รหัสโครงการ SUT3-303-50-24-13

รายงานการวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดและการศึกษาอัตราส่วนระหว่างสเปิร์มและไข่ที่เหมาะสม ของการใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง

(Preservation of Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* sperm and a study on the suitable sperm: egg ratio of fresh or cryopreserved sperm)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-303-50-24-13

รายงานการวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดและการศึกษาอัตราส่วนระหว่างสเปิร์มและไข่ที่เหมาะสม ของการใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง

(Preservation of Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* sperm and a study on the suitable sperm: egg ratio of fresh or cryopreserved sperm)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. นายอรรณพ อิ่มศิลป์

2. นายสมบัติ สิงห์สี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2550-2551

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2550-2551 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการวิจัย ขอขอบคุณ คุณอรรณพ อิ่มศิลป์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดหนองคาย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และสัตว์ทดลอง คุณสมบัติ สิงห์สี หัวหน้าสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม คุณอุไรวรรณ เปียสูงเนิน นักวิชาการประมงสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม คุณสุขสันต์ ปิยะนันท์ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ประจำสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนมทุก ๆ ท่าน ที่ได้มีส่วนช่วยให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2554

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทคัดย่อ

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดได้ทำการศึกษาทั้งการเก็บรักษาแบบระยะสั้นและการเก็บรักษาแบบระยะยาว แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 การทดลอง โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้ (1.1) ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด (1.2) ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาว ได้แบ่งออกเป็น 2 การทดลองย่อยดังนี้ (2.1) ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง (2.2) ผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง และการทดลองที่ 3 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

การศึกษาผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น (การทดลองที่ 1.1) โดยใช้สาร extender 10 ชนิด (Kurokura medium-KU, modified cortland solution-MC, Calcium-Free Hanks' balanced salt solution-C-F HBSS, modified fish ringer's solution-MFR, 0.9% NaCl, Hanks' balanced salt solution-HBSS, sperm motility inhibiting saline medium-SM, Immobilizing Saad solution-Saad, 350 mM glucose and Immobilizing solution-IM) ทำการเจือจางน้ำเชื้อในสาร extender แต่ละชนิด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นทำการทดสอบผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง พบว่าการเก็บที่ระยะเวลา 6-24 ชั่วโมง การใช้สาร extender ทั้ง 10 ชนิด ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ($P>0.05$) ยกเว้นการใช้ Saad และ SM ที่ระยะเวลาการเก็บ 12 และ 24 ชั่วโมง มีอัตราการมีชีวิตต่ำกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ และเมื่อทำการเก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นที่ 48-96 ชั่วโมง พบว่าการใช้ MC และ IM ยังมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 50% และสูงกว่าสาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อนำสาร extender ทั้ง 10 ชนิด มาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ ณ เวลา 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้สาร extender 3 ชนิด (HBSS, MC และ KU) ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) จากนั้นนำสาร extender ทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าว (HBSS, MC และ KU) มาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ ณ เวลาการเก็บที่ 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้ HBSS ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงสุด 28.39±3.44% (55% ของน้ำเชื้อสด) จากนั้นนำสาร extender ที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลอง

ที่ 1.1 (HBSS) มาศึกษาอัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่างๆ คือ 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 (การทดลองที่ 1.2) ที่ระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่าง ๆ (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15) ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ และให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (undiluted sperm, P>0.05) ที่ระยะเวลาการเก็บเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) และพบว่าเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง และเพิ่มอัตราการเจือจางเป็น 1: 10 และ 1: 15ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 และ 1: 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

การศึกษาผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง (การทดลองที่ 2.1) โดยใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, glycerol and methanol-MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% และใช้ HBSS เป็นสาร extender พบว่าการใช้ 5% glycerol มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด 64.97±1.82% (74% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) จากนั้นเลือกสาร cryoprotectant ที่ให้ผลดีที่สุด คือ 5% glycerol และ HBSS มาทำการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง (การทดลองที่ 2.2) โดยใช้วิธีอัตราการลดอุณหภูมิ 3 แบบ (One-step, Two-steps และ Three-steps) พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step และ Two-steps มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการมีชีวิตสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

การศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิทั้งในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด (การทดลองที่ 3) ในน้ำเชื้อสดพบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 1×10^{6}: 1 และ1.5×10^{6}: 1 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ (P<0.05) ส่วนในน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ที่อัตราส่วน 1.30×10^{6}:1, 1.95×10^{6}: 1 และ 2.60×10^{6}: 1 ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน (P>0.05) แต่เมื่อมีการเพิ่มหรือลดจำนวน sperm: egg ratio ทั้งในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง มีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ABSTRACT

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

The effects of ten extenders (Kurokura medium-KU, modified cortland solution-MC, Calcium-Free Hanks' balanced salt solution-C-F HBSS, modified fish ringer's solution-MFR, 0.9% NaCl, Hanks' balanced salt solution-HBSS, sperm motility inhibiting saline medium-SM, Immobilizing Saad solution-Saad, 350 mM glucose and Immobilizing solution-IM) on the short term storage of *C. microlepis* sperm were investigated. Sperm samples were diluted with each extender and stored for 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 and 120 h at 4°C, motility and viability rates were assessed. Ten of the extenders used did not affect motility and viability rates after storage for 6-24 h ($P>0.05$), except Saad and SM diluents in which viability rates were significantly lower than other extenders after storage for 12 and 24 h. With increasing storage time from 48 to 96 h, the sperm diluted with MC and IM retained motility rate more than 50%, and was significantly higher than the other extenders ($P<0.05$). After storage for 48 h, the effects of ten extenders on the fertilization rate were investigated. Three extenders (HBSS, MC and KU) did not affect the fertilization rates of *C. microlepis* sperm and produced no significant difference from the control ($P>0.05$). These three extenders (KU, MC and HBSS) were used to investigate the fertilization rate, at 72 h of storage. The highest fertilization rate 28.39±3.44% (55% of control) resulted from HBSS diluent. The best extender from the experiment 1.1 (HBSS) was used to evaluate the effects of four dilution ratios (sperm: extender) at 1:3, 1:5, 1:10 and 1:15 and times storage at 0, 48 and 72 h. At the beginning of the time storage (0 h), dilution ratios among 1:3, 1:5, 1:10 and 1:15 did not affect the percentages of fertilization, viability and motility. These results were not significantly different from the control treatment (undiluted sperm, $P>0.05$). Increasing dilution ratios up to 1:10 and 1:15 resulted in lower fertilization, viability and motility rates than those of 1:3 and 1:5 ratios ($P<0.05$), when stored for 48 h.

The effects of four cryoprotectants (dimethyl sulfoxide-DMSO, dimethyl acetamide-DMA, glycerol and methanol-MeOH) at three concentrations (5, 10 and 15%) on the cryopreservation of *C. microlepis* sperm were investigated. HBSS diluent was used as an extender. The highest fertilization rate 64.97±1.82% (74% of control) was achieved with 5% glycerol. This had a significantly higher result than the other treatments ($P<0.05$). Since the combination of 5% glycerol and HBSS yielded the best fertilization percentage, it was chosen to investigate the effect of three freezing procedures (one-step, two-steps and three-steps) on the cryopreservation of *C. microlepis* sperm. The percentage of fertilization and viability of frozen sperm resulting from one-step and two-step freezing procedures yielded a higher rate of fertilization and viability than that of the three-step freezing procedures ($P<0.05$).

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญภาพ	ฏ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์ในการวิจัย	3
1.2 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	9
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	10
3.2 สารเคมี	11
3.3 วิธีการศึกษา	12
3.3.1 การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์	12
3.3.2 การศึกษาส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด	14
3.3.3 การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ	14
1.3.3.1 ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ	14
1.3.3.2 การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)	15
1.3.3.3 การศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility)	15
1.3.3.4 การศึกษาการมีชีวิตของอสุจิ (viability)	16
1.3.3.5 การศึกษาการปฏิสนธิ (fertilization)	17
3.3.4 ขั้นตอนและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา	19
1) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น	19
1.1) ศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น	19

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

1.2) ศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 23

2) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาวหรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง 25

2.1) ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 25

2.2) ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 28

3) ศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ 30

3.1) ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด 30

3.2) ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด 31

บทที่ 4 ผลการศึกษา 34

4.1 ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด 33

4.2 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 34

4.2.1 ผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 34

4.2.2 ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 40

4.3 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง 42

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสม สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 42

4.3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 44

4.4 จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ 45

4.4.1 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด 45

4.4.2 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด 46

บทที่ 5 อภิปรายผล 48

5.1 ผลของชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 47

5.2 ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 49

5.3 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง 51

5.3.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 51

5.3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 52

5.4 จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ 53

5.4.1 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด 53

5.4.2 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด 55

บทที่ 6 สรุป และข้อเสนอแนะ 56

6.1 สรุป 56

6.2 ข้อเสนอแนะ 56

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก ก. ตารางแสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์	65
ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย	79

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	หลักเกณฑ์การสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ	16
ตารางที่ 2	ส่วนประกอบของสีย้อม eosin-nigrosin	16
ตารางที่ 3	ส่วนประกอบทางเคมีของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด	20
ตารางที่ 4	แผนการทดลองการศึกษาชนิดของสาร extender 10 ชนิด (KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น โดยทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง	21
ตารางที่ 5	แผนการทดลองการศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ (0, 48 และ 72 ชั่วโมง) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นโดยมี HBSS เป็นสาร extender	24
ตารางที่ 6	แผนการทดลองการศึกษาชนิดของสาร cryoprotectant 4 ชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (5, 10 และ 15%) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ HBSS เป็นสาร extender	27
ตารางที่ 7	แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing rate โดยใช้ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง	29
ตารางที่ 8	แผนการทดลองการศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด	30
ตารางที่ 9	แผนการทดลองการศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด	31
ตารางที่ 10	ปริมาตร ความเข้มข้น ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด	33
ตารางที่ 11	ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (mean±S.E.) ต่อการเก็บที่ระยะเวลาต่าง ๆ	35
ตารางที่ 12	ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการมีชีวิต (mean±S.E.) ต่อการเก็บที่ระยะเวลาต่าง ๆ	36

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดที่อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่าง ๆ (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15) 41

ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดในสาร extender (HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% 43

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	การฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของอสุจิ และการพัฒนาของไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืด	13
ภาพที่ 2	การรีดน้ำเชื้อ (ก) การรีดไข่ (ข)	14
ภาพที่ 3	สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (hemacytometer) (ก) ภาพแสดงตำแหน่งที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1, 2, 3, 4 และ 5) (ข)	15
ภาพที่ 4	อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตัวตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี eosin-nigrosin ส่องภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า	17
ภาพที่ 5	ขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร และระบบการฟักไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืด	18
ภาพที่ 6	การพัฒนาของคัพภะปลานวลจันทร์น้ำจืดระยะ gastrula stage (8 ชั่วโมง)	19
ภาพที่ 7	กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น	22
ภาพที่ 8	กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง	26
ภาพที่ 9	ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งโดยใช้ freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis Version 4	28
ภาพที่ 10	ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ (6-120 ชั่วโมง)	38
ภาพที่ 11	อัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ทำการเก็บรักษาด้วยสาร extender 10 ชนิด ที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง	39
ภาพที่ 12	อัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ทำการเก็บรักษาด้วยสาร extender 3 ชนิด ที่ระยะเวลาการเก็บ 72 ชั่วโมง	40
ภาพที่ 13	ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ	44
ภาพที่ 14	ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ต่ออัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืด	45
ภาพที่ 15	ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ต่ออัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อแช่แข็งปลานวลจันทร์น้ำจืด	46

บทที่ 1
บทนำ

ปลานวลจันทร์น้ำจืด หรือปลาพอน (*Cirrhinus microlepis*) Sauvage เป็นปลาพื้นเมืองของไทย ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน มีรูปร่างเพรียวยาวลำตัวค่อนข้างกลม ปากเล็ก เกล็ดเล็ก สีของลำตัวมีตั้งแต่สีส้มปนเทา จนถึงสีน้ำตาลปนสีขาวเงิน ท้องสีขาว ครีบหลังและครีบหางสีน้ำตาลปนเทา ปลายครีบสีชมพู เดิมพบมากตามแม่น้ำเจ้าพระยาตั้งแต่จังหวัดอยุธยาขึ้นไปถึงจังหวัดนครสวรรค์ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบมากในแม่น้ำโขง (กรมประมง, 2530) แต่ในปัจจุบันปลานวลจันทร์น้ำจืดในธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลง (Rainboth, 1996) เนื่องจากถิ่นที่อยู่อาศัยถูกทำลาย และสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรม จากการขยายตัวของชุมชน และพื้นที่การเกษตรที่ก่อมลพิษสู่แหล่งน้ำ รวมถึงการทำประมงเกินขนาด และการจับปลาในฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งในปัจจุบันจากฐานข้อมูลชนิดพันธุ์ที่ถูกคุมคามในประเทศไทย (Red Data of Thailand, 2005) ของสำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ได้จัดให้ปลานวลจันทร์น้ำจืดอยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ ต่อมามีหลายหน่วยงานที่เห็นความสำคัญของสถานการณ์ดังกล่าวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง จากรายงานของสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม มีการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืดจากแม่น้ำโขงในเขตจังหวัดนครพนมและจังหวัดมุกดาหาร มาทำการทดลองเลี้ยงในบ่อดิน และพบว่าปลาชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดี สามารถเลี้ยงเพื่อบริโภคได้ จึงทำการศึกษาเพาะพันธุ์เพื่อผลิตปลาชนิดนี้ปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติเป็นการฟื้นฟูพันธุ์สัตว์น้ำให้คงมีอยู่ต่อไปและสามารถส่งเสริมอาชีพให้แก่เกษตรกรได้ โดยจากการศึกษาพบว่าฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa) ที่อัตราความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม มีความเหมาะสมต่อการกระตุ้นการตกไข่ของแม่ปลานวลจันทร์น้ำจืด (เจริญ อุดมการ อรรณพ อิ่มศิลป์ สมบัติ สิงห์สี มาลัย อิ่มศิลป์ และ พิน พลไชย, 2547) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศผู้ มีปริมาตรน้ำเชื้อน้อย โดยมีปริมาตรน้ำเชื้อประมาณ 0.2-0.4 มิลลิลิตร/ตัว แต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อถึง $1.65\pm0.25\times10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร (ดวงจันทร์ ดอกพอง, 2553) จากสาเหตุดังกล่าวจึงเป็นอุปสรรคสำหรับการเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้ ด้วยเหตุนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดจึงน่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยในการแก้ปัญหาดังกล่าว ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อมีวิธีการเก็บ 2 วิธี คือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้น จะใช้สาร extender ในการเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาตร เป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิเพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม อีกทั้งสาร extender ยังช่วยยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ ให้กับตัวอสุจิโดยการเลือกชนิดของสาร extender นั้น ควรมีค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกับ seminal plasma ของน้ำเชื้อปลาที่ทำการศึกษาโดยทั่วไปค่าออสโมลาลิตี้ที่เหมาะสมในปลากลุ่ม carp จะอยู่ในช่วง

ระหว่าง 254-346 mOsmol/kg (Alavi and Cosson, 2006) หากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำ (hypotonic) จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ซึ่งสารละลายที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำกว่า 200 mOsmol/kg จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในปลากลุ่ม carp และต่อมาเซลล์อสุจิจะหยุดการเคลื่อนไหว และเซลล์อาจแตกหรือถูกทำลายเนื่องจากเซลล์บวม (Alavi and Cosson, 2005) และสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตี้สูง (hypertonic) ทำให้เซลล์มีการสูญเสียน้ำเกิดสภาวะเซลล์เหี่ยว ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุทำให้โครงสร้างของ phospholipids bilayer และเซลล์เมมเบรนของตัวอสุจิถูกทำลาย (Jenking-Keeran and Woods, 2002) ทำให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้ สำหรับผลของ pH พบว่าหากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มี pH ต่ำ จะทำให้อสุจิมีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น และมีการผลิตกรดแลกติกส่งผลให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ลดลง และหากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มี pH สูง จะส่งผลให้อสุจิมีอัตราเมแทบอลิซึมสูงขึ้น ดังนั้นการเลือกสาร extender ให้มีค่า pH และออสโมลาลิตี้ ที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็นสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น เพราะสาร extender นอกจากสามารถยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ให้กับตัวอสุจิแล้ว ยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อได้อีกด้วย จึงน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาและประยุกต์ใช้กับปลานวลจันทร์น้ำจืด ซึ่งพบว่ามีปริมาตรน้ำเชื้อน้อย แต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อสูง จึงได้มีการศึกษาอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ ให้สามารถนำไปผสมเทียมกับไข่ได้ง่ายขึ้น และในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาวหรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยดำรงพันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืด เพราะเป็นวิธีที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดไว้ได้นานเป็นระยะเวลาหลายปีโดยการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) ซึ่งอาศัยการทำงานของสาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant โดยสาร cryoprotectant มีหน้าที่ป้องกันอันตรายของเซลล์ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย นอกจากนี้อัตราการลดอุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่จะทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาวประสบความสำเร็จ เนื่องจากการลดอุณหภูมิช้าหรือเร็วเกินไปก็จะทำให้เกิดอันตรายต่อตัวอสุจิได้ หากมีการลดอุณหภูมิช้าเกินไปก็จะทำให้มีการสูญเสียน้ำจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ในปริมาณที่มาก ส่งผลให้เกิดภาวะเซลล์เหี่ยว และอาจทำให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายภายในเซลล์สูงเกินไป เมื่อตัวอสุจิสัมผัสอยู่กับสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงเป็นเวลานานก็จะทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์อสุจิได้ และหากมีการลดอุณหภูมิเร็วเกินไปจะทำให้น้ำภายในเซลล์เคลื่อนที่ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้น้อย ส่งผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์และออแกเนลล์ถูกผลึกน้ำแข็งทิ่มแทงได้ (Yang, Carmichael, Varga and Tiersch, 2007) และนอกจากนี้เพื่อให้เกิดการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุด จึงควรทราบอัตราส่วนน้ำเชื้อปลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผสมกับไข่ (sperm: egg ratio) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อไข่ที่มากเกินไปส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง เนื่องจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้อสุจิไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Silveira,

Foresti, Silveira and Senhorini, 2006; Rurangwa et al., 1998; Tambassen-Cheong, Tan-Fermin, Garcia and Baldevarona, 1995; Rosenthal, Klumpp and Willfuhr, 1998) ในทางตรงกันข้ามพบว่าปริมาณน้ำเชื้อที่ไม่เพียงพอก็ส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเช่นเดียวกัน (Linhart, Rodina, Kocour and Gela, 2006; Rurangwa et al., 1998; Silveira et al., 2006; Bart, Wolfe and Dunham, 1998) อย่างไรก็ตามที่ผ่านมายังมีการศึกษาเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นน้อยมาก และพบว่ายังไม่มีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว รวมทั้งยังไม่มีการศึกษาในเรื่องของอัตราส่วนน้ำเชื้อปลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผสมกับไข่ (sperm: egg ratio)

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

1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาชนิดของสาร extender และอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง (แบบระยะยาว)

1.2.3 เพื่อศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) สำหรับการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งของปลานวลจันทร์น้ำจืด

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบชนิดของสาร extender ทราบอัตราการเจือจางของ sperm: extender และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น ทราบชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง อีกทั้งทราบถึงอัตราส่วน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งของปลานวลจันทร์น้ำจืด เพื่อให้มีการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่

อย่างจำกัดของปลานวลจันทร์น้ำจืดให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งประโยชน์จากการศึกษาดังกล่าวนี้เพื่อนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิต ส่งเสริมการเลี้ยงให้กับเกษตรกร ตลอดจนการอนุรักษ์พันธุ์ปลาต่อไป จัดเป็นองค์ความรู้ใหม่ และเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป เพราะยังไม่มีการศึกษาและวิจัยการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืดมาก่อน และสามารถพัฒนาเทคนิคและวิธีการที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในกลุ่มเดียวกันที่มีปัญหาคล้ายคลึงกัน

สำหรับหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ สถาบันการศึกษาต่าง ๆ กรมประมง สถานีประมง ผู้ประกอบการธุรกิจสัตว์น้ำ ตลอดจนหน่วยงานของรัฐและเอกชนที่สนใจ

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลานวลจันทร์น้ำจืด หรือปลาพอน, *Cirrhinus microlepis* Sauvage มีชื่อสามัญ คือ Small scale mud carp เป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน มีรูปร่างเพรียวยาวลำตัวค่อนข้างกลม ปากเล็ก สีของลำตัวมีตั้งแต่สีส้มปนเทาจนถึงสีน้ำตาลปนสีขาวเงิน ท้องสีขาว ครีบหลังและครีบหางสีน้ำตาลปนเทา ปลายครีบสีชมพู ปลานวลจันทร์น้ำจืดเดิมพบมากตามแม่น้ำใหญ่ เช่น แม่น้ำเจ้าพระยาตั้งแต่จังหวัดอยุธยาขึ้นไปถึงจังหวัดนครสวรรค์ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบมากในแม่น้ำโขง (กรมประมง, 2530) ต่อมามีการขยายตัวของชุมชน และพื้นที่การเกษตรที่ก่อมลพิษสู่แหล่งน้ำ อีกทั้งวิธีการจับปลาที่ผิดกฎหมายทำให้ทรัพยากรสัตว์น้ำจืดมีจำนวนลดลงมาก และจากการศึกษาพบว่าประชากรของปลานวลจันทร์น้ำจืดในแต่ละแหล่งมีจำนวนลดลงมาก (Rainboth, 1996) ซึ่งต่อมา เจริญ อุดมการ และคณะ (2547) จึงได้มีการศึกษาการเพาะพันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืด และพบว่าฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa) ที่อัตราความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม มีความเหมาะสมต่อการกระตุ้นการตกไข่ของแม่ปลานวลจันทร์น้ำจืด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศผู้มีน้ำเชื้อน้อย จึงเป็นอุปสรรคสำหรับการเพาะพันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืด

ด้วยเหตุนี้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นและแบบระยะยาว น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งสำหรับการแก้ปัญหาในปลาชนิดนี้ โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นนั้นจำเป็นต้องคัดเลือกสาร extender ให้เหมาะสมสำหรับเจือจางน้ำเชื้อ ก่อนการเก็บรักษาเพื่อไม่ให้น้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป และยังเป็นการเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้ออีกด้วย อีกทั้งมีบทบาทในการยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ และลดการใช้พลังงานของตัวอสุจิ ซึ่งสาร extender ควรมีค่าออสโมลาริตี้ใกล้เคียงกับเลือด หรือ seminal plasma ของน้ำเชื้อปลา เช่น 280-300 mOsm Kg^{-1} สำหรับปลาน้ำจืด และ 200-300 mOsm Kg^{-1} สำหรับปลาทะเล (Wayman and Tiersch, 2000)

ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะยาวมีปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง เก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196°C สาร cryoprotectant เป็นสารป้องกันเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง ซึ่งสาร cryoprotectant แต่ละชนิดจะต้องมีความเข้มข้นและระยะเวลา (equilibration time) ที่เหมาะสม เพื่อที่จะออกฤทธิ์และป้องกันเซลล์ถูกทำลาย (Rana, 1995 และ Akcay, Bozkurt, Secer and Tekin, 2004) สาร cryoprotectant หลายชนิด เช่น DMSO, DMA, MeOH และ glycerol ได้มีการใช้และให้ผลดีในปลาหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานว่า DMSO เป็นสารที่นิยมใช้กันแพร่หลายในปลาหลายชนิด แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิประมาณ 50% (Horvath and Urbanyi, 2000; Urbanyi et al., 1999; Chereguini,

Banda, Rasines and Fermandez, 2001 and Kwantong and Bart, 2003) และพบว่าสาร cryoprotectant ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Wayman and Tiersch, 2000) อย่างไรก็ตามสารต่าง ๆ เหล่านี้ยังมีการศึกษากันน้อยมากในกลุ่มปลา Carp Babiak, Glogowski, Brzuska, Szumiec and Adamk (1997) พบว่าสาร DMA (10%) เป็นสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเท่ากับ 27.5±2.5% และ 72.9±0.8% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามในปลาชนิดเดียวกันนี้ Lahnsteiner, Berger, Horvath, Urbanyi and Weismann (2000) และ Linhart, Rodina and Cosson (2000) พบว่า 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectantที่ให้อัตราการเคลื่อนที่ 35.2±7.1% และ 78.0±18.0% ตามลำดับ

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมของสาร cryoprotectant และสาร extender เท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย (Mazur, 1977) ในระหว่างขบวนการแช่แข็งและการละลาย (thawing) จะมีการแพร่เข้า-ออก ของน้ำระหว่างเซลล์และตัวกลาง พบว่าถ้าลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ในระหว่างขบวนการแช่แข็งจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย ในทางกลับกันถ้ามีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเซลล์อาจจะมีการช๊อค (cold shock) (Lueng in Jamieson, 1991) ในขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน โดยใช้น้ำแข็งแห้ง (dry ice, อุณหภูมิ -79°C) พบอัตราการรอด (survival rate) สูงที่สุด 91% เมื่อใช้ Kurokura el al. extender +10% egg yolk และมี 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant (Babiak et al., 1997) นอกจากนี้ Linhart et al. (2000) พบว่าอัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไนไม่มีความแตกต่างกับน้ำเชื้อสด (52±9% และ 50±18% ตามลำดับ, $p>0.05$) เมื่อใช้การลดอุณหภูมิที่ two-step freezing rates โดยการลดอุณหภูมิ 4°C min^{-1} จาก 4°C ถึง -9°C และลดอุณหภูมิที่ 11 °C min^{-1} จาก -9°C ถึง -80°C นอกจากนี้ Akcay et al. (2004) พบว่าอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไนเพียง 26% เมื่อใช้การลดอุณหภูมิโดยการอังผ่านไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) นาน 10 นาที ก่อนจุ่มในไนโตรเจนเหลว -196°C จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าวิธีการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากลุ่ม Carp ยังมีความหลากหลายและผลที่ได้ก็แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการหาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงจำเป็นสำหรับปลากลุ่มนี้ โดยเฉพาะในปลานวลจันทร์น้ำจืดซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อน

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่นิยมทำกันมี 2 วิธี คือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้น (Short-term storage) เป็นการเก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 0°C เล็กน้อย โดยสารสำคัญที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น คือสาร extender ซึ่งเป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษาเพื่อไม่ให้น้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป อีกทั้งมีบทบาทในการลดการเคลื่อนที่และการใช้พลังงานของตัวอสุจิ และอีกวิธีหนึ่งคือการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาว (Long-term storage) ซึ่งต้องอาศัย

สาร extender สาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196°C

Hulata and Rothbard (1979) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบระยะสั้น โดยใช้ rinsing solution ซึ่งประกอบด้วย 0.3% Urea และ 0.4% NaCl เป็นสาร extender เก็บที่อุณหภูมิ 0 ถึง 4°C ได้นานถึง 45 ชั่วโมง โดยมีอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด และใช้สารเดียวกันนี้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทองพบว่าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 3 ถึง 5°C ได้นานถึง 30 วัน สำหรับในประเทศไทย อุทัยรัตน์ ณ นคร (2525) ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยเจือจางน้ำเชื้อต่อสาร extender 2 ชนิด คือ rinsing solution และ Ringer's solution ในอัตราส่วน 5: 3 (sperm: extender) พบว่า Ringer's solution เป็นสารละลายที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียน โดยเก็บได้นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C คือ ให้อัตราการปฏิสนธิเป็น 80.64 และ 38.68% เมื่อเก็บนาน 24 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ต่างกับน้ำเชื้อที่เก็บเจือจางใน rinsing solution โดยวิธีเดียวกันมีอัตราการปฏิสนธิเป็น 60.17 และ 3.71% เมื่อเก็บนาน 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ จากข้อมูลจะเห็นได้ว่าชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมนั้นนอกจากจะสามารถยืดเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นแล้ว ยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อได้อีกด้วย จึงน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาและประยุกต์ใช้กับปลานวลจันทร์ ซึ่งพบว่ามีน้ำเชื้อน้อย

นอกจากนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาในปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (Endangered species) หรือใช้ในโปรแกรมการผสมพันธุ์ปลา เช่น androgenesis (Thorgaard, Pual, Wheeler and Robert, 2000) และผลิตปลาข้ามสายพันธุ์ (Hybridize species) ได้ เช่น การใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของ blue catfish, *Ictalurus furcatus* ผสมกับไข่ของ Channel catfish, *Ictalurus punctatus* โดย Bart et al. (1998) นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน ลดพื้นที่การเลี้ยง broodstock สามารถขนส่งได้ง่ายเมื่อเทียบกับปลามีชีวิต (Piironen, 1993; Chereguini et al., 2001) และสามารถแก้ปัญหาสำหรับปลาที่ไข่และน้ำเชื้อสุกไม่พร้อมกันเช่นปลาเผาะหรือปลาโมง (*Pangasius bocourti*) อย่างไรก็ตามวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน และค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาจึงควรใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด ด้วยเหตุนี้จึงควรทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำเชื้อแช่แข็ง และน้ำเชื้อสดที่ใช้ผสมกับไข่หนึ่งใบ (sperm: egg ratio)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีการใช้ปริมาณน้ำเชื้อผสมกับไข่เกินความจำเป็น อีกทั้งการศึกษาอัตราส่วนของ sperm: egg ratio ที่เหมาะสมสำหรับปลาแต่ละชนิดมีน้อยมาก (Lahnsteiner and Patzner, 1996) ในปลาดุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*) Steyn and Vuren (1987) พบว่าการใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อแช่แข็ง 4.9×10^4 sperm: egg มีอัตราการฟักเป็นตัว 51% ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสดในปลาชนิดเดียวกันนี้ Viveiros, So and Komen (2000) พบอัตราการฟักเป็นตัว 58% ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด เมื่อใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อแช่แข็ง 1.13×10^4 sperm: egg แต่อย่างไรก็ตามใน blue catfish,

Ictalurus furcatus ต้องใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งถึง 13.3×10^{6} sperm: egg และให้อัตราการปฏิสนธิเพียง 54% ของน้ำเชื้อสด (Bart et al., 1998) สำหรับปลานิล, *Oreochromis* sp. Rana and McAndrew (1989) พบอัตราส่วนน้ำเชื้อแช่แข็ง 0.14×10^{6} sperm: egg เป็นสัดส่วนที่เหมาะสม นอกจากนี้พบว่าอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อไข่ที่มากเกินไปส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง เนื่องจากความหนืดของ sperm ที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้ไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Rurangwa et al., 1998; Tambassen et al., 1995; Gwo, 2000; Rosenthal et al. 1988) ในทางกลับกันพบว่าปริมาณน้ำเชื้อที่ไม่เพียงพอก็ส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเช่นเดียวกัน (Rurangwa et al., 1998; Bart et al., 1998) Kwantong (2003) ศึกษาผลของอัตรา dilution rate ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลาสวาย พบว่าอัตรา dilution rate ระหว่าง 1:1 ถึง 1:30 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ซึ่งอัตราการปฏิสนธิอยู่ระหว่าง 33-45% แต่เมื่อเพิ่มอัตรา dilution rate เป็น 1:100 ทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเพียง 17% เท่านั้น จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำเชื้อที่สูงเกินไปหรือน้อยไป จะมีผลต่อการลดอัตราการปฏิสนธิ อีกทั้งข้อมูลการศึกษาถึงประสิทธิภาพ อัตราส่วนน้ำเชื้อที่เหมาะสมต่อการผสมกับไข่มีน้อยมาก หรือไม่มีเลยสำหรับปลาในกลุ่ม Carp ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการศึกษา dilution rate ของสาร extender ที่เหมาะสม เพื่อใช้เจือจางน้ำเชื้อปลา และเพื่อให้เกิดการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุด และควรทราบอัตราส่วนน้ำเชื้อปลาที่ใช้ในการผสมกับไข่ตลอดจนการศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดนี้แบบแช่แข็งเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์และส่งเสริมการเลี้ยงสำหรับเกษตรกรต่อไป

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด (*Cirrhinus microlepis*) โดยวิธีการเก็บแบบระยะสั้นและแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง มีการดำเนินงานวิจัยทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการ ในส่วนของห้องปฏิบัติการใช้ห้องปฏิบัติการสรีรและกายวิภาคสัตว์ อาคารเครื่องมือ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และห้องปฏิบัติการของสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม สำหรับการศึกษาในภาคสนามนั้นใช้สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม เป็นสถานที่ในการดำเนินการวิจัย โดยการศึกษาครั้งนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

1.1 ศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

1.2 ศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ (time storage) ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

2.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

2.2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (feezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทั้งแบบระยะสั้นและระยะยาว มีการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ

การทดลองที่ 3 ศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

3.1 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

3.2 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

โดยใช้วัสดุอุปกรณ์หลัก สารเคมี พร้อมทั้งวิธีการศึกษาดังนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1) หลอดฉีดยาและเข็มฉีดยา
2) โกร่งบดฮอร์โมน
3) เปลใส่ปลา
4) ถุงพลาสติกขนาด 30×80 เซนติเมตร
5) ผ้าขนหนู
6) กะละมัง
7) ขวดพลาสติกขนาด 1.25 ลิตร
8) glass petri dish
9) ขนไก่
10) กระติกน้ำแข็ง
11) หลอดพลาสติกขนาด 5 มิลลิลิตร พร้อมฝาปิด
12) vortex mixer
13) Fiske Associates Osmometer รุ่น 210
14) ตู้เย็น
15) slides และ cover slips
16) ไม้จิ้มฟัน
17) micro pipettes ขนาด 10, 100, 200 และ 1000 ไมโครลิตร
18) small and large pipette tips
19) hemacytometer
20) หลอดแช่แข็ง (french straws) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร
21) forcept
22) ตะเกียงแอลกอฮอล์
23) beaker ขนาด 25, 50, 100 และ 250 มิลลิลิตร
24) graduated cylinders ขนาด 250 มิลลิลิตร
25) glass stirring rod
26) volumetric flask ขนาด 25 และ 250 มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

27) ขวดสีชา ขนาด 50 มิลลิลิตร

28) ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร

29) liquid nitrogen containers dewar 20 XT (Taylor-Wharton U.S.A.)

30) liquid nitrogen storage with dispenser

31) cryobath

32) cryochamber

33) cryocane

34) cryo gloves

35) freezer control (CL 3300)

36) compound microscope and stereo microscope

37) computer and software operating manual (cryogenesis version 4 for windows)

38) Hach pH Meter รุ่น EC10

39) universal high speed centrifuges รุ่น Z 323 K

3.2 สารเคมี

1) น้ำกลั่น
2) ไนโตรเจนเหลว
3) sodium chloride (NaCl)
4) potassium chloride (KCl)
5) calcium chloride dihydrate ($CaCl_2.2H_2O$)
6) sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_{3)}$
7) magnesium sulphate heptahydrate ($MgSO_4.7\ H_2O$)
8) disodium hydrogen phosphate heptahydrate ($Na_2HPO_4.7\ H_2O$)
9) potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)
10) sodium dihydrogen phosphate (NaH_2PO_4)
11) tris-Hydroxymethyl-Methylamine ($NH_2C(CH_2OH)_3$)
12) glucose ($C_6H_{12}O_6$)
13) dimethyl sulfoxide (DMSO, $(CH_3)_2SO$)
14) dimethyl acetamide (DMA, $CH_3C(O)N(CH_3)_2$)
15) glycerol ($C_3H_5(OH)_3$)
16) methanol (MeOH, CH_3OH)

17) luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRHa; Suprefact)

18) domperidone (Motilium M)

19) human chorionic gonadotropin (HCG)

20) eosin B

21) nigrosin

22) sodium citrate dihydrate

23) gilson solution

24) น้ำยาเช็ดเลนส์

25) น้ำยาเคลือบเล็บ

26) oil

3.3 วิธีการศึกษา

3.3.1 การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์

เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม ก่อนทำการทดลองต้องคัดพ่อแม่พันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืดที่สมบูรณ์เพศ และแข็งแรง จากบ่อดินมาพักไว้ในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 2 ลูกบาศก์เมตร โดยแยกเพศผู้ และเพศเมียเพื่อทำการฉีดฮอร์โมน โดยมีวิธีการตรวจสอบความสมบูรณ์เพศ และวิธีการฉีดฮอร์โมนของพ่อแม่พันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืดดังนี้

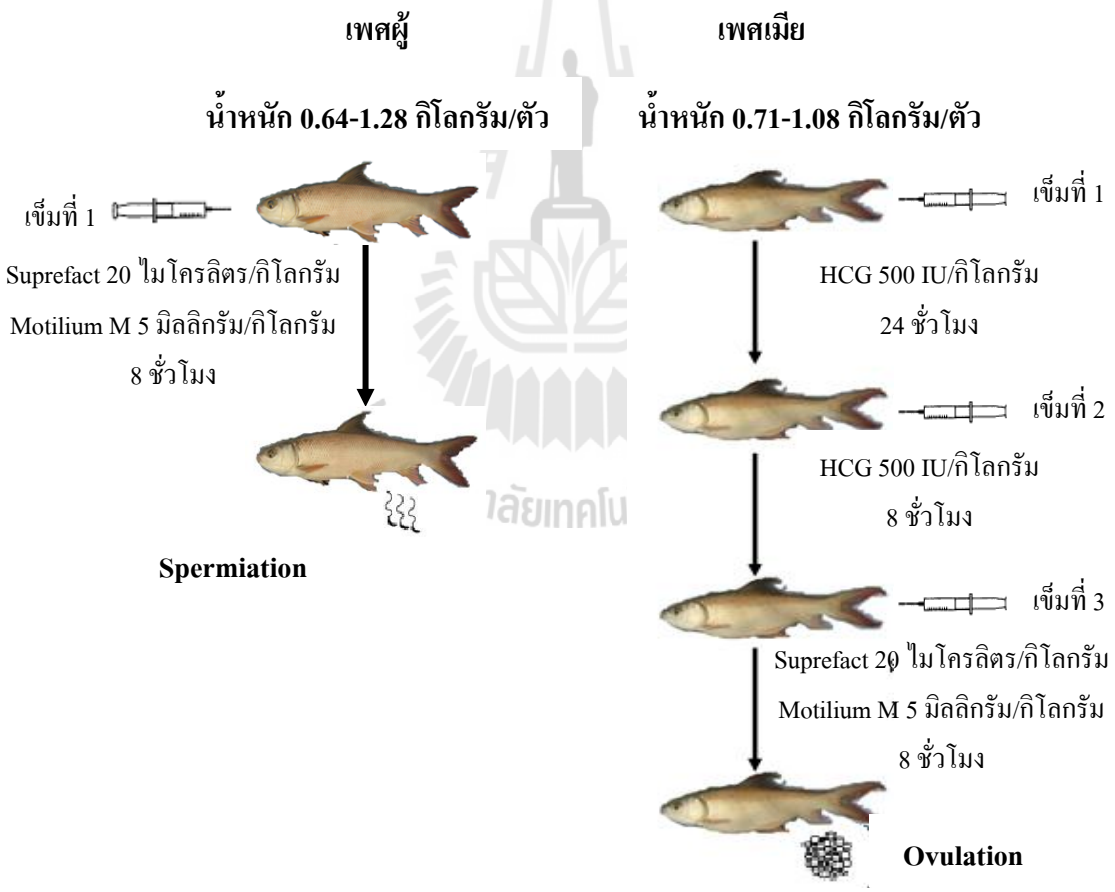
- ปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศผู้

ลักษณะส่วนท้องไม่นูน พื้นท้องจะแข็งกว่าเพศเมีย ช่องเพศมีลักษณะเป็นรูปวงรี แคบเล็กสีแดงอ่อน เมื่อใช้มือบีบที่ช่องเพศเบา ๆ จะมีน้ำเชื้อสีขาวไหลออกมาเห็นได้ชัดเจน นำพ่อพันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืดที่แข็งแรงสมบูรณ์เพศมาทำการฉีดฮอร์โมน โดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa, Suprefact) ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ domperidone (Motilium M) โดยใช้ Suprefact 20 ไมโครลิตร/กิโลกรัม ร่วมกับ Motilium M 5 มิลลิกรัม/กิโลกรัม หลังจากนั้น 6-8 ชั่วโมง ทำการรีดน้ำเชื้อ ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยใช้ micro pipettes ขนาด 1,000 ไมโครลิตร ดูดน้ำเชื้อ (ภาพที่ 2, ก) ก่อนทำการรีดน้ำเชื้อควรใช้ผ้าขนหนูสะอาดเช็ดตัวปลาให้แห้ง และใช้กระดาษทิชชู่ซับบริเวณติ่งเพศ (urogenital pore) เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ เลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ น้ำเชื้อที่นำมาทำการเก็บรักษาจะต้องไม่ปนเปื้อนจากสิ่งดังกล่าว และมีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป

- ปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศเมีย

ลักษณะส่วนท้องอูมเป่ง กลม นูนออกมาเห็นได้ชัด พื้นท้องนิ่มมาก ลักษณะช่องเพศเป็นรูปวงรี กว้างและใหญ่กว่าเพศผู้ นอกจากการสังเกตภายนอกแล้ว ยังต้องมีการสุ่มตัวอย่าง และวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไข่ด้วยเวอร์เนียมิเตอร์ โดยใช้ flexible catheter ดูดไข่ออกมาใส่ในขวดที่มี

น้ำยา gillson เพื่อเป็นการ fix ไข่ จากนั้นนำมาวัดขนาดไข่ ถ้าพบว่าไข่มีขนาดค่อนข้างสม่ำเสมอและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของไข่ประมาณ 1.4 มิลลิเมตร จึงนำมาฉีดฮอร์โมนเร่งการตกไข่ โดยใช้ human chorionic gonadotropin (HCG) ฉีด HCG 2 เข็ม เข็มละ 500 IU/กิโลกรัม โดยเข็มที่ 2 ห่างจากเข็มแรก 24 ชั่วโมง หลังจากฉีดเข็มที่ 2 แล้ว 8 ชั่วโมง ฉีด Suprefact 20 ไมโครลิตร/กิโลกรัม ร่วมกับ Motilium M 5 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หลังจากนั้น 8 ชั่วโมง ทำการรีดไข่ดังแสดงในภาพที่ 1 ก่อนทำการรีดไข่ควรใช้ผ้าขนหนูที่สะอาดทำความสะอาดตัวปลา และใช้กระดาษทิชชู่ซับบริเวณติ่งเพศ แล้วใช้ภาชนะที่แห้ง และสะอาดรองรับไข่ (ภาพที่ 2, ข) เพื่อนำไปทดสอบอัตราการปฏิสนธิ โดยไข่ที่นำมาใช้ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิจะต้องไม่มีการปนเปื้อนจากน้ำ เลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ ซึ่งไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืดควรมีลักษณะกลม มีขนาดที่สม่ำเสมอกัน มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.6 มิลลิเมตร สีเขียวอมเทา หรือสีเหลืองอำพัน และไข่ไม่เกาะกันเป็นก้อน



ภาพที่ 1 การฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของอสุจิ และการพัฒนาของไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืด

(ก)

(ข)

ภาพที่ 2 การรีดน้ำเชื้อ (ก) การรีดไข่ (ข)

3.3.2 การศึกษาส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

3.3.3 การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ โดยศึกษาจากลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

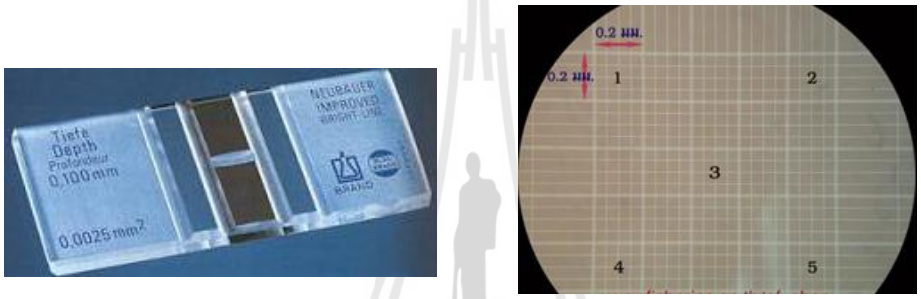
3.3.3.1 ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

ควรสังเกตทันทีหลังจากรีดน้ำเชื้อออกมา โดยดูสี ความเข้มข้น และสิ่งเจือปน เช่น น้ำ เลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่น ๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น และไม่มีสิ่งเจือปน

3.3.3.2 การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)

การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อหาได้โดยเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยสาร extender (0.9% NaCl) ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสาร extender เท่ากับ 1: 1,500 เท่า ขณะที่ทำการดูดน้ำเชื้อควรใช้กระดาษทิชชู่ซับน้ำเชื้อส่วนเกินที่ติดมากับ pipette tips จากนั้นนับจำนวนอสุจิ โดยใช้สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (hemocytometer) ภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 40 เท่า นับจำนวนอสุจิจากมุมบน-ล่าง ทั้ง 4 มุม และช่องตรงกลาง รวม 5 ช่อง ดังแสดงในภาพที่ 3 แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตร ดังนี้

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



(ก) (ข)

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

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

3.3.3.3 การศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility)

นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเพื่อดูอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ การศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิทำได้โดยการหยดน้ำกลั่น 1 หยด (5 ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ และหยดน้ำเชื้อ 1 ไมโครลิตร จากนั้นใช้ไม้จิ้มฟันเขี่ยน้ำมาแตะกับน้ำเชื้อเพียงเล็กน้อย แล้วสังเกตการเคลื่อนที่ภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 10 เท่า โดยมีเกณฑ์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์การสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

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

ดัดแปลงจาก: Guest (1973)

3.3.3.4 การศึกษาการมีชีวิตของอสุจิ (viability)

การศึกษาการมีชีวิตของอสุจิทำได้โดยวิธีการย้อมสี eosin-nigrosin ซึ่งส่วนประกอบสีย้อมแสดงในตารางที่ 2 และมีวิธีการเตรียมสีย้อมดังนี้

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสีย้อม eosin-nigrosin

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

ที่มา: Hambananda (1996)

วิธีการเตรียมสีย้อมสำหรับดูตัวเป็นตัวตายสามารถเตรียมได้ดังนี้

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

ขั้นตอนการศึกษาอัตราการมีชีวิตมีขั้นตอนดังนี้

- หยดสี eosin-nigrosin ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) แล้วหยดน้ำเชื้อลงข้าง ๆ สีย้อมประมาณ 1 ไมโครลิตร

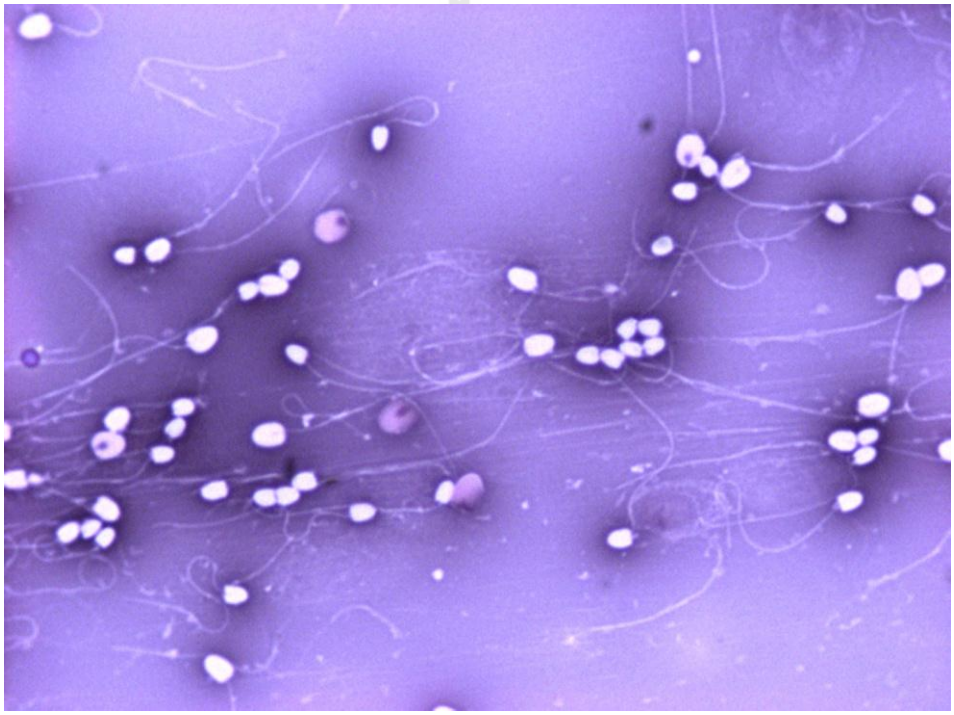
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- ใช้เข็มเขี่ยคนน้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากันจากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบาง ๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว

- นำแผ่นสไลด์ที่เกลี่ยแล้ว ผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง

- หยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยดแล้วปิดด้วย cover slips จากนั้นนำไปส่องดูภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า

- นับจำนวนอสุจิตัวเป็นและตัวตายโดยการสุ่มนับ 5 บริเวณ ๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่อสุจิตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาวไม่ติดสีย้อม ส่วนอสุจิตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม ดังแสดงในภาพที่ 4



ภาพที่ 4 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตัวตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin-nigrosin ส่องภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า

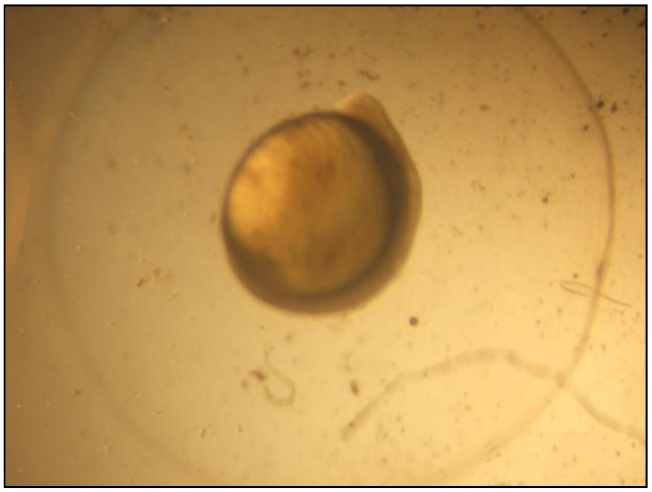
3.3.3.5 การศึกษาการปฏิสนธิ (fertilization)

การศึกษาการปฏิสนธิเป็นการทดสอบความสามารถของอสุจิในการผสมกับไข่โดยการนำแม่ปลานวลจันทร์น้ำจืดมารีดไข่ หลังจากการฉีดฮอร์โมนเข็มที่ 3 แล้ว 8 ชั่วโมง ซึ่งลักษณะไข่ปลาที่ดีจะมีสีเขียว หรือสีเหลืองอำพัน ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.6 มิลลิเมตร ใช้ไมโครปิ

เปตดูดไข่ 200 ไมโครลิตร (มีไข่จำนวน 129±6.69 ฟอง) ใส่จานแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 เซนติเมตรดูดน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อที่ทำการเก็บรักษาทั้งแบบระยะสั้นและแบบระยะยาว (ตามรายละเอียดในแต่ละการทดลอง) มีจำนวนอสุจิหรือ Insemination dose เท่ากัน คือ 1.29×10^{8} ตัว ลงไปผสมกับไข่ ใช้ขนไก่คนไข่ และน้ำเชื้อให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำเพาะฟักลงไป 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 5 นาทีแล้วใช้ขนไก่เขี่ยไข่จากจานแก้วใส่ลงในขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร ที่มีการไหลเวียนของน้ำตลอดเวลาขณะทำการเพาะฟัก ดังแสดงในภาพที่ 5 หลังจากนั้น 8 ชั่วโมง ทำการตรวจนับการปฏิสนธิที่ระยะ gastrula stage ดังแสดงในภาพที่ 6 และคำนวณหาอัตราการปฏิสนธิตามสมการดังนี้

$$\text{การปฏิสนธิ (\%)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่เจริญถึงระยะ gastrula stage}\times100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}}$$

ภาพที่ 5 ขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร และระบบการฟักไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืด



ภาพที่ 6 การพัฒนาของคัพภะปลานวลจันทร์น้ำจืดระยะ gastrula stage (8 ชั่วโมง)

3.3.4 ขั้นตอนและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ

1. ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

1.1 ศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

1) ทำการเตรียมสาร extender 10 ชนิด ได้แก่ Kurokura medium (KU), Modified Cortland solution (MC), Calcium-Free Hanks' balanced salt solution (C-F HBSS), Modified fish Ringer' s solution (MFR), 0.9% NaCl, Hanks' balanced salt solution (HBSS), Sperm motility inhibiting saline medium (SM), Immobilizing Saad solution (Saad), glucose (350 mM) และ Immobilizing solution (IM) ตามส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3 วัดค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH หลังจากนั้นนำสาร extender ที่เตรียมแล้วใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4°C

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

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบทางเคมีของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

สารเคมี (mM)	สาร extender									
	KU	**MC**	**C-F HBSS**	**MFR**	**0.9% NaCl**	**HBSS**	**SM**	**Saad**	**glucose (350 mM)**	**IM**
NaCl	128.4	112.07	153.28	129.31	155.17	137.93	75.00	200.00	-	200.00
KCl	2.70	40.54	5.95	13.51	-	5.41	70.00	-	-	-
$CaCl_2.2H_2O$	1.40	2.06	-	1.46	-	1.10	2.00	-	-	-
$NaHCO_3$	2.40	2.38	4.64	-	-	4.17	-	-	-	2.38
$MgSO_4.7\ H_2O$	-	-	0.89	1.92	-	0.81	1.00	-	-	-
$Na_2HPO_4.\ 7\ H_2O$	-	-	0.49	-	-	0.45	-	-	-	-
KH_2PO_4	-	-	0.52	-	-	0.44	-	-	-	-
Glucose	-	-	6.17	5.56	-	5.56	-	-	350.00	-
NaH_2PO_4	-	-	-	3.42	-	-	-	-	-	-
Tris-Hydro*	-	-	-	-	-	-	20.00	30.00	30.00	-
pH	8.11±0.1	8.00±0.04	7.84±0.04	5.25±0.04	6.88±0.2	8.00±0.02	9.90±0.04	9.63±0.1	8.54±0.1	8.55±0.04
Osmolality	250.33±1.5	285.33±0.6	308.33±0.6	280.67±1.5	286.00±1	280.33±0.6	291.67±1.5	397.00±2	403.67±0.6	369.00±1

หมายเหตุ: * Tris-Hydroxymethyl-Methylamine ($NH_2C(CH_2OH)_3$), KU; Kurokura medium, MC; Modified Cortland solution, C-F HBSS; Calcium-Free Hanks' balanced salt solution, MFR; Modified fish Ringer's solution, HBSS; Hanks' balanced salt solution, SM; Sperm motility inhibiting saline medium, Saad; Immobilizing Saad solution, IM; Immobilizing solution

ตารางที่ 4 แผนการทดลองผลของสาร extender 10 ชนิด (KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น โดยทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง

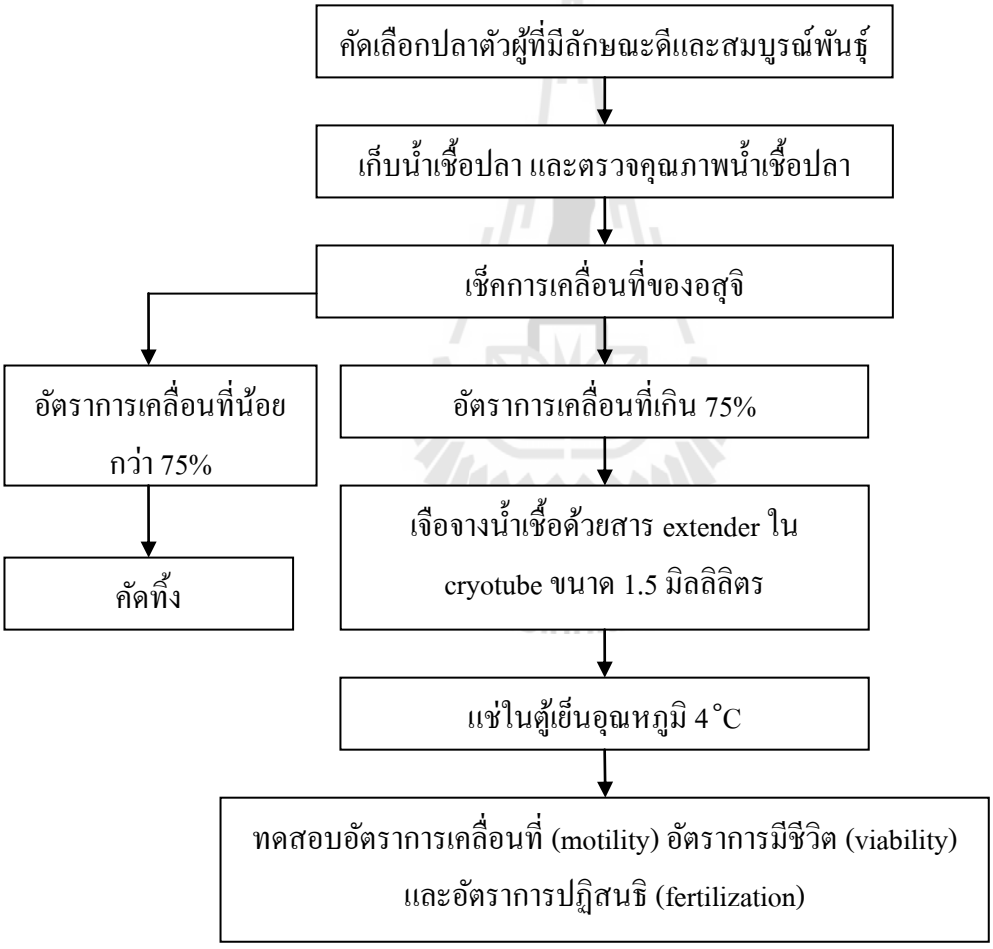
กลุ่มการทดลอง	สาร extender	การเคลื่อนที่ (%)											การมีชีวิต (%)										
		ระยะเวลาการเก็บ (ชั่วโมง)											ระยะเวลาการเก็บ (ชั่วโมง)										
		6	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	6	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
1	KU																						
2	MC																						
3	C-F HBSS												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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

4) นำสาร extender ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม หลังจากการเก็บ 48 ชั่วโมง ซึ่งได้แก่ KU, MC และ HBSS มาทำการทดสอบการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ 72 ชั่วโมง ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ มีการใช้น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) และน้ำเชื้อที่เจือจางกับสาร extender แต่ละชนิด มีจำนวนอสุจิ หรือ Insemination dose เท่ากัน คือ 1.29×10^{8} ตัว โดยขั้นตอนและขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นแสดงในแผนภาพที่ 7



ภาพที่ 7 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

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

1.2 ศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

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

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

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

ตารางที่ 5 แผนการทดลองการศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บ (0, 48 และ 72 ชั่วโมง) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นโดยมี HBSS เป็นสาร extender

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาอัตราการเจือจางของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการจัด treatment แบบ 4×3 factorial คือ สี่อัตราส่วน sperm: egg (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15) และ 3 ระยะเวลาการเก็บที่ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง โดยใช้น้ำเชื้อสดที่ไม่ได้เจือจางเป็นตัวควบคุม และแต่ละกลุ่มทดลองมีจำนวน 9 ซ้ำ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS

2. ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

2.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

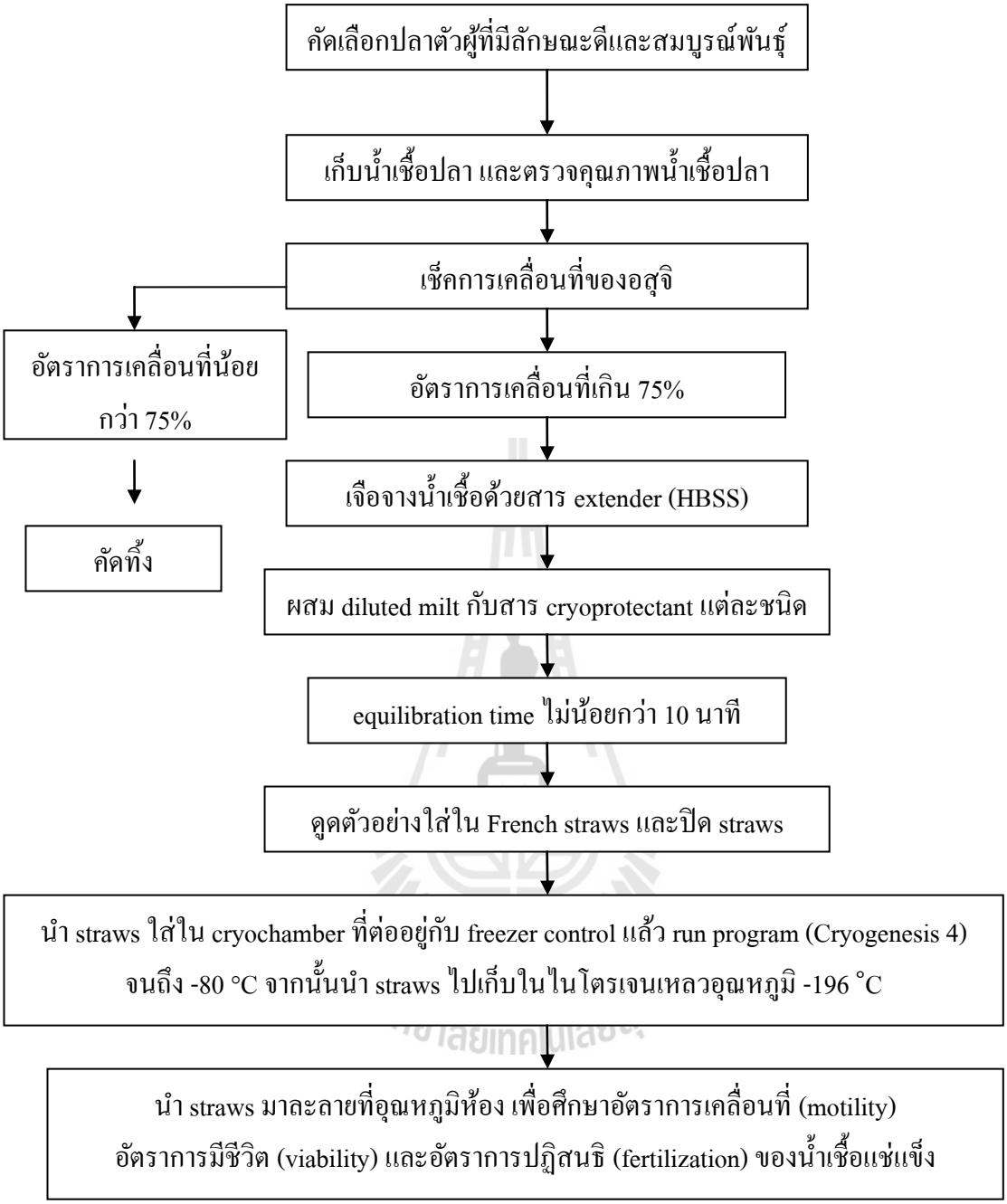
เลือกสาร extender ที่ให้ผลดีที่สุด (HBSS) จากการทดลองที่ 1 มาทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง ในครั้งนี้ทำการศึกษาใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMA), glycerol และ Methanol (MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

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

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

3) นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไป มาเจือจางด้วยสาร extender ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender 1: 3 ผสมให้เข้ากัน หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMSO, DMA, glycerol หรือ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% โดยใช้สัดส่วน 1: 3 โดยมีขั้นตอนและขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็งแสดงในแผนภาพที่ 8 และแผนการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6

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

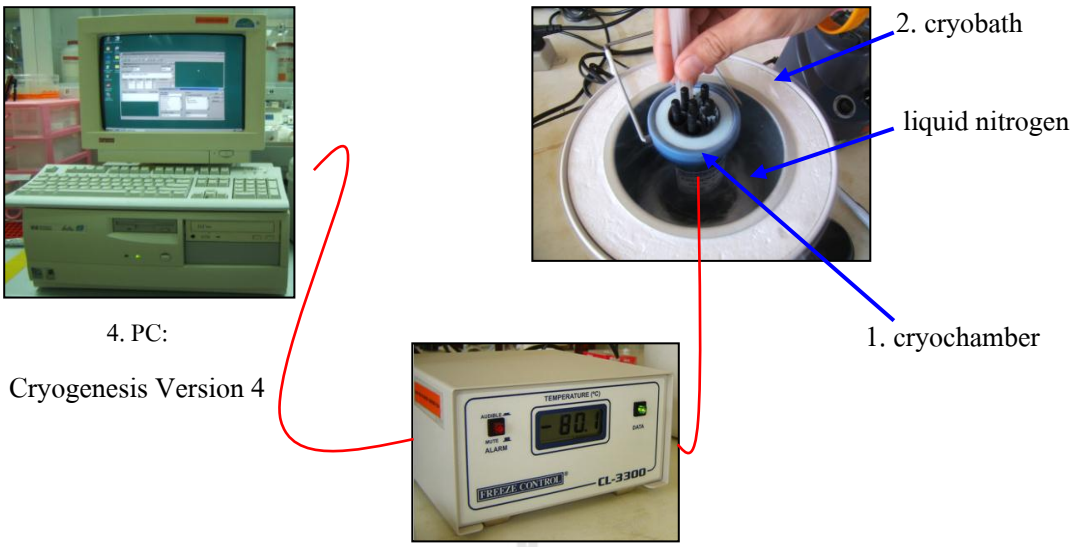


ภาพที่ 8 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

ตารางที่ 6 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร cryoprotectant 4 ชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (5, 10 และ 15%) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ HBSS เป็นสาร extender

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

5) การเตรียม freezer control และคอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ โดยเติมไนโตรเจนเหลว (LN_2) ลงใน cryobath ให้สูงประมาณ 15 เซนติเมตร จากนั้นใส่ cryochamber ลงใน cryobath แล้วปิดฝา โดยที่ cryochamber ต่อกับ freezer control (CL 3300) และ freezer control ต่อกับคอมพิวเตอร์อีกทีเพื่อควบคุมการทำงานของ freezer control จากนั้นเลือกอัตราการลดอุณหภูมิ 10 °C min^{-1} โดยทำการลดอุณหภูมิจาก 20°C ถึง -80 °C โดยใช้เมนู execute จากโปรแกรม Cryogenesis 4 นำตัวอย่างน้ำเชื้อที่ดูดใส่ straws ใส่ลงใน cryochamber ปิดฝา แล้วทำการ run program จากนั้นรอให้คอมพิวเตอร์ และ freezer control ทำงานจนอุณหภูมิที่ freezer control ถึง -80 °C (ภาพที่ 9) จึงนำ straws ออกจาก cryochamber เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ มีการใช้น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) และน้ำเชื้อแช่แข็งมีจำนวนอสุจิ หรือ Insemination dose เท่ากัน คือ 1.29×10^{8} ตัว



ภาพที่ 9 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้ freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis Version 4

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

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

2.2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

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

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

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

3) นำ straws ใส่ลงใน cryochamber ปิดฝา เลือกอัตราการลดอุณหภูมิที่ต้องการศึกษาทั้ง 3 แบบ ได้แก่ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing rate ดังแสดงในแผนการทดลองตารางที่ 7 จากนั้น run program จนอุณหภูมิที่ freezer control ถึง $-80^{\circ}C$ จึงนำ straws ออกจาก cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ $-196^{\circ}C$ จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปทดสอบหาอัตราการปฏิสนธิ อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิต่อไป ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ มีการใช้น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) และน้ำเชื้อแช่แข็งมีจำนวนอสุจิ หรือ Insemination dose เท่ากัน คือ 1.29×10^{8} ตัว โดยทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ 16 ซ้ำต่อทรีทเมนต์

ตารางที่ 7 แผนการทดลองผลของอัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing rate โดยใช้ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

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

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ 3 แบบ ได้แก่ One-step, Two-steps และ Three-steps freezing rate และใช้น้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม ซึ่งในแต่ละทรีทเมนต์ได้ทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต 6 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ ส่วนอัตราการปฏิสนธิได้ทำการทดสอบ 16 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS

3. ศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

3.1 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

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

ตารางที่ 8 แผนการทดลองการศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด มีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ทำการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อสด 7 อัตราส่วน ได้แก่ 0.5×10^{6}: 1, 1×10^{6}: 1, 1.5×10^{6}: 1, 0.5×10^{7}: 1, 0.75×10^{7}: 1, 1×10^{7}: 1 และ 0.25×10^{8}: 1 และแต่ละกลุ่มทดลองมีจำนวน 6 ซ้ำ ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการปฏิสนธิไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างทรีทเมนต์ด้วยวิธี Duncan's test ที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$ โดยใช้โปรแกรม SPSS

3.2 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

การศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยใช้ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS และอัตราการลดอุณหภูมิ One-step freezing rate ($10^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $20^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$) มาทำการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 5 อัตราส่วน ได้แก่ 1.3×10^{6}: 1, 1.95×10^{6}: 1, 2.6×10^{6}: 1, 3.25×10^{6}: 1 และ 3.9×10^{6}: 1 และใช้น้ำเชื้อสด 1.00×10^{6}: 1 เป็นกลุ่มควบคุม ดังแสดงในแผนการทดลองตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แผนการทดลองการศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

ขั้นตอนการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบแช่แข็ง มีดังนี้

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

2) ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายน้ำเชื้อในข้อ 1 ใส่หลอดแช่แข็ง (French straws ขนาด 250 ไมโครลิตร) ตามจำนวน Insemination dose หรือจำนวนอสุจิ ดังแสดงในตารางที่ 9 แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ forcept ลนไฟจนร้อนแล้วหนีบปากหลอดแช่แข็ง

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

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

จากการศึกษาพบว่าปลานวลจันทร์น้ำจืดมีปริมาตรน้ำเชื้อประมาณ 0.2-0.4 มิลลิลิตร/ตัว โดยมีความเข้มข้นของน้ำเชื้อ $1.65\pm0.25\times10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) 7.15±0.07 มีค่าออสโมลาลิตี้ (osmolality) 255.00±0.89 mOsmol/kg และในน้ำเชื้อมีส่วนประกอบของไอออนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โซเดียม (Na^+), โพแทสเซียม (K^+), แคลเซียม (Ca^{2+}), แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และคลอไรด์ (Cl^-) ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ปริมาตร ความเข้มข้น ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

Parameter	*N*	Minimum	Maximum	Mean	S.D.
ความยาวปลาเพศผู้ (เซ็นติเมตร)	127	40.00	70.00	46.88	5.49
น้ำหนักปลาเพศผู้ (กิโลกรัม)	127	0.60	2.00	0.96	0.32
ปริมาตรน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)	7	0.20	0.4	0.30	0.10
ความเข้มข้นน้ำเชื้อ ($\times10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร)	7	1.30	1.98	1.65	0.25
คุณลักษณะของ seminal plasma					
โซเดียม (mM)	3	71.00	73.00	72.33	1.15
คลอไรด์ (mM)	3	96.00	100.00	97.67	2.08
โพแทสเซียม (mM)	3	31.00	35.50	33.80	2.44
แคลเซียม (mM)	3	0.48	0.63	0.54	0.08
แมกนีเซียม (mM)	3	0.53	0.66	0.60	0.06
osmolality (mOsmol/kg)	6	254	256	255	0.89
pH	6	7.09	7.26	7.15	0.07

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

4.2.1 ผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นด้วยสาร extender 10 ชนิด ได้แก่ Kurokura medium (KU), Modified Cortland solution (MC), Calcium-Free Hanks' balanced salt solution (C-F HBSS), Modified fish Ringer's solution (MFR), 0.9% NaCl, Hanks' balanced salt solution (HBSS), Sperm motility inhibiting saline medium (SM), Immobilizing Saad solution (Saad), glucose (350 mM) และ Immobilizing solution (IM) หลังจากทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ ณ ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง พบว่าการเก็บที่ระยะเวลา 6-24 ชั่วโมง เมื่อใช้สาร extender ทั้ง 10 ชนิด มีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และเมื่อทำการเก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นที่ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ KU, MC, C-F HBSS, HBSS และ IM ยังมีอัตราการเคลื่อนที่ 100% และเมื่อทำการเก็บที่ระยะเวลา 72-96 ชั่วโมง พบว่าการใช้ MC และ IM มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, ตารางที่ 11)

สำหรับผลของอัตราการมีชีวิตพบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 24 และ 48 ชั่วโมง การใช้ KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, glucose (350 mM) และ IM มีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และเมื่อทำการเก็บผ่านไปถึง 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้สาร extender แต่ละชนิดมีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ยกเว้นการใช้ Saad และ glucose (350 mM) ที่มีอัตราการมีชีวิตลดลงต่ำกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อทำการเก็บยาวนานขึ้นถึง 84 ชั่วโมง พบว่าการใช้ KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS และ IM ยังให้ผลอัตราการมีชีวิตสูงกว่า 50% และให้ผลไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$, ตารางที่ 12) แต่หลังจากการเก็บที่ 96-120 ชั่วโมง พบว่าการเก็บด้วยสาร extender แต่ละชนิดมีอัตราการมีชีวิตลดลงต่ำกว่า 50% (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 11 ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (mean±S.E.) ต่อการเก็บที่ระยะเวลต่าง ๆ

สาร	ระยะเวลาการเก็บ (ชั่วโมง)										
extender	6	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
KU	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	83.3±5.3^{bc}	66.7±5.3^{b}	33.3±8.3^{b}	4.2±4.2^{b}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}
MC	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	95.8±4.2^{a}	79.2±7.7^{a}	66.7±8.3^{a}	41.7±5.3^{a}	20.8±4.2^{a}
C-F HBSS	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	87.5±5.6^{ab}	62.5±5.6^{b}	33.3±5.3^{b}	4.2±4.2^{b}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}
0.9% NaCl	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	87.5±5.6^{b}	75.0±11.2^{b}	58.3±15.4^{cd}	29.2±13.6^{c}	8.3±5.3^{c}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}
MFR	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	75.0±0.0^{b}	50.0±0.0^{d}	25.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}
HBSS	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	83.3±5.3^{bc}	62.5±5.6^{b}	25.0±0.0^{b}	4.2±4.2^{b}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}
SM	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	95.8±4.2^{a}	75.0±0.00^{c}	54.2±4.2^{c}	8.3±5.3^{e}	0.0±0.0^{d}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}
Saad	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	95.8±4.2^{a}	75.0±0.0^{c}	54.2±4.2^{c}	16.7±5.3^{e}	0.0±0.0^{d}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}
glucose	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	79.2±4.2^{c}	54.2±4.2^{c}	8.3±5.3^{e}	0.0±0.0^{d}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}	0.0±0.0^{c}	0.0±0.0^{b}
IM	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	100.0±0.0^{a}	87.5±5.6^{a}	75.0±11.2^{a}	62.5±14.1^{a}	12.5±5.6^{b}	0.0±0.0^{b}

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

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

ตารางที่ 12 ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการมีชีวิต (mean±S.E.) ต่อการเก็บที่ระยะเวลาต่าง ๆ

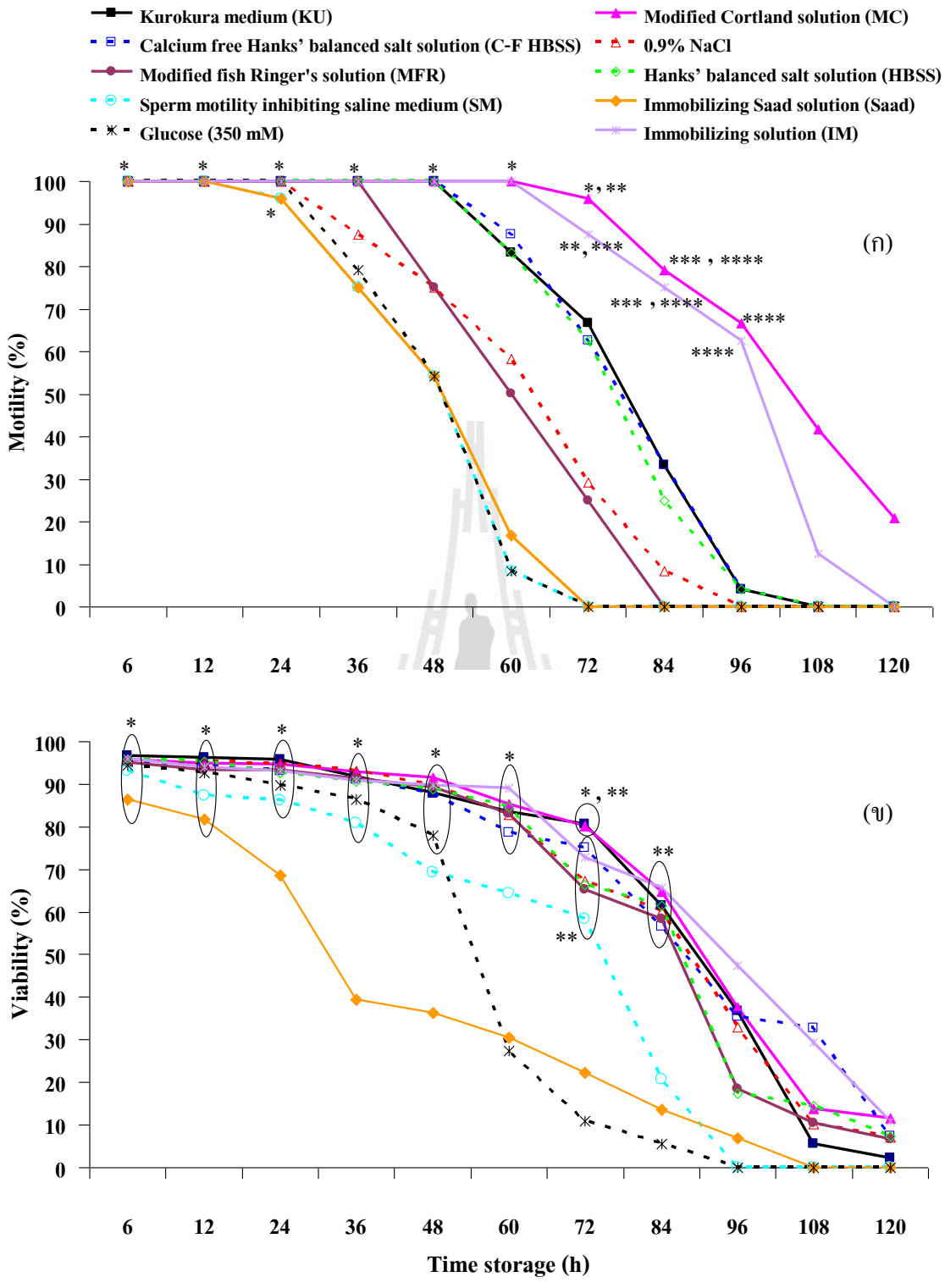
สาร extender	ระยะเวลาการเก็บ (ชั่วโมง)										
	6	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120
KU	96.7±1.2^{a}	96.2±1.1^{a}	95.7±1.4^{a}	91.7±1.9^{a}	88.0±1.6^{ab}	83.5±4.5^{ab}	80.7±4.3^{a}	61.5±7.6^{a}	36.8±16.3^{ab}	5.7±2.7^{bc}	2.3±1.1^{a}
MC	95.7±1.3^{a}	94.83±1.9^{a}	94.7±2.0^{a}	92.8±1.7^{a}	91.5±1.6^{a}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

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

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

นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าการใช้สาร extender แต่ละชนิด มีแนวโน้มของอัตราการเคลื่อนที่ลดลงเป็นแบบเส้นโค้งยกกำลังเก้า (nonic trend) เมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) และพบว่าการใช้ MC สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานถึง 72 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ 95.8±4.2% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างจากการเก็บที่ระยะเวลาเริ่มต้นที่ 6 ชั่วโมง (100%) ซึ่งพบว่าให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ IM โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ 87.5±5.6% และเมื่อทำการเก็บที่ 84 และ 96 ชั่วโมง พบว่าการใช้ MC และ IM ยังมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 50% และมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, ภาพที่ 10 ก) สำหรับผลของการศึกษาอัตราการมีชีวิตพบว่าในการใช้สาร extender แต่ละชนิด มีแนวโน้มของอัตราการมีชีวิตลดลงเป็นแบบเส้นโค้งยกกำลังเก้า (nonic trend) เช่นเดียวกัน เมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) ซึ่งพบว่าการใช้ KU และ MC สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานถึง 72 ชั่วโมง โดยมีอัตราการมีชีวิต 80.7±4.3% และ 80.2±3.1% ตามลำดับ ให้ผลไม่แตกต่างจากการเก็บที่ระยะเวลาเริ่มต้นที่ 6 ชั่วโมง ($P>0.05$) ที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 96.7±1.2% และ 95.7±1.3% ตามลำดับ ซึ่งพบว่าให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM และ IM ($P>0.05$) และที่ระยะเวลาการเก็บ 84 ชั่วโมง พบว่าการใช้สาร extender แต่ละชนิดมีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน ยกเว้นการใช้ SM, Saad และ glucose (350 mM) ซึ่งมีอัตราการมีชีวิตต่ำกว่า 50% และให้ผลต่ำกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, ภาพที่ 10 ข)

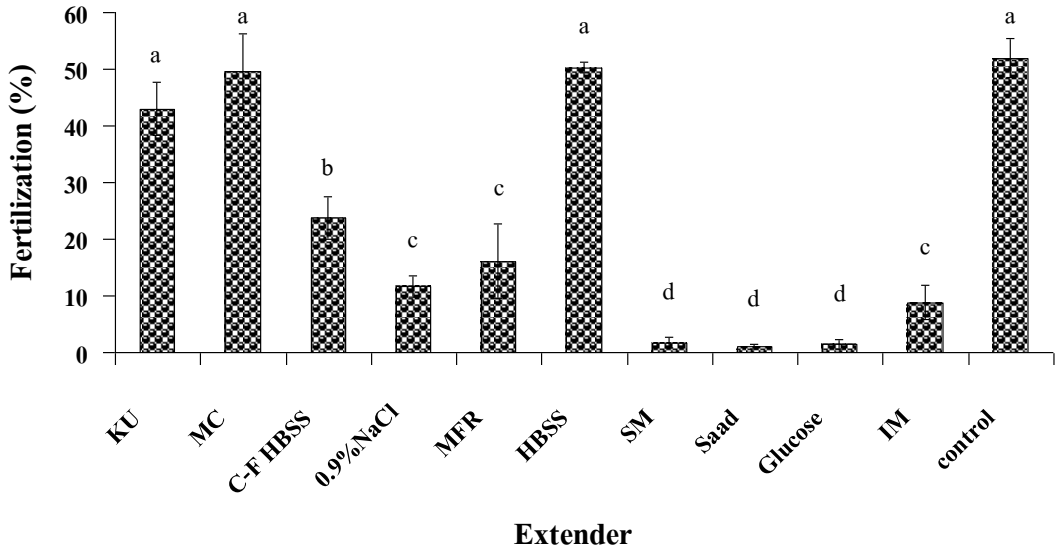
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี



ภาพที่ 10 ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ (6-120 ชั่วโมง)

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

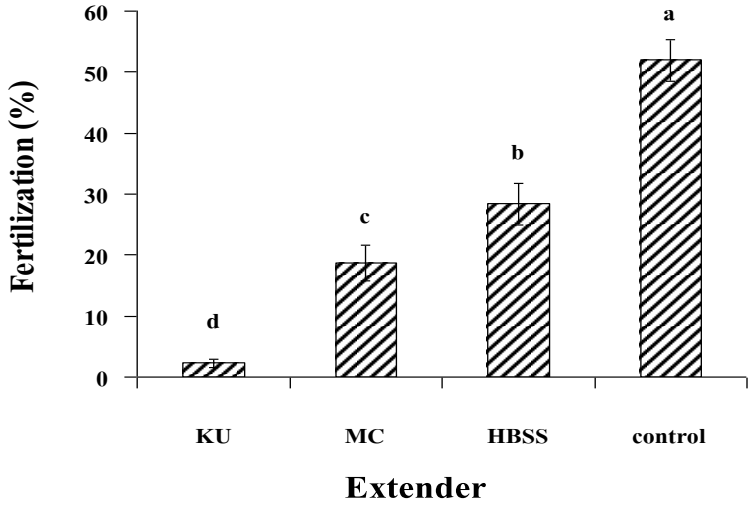
จากการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง ในสาร extender ทั้ง 10 ชนิด (KU, MC, C- F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM พบว่าการใช้ HBSS, MC และ KU ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด และมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าและแตกต่างจากการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 อัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ทำการเก็บรักษาด้วยสาร extender 10 ชนิด ที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต ($P<0.05$)

จากนั้นได้นำสาร extender ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมหลังจากการเก็บ 48 ชั่วโมง ซึ่งได้แก่ KU, MC และ HBSS มาทำการทดสอบการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ 72 ชั่วโมง หลังจากทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิพบว่าการใช้สาร extender ทั้ง 3 ชนิด ให้ผลอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าและแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าการใช้ HBSS ให้ผลอัตราการปฏิสนธิ 28.39±3.44% ซึ่งสูงกว่าการใช้ KU (2.30±0.67%) และ MC (18.70±2.89%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 12



ภาพที่ 12 อัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดที่ทำการเก็บรักษาด้วยสาร extender 3 ชนิด ที่ระยะเวลาการเก็บ 72 ชั่วโมง

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต (P<0.05)

4.2.2 ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

จากการนำสาร extender (HBSS) มาทำการศึกษาอัตราการเจือจาง sperm: extender ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ในระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง มาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยดูผลของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ พบว่ามีอิทธิร่วมกัน (interaction) ระหว่างอัตราการเจือจางกับระยะเวลาการเก็บ (P<0.05) และพบว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วน 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ undiluted sperm (กลุ่มควบคุม, P>0.05) ที่ระยะเวลาการเก็บ 0 ชั่วโมง (ตารางที่ 13) และที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 5 มีอัตราการปฏิสนธิอัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ไม่แตกต่างจากการใช้ undiluted sperm (P>0.05) และนอกจากนี้ที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง ยังพบว่าเมื่อเพิ่มอัตราการเจือจางขึ้นถึง 1: 10 และ 1: 15 ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 และ 1: 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05, ตารางที่ 13) และเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นถึง 72 ชั่วโมง พบว่าในแต่ละอัตรากาเจือจาง (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 5) มีอัตราการปฏิสนธิอัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้ undiluted sperm อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แต่อย่างไรก็ตาม ณ เวลา 72 ชั่วโมง การใช้อัตราการเจือจาง

1: 3 และ 1: 5 ยังคงมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 10 และ 1: 15 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05, ตารางที่ 13)

ตารางที่ 13 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการคลื่อนที่ ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดที่อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่าง ๆ (1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15)

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

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ตัวเลขในวงเล็บ คือเปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

4.3 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

4.3.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ DMSO, DMA, glycerol และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ร่วมกับ HBSS เป็นสาร extender และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10°C min^{-1} จาก 20°C ถึง -80°C จากผลของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ พบว่ามีอิทธิร่วมกัน (interaction) ระหว่างชนิดของสาร cryoprotectant กับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ($P<0.05$) และพบว่าการใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้นทั้ง 3 ระดับ ดังกล่าวมีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบการใช้สาร cryoprotectant แต่ละชนิดพบว่าเมื่อใช้ 5% glycerol ให้อัตราการปฏิสนธิ 64.97±1.82% (74% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, ตารางที่ 14) สำหรับผลของอัตราการมีชีวิตพบว่าการใช้ 5% glycerol, 5% DMA และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ให้อัตราการมีชีวิตสูงกว่าและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ยกเว้น 5% DMSO ที่มีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากการใช้ 5% DMA และ 5% MeOH แต่ผลของอัตราการเคลื่อนที่พบว่าการใช้สาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 15% มีอัตราการเคลื่อนที่ (68.75±3.26%, 69% ของน้ำเชื้อสด และ 66.67±3.55%, 67% ของน้ำเชื้อสด ตามลำดับ) ซึ่งสูงกว่าการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 14

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

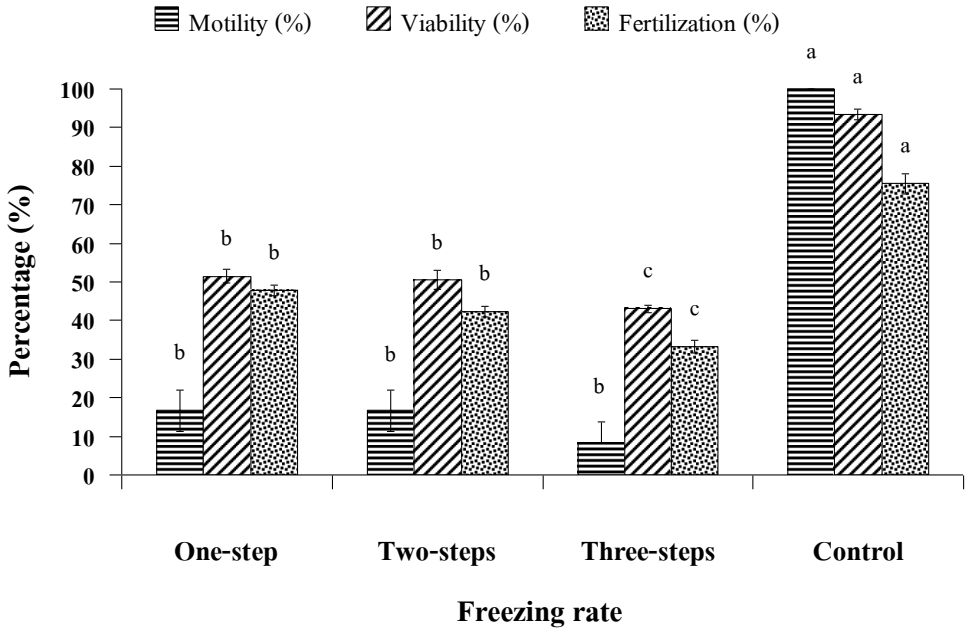
ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราเคลื่อนที่ ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดในสาร extender (HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

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

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

4.3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง ที่อัตราการลดอุณหภูมิ One-step (10°C min^{-1} จาก 20°C ถึง -80°C), Two-steps (4°C min^{-1} จาก 3°C ถึง -4°C และ 11°C min^{-1} จาก -4°C ถึง -80°C) และ Three-steps freezing rate (5°C min^{-1} จาก 2°C ถึง -7°C, 3°C min^{-1} จาก -7°C ถึง -30°C และ 2°C min^{-1} จาก -30°C ถึง -80°C) โดยใช้ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 แบบดังกล่าวให้ผลอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step และ Two-steps ให้ผลไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยมีอัตราการปฏิสนธิ 47.84±1.42% และ 42.37±1.44% และอัตราการมีชีวิต 51.50±1.71% และ 50.66±2.49% ตามลำดับ แต่ให้ผลสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps สำหรับอัตราการเคลื่อนที่พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 แบบดังกล่าวไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ($P>0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 13



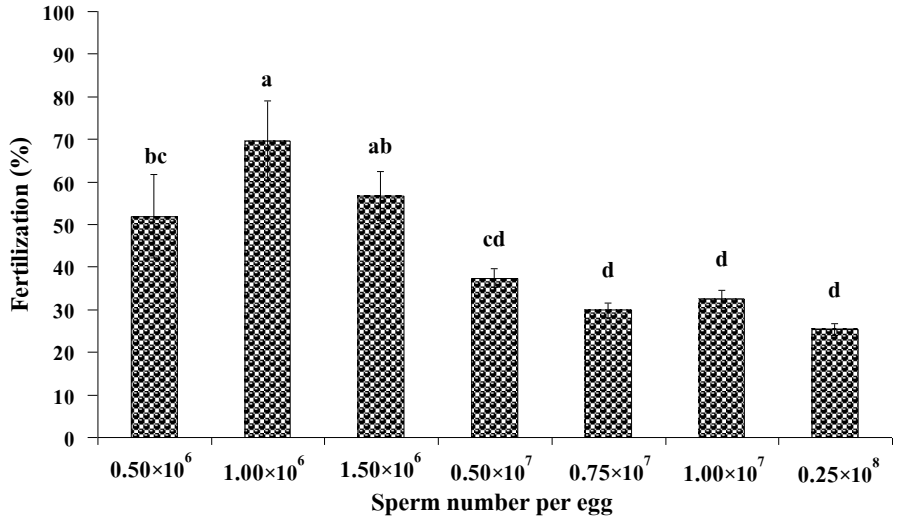
ภาพที่ 13 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.4 จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

4.4.1 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

จากการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยใช้ sperm: egg ratio ที่อัตราส่วนต่าง ๆ กัน ดังนี้ 0.5×10^{6}: 1, 1×10^{6}: 1, 1.5×10^{6}: 1, 0.5×10^{7}: 1, 0.75×10^{7}: 1, 1×10^{7}: 1 และ 0.25×10^{8}: 1 พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 1×10^{6}: 1 และ 1.5×10^{6}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน (69.62±9.31% และ 56.65±5.75% ตามลำดับ, $P>0.05$) แต่เมื่อมีการเพิ่มหรือลดจำนวน sperm: egg ratio มีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 14

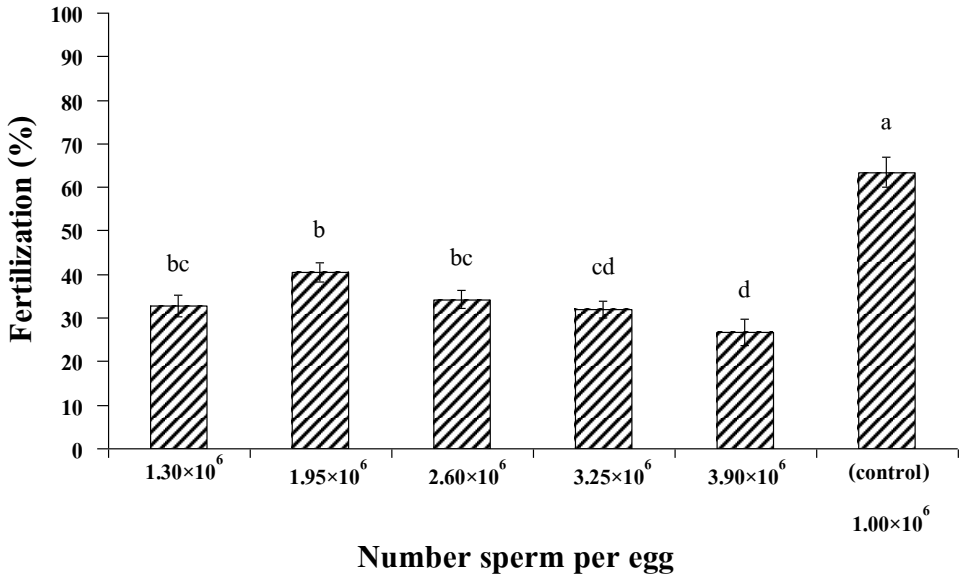


ภาพที่ 14 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ต่ออัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืด

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.4.2 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

จากการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมของน้ำเชื้อแช่แข็งปลานวลจันทร์น้ำจืด โดยใช้ sperm: egg ratio ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1.3×10^6: 1, 1.95×10^6: 1, 2.6×10^6: 1, 3.25×10^6: 1 และ 3.9×10^6: 1 และใช้น้ำเชื้อสด 1.00×10^6: 1 ซึ่งเป็นจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อสดที่เหมาะสมต่อการปฏิสนธิของปลานวลจันทร์น้ำจืด เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ทั้ง 5 อัตราส่วน ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, ภาพที่ 15) แต่เมื่อเปรียบเทียบการใช้จำนวน sperm: egg ratio แต่ละอัตราส่วน พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 1.95×10^6: 1, 1.30×10^6: 1 และ 2.60×10^6: 1 มีอัตราการปฏิสนธิ (40.61±2.22%, 32.77±2.40 และ 34.25±2.05% ตามลำดับ) ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่เมื่อใช้น้ำเชื้อเพิ่มขึ้น 3.9×10^6: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงต่ำสุด (26.77±2.96%) ดังแสดงในภาพที่ 15



ภาพที่ 15 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ต่ออัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อแช่แข็งปลานวลจันทร์น้ำจืด

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

บทที่ 5
อภิปรายผล

5.1 ผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

โดยปกติตัวอสุจิปลาจะไม่มีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ใน seminal plasma หรือในอัณฑะ แต่จะมีการเคลื่อนที่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยน้ำในขณะการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ถ้าจะเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยสาร extender ใด ๆ ก็ตาม สาร extender ชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ดังนั้นการใช้สาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจึงควรมีส่วนประกอบทางเคมี ค่าออสโมลาลิตี้ และ pH ใกล้เคียงกับ seminal plasma ของปลาชนิดนั้น ๆ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนที่หรือการใช้พลังงานของตัวอสุจิ ตลอดจนการรักษาให้ตัวอสุจิคงรูป และมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา (Kang, Shao, Kho and Zhang, 2004) ซึ่งจากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นด้วยสาร extender 10 ชนิด ได้แก่ KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM หลังจากทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ 120 ชั่วโมง พบว่าการใช้สาร extenderแต่ละชนิดมีแนวโน้มของอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตลดลงเป็นแบบเส้นโค้งยกกำลังเก้า (nonic trend) เมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากในขณะที่ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่จะมีการเผาผลาญพลังงานทั้งแบบใช้ก๊าซออกซิเจน และไม่ใช้ก๊าซออกซิเจน ซึ่งการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ก๊าซออกซิเจนนี้เองทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น (Lahnsteiner, Berger and Weismann, 1999) กรดแลคติกที่เกิดขึ้นนี้เองจะทำให้ pH ของน้ำเชื้อเปลี่ยนไป และเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นทำให้มีปริมาณของกรดแลคติกเพิ่มขึ้น ส่งผลให้มีค่า pH ลดลง ทำให้เมแทบอลิซึม และการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง นอกจากนี้ขบวนการเผาผลาญพลังงานยังส่งผลให้แหล่งพลังงานของเซลล์ ซึ่งได้แก่ glucose หรือน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เช่น galactose, fructose, ribose และ trehalose ลดลง หรืออาจมีการใช้แหล่งพลังงานเหล่านี้หมดไปเมื่อทำการเก็บที่ยาวนานขึ้น ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิลดลง แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าการเก็บที่ระยะเวลา 6-24 ชั่วโมง เมื่อใช้สาร extender ทั้ง 10 ชนิด มีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษาการเผาผลาญพลังงานของตัวอสุจิยังเกิดขึ้นน้อย ส่งผลให้ค่า pH ของน้ำเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงน้อย รวมถึงแหล่งพลังงานของเซลล์ยังมีปริมาณเพียงพอ จึงไม่ส่งผลต่อตัวอสุจิ ดังนั้นหากมีความต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพียง

24 ชั่วโมง สาร extender ที่ควรเลือกใช้ คือ 0.9% NaCl เพราะเป็นสาร extender ที่เตรียมง่าย และมีส่วนประกอบเพียงอย่างเดียว ทำให้ประหยัดเวลาและค่าใช้จ่าย และเมื่อทำการเก็บในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นที่ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ KU, MC, C-F HBSS, HBSS และ IM ยังมีอัตราการเคลื่อนที่ถึง 100% และให้ผลอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน และมีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากการใช้ 0.9% NaCl, MFR และ glucose (350 mM) (P>0.05) นอกจากนี้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ระยะเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 84 และ 96 ชั่วโมง พบว่าการใช้MC และ IM มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่า 50% และมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และเมื่อพิจารณาผลของอัตราการมีชีวิตที่ระยะเวลาการเก็บ 84 และ 96 ชั่วโมง เช่นเดียวกันพบว่าการใช้ MC และ IM มีอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างจากการใช้ KU, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR และ HBSS แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำสาร extender ทั้ง 10 ชนิดมาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง พบว่าการใช้ HBSS, MC และ KU ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด และมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าและแตกต่างจากการใช้สาร extender ชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ดังนั้นหากพิจารณาทั้งผลของอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ แล้วพบว่าถ้าต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ 48 ชั่วโมง สามารถเลือกใช้ KU, MC และ HBSS เป็นสารextender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นได้ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจาก HBSS มีค่าออสโมลาลิตี้ 280 mOsmol/kg และ pH 8 ส่วน KU มีค่าออสโมลาลิตี้ 250 mOsmol/kg และ pH 8.11 และ MC ซึ่งมีค่าออสโมลาลิตี้ 285 mOsmol/kg และ pH 8 ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ seminal plasmaของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดซึ่งมีค่าออสโมลาลิตี้ 255 mOsmol/kg และค่า pH 7.15 ซึ่งค่าออสโมลาลิตี้มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิ ในปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่เป็น hypotonic คือ สารละลายนอกเซลล์มีความเข้มข้นน้อยกว่าภายในเซลล์ (ค่าออสโมลาลิตี้ของสารละลายภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์) จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยพบว่าสารละลายที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำกว่า 200 mOsmol/kg จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในปลากลุ่ม carp และต่อมาเซลล์อสุจิจะหยุดการเคลื่อนที่ และเซลล์อาจแตกหรือถูกทำลายเนื่องจากเซลล์บวม (Alavi and Cosson, 2005) ในทางตรงข้ามสารละลายที่เป็น hypertonic คือ สารละลายนอกเซลล์ที่มีความเข้มข้นมากกว่าภายในเซลล์ (ค่าออสโมลาลิตี้ของสารละลายภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในเซลล์) ทำให้มีการสูญเสียน้ำส่งผลให้เซลล์เหี่ยว และเสียสภาพทำให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้ ซึ่งอสุจิของปลาน้ำจืดในปลากลุ่ม carp สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าออสโมลาลิตี้ได้อยู่ในช่วง 254-346 mOsmol/kg (Alavi and cosson, 2006) แต่จากการศึกษาค่าออสโมลาลิตี้ของ IM พบว่ามีค่าออสโมลาลิตี้ 369 mOsmol/kg ซึ่งสูงกว่าค่าออสโมลาตี้ของ seminal plasma ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด (255 mOsmol/kg) ค่อนข้างมาก โดยค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับนี้อาจมีผลต่อส่วนหัวของตัวอสุจิ ทำให้มีการ

สูญเสียน้ำส่งผลให้เซลล์เหี่ยว และเสียสภาพทำให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้ ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิต่ำ แต่ไม่มีผลทำลายในส่วนหาง ทั้งนี้เนื่องจากส่วนหัวเป็นส่วนที่มีขนาดใหญ่ และมีส่วนประกอบที่ซับซ้อนกว่าส่วนหางซึ่งง่ายต่อการถูกทำลายได้เร็วกว่า ทำให้ตัวอสุจิสามารถเคลื่อนที่ได้อยู่เนื่องจากส่วนหางไม่ถูกทำลาย แต่เมื่อพิจารณาเพิ่มเติมจากผลของการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่การเก็บ 72 ชั่วโมง โดยการนำสาร extender ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมหลังจากการเก็บ 48 ชั่วโมง ซึ่งได้แก่ KU, MC และ HBSS มาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ พบว่าการใช้ HBSS ให้ผลอัตราการปฏิสนธิ 28.39±3.44% ซึ่งสูงกว่าการใช้ KU (2.30±0.67%) และ MC (18.70±2.89%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจาก HBSS มีน้ำตาล glucose เป็นองค์ประกอบ จึงสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของอสุจิปลาได้ ทั้งนี้เป็นเพราะอสุจิของปลาสามารถใช้สารภายนอกเซลล์ในขบวนการเผาผลาญพลังงานได้ (De W. Kruger, Smit, Van vuren and Ferreira, 1984; Yao, Richardson and Crim, 1999) ในกรณีที่มีการเก็บน้ำเชื้อไว้ใช้ในระยะยาวซึ่งอาจทำให้แหล่งพลังงานภายในตัวอสุจิหมดไป จึงทำให้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย HBSS ยังคงมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่า KU และ MC ซึ่งไม่มี glucose เป็นองค์ประกอบ ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดที่ 72 ชั่วโมง ควรเลือกใช้ HBSS เนื่องจากให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงสุด และจากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่า HBSS เป็นสาร extender ที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดได้ดีที่สุด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้ HBSS ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นมีหลายรายงานที่ประสบผลสำเร็จ ได้แก่ การศึกษาของ Jing, Huang, Bai, Tanguay and Dong (2009) ซึ่งได้ใช้ HBSS และ Buffered sperm motility-inhibiting solution (BSMIS) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Zebrafish, *Danio rerio*พบว่าการใช้ HBSS ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ BSMIS เช่นเดียวกับการศึกษาของ Tiersch, Figiel and And (2004) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Colorado pikeminnow, *Ptychocheilus lucius* แบบระยะสั้นโดยใช้ HBSS เป็นสาร extender พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย HBSS มีอัตราการเคลื่อนที่ (77±22%) สูงกว่าน้ำเชื้อที่ไม่มีการเจือจางด้วย HBSS (12±30%) และในปีเดียวกัน Tiersch, Wayman, Skapura, Neidig and Grier (2004) ได้ศึกษาผลของสาร extender 2 ชนิด ได้แก่ HBSS และ 0.6% NaCl ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา common snook, *Centropomus undecimalis* พบว่าเมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วย HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานกว่าการใช้ 0.6% NaCl

5.2 ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมนั้นนอกจากจะสามารถยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นแล้ว ยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อได้อีกด้วย จึงน่าจะเป็น

ประโยชน์สำหรับการศึกษาและประยุกต์ใช้กับปลานวลจันทร์น้ำจืด ซึ่งพบว่ามีปริมาตรน้ำเชื้อน้อย (0.2-0.4 มิลลิลิตร/ตัว) แต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อสูงถึง $1.65\pm0.25\times10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร จึงได้มีการศึกษาอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ โดยเลือกสาร extender ที่ให้ผลดีที่สุด คือ HBSS มาศึกษาอัตราการเจือจาง sperm: extender ที่ 4 อัตราส่วน ได้แก่ 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ในระยะเวลาการเก็บ 0, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วน 1: 3, 1: 5, 1: 10 และ 1: 15 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้ undiluted sperm (กลุ่มควบคุม, $P>0.05$) ที่ระยะเวลาการเก็บ 0 ชั่วโมง ทั้งนี้ในขณะที่ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่จะมีการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ก๊าซออกซิเจน ทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น (Lahnsteiner et al., 1999) ซึ่งกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะทำให้ค่า pH ของน้ำเชื้อเปลี่ยนไป ซึ่งถ้าค่า pH เปลี่ยนแปลงมาก ๆ จะทำให้ตัวอสุจิตายได้ และในขบวนการเผาผลาญพลังงานยังส่งผลให้แหล่งพลังงานของเซลล์ลดลงเช่นเดียวกัน แต่ในช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษาการเผาผลาญพลังงานของตัวอสุจิยังเกิดขึ้นไม่มาก ส่งผลให้ค่า pH ของน้ำเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงน้อย รวมถึงแหล่งพลังงานของเซลล์ก็ยังคงไม่ลดลงมาก จึงไม่ส่งผลต่อตัวอสุจิ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลา walking catfish, *Clarias macrocephalus* พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) การใช้อัตราการเจือจาง 1: 1, 1: 2, 1: 4, 1: 9 และ 1: 19 ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (Vuthiphandchai, Thadsri and Nimrat, 2009) และจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเมื่อทำการเก็บยาวนานขึ้นถึง 48 ชั่วโมง และใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนสูง (1: 10 และ 1: 15) ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่ำ (1: 3 และ 1: 5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และสำหรับการเก็บที่ 72 ชั่วโมง ก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผลของ dilution factor ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Ocean pout, *Macrozoarces americanus* L. พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน เมื่อใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 30 และ 1: 40 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Yao et al., 1999) และจากการศึกษาในปลา Atlantic halibut, *Hippoglossu hippoglossus* พบว่าเมื่อใช้อัตราการเจือจาง 1: 5 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการเจือ1: 9, 1: 19, 1: 49 และ 1: 99 (Babiak, Ottesen, Rudolfsen and Johnsen, 2006) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Atlantic cod, *Gadus morhua* ที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน พบว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 1 และ 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่ 49±0.24 และ 51±0.6% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1: 5 และ 1: 10 (43±0.3 และ 39±5.9% ตามลำดับ) (DeGraaf, King, Benton and Berlinsky, 2004) และจากการศึกษาในปลาชนิดเดียวกันพบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน การใช้อัตราการเจือจาง 1: 3 มีอัตราการเคลื่อนที่ (74±0.3%) ซึ่งสูงกว่าและแตกต่าง $P<0.05$ จากการใช้อัตราการเจือจาง 1: 1, 1: 2, 1: 5 และ 1: 10 ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง 42-66% (DeGraaf and Berlinsky, 2004)

5.3 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

5.3.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ DMSO, DMA, glycerol และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15% ร่วมกับ HBSS เป็นสาร extender พบว่าเมื่อใช้ 5% glycerol มีอัตราการปฏิสนธิ 64.97±1.82% ซึ่งสูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้ glycerol ช่วยป้องกันการลดขนาดของเซลล์ และอันตรายต่อเซลล์อันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของอิเล็คโทรไลท์ในขณะทำการแช่แข็ง ซึ่งมีรายงานว่า glycerol ที่เติมลงไปจะเป็นตัวการที่ช่วยปรับเปลี่ยนให้เกิดความสมดุลระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมภายในและภายนอกเซลล์ด้วยการส่งถ่ายโซเดียมเข้าสู่ภายในเซลล์ และเนื่องจากโซเดียมไอออนมีความสามารถจับกับน้ำ ทำให้มีการส่งถ่ายน้ำเข้าสู่เซลล์ เป็นการช่วยป้องกันการลดขนาดของเซลล์ระหว่างขบวนการแช่แข็ง (Rall, Mazur and Souzur, 1978) นอกจากนี้การใช้ glycerol ยังช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจาก glycerol เมื่อรวมกับน้ำจะทำให้จุดเยือกแข็งของสารละลายนั้นลดต่ำลง ทำให้ของเหลวนั้น “เย็นจัดยิ่ง” ก่อนจะแข็งหรือก่อนการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง หรืออีกนัยหนึ่งคือส่งผลให้ของเหลวภายในเซลล์แข็งตัวช้ากว่าปกติ และทำให้ในเซลล์มีปริมาณน้ำน้อยลง การเกิดเกล็ดน้ำแข็งก็ย่อมเกิดขึ้นน้อยตามไปด้วย (ปริมาณน้ำในเซลล์มากเกิดผลึกมากซึ่งเป็นผลเสียต่อเซลล์) ซึ่งมีหลายรายงานที่ประสบความสำเร็จในการใช้ glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง เช่น จากการศึกษาในปลา Platyfish, *Xiphophorus couchianus* (Huan, Dong and Tiersch, 2004) และจากการศึกษาในปลา Green swordtail, *Xiphophorus helleri* (Huang, Dong, Walter and Tiersch, 2004) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการใช้ 5% glycerol ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ glycerol ที่ความเข้มข้น 10 และ 15% ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของ glycerol ที่สูงเกินไป ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อใช้ glycerol ที่ความเข้าข้น 10 และ 15% ทำให้มีการแพร่ของ glycerol เข้าสู่เซลล์ได้เร็วกว่าที่ความเข้มข้น 5% ที่ equilibration time 10 นาทีเท่ากันซึ่งส่งผลให้มีปริมาณของ glycerol สูงเกินไปจนเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิได้ อย่างไรก็ตามสาร cryoprotectant ยังมีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของปลา โดยการใช้ 5% glycerol นั้นแม้ว่าจะใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดได้ดี แต่กลับไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบางชนิด ได้แก่ น้ำเชื้อปลา Silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix* โดยพบว่าเมื่อใช้ 5% glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็งทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้ 10% DMSO (Alvarez et al., 2003) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Common snook, *Centropomus undecimalis* พบว่าการใช้ 5% glycerol มีอัตราการ

เคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้ 5%, 10% DMSO และ 5% MeOH (Tiersch,Wayman et al., 2004) และจากการศึกษาในปลา Tropical bagrid catfish, *Mystus nemurus* พบว่าการใช้ 5% glycerol มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้ 10% MeOH (Muchlisin, Hashim and Chong, 2004) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในปลาแต่ละชนิดมีลักษณะและขนาดของตัวอสุจิที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจทำให้โครงสร้างของส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรน ซึ่งได้แก่ ฟอสโฟลิปิด โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต มีปริมาณแตกต่างกัน จึงอาจส่งผลให้การแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์แตกต่างกันออกไปตามชนิดของปลา และจากการศึกษายังพบว่าถึงแม้การใช้ 5% glycerol จะให้ผลอัตราการปฏิสนธิและอัตราการมีชีวิตสูง แต่กลับให้ผลของอัตราการเคลื่อนที่ต่ำ (25.0±0.0%) ซึ่งในการทดลองพบว่าน้ำเชื้อที่ใช้ 5% glycerol มีลักษณะเป็นเจลซึ่งอาจเป็นสาเหตุทำให้อสุจิไม่สามารถเคลื่อนที่ได้สะดวก แต่อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาทดสอบอัตราการปฏิสนธิแล้วพบว่ามีอัตราการปฏิสนธิสูงนั้นอาจเป็นเพราะปัจจัยบางอย่างซึ่งได้แก่ไข่ หรือ ovarian fluid ซึ่งเป็นตัวที่สามารถกระตุ้นให้อสุจิมีการเคลื่อนที่เข้าไปผสมกับไข่ได้ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิสูงซึ่งจากการศึกษาของ Yanagimachi, Chrr, Pillai and Baldwin (1992) พบว่ามี sperm-activating factor ในไข่ของปลา rainbow trout และ ปลา cohosalmon,*Oncorhynchus kisutch* เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Pacific herring, *Clupea pallasi* (Morisawa, Tanimoto and Ohtake, 1992) และจากการศึกษาในปลา muskellunge, *Esox masquinongy* (Ciereszko, Dabrowski, Lin, Christ and Toth, 1999) และในปลา striped bass (Kerby, 1983) พบว่าไม่มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ แต่กลับให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูง ซึ่งในกรณีดังกล่าวสอดคล้องกับการใช้ 5% glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบแช่แข็งในครั้งนี้ คือมีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำ แต่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูง และเมื่อทดสอบดูค่าความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิพบว่าอยู่ในระดับปานกลาง ($r=0.52$, $P<0.05$)

5.3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับชนิดของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมเท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย ซึ่งจากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง ที่อัตราการลดอุณหภูมิ One-step ($10^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $20^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$), Two-steps ($4^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $3^{\circ}C$ ถึง $-4^{\circ}C$ และ $11^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $-4^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$) และ Three-steps freezing rate ($5^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $2^{\circ}C$ ถึง $-7^{\circ}C$, $3^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $-7^{\circ}C$ ถึง $-30^{\circ}C$ และ $2^{\circ}C\ min^{-1}$ จาก $-30^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$) พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างเร็ว คือ One-step และ Two-steps มีอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการมีชีวิตไม่แตกต่างกัน และให้ผลสูงกว่าการใช้อัตราการ

ลดอุณหภูมิอย่างช้า (Three-steps) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลาสวาย (Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus*) โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step (10°C min^{-1}) และแบบ Two-steps (4°C min^{-1} จาก 3°C ถึง -4°C, 11°C min^{-1} จาก -4°C ถึง -80°C) พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน (Kwantong and Bart, 2003) และจากการศึกษาในปลา Zebrafish, *Danio rerio* พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10°C min^{-1} จาก 5°C ถึง -80°C มีอัตราการเคลื่อนที่ 35% ซึ่งให้ผลสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 20°C min^{-1} ที่พบอัตราการเคลื่อนที่เพียง 1% เท่านั้น เมื่อใช้ 8% MeOH เป็นสาร cryoprotectant (Yang et al., 2007) และยังสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Medaka, *Oryzias latipes* เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10°C min^{-1} จาก 5°C ถึง -80°C โดยใช้ 10% MeOH เป็นสาร cryoprotectant มีอัตราการเคลื่อนที่ (50±10%) ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 5, 15, 20 และ 25°C min^{-1} จาก 5°C ถึง -80°C (Yang, Norris, Winn and Tiersch, 2010) และในการศึกษาของ Codcharat, Nimrat and Vuthiphandchai (2005) ทำการศึกษาในปลา Black ear catfish, *Pangasius larnaudii* โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 10°C min^{-1} จาก 25°C ถึง -20°C พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10°C min^{-1} มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าและแตกต่างจากการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3 และ 5°C min^{-1} และยังให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Red snapper, *Lutjanus argentimaculatus* พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10°C min^{-1} จาก 25°C ถึง -80°C มีอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5 และ 12°C min^{-1} เมื่อใช้10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant (Vuthiphandchai, Chomphuthawach and Nimrat, 2009) และจากการศึกษาของ Linhart et al. (2000) พบว่าอัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไนไม่มีความแตกต่างกับน้ำเชื้อสด (52±9% และ 50±18% ตามลำดับ) เมื่อใช้การลดอุณหภูมิที่ Two-steps freezing rates (4°C min^{-1}จาก 4°C ถึง -9°C และ 11°C min^{-1} จาก -9°C ถึง -80°C) จะเห็นได้ว่าในขบวนการแช่แข็งอัตราการลดอุณหภูมิมีส่วนสำคัญต่อเซลล์ หากช้าหรือเร็วเกินไปต่างก็ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ได้ ซึ่งจากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า Three-steps ใช้เวลาในการลดอุณหภูมิถึง 37 นาที เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างเร็ว One-step และ Two-steps ซึ่งใช้เวลาเพียง 10 และ 11 นาที ตามลำดับ ซึ่งการลดอุณหภูมิอย่างช้าจะส่งผลให้เซลล์มีการสูญเสียน้ำทำให้เซลล์เหี่ยว และความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์สูงเกินไป จึงอาจเป็นสาเหตุสำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลทำให้มีอัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิต่ำ เนื่องจากตัวอสุจิเสียสภาพทำให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้

5.4 จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

5.4.1 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อไข่ที่มากเกินไปส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง เนื่องจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้อสุจิไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Silveira et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Tambassen-Cheong et al., 1995; Rosenthal et al., 1998) ในทางตรงกันข้ามพบว่าปริมาณน้ำเชื้อที่ไม่เพียงพอก็ส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเช่นเดียวกัน (Linhart et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Silveira et al., 2006; Bart et al., 1998) และด้วยเหตุนี้จึงควรทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำเชื้อสด ที่ใช้ผสมกับไข่หนึ่งใบ (sperm: egg ratio) เพื่อให้เกิดการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุด โดยเฉพาะปลานวลจันทร์น้ำจืดซึ่งพบว่ามีน้ำเชื้อน้อย จึงควรทราบอัตราส่วนน้ำเชื้อปลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผสมกับไข่หนึ่งใบ จากการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยใช้ sperm: egg ratio ที่อัตราส่วน 0.5×10^{6}: 1, 1×10^{6}: 1, 1.5×10^{6}: 1, 0.5×10^{7}: 1, 0.75×10^{7}: 1, 1×10^{7}: 1 และ 0.25×10^{8}: 1 พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 1×10^{6}: 1 และ 1.5×10^{6}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน (69.62±9.31% และ 56.65±5.75% ตามลำดับ) แต่เมื่อใช้น้ำเชื้อลดลงถึง 0.50×10^{6}: 1 ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิ (51.86±9.79%) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปริมาณน้ำเชื้อที่ใช้ไม่เพียงพอจึงส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อสดในปลา Turbot, *Scophthalmus maximus* พบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ลดลงถึง 3×10^{3}: 1 และ 6×10^{3}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้จำนวน sperm: egg ratio 2×10^{4}: 1 (Dreanno et al., 1997) และจากการศึกษาในปลา Sea lamprey, *Petromyzon marinus* พบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio 1.0×10^{5}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด (97%) แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ลดลงต่ำกว่า 5×10^{4}: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงต่ำกว่า 80% (Ciereszko, Glogowski and Dabrowski, 2000) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในปลา African catfish, *Clarias gariepinus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อสด 1.5×10^{4}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด (80%) แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ลดลงต่ำกว่า 3×10^{3}: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลง (45%) (Rurangwa et al., 1998) ในขณะเดียวกันจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเมื่อมีการใช้น้ำเชื้อเพิ่มขึ้นจาก 0.50×10^{7}-0.25×10^{8}: 1 พบว่ามีแนวโน้มของอัตราการปฏิสนธิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้อสุจิไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Silveira et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Tambassen-Cheong et al., 1995; Rosenthal et al., 1998) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อสดปลา Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 1.89×10^{5}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด 44.56±11.48% แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio เพิ่มขึ้นถึง 1.89×10^{8}: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงเหลือเพียง 2.90±0.36% (Kwantong and Bart, 2009) และยังให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในปลา African catfish, *Clarias gariepinus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อสด 1.5×10^{4}: 1 มีอัตราการ

ปฏิสนธิสูงสุด (80%) แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio เพิ่มขึ้นเป็น 3.75×10^{5}: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลง (71%) (Rurangwa et al., 1998)

5.4.2 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

ในการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากส่งผลโดยตรงต่ออัตราการปฏิสนธิ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในน้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งพบว่าจะต้องใช้จำนวนอสุจิมากกว่าการใช้น้ำเชื้อสด ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีอัตราการตายและความผิดปกติของอสุจิมากกว่าในน้ำเชื้อสด (Dreanno et al., 1997; Lahnsteiner, Weismann and Patzner, 1997; Ding et al., 2008; Lahnsteiner, Berger and Weismann, 2003; Lahnsteiner, Mansour and Weismann, 2002) เนื่องจากในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ จะเกิดอันตรายกับเซลล์อสุจิ เช่น อันตรายจากผลของ pH, solute, อันตรายที่เกิดจากความเป็นพิษของสาร cryoprotectantและอันตรายที่เกิดจากการสูญเสียน้ำ และการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ และนอกเซลล์ (Leung in Jamieson, 1991; Muchlisin and Azizah, 2009; Ji et al., 2004) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยใช้ sperm: egg ratio ที่อัตราส่วนต่าง ๆ ได้แก่ 1.3×10^{6}: 1, 1.95×10^{6}: 1, 2.6×10^{6}: 1, 3.25×10^{6}: 1 และ 3.9×10^{6}: 1 โดยใช้น้ำเชื้อสด 1.00×10^{6}: 1 เป็นกลุ่มควบคุม พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 1.95×10^{6}: 1, 1.30×10^{6}: 1 และ2.60×10^{6}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิ (40.61±2.22%, 32.77±2.40 และ34.25±2.05% ตามลำดับ) ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ($P<0.05$) แต่เมื่อใช้น้ำเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 3.9×10^{6}: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงต่ำสุด (26.77±2.96%) ทั้งนี้อาจเนื่องจากมีจำนวน sperm: egg ratio ที่มากเกินไปส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง ซึ่งเกิดจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้ไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* พบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 6.94×10^{6}: 1 มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุด 53.75±1.62% แต่เมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio เพิ่มขึ้นจาก 3.47×10^{7}: 1-6.94×10^{8}: 1 ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลงจาก 26.07±0.59% เหลือเพียง1.50±0.68% (Kwantong and Bart, 2009) และในบางกรณีพบว่าเมื่อมีการใช้จำนวน sperm: egg ratio น้อยเกินไปส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิลดลง ทั้งนี้เนื่องจากมีจำนวนอสุจิไม่เพียงพอที่จะผสมกับไข่ (Linhart et al., 2006; Rurangwa et al., 1998; Silveira et al., 2006; Bart et al., 1998) ได้แก่ ปลา Turbot, *Scophthalmus maximus* (Dreanno et al., 1997; Chen, Jia and Yua, 2004, Mandarin fish, *Sinipeca chuatsi* (Ding et al., 2008), *Chalcalbumus chalcalburnus*, *Chondrostoma nasus*, *Rutilus* meidingerii, *Barbus barbatus* และ *Cyprinus carpio* (Lahnsteiner et al., 2003) และ Sea bass, *Dicentrarchus labrax* (Fauvel, Suquet, Dreanno, Zonno and Menu, 1998)

บทที่ 6
สรุป และข้อเสนอแนะ

6.1 สรุป

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

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

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

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

6.1.5 จำนวน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมในน้ำเชื้อสด คือ $1.0\text{-}1.5\times10^{6}$: 1 สำหรับในน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีจำนวนน้ำเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของน้ำเชื้อสด คือ อยู่ในช่วง $1.3\text{-}2.6\times10^{6}$: 1

6.2 ข้อเสนอแนะ

6.2.1 ในการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ เนื่องจากไข่ของปลานวลจันทร์น้ำจืดเป็นไข่ครึ่งจมครึ่งลอย และมีเปลือกไข่บางมาก ดังนั้นการติดตั้งระบบเพาะฟักไข่ควรมีการไหลเวียนของน้ำตลอดเวลาโดยมีการปล่อยน้ำจากด้านล่างของขวดเพาะฟักและมีวาล์วสำหรับปรับระดับความแรงของน้ำเพื่อให้ไข่ลอยขึ้นเพียงเล็กน้อยป้องกันการซ้อนทับกันของไข่ และในขณะเดียวกันในส่วนบนของขวดเพาะฟักมีการเจาะรูเพื่อเป็นทางให้น้ำไหลออก และต้องบุด้วยตาข่าย เพื่อป้องกันไข่ไหลออก

6.2.2 ในขั้นตอนของการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ เนื่องจากเปลือกไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืดมี

ลักษณะบางมาก หากมีการกระทบกระเทือนมากเกินไปอาจทำให้เปลือกไข่แตกได้ ดังนั้นขณะที่ทำการ load ไข่เพื่อผสมกับน้ำเชื้อนั้นควรทำด้วยความระมัดระวัง นอกจากนี้ในการนับระยะไข่ควรใช้ความรวดเร็ว และควรนำไข่ออกมานับครั้งละหนึ่งทรีตเมนต์ เพราะจะส่งผลต่อการพัฒนาของไข่

6.2.3 จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการมีชีวิต อัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการมีชีวิตกับอัตราการปฏิสนธิ พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน ดังนั้นในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อควรทำการทดสอบแค่เพียง อัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิ เนื่องจากการทดสอบอัตราการมีชีวิตเป็นวิธีการที่ยุ่งยากและใช้เวลานาน ทั้งนี้เพื่อเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

รายการอ้างอิง

กรมประมง. (2530). **ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย**. กรุงเทพมหานคร. องค์การค้าของคุรุสภา.

เจริญ อุดมการ อรรณพ อิ่มศิลป์, สมบัติ สิงห์สี, มาลัย อิ่มศิลป์ และ พิน พลไชย. (2547). **การเพาะพันธุ์ปลานวลจันทร์**. กรุงเทพมหานคร. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด.

ดวงจันทร์ ดอกพอง. 2553. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด Small scale mud carp, Cirrhinus microlepis แบบระยะสั้นและแบบระยะยาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. (2525). **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในช่วงเวลาสั้น**. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 17: 53-67.

Akcay, E., Bozkurt, Y., Secer, S. and Tekin, N. (2004). Cryopreservation of mirror carp semen. **Research Article**. 28: 837-843.

Alavi, S.M.H. and Cosson J. (2005). Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. **Cell Biology International**. 29: 101-110.

Alavi, S.M.H. and Cosson, J. (2006). Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. **Cell Biology International**. 30: 1-14.

Babiak, I., Glogowski, J., Brzuska, E., Szumiec, J. and Adamk, J. (1997). Cryopreservation of sperm of common carp*, Cyprinus carpio* L. **Aquaculture Research**. 28: 567-571.

Babiak, I., Ottesen, O., Rudolfsen, G. and Johnsen, S. (2006). Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. I: Optimizing the protocol. **Theriogenology**. 66: 2025-2035.

Bart, A.N., Wolfe, D.F. and Dunham, R.A. (1998). Effects of cryoprotectant, sperm density and straw size on cryopreservation of blue catfish, *Ictalurus furcatus*, sperm. **Transactions of the African Fisheries Society**. 127: 819-824.

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.

Chen, S.L., Jia, X. S. and Yua, G.C. (2004). Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. **Aquaculture Research**. 236: 547-556.

Ciereszko, A., Dabrowski, K., Lin, F., Christ, S.A. and Toth, G.P. (1999). Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved muskellunge spermatozoa. **Transactions of the American Fisheries Society**. 128: 542-548.

Ciereszko, A., Glogowski, J. and Dabrowski, K. (2000). Fertilization in landlocked sea lamprey: storage of gametes, optimal sperm: egg ratio, and methods of assessing fertilization success. **Journal of Fish Biology**. 56: 495-505.

Codcharat, S., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. (2005). Cryopreservation of common black ear catfish (*Pangasius larnaudii*) spermatozoa. **Burapha University, Thailand**. 8 p.

DeGraaf, J.D. and Berlinsky, D.L. (2004). Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. **Aquaculture Research**. 234: 527-540.

DeGraaf, J.D., King, W.V., Benton, C. and Berlinsky, D.L. (2004). Production and storage of sperm from the black sea bass *Centropristis striata* L. **Aquaculture Research**. 35: 1457-1465.

De W. Kruger, J.C., Smit, G.L., Van vuren, J.H.J. and Ferreira, J.T. (1984). Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and *Oreochromis mossambicus* (Peter). **J. Fish Biol**. 24: 263-272.

Ding, S., Ge, J., Hao, C., Zhang, M., Yan, W., Xu, Z., Pan, J., Chen, S., Tian, Y. and Huang, Y. (2008). Long-term cryopreservation of sperm from Mandarin fish *Siniperca chuatsi*. **Animal Reproduction Science**. 7 p.

Dreanno, C., Suguet, M., Quemener, L., Cosson, J., Fierville, F., Normant, Y. Billard, R. (1997). Cryopreservation of Turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. **Theriogenology**. 48: 589-603.

Fauvel, C., Suquet, M., Dreanno, C., Zonno, V. and Menu, B. (1998). Cryopreservation of sea bass (*Dicentrarchus labrax*) spermatozoa in experimental and production simulating conditions. **Aquat. Living Resour**. 11: 387-394.

Guest, W. C. (1973). Spermatology and sperm preservation of Channel catfish, *Ictalurus punctatus*. M.S. thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical college United States of America.

Gwo J.C. (2000). Cryopreservation of sperm of some marine fishes. In: Cryopreservation in aquatic species, Tiersch TR, Mazik PM (Eds.), World Aquaculture Society, Baton Rouge, Lousiana., pp.138-160.

Hambananda, A. (1996). Cryopreservation of milt of striped catfish, *Pangasius sutchi* Fowler. Ph.D. Dissertation, Kasetsart University, Thailand.

Horvath, A. and Urbanyi, B. (2000). The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved of African catfish sperm, Clarias gariepinus (Burchell 1822). **Aquaculture Research**. 31: 317-324.

Huang, C., Dong, Q. and Tiersch, T.R. (2004). Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the platyfish *Xiphophorus couchianus*. **Theriogenology**. 62: 971-989.

Huang, C., Dong, Q., Walter, R.B. and Tiersch, T.R. (2004). Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. **Cryobiology**. 48: 295-308.

Hulata, G. and Rothbard, S. (1979). Cold storage of carp semen for short periods. **Aquaculture Research**. 16: 267-269.

Jenkins-keeran, K. and Woods, L.C. (2002). An Evaluation of Extenders for the Short-Term Storage of Striped Bass Milt. **North American Journal of Aquaculture**. 64: 248-256.

Ji, X.S., Chen, S.L., Tian, Y.S., Yu, G.C., Sha, Z.X., Xu, M.Y. and Zhang S.C. (2004). Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. **Aquaculture Research**. 241: 517-528.

Jing, R., Huang, C., Bai, C., Tanguay, R. and Dong, Q. (2009). Optimization of activation, collection, dilution, and storage methods for zebrafish sperm. **Aquaculture**. 290: 165-171.

Kang, H.K., Shao, M.Y., Kho, K.H. and Zhang, Z.F. (2004). Short-term storage and cryopreservation of *Urechis unicinctus* (Echiura: Urechidae) sperm. **Aquaculture Research**. 35: 1195-1201.

Kerby, J.H. (1983). Cryogenic preservation of sperm from striped bass. **Transactions of the American Fisheries Society**. 112: 86-94.

Kwantong S. 2003. Cryopreservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* sperm. Doctoral thesis. Asian Institute of Technology. School of environment, resources and development. 65 p.

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

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

Lahnsteiner, F., Berger, B., Horvath, A., Urbanyi, B. and Weismann, T. (2000). Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. **Theriogenology**. 54: 1477-1498.

Lahnsteiner, F., Berger, B. and Weismann, T. (1999). Sperm metabolism of the teleost fish *chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability. **Journal of experimental zoology**. 284: 454-465.

Lahnsteiner, F., Berger, B. and Weismann, T. (2003). Effects of media, fertilization technique, extender, straw volum, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. **Theriogenology**. 60: 829-841.

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

Lahnsteiner, F. and Patzner, R.A. (1996). Changes in morphology, physiology, metabolism and fertilization capacity of semen of rainbow trout following cryopreservation. **The progressive Fish-Culturist**. 58: 149-159.

Lahnsteiner, F., Weismann, T. and Patzner, R.A. (1997). Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. **Aquaculture Research**. 28: 247-479.

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

Linhart, O., Rodina, M. and Cosson, J. (2000). Cryopreservation of sperm in common crap *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. **Cryobiology**. 41: 241 - 250.

Linhart, O., Rodina, M., Kocour, M. and Gela, D. (2006). Insemination, fertilization and gamete management in tench, *Tinca tinca* (L.). **Aquaculture Research**. 14: 61-73.

Maria, A.N., Viveiros, A.T.M., Freitas, R.T.F. and Oliveira, A.V. (2006). Extender and cryoprotectants for cooling and freezing of piracajuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. **Aguaculture Research**. 260: 298-306.

Mazur, P. (1997). The role of intracellular freezing in the death of cells cooled at supraoptimal rates. **Cryobiology**. 14: 251-272.

Morisawa, M., Tanimoto, S. and Ohtake, H. (1992). Characterization and partial purification of sperm activation and partial purification of sperm activating substance from eggs of the herring, *Clupea pallasii*. **Journal of Experimental Zoology**. 264: 225-230.

Muchlisin, Z.A. and Azizah, M.N.S. (2009). Influence of cryoprotectants on abnormality and motility of baung (*Mystus nemurus*) spermatozoa after long-term cryopreservation. **Cryobiology**. 58: 166-169.

Muchlisin, Z.A., Hashim, R. and Chong, A.S.C. (2004). Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. **Theriogenology**. 62: 25-34.

Piironen, J. (1993). Cryopreservation of sperm from brown trout (*Salmo trutta* m. lacustris L) and Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L). **Aquaculture**. 116: 275-285.

Rainboth, W. J. (1996). **The taxonomy, systematics, and zoogeography of *Hypsibarbus*, a new genus of Large Barbs (Pisces, Cyprinidae) from the rivers of southeastern Asia**. Los Angeles: University of California Press.

Rall, W.F., Mazur, P. and Souzur, H. (1978). Physical-chemical basic of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol. **Biophys. J**. 23: 101-120.

Rana, K.J. (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.

Rana, K. J. and McAndrew, B. J. (1989). The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa **Aquaculture Research**. 76: 335-345.

Rodina, M., Cosson, J., Gela, D. and Linhart, O. (2004). Kurokura solution as immobilizing medium for spermatozoa of tench (*Tinca tinca* L.). **Aquaculture International**. 12: 119-131.

Rosenthal, H., Klumpp, D. and Willfuhr, J. (1998). Influence of sperm density and contact time on herring egg fertilization. **Journal of Applied Ichthyology**. 4: 79-86.

Rurangwa, E., Roelants, I., Huyskens, G., Ebrahimi, M., Kime, D.E. and Ollevier, F. (1998). The minimum effective spermatozoa : egg ratio for artificial insemination and the effects of mercury on sperm motility and fertilization ability in *Clarias gariepinus*. **Fish Biology**. 53: 402-413.

Silveira, A.N., Foresti, F., Silveira, R.V. and Senhorini, J.A. (2006). Seminal analysis, cryogenic preservation, and fertility in Matrinza Fish, *Brycon cephalus* (Gunther, 1986). **Brazilian Archives of Biology and Technology**. 49: 651-659.

Steyn, G.J., and Van Vuren, J.H.J. (1987). The fertilizing capacity of cryoperserved Sharptooth catfish (*Clarias gariepinus*) sperm. **Aquaculture**. 63:187-193.

Tambassen-Cheong, M.V.P., Tan-Fermin, J.D., Garcia, L.M.B. and Baldevarona, R.B. (1995). Milt-egg ratio in artificial fertilization of the Asian freshwater catfish (*Clarias macrocephalus*) injected salmon gonadotropin-releasing hormone and domperidone. **Aquatic Living Resources**. 8: 303-307.

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

Tiersch, T.R., Figiel, C.R. and And, J.R. (2004). Cryopreservation of sperm from the Endangered Colorado Pikeminnow. **Aquaculture Research**. 66: 8-14.

Tiersch, T.R., Wayman, W.R., Skapura, D.P., Neidig, C.L. and Grier, H.J. (2004). Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). **Aquaculture Research**. 35: 278-288.

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

Viveiros, A. T. M., So, N. and Komen, J. (2000). Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm: egg dilution ratio. **Theriogenology**. 54(9): 1395-1408.

Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. (2009). Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. **Theriogenology**. 10 pages.

Vuthiphandchai, V., Thadsri, I. and Nimrat, S. (2009). Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. **Aquaculture**. 269: 58-64.

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.

Yanagimachi, R., Cherr, G.N., Pillai, M.C. and Baldwin, J.D. (1992). Factors controlling sperm entry into the micropyles of salmonid and herring eggs. **Development Growth and Differentiation**. 34: 447-461.

Yang, H., Carmichael, C., Varga, Z.M. and Tiersch, T.R. (2007). Development of a simplified and standardized protocol with potential for high-throughput for sperm cryopreservation in zebrafish *Danio rerio*. **Theriogenology**. 68: 128-136.

Yang, H., Norris, M., Winn, R. and Tiersch, T.R. (2010). Evaluation of cryoprotectant and cooling rate for sperm cryopreservation in the euryhaline fish medaka *Oryzias latipes*. **Cryobiology**. 61: 211-219.

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

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ภาคผนวก ก.

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์

1. การศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

1.1 อัตราการเคลื่อนที่

ตารางที่ ก. 1 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 24 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 2 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 36 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 3 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 48 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 4 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 60 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 5 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 72 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 6 แสดงการวิเคราะห์ว่าเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 84 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 7 แสดงการวิเคราะห์ว่าเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 96 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 8 แสดงการวิเคราะห์ว่าเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 108 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 9 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่การเก็บ 120 ชั่วโมง

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

1.2 อัตราการมีชีวิต

ตารางที่ ก. 10 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 6 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 11 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 12 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 12 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 24 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 13 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 36 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 14 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 48 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 15 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 60 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 16 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 72 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 17 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 84 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 18 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 96 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 19 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 108 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 20 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่การเก็บ 120 ชั่วโมง

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

1.3 อัตราการปฏิสนธิ

ตารางที่ ก. 21 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการปฏิสนธิ ที่การเก็บ 48 ชั่วโมง

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

ตารางที่ ก. 22 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการปฏิสนธิ ที่การเก็บ 72 ชั่วโมง

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

ตารางที่ ก. 26 แสดงการวิเคราะห์ว่าเรียนซ์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่ออัตราการปฏิสนธิ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

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

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

ตารางที่ ก. 27 แสดงการวิเคราะห์ว่าเรียนซ์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่ออัตราการมีชีวิต ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

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

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

ตารางที่ ก. 28 แสดงการวิเคราะห์ว่าเรียนซ์ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

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

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

4. ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (feezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

ตารางที่ ก. 29 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่ออัตราการปฏิสนธิ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

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

ตารางที่ ก. 30 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่ออัตราการมีชีวิตในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

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

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ก. 31 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่ออัตราการเคลื่อนที่ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

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

5. ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

ตารางที่ ก. 32 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของจำนวน sperm: egg ratio ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

ตารางที่ ก. 33 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของจำนวน sperm: egg ratio ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

ประวัตินักวิจัย

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

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

(ภาษาอังกฤษ) Dr. Samorn Ponchunchoovong

เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน: 3 9201 00947 09 0

2. ตำแหน่งปัจจุบัน: อาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3. สถานที่ติดต่อ:

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อำเภอเมือง จ.นครราชสีมา 30000
Tel: (044) 224377-8
Fax: (044) 224150
E-mail: samorn@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. ผลงานวิจัย

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

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

สมร พรชื่นชูวงศ์. 2547. รายงานการวิจัย การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวธีการแช่แข็ง 47 หน้า.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ponchunchoovong, S. 2008. Effects of freezing rates on the cryopreservation of striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage, 1878) sperm. Proceedings "The 13 th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies. September 22-26, 2008, Hanoi, Vietnam. P. 406.

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

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.

Samorn, P., Augkana, J. and Tunyaluk, R. 2010. Effect of activators solution on motility and fertilization of frozen striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus*. Proceedings "The 14 th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP). August 23-27, 2010, Pingtung Taiwan, ROC P. 321.

Samorn, P., Duangchan. D., Unnop, I., Uraiwan, P. and Sombut, S. 2010**. The effect of dilution ratios on short-term storage of Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* (Sauvage, 1878) sperm.** Proceedings "The 14 th Animal Science Congress of the Asian-Australasian Association of Animal Production Societies (AAAP). August 23-27, 2010, Pingtung Taiwan, ROC P. 322.

Ponchunchoovong, S. and Plime S. 2010. Effect of combinations of cryoprotectants and freezing rates on cryopreservation of the spermatozoa of Striped catfish, Pangasianodon hypophthalmus (Sauvage, 1878). Kasetsart J. (Nat. Sci.) 44: 1153-1161.

Ponchunchoovong, **S**., S. Kainin1, U. Imsilp, U. Piasoongnoen & S. Singsee. 2011. The effect of freezing rates and combinations cryodiluents on the cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasius bocourti* sperm. Proceedings 3rd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 26-29 July, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand. P.76.

Ponchunchoovong, S., D. Dokpong, U. Imsilp, U. Piasoongnoen& S. Singsee. 2011 Fertilization efficiency of fresh and frozen sperm from Small scale mud carp, *Cirrhinus microlepis* (Sauvage, 1878). Proceedings 3rd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 26-29 July, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand. P.75.

Boonmatun, T., **S. Ponchunchoovong**, T. Chomai , T. Vongpralub & A. Molee. 2011. Effects of extender and storage time on motility of native chicken "Luang hang kao" spermatozoa. Proceedings 3rd International conference on sustainable animal agriculture for developing countries. 26-29 July, 2011. Nakhon Ratchasima, Thailand. P.336.

Vechklang, K., S. Boonanuntanasarn**, S. Ponchunchoovong**, N. Pirarat&C. Wanapu. 2011. The potential for rice wine residual as an alternative protein source in a practical diet for Nile tilapia (Oreochromis niloticus) at the juvenile stage. *Aquaculture Nutrition*. P. 1365-2095.

7. งานวิจัยที่สนใจ

Cryopreservation of fish spermatozoa

Aquaculture (seed production)

8. งานวิจัยที่กำลังดำเนินการมี 4 เรื่อง

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

(เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 60%)

2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะโห้โดยวิธีการแช่แข็ง (Cryopreservation of Giant barb, *Catlocarpio siamensis* sperm)

(เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 70%)

3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อไก่พื้นเมืองพันธุ์เหลืองหางขาว โดยวิธีการแช่แข็ง (Cryopreservation of Thai indigenous chicken (Leung Hang Kao) spermatozoa)

(เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 50%)

4. การพัฒนาและเพิ่มผลผลิตปลาสวายโมง (Thai Panga) เพื่อการส่งออก(ภาษาอังกฤษ): The improvement of Thai Panga production for export

(เป็นหัวหน้าโครงการวิจัย รับผิดชอบโครงการวิจัย 35%)

ประวัติผู้ร่วมโครงการวิจัย

1. ชื่อ: (ภาษาไทย) นายอรรณพ อิ่มศิลป์

(ภาษาอังกฤษ) Mr. Unnop Imsilp

2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน:

3. ตำแหน่งปัจจุบัน: ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดหนองคาย (นักวิชาการประมง 7 ว.)

สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกรมประมง

4. สถานที่ติดต่อ:

สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม

ตำบลหนองญาติ อำเภอเมืองจ.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)	KasetsartUniversity	1989	Thailand
M.Sc. (Aquaculture)	KasetsartUniversity	2000	Thailand

6. สาขาวิชาการที่ชำนาญพิเศษ (แตกต่างจากวุฒิการศึกษา):

- การวิเคราะห์ต้นทุนการผลิต
- การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น

7. ประสบการณ์วิจัย:

7.1 งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้ว

งานวิจัยที่ทำสำเร็จแล้วมี 6 เรื่อง (โดยเป็นหัวหน้าโครงการ 3 เรื่องและเป็นผู้ช่วย 3 เรื่อง) ซึ่งทั้ง 6 เรื่องได้รับการตีพิมพ์เรียบร้อยแล้วและอีก 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 MekongFisheries,26-28November, 2003. MRC Conference Series No. 5. MekongRiver 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:** (ภาษาไทย) นายสมบัติ สิงห์สี

   (ภาษาอังกฤษ) MR. Sombut Singsee

2. **เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน:**

3. **ตำแหน่งปัจจุบัน:** หัวหน้าสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม (นักวิชาการประมง 6 ว.)

   ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสกลนคร

   สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกรมประมง

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 อักษรย่อปริญญาและ**

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

6. **ประสบการณ์วิจัย:**

   6.1 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 ต่อการตกไข่ 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.

6.2 งานวิจัยที่กำลังดำเนินการ

1. ผลของฮอร์โมนต่างชนิดต่อการวางไข่ของปลายอนหลังเขียว (ผู้ร่วมวิจัย 5%)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี