซีย และญี่ปุ่น ซึ่งถือเป็นตลาดใหม่ที่มีอนาคต ความต้องการของตลาดในภาพรวมนั้น มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่มีผู้ผลิตและจำหน่ายมีเพียงรายเดียวเท่านั้นคือประเทศเวียดนาม อย่างไรก็ตามปัจจุบันเวียดนามกำลังประสบกับปัญหาในด้านคุณภาพของปลาชนิดนี้ อันได้แก่ ลักษณะของสี ซึ่งไม่มีความสม่ำเสมอ และขนาดของปลาที่มีขนาดเล็กลง เนื่องจากมีการผสมพันธุ์ระหว่างคู่ที่มีสายเลือดเดียวกัน หรือเลือดชิด (Inbreed) ตลอดจนขาดระบบการจัดการที่ดีและการปนเปื้อนของเสียจากชุมชน ทำให้ประเทศไทยมีโอกาสอย่างมากในการเพาะเลี้ยงและแปรรูปปลาชนิดนี้เพื่อการส่งออกสู่ตลาดโลก เนื่องจากเป็นปลาที่มีถิ่นกำเนิดแถบลุ่มน้ำโขง และไทยมีพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง ทั้งในกระชังและบ่อดิน

อย่างไรก็ตาม การเพาะพันธุ์ปลาเผาะมีปัญหาเนื่องจากมีช่วงสืบพันธุ์ไม่ตรงกันระหว่างปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย โดยเพศผู้เจริญพันธุ์เร็วกว่าเพศเมีย (Khanh et al., 1999 และ เจริญ และสมบัติ, 2547) ในสภาพการเลี้ยงที่ผ่านมาเกษตรกรนิยมรวบรวมลูกปลาจากธรรมชาติเพื่อนำมาเลี้ยงในกระชัง

บริเวณริมฝั่งแม่น้ำโขง แต่ปัจจุบันการรวบรวมลูกปลาทำได้ลำบาก และมีปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร (วิวัฒน์ และชัยศิริ, 2538) ด้วยเหตุนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง ซึ่งจะแก้ปัญหาต่างๆ ที่กล่าวมาข้างต้นได้ เพราะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในสภาพแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว เพื่อรอความอุดมสมบูรณ์ของไข่จากเพศเมีย อย่างไรก็ตาม เทคนิคและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งยังไม่มีการศึกษาสำหรับปลาชนิดนี้

โครงการวิจัยนี้จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง เพื่อหาชนิดของสาร Cryoprotectant สาร Extender และการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยใช้ Freezer control (CL 3300) ร่วมกับ Cryogenesis version 4 ควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างการแช่แข็ง นอกจากนี้ผู้วิจัยจะนำวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่แข็ง (Kwantong and Bart, 2003) มาประยุกต์ใช้สำหรับปลาชนิดนี้ด้วยเพื่อเป็นการพิสูจน์ว่าเทคนิควิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งสามารถประยุกต์ใช้ได้กับปลาในกลุ่มเดียวกัน

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาชนิดของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง
2. เพื่อศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rate) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็งเพื่อแก้ปัญหาในปลาเพศผู้ที่มีความสมบรูณ์พันธุ์ก่อนปลาเพศเมีย และช่วยพัฒนาธุรกิจการเพาะพันธุ์ปลาเผาะซึ่งกำลังเป็นที่สนใจและแพร่หลายมากในขณะนี้ อีกทั้งสามารถนำเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะนี้ไปประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดอื่นได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ หรือปลาเศรษฐกิจ งานวิจัยนี้จึงเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป เพื่อนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์เพื่อการส่งออกต่อไป และนำเทคนิคที่ได้นี้ไปเผยแพร่บริการวิชาการแก่ประชาชน (เกษตรกรที่ทำการเลี้ยงปลา) และฟาร์มเอกชนที่สนใจ อีกทั้งมีประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุ์ปลาต่อไป

หน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ สถาบันการศึกษาต่างๆ กรมประมง ตลอดจนหน่วยงานของรัฐและเอกชนที่สนใจ

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลาเผาะ หรือ ปลาโมง, *Pangasius bocourti* Sauvage, 1880 เป็นปลาตระกูลเดียวกับปลาสวาย พบกระจายพันธุ์ในเขตเอเชียตะวันออกเฉียงใต้เป็นจำนวนมาก (Berra, 1981) ในประเทศไทยพบมากในแม่น้ำโขงและแม่น้ำเจ้าพระยา (Tyson, 1991) แม่พันธุ์น้ำหนักเฉลี่ย 8,680 กรัม มีความดกไข่เฉลี่ย 157,040 ฟอง ไข่เป็นไข่ติดจมน้ำ มีสีขาวอมเหลืองใส ปลาเผาะ อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำไหลที่มีปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำสูง โดยเฉพาะในแม่น้ำโขง พบในช่วงเดือน เมษายน – มิถุนายน ของทุกปี (วิวัฒน์และ ชัยศิริ, 2538) เนื้อปลามีสีขาว และรสชาติดี เป็นที่ต้องการของตลาด ทำให้มีราคาสูง โดยปลาโมงขนาด 0.7 - 1 กิโลกรัมๆ ละ 50 บาท ปลาโมงขนาด 1.5 - 2 กิโลกรัมๆ ละ 150 บาท (Prasertwattana *et al.*, 2003) เกษตรกรนิยมรวบรวมลูกปลาจากธรรมชาติเพื่อนำมาเลี้ยงในกระชังบริเวณริมฝั่งแม่น้ำโขง แต่ปัจจุบันการรวบรวมลูกปลาทำได้ลำบาก และมีปริมาณไม่เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกร เพราะประสบปัญหาแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำเสื่อมโทรมอันเนื่องมาจากผลกระทบของสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม และการเกิดมลพิษในแหล่งน้ำซึ่งจะเป็นอันตรายต่อปลาโดยตรง จึงทำให้ปริมาณปลาลดลง โดยเฉพาะปลาในสกุล *Pangasius* เช่นปลาบึก ปลาเทโพ และปลาเทพา (สำนักงานสำนักงานสถิติแห่งชาติ, 2539) สำหรับปลาโมง มีช่วงสืบพันธุ์ไม่ตรงกันระหว่างปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย (เพศผู้เจริญพันธุ์เร็วกว่าเพศเมีย) (Khanh et al., 1999) เพื่อให้การพัฒนาของธุรกิจการเพาะเลี้ยงปลาโมง ซึ่งกำลังเป็นที่นิยมและแพร่หลายมากขึ้น ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องมีลูกพันธุ์ปลาจำนวนเพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภค

ด้วยเหตุนี้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งน่าจะเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะแก้ปัญหาสำหรับปลาชนิดนี้ (ซึ่งมีไข่และน้ำเชื้อสุกไม่พร้อมกัน) เพราะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในสภาพแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว เพื่อชะลอความอุดมสมบูรณ์ของไข่จากเพศเมีย อีกทั้งยังสามารถแก้ปัญหาในปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (Endangered species) หรือใช้ในโปรแกรมการผสมพันธุ์ปลา เช่น androgenesis (Thorrard et al., 2000) และผลิตปลาข้ามสายพันธุ์ (Hybridize species)ได้ เช่น การใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของ blue catfish, *Ictalurus furcatus* ผสมกับ ไข่ของ Channel catfish, *Ictalurus punctatus* โดย Bart et al. (1998) นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน สามารถขนส่งได้ง่ายเมื่อเทียบกับปลามีชีวิต

ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งจะต้องอาศัย สาร extender (เป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ และลดการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาก่อนกระบวนการแช่แข็ง) ซึ่งควรมีค่าออสโมลาริตี้ใกล้เคียงกับเลือด หรือ seminal fluid ของน้ำเชื้อปลา เช่น 280 -300 mOsm Kg^{-1} สำหรับปลาน้ำจืด และ 200-300 mOsm Kg^{-1} สำหรับปลาทะเล (Wayman and Tiersch, 2000) และสาร cryoprotectant

ซึ่งเป็นสารป้องกันการเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง สาร 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) อย่างไรก็ตามสารต่างๆ เหล่านี้ยังมีการศึกษากันน้อยมากในปลากลุ่ม Pangasiid และพบว่า สาร cryoprotectant 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

อย่างไรก็ตามการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมของสารcryoprotectant และสารextender เท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งและการละลาย (Freezing and thawing rates) (Mazur, 1977) จากการศึกษาพบว่าในขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา 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 (10 °C min^{-1}) ให้ผลการศึกษาดีกว่า two-step freezing rates แต่อย่างไรก็ตามอัตราการปฏิสนธิน้อยกว่า 50% ด้วยเหตุนี้ควรมีการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิโดยใช้ one step freezing rate ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ เช่น 5, 10, 15, 20, 30 และ 60 °C min^{-1} เพื่อที่จะหาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะ (*Pangasius bocourti*) โดยวิธีการแช่แข็ง มีระเบียบการดำเนินการวิจัยและศึกษาทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ในส่วนของห้องปฏิบัติการ ใช้ห้องปฏิบัติการสรีรและกายวิภาคศาสตร์สัตว์ อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และภาคสนามใช้สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม เป็นสถานที่ในการดำเนินการวิจัย โดยใช้วัสดุอุปกรณ์หลัก และสารเคมี พร้อมทั้งวิธีการศึกษา ดังนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยประกอบด้วย

3.1.1 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 10, 100, 200 และ 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 didpenser
19) Cryobath
20) Cryochamber
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) สไลด์นับเม็ดโลหิต (Haemacytometer)

28) Vortex mixer

29) Timer

3.1.2 สารเคมี

สารเคมีสำหรับศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

1) น้ำกลั่น
2) น้ำยาเช็ดเลนส์
3) Oil
4) น้ำยาเคลือบเล็บ
5) Ginzburg fish ringer
6) Calcium Free Hanks' Balance Salt Solution (C-F HBSS)
7) Glucose ($C_6H_{12}O_6$)
8) Sodium chloride (NaCl)
9) Potasium chloride (KCl)
10) Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)
11) Potasium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
12) Calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)
13) Magnesium sulphate heptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)
14) Disodium hydrogen phosphate heptahydrate ($Na_2HPO_4.7H_2O$)
15) Dimethyl sulfoxide (DMSO)
16) Dimethyl acetamide (DMA)
17) Methanol (MeOH)
18) Glycerol
19) Luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRHa; Suprefact)
20) Domperidone (Motilium)

3.2 วิธีการศึกษา

การศึกษาชนิดของสาร Extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rate) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง มี 2 ขั้นตอน ดังนี้

3.2.1 ภาคสนาม

การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาเผาะ

นำพ่อแม่พันธุ์ปลาเผาะที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ โดยพ่อพันธุ์มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.53 ± 1.39 กิโลกรัม/ตัว และแม่พันธุ์มีน้ำหนักเฉลี่ย 3.72 ± 1.94 กิโลกรัม/ตัว จากบ่อดินมาพักในโรงเพาะฟักของสถานีประมงน้ำจืดนครพนมโดยแยกเพศผู้และเพศเมีย เพื่อสะดวกในการฉีดฮอร์โมน ก่อนฉีดฮอร์โมน ต้องงดอาหารอย่างน้อย 6 – 12 ชั่วโมง โดยพ่อพันธุ์ปลาเผาะจะฉีดกระตุ้นโดยใช้ฮอร์โมน LHRHa มีชื่อทางการค้าว่า Suprefect ในอัตรา 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมร่วมกับ domperidone มีชื่อทางการค้าว่า Motilium ในอัตรา 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมโดยฉีดใต้ครีบหลังเหนือเส้นข้างลำตัว หลังจาก 8 - 12 ชั่วโมง จึงนำมารีดน้ำเชื้อ และควรระวังไม่ให้มีการปนเปื้อนของเลือด ปัสสาวะหรือน้ำ ทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

ส่วนปลาเผาะเพศเมียที่มีความสมบูรณ์ทางเพศสังเกตจากลักษณะภายนอกได้ไม่ชัดเจน จึงตรวจสอบความสมบรูณ์พันธุ์ของแม่พันธุ์โดยการใช้สายยางเล็กๆ ดูดไข่ เพื่อนำไข่มาวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ด้วยเวอร์เนียมิเตอร์ (ไข่ที่พร้อมจะฉีดฮอร์โมนควรมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่เท่ากับ 1.8 - 2.0 มิลลิเมตร (Tuan, 1999; เจริญ และ สมบัติ, 2547) ถ้ามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเล็กกว่าขนาดดังกล่าว จะมีการฉีดกระตุ้นไข่ด้วยฮอร์โมน HCG 500 IU ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม จนมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่อยู่ระหว่าง 1.8 มิลลิเมตรขึ้นไป แล้วจึงฉีดฮอร์โมน Suprefect ในอัตรา 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมร่วมกับ Motilium ในอัตรา 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม จากนั้นทิ้งไว้ประมาณ 11 - 12 ชั่วโมงเช็คการตกไข่โดยการดูดไข่เพื่อดูความใสของไข่ เพื่อนำไปทดสอบการปฏิสนธิต่อไป

3.2.2 ในห้องปฏิบัติการ ทำการศึกษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลาโดยดูลักษณะต่างๆ ดังนี้

1. การศึกษาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

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

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์การสังเกตเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ

หลักเกณฑ์	หมายเลข	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)

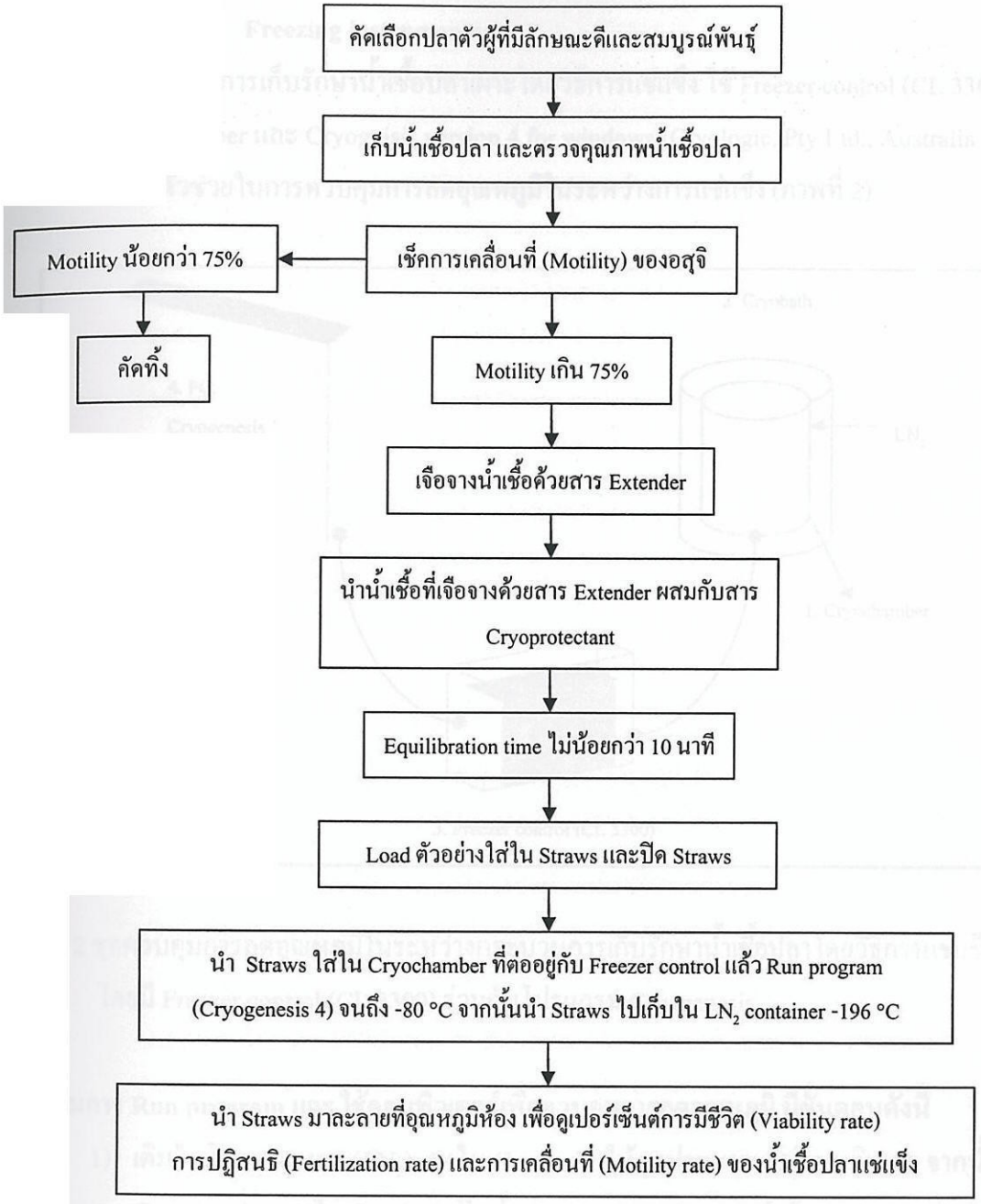
2. การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)

การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ ทำได้โดยเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อน้ำกลั่นเท่ากับ 1: 1500 เท่า แล้วนับจำนวนอสุจิ โดยใช้สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (Hemacytometer counting chamber) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (40×) นับจำนวนอสุจิจากจาก 5 บริเวณ คือ ช่องมุมบน-ล่างทั้งซ้ายและขวา และช่องตรงกลาง แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ ต่อ 1 มิลลิลิตร ดังนี้

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

3. ขั้นตอนและวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

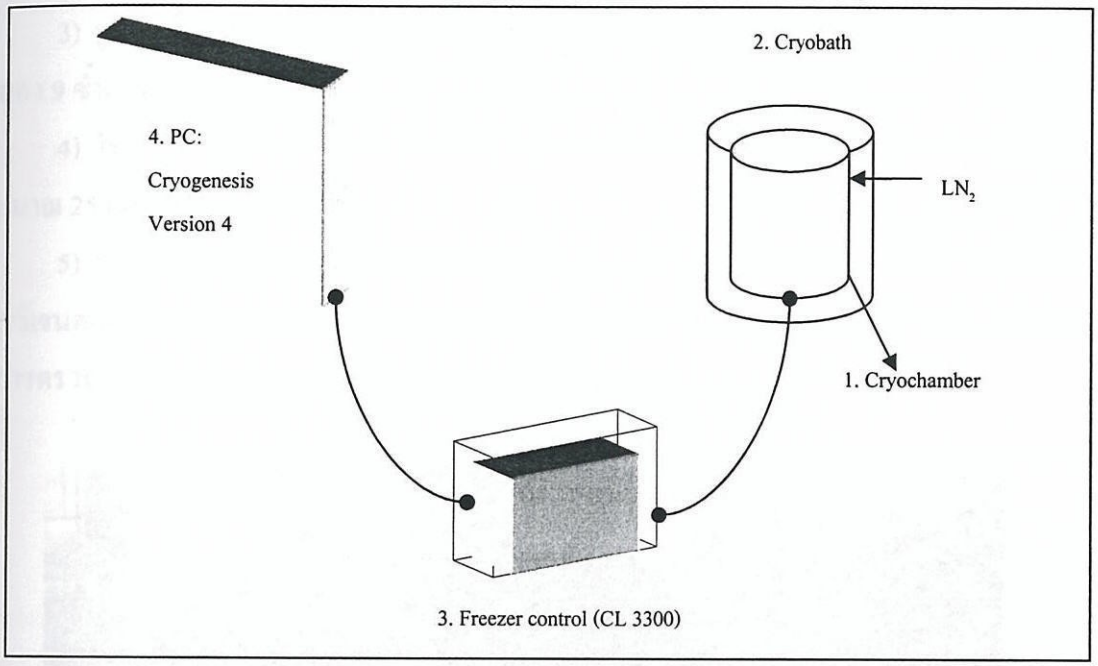
นำน้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่า 75% มาเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง มีขั้นตอนและระเบียบวิธีการวิจัยดังแสดงในแผนภาพที่ 1.



ภาพที่ 1 แผนภาพแสดงกระบวนการการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง ดัดแปลงจาก Kwantong (2003)

4. Freezing instrumentation

ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง ใช้ Freezer control (CL 3300), cryobath, cryochamber และ Cryognisis version 4 for windows (Cryologic, Pty Ltd., Australia 1998 and 1999) เป็นตัวช่วยในการควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างการแช่แข็ง (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง โดยมี Freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis

ขั้นตอนการ Run program และ ใช้คอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ มีขั้นตอนดังนี้

1) เติมไนโตรเจนเหลว (LN_2) ลงใน Cryobath ให้สูงประมาณ 15 เซนติเมตร จากนั้นใส่ Cryochamber ลงใน Cryobath ปิดฝา ต่อสาย Cryochamber เข้ากับ Freezer control (CL 3300) จากนั้นต่อ Freezer control ต่อกับคอมพิวเตอร์อีกที เพื่อควบคุมการทำงาน ดังแสดงในภาพที่ 2
2) เลือกช่วงอุณหภูมิที่ต้องการ โดยใช้เมนู EXCUTE จากโปรแกรม Cryogenesis
3) นำตัวอย่างของน้ำเชื้อที่ Load ใส่ French straws เรียบร้อยแล้วบรรจุใน Cryochamber และRun program จนอุณหภูมิที่ Freezer control (CL 3300) ถึง -80°C จึงนำเอาตัวอย่างน้ำเชื้อออกจาก Cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งนี้ไปทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การเคลื่อนที่ และการมีชีวิตของอสุจิต่อไป

5. การศึกษาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

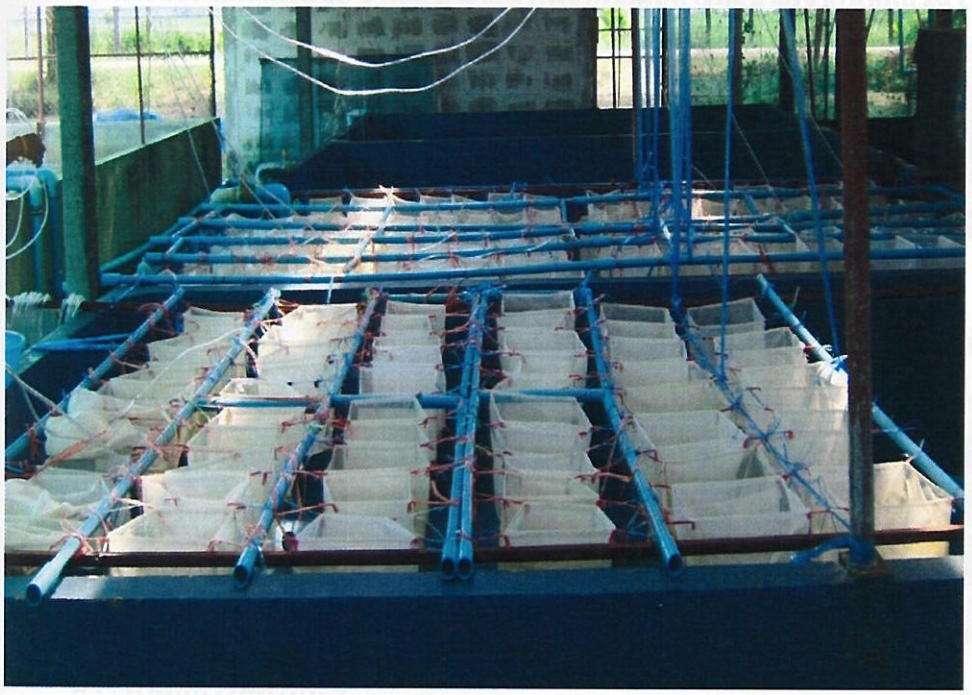
1) รีดไข่ปลาเผาะหลังจากการฉีดฮอร์โมนมาแล้ว 11 - 12 ชั่วโมง ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.8-2.0 มิลลิเมตร

2) ใช้ไมโครปิเปตดูดไข่ 450 µl (ประมาณ 103 ± 8.0 ฟอง) ใส่จานแก้ว (Glass petri dish) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร

3) ดูดน้ำเชื้อสด 30 µl (ตัวควบคุม) และน้ำเชื้อแช่แข็ง 240 µl ลงไปผสมกับไข่ โดยทำการทดลอง 9 ซ้ำต่อทรีทเมนต์

4) ใช้ขนไก่คนไข่และน้ำเชื้อให้เข้ากัน หลังจากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำสำหรับการเพาะฟักลงไปประมาณ 25 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ 3 นาที

5) นำจานแก้วใส่ลงในกระชังเพาะฟักขนาด 16 x 24 x 16 เซนติเมตร (ภาพที่ 3) มีการให้ออกซิเจนตลอดเวลาทำการเพาะฟัก ช่วงอุณหภูมิของน้ำอยู่ระหว่าง 25 - 29 °C หลังจากนั้น 7 ชั่วโมง ทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ที่ระยะ gastrula stage



ภาพที่ 3 กระชัง และ Tank สำหรับฟักไข่ปลาเผาะ

6. การศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (Viability)

การศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ทำได้โดยวิธีการย้อมสี Eosin-Nigrosin (ส่วนประกอบสีย้อมแสดงในตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสีย้อม Eosin - Nigrosin

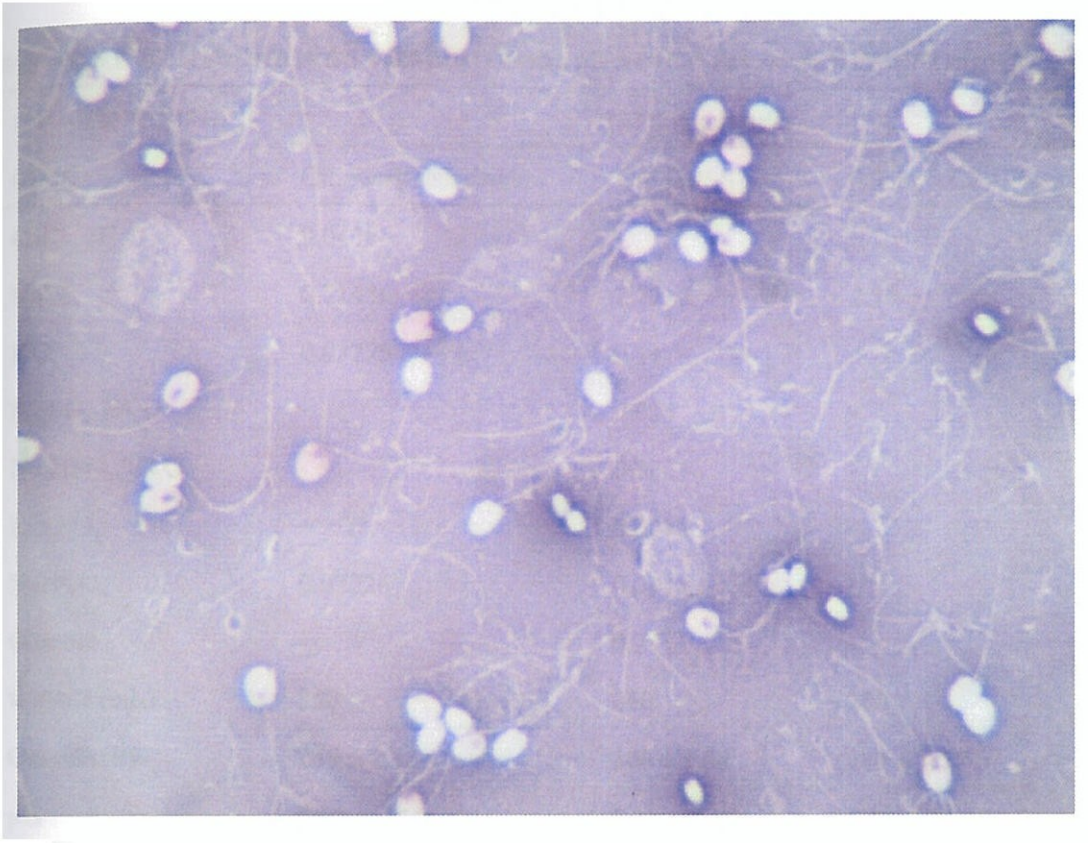
ส่วนประกอบสารเคมี	ปริมาณ
Eosin Y disodium salt	1 (g)
Nigrosin water soluble	5 (g)
Distilled water	100 (ml)

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 แล้วหยดน้ำเชื้อแช่แข็ง ของแต่ละกลุ่มการทดลองลงข้างๆ สีย้อมประมาณ 1 µl
2. ใช้เข็มเขี่ย Smear น้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากัน จากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบางๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว รอจนสไลด์แห้ง
3. หยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1 - 2 หยด แล้วปิดด้วย Cover slide แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า
4. นับจำนวนเซลล์ตัวเป็นและตัวตาย โดยการสุ่มนับ 5 บริเวณๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่เซลล์ตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาว (ไม่ติดสีย้อม) ส่วนตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วง ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีม่วงหรือสีชมพูแดง

การทดลองที่ 1. ชนิดของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง มีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ มาเจือจางด้วยสาร extenders แต่ละชนิด (Ginzburg ringer fish, Calcium Free Hanks' Balanced Salt Solution (C-F HBSS) และ 0.9% NaCl) ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender เท่ากับ 1: 3 เตรียมสาร extender ทั้ง 3 ชนิด ตามส่วนประกอบของแต่ละสูตร ดังแสดงในตารางที่ 3 จากนั้นวัดค่า pH และวัดค่า osmolarity ของสาร extender นำสาร extender ใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0 - 4 °C หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMA, DMSO, MeOH และ Glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ดังแผนการทดลองในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบทางเคมี ออสโมลาริตี และ pH ของสาร extenders ที่ใช้ในการศึกษา

ส่วนประกอบสารเคมี	สูตรสาร extender		
(กรัม)	Ginzburg fish ringer	C-F HBSS	0.9% NaCl
$CaCl_2.2H_2O$	0.0438	-	-
NaCl	0.71456	2.2225	2.25
KCl	0.02775	0.11	-
$MgSO_4.7H_2O$	-	0.055	-
$Na_2HPO_4.7H_2O$	-	0.0325	-
KH_2PO_4	-	0.0175	-
$NaHCO_3$	0.02226	0.0975	-
Glucose	-	0.2775	-
น้ำกลั่น (mL)	250	250	250
Osmolarity	**249 ± 2.35**	**298 ± 1.88**	**277 ± 1.77**
pH	**7.53 ± 0.36**	**7.32 ± 0.18**	**6.58 ± 0.26**

2) ดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1 ปริมาตร 240 µl ใส่หลอดแช่แข็ง (French straw ขนาด 250 µl) โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ 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 (CL 3300) ทำงาน จนอุณหภูมิที่ Freezer control (CL 3300) ถึง -80°C จึงนำ Straws ออกจาก Cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C เป็นระยะเวลา 1 วัน จากนั้นน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิต่อไป

ตารางที่ 4 แผนการทดลองศึกษาชนิดของสาร extenders และสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่เย็น

Treatment	สาร Extender	ความเข้มข้นสาร Cryoprotectants* (%)
1	Ginzburg fish ringer	5
2	Ginzburg fish ringer	10
3	Ginzburg fish ringer	15
4	C-F HBSS	5
5	C-F HBSS	10
6	C-F HBSS	15
7	0.9% NaCl	5
8	0.9% NaCl	10
9	0.9% NaCl	15
10 (Control)		

หมายเหตุ * สาร cryoprotectant ที่ใช้มี 4 ชนิดคือ DMSO, DMA, MeOH และ Glycerol

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ 3 x 3 แฟคทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (3 x 3 Factorial Experiment in Completely Randomized Design) โดยเปรียบเทียบสาร extenders 3 ชนิด ร่วมกับชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants 3 ระดับความเข้มข้น โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลองตามชนิดของสาร Cryoprotectants (DMSO, DMA, MeOH และ glycerol) โดยมีจำนวนซ้ำ 9 ซ้ำต่อทรีตเมนต์ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวน นำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิในแต่ละทรีตเมนต์ไป transformed โดยใช้วิธี arcsine transformation จากนั้นเปรียบเทียบผลของสาร extender และระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ในแต่ละทรีตเมนต์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA ตามแผนการทดลองแบบ 3 x 3 แฟคทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ และวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยใช้โปรแกรม SPSS

การทดลองที่ 2. ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

การทดลองนี้เป็นการทดลองต่อเนื่องจากการทดลองที่ 1 โดยเลือกชนิดของสาร cryoprotectant ร่วมกับสาร extender ที่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดในแต่ละกลุ่มการทดลองชนิดของสาร cryoprotectant มาศึกษาผลร่วมกับอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure ในอัตราต่างๆ (6, 8 และ 10 °C min^{-1}) เพื่อที่จะหาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) นำน้ำเชื้อสดที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ มาเจือจางด้วยสาร extenders ที่เลือกจากการทดลองที่ 1 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender เท่ากับ 1: 3 หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectant ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ดังแผนการทดลอง Factorial in CRD ในตารางที่ 5
2) ดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1. ปริมาตร 240 µl ใส่หลอดแช่แข็ง (French straw ขนาด 250 µl) โดยใช้ไมโครปิเปต แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ Heated hemostat
3) นำ Straws ใส่ลงใน Cryochamber ปิดฝา เลือกอุณหภูมิที่ต้องการศึกษาดังที่กล่าวมาข้างต้น (6, 8 และ 10 °C min^{-1}) จากนั้น Run program จนอุณหภูมิที่ Freezer control ถึง -80 °C จึงนำ Straws ออกจาก Cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิต่อไป

ตารางที่ 5 แผนการทดลองการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (6, 8 และ 10 °C min^{-1}) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

Treatment	Freezing rate (°C min^{-1})	สาร Cryoprotectants + สาร Extender
1	6	10% DMSO + C-F HBSS
2		10% DMA + C-F HBSS
3		5% MeOH + 0.9% NaCl
4		10% glycerol + Ginzburg fish ringer
5	8	10% DMSO + C-F HBSS
6		10% DMA + C-F HBSS
7		5% MeOH + 0.9% NaCl
8		10% glycerol + Ginzburg fish ringer
9	10	10% DMSO + C-F HBSS
10		10% DMA + C-F HBSS
11		5% MeOH + 0.9% NaCl
12		10% glycerol + Ginzburg fish ringer
13 (Control)		

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยใช้แผนการทดลองแบบ 3 x 4 แฟคทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (3 x 4 Factorial Experiment in Completely Randomized Design) โดยมีจำนวนซ้ำ 15 ซ้ำต่อทรีตเมนต์ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำข้อมูลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิในแต่ละทรีตเมนต์ไป transformed โดยใช้วิธี arcsine transformation จากนั้นเปรียบเทียบผลของอัตราการลดอุณหภูมิ ในแต่ละทรีตเมนต์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

4) เลือก treatment combinations ที่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงที่สุด มาทำการศึกษาต่อเพื่อเปรียบเทียบร่วมกับอัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps freezing procedure (โดยการลดอุณหภูมิที่อัตรา 4 °C min^{-1} จาก 3 ถึง -4 °C และ 11 °C min^{-1} จาก -4 °C ถึง -80 °C) และแบบ Three-steps

freezing procedure (โดยการลดอุณหภูมิที่อัตรา 5 °C min^{-1} จาก 2 ถึง -7 °C, 3 °C min^{-1} จาก -7 °C ถึง -30 °C และ 2 °C min^{-1} จาก -30 °C ถึง -80 °C) ดังแผนการทดลองในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่างๆ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedures โดยใช้สาร 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS

Treatment	Freezing rate
1	One-step freezing procedure
2	Two-steps freezing procedure
3	Three-steps freezing procedure
4 (Control)	

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่างๆ (One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedures) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยใช้แผนการวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan' test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 ผลการศึกษาคุณลักษณะของน้ำเชื้อและองค์ประกอบของอิออนชนิดต่างๆ ในน้ำเชื้อปลาเผาะ

จากการศึกษาพบว่าปลาเผาะมีปริมาตรน้ำเชื้อประมาณ 2.88 ± 1.55 มิลลิลิตร/ตัว โดยมีความเข้มข้นของน้ำเชื้อ $2.35 \pm 0.22 \times 10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 7.59 ± 0.05 มีค่าออสโมลาลิตี้ (osmolarity) 297 ± 3.77 mOsm L^{-1} และในน้ำเชื้อมีส่วนประกอบของอิออนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โซเดียม (Na^+), โพแทสเซียม (K^+), แคลเซียม (Ca^{2+}), แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และคลอไรด์ (Cl^-) ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ส่วนประกอบของอิออนชนิดต่าง ๆ ที่พบในน้ำเชื้อปลาเผาะ

ชนิดอิออน	ความเข้มข้น (mM) (mean±S.D.)
โซเดียม	111±5.57
โพแทสเซียม	13.33±1.56
แคลเซียม	0.73±0.26
แมกนีเซียม	0.53±0.12
คลอไรด์	110.33±5.13

4.2 ผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร Cryoprotectant ที่มีผลต่อการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง แบ่งเป็น 4 กลุ่มการทดลองตามชนิดของสาร cryoprotectant (DMSO, DMA, MeOH และ Glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ร่วมกับสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} และเก็บน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว (-196 °C) เป็นระยะเวลา 1 วัน จากนั้นนำน้ำเชื้อมาละลายที่อุณหภูมิห้อง (25 °C) และประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งจากเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (motility) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (viability) และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (fertilization)

จากการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 75.79 ± 1.72% (94% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P>0.05$) เมื่อทดสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิ พบว่าเมื่อใช้ 5 และ

10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ และเมื่อใช้ 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 60.61±1.02% (69% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$; ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}

สาร Extender	สาร DMSO (%)	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
Ginzburg fish ringer	5	42.18±2.83^{cd} (52.19)	41.32±2.50^{c} (41.32)	25.89±0.96^{e} (29.54)
	10	46.85±2.46^{cd} (47.96)	35.66±2.64^{c} (35.66)	30.39±1.14^{de} (34.33)
	15	35.56±2.62^{d} (44.00)	32.90±2.50^{c} (32.90)	25.79±1.39^{e} (29.42)
C-F HBSS	5	66.65±2.29^{b} (82.46)	64.34±5.65^{b} (64.34)	54.28±1.30^{c} (61.94)
	10	75.79±1.72^{ab} (93.76)	69.80±5.46^{b} (69.80)	60.61±1.02^{b} (69.15)
	15	47.26±3.20^{cd} (58.47)	32.90±2.50^{c} (32.90)	30.56±1.03^{de} (34.87)
0.9%NaCl	5	40.75±3.57^{cd} (50.41)	44.20±2.20^{c} (44.20)	32.50±0.80^{d} (37.08)
	10	51.17±3.66^{c} (63.30)	41.32±2.50^{c} (41.32)	29.37±1.71^{de} (33.51)
	15	42.52±1.53^{cd} (52.61)	32.90±2.50^{c} (32.90)	31.43±1.55^{de} (35.87)
Control		80.83±1.07^{a}	100±0.00^{a}	87.64±1.30^{a}

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

จากการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุดเท่ากับ 60.19 ± 2.10% (77% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้ 5 และ 10% DMA ร่วมกับ 0.9% NaCl (P>0.05) และเมื่อใช้ 5 และ 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ และเมื่อใช้ 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 59.90 ± 1.14% (60% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด (P<0.05; ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}

สาร Extender	สาร DMA (%)	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
Ginzburg fish ringer	5	40.37±0.72^{de} (51.91)	30.20±2.20^{c} (30.20)	22.84±1.40^{ef} (26.89)
	10	44.40±1.98^{cde} (57.09)	32.90±2.50^{c} (32.90)	23.86±1.03^{ef} (28.09)
	15	35.40±1.48^{e} (45.52)	27.56±1.67^{c} (27.56)	24.54±1.02^{ef} (28.89)
C-F HBSS	5	49.25±3.23^{cd} (63.33)	50.00±2.50^{b} (50.00)	40.38±1.15^{c} (47.54)
	10	60.19±2.10^{b} (77.39)	52.91±3.91^{b} (52.91)	59.90±1.14^{b} (59.93)
	15	44.81±1.95^{cde} (57.62)	32.90±2.50^{c} (32.90)	27.11±1.36^{de} (31.92)
0.9%NaCl	5	51.20±0.93^{bc} (65.83)	35.66±2.64^{c} (35.66)	30.70±0.92^{d} (36.15)
	10	53.00±1.20^{bc} (68.14)	35.66±2.64^{c} (35.66)	28.72±1.22^{de} (33.81)
	15	39.53±2.60^{de} (50.83)	30.20±2.20^{c} (30.20)	20.41±1.31^{f} (24.03)
Control		77.77±1.08^{a}	100±0.00^{a}	84.94±1.68^{a}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมม์แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ตัวเลขในวงเล็บคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

จากการใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 54.32 ± 0.64% (74% ของน้ำเชื้อสด), 55.80 ± 3.33% (56% ของน้ำเชื้อสด) และ 50.00 ± 1.06% (59% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$; ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ MeOH เป็นสาร Cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}

สาร Extender	สาร MeOH (%)	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
Ginzburg fish ringer	5	44.94±0.62^{d} (60.83)	27.56±1.67^{cd} (27.56)	26.01±0.92^{d} (30.86)
	10	40.37±0.83^{e} (54.64)	30.20±2.20^{cd} (30.20)	27.28±1.22^{d} (32.36)
	15	36.81±1.38^{cf} (49.83)	22.52±3.91^{d} (22.52)	25.22±0.98^{d} (29.91)
C-F HBSS	5	45.90±0.31^{d} (62.13)	32.90±2.50^{cd} (32.90)	30.53±1.20^{cd} (36.22)
	10	46.45±0.38^{cd} (62.87)	41.32±2.50^{c} (41.32)	30.60±0.82^{cd} (36.30)
	15	45.13±0.56^{d} (61.09)	30.20±2.20^{cd} (30.20)	26.21±1.03^{d} (31.09)
0.9%NaCl	5	54.32±0.64^{b} (73.53)	55.80±3.33^{b} (55.80)	50.00±1.06^{b} (59.31)
	10	49.98±0.52^{c} (67.65)	41.32±2.50^{c} (41.32)	33.58±1.05^{c} (39.83)
	15	34.04±0.45^{f} (46.08)	22.52±3.91^{d} (22.52)	27.99±1.53^{d} (33.20)
Control		73.88±1.25^{a}	100±0.00^{a}	84.30±1.32^{a}

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

และจากการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 45.10 ± 0.40% (63% ของน้ำเชื้อสด) และ 41.27 ± 1.26% (49% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) และเมื่อใช้ 5, 10 และ 15% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าทรีตเมนต์อื่นๆ (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ในสาร Extender 3 ชนิด (Ginzburg fish ringer, C-F HBSS และ 0.9% NaCl) ร่วมกับการใช้ Glycerol เป็นสาร Cryoprotectant ที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1}

สาร Extender	สาร Glycerol (%)	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
Ginzburg fish ringer	5	31.79±0.41^{e} (44.55)	35.66±2.64^{bcd} (35.66)	26.30±1.15^{def} (31.00)
	10	45.10±0.40^{b} (63.20)	50.00±2.50^{b} (50.00)	41.27±1.26^{b} (48.65)
	15	42.33±0.38^{c} (59.32)	38.47±2.64^{bc} (38.47)	35.05±0.90^{c} (41.32)
C-F HBSS	5	38.52±0.48^{d} (53.99)	32.90±2.50^{cde} (32.90)	29.46±0.96^{d} (34.73)
	10	37.10±0.51^{d} (52.00)	32.90±2.50^{cde} (32.90)	27.67±1.00^{de} (32.62)
	15	27.28±0.55^{f} (38.23)	22.52±3.91^{de} (22.52)	22.02±1.19^{f} (25.96)
0.9%NaCl	5	36.38±0.39^{d} (50.99)	22.52±3.91^{de} (22.52)	27.25±0.84^{de} (32.13)
	10	30.31±0.33^{e} (42.48)	20.14±3.33^{e} (20.14)	23.67±0.91^{ef} (27.90)
	15	31.15±0.68^{e} (43.66)	20.14±3.33^{e} (20.14)	24.99±0.97^{def} (29.46)
Control		71.35±0.90^{a} (100.00)	100±0.00^{a} (100.00)	84.83±1.27^{a} (100.00)

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

เมื่อวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) ในแต่ละการทดลองย่อยของสารแต่ละชนิดสาร Cryoprotectant (DMSO, DMA, MeOH หรือ Glycerol) เพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ หรือระหว่างเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต หรือระหว่างเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 พบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต โดยทุกพารามิเตอร์มีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางเดียวกัน (ตารางที่ 12) ตัวอย่างเช่น พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตในสาร glycerol มีความสัมพันธ์ในระดับสูงมาก หรือ ความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ในสาร DMSO มีความสัมพันธ์ในระดับปานกลาง เป็นต้น ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 ความสัมพันธ์ระหว่าง เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต ของสาร cryoprotectant แต่ละชนิดที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

สาร cryoprotectant		**Fertilization**	**Motility**
DMSO	Motility	0.548*	
	Viability	0.705*	0.866*
DMA	Motility	0.638*	
	Viability	0.718*	0.878*
MeOH	Motility	0.813*	
	Viability	0.872*	0.881*
Glycerol	Motility	0.861*	
	Viability	0.937*	0.859*

* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.3 ผลของการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure ที่ระดับ 6, 8 และ 10 °C min^{-1} ร่วมกับชนิดสาร cryoprotectant ที่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงสุด ดังนี้ 1) 10% DMSO + C-F HBSS, 2) 10% DMA + C-F HBSS, 3) 5% MeOH + 0.9% NaCl และ 4) 10% glycerol + Ginzburg fish ringer จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO + C-F HBSS ร่วมกับอัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 54.28 ± 0.72% (81% ของน้ำเชื้อสด), 62.10 ± 2.48% (62% ของน้ำเชื้อสด) และ57.67 ± 1.07% (73% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 6 และ 8 °C min^{-1} ($P>0.05$) แต่ต่ำกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับน้ำเชื้อสด ($P<0.05$) และพบว่าเมื่อใช้ 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 6, 8 และ 10 °C min^{-1} ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำกว่า ทรีตเมนต์อื่น ๆ (ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) ที่ระดับการลดอุณหภูมิ 6, 8 และ 10 °C min^{-1}

Freezing rate (°c min^{-1})	Cryodiluent	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
6	10% DMSO+C-F HBSS	53.81±1.57^{bc}	56.96±2.30^{b}	57.36±1.20^{b}
		(79.81)	(56.96)	(72.44)
	10% DMA+C-F HBSS	46.27±1.41^{cd}	37.90±2.00^{cdc}	49.94±1.00^{c}
		(68.63)	(37.90)	(63.08)
	5% MeOH+0.9% NaCl	41.80±1.32^{def}	32.90±1.89^{cdef}	43.00±1.22^{d}
		(62.00)	(32.90)	(54.30)
	10% glycerol+Ginzburg	34.43±0.83^{fg}	28.08 ±2.88^{ef}	34.51 ±1.34^{e}
	fish ringer	(51.07)	(28.08)	(43.58)
8	10% DMSO+C-F HBSS	53.26±1.60^{bc}	60.40±2.45^{b}	57.01±1.17^{b}
		(78.99)	(60.40)	(72.00)
	10% DMA+C-F HBSS	45.43±1.75^{d}	41.32±1.89^{cd}	51.01±1.04^{c}
		(67.38)	(41.32)	(64.42)
	5% MeOH+0.9% NaCl	41.99±1.62^{def}	34.55±1.96^{cdef}	43.40±1.17^{d}
		(62.28)	(34.55)	(54.81)
	10% glycerol+Ginzburg	35.33±1.30^{efg}	29.66±3.00^{def}	34.93±0.94^{e}
	fish ringer	(52.41)	(29.66)	(44.12)
10	10% DMSO+C-F HBSS	54.28±0.72^{b}	62.10±2.48^{b}	57.67±1.04^{b}
		(80.51)	(62.10)	(72.84)
	10% DMA+C-F HBSS	44.89±1.76^{d}	44.77±2.17^{c}	50.42±1.15^{c}
		(66.59)	(44.77)	(63.68)
	5% MeOH+0.9% NaCl	42.57±1.35^{de}	36.22±2.00^{cde}	42.54±0.66^{d}
		(63.14)	(36.22)	(53.72)
	10% glycerol+Ginzburg	33.19±1.22^{g}	23.50±4.50^{f}	34.77±4.50^{e}
	fish ringer	(49.23)	(23.50)	(43.91)
Control		67.42±2.22^{a}	100±0.00^{a}	79.18±0.00^{a}

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

จากการศึกษาผลการทดลองเปรียบเทียบการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing procedure ร่วมกับ 10% DMSO + C-F HBSS พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 61.47 ± 0.64% (90% ของน้ำเชื้อสด) และ 64.66 ± 0.98% (82% ของน้ำเชื้อสด) ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps และ Three-steps ($P<0.05$) และเมื่อทดสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ One-step ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 67.10 ± 3.16% (67% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps ($P>0.05$) และพบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อแช่แข็งต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ย (Mean ± SE) เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาเผาะ (*P. bocourti*) โดยใช้สาร 10% DMSO + C-F HBSS ที่ระดับการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ (One-step, Two-steps และ Three-steps)

Freezing rate	Fertilization (%)	Motility (%)	Viability (%)
One-step	61.47±0.64^{b}	67.10±3.16^{b}	64.66±0.98^{b}
	(89.76)	(67.10)	(82.39)
Two-steps	53.43±2.08^{c}	62.10±2.48^{bc}	57.58±0.87^{c}
	(78.03)	(62.10)	(73.37)
Three-steps	53.15±1.49^{c}	55.23±2.17^{c}	57.78±1.00^{c}
	(77.61)	(55.23)	(73.62)
Control	68.48±1.23^{a}	100±0.00^{a}	78.48±0.58^{a}

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

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุป และข้อเสนอแนะ

5.1 ผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับ C-F HBSS ให้ผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ อีกทั้งยังให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) เนื่องมาจาก DMSO สามารถช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์และยังช่วยคงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ที่อาจเกิดมาจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง และ osmotic stress ได้ ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Mongkonpunya et al. (1995) ที่ทำการศึกษาในปลาบึก (Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas*) พบว่าเมื่อใช้ 9% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) เช่นเดียวกันกับรายงานของ Harvath and Urbanyi (2000) ที่ทำการศึกษาในปลาดุกยักษ์ (African catfish, *Clarias gariepinus*) พบว่า 10% DMSO มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง โดยให้ผลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักเฉลี่ยระหว่าง $86.8 \pm 3.1\%$ และ $67.1 \pm 11.9\%$ ตามลำดับ ซึ่งเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักดังกล่าวมีค่าสูงกว่าการใช้ MeOH, Ethylene glycol, Propylene glycol และ glycerol เป็นสาร cryoprotectant เช่นเดียวกันกับรายงานของ Kwantong and Bart (2006) ที่ทำการศึกษาในปลาเทโพ (Black ear catfish, *Pangasius larnaudi*) พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ 10% DMA และ 5% MeOH และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Riley et al. (2004) ที่ได้ทำการศึกษาในปลา Red snapper (*Lutjanus campechanus*) พบว่าเมื่อใช้ 10% DMSO ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ DMA, MeOH และ glycerol เป็นสาร cryoprotectant รวมถึงการทดลองของ He and Wood (2004) พบว่า DMSO สามารถป้องกันเนื้อเยื่อเมมเบรนและไมโตคอนเดรียและยังช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์จากอันตรายที่เกิดจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นในกระบวนแช่แข็งได้ อีกทั้งมีการรายงานว่าการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant ประสบความสำเร็จในเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลาหลายชนิด เช่น European catfish, *Silurus glanis* (Linhart et al., 2005); Blue catfish, *Ictalurus furcatus* (Bart et al., 1998); European eel, *Anguilla anguilla* (Penaranda et al., 2009) เป็นต้น ทั้งนี้ยังมีความเป็นไปได้ว่าสาร DMSO ที่ให้ผลดีเนื่องมาจากการ combination ร่วมกับสาร extender คือ C-F HBSS โดย C-F

HBSS มีค่าออสโมลาลิตี้ (298 ± 1.88 mOsm kg^{-1}) ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำเชื้อปลาเผาะ(297 ± 3.77 mOsm kg^{-1}) มากกว่า 0.9% NaCl (277 ± 1.77 mOsm kg^{-1}) และ Ginzburg fish ringer (249 ± 2.35 mOsm kg^{-1}) จะเห็นได้ว่าค่าออสโมลาลิตี้ของ extender ที่มีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อจะช่วยควบคุมรักษาความดันออสโมติกและช่วยลดการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อก่อนกระบวนการแช่แข็งได้ดี อีกทั้ง C-F HBSS ยังมีส่วนประกอบของ glucose ซึ่งไม่มีใน 0.9% NaCl และ Ginzburg fish ringer โดย glucose จะเป็นแหล่งพลังงานให้กับสเปิร์ม ซึ่งสอดคล้องจากการศึกษาของ Yao et al. (1999) ที่ได้ทำการศึกษาในปลา Ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) โดยศึกษาความแตกต่างส่วนประกอบของสาร extender พบว่าสาร extender ที่มีส่วนประกอบของ glucose จะช่วยให้พลังงานให้กับสเปิร์มทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าสาร extender ที่ไม่มีส่วนประกอบของ glucose จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการใช้สาร 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant ร่วมกับ C-F HBSS มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองการใช้ DMA, MeOH และ glycerol เป็นสาร cryoprotectants

จากการทดลองโดยใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 10% DMA ร่วมกับ C-F HBSS ให้ผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ แต่ให้เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบจากชุดการทดลองการใช้ DMSO เป็นสาร cryoprotectant แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Wernecke and Pluta (2003) พบว่าเมื่อใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการปฏิสนธิและการฟัก ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไน (Common carp, *Cyprinus carpio*) เช่นเดียวกันในการศึกษาของ Baulny et al. (1999) ที่ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลา European catfish พบว่าการใช้ DMA เป็นสาร cryoprotectant จะช่วยรักษาพลังงาน หรือช่วยกระตุ้นในกระบวนการ ATP ให้กับเซลล์เพื่อให้เซลล์มีสภาพคงอยู่หลังจากผ่านกระบวนการแช่แข็งและการละลาย นอกจากนี้การใช้ DMA เป็นสาร cryoprotctant ยังประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในกลุ่มปลา Salmonid (Babiak et al., 2001; Richardson et al., 2000)

จากการทดลองโดยใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 5% MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl ให้ผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ แต่ให้เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบจากชุดการทดลองการใช้ DMSO และ DMA เป็นสาร cryoprotectant ทั้งนี้เนื่องจาก MeOH มีมวลโมเลกุล (32.04) ซึ่งต่ำกว่ามวลโมเลกุลของ DMSO (78.13) และ DMA (87.12) และเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น 10 และ 15% ทำให้มีอัตราการแพร่สูงจึงทำให้สามารถซึมผ่านเข้าเซลล์ได้รวดเร็วกว่าสาร cryoprotectant ชนิดอื่น ๆ จึงน่าจะทำให้เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mongkonpunya et al. (1995) ที่ได้ทำการศึกษาในปลาบึก พบว่าระดับความเข้มข้น 14% MeOH มีความเป็นพิษต่อสเปิร์ม

ทำให้สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อเทียบกับที่ระดับความเข้มข้น 5-10% เช่นเดียวกันจากการศึกษาของ Christensen and Tiersch (2005) ที่ได้ทำการศึกษาในปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) พบว่าเมื่อใช้ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5% ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าที่ระดับความเข้มข้น 10% และเช่นเดียวกับในการศึกษาของ Harvath et al. (2005); Christensen and Tiersch (1997) ได้พบว่าเมื่อใช้ MeOH ระดับความเข้มข้น 15% มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มมากกว่าการใช้ที่ระดับความเข้มข้น 5% และ 10% อย่างไรก็ตามในบางรายงานพบว่าการใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant ประสบความสำเร็จในเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลาได้หลายชนิด เช่น ปลาดุกยักษ์ (Viveiros et al., 2000; 2001); Turbot, *Lota lota* (Lahnsteiner et al., 2002); Tropical bagrid catfish, *Mystus nemurus* (Muchlisin et al., 2004; Muchlisin & Azizah, 2009); Murray cod, *Marraycullochella peelii peelii* (Daly et al., 2008)

ส่วนการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant พบว่าเมื่อใช้ 10% glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer ให้ผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ แต่ให้เปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบจากชุดการทดลองการใช้ DMSO, DMA และ MeOH เป็นสาร cryoprotectant ซึ่งในการทดลองพบว่าสาร glycerol มีลักษณะเป็นเจลหนืด อาจเกิดจากระยะเวลา (equilibration time) ที่ไม่เหมาะสม เนื่องมาจาก glycerol มีมวลโมเลกุล 92.09 มากกว่า DMSO (78.13), DMA (87.12) และ MeOH (32.04) จึงทำให้ glycerol มีอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ช้ากว่า DMSO, DMA หรือ MeOH จึงเป็นไปได้ว่าระยะ equilibration time ในการทดลอง (10 นาที) อาจจะสั้นเกินไปทำให้มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการป้องกันความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ โดย equilibration time มีผลต่อการแพร่ของสารเข้าสู่เซลล์และขึ้นอยู่กับชนิดของสาร cryoprotectants ซึ่งการใช้สาร glycerol อาจจะต้องใช้ร่วมกับ equilibration time ที่ระยะเวลานานขึ้นเพื่อให้ glycerol แพร่เข้าสู่เซลล์ได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องจากรายงานของ Harvey et al. (1982) ได้กล่าวว่าการใช้สาร glycerol เป็นสาร cryoprotectant จะประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งจะต้องใช้ระยะ equilibration time ที่ระยะเวลามากกว่า 20 นาที และจากการศึกษาของ Conget et al. (1996); Tekin et al. (2007) พบว่า glycerol มีความเป็นพิษต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในกลุ่ม Salmonid อย่างไรก็ตามบางรายงานพบว่าเมื่อใช้สาร glycerol เป็นสาร cryoprotectant ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง เช่นในปลาดุกยักษ์ (Steyn, 1993; Steyn and Van, 1987), European catfish (Linhart et al., 1993) เป็นต้น

จากผลการศึกษาชนิดของสาร cryoprotectants (DMSO, DMA, MeOH และ glycerol) พบว่าผลของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิจะขึ้นอยู่กับ combination ระหว่างชนิดของสาร cryoprotectants และชนิดของสาร extender เช่น DMSO และ DMA ใช้ร่วมกับ C-F HBSS, MeOH ร่วมกับ 0.9% NaCl และ glycerol ร่วมกับ Ginzburg fish ringer

อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นที่ 15% มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นที่ 5% และ 10% นอกจากนี้ในการเลือกชนิดของสาร extender เพื่อใช้ในการศึกษากระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งนั้นควรพิจารณาสาร extender ที่มีค่าออสโมลาลิตี้และค่าพีเอชที่ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลาชนิดนั้นๆ อีกทั้งส่วนประกอบของอิออนต่าง ๆ เช่น Na^+, K^+, Ca^{2+} ต่างมีผลต่อน้ำเชื้ออีกด้วย

เมื่อพิจารณาผลจากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) ในจากการศึกษาผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และยังมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ โดยทุกพารามิเตอร์มีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางเดียวกัน เช่นในสาร DMSO มีความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ($r=0.55$, $P<0.05$) หรือความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ($r=0.71$, $P<0.05$) เป็นต้น ซึ่งสอดคล้องตามการรายงานของ Rurangwa et al. (2001) ที่ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกยักษ์โดยวิธีการแช่แข็ง พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การฟัก และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การฟัก ($r=0.83$, $P<0.001$) นอกจากนี้จากการรวบรวมเอกสารงานวิจัยของ Muchlisin (2005) ได้รายงานว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ โดยเมื่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงจะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงตามไปด้วย ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าจากการทดลองเมื่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงก็จะส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตและเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงตามไปด้วยเช่นกัน

5.2 ผลของการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้น ของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมเท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย โดยจากการวิเคราะห์ข้อมูลผลของอัตราการลดอุณหภูมิในครั้งนี้พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิที่ระดับ 6, 8 และ 10 °C min^{-1} ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต โดยพบว่า 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS และใช้อัตราการลดอุณภูมิที่ 10 °C min^{-1} ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดเท่ากับ 54, 62 และ 58% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 6 และ 8 °C min^{-1} ($P>0.05$) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้สอดคล้องจากการศึกษาของ ศิริพร คชรัตน์ และคณะ (2548) ที่ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลาเทโพ โดยใช้ DMSO ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% ในระดับอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ

10 °C min^{-1} มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิโดยรวมมีค่าต่ำกว่า 20% ซึ่งการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5, และ 10 °C min^{-1} ให้ผลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งคาดว่าน่าจะเกิดจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่มีค่าไม่แตกต่างกันมากนัก และจากการศึกษาของ Viveiros et al. (2001) ที่ได้ทำการศึกษาในปลาดุกยักษ์ โดยทำการลดอุณหภูมิที่ 3 ระดับคือ 3, 5 และ 10 °C min^{-1} พบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} ให้เปอร์เซ็นต์การฟักสูงสุดเท่ากับ 86.2 ± 5.7% ซึ่งผลของเปอร์เซ็นต์การฟักไม่มีความแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 °C min^{-1} แต่ให้ผลที่สูงกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2 °C min^{-1} ($P<0.05$) และจากการศึกษาของ Yang et al. (2007) ที่ได้ทำการศึกษาในปลา Zebrafish (*Danio rerio*) โดยพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} ให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (35%) สูงกว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ 20 °C min^{-1} จะเห็นได้ว่าในการปฏิบัติการกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งเวลามีส่วนสำคัญต่อเซลล์ หากช้าหรือเร็วต่างก็ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ อีกทั้งยังคำนึงเวลาในการทำงานและเวลาที่อัตราการระเหยของไนโตรเจน โดยที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 6 °C min^{-1} จะใช้เวลาในการ run program ประมาณ 17 นาที และที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 8 °C min^{-1} จะใช้เวลาประมาณ 13 นาที ส่วนที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} จะใช้เวลาประมาณ 10 นาที ซึ่งน้อยกว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 6 และ 8 °C min^{-1} ซึ่งสามารถประหยัดเวลา อีกทั้งประหยัดไนโตรเจนเหลวซึ่งจะเป็นการลดต้นทุนในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง

นอกจากนี้ได้มีทำการทดลองเพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (10 °C min^{-1}), Two-steps freezing procedure (อัตราลดอุณหภูมิที่ 4 °C min^{-1} จาก 3 ถึง -4 °C และ 11 °C min^{-1} จาก -4 °C ถึง -80 °C) และ Three-steps freezing procedure (อัตราลดอุณหภูมิที่ 5 °C min^{-1} จาก 2 ถึง -7 °C และ 3 °C min^{-1} จาก -7 °C ถึง -30 °C และ 2 °C min^{-1} จาก -30 °C ถึง -80 °C) พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps หรือ Three-steps ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Dokpong et al. (2009) ที่ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลานวลจันทน์น้ำจืด (Small Scale Mud Carp, *Cirrhinus microlepis*) พบว่าที่อัตราการลดอุณภูมิแบบ One-step (10 °C min^{-1}) ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุดเท่ากับ 47.82 ± 0.82% และ51.50 ± 0.98% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps ($P>0.05$) และพบว่าที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps ให้ผลเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step และ Two-steps เช่นเดียวจากการศึกษาของ Kwantong and Bart (2003) ได้ทำการศึกษาในปลาสวาย (Striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step (10 °C min^{-1}) และแบบ Two-steps พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ (P>0.05) แต่อย่างไรก็ตาม การลดอุณหภูมิแบบ One-step ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงกว่าการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps และจากศึกษา Warnecke and Pluta (2003) ที่ได้ทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในปลาไน โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ One-step และ Three-steps พบว่าการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด (40 ± 6%) แต่ไม่มีความแตกต่างจากการลดอุณหภูมิแบบ One-step (P>0.05) จะเห็นได้ว่าระยะเวลาในขบวนการแช่แข็งอัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 °C min^{-1} จะใช้เวลาในการ run program ในระหว่างขบวนการแช่แข็งประมาณ 10 นาที ซึ่งน้อยกว่าอัตราการลดอุณหภูมิแบบ Two-steps (11 นาที) และ Three-steps จะใช้เวลาประมาณ 37 นาที ซึ่งใช้เวลาในระหว่างขบวนการแช่แข็งนาน จึงอาจเป็นไปได้ว่าหากมีการลดอุณหภูมิเกิดขึ้นอย่างช้าๆ จะใช้เวลานานจึงอาจทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ เนื่องจากเซลล์สูญเสียน้ำจนทำให้ของเหลวภายในมีความเข้มข้นสูงขึ้นทำให้เซลล์เหี่ยว จึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลทำให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต่ำ

สรุป และข้อเสนอแนะ

1. จากการทดลองผลของชนิดของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง ควรใช้ C-F HBSS ร่วมกับ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10%

2. อัตราการลดอุณหภูมิ แบบ One-step freezing rate (10 °C min^{-1}) มีความเหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

ข้อเสนอแนะ

1. ผู้วิจัยเห็นว่าในระหว่างขบวนการนับระยะไข่ควรใช้ความรวดเร็ว และควรนำไข่ขึ้นมานับครั้งละหนึ่งทรีตเมนต์ เพราะจะส่งผลต่อการพัฒนาของไข่ได้

2. จากการวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (Correlation) จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิมีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต โดยทุกพารามิเตอร์มีความสัมพันธ์กันไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นในการทดลองครั้งต่อไปควรเลือกศึกษาเพียงเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เนื่องจากการศึกษาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตต้องใช้เวลานานในการศึกษา อีกทั้งจะช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการวิจัยได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

เจริญ อุดมการ และ สมบัติ สิงห์สี. (2547). ผลของฮอร์โมนและต่อมใต้สมองต่อการตกไข่ปลาโมง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 25/2547. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วิวัฒน์ ปรารมภ์ และ ชัยศิริ ศิริกุล. (2538). การศึกษาชีววิทยาบางประการของปลาโมง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 22 . กองประมงน้ำจืด, กรมประมง. 53 หน้า.

ศิริพร คชรัตน์ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2548). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพ (*Pangasius larnaudii*) แบบแช่แข็ง. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (หน้า 82-89). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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: 819-824.

Baulny, B. O., Labbe, C., and Maisse, G. (1999). Membrane Integrity, Mitochondrial Activity, ATP Content, and Motility of the European Catfish (*Silurus glanis*) Testicular Spermatozoa after Freezing with Different Cryoprotectants. Cryobiology. 39: 177–184.

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. (1997). Cryopreservation of channel catfish spermatozoa: effect of cryoprotectant, straw size and formulation of extender. Theriogenology. 47:639–45.

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.

Conget, P., Fernandez, M., Herrera, G. and Minguell, J.J. (1996). Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. Aquaculture. 143: 319-329.

Daly, J., Glloway, D., Bravington, W., Holland, M. and Ingram, B. (2008). Cryopreservation of sperm from Murray cod, *Maccullochella peelii peelii*. Aquaculture. 285: 117-122.

Dokpong, D., Ponchunchoovong, S., Imsin, A., Piasoongnoen, U. and Singhae, S. (2009). The effect of freezing rates on the cryopreservation of *Small Scale Mud Carp*, *Cirrhina microlepis* (Sauvage, 1878) sperm. Second international conference on sustainable animal agriculture for developing coutries. 8-11 November, Corus Hotel, Kuala Lumpur, Malaysia. P.268-270.

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.

Harvath, A., Wayman, W.R., Urbanyi, B., Ware, K.M., Dean, J.C. and Tiersch, T.R. (2005). The relationship of the cryoprotectnts methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North- American sturgeon species. Aquaculture. 247: 243-251.

Harvey, B., Kelley, R.N. and Smith, M.J. (1982). Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. National Research Council of Canada. Can. J. Zool. 60: 1867-1870.

He, S. and Wood, L.C. (2004). Effect of dimethyl sulfoxide and glycine on cryopreservation induced damage of plasma membranes and mitrochondria to striped bass (*Morone-saxatilis*) sperm. Cryobiology. 48: 254-262.

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.

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). SHORT COMMUNICATION 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

Linhart, O., Billard, R., and Proteau, J. P. (1993). Cryopreservation of European catfish (*Silurus-glanis* L.) spermatozoa. Aquaculture Research. 115: 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: 250–61.

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; V.8 NO.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.

Muchlisin, Z.A. (2005). Current status of extenders and cryoprotectants on fish spermatozoa cryopreservation. Biodiversitas. 60: 66-69.

Muchlisin, Z.A. and M.N.S. Azizah. (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.

Penaranda, D.S., Perez, L., Gallego, V., Jover, M. and Asturiano, J.F. (2009). Improvement of European eel sperm cryopreservation methode by preventing spermatozoa movement activation caused by cryoprotectants. Cryobiology. 59: 119-126.

Prasertwattana, P., Singsee, S and Udomkran, C. (2003). Survey of cage culture of Mekong indigenous fish along the Mekong and Songkhram River, Nakhonphanom Province, Thailand. Proceeding of the 5th Technical Symposium on Mekong Fisheries, MRC Conference Series No. 4. Thailand . P.181-183.

Rana, K.J. 1995. Cryopreservation of fish spermatozoa. In: Cryopreservation and Freezing- Drying protocols. Day, J.G., and McLellan, M.R. (Eds.). New Jersey: Humana press. 254 pp.

Richardson, G.F., Miller, T.L. and McNiven, M.A. (2000). Cryopreservation of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L.) semen in various extenders and in three sizes of straw. Aquaculture Research. 31: 307-315

Riley, K., Holladay, C.G., Chesney, E.J. and Tiersch, T.R. (2004). Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). Aquaculture Research. 238: 183-194.

Rurangwa, E., Volckaert, F.A.M., Huyskens, I G., Kime, I 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.

Steyn, G. J. (1993). The effect of freezing rate on the survival of cryopreseved African Sharptooth Catfish (*Clarias gariepinus*) spermatozoa. Cryobiology. 30: 581-590.

Steyn, G. J. and Van Vuren, J.H.J. (1987). The fertilizing Capacity of Cryopreserved Sharptooth catfish (Clarias gariepinus) sperm. Aquaculture. 63: 187-194.

Takin, N., Secer, S., Akcay, E., Bozkurt, Y. and Kayam, S. (2007). Effects of glycerol additions on post-thaw fertility of frozen rainbow trout sperm, with an amphasis on interaction between extender and cryoprotectant. Journal compilation 2006 Blackwell Verlag, Berlin. J. Appl. Ichthyol. 23: 60-63.

Thorgaard, G.H., Pual, A., Wheeler and Robert, D.F. (2000). Utilization of androgenesis for strain recovery from cryopreserved sperm. In: cryopreservation in aquatic species. Tiersch, T.R., and Mazik, P.M. (Eds.). World aquaculture society, Baton Rouge, Lousiana, 305-309.

Tuan, N. (1999). Induced breeding on *Pangasius bocourti* Sauvage, 1880. Research institute for aquaculture No. 2 (RIA.2). Vietnam.

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., 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.

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.

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, Lousiana, 264-275.

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 . 54: 1395–1408.

Yao, Z., Richardson, G.F. and Crim, L.W. (1999). A diluent for prolonged motility of ocean pout (*Macrozoarces americanus* L.) sperm. Aquaculture. 174: 183-193.

ภาคผนวก ก

ตารางผนวกที่ 1 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extenders ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

1.1 เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (DMSO)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7247.932	9	805.326	12.987	.000
Within Groups	4960.917	80	62.011		
Total	12208.849	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05			
		1	2	3	4
Tr.3	9	36.6078			
Tr.7	9	39.6678	39.6678		
Tr.1	9	40.5033	40.5033		
Tr.9	9	40.6989	40.6989		
Tr.2	9	43.1944	43.1944		
Tr.6	9	43.4311	43.4311		
Tr.8	9		45.6700		
Tr.4	9			54.7278	
Tr.5	9			60.5256	60.5256
control	9				64.0322
Sig.		.112	.163	.122	.348

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

1.2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (DMSO)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	23790.000	9	2643.333	28.009	.000
Within Groups	7550.000	80	94.375		
Total	31340.000	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05		
		1	2	3
Tr.3	9	35.0000		
Tr.6	9	35.0000		
Tr.9	9	35.0000		
Tr.2	9	36.6667		
Tr.1	9	40.0000		
Tr.8	9	40.0000		
Tr.7	9	41.6667		
Tr.4	9		53.3333	
Tr.5	9		56.6667	
control	9			90.0000
Sig.		.217	.469	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

1.3 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (DMSO)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12812.338	9	1423.593	101.130	.000
Within Groups	1126.145	80	14.077		
Total	13938.482	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05				
		1	2	3	4	5
Tr.3	9	30.5167				
Tr.1	9	30.5856				
Tr.8	9	32.8144	32.8144			
Tr.2	9	33.2667	33.2667			
Tr.6	9	33.5611	33.5611			
Tr.9	9	34.1011	34.1011			
Tr.7	9		34.7567			
Tr.4	9			47.4578		
Tr.5	9				51.1233	
control	9					69.4200
Sig.		.079	.337	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

1.4 เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (DMA)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4329.746	9	481.083	15.037	.000
Within Groups	2559.503	80	31.994		
Total	6889.249	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05				
		1	2	3	4	5
Tr.13	9	36.5111				
Tr.19	9	38.9589	38.9589			
Tr.11	9	39.4500	39.4500			
Tr.12	9	41.7856	41.7856	41.7856		
Tr.16	9	42.0222	42.0222	42.0222		
Tr.14	9		44.5722	44.5722		
Tr.17	9			45.6867	45.6867	
Tr.18	9			46.7178	46.7178	
Tr.15	9				50.8789	
control	9					61.8700
Sig.		.068	.063	.103	.068	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

1.5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (DMA)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	24710.000	9	2745.556	50.493	.000
Within Groups	4350.000	80	54.375		
Total	29060.000	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05		
		1	2	3
Tr.13	9	31.6667		
Tr.11	9	33.3333		
Tr.19	9	33.3333		
Tr.12	9	35.0000		
Tr.16	9	35.0000		
Tr.17	9	36.6667		
Tr.18	9	36.6667		
Tr.14	9		45.0000	
Tr.15	9		46.6667	
control	9			90.0000
Sig.		.223	.633	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

1.6 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (DMA)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	12026.802	9	1336.311	96.287	.000
Within Groups	1110.270	80	13.878		
Total	13137.071	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05					
		1	2	3	4	5	6
Tr.19	9	26.8611					
Tr.11	9	28.5522	28.5522				
Tr.12	9	29.2411	29.2411				
Tr.13	9	29.6933	29.6933				
Tr.16	9		31.3789	31.3789			
Tr.18	9		32.4033	32.4033			
Tr.17	9			33.6500			
Tr.14	9				39.4544		
Tr.15	9					45.5167	
control	9						67.1622
Sig.		.146	.052	.227	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

1.7 เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (MeOH)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	3476.138	9	386.238	71.753	.000
Within Groups	430.627	80	5.383		
Total	3906.765	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05					
		1	2	3	4	5	6
Tr.29	9	35.6956					
Tr.23	9	37.3544	37.3544				
Tr.22	9		39.4456				
Tr.21	9			42.0978			
Tr.26	9			42.2056			
Tr.24	9			42.6511			
Tr.25	9			42.9622	42.9622		
Tr.28	9				44.9900		
Tr.27	9					47.4800	
control	9						59.2633
Sig.		.133	.059	.479	.067	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

1.8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (MeOH)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	27162.500	9	3018.056	45.989	.000
Within Groups	5250.000	80	65.625		
Total	32412.500	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05			
		1	2	3	4
Tr.23	9	28.3333			
Tr.29	9	28.3333			
Tr.21	9	31.6667	31.6667		
Tr.22	9	33.3333	33.3333		
Tr.26	9	33.3333	33.3333		
Tr.24	9	35.0000	35.0000		
Tr.25	9		40.0000		
Tr.28	9		40.0000		
Tr.27	9			48.3333	
control	9				90.0000
Sig.		.132	.058	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

1.9 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (MeOH)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10359.907	9	1151.101	100.450	.000
Within Groups	916.755	80	11.459		
Total	11276.663	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05			
		1	2	3	4
Tr.23	9	30.1433			
Tr.21	9	30.6656			
Tr.26	9	30.7944			
Tr.22	9	31.4856			
Tr.29	9	31.9422			
Tr.24	9	33.5411	33.5411		
Tr.25	9	33.5856	33.5856		
Tr.28	9		35.4144		
Tr.27	9			45.0000	
control	9				66.6544
Sig.		.065	.273	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

1.10 เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (Glycerol)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	4504.866	9	500.541	211.978	.000
Within Groups	188.903	80	2.361		
Total	4693.769	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05					
		1	2	3	4	5	6
Tr.36	9	31.4844					
Tr.38	9		33.4033				
Tr.39	9		33.9289				
Tr.31	9		34.3200				
Tr.37	9			37.0967			
Tr.35	9			37.5256			
Tr.34	9			38.3633			
Tr.33	9				40.5867		
Tr.32	9					42.1856	
control	9						57.6400
Sig.		1.000	.238	.102	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

1.11 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (Glycerol)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	28860.000	9	3206.667	41.713	.000
Within Groups	6150.000	80	76.875		
Total	35010.000	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05				
		1	2	3	4	5
Tr.38	9	26.6667				
Tr.39	9	26.6667				
Tr.36	9	28.3333	28.3333			
Tr.37	9	28.3333	28.3333			
Tr.34	9	35.0000	35.0000	35.0000		
Tr.35	9	35.0000	35.0000	35.0000		
Tr.31	9		36.6667	36.6667	36.6667	
Tr.33	9			38.3333	38.3333	
Tr.32	9				45.0000	
control	9					90.0000
Sig.		.080	.075	.470	.059	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

1.12 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต (Glycerol)

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	10834.630	9	1203.848	120.111	.000
Within Groups	801.824	80	10.023		
Total	11636.453	89			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05					
		1	2	3	4	5	6
Tr.36	9	27.9878					
Tr.38	9	29.1122	29.1122				
Tr.39	9	29.9956	29.9956	29.9956			
Tr.31	9	30.8500	30.8500	30.8500			
Tr.37	9		31.4689	31.4689			
Tr.35	9		31.7400	31.7400			
Tr.34	9			32.8711			
Tr.33	9				36.3000		
Tr.32	9					39.9744	
control	9						67.0800
Sig.		.083	.121	.089	1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 9.000.

ตารางผนวกที่ 2 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure (6, 8 และ 10 องศาเซลเซียสต่อนาที) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

2.1 เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	5588.604	12	465.717	13.980	.000
Within Groups	6062.859	182	33.312		
Total	11651.463	194			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05						
		1	2	3	4	5	6	7
Tr.12	15	35.1793						
Tr.4	15	35.9307	35.9307					
Tr.8	15	36.4713	36.4713	36.4713				
Tr.3	15		40.2807	40.2807	40.2807			
Tr.7	15		40.3887	40.3887	40.3887			
Tr.11	15			40.7280	40.7280			
Tr.10	15				42.0693			
Tr.6	15				42.3753			
Tr.2	15				42.8620	42.8620		
Tr.5	15					46.8673	46.8673	
Tr.1	15					47.1827	47.1827	
Tr.9	15						47.4553	
control	15							55.1920
Sig.		.568	.052	.064	.294	.052	.795	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

2.2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	44836.154	12	3736.346	41.138	.000
Within Groups	16530.000	182	90.824		
Total	61366.154	194			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05					
		1	2	3	4	5	6
Tr.12	15	29.0000					
Tr.4	15	32.0000	32.0000				
Tr.8	15	33.0000	33.0000	33.0000			
Tr.3	15	35.0000	35.0000	35.0000	35.0000		
Tr.7	15	36.0000	36.0000	36.0000	36.0000		
Tr.11	15		37.0000	37.0000	37.0000		
Tr.2	15		38.0000	38.0000	38.0000		
Tr.6	15			40.0000	40.0000		
Tr.10	15				42.0000		
Tr.1	15					49.0000	
Tr.5	15					51.0000	
Tr.9	15					52.0000	
control	15						90.0000
Sig.		.073	.135	.079	.079	.421	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size =15.000.

2.3 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	9816.004	12	818.000	46.267	.000
Within Groups	3217.787	182	17.680		
Total	13033.790	194			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05				
		1	2	3	4	5
Tr.4	15	35.9747				
Tr.12	15	36.1327				
Tr.8	15	36.2320				
Tr.11	15		40.7093			
Tr.3	15		40.9740			
Tr.7	15		41.2080			
Tr.2	15			44.9673		
Tr.10	15			45.2407		
Tr.6	15			45.5773		
Tr.5	15				49.0307	
Tr.1	15				49.2333	
Tr.9	15				49.4140	
control	15					62.8513
Sig.		.876	.762	.711	.816	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

ตารางผนวกที่ 3 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step freezing procedure, Two-steps freezing procedure และ Three-steps freezing procedure โดยใช้สาร 10% DMSO ร่วมกับ C-F HBSS ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเผาะโดยวิธีการแช่แข็ง

3.1 เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	837.286	3	279.095	8.769	.000
Within Groups	1782.338	56	31.827		
Total	2619.624	59			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05		
		1	2	3
Tr.3	15	46.8033		
Tr.2	15	46.9693		
Tr.1	15		51.6280	
control	15			55.8440
Sig.		.936	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

3.2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	16901.250	3	5633.750	72.030	.000
Within Groups	4380.000	56	78.214		
Total	21281.250	59			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05		
		1	2	3
Tr.3	15	48.0000		
Tr.2	15	52.0000	52.0000	
Tr.1	15		55.0000	
control	15			90.0000
Sig.		.221	.357	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

a. Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

3.3 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิต

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	1676.066	3	558.689	48.670	.000
Within Groups	642.824	56	11.479		
Total	2318.890	59			

เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan't test ที่ระดับนัยสำคัญที่ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

Duncan[a]

Treatment	N	Subset for alpha=.05		
		1	2	3
Tr.3	15	49.3607		
Tr.2	15	49.4753		
Tr.1	15		53.5227	
control	15			62.3620
Sig.		.926	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed.

Uses Harmonic Mean Sample Size = 15.000.

ประวัตินักวิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

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

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Samorn Ponchunchoovong

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3 9201 00947 090

2. ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. สถานที่ติดต่อ:

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อำเภอเมือง จ.นครราชสีมา 30000

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

4. 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

5. สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา):

- Cryopreservation of fish sperm
- Aquaculture (seed production)

6. ประสบการณ์วิจัย:

7.1 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว และได้รับการตีพิมพ์ ดังเอกสารแนบ (โดยเป็นหัวหน้าโครงการทั้ง 3 เรื่อง)

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

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

สมร พรชื่นชูวงศ์. 2547. รายงานการวิจัย การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีการแช่เย็น 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 ear catfish, *Pangasius larnaudii*, (Bocourt) sperm. Aquaculture Research. 37: 955-957.

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

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

Ponchunchoovong, S. 2007. Effect of equilibration times on the fertilization rate of cryopreserved striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) sperm. First international conference on sustainable animal agriculture in developing coutries. 27-29 September, Guanda Hotel, Kunming, China. P. 341-344.

Kwantong, S. and Bart, A. N. 2009. Fertilization efficiency of cryopreserved sperm from striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage). Aquaculture Research, 40: 292-297.

สมร พรชื่นชูวงศ์ และ สุพรรณ ขันน้ำเที่ยง. 2552. ผลของ combination cryoprotectants และอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพโดยวิธีการแช่เย็ง. ประชุมวิชาการประมงครั้งที่ 4 "เพื่อความมั่นคงด้านการประมงและทรัพยากรทางน้ำ" 8-10 ธันวาคม 2552 ณ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่.

Dokpong, D., S. Ponchunchoovong, U. Amsin, U. Piasoongnoen & S. Singhae. 2009. The effect of freezing Rates on the cryopreservation of Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* (Sauvage, 1878) sperm. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 268-270.

Ponchunchoovong, S. & S. Kannumteing. Effects of freezing rates on the cryopreservation of black Eared catfish, *P. larnaudii* spermatozoa. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 271- 273.

Kainin, S., S. Ponchunchoovong, U. Imsin, U. Piasoongnoen & S. Singhae. Successful hybridization of *Pangasius* species using cryopreserved sperm. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 274-275.

Boonanuntanasarn, S., K. sukoim, T. Changmunwai, S. Ponchunchoovong & Y. Manakasem. Effect of *Butea superba* on masculinization of Nile tilapia. Proceedings 2nd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 8-11 November, 2009. Kuala Lumpur, Malaysia. P. 250-251.

Nipon, S., R. Yahsiro, S. Tunkijjanukij and S. Ponchunchoovong. 2009. Preservation of Humpback Grouper, *Cromileptes altivelis* (Valenciennes, 1828) Spermatozoa. Kasetsart University Fisheries research Bulletin Vol. 33(2): May, 2009. p. 12-23.

7.2 งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ มี 1 เรื่อง

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

(เป็นผู้หัวหน้าโครงงานวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 70%)

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ: (ภาษาไทย) นายอรรณพ อิ่มศิลป์

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Unnop Imsilp

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน:

3. ตำแหน่งปัจจุบัน: หัวหน้าสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม (นักวิชาการประมง 7 ว.)

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสกลนคร

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง

4. สถานที่ติดต่อ:

สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม

ตำบลหนองญาติ อำเภอเมือง จ.นครพนม 48000

Tel: (042) 513734, (042) 515601

Fax: (042) 513734, (042) 515601

E-mail: unnop2627@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา:

Degree	**Institution**	**Year**	**Country**
B.Sc. (Fisheries)	Kasetsart University	1989	Thailand
M.Sc. (Aquaculture)	Kasetsart University	2000	Thailand

6. สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา):

- การวิเคราะห์ต้นทุนการผลิต
- การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น

7. ประสบการณ์วิจัย:

7.1 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว มี 6 เรื่อง (โดยเป็นหัวหน้าโครงการ 3 เรื่อง และเป็นผู้ช่วย 3 เรื่อง) ซึ่ง ทั้ง 6 เรื่องได้รับการตีพิมพ์เรียบร้อยแล้ว และอีก 5 เรื่องอยู่ระหว่างการดำเนินการ (ดังเอกสารแนบ)

ทวี วิพุทธานุมาศ, อรรณพ อิ่มศิลป์ และ มาลัย อิ่มศิลป์. 2544. ระดับโปรตีนที่เหมาะสมในอาหารที่ใช้เลี้ยงปลาจาด. เอกสารวิชาการฉบับที่ 12/2544. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดเพชรบุรี, กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 17 หน้า.

อรรณพ อิ่มศิลป์, วิทยา ตินนังวัฒนะ และ มาลัย อิ่มศิลป์. 2545. การเพาะพันธุ์ปลาจาด. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 11/2545. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดเพชรบุรี, กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 31 หน้า.

อรรณพ อิ่มศิลป์, วิทยา ตินนังวัฒนะ และ วราภรณ์ สาลีติด. 2547. อาหารที่เหมาะสมในการอนุบาลลูก ปลาจาด.เอกสารวิชาการฉบับที่ 8/2547. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดเพชรบุรี, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 20 หน้า.

วิทยา ตินนังวัฒนะ, อรรณพ อิ่มศิลป์ และ วราภรณ์ สาลีติด. 2547. โปรตีนที่เหมาะสมในการเลี้ยงปลาอีกง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 48/2547. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดราชบุรี, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 15 หน้า.

เจริญ อุดมการ, อรรณพ อิ่มศิลป์, สมบัติ สิงห์สี, มาลัย อิ่มศิลป์ และ พิน พลไชย. 2547. การเพาะพันธุ์ปลานวลจันทร์. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 1/2547. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 21 หน้า.

Imsilp, U., S. Singsee, P. Polchai, T. Assonjohn and N. Sukumasavin. 2005. Mobile hatchery: a new tool for fisheries extension. Proceedings of the 6th Technical Symposium on Mekong Fisheries,26-28 November, 2003. MRC Conference Series No. 5. Mekong River Commission, Vientiane. pp. 79-82.

7.2 งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ มี 5 เรื่อง

1. การศึกษาวิธีการลำเลียงกบนา. (เป็นผู้ร่วมวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 20%)
2. การใช้กากถั่วเหลืองทดแทนปลาป่นในอาหารกบนา (เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบ 70%)
3. ผลของความหนาแน่นที่มีต่อการเจริญเติบโตของปลาจาดที่เลี้ยงในกระชัง (เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบ 80%)

4. ผลของฮอร์โมนต่างชนิดต่อการวางไข่ของปลายอนหลังเขียว (เป็นผู้ร่วมวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 25%)

5. ผลของความหนาแน่นที่มีต่อการเจริญเติบโตของปลาโมงที่เลี้ยงในกระชัง.ในแม่น้ำโขง (เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบ 75%)

ประวัติผู้ร่วมวิจัย

1. ชื่อ นายสมบัติ สิงห์สี

MR. Sombut Singsee

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน:

3. ตำแหน่งปัจจุบัน: นักวิชาการประมง 6 ว.

4. สถานที่ติดต่อ:

สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม ตำบลหนองญาติ อำเภอเมือง จ.นครพนม 48000

Tel: (042) 513734, (042) 515601

Fax: (042) 513734, (042) 515601

E-mail: singsee@yahoo.com

5. ประวัติการศึกษา

ปีที่จบการศึกษา	ปริญญา	อักษรย่อปริญญาและชื่อเต็ม	สาขาวิชา	วิชาเอก	ชื่อสถาบันการศึกษา	ประเทศ
2537	ปริญญาตรี	ทษบ. เทคโนโลยีการเกษตร	สัตวศาสตร์	ประมงน้ำจืด	มหาวิทยาลัยแม่โจ้	ไทย
2549	ปริญญาโท	วทม. การประมง	การประมง	การประมง	มหาวิทยาลัยขอนแก่น	ไทย

7. ประสบการณ์วิจัย:

7.1 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว มี 5 เรื่อง

สมบัติ สิงห์สี และ เจริญ อุดมการ. 2547. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยวิธีฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์เร่งให้วางไข่ตามธรรมชาติ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 19/2547. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 11 หน้า.

เจริญ อุดมการ และ สมบัติ สิงห์สี. 2547. ผลของฮอร์โมนและต่อมใต้สมองต่อการตกไข่ปลาโมง. เอกสาร วิชาการ ฉบับที่ 25/2547. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 14 หน้า.

สุจิตรา สหัสนฤภัยพงษ์, สมบัติ สิงห์สี, พิน พลไชย และ มาลัย อิ่มศิลป์. 2547. ผลของฮอร์โมนชนิดต่างๆ ต่อการ ตกไข่ ของปลาสายยู. เอกสารวิชาการฉบับที่ 59/2547. กลุ่มวิชาการ, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 14 หน้า.

เจริญ อุดมการ, อรรณพ อิ่มศิลป์, สมบัติ สิงห์สี, มาลัย อิ่มศิลป์ และ พิน พลไชย. 2547. การเพาะพันธุ์ปลานวลจันทร์. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 1/2547. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 21 หน้า.

Imsilp, U., S. Singsee, P. Polchai, T. Assonjohn and N. Sukumasavin. 2005. Mobile hatchery: a new tool for fisheries extension. Proceedings of the 6th Technical Symposium on Mekong Fisheries,26-28 November, 2003. MRC Conference Series No. 5. Mekong River Commission, Vientiane. pp. 79-82.

7.2 งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

1. ผลของฮอร์โมนต่างชนิดต่อการวางไข่ของปลายอนหลังเขียว (ผู้ร่วมวิจัย 5%)