การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำ (*Labeochrysophekadion*) แบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง

นางสาวพิมพันธ์ละดอกท่า

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2558

CHILLED STORAGE AND CRYOPRESERVATION OF BLACK SHARKMINNOW(*Labeochrysophekadion*) SPERMATOZOA

PhimphanLadoktha

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements forthe

Degree Master of Science in Animal Production Technology

Suranaree University of Technology

Academic Year 2015

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำ (*Labeochrysophekadion*)แบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีอนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

_____

(รศ. ดร.ปราโมทย์ แพงคำ)

ประธานกรรมการ

_____

(อ. ดร.สมรพรชื่นชูวงศ์)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

_____

(อ. ดร.วิทธวัช โมพี)

กรรมการ

_____

(ผศ. ดร.อมรรัตน์โมพี)

กรรมการ

_____

(ผศ. น.สพ. ดร.ภคนิจ คุปพิทยานันท์)

กรรมการ

_____

(ศ. ดร.ชูกิจลิมปีจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการและนวัตกรรม

_____

(ศ. ดร.หนึ่ง เตียอำรุง)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

พิมพันธ์ ละดอกท่า: การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำ (*Labeochrysophekadion*) แบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง (CHILLED STORAGE AND CRYOPRESERVATION OF BLACK SHARKMINNOW (*Labeochrysophekadion*) SPERMATOZOA) อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์ ดร.สมร พรชื่นชูวงศ์, 84หน้า.

การศึกษาผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งได้แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้ 1) เพื่อศึกษาชนิดของสาร extender และระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น 2) เพื่อศึกษาชนิดของสาร extender ร่วมกับชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง และ 3) เพื่อศึกษาชนิดของสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

การศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็นใช้สาร extender 5 ชนิด (Modified Cortland solution-MC Hanks ' balanced salt solution-HBSS 0.9%NaCl Kurokura solution-KU และ Modified extender) และมีน้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม ทำการเจือจางน้ำเชื้อในสาร extender แต่ละชนิด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-5° C จากนั้นทำการทดสอบผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาเก็บ 1-5 วัน พบว่า ชนิดของสาร extender และระยะเวลาในการเก็บมีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อปลากาดำโดยมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) ในทุกทรีทเมนต์หลังจากระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน พบว่าการใช้สาร Modified extender ให้อัตราการเคลื่อนที่ (61%) อัตราการมีชีวิต (59%) และอัตราการปฏิสนธิ (41% หรือ 59% ของน้ำเชื้อสด) สูงที่สุด ($P<0.05$) และจากการศึกษาหาความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่างๆ (VAP VCL และ VSL) อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน ($P<0.01$)
การศึกษาผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งโดยใช้สาร extender 2 ชนิด คือ Modified extender และ MC ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSO MeOH และ glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10°C min^{-1} พบว่าการใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO ให้อัตราการเคลื่อนที่ (54% หรือ 60% ของน้ำเชื้อสด) อัตราการมีชีวิต (63% หรือ 66% ของน้ำเชื้อสด) และอัตราการปฏิสนธิ (45% หรือ 64% ของน้ำเชื้อสด) ไม่แตกต่างจากการใช้สาร MC ร่วมกับ 15% DMSO ($P>0.05$) ซึ่งสูงกว่าทรีทเมนต์อื่นๆ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งจากการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการ

เคลื่อนที่แบบต่างๆ (VAP VCL และ VSL) อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน (P<0.01)

การศึกษาชนิดของสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็นโดยนำทรีทเมนต์ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 (Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และ MC ร่วมกับ 15% DMSO) มาศึกษาโดยใช้สาร activation solution 5 ชนิด (Tap water 17mM NaCl+5 mMTris-HCl 50 mMNaClKCl (100 mM KCl+20 mMTris-HCl) และ SAS (50 mM NaCl+30 mM KCl+30 mMTris-HCl)) พบว่าการใช้ 50 mMNaCl ให้อัตราการเคลื่อนที่ (74% หรือ 81% ของน้ำเชื้อสด) ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (61 s) และอัตราการปฏิสนธิ (50% หรือ 72% ของน้ำเชื้อสด) ดีที่สุด (P<0.05) จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่างๆ (VAP VCL และ VSL) ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิ พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน (P<0.01)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ ลายมือชื่อนักศึกษา _____

ปีการศึกษา 2558 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา _____

PHIMPHAN LADOKTHA: CHILLED STORAGE AND CRYOPRESERVATION OF BLACK SHARKMINNOW (*Labeochrysophekadion*) SPERMATOZOA.

THESIS ADVISOR: SAMORN PONCHUNCHOOVONG, Ph.D., 84 PP.

CHILLED STORAGE/CRYOPRESERVATION/EXTENDER/ CRYOPROTECTANT/ACTIVATION SOLUTION/*Labeochrysophekadion*/SPERM

This study examined the feasibility of chilled storage and cryopreservation of black sharkminnow (*Labeochrysophekadion*) spermatozoa. Three major experiments were carried out:The first experiment was to investigatethe effect of extenders and the storage time on the chilled storage of *L.chrysophekadion* spermatozoa. The second experiment was to examine the effect of extenders and cryoprotectants onthe cryopreservationof *L. chrysophekadion* spermatozoa and the third experiment was to determine the effect of activation solutions on the frozen sperm of *L. chrysophekadion*.

The effects of five extenders (Modified Cortland solution-MC, Hanks' balanced salt solution-HBSS, 0.9%NaCl, Kurokura solution-KU and Modified extender) on the chilled storage of *L. chrysophekadion* sperm were investigated. Fresh sperm (undiluted sperm)was used as a control. Spermsamples were diluted with each extenderand refrigerated at 4-5ºC for five days. Motility, viability and fertilization rates were evaluated every day. Motility, viability and fertilization rates decreased significantly ($P<0.05$) with increasing storage time in all treatments. After a storage time of 3 days, the highest motility, viability and fertilization rates (61%, 59% and 41%,respectively) were achieved with the modified extender.In addition, this study

found that motility, parameters of velocity (VAP, VCL and VSL), viability and fertilization had a positive significant correlation (P<0.01).

The effects of two extenders (Modified extender andMC) andthreecryoprotectants (DMSO, MeOH and glycerol) at concentrations of 5, 10 and 15%, with the one-step freezing procedure (10°C min^{-1})on thecryopreservation of *L.chrysophekadion*spermatozoa were investigated.The highest motility (54% or 60% of control), viability (63% or 66% of control) and fertilization rates(45% or 64% of control) resulted from the combination of modified extender and 10% DMSO. These results were not significantly different from the combination of MC and 15% DMSO (P>0.05) and washigher than the other treatments (P<0.05).The three concentrations used (5, 10 and 15%) affected motility, viability and fertilization rates after cryopreservation. In addition, this study found that motility, parameters of velocity (VAP, VCL and VSL), viability and fertilization had a significant positive correlation (P<0.01).

The highest fertilization rate from the second experiment (modified extender +10% DMSO and MC+15% DMSO) was chosen to determine the effects of five activation solutions (Tap water, 17 mM NaCl+5 mMTris-HCl, 50 mMNaCl, 100 mM KCl+20 mMTris-HCl and SAS (50 mM NaCl+30 mM KCl+30 mMTris-HCl) on the frozen sperm of *L. chrysophekadion.* The highest percentage of motility (74% or 81% of control),duration time (61s) and fertilization rate (50% or 72% of control)were achieved with 50 mMNaCl.These results were significantly higher than the other treatments (P<0.05).In addition, this study found that motility, parameters of velocity (VAP, VCL and VSL),duration time and fertilization had a significant positive correlation (P<0.01).

School of Animal Production Technology Student's Signature _____

Academic Year 2015 Advisor's Signature_____

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจาก ได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่ง ทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินการวิจัยจากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่างๆ ได้แก่

ขอขอบพระคุณ อ .ดร.สมรพรชื่นชูวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือ ตลอดจนตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และนอกจากนี้ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำสาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน และคอยให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการศึกษางานวิจัยในครั้งนี้จนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้เสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คุณจริญ อุดมการณ์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดนครราชสีมา ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์พ่อแม่พันธุ์ปลากาดำ ตลอดจนให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คุณสุนัย พลายมี หัวหน้างานสัตว์น้ำ ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีและพนักงานประมงทุกท่าน และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทุกท่านขอขอบคุณพี่เพื่อน ตลอดจนน้องบัณฑิตศึกษาทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษาด้านวิชาการให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย และให้กำลังใจด้วยดีมาโดยตลอด

สำหรับคุณงามความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดา มารดา ญาติสนิท ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และให้คำปรึกษาที่เป็นประโยชน์ให้แก่ข้าพเจ้าด้วยดีเสมอมา

พิมพันธ์ละดอกท่า

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....ค
กิตติกรรมประกาศ.....จ
สารบัญ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ฌ
สารบัญภาพ.....ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....ฐ

บทที่

1 บทนำ.....1
1.1 ความสำคัญของปัญหา.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา.....2
1.3 สมมติฐานของการศึกษา.....3
1.4 ขอบเขตของการศึกษา.....3
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
2 ปริทัศน์และวรรณกรรมงานที่เกี่ยวข้อง.....4
2.1ชีววิทยาปลากาดำ.....4
2.2 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา.....5
2.2.1 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น.....5
2.2.2การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาวหรือวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง.....6
2.3 ผลของสาร extender และระยะเวลาในการเก็บต่อคุณภาพของน้ำเชื้อปลาในกลุ่ม Carp ที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น.....7
2.4 ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ต่อคุณภาพของน้ำเชื้อปลาในกลุ่ม Carp ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง.....9
2.5 ผลของสาร activation solution ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในปลากลุ่ม Carp.....13
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....17
3.1 สถานที่ทำการทดลอง.....17

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี 17
3.2.1 อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงปลาและฉีดฮอร์โมน 17
3.2.2 อุปกรณ์สำหรับการรีดน้ำเชื้อปลาและไข่ปลา 18
3.2.3 อุปกรณ์สำหรับการเตรียมสาร extender สาร cryoprotectant และสาร activation solution 18
3.2.4 อุปกรณ์สำหรับศึกษาส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อ 18
3.2.5อุปกรณ์สำหรับการนับความเข้มข้นของอสุจิ 18
3.2.6อุปกรณ์สำหรับประเมินอัตราการเคลื่อนที่และระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิ 19
3.2.7อุปกรณ์สำหรับประเมินอัตราการมีชีวิตของอสุจิ 19
3.2.8อุปกรณ์สำหรับประเมินอัตราการปฏิสนธิ 19
3.2.9อุปกรณ์สำหรับประเมินลักษณะทางกายภาพของตัวอสุจิแบบแช่แข็งด้วยกล้อง SEM 19
3.2.10 สารเคมี 20
3.3 วิธีการศึกษา 21
3.3.1 การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลากาดำ 21
3.3.2 ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลากาดำ 22
3.3.3 การรีดน้ำเชื้อและการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ 23
3.3.4 การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extender และระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น 28
3.3.5การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectantที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง 32
3.3.6การทดลองที่ 3 ศึกษาชนิดของ activation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง 35
4 ผลการศึกษา 37
4.2ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลากาดำ 37

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น 38
4.3 ผลของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectantที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง 44
4.4 ผลของสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง 51
5 อภิปรายผล 55
5.1 ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลากาดำ....55
5.2 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น 56
5.3ผลของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง....58
5.4ผลของสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง 61
6 สรุปและข้อเสนอแนะ 64
6.1 สรุป 64
6.2 ข้อเสนอแนะ 64
รายการอ้างอิง 65
ภาคผนวก ก ตารางแสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์ 75
ประวัติผู้เขียน 84

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1ส่วนประกอบของไอออน(K^+ Na^+ Ca^{2+} และCl^-) และค่าosmolalityใน seminal plasma ของปลากลุ่มcyprinids.....6

3.1 ค่า Analysis setup สำหรับประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ 25

3.2 ส่วนประกอบทางเคมี ค่า osmolality และค่า pH ของสาร extender ที่ใช้เจือจาง น้ำเชื้อ ปลากาดำ.....30

3.3 แผนการทดลองการศึกษาสารextender 5 ชนิด (MC; Modified Cortland solution HBSS;Hanks' balanced salt solution 0.9%NaClKU; Kurokura solution และ Modified extender)ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบช่เย็น.....31

3.4 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร extender 2 ชนิด (Modified extender และ MC) ร่วมกับ สาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSOMeOH และ glycerol) และ 3 ระดับความ เข้มข้น(5 10 และ 15%) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบช่แข็ง.....34

3.5 ค่า osmolality และค่า pH ของ activation solution 35

3.6 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร activation solution 5 ชนิด (Tap water 17mM NaCl+5 mMTris-HCl 50 mMNaClKCl (100 mM KCl+20 mMTris-HCl) และ SAS) ต่ออัตราการเคลื่อนที่ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิ ของอสุจิปลากาดำที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และสารMC ร่วมกับ 15% DMSO 36

4.1 ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลากาดำ 37

4.2 ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ (Mean±SE) ของการเก็บรักษา น้ำเชื้อปลากาดำที่ระยะเวลาการเก็บ1-5วัน.....39

4.3 ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต (Mean±SE) ของการเก็บรักษา น้ำเชื้อปลากาดำที่ระยะเวลาการเก็บ1-5วัน.....39

4.4 ผลของสาร extender ต่ออัตราการปฏิสนธิ (Mean±SE) ของการเก็บรักษา น้ำเชื้อปลากาดำที่ระยะเวลาการเก็บ1-5วัน.....40

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ **หน้า**

4.5ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่อัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิ
ของน้ำเชื้อปลากาดำในสารextender 2 ชนิด (Modified extenderและ MC)
ร่วมกับสารcryoprotectant 3 ชนิด(DMSO MeOHและglycerol) ที่ระดับ
ความเข้มข้น 5 10และ 15% 46
4.6ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ และ
อัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากาดำในสารactivation solution 5 ชนิด
(Tap water 17mM NaCl+5 mMTris-HCl 50 mMNaClKCl (100 mMKCl
+20 mMTris-HCl)และSAS) เมื่อใช้สาร Modified extenderร่วมกับ
10% DMSO และ MC ร่วมกับ 15% DMSO 52

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะภายนอกของปลากาดำ 4
3.1ปลากาดำเพศเมีย (ก) และปลากาดำเพศผู้ (ข) 22
3.2สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (haemacytometer ;ก) บริเวณที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1 2 3 4 และ 5 ;ข) 23
3.3เครื่องวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (ก) การโหลดตัวอย่างลงบน slide 2X-cell (ข) 24
3.4 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin-nigrosinภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย100 เท่า 26
3.5 ขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตรและระบบการฟักไข่ปลากาดำ 27
3.6 การพัฒนาของคัพภะไข่ปลากาดำระยะ gastrula stage (7-8 ชั่วโมง) 27
3.7 แผนภาพกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น 29
3.8 แผนภาพกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง 33
4.1 ผลของระยะเวลาการเก็บ1-5วันต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากาดำ 41
4.2ผลของระยะเวลาการเก็บ1-5วันต่ออัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลากาดำ 41
4.3ผลของระยะเวลาการเก็บ1-5วันต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากาดำ 42
4.4ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (ก) VCL (ข) และ VSL (ค) ที่ระยะเวลาการเก็บ 1-5 วัน 43
4.5ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการมีชีวิต (ก) และอัตราการปฏิสนธิ(ข) และระหว่างอัตราการมีชีวิตกับอัตราการปฏิสนธิ (ค) ที่ระยะเวลาการเก็บ 1-5 วัน 44
4.6ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (ก) VCL (ข) และ VSL (ค) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง 48
4.7ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการมีชีวิต (ก) และอัตราการปฏิสนธิ(ข) และระหว่างอัตราการมีชีวิตกับอัตราการปฏิสนธิ (ค) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง 49

สารบัญภาพ(ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4.8ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิปลากาดำปรกติ ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วน midpieceและส่วนหาง โดยส่วนหัวจะมีลักษณะกลม ส่วน midpieceจะมีขนาดสั้นและส่วนหางมีลักษณะยาว (น้ำเชื้อสด (ก และ ข) น้ำเชื้อที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งด้วยสาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และสาร MC ร่วมกับ 15% DMSO (ค-ฉ)ที่กำลังขยาย2,500 เท่า และ 5,000 เท่าตามลำดับจากภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM..... 50

4.9 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิที่ทำลายโดยเฉพาะบริเวณส่วนหัวเกิดการแตกและแยกจากส่วนหาง เมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งด้วยสาร Modified extenderร่วมกับ15% glycerol ที่กำลังขยาย2,500 เท่า (ช) และ5,000 เท่า(ซ) จากภาพถ่ายด้วยกล้องSEM..... 51

4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (ก) VCL (ข) และ VSL (ค)ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งที่ใช้สาร activation solution 5 ชนิด 53

4.11ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิ(ก)และระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (ข)และระหว่างอัตราการปฏิสนธิกับระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิ(ค)ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งที่ใช้สาร activation solution 5 ชนิด..... 54

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

AS	=	Activation solutions
CASA	=	Computer assisted sperm analysis
CCSE	=	Common carp sperm extenders
CF-HBSS	=	Calcium free Hank's balance salt solution
DMA	=	Dimethlyacetamide
DMF	=	Dimethyl formamide
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
GFSE	=	Goldfish sperm extenders
HBSS	=	Hanks ' balanced salt solution
hCG	=	Human chorionic gonadotropin
KU	=	Kurokura solution
MC	=	Modified Cortland solution
MeOH	=	Methanol
OTOP	=	One Tambon One Product (หนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์)
PVP	=	Polyvinylpyrrolidone
Prog.	=	Progressive
SAS	=	Saline activator solutions
SEM	=	Scanning electron microscope (กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด)
VAP	=	Average path velocity
VCL	=	Curvilinear velocity
VSL	=	Straight line velocity

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

จากสภาพแวดล้อมของประเทศที่ถูกทำลายและการทำประมงแบบผิดกฎหมายทำให้ปลาเศรษฐกิจบางชนิดในธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลง นอกจากนี้ปลาบางชนิดมีการเจริญพันธุ์ของเพศผู้เพศเมียไม่พร้อมกันเช่น ในปลาดุกอุย (Vuthiphandchai, Thadsri andNimrat, 2009) และ ปลาเผาะ (Kainin, Ponchunchoovong, Imsilp and Singsee, 2014) เป็นต้น ทำให้เป็นอุปสรรคสำหรับการเพาะขยายพันธุ์ปลาในประเทศไทย ปลากาดำเป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งซึ่งในธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลงปลากาดำขนาดใหญ่นิยมนำมาบริโภคภายในครัวเรือนเนื่องจากมีรสชาติอร่อยในปัจจุบันมีการนำปลากาดำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ปลาส้มและแจ่วบองปลาร้าซึ่งเป็นสินค้า OTOPที่ขึ้นชื่อของวิสาหกิจชุมชนบ้านด่านใหม่ ตำบลโขงเจียม จังหวัดอุบลราชธานี ทำให้สินค้ามีมูลค่าทางการตลาดมากขึ้น (http://www.thaitechno.net/t1/profile.php?uid=44348) นอกจากนี้ปลากาดำยังส่งออกเป็นปลาสวยงามเป็น อันดับที่ 32 จากปลาจำนวน 140 ชนิดที่มีการส่งออก(สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ, 2549) ในช่วงฤดูฝน ประมาณเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน ปลากาดำจะอพยพจากบริเวณแม่น้ำโขงและแม่น้ำเจ้าพระยาไปวางไข่ในบริเวณที่ราบน้ำท่วมที่มีระดับน้ำตื้น (Poulsen, Hortle, Valbo-Jorgensen, Chan, Chhuon, Viravong, Bouakhamvongsa, Suntornratana, Yoorong, Nguyen and Tran, 2004)และช่วงเดือนตุลาคม-ธันวาคม ลูกปลาและปลาขนาดใหญ่จะอพยพไปยังบริเวณที่ราบน้ำท่วมถึงและกลับไปยังแม่น้ำโขง(Rainboth, 1996)สำหรับในประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวและประเทศไทยปลากาดำจะอพยพจากบริเวณแม่น้ำโขงในประเทศไทยไปยังประเทศสาธารณรัฐประชาธิปไตยประชาชนลาวในช่วงเริ่มต้นของฤดูฝน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของฤดูกาลในประเทศไทยทำให้ประสบปัญหาการขาดแคลนปลากาดำขนาดใหญ่ในบริเวณลุ่มแม่น้ำโขงด้วยเหตุนี้วิสาหกิจชุมชนของตำบลโขงเจียมจึงต้องซื้อปลากาดำขนาดใหญ่ผ่านพ่อค้าคนกลางจากประเทศลาว ทำให้ราคาของปลากาดำเพิ่มสูงขึ้นนอกจากนี้ยังพบว่าปลากาดำเพศผู้มีปริมาตรน้ำเชื้อน้อย โดยมีปริมาตรน้ำเชื้อประมาณ 1.15 มิลลิลิตร/ตัว แต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อถึง13.00±2.62×10^{9}ตัว/มิลลิลิตรซึ่งเป็นอุปสรรคสำหรับการเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้เนื่องเหตุนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำจึงน่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยในการแก้ปัญหาดังกล่าว โดย การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบช่เย็นหรือแบบแช่แข็ง การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น จะใช้สาร extenderสำหรับเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อเป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิเพื่อใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึมอีกทั้งยังกันไม่ให้อสุจิเคลื่อนที่หรือลดการใช้พลังงา

ของตัวอสุจิจะช่วยแก้ปัญหาในกรณีที่ปลามีปริมาตรน้ำเชื้อน้อยแต่มีความเข้มข้นของอสุจิสูงให้มีการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุดตลอดจนช่วยยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในกรณีที่แม่พันธุ์ปลายังไม่พร้อมที่จะทำการผสมเทียมในช่วงระยะเวลาสั้น สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งก็เป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยอนุรักษ์พันธุ์ปลากาดำ เพราะเป็นวิธีที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำไว้ได้นานเป็นระยะเวลาหลายปีโดยการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) ซึ่งอาศัยการทำงานของสาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant ซึ่งสาร cryoprotectant มีหน้าที่ป้องกันอันตรายของเซลล์ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลายสารเคมีกลุ่มนี้มีข้อเสียคือมีความเป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่สูงเกินไปในทางตรงกันข้ามเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่น้อยเกินไปจะไม่สามารถป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลายนอกจากนี้ยังทำการศึกษาชนิดของสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อปลากาดำที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งจากการศึกษาที่ผ่านมามีการรายงานผลของอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งพบว่าให้ผลต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดในปลาหลายชนิด เช่น ในปลาไน (Linhartand Rodina, 2000) ปลา shabout(*Barbusgrypus*) (Dogu, 2012)และปลา olive barb (*Puntiussarana*) (Nahiduzzaman, Hassan, Khanam, Mamun, Hossain and Tiersch, 2011)เป็นต้น การเลือกใช้สาร activation solution ที่เหมาะสมจะช่วยปรับปรุงการผสมเทียมและเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อ ที่เก็บรักษาแบบ แช่แข็ง ดังนั้นการประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็ บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบ แช่เย็น และแบบ แช่แข็ง จะช่วยแก้ปัญหาน้ำเชื้อที่มีอยู่อย่าง จำกัดให้ เกิดประโยชน์สูงสุดทำให้การผสมเทียมง่ายขึ้นและสามารถผลิตลูกปลาได้ เพิ่มมากขึ้น และยังมีประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์พันธุ์ปลากาดำ

ด้วยเหตุนี้ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็นชนิดของสาร extender ร่วมกับ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งและชนิดของสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาชนิดของสาร extenderและระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น

1.2.2 เพื่อศึกษา ชนิดของ สาร extenderร่วมกับ ชนิดและระดับความเข้มข้ นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อปลากาดำแบบ แช่แข็ง

1.2.3 เพื่อศึกษาชนิดของสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

1.3 สมมติฐานของการศึกษา

1.3.1 การใช้สารextenderที่มีกลูโคสเป็นแหล่งพลังงานและมี Tris-HClเป็นบัฟเฟอร์สามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลากาดำที่เก็บแบบแช่เย็นได้นานที่สุด

1.3.2 การใช้สารModified extenderร่วมกับการใช้ DMSO เป็นสารcryoprotectantสามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งได้

1.3.3 การใช้สาร activation solution ที่มีสาร NaClเป็นองค์ประกอบสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลากาดำที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งได้

1.4 ขอบเขตของการศึกษา

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำในครั้งนี้เพื่อศึกษาชนิดของสาร extenderและระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น ศึกษา ชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารcryoprotectantที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแบบแช่เย็นจะประเมินจากอัตราการเคลื่อนที่อัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งจะประเมินจากอัตราการเคลื่อนที่อัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิตรวจสอบความผิดปกติของตัวอสุจิภายหลังจากการแช่แข็งจากภาพถ่ายด้วยกล้อง SEMและเพื่อศึกษาชนิดของสารactivation solution ที่เหมาะสมสำหรับอสุจิปลากาดำที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งสามารถแก้ไขปัญหากรณีที่ขาดแคลนพ่อพันธุ์ปลานอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในธนาคาร น้ำเชื้อสามารถขนส่งในระยะไกลได้สะดวก ทำ ให้มีการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุดเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิตทั้งการเก็บน้ำเชื้อแบบแช่แข็งสามารถช่วยพัฒนาการเพาะขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ปลาได้ และสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาอื่นๆที่ใกล้สูญพันธุ์ได้และการใช้สาร activation solution ที่เหมาะสมเพื่อ เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งสำหรับหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์หรือผู้ประกอบการธุรกิจสัตว์น้ำ

บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1ชีววิทยาปลากาดำ

ปลากาดำมีชื่อสามัญว่า black sharkminnow(ภาพที่ 2.1)ปลากาดำเป็นปลาน้ำจืดขนาดกลาง ลำตัวเรียวยาวแบนข้างพื้นลำตัวสีม่วงดำหรือน้ำเงินดำเกล็ดมีขนาดใหญ่คลุมตลอดลำตัวยกเว้นส่วนหัวหัวเรียวแหลมปากยืดหดได้ไม่มีฟันริมฝีปากบนและล่างเป็นหยักมีติ่งเนื้อเป็นฝอยสั้นๆอยู่ร่วมกันเป็นกระจุกมีหนวด 2 คู่ครีบหลังมีขนาดใหญ่และสูงมากครีบหูครีบท้องและครีบก้นเรียวยาวและมีขนาดไล่เลี่ยกันครีบหางยาวเป็นแฉกเว้าลึกครีบทุกครีบมีสีดำพบทั้งในแหล่งน้ำนิ่งและน้ำไหลทั่วประเทศ (สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์ และกาญจนรี พงษ์ฉวี,2543) ปลากาดำเป็นปลาที่มีพฤติกรรมว่ายแหวกตามหินและชอบกัดเกล็ดของปลาอื่นกินตะไคร่น้ำและซากพืชซากสัตว์เป็นอาหาร(ชาลิตวิทยานนท์,2547) ปลากาดำโดยทั่วไปพบว่ามีไข่แก่ในช่วงฤดูฝนโดยสามารถทำการเพาะพันธุ์ปลากาดำได้ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมจนถึงกลางเดือนพฤศจิกายนประเภทของไข่ปลากาดำมีลักษณะเป็นไข่ครึ่งจมครึ่งลอยลักษณะของไข่แก่จะมีสีน้ำตาลปนเทา สามารถจำแนกตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้

อาณาจักร Animalia

ไฟลัมChordata

ชั้นActinopterygii

อันดับCypriniformes

วงศ์Cyprinidae

สกุล*Labeo*

สปีชีส์*Labeochrysophekadion*

ภาพที่ 2.1 ลักษณะภายนอกของปลากาดำ

2.2 วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

2.2.1 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็น

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นจะเก็บที่อุณหภูมิ 0-4°C มีปัจจัยที่สำคัญคือ สาร extender ซึ่งใช้เพื่อเจือจางน้ำเชื้อและเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อส่วนประกอบของสาร extender เป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิสำหรับใช้ในกระบวนการเมทาบอลิซึม อีกทั้งป้องกันไม่ให้อสุจิเคลื่อนที่หรือลดการใช้พลังงานของตัวอสุจิ (extend motility) และมีชีวิตอยู่รอดตลอดเวลาที่เก็บรักษาดังนั้นการเลือกชนิดสาร extender ควรจะพิจารณาค่าออสโมลาลิตี้ (osmolality) และควรมีค่า pH ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา (seminal plasma) ที่ทำการศึกษา ปลาแต่ละกลุ่มมีค่าออสโมลาลิตี้แตกต่างกันเช่น 280-300 mOsmkg^{-1} สำหรับกลุ่มปลาน้ำจืดและ 200-300 mOsmkg^{-1} สำหรับปลาน้ำเค็ม (Wayman and Tiersch, 2000) โดยปกติอสุจิของปลาจะไม่มีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ใน seminal tract (Stoss, 1983) ซึ่งตรงข้ามกับอสุจิของสัตว์เลี้ยงคลานหรือสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Krasznai, Marian, Balkay, Gasper and Tron, 1995) ค่าออสโมลาลิตี้และส่วนประกอบของ ไอออนใน seminal plasma จะป้องกันการเคลื่อนที่ของอสุจิปลาใน sperm duct (Billard, 1986) seminal plasma ผลิตจาก sperm duct มีหน้าที่ช่วยให้อสุจิมีชีวิตหลังจากที่อสุจิถูกปล่อยออกมาจากอัณฑะ (Cieresz ko, 2008) สารละลายที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำกว่าหรือสูงกว่า seminal plasma จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิปลา อสุจิของปลาน้ำจืดจะเคลื่อนที่เมื่อเจือจางใน hypotonic solution (คือสารละลายภายนอกเซลล์มีความเข้มข้นน้อยกว่าภายในเซลล์) (Morisawa and Suzuki, 1980; Morisawa, Suzuki, Shimizu, Morisawa and Yasuda, 1983; Marian, Krasznai, Balkay, Balazs, Emri, Bene and Tron, 1993 ; Marian, Krasznai, Balkay, Emri and Tron, 1997) ปกติอสุจิของปลาน้ำจืดในครอบครัว Cyprinidae (goldfish carp crucian carp and dace) จะยังไม่เคลื่อนที่แม้จะเจือจางในสารละลาย เช่น NaCl KCl mannitol หรือ glucose เนื่องจากมีค่าออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกับ seminal plasma (300 mOsm kg^{-1}) แต่อสุจิจะเคลื่อนที่ได้เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำกว่า seminal plasma (<200 mOsm kg^{-1}) ซึ่งการเคลื่อนที่ของอสุจิจะถูกกดโดยค่าออสโมลาลิตี้ใน seminal plasma ใน sperm duct และจะเริ่มเคลื่อนที่เมื่อมีการลดค่าออสโมลาลิตี้ตอนวางไข่ในน้ำจืด (Morisawa *et al*., 1983) ค่า pH ภายในเซลล์และนอกเซลล์มีผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิซึ่งค่า pH ภายนอกเซลล์มีผลต่อความเข้มข้นของโปรตอนภายในเซลล์ ซึ่งมีผลต่อ membrane potential เช่น ลักษณะการเคลื่อนที่ (Boitano and Omoto, 1992) ปกติค่า pH ใน seminal plasma ของปลา rainbow trout อยู่ในช่วง 7.5-8.5 สำหรับปลาในกลุ่ม carp อสุจิจะเคลื่อนที่ในสารละลายที่มีค่า pH ภายนอกเซลล์อยู่ในช่วง 6-9 (Redondo-Muller, Cosson and Cosson, 1991; Perchec-Poupard, Gatti and Cosson, 1997) Alavi, Rodina, Policar and Linhart (2009) ได้รวบรวมเอกสารพบว่าไอออนใน seminal plasma ในปลากลุ่ม cyprinids จะพบ K^+ Na^+ และ Cl^- มากกว่า Ca^{2+} และมีค่าออสโมลาลิตี้อยู่ในช่วง 230-346 mOsmokg^{-1} ดังแสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่2.1 ส่วนประกอบของไอออน(K^+ Na^+ Ca^{2+} และCl^-) และค่าosmolality ใน seminal plasma ของปลากลุ่มcyprinids

Species	Osmolality (mOsm kg^{-1})	K^+	Na^+	Ca^{2+}	Cl^-	Author(s)
		(mmol l^{-1})				
Tincatinca	230	1.93	18.41	0.6		Linhart*et al.*(2003)
Cyprinuscarpio	290-346	73-78	58-71	2-2.75	96-111	Kruger *et al.*(1984)
	258					Redondo-Muller *et al.*(1991)
	302	82	75	2		Morisawa*et al.*(1983)
		67.8	94	12.5		Clemens and Grant (1965)
	286	44	51	0.7		Plouidy and Billard (1982)
Ctenopharyngodonidella		35	81	1		Gosh (1985)
Alburnusalburnus	254-267	40	67			Lahnsteiner*et al.*(1996)
Barbusbarbus	268-276	84-85	70-76	0.3-0.4	121-125	Alavi*et al.* (2008a, b)
	249-294	75-98	59-78	0.1-0.6	113-128	Alavi*et al.*(2009)

ที่มา: Alavi*et al*. (2009)

2.2.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะยาวหรือการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง

สำหรับวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะยาวหรือการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งนั้นจะต้องอาศัยสาร extender สาร cryoprotectantและอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ-196°C สาร cryoprotectantเป็นสารที่ช่วยป้องกันอันตรายแก่อสุจิในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ สารที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ เช่นglycerol dimethylsulfoxide (DMSO)dimethlyacetamide (DMA)dimethyl formamide (DMF)สารกลุ่มแอลกอฮอล์ เช่น methanol ethanol และpropanediolเป็นต้น ซึ่งสารเคมีเหล่านี้จะต้องซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายระหว่างกระบวนการแช่แข็ง และการ

ละลาย สารเคมีกลุ่มนี้มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่ง คือ เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อเมื่อใช้ในระดับ ความเข้มข้นที่สูงเกินไป และเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นที่น้อยเกินไป จะไม่สามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ในระหว่างการแช่แข็งและการละลายได้และสารที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ เช่น polyvinylpyrrolidone (PVP) และน้ำตาล เช่น sucrose glucose และ manital เป็นต้น ซึ่งสารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์และมีความเป็นพิษน้อยกว่า cryoprotectant ชนิดที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ โดยสาร cryoprotectant จะมีผลต่อคุณสมบัติของๆ เหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ซึ่งจะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังจากการแช่แข็งได้ การเลือกชนิดของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง เนื่องจากสามารถป้องกันอันตรายจาก cold-shock จากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายนอกเซลล์หรือภายในเซลล์ (Yang, Carmichael, Varga and Tiersch, 2007) สาร cryoprotectant จะสามารถป้องกันอันตรายที่จะเกิดกับเซลล์ได้เมื่อมีการใช้ร่วมกันระหว่างชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะสม (Vuthiphandchai, Wilairattanadilok, Chomphuthawach, Sooksawat and Nimrat, 2014) โดยปกติไม่มีสาร cryoprotectant หรือความเข้มข้นสากลที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา (Gwo, 2000) และชนิดของสาร cryoprotectants ที่เหมาะสมนั้นจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของปลาและวิธีการศึกษาที่แตกต่างกัน (Vuthiphandchai, Chomphuthawach and Nimrat, 2009) ทั้งนี้เพราะสาร cryoprotectants แต่ละชนิดมีความสามารถในการซึมผ่านเซลล์ที่แตกต่างกันและตัวอสุจิมีระดับความทนต่อความเป็นพิษของสาร cryoprotectants ที่แตกต่างกันอีกด้วย (Cabrita, Robles, Cherguinni, Wallace and Herraez, 2003) โดยประสิทธิภาพของสาร cryoprotectants จะขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่างความเป็นพิษและความสามารถในการป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ (Lahnsteiner, Berger, Weismann and Patzner, 1996a) นอกจากนี้อัตราการลดอุณหภูมิเป็นส่วนประกอบหนึ่งที่มีความสำคัญสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งหากมีการลดอุณหภูมิช้าเกินไปก็จะทำให้มีการสูญเสียน้ำจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ในปริมาณที่มากส่งผลให้เกิดภาวะเซลล์เหี่ยวและอาจทำให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายทั้งในสารละลายและตัวอสุจิสูงเกินไป เมื่อตัวอสุจิสัมผัสอยู่กับสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงเป็นเวลานานก็จะทำเกิดอันตรายต่อเซลล์อสุจิได้ และหากมีการลดอุณหภูมิเร็วเกินไปจะทำให้น้ำภายในเซลล์เคลื่อนที่ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้น้อย ส่งผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์

2.3 ผลของสาร extender และระยะเวลาในการเก็บต่อคุณภาพของน้ำเชื้อปลาในกลุ่ม Carp ที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น

Bozkurt, Ogretmen and Secer (2009) ได้ศึกษาผลของชนิดของ extender และระยะเวลาในการเก็บในปลา Grass carp (*Ctenopharyngodonidella*) ในระหว่างฤดูวางไข่ โดยใช้สาร extender 3 ชนิด คือ Extender I (300 mM glucose solution) Extender II (1% NaCl solution) และ Modified ionic solution (75 mM NaCl 70 mM KCl 2 mM $CaCl_2$ 1 mM $MgSO_4$ และ 20 mM Tris) โดยเก็บไว้ในตู้เย็นซึ่งมีอุณหภูมิ 4°C

นาน 8 ชั่วโมงพบว่าระยะในการเก็บที่เพิ่มขึ้นทำให้อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการปฏิสนธิลดลงแต่อย่างไรก็ตามการใช้สารExtender II ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด (35±2.89%) ในเดือนมิถุนายน แต่เมื่อพิจารณาผลของอัตราการปฏิสนธิพบว่าการใช้สาร Extender Iให้อัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด (25±1.15%)และแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่นที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.05$)และนอกจากนี้ยังพบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสาร extender ทุกชนิดให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าน้ำเชื้อที่ไม่ได้เจือจางด้วยสารextender อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) Bozkurt and Secer(2005) ได้ศึกษาผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นในปลาไน(*Cyprinuscapio*) โดยเจือจางในสาร extender 2 ชนิด คือ Kurokura solution(440 mgNaCl 620 mg KCl 22 mg $CaCl_2$20 mg $NaHCO_3$ และ8 mg $MgCl_2$)และ Extender II (350 mM glucose และ 30 mMTris) โดยเก็บไว้ในตู้เย็นซึ่งมีอุณหภูมิ 4°C นาน 72 ชั่วโมง พบว่าระยะในการเก็บที่เพิ่มขึ้นทำให้อัตราการเคลื่อนที่ลดลง แต่อย่างไรก็ตามสารExtender I และ Extender II ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และให้อัตราการฟักไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด($P>0.05$) Rodina, Cosson, Gela and Linhart(2004) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ Kurokura solution เป็นสาร extenderในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาTench(*Tincatinca*)โดยทำการศึกษาความเข้มข้นของ NaCl4 ระดับ ได้แก่ 130 mM 160 mM 180 mMและ 200 mMในส่วนประกอบของ Kurokura solution พบว่าน้ำเชื้อที่ทำการเจือจางกับ Kurokura solution ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 180 mMมีอัตราการปฏิสนธิ (41%) และอัตราการฟัก (41%) สูงกว่าการเจือจางกับ Kurokura solution ที่มีความเข้มข้นของ NaClที่ระดับอื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาและกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) นอกจากนี้ยังมีการใช้สาร extender ชนิดอื่นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากลุ่ม carp อย่างเช่นการใช้Modified Cortland'ssolution เป็นสาร extender ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์ (*Cirrhinusmicrolepis*) แบบแช่เย็น พบว่าหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-9°C เป็นระยะเวลา48 ชั่วโมง พบว่าให้อัตราการปฏิสนธิ (70.88±5.03%) และอัตราการฟัก (75.59±4.50%) ไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) (Singsee, Imsilp, Pewnane and Sukumasavin, 2005)Jing, Huang, Bai, Tanguay and Dong (2009) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาZebrafish(*Daniorerio*) แบบแช่เย็น โดยใช้สาร extender 2 ชนิด คือ Hank's balanced salt solution (HBSS) และ Buffered sperm motility-inhibiting solution (BSMIS) พบว่า ที่ระยะเวลาในการเก็บ 10 ชั่วโมง การใช้ HBSS ให้อัตราการเคลื่อนที่ (67±15%) แตกต่างจากการใช้ BSMIS (3±6%) อย่างมี นัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P<0.001$) และจากการศึกษาของ Chew, Hassan, Rashid and Chuah(2010) ทำการศึกษาผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทย (*Probarbusjullieni*) แบบแช่เย็นโดยใช้สาร extender 14 ชนิด คือHBSS (137 mMNaCl5.4 mMKCl1.1 mM $CaCl_2$ 0.8 mM $MgSO_4$ 0.17 mM Na_2HPO_4 0.45 mM KH_2PO_4 4.2 mM $NaHCO_3$และ5.6 mM fructose) Ca-F HBSS(152 mMNaCl5.9 mMKCl 0.9 mM $MgSO_4$ 0.36 mM Na_2HPO_4 0.5 mM KH_2PO_4 4.6 mM $NaHCO_3$และ6.16 mMfructose)Extender C (125 mM $KHCO_3$ 250 mM sucrose และ 9.76

mM $C_{10}H_{17}N_3O_6S$)Extender D (51mMNaCl 6 mM $NaHCO_3$ และ202 mM glucose) Extender E (51 mMNaCl 6 mM $NaHCO_3$ และ303 mM glucose)Extender F (128 mMNaCl13.4 mMKCl 1.1 mM $CaCl_2$ 0.95 mM $MgSO_4$ 1.14 mM Na_2HPO_4และ5.1 mM glucose)Extender G (135.5 mMNaCl 40 mMKCl 1.25 mM $CaCl_2$ 1.25 mM $MgSO_4$ 4.2 mM Na_2HPO_4และ5.1 mM glucose)Extender H (175 mM sucrose) Extender I (333 mM fructose)Extender J (111 mMNaCl 40.2 mMKCl 2.1 mM $CaCl_2$ และ 2.4mM $NaHCO_3$)Kurokura(128 mMNaCl 2.7 mMKCl 1.4 mM $CaCl_2$และ 2.4mM $NaHCO_3$)Kurokura (75 mMNaCl 83.2 mMKCl 1.5 mM $CaCl_2$ 0.4 mM$MgCl_2$ และ 2.4mM $NaHCO_3$)Extender M(62 mMNaCl 134 mMKCl 1.5 mM $CaCl_2$ 0.4 mM$MgCl_2$ และ 2.4mM $NaHCO_3$) และ Extender N (101 mMNaCl 101 mMKClและ19.8 mMTris) สาร extender ทุกชนิดปรับค่า pH เท่ากับ 7.5 และปรับค่าออสโมลาลิตี้เท่ากับ285±10 mOsm kg^{-1}ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C นาน24 ชั่วโมง พบว่าการใช้ Ca-F HBSS ให้ผลของอัตราการเคลื่อนที่ (69.3±5.9%) สูงที่สุดและแตกต่างจากการใช้ทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ($P<0.05$) และจากการศึกษาของHassan, Nahiduzzaman, Mamun, Taher and Hossain (2014)ได้ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาIndian major carp (*Labeocalbasu*) โดยใช้สาร Alsever's solution และ0.9% NaClหลังจากการเก็บ60 ชั่วโมงพบว่าการใช้สาร extenderทั้งสองชนิดมีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน($P>0.05$)

จากการศึกษาผลของการใช้สาร extender ยังมีความหลากหลายและผลที่ได้ก็แตกต่างกันออกไปตามชนิดของปลาทั้งนี้เนื่องมาจากในปลาแต่ละชนิดมีส่วนประกอบของไอออนใน seminal plasma ที่แตกต่างกันเป็นผลทำให้ค่าออสโมลาลิตี้และpHก็แตกต่างกันตามชนิดของปลาดังนั้นการเลือกสาร extender ให้มีส่วนประกอบของไอออนใน seminal plasma มีค่า pH และออสโมลาลิตี้ที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็นสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบเย็นเพราะสาร extender นอกจากสามารถยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ให้กับตัวอสุจิแล้วยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อได้อีกด้วยจึงน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการประยุกต์ใช้กับปลากาดำซึ่งพบว่ามีปริมาตรน้ำเชื้อน้อยแต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อสูง เพื่อ การใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุดดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงต้องการหาสาร extender ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบเช่เย็น

2.4 ผลของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารcryoprotectantต่อคุณภาพของน้ำเชื้อปลาในกลุ่มCarp ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

Urbanyi, Szabo, Miskolczi, Mihalffy, Vranovics and Horvath (2006) ศึกษาผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในกลุ่ม Cyprinids 4 ชนิด ได้แก่ Roach (*Rutilusrutilus*) Bream (*Abramisbrama*) Silver bream (*Bliccabjoerkna*) และ Barbel (*Barbusbarbus*) โดยวิธีแช่แข็งโดยใช้สาร extender 5 ชนิด (Fructose Glucose Sucrose KClและ Modified

Kurokura'sextender) ร่วมกับ cryoprotectants 2 ชนิด (10% MeOHและ 10% DMSO) พบว่าการใช้ Fructose หรือ Glucose ร่วมกับ 10%MeOHให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ในปลาทั้ง 3 ชนิด ยกเว้นในปลา Bream (*Abramisbrama*) พบว่าการใช้ Fructose หรือ Glucose ร่วมกับ 10%MeOHหรือ 10% DMSO ให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ อัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักไม่แตกต่างกัน($P>0.05$) Horvath, Miskolczi and Urbanyi(2003) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อ โดยวิธีแช่แข็งใน ปลาไน (*Cyprinuscarpio*) โดยใช้สาร cryoprotectant 2 ชนิด (10% DMSO และ 10% MeOH) ร่วมกับสาร extender 5 ชนิด (Sucrose Glucose FructoseKCl และ Saline carp sperm extender) พบว่าการใช้ 10% MeOHร่วมกับ glucose ให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (63%) อัตราการปฏิสนธิ (74%) และอัตราการฟัก (67%) ไม่ต่างจาก การใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$) จากการศึกษา ของIrawan, Vuthiphandchaia and Nimratc (2010) ได้ทำการศึกษาใน ปลาไนเช่นเดียวกันโดยใช้สารextender 6 ชนิด (CCSE 1-CCSE 6) ร่วมกับ สาร cryoprotectant 3 ชนิด (10% DMSO 10% MeOHและ 10% Propylene glycol) พบว่าการใช้ CCSE 2 ร่วมกับ 10% DMSO ให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (94.5±3.3%) ซึ่งไม่ต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (98.6±0.7) ($P>0.05$)และจากการศึกษาในปลาไนเช่นเดียวกันโดยใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด (15% DMSO 15% DMA และ 15% glycerol) ร่วมกับสาร extender 3 ชนิด ได้แก่ Extender 1 (Kurokura*et al.*, 1984) Extender 2 (Zhang and Liu, 1991) และ Extender 3 (Cognie*et al.*, 1989)พบว่าการใช้ 15% DMSO ร่วมกับ สาร Extender 1 ให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิสูงสุด (55%) แต่เมื่อดูผลอัตราการปฏิสนธิพบว่าการใช้ 15% DMA ร่วมกับ สาร Extender 3 ให้อัตราการปฏิสนธิ (25.9%) แตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Akcay, Bozkurt, Secer and Tekin, 2004)และจากการศึกษาของ Yavas, Bozkurt and Yildiz (2014)ซึ่งทำการศึกษาในปลาไนเช่นเดียวกัน โดยใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSO DMA และ Egg yolk) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ร่วมกับ Kurokuraเป็นสาร extenderพบว่าการใช้ 10% DMSO 10% DMA 15% DMA และ Egg yolk ทั้งสามระดับ ให้อัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) และการใช้ 10 และ 15% Egg yolk ให้อัตราการปฏิสนธิ(95.6±2.27% และ 96.4±0.15%) ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด(98.7±1.28%) ($P>0.05$) และสำหรับอัตราการฟัก พบว่าการใช้15% DMSO (94.6±3.25%) 10% DMA (98.0±1.82%) 15% DMA (99.3±0.80%) และ Egg yolk ทั้งสามระดับ (95.0±0.52% 99.0±0.54% และ 95.0±0.53%)ให้อัตราการฟักไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด(99.2±0.84%) ($P>0.05$) จากการศึกษาของBozkurt, Yavas and Karaca (2012) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนเช่นเดียวกัน โดยใช้สาร extender 3 ชนิด ได้แก่ Extender 1 (Ravinder*et al.*, 1997) Extender 2 (Tekin*et al.*, 2003) และ Extender 3 (Billard and Cosson, 1992)ร่วมกับ 10% DMSO พบว่าการใช้สารExtender 2 ร่วมกับ 10% DMSO ให้อัตราการ

เคลื่อนที่ของอสุจิ (78.6±0.7%) แตกต่างจากทรีทเมนต์อื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แต่เมื่อดูอัตราการปฏิสนธิ (99.7±0.5%) พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน(P>0.05) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลของอัตราการฟักพบว่าให้อัตราการฟัก (46.2±0.7%) สูงกว่าทรีทเมนต์อื่นๆ แต่ต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดและการศึกษาในปลาไนเช่นเดียวกันโดยการใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด (ethanol methanol และ DMSO)ร่วมกับสาร extender 3ชนิด (Alsever's solution Egg-yolk citrate และ0.9%NaCl) พบว่าการใช้ Alsever's solution ร่วมกับ ethanol หรือ methanol และ Egg yolk citrate ร่วมกับ DMSO ให้อัตราเคลื่อนที่สูงกว่าทรีทเมนต์อื่นๆ จากนั้นศึกษาต่อเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของสาร cryoprotectant โดยใช้ cryoprotectant 3 ชนิด (ethanol methanol และ DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ร่วมกับ การใช้ extender 2 ชนิด (Alsever's solution และ Egg-yolk citrate) พบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10% มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าที่ระดับ 5 และ 15% ในสาร cryoprotectant ทั้งสามชนิด จากนั้นนำมาทดสอบ อัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟัก พบว่าการใช้ 10%DMSO ร่วมกับ Egg-yolk citrate มีอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักสูงกว่าทรีทเมนต์อื่นๆ แต่ต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด (P<0.05) (Sultana,Nahiduzzaman, Hassan, Khanam and Hossain, 2010)นอกจากนี้ในการศึกษาในปลากลุ่ม carp ชนิดอื่นๆซึ่งได้แก่การศึกษาในปลา shabout (*Barbusgrypus*)โดยใช้สารDMSO ที่ระดับความเข้มข้น 7 10 และ 15% ร่วมกับการใช้ extender 3 ชนิด ได้แก่ Extender 1 (83% glucose) Extender 2 (80% glucose) และ Extender 3(75% glucose)พบว่า การใช้ 10% DMSO+Extender 2 ให้อัตราการเคลื่อนที่ (41.3±0.8%) และอัตราการปฏิสนธิ (36.1±1.6%) สูงกว่าทรีทเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (Dogu, 2012) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Basavaraja and Hegde (2004) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา mahseer (*Tor khudree*) โดยใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด (10% DMSO 10% MeOHและ10% Propylene glycol) ร่วมกับสาร extender 4 ชนิด (E1 E2 E3 และ E4) พบว่าการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ E1 E2 และE4 มีอัตราการเคลื่อนที่ (46.67±1.67% 53.33±3.33% และ 55.00±2.89% ตามลำดับ) แตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) สอดคล้องกับการศึกษาในปลา mahseer (*Tor khudree*)พบว่าการ ใช้สาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ร่วมกับการใช้ Modified fish Ringer's solution (pH:7.48) เป็นสาร extender พบว่าการใช้ 10% DMSO มีอัตราการเคลื่อนที่หลังจากการเก็บ 385 วัน(46.7%) สูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (Basavaraja, Hegde and Palaksha, 2006) สอดคล้องกับการศึกษาในปลา Indian major carp (*Labeocalbasu*) โดยใช้สารcryoprotectant 2 ชนิด (MeOHและ DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ร่วมกับสารAlsever's solution พบว่าการใช้ 10%DMSO มีอัตราการเคลื่อนที่ (66±5%) สูงกว่าทรีทเมนต์อื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (Nahiduzzaman, Hassan, Roy, Hossain, Hossain and Tiersch, 2012) และสอดคล้องกับการศึกษาของ Nahiduzzaman*et al.*

(2011) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา olive barb (*Puntiussarana*) โดยใช้สาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10% และ MeOH ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ร่วมกับสาร Alsever's solution เป็นสาร extender พบว่าการใช้ 10% DMSO ให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (61±8%) สูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) จากนั้นนำไปศึกษา อัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟัก พบว่าให้อัตราการปฏิสนธิ (70%) และอัตราการฟัก (37%) ต่ำกว่าน้ำเชื้อสด (72% และ 62% ตามลำดับ) สอดคล้องกับ Alvarez, Fuentes, Pimentel, Abad, Cabrera, Pimentel and Arenal(2003) ที่ศึกษาผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ในปลา silver carp (*Hypophthalmichthysmolitrix*) โดยใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด (Glycerol MeOH และ DMSO) ที่ระดับความเข้มข้น 5 7 และ 10% ร่วมกับสาร extender ที่มีส่วนประกอบของ NaCl 68.38 mmol/l sodium citrate 27.20 mmol/l และ dextrose 11.01 mmol/l พบว่าการใช้ 10% DMSO มีอัตราการเคลื่อนที่ (>75%) ซึ่งไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด (>75%) (P>0.05) และการศึกษาของ Hossain and Sarder (2009) ในปลา silver carp โดยใช้สาร cryoprotectant 3 ชนิด (MeOH DMSO และ ethanol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 15 20 และ 25% ร่วมกับสาร extender 3 ชนิด (Alsever's solution Urea egg-yolk และ Egg-yolk citrate) พบว่าสาร cryoprotectant 3 ชนิด ที่ระดับความเข้มข้น 10% ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าที่ระดับความเข้มข้นอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) จากนั้นทำการศึกษาต่อโดยเลือกสาร 10% DMSO ที่ให้อัตราการเคลื่อนที่ดีที่สุด ร่วมกับสาร extender 3 ชนิด (Alsever's solution Urea egg-yolk และ Egg-yolk citrate) พบว่าทั้ง 3 ทรีทเมนต์ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าน้ำเชื้อสด (P<0.05) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาอัตราการฟัก พบว่าให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (P>0.05) Vuthiphandchai *et al.* (2014) ทำการศึกษาในปลาตะเพียนขาว (*Barbodesgonionotus*) โดยใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด (DMSO propylene glycol sucrose และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 15 และ 20% ร่วมกับ Hank's balanced salt solution เป็นสาร extender พบว่าการใช้ 10% DMSO ร่วมกับการลดอุณหภูมิ 5 และ 8°C min^{-1} ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) จากนั้นทำการศึกษาต่อโดยการใช้ 10% DMSO ร่วมกับการลดอุณหภูมิ 8°C min^{-1} พบว่าอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักที่ระยะเวลาการเก็บ 1 เดือน และ 4 เดือน ให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (P>0.05) นอกจากนี้ Dang, Pham, Pham and Jun Lee (2006) ได้ศึกษาผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Grass Carp (*Ctenopharyngodonidellus*) โดยใช้ สาร DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 6 8 และ 10% ร่วมกับ Kurokura เป็นสาร extender พบว่าการใช้สาร DMSO ทุกระดับความเข้มข้น ให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (P>0.05) แต่เมื่อดูผลของอัตราการฟักพบว่าการใช้ DMSO ทุกระดับความเข้มข้น ให้อัตราการ ฟักแตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาของ Sarder, Rafiquzzaman, Sultana and Faridul Islam

(2009) ในปลา Mrigal (*Cirrhinuscirrhosus*) โดยใช้สารcryoprotectant 4 ชนิด (DMSO MeOH Ethanol และ Glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น5 7 10 15 20 และ 30% ร่วมกับสาร extender 3 ชนิด (Urea-egg-yolk Egg-yolk citrate และ0.9% NaCl)พบว่าการใช้ 10% DMSO ร่วมกับสาร extender ทั้ง3 ชนิด ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุดแต่ไม่แตกต่างจากการใช้10% MeOHและ 10% Ethanol ร่วมกับสาร extender ทั้งสามชนิด ($P>0.05$) และการศึกษาในปลายี่สกไทย (*Probarbusjullieni*) โดยใช้สารMeOHที่ระดับความเข้มข้น 5 7.5 9 10 12 15 และ 20% ร่วมกับ CF-HBSSพบว่าการใช้ 9 และ 10% MeOHมีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Chew *et al.,* 2010)และนอกจากนี้การศึกษาของ Taghizadeh, Imanpoor and Sadeghi(2013) ในปลา Goldfish(*Carassiusauratusgibelio*) โดยใช้สารMeOHที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 20% ร่วมกับ สาร extender 4 ชนิด(GFSE 1 GFSE 2 GFSE 3 และ GFSE 4) พบว่าการใช้ GFSE 2 ร่วมกับ 10% MeOHมีอัตราการเคลื่อนที่ (13.00±2.64%) แตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$)

จากผลการศึกษาเกี่ยวกับ ชนิดของ สาร cryoprotectantต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง พบว่าการเลือกใช้สาร cryoprotectantขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ชนิดและ ระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และชนิดของสาร extender สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำนั้นยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้ต้องการศึกษา ชนิดของสาร extenderชนิดและ ความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบ แช่แข็ง

2.5 ผลของสารactivation solution ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในปลากลุ่มCarp

คุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์ของเพศผู้ถือว่าเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญในการประสบความสำเร็จในเพาะพันธุ์ปลา คุณภาพของของอสุจิคือการวัดความสามารถของอสุจิที่สามารถผ่านเข้าไปผสมกับไข่ปลาได้ โดยอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิถือเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่นิยมใช้ในการประเมินคุณภาพของอสุจิ ตั้งแต่พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกับอัตราการปฏิสนธิ(Rurangwa, Kime, Ollevier and Nash, 2004)โดยปกติแล้วอสุจิของปลาจะไม่มีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในอัณฑะแต่จะมีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ที่ sperm duct โดย seminal plasma ผลิตมาจาก sperm duct มีหน้าที่ช่วยให้อสุจิมีชีวิตหลังจากที่อสุจิถูกปล่อยออกมาจากอัณฑะ(Cosson, 2008) จากการรายงานความสัมพันธ์ระหว่างส่วนประกอบของ seminal plasma กับการเคลื่อนที่ของอสุจิในปลาหลายชนิด เช่น ปลา common carp(*Cyprinuscarpio*) (Kruger, Smith, Van Vuren and Ferreira, 1984) bleak (*Alburnusalburnus*) (Lahnsteiner, Berger, Weismann and Patzner, 1996b) และ Chinook salmon (*Oncorhynchustshawytscha*) (Rosengrave, Taylor, Montgomerie, Metcalf, McBride and Gemmell, 2009)จากการรายงานพบว่ามีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิ เช่น ค่า pH อุณหภูมิไอออน และค่าออสโมลาลิตี้ (Cosson,

Billard, Cibert, Dreanno and Suquet, 1999; Morisawa, Oda, Yoshida and Takai, 1999; Alavi and Cosson, 2006; Islam and Akhter, 2011)สำหรับปลาในกลุ่ม cyprinids อสุจิจะเคลื่อนที่เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารละลายที่เป็น hypotonic solution (คือสารละลายภายนอกเซลล์มีความเข้มข้นน้อยกว่าภายในเซลล์) (Morisawa and Suzuki, 1980) การเคลื่อนที่ของอสุจิปลาเป็นผลมาจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไอออนและค่าออสโมลาลิตี้ของสาร external medium (Alavi and Cosson, 2006)ค่า pH ภายนอกเซลล์มีผลต่อความเข้มข้นของโปรตอนภายในเซลล์ ซึ่งมีผลต่อmembrane potential เช่น ลักษณะการเคลื่อนที่ (Boitano and Omoto, 1991) ปกติค่า pH ใน seminal plasma ของปลากลุ่ม carp อสุจิจะเคลื่อนที่ในสารละลายที่มีค่าpH ภายนอกเซลล์อยู่ในช่วง 6-9 (Redondo-Muller*et al.*, 1991 ; Perchec-Poupard*et al.*, 1997)ซึ่งการศึกษาปัจจัยเหล่านี้จะช่วยให้การตัดสินใจเลือกใช้สาร activation solution ที่เหมาะสมจะช่วยปรับปรุงการผสมเทียมหรือการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งให้มีประสิทธิมากขึ้น มีการรายงานผลของอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่า ให้ผลต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดในปลาหลายชนิด เช่น ในปลาไน(Linhart and Rodina, 2000 ; Akcay*et al.*, 2004; Sultana *et al.*, 2010) *Barbusbarbus*และ *Bliccabjoerkna*(Urbanyi*et al.*, 2006) และ *Barbusgrypus* (Dogu, 2012)เนื่องจากน้ำเชื้อแช่แข็งพบอัตราการตายของอสุจิมากกว่าน้ำเชื้อสดมีการศึกษาผลของสาร activation solution ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิของปลาในกลุ่ม Carp เช่นAlavi*et al.* (2009) ได้ศึกษาผลของสาร activation solution ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อสดของปลาBarbel (*Barbusbarbus*) โดยใช้สารactivation solution 3ชนิด คือ KClความเข้มข้น 4 ระดับ (0 50 100 และ 150 mMโดยมีค่าออสโมลาลิตี้ คือ 3 130 215 และ 345 mOsmkg^{-1} ตามลำดับ)NaClความเข้มข้น 4 ระดับ (0 50 100 และ 150 mMโดยมีค่าออสโมลาลิตี้ คือ 3 125 230 และ 350 mOsm kg^{-1}ตามลำดับ) และ Sucrose ความเข้มข้น 6 ระดับ (0 25 50 100 200 และ 300 mMโดยมีค่าออสโมลาลิตี้ คือ 4 30 50 95 210 และ 330mOsmkg^{-1} ตามลำดับ) โดยทุกสูตรใช้ 20 mMTris-HClเพื่อปรับค่า pH ให้ได้ 8.0±0.2 พบว่าการใช้ 100 mMKCl ให้ผลการเคลื่อนที่ของอสุจิแตกต่างจากการใช้ KClความเข้มข้นระดับอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) 100 mMNaClให้ผลการเคลื่อนที่ของอสุจิแตกต่างจากการใช้ NaClความเข้มข้นระดับอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และสำหรับการใช้ 25 50 100 และ 200 mM Sucrose ให้ผลการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน (P>0.05) Cejko, Sarosiek and Koealski(2013) ได้ศึกษาผลของสาร activation solution ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อสดของปลาไน (*Cyprinuscarpio*) โดยใช้สาร activation solution 5 ชนิด คือ As 1 (68 mMNaCl 50 mM Urea และ 0.5% bovine serum albumin) As2 (100 mMNaCl 10 mMTrisและ 0.5% bovine serum albumin) As 3 (86 mMNaClและ 0.5% bovine serum albumin) As 4 (5 mMKCl 45 mMNaCl30 mMTrisและ 0.5% bovine serum albumin) และ As 5 (Distilled water และ 0.5% bovine serum albumin) พบว่า As 2 เป็นสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิปลาไนKalbassi, Lorestaniand

Ghafle(2013) ได้ศึกษาผลของสาร activation solution ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อสดของปลา*Barbussharpeyi*โดยใช้สาร activation solution 4 ชนิด คือ Saline Activator Solution 1 (45 mMNaCl 5 mMKClและ 30 mMTris-HCl pH 8.2 และออสโมลาลิตี้188 mOsm kg^{-1}) Saline ActivatorSolution 2 (50 mMNaCl 30 mMKClและ30 mMTris-HCl pH 8.5และออสโมลาลิตี้189 mOsm kg^{-1})distilled water และ hatchery water พบว่าการใช้ Saline Activator Solution 1 มีอัตราการเคลื่อนที่ (81.78±2.09%) ซึ่งไม่ต่างจากการใช้Saline Activator Solution 2 (85.75±1.56%) (P>0.05) Hu, Zhang, Zhou and Zhang (2009) ได้ศึกษาผลของสาร activation solution ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อสดของปลาRosy barb (*Puntiusconchonius*) โดยใช้สาร activation solution 2 ชนิด คือ NaClและ Mannitolโดยมีการปรับค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ100 150 200 250 270 และ 300 mOsm kg^{-1}พบว่าการใช้ NaClและ Mannitolที่มีระดับค่าออสโมลาลิ้เท่ากันให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน (P>0.05) ส่วนการใช้ทั้ง NaClและ Mannitolที่มีระดับค่าออสโมลาลิตี้ต่างกัน พบว่าค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 100 และ 150 mOsm kg^{-1}ให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) Jing *et al.* (2009) ได้ศึกษาผลของสาร activation solution ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อสดปลา Zebrafish (*Daniorerio*) โดยใช้สาร activation solution 3 ชนิด (0.3% NaCl de-ionized water และ HBSS 170 mOsm kg^{-1}) พบว่าการใช้สาร activation solution ทั้ง 3 ชนิดให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกัน (P>0.05)Nahiduzzaman*et al.* (2011) ได้ศึกษาผลของสาร activation solution ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในน้ำเชื้อสดของปลา Olive barb (*Puntiussarana*) โดยใช้สาร activation solution คือ NaClโดยมีการปรับค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ48 67 96 128 157 191 223 255 287 และ 319 mOsm kg^{-1}พบว่าการใช้ NaClที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่ระดับ 128 mOsm kg^{-1}เป็นสารactivation solution ที่เหมาะสมสำหรับกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิปลาOlive barb นอกจากนี้ Khara, Noveiri, Hadiseh,Rahbar, Ahmadnejad and Khodadoost (2014) ได้ศึกษาผลของสาร activation solution ในน้ำเชื้อสดของปลาไน โดยใช้สาร activation solution 4 ชนิด คือ NaCl ความเข้มข้น 3 ระดับ (63 72และ81mM) KClความเข้มข้น 3 ระดับ (80 88และ 96mM) $MgCl_2$ ความเข้มข้น 3 ระดับ (1.2 1.3และ 1.5mM)และ$CaCl_2$ ความเข้มข้น 3ระดับ(1.75 2.5และ3.25mM) โดยทุกสูตรใช้ 30-40 mMTris-HClเพื่อปรับค่า pH ให้ได้ 8.5±0.2โดยมีน้ำกลั่นเป็นกลุ่มควบคุม พบว่าการใช้ 72 mMNaClให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิดีที่สุด (P<0.05)สำหรับการใช้KCl$MgCl_2$ และ $CaCl_2$ ทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (P>0.05)และ NaClKClและ$MgCl_2$ทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (P>0.05) ยกเว้นการใช้ $CaCl_2$(P<0.05)นอกจากนี้ Basavaraja*et al.*(2006) ได้ศึกษาผลของสาร activation solution ในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งของปลา mahseer (*Tor khudree*) โดยใช้สาร activation solution 3ชนิด คือ tap water0.3%NaClและ 1% glucose และ พบว่าการใช้สาร 0.3% NaClให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิดีที่สุด (P<0.05) และ

Lahnsteiner, Berger and Weismann(2003)ได้ศึกษาผลของสาร activation solution ในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งของปลา bleak (*Chalcalburnuschalcalburnus*) โดยใช้สาร activation solution 5 ชนิด คือ 50 mMKCl+1 mM $MgSO_4$ (1:10)50 mMNaCl (1:10)12.5 mMNaCl (1:10)Hatcherywater (1:10)และ Hatcherywater (1:15)หลังจากกระตุ้น 10 วินาทีพบว่าการใช้50mMKCl (1:10) และ 1 mM $MgSO_4$ (1:10) มีอัตราการเคลื่อนที่ (38.0±10.8%) ซึ่งไม่ต่างจากการใช้ 50 mMNaCl (1:10)(39.3±8.8%) (P>0.001)Yasui, Arias-Rodriguez, Fujimoto and Arai (2009)ได้ศึกษาผลของสาร activation solution ในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งและน้ำเชื้อสดของปลา loach (*Misgurnusanguillicaudatus*) โดยใช้สารactivation solution 4 ชนิด คือ dechlorinated tap water (DTW) distilled water (DW) 25mMNaCl และ 50mMNaClพบว่า ชนิดของสาร activation solution ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ทั้งน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งและน้ำเชื้อสด(P>0.05)แต่อย่างไรก็ตามเมื่อดูผลของระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิพบว่าการใช้ 50mMNaCl เป็นสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งและน้ำเชื้อสดของปลา loachและนอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาผลของสาร activation solution ในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งของปลากลุ่มอื่น ๆ เช่น MeloandGodinho(2006) ได้ศึกษาผลของสาร activation solution ในน้ำเชื้อ ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งของปลา *Bryconorthotaenia* โดยใช้สาร activation solution 3 ชนิด คือ 25 mMNaCl119 mM $NaHCO_3$และdistilled water พบว่าการใช้119 mM $NaHCO_3$ ให้อัตราการเคลื่อนที่และระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิดีที่สุด (P<0.05)จากการศึกษาผลของสาร activation solution ในน้ำเชื้อ ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งของปลา tiete tetra (*Bryconinsignis*)โดยใช้สารactivation solution 2 ชนิด คือ 0.29% NaClและ 1% $NaHCO_3$ พบว่าให้อัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน(P>0.05) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อดูผลของระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิพบว่าการใช้ 1% $NaHCO_3$ เป็นสาร activation solution ที่ให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิดีที่สุด (P<0.05)(Viveiros, Amaral, Orfão, Isaú, Caneppele and Leal, 2011)และจากการศึกษาของ Viveiros, Orfão, Maria and Allaman(2009) ในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งของปลา curimba(*Prochiloduslineatus*)โดยใช้สารactivation solution 4 ชนิด คือ distilled water 0.15% NaCl 0.29% NaClและ 1% $NaHCO_3$พบว่าไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (P>0.05) เมื่อใช้ 10% Methylglycolเป็นสาร cryoprotectantร่วมกับสาร extender ทั้ง 4 ชนิด(0.9% NaCl 5% glucose 5% BTS™และ 6% M III™)แต่อย่างไรก็ตามการใช้ 10% DMSO ร่วมกับสาร extender 2 ชนิด (5%glucose และ5%BTS™) พบว่าการใช้ distilled water ให้อัตราการเคลื่อนที่ต่ำที่สุด(P<0.05)

จากการศึกษาผลของสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับอสุจิปลาในกลุ่ม carp พบว่าชนิดของ activation solutionขึ้นอยู่กับชนิดปลา ดังนั้นควรมีการศึกษาเพื่อหาสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งเพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำ (*Labeochrysophekadion*) โดยวิธีการเก็บแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งในครั้งนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ

การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extenderและระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น

การทดลองที่ 2 ศึกษาชนิดของสาร extenderชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

การทดลองที่ 3 ศึกษาชนิดของสารactivation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

โดยใช้สถานที่ทำการทดลอง อุปกรณ์และสารเคมีพร้อมทั้งวิธีการศึกษาดังนี้

3.1 สถานที่ทำการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้มีการดำเนินงานวิจัยทั้งในภาคสนามและในห้องปฏิบัติการในส่วนของห้องปฏิบัติการใช้ห้องปฏิบัติการสรีรและกายวิภาคสัตว์ อาคารเครื่องมือ 10 ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสุรนารี และภาคสนามที่ฟาร์มมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี (งานสัตว์น้ำ)

3.2 อุปกรณ์และสารเคมี

3.2.1 อุปกรณ์สำหรับการเลี้ยงปลาและฉีดฮอร์โมน

1) บ่อดินขนาด 10ไร่

2) โครงกระชังเหล็ก และกระชังขนาด 2×2×2.5 เมตร

3) เครื่องปั๊มลม

4) หลอดฉีดยาและเข็มฉีดยา

5) โกร่งบดยา

6) ผ้าขนหนู

7)ตาชั่งขนาด 15กิโลกรัม

3.2.2 อุปกรณ์สำหรับการรีดน้ำเชื้อปลาและไข่ปลา

1) Efpendrofขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2) Micro pipettes และ pipettes tipsขนาด 1,000 ไมโครลิตร

3) ผ้าขนหนู

4) กระดาษทิชชู่

5) Beaker ขนาด250 มิลลิลิตร

6) กระติกน้ำแข็ง

7)สวิงจับปลา

3.2.3อุปกรณ์สำหรับการเตรียมสาร extenderสาร cryoprotectantและสาร activation solution

1) Beaker ขนาด 100 และ 250 มิลลิลิตร

2) Volumetric flasks ขนาด 250 มิลลิลิตร และ Rack

3) กระบอกตวงขนาด 25 มิลลิลิตร

4) ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร

5) ช้อนตักสารเคมีและแท่งคนสาร

6)เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

7) Osmometer(Fiske Associates Micro-Osmometer210, Massachusetts, USA)

8) pH/Ion meter (pH/Ion meterS220Mettler-Toledo AG, Switzerland)

3.2.4 อุปกรณ์สำหรับศึกษาส่วนประกอบไอออนค่าออสโมลาลิตี้และค่า pH ของน้ำเชื้อ

1) Efpendrofขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2) Micro pipettes และ pipettes tipsขนาด 20และ1,000 ไมโครลิตร

3) กระดาษทิชชู่

4)Centrifuge Tube ขนาด 15มิลลิลิตร

5) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง (Hettich, Universal 320R,Germany)

7) Osmometer (Fiske Associates Micro-Osmometer210, Massachusetts, USA)

8) pH/Ion meter (pH/Ion meterS220Mettler-Toledo AG, Switzerland)

9)Ion Chromatography (DIONEX ICS3000, USA)

3.2.5 อุปกรณ์สำหรับการนับความเข้มข้นของอสุจิ

1) Efpendrofขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2) Micro pipettes และ pipettes tipsขนาด 200 และ1,000 ไมโครลิตร

3) กระดาษทิชชู่

4) กระดาษเช็ดเลนส์

5) สไลด์นับเม็ดเลือด

6) กล้อง Compound microscope

3.2.6 อุปกรณ์สำหรับประเมินอัตราการเคลื่อนที่และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของอสุจิ

1) Efpendrofขนาด 1.5 มิลลิลิตร

2) Micro pipettes และ pipettes tipsขนาด 20 และ1,000 ไมโครลิตร

3) ไม้จิ้มฟัน และนาฬิกาจับเวลา

4)Slides

5)กล้อง Compound microscope Slides

6)เครื่องวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (IVOS; Hamilton Thorne, USA) และ 2x-CEL slide

3.2.7 อุปกรณ์สำหรับประเมินอัตราการมีชีวิตของอสุจิ

1) Slides และ cover slides

2) Micro pipettes และ pipettes tipsขนาด 100 และ1,000 ไมโครลิตร

3) ไม้จิ้มฟัน

4)กล้อง Compound microscope

3.2.8 อุปกรณ์สำหรับประเมินอัตราการปฏิสนธิ

1) Petri dish และขนไก่

2) Micro pipettes และ pipettes tipsขนาด 100 และ1,000 ไมโครลิตร

3) ขวดน้ำขนาด 1.25ลิตรและสายยาง

4)Beaker ขนาด250 มิลลิลิตร

5)กล้อง Stereo Microscope

3.2.9อุปกรณ์สำหรับประเมินลักษณะทางกายภาพของตัวอสุจิแบบแช่แข็งด้วยกล้อง SEM

1) Petri dish

2) ไม้จิ้มฟัน

3) Cover slides

4) ขวดแก้วขนาด 5 มิลลิลิตร

5) Vortex

6) Forceps

7) Dropper

8) เทปกาวสองหน้า

9) เครื่องทำให้แห้ง (criticalpointdryer)(CPD, Samdri-PVT-3B, USA)

10) ฐานรองตัวอย่าง (stap)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

11) เครื่องฉาบทอง (ion sputter)(JEOL JFC-1100E, Japan)

12) Scanning electron microscope (SEM, JEOL JSM-6010LV, Japan)

3.2.10สารเคมี

1) น้ำมันกานพลู

2) สารเคมีสำหรับเตรียมสาร extender

- Sodium chloride (NaCl)
- Potassium chloride (KCl)
- Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)
- Calcium chloride dehydrate ($CaCl_2.2H_2O$)
- Magnesium sulphateheptahydrate ($MgSO_4.7H_2O$)
- Disodium hydrogen phosphate heptahydrate ($Na_2HPO_4.\ 7H_2O$)
- Potassium dihydrogen phosphate ($KH_2\ PO_4$)
- Glucose ($C_6H_{12}O_6$)
- Tris-HCl($C_4H_{11}NO_3HCl$)
- น้ำกลั่น

3) สารเคมีสำหรับเตรียมสาร cryoprotectant

- Dimethyl sulfoxide (DMSO)
- Methanol(MeOH)
- Glycerol ($C_3H_8O_3$)
- ไนโตรเจนเหลว

4) สารเคมีสำหรับเตรียมสาร activation solution

- Sodium chloride (NaCl)
- Potassium chloride (KCl)
- Tris-HCl ($C_4H_{11}NO_3HCl$)
- น้ำกลั่น
- Tap water

5) สารเคมีที่ใช้สำหรับการฉีดฮอร์โมน

- Luteinizing hormone releasing hormone analog (LHRHa;Suprefact, Germany)
- Domperidone (Motilium-M)
- Human Chorionic Gonadotropin (hCG, China)
- น้ำกลั่น

6) สารเคมีที่ใช้สำหรับการประเมินอัตราการเคลื่อนที่

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

- 0.2%Sodium chloride (NaCl)
- น้ำกลั่น

7)สารเคมีที่ใช้สำหรับประเมินอัตราการมีชีวิต

- Eosin B
- Nigrosin
- Sodium citrate dihydrate

- น้ำยาเคลือบเล็บ
- Immersion Oil
- น้ำยาเช็ดเลนส์

8) สารเคมีที่ใช้สำหรับเตรียมตัวอย่างศึกษาลักษณะทางกายภาพของอสุจิด้วยกล้อง SEM

- 2.5%glutaraldehydeใน 0.1MphosphatebufferpH7.2
- Phosphate buffer pH7.2
- 1%osmium ใน 0.1MphosphatebufferpH7.2
- Ethanol ที่ความเข้มข้น 30%50%70%90%95% และ 100%

3.3 วิธีการศึกษา

3.3.1 การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลากาดำ

ปลาเพศผู้มีลำตัวยาวเรียวกว่าเพศเมียเล็กน้อยเมื่อจับปลาหงายท้องตรงส่วนล่างของตัวปลาใกล้กับทวารปลาเพศผู้จะมีความกว้างลำตัวแคบกว่าเพศเมียสำหรับในช่วงฤดูการผสมพันธุ์ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมจนถึงกลางเดือนพฤศจิกายนจึงสามารถบอกลักษณะความแตกต่างระหว่างเพศได้อย่างชัดเจน(ภาพที่ 3.1ก และ ข)โดยปลาเพศผู้บริเวณครีบอกจะสากบริเวณท้องไม่อูมลำตัวยาวเรียวกว่าเพศเมียเล็กน้อย ถ้าแตะที่ท้องเบาๆจะมีน้ำเชื้อสีขาวคล้ายน้ำนมไหลออกมา สำหรับแม่พันธุ์นั้น บริเวณครีบหูลื่นไม่สากมือ เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์แล้วท้องแม่พันธุ์จะอูมและบวมเบ่งมีสีแดงอ่อนนำพ่อแม่พันธุ์ปลากาดำที่แข็งแรงสมบูรณ์มาทำการฉีดฮอร์โมน สำหรับอัตราการฉีดฮอร์โมนปลากาดำเพศเมียจะฉีด 2 เข็ม เข็มที่ 1 ใช้hCG500 IU ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมหลังจาก 24 ชั่วโมง จึงฉีดเข็มที่ 2 ใช้ Suprefactในอัตรา 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมร่วมกับ Motilium M 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมสำหรับปลากาดำเพศผู้จะฉีดเข็มเดียว โดยฉีดพร้อมเข็มที่2 ของปลากาดำเพศเมีย โดยใช้ Suprefactในอัตรา 15 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมร่วมกับ Motilium M 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา1 กิโลกรัม โดยฉีดบริเวณใต้ครีบหลังเหนือเส้นข้างลำตัว หลังจากฉีดฮอร์โมนแล้ว ประมาณ8 ชั่วโมงจึงทำการรีดน้ำเชื้อและไข่ ก่อนรีดน้ำเชื้อหรือไข่จะต้องใช้ผ้าขนหนูอาดซับตัว

ปลาให้แห้งและใช้กระดาษทิชชู่ซับบริเวณติ่งเพศเพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ เลือด ปัสสาวะและอุจจาระ

(ก) (ข)

ภาพที่ 3.1 ปลากาดำเพศเมีย (ก) และปลากาดำเพศผู้ (ข)

3.3.2 ส่วนประกอบไอออนค่าออสโมลาลิตี้และค่า pH ของน้ำเชื้อปลากาดำ

นำน้ำเชื้อปลากาดำที่รีดได้มาทำการ centrifugedที่ ความเร็วรอบ10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที โดยการใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง รุ่น Universal 320R (Hettich, Tuttlingen, Germany)หลังจากการ centrifuged จะสังเกตเห็นได้ว่าตัวอย่างน้ำเชื้อมีการแยกออกเป็น2 ส่วนโดยส่วนล่างจะมีลักษณะสีขาวขุ่น คือ ตัวอสุจิ และส่วนบนจะมีลักษณะเป็นน้ำใส คือ seminal plasma ใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนของ seminal plasma ใส่ Efpendrofขนาด 1.5 มิลลิลิตร นำมาcentrifuged ที่ความเร็วรอบ10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 20 นาที อีกครั้งเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของตัวอสุจิ จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนของ seminal plasma ใส่ Efpendrofขนาด 1.5 มิลลิลิตรเพื่อนำมาวัดค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH โดยทำการวัดค่าออสโมลาลิตี้ด้วยเครื่อง Fiske Associates Micro-Osmometerรุ่น 210 (Fiske Associates, Massachusetts, USA)และวัดค่า pH ด้วยเครื่อง SevenCompact™pH/Ion meter รุ่น S220 (Mettler-Toledo AG,Schwerzenbach, Switzerland)ส่วน seminal plasma ที่เหลือนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80°Cสำหรับนำไปศึกษาส่วนประกอบของไอออนชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำเชื้อปลากาดำ ซึ่งได้แก่ โซเดียมโพแทสเซียมคลอไรด์ แคลเซียม และแมกนีเซียม โดยใช้เครื่องIon Chromatography DIONEX ICS รุ่น 3000 (DIONEX ICS, Sunnyvale, California, USA)

3.3.3 การรีดน้ำเชื้อและการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ก่อนทำการรีดน้ำเชื้อจะต้องทำการสลบปลาโดยใช้น้ำมันกานพลูที่ความเข้มข้น 200 ppm หลังจากนั้นใช้ผ้าขนหนูสะอาดเช็ดตัวปลาให้แห้งและใช้กระดาษทิชชู่ซับบริเวณติ่งเพศ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากน้ำ เลือด ปัสสาวะและอุจจาระ ซึ่งน้ำเชื้อที่นำมาทำการเก็บรักษาจะต้องไม่ปนเปื้อนจากสิ่งดังกล่าวและนำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยประเมินลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อความเข้มข้นของน้ำเชื้ออัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิและการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของตัวอสุจิที่เก็บรักษาแบบระยะยาวจากภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM โดยมีรายละเอียดต่างๆ ดังนี้

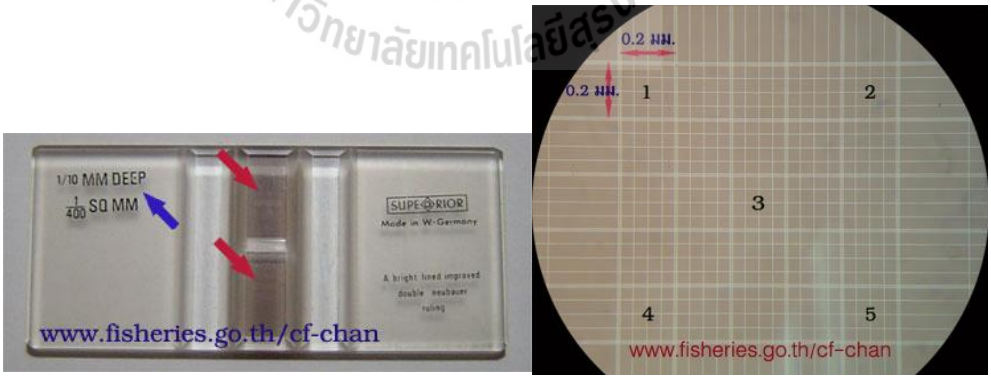
3.3.3.1 การประเมินลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

ควรสังเกตทันทีภายหลังจากการรีดน้ำเชื้อ โดยดูสี และสิ่งเจือปน เช่น อุจจาระ ปัสสาวะ และของเสียอื่นๆ โดยน้ำเชื้อที่จะนำมาศึกษาต้องปราศจากสิ่งปนเปื้อนดังกล่าว

3.3.3.2 การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)

การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อหาได้โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อสดด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วนเท่ากับ 1:1,500 ขณะที่ทำการดูดน้ำเชื้อควรใช้กระดาษทิชชู่ซับน้ำเชื้อส่วนเกินที่ติดมากับ pipettes tips จากนั้นทำการนับจำนวนอสุจิ โดยใช้สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (haemacytometer) (ภาพที่ 3.2 ก) ภายใต้กล้อง compound microscope (40X) นับจำนวนอสุจิจากมุมบน-ล่าง ทั้ง 4 มุม และช่องตรงกลาง รวม 5 ช่อง (ภาพที่ 3.2 ข) แล้วนำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนอสุจิที่นับได้ต่อ 1 มิลลิลิตรดังนี้

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



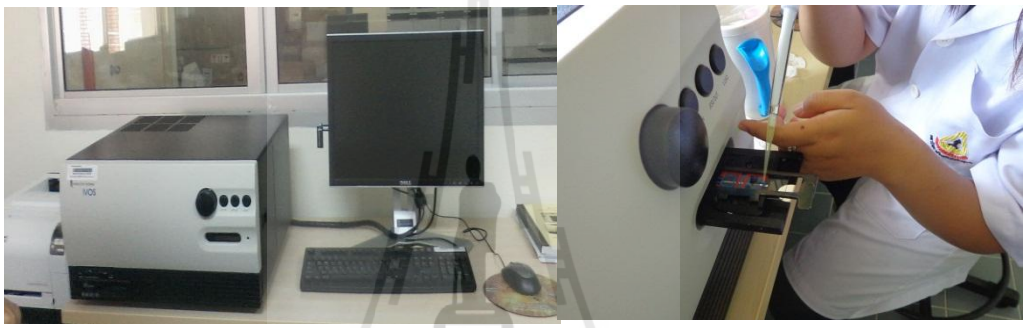
(ก) (ข)

ภาพที่ 3.2 สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (haemacytometer;ก) บริเวณที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1 2 3 4 และ 5;ข)

ที่มา : http://www.fisheries.go.th/cf-chan/plankton/hema/hema.htm

3.3.3.3 ศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ (Motility) และระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ

เป็นวิธีการศึกษาอัตราการเคลื่อนที่และระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโดยใช้เครื่องวิเคราะห์คุณภาพของน้ำเชื้อ(CASA; IVOS; Hamilton Thorne, USA)(ดังภาพที่ 3.3ก) โดยมีการกำหนดค่า Analysis setup ดังแสดงในตารางที่3.1ทำได้โดยการใช้ micropipetteดูดตัวอย่างและกระตุ้นด้วย0.2% NaClในอัตราเจือจาง1 : 5 สำหรับน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็งจากนั้น โหลดลงบน slide 2X-cell และประเมินอัตราการเคลื่อนที่ภายในระยะเวลา10 วินาทีหลังจากที่กระตุ้นด้วย 0.2% NaCl(ดังภาพที่ 3.3ข)สำหรับระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิจะทำการประเมินหลังจากกระตุ้นด้วยสาร activation solution แต่ละชนิด จนกระทั่งอสุจิหยุดการเคลื่อนที่ทั้งหมด



(ก) (ข)

ภาพที่ 3.3เครื่องวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (ก)การโหลดตัวอย่างลงบน slide 2X-cell (ข)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 3.1ค่า Analysis setup สำหรับประเมินอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

Apply sort	0
Frames Acquired	30
Frames rate (Hz)	60
Minimum contrast	30
Minimum Cell Size (pixels)	3
Minimum Static Contrast	30
Straightness (STR) Threshold (%)	80
VAP Cutoff (μm/sec)	10
Prog. Min VAP (μm/sec)	20
VSL Cutoff (μm/sec)	10
Cell Size (pixels)	3
Cell Intensity	50
Static Head Size	1.21-8.82
Static Head Intensity	0.21-2.00
Static Elongation	19-99
Slow Cell Motile	Yes
Magnification	1.92
Video Frequncy	60
Bright Field	No
Temperature (°C)	27
Chamber depth (μm)	20
Field Selection Mode	Auto

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

3.3.3.4 ศึกษาอัตราการมีชีวิต (Viability)

การศึกษาอัตราการมีชีวิตใช้เทคนิคการย้อมสีด้วย Eosin และ Nigrosin โดยมีวิธีการเตรียมสีย้อมและขั้นตอนการศึกษาอัตราการมีชีวิตดังนี้

วิธีการเตรียมสีย้อม

ชั่งEosin B 1 กรัมNigrosin 5 กรัมและ Sodium citrate dihydrate 1.5 กรัม ใส่ใน Beagerและเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรโดยให้ความร้อนขณะเตรียมสารเมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรอง จนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ แล้วนำสีย้อมที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง

วิธีการศึกษาอัตราการมีชีวิต

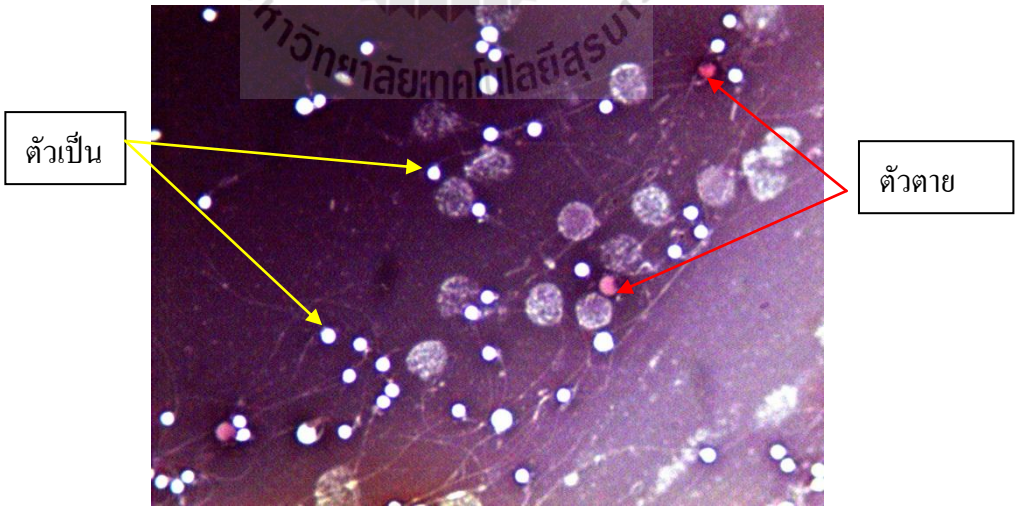
-หยดสี Eosin-Nigrosin dye ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) แล้วหยดน้ำเชื้อตัวอย่างข้างๆ สีย้อมประมาณ1 ไมโครลิตร

-ใช้เข็มเขี่ยคนน้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากันจากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบางๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว

-นำแผ่นสไลด์ที่smear แล้วผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง

-หยดน้ำยาทาเล็บลงบนแผ่นสไลด์1 หยด แล้วปิดด้วย cover slide นำไปส่องดูภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย100 เท่า

-นับจำนวนเซลล์ตัวเป็นและตัวตายโดยการสุ่มนับ5 บริเวณๆ ละ 20 เซลล์ โดยที่เซลล์ตัวเป็นจะมีลักษณะสีขาวไม่ติดสีย้อม ส่วนตัวตายจะติดสีย้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม(ภาพที่ 3.4)



ภาพที่ 3.4 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี Eosin-nigrosinภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย100 เท่า

3.3.3.5 ศึกษาอัตราการปฏิสนธิ (Fertilization)

นำแม่ปลากาดำมารีดไข่หลังจากฉีดฮอร์โมนแล้ว 8 ชั่วโมง ใช้ไมโครปิเปตดูดไข่ 160 ไมโครลิตร(มีไข่จำนวน 207±0.42 ฟอง)ใส่ใน Petri dish ดูดน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อที่ทำการเก็บรักษาแบบแช่เย็นโดยใช้ sperm/egg ratio เท่ากับ 1×10^6: 1และใช้ sperm/egg ratio เท่ากับ 2×10^6: 1สำหรับน้ำเชื้อแช่แข็งลงไปผสมกับไข่ จากนั้นใช้ขนไก่คนไข่และน้ำเชื้อปลากาดำให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2-3 นาที จากนั้นค่อยๆเติมน้ำลงไป1มิลลิลิตร ทิ้งไว้ประมาณ 4-5 นาที แล้วใช้ขนไก่เขี่ยไข่ใส่ลงในขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร ที่มีการไหลเวียนของน้ำตลอดเวลา (ภาพที่3.5) หลังจากนั้น 8 ชั่วโมง ทำการตรวจนับอัตราการปฏิสนธิที่ระยะGastrula (ภาพที่3.6) หลังจากนั้นคำนวณหาอัตราการปฏิสนธิ ดังนี้

$$\text{อัตราการปฏิสนธิ (\%)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ถึงระยะ Gastrula} \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}}$$

ภาพที่ 3.5ขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตรและระบบการฟักไข่ปลากาดำ

ภาพที่ 3.6การพัฒนาของคัพภะไข่ปลากาดำระยะ gastrula stage (7-8 ชั่วโมง)

3.3.3.6 การศึกษาลักษณะทางกายภาพของอสุจิปลากาดำแบบแช่แข็งด้วยกล้อง SEM

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง

1.ใช้ไม้จิ้มฟัน smearตัวอย่าง ใน cover slide ที่หักแล้วขนาด 0.5×0.5 มิลลิเมตรไม่หนาหรือบางจนเกินไป

2.แช่ตัวอย่าง (pre-fix) ใน 2.5%glutaraldehydeใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 1ชั่วโมงหรือทิ้งไว้ข้ามคืนในตู้เย็น หลังจากนั้นล้างตัวอย่างด้วย phosphate buffer pH 7.2 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที

3.นำตัวอย่างไปแช่ (post-fix)ใน 1%osmium ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 นาน 1 ชั่วโมง

4.หลังจากนั้นล้างตัวอย่างด้วย phosphate buffer pH 7.2 จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที

5.ขจัดน้ำออกจากตัวอย่าง (dehydrate) ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้น 30% 50% 70% 90% 95% จำนวน 1 ครั้ง ครั้งละ 10-15 นาที และ 100% จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 20 นาที

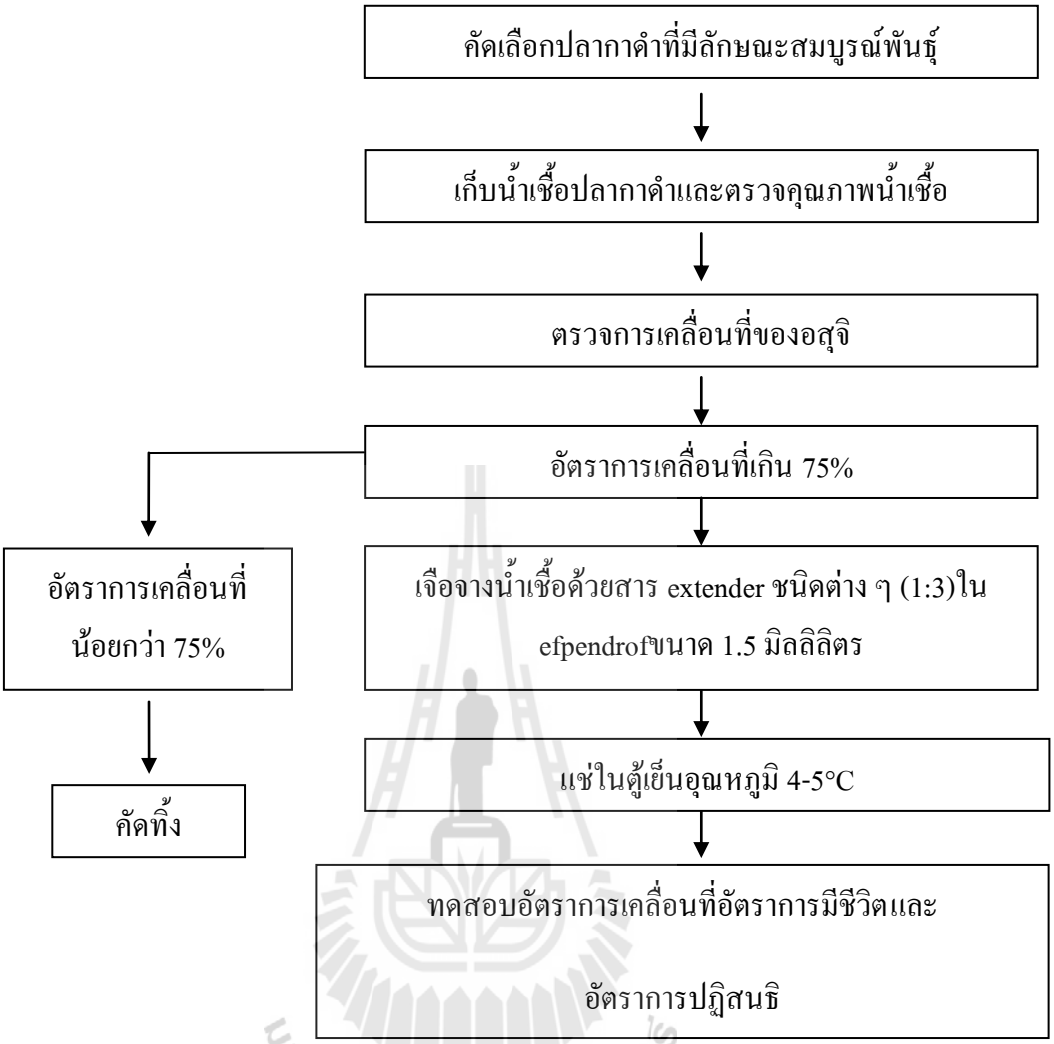
6.นำตัวอย่างไปทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤตด้วยเครื่องทำให้แห้ง(CPD, Samdri-PVT-3B, USA) และนำตัวอย่างไปติดบนฐานรองตัวอย่าง (stap) ด้วยกาว 2 หน้า หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปฉาบทองด้วยเครื่องฉาบทอง (ion sputter) (JEOL JFC-1100E, Japan) เสร็จแล้วจึงนำตัวอย่างไปส่องดูลักษณะด้วยกล้อง SEM (JEOL JSM-6010LV, Japan)

3.3.4 การทดลองที่ 1 ศึกษาชนิดของสาร extender และระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเตรียมสาร extender 5 สูตร ได้แก่ Modified Cortland solution (MC) Hanks ' balanced salt solution (HBSS) 0.9%NaClKurokura solution (KU) และ Modified extender ตามส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่ 3.2วัดค่า osmolality และค่า pH หลังจากนั้นนำสาร extender ที่เตรียมแล้วใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-5°C

2. นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไปมาเจือจางกับสาร extender ทั้ง 5 ชนิด ในอัตราส่วนน้ำเชื้อสดต่อสาร extender 1:3 ใน efpendrof ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง mixer และเก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 4-5°C จากนั้นทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่อัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาเก็บ 1-5 วัน ดังแผนการทดลองในตารางที่ 5โดยมีขั้นตอนและกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็นดังแสดงในภาพที่ 3.7และแผนการทดลองแสดงในตารางที่ 3.3



ภาพที่ 3.7แผนภาพกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบทางเคมี ค่า osmolality และค่า pH ของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลากาดำ

สารเคมี (g)	**ชนิดของสาร extender**				
	MC	**HBSS**	**0.9%NaCl**	**KU**	**Modified extender**[1]
NaCl	1.625	2	2.25	1.875	1.628
KCl	0.75	0.1	-	0.05	0.052
$NaHCO_3$	0.05	0.0875	-	0.05	0.102
$CaCl_2.2H_2O$	0.075	0.04	-	0.05	0.051
$MgSO_4.7H_2O$	-	0.05	-	-	0.040
$Na_2HPO_4.7H_2O$	-	0.03	-	-	-
KH_2PO_4	-	0.15	-	-	-
Glucose	-	0.25	-	-	0.801
Tris-HCl	-	-	-	-	0.127
น้ำกลั่น(ml)	250	250	250	250	250
osmolality	285±1.00	286.33±1.53	283.67±1.53	248.67±1.16	252±1.00
pH	8.09±0.29	7.42±0.01	7.5±0.05	8.16±0.03	8.11±0.05
Ref.	Singsee *et al.*(2005)	Jing *et al.* (2009)	Hassan *et al.* (2014)	Kurokura, Hirano, Tomita and Iwahashi(1984)	

หมายเหตุ : MC; Modified Cortland solution HBSS;Hanks ' balanced salt solution และ KU; Kurokura solution

[1]ใช้ 1%NaOH solution เพื่อปรับ pH

ตารางที่3.3 แผนการทดลองการศึกษาสารextender 5 ชนิด (MC; Modified Cortland solution HBSS ;Hanks' balanced salt solution0.9%NaClKU; Kurokura solution และ Modified extender)ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบช่เย็น

Treatment (extender)	ระยะเวลาที่เก็บ (วัน)	อัตราการเคลื่อนที่ (%)	อัตราการมีชีวิต (%)	อัตราการปฏิสนธิ (%)
MC	**1-5**			
HBSS				
0.9% NaCl				
KU				
Modified				
น้ำเชื้อสด				

หมายเหตุ: MC ; Modified Cortland solution HBSS;Hanks ' balanced salt solution และKU; Kurokura solution

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาชนิดของสาร extender 5 ชนิด (MC; Modified Cortland solution HBSS;Hanks' balanced salt solution0.9%NaClKU; Kurokura solution และ Modified extender)ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบช่เย็น โดยใช้น้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุมมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการวัดซ้ำ (Repeated Measurements) โดยทำการทดลอง 15 ซ้ำต่อทรีทเมนต์สำหรับการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตและทำการทดลอง 10ซ้ำต่อทรีทเมนต์สำหรับอัตราการปฏิสนธิซึ่งมีการวัดซ้ำอัตราการเคลื่อนที่อัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ 1-5 วัน ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิไปtransformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD ที่มีการวัดซ้ำ วิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ$P<0.05$และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างเนื่องจากเวลาด้วย orthogonal polynomials โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปSPSS V. 16

3.3.5 การทดลองที่ 2ศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectantที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

นำสาร MC และ Modified extenderที่ให้ผลดีที่จากการทดลองที่ 1 มาทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งโดยมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

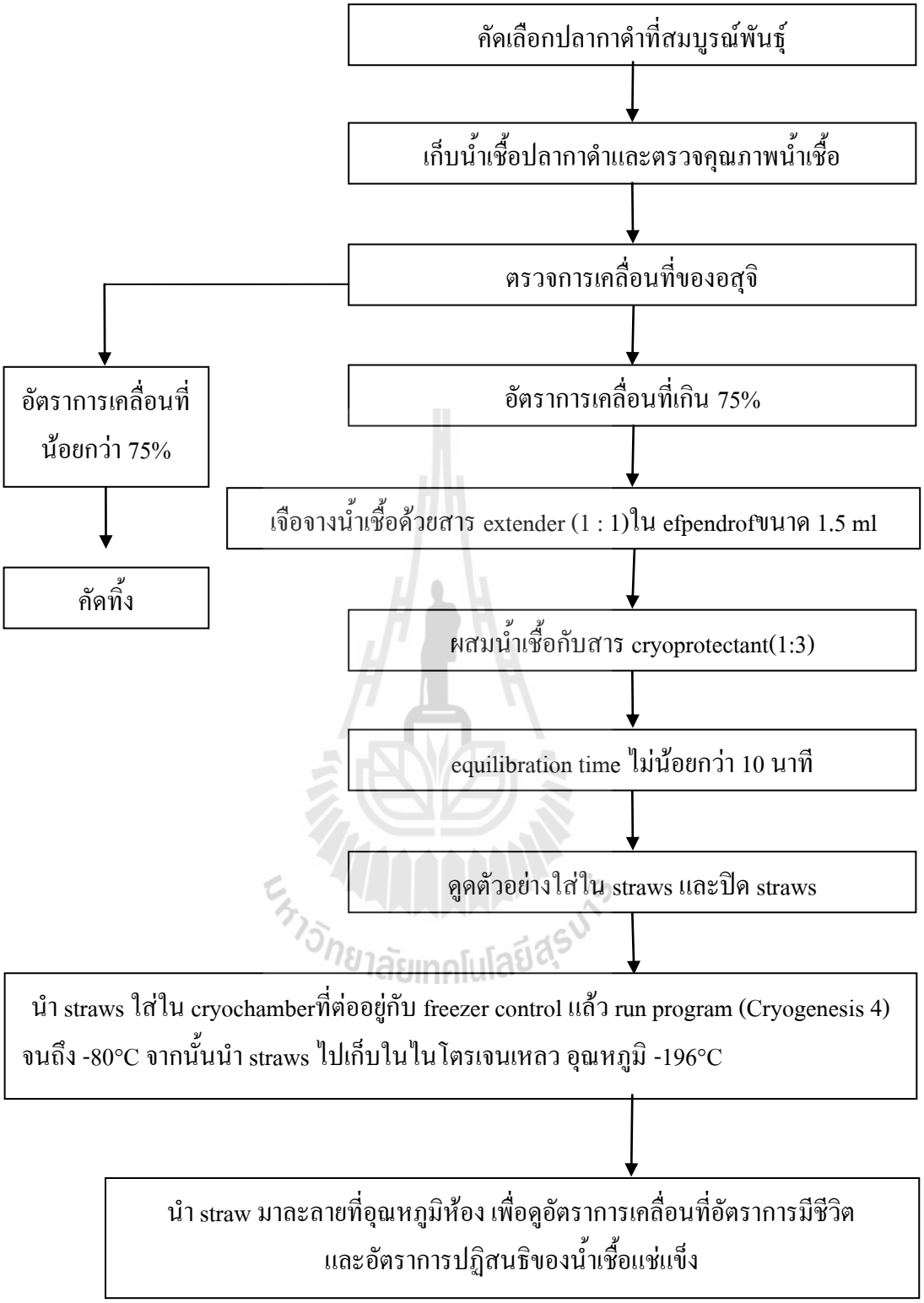
ขั้นตอนการทดลอง

1. เตรียมสาร MC และ Modified extenderวัดค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้จากนั้นใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5°C เพื่อใช้เจือจางน้ำเชื้อและใช้เตรียมสาร cryoprotectant

2. เตรียมสาร cryoprotectant 3ชนิด ได้แก่DMSO MeOH และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% โดยใช้สาร extender ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ใส่ขวดสีชาปิดฝาให้สนิทเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5°C

3. นำน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 75% ขึ้นไปมาเจือจางด้วยสาร extender ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 ในอัตราส่วน (1:1)หลังจากนั้นเติมสาร cryoprotectantแต่ละชนิด(DMSO MeOH และ glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% ในอัตราส่วน (1:3)

4. ใช้ micropetteดูดน้ำเชื้อปริมาณ 240ไมโครลิตร ใส่หลอดแช่แข็ง (french straw ขนาด 250ไมโครลิตร) แล้วปิดหลอดแช่แข็งโดยใช้ forcepลนไฟจนร้อนแล้วหนีบปากหลอดแช่แข็ง เตรียม freezer control และคอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการลดอุณหภูมิ โดยการนำ cryobathใส่ไนโตรเจนเหลวสูงประมาณ 15 เซนติเมตร จากนั้นใส่ cryochamberลงใน cryobathแล้วปิดฝา โดยที่ cryochamberต่อกับ freezer control (CL 3300) และ freezer control จะต่อกับคอมพิวเตอร์เพื่อควบคุมการทำงานของ freezer control จากนั้นเลือกอัตราการลดอุณหภูมิโดยลดอุณหภูมิ 10°Cmin^{-1} จากอุณหภูมิ 25 ถึง -80°Cโดยใช้โปรแกรม Cryogenesis version 4 จากนั้นรอให้คอมพิวเตอร์และ freezer control ทำงานจนอุณหภูมิที่ freezer control ถึง -80°Cจึงนำ straws ออกจาก cryochamber แล้วไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°Cโดยมีขั้นตอนและกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งดังแสดงในภาพที่ 3.8และแผนการทดลองในตารางที่ 3.4



ภาพที่3.8แผนภาพกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

ตารางที่3.4 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร extender 2 ชนิด(Modified extender และ MC) ร่วมกับ สาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSOMeOH และ glycerol) และ 3 ระดับความเข้มข้น(5 10 และ 15%) ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบช่แข็ง

Treatment	สาร extender	สาร cryoprotectant	ความเข้มข้น (%)	อัตราการเคลื่อนที่ (%)	อัตราการมีชีวิต (%)	อัตราการปฏิสนธิ (%)
1	Modified	DMSO	5			
2	extender		10			
3			15			
4		MeOH	5			
5			10			
6			15			
7		glycerol	5			
8			10			
9			15			
10	MC	DMSO	5			
11			10			
12			15			
13		MeOH	5			
14			10			
15			15			
16		glycerol	5			
17			10			
18			15			
19	น้ำเชื้อสด					

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบช่แข็ง มีการวางแผนการทดลองแบบ 2x3 แฟคทอเรียล ในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ คือ ใช้สาร extender 2 ชนิด

(Modifiedextenderและ MC)ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด(DMSOMeOH และ glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% โดยใช้น้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุมซึ่งในแต่ละทรีทเมนต์ได้ทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่อัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิเช่นเดียวกับทรีทเมนต์ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิไปtransformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน(ANOVA)ตามแผนการทดลองแบบ2×3แฟคทอเรียล ในการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธีDuncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ $P<0.05$โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปSPSS V. 16

3.3.6 การทดลองที่ 3 ศึกษาชนิดของสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

นำทรีทเมนต์ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุดคือ Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และ MC ร่วมกับ 15% DMSO จากการทดลองที่ 2 มาทำการศึกษาชนิดของ activation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

ขั้นตอนการทดลอง

1. ทำการเตรียมสาร activation solution 5 ชนิด ได้แก่ Tap water 17mMNaClและ 5 mMTris-HCl50 mMNaClKCl (100 mMKClและ 20 mMTris-HCl)และSASตามส่วนประกอบดังแสดงในตารางที่3.5 วัดค่า osmolality และค่า pH หลังจากนั้นนำสารactivation solution ที่เตรียมแล้วใส่ขวดแก้วปิดฝาให้สนิทเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ4-5°C

2. นำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายแล้วมากระตุ้นด้วยสาร activation solution ทั้ง 5 ชนิดในอัตราส่วน (1:5) ใน Efpendrofขนาด 1.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิดังแผนการทดลองในตารางที่3.6

ตารางที่ 3.5ค่า osmolality และค่า pH ของ activation solution

ชนิดที่	Activation solution	Osmolality ($mOsm\ kg^{-1}$)	pH	Ref.
1	Tap water	10.70±0.21	7.94±0.03	
2	17mMNaClและ 5mMTris-HCl	38.80±0.44	7.06±0.42	
3	50 mMNaCl(0.3 % NaCl)	96.10±0.31	7.02±0.01	Jing *et al.*(2009)
4	KCl(100 mMKCl และ 20 mMTris-HCl)	230.10±0.23	8.00±0.01	Alavi*et al.* (2009)
5	SAS (50 mMNaCl30 mMKClและ 30 mMTris-HCl)	191.20±1.48	8.47±0.02	Kalbassi*et al.*(2013)

ตารางที่3.6 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร activation solution 5ชนิด (Tap water 17mM NaCl+5 mMTris-HCl50 mMNaClKCl (100 mM KCl+20 mMTris-HCl)และSAS) ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิของอสุจิปลากา ดำที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งโดยใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และสาร MC ร่วมกับ 15% DMSO

Treatment	สาร extender+ cryoprotectant	สาร activation solution	อัตราการเคลื่อนที่ (%)	ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (s)	อัตราการปฏิสนธิ (%)
1	Modified+	Tap water			
2	10%DMSO	17mM NaCl+5mMTris-HCl			
3		50 mMNaCl			
4		KCl			
5		SAS			
6	MC+	Tap water			
7	15% DMSO	17mM NaCl+5mMTris-HCl			
8		50 mMNaCl			
9		KCl			
10		SAS			

หมายเหตุ : KCl(100 mM KCl+20 mMTris-HCl)

SAS (50 mMNaCl+30 mMKCl+30 mMTris-HCl)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

การศึกษาผลของสาร activation solution 5ชนิด(Tap water 17mM NaCl+5 mMTris-HCl 50 mMNaClKCl (100 mM KCl+20 mMTris-HCl)และSAS) ต่ออัตราการเคลื่อนที่ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ และอัตราการปฏิสนธิของอสุจิปลากาดำที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD ซึ่งในแต่ละทรีทเมนต์ได้ทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิ 10ซ้ำต่อทรีทเมนต์ก่อนการวิเคราะห์ความแปรปรวนนำผลอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิ ไป transformed โดยใช้วิธี Arcsine Transformation จากนั้นวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์ความแตกต่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple rang test ที่ระดับนัยสำคัญ$P<0.05$โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปSPSS V. 16

บทที่ 4
ผลการศึกษา

4.1 ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลากาดำ

จากการศึกษาพบว่าปลากาดำมีปริมาตรน้ำเชื้อเฉลี่ย 1.15±0.69 มิลลิลิตร/ตัว โดยมีความเข้มข้นของน้ำเชื้อ 13.00±2.62×10^9 ตัว/มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) มีค่าเท่ากับ 8.10±0.01 มีค่าออสโมลาลิตี้ (osmolality) 251±4.24 mOsm kg^{-1} และในน้ำเชื้อมีส่วนประกอบของไอออนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ โซเดียม (Na^+) และคลอไรด์ (Cl^-) เป็นหลัก รองลงมาคือ โพแทสเซียม (K^+) แคลเซียม (Ca^{2+}) และแมกนีเซียม (Mg^{2+}) ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลากาดำ

Parameter	N	Minimum	Maximum	Mean	S.D.
ความยาว (เซนติเมตร)	13	33.00	45.00	38.46	3.39
น้ำหนัก (กิโลกรัม)	13	0.36	0.98	0.61	0.17
ปริมาตรน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร/ตัว)	13	0.30	2.25	1.15	0.69
ความเข้มข้นน้ำเชื้อ (10^9 ตัว/มิลลิลิตร)	13	0.88	1.82	13.00	2.62
คุณลักษณะของ seminal plasma					
แคลเซียม (mM)	2	0.64	0.85	0.75	0.15
แมกนีเซียม (mM)	2	0.41	0.47	0.44	0.04
โซเดียม (mM)	2	60.47	81.17	70.82	14.64
โพแทสเซียม (mM)	2	35.75	39.04	37.40	2.35
คลอไรด์ (mM)	2	73.07	78.61	75.84	3.92
ออสโมลาลิตี้ (mOsmo kg^{-1})	13	244	258	251	4.24
pH	13	8.08	8.12	8.10	0.01

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

4.2 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น

จากการศึกษาผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น โดยใช้ชนิดของสาร extender 5 ชนิด ได้แก่ MC ; Modified Cortland solution HBSS ; Hanks' balanced salt solution 0.9% NaCl KU ; Kurokura solution และ Modified extender และมีน้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุม โดยทำการเก็บที่ระยะเวลา 1-5 วัน ทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ พบว่าสาร extender ทุกชนิดมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ น้ำเชื้อที่ไม่ได้เจือจางด้วยสาร extender ให้อัตราการเคลื่อนที่เพียง 42% หลังจากระยะเวลาเก็บ 1 วัน ขณะที่น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสาร extender ทั้ง 5 ชนิด ให้อัตราการเคลื่อนที่ 71-79% (P<0.05) แต่อย่างไรก็ตาม หลังจากระยะเวลาการเก็บ 2-5 วัน พบว่า การใช้ Modified extender ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด (66 61 39 และ 12% ตามลำดับ) และแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05 ; ดังตารางที่ 4.2) ส่วนน้ำเชื้อที่ไม่ได้เจือจางด้วยสาร extender พบว่าไม่มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่ระยะเวลาการเก็บ 3 วัน

สำหรับผลของอัตราการมีชีวิต พบว่าสาร extender ทุกชนิดให้อัตราการมีชีวิตลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น (P<0.05) ที่ระยะเวลาการเก็บ 3 วัน การใช้สาร extender ทั้ง 5 ชนิดยังให้ผลอัตราการมีชีวิตสูงกว่า 50% และให้ผลไม่แตกต่างกัน (P>0.05) ยกเว้นน้ำเชื้อที่ไม่ได้เจือจางด้วยสาร extender (P<0.05) และน้ำเชื้อที่ไม่ได้เจือจางด้วยสาร extender ไม่พบอัตราการมีชีวิตที่ระยะเวลาการเก็บ 4 วัน (ดังตารางที่ 4.3)

จากนั้นได้นำสาร extender ทั้ง 5 ชนิด มาทำการทดสอบอัตราการปฏิสนธิ พบว่าสาร extender ทุกชนิดให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น (P<0.05) ที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน พบว่าการใช้สาร Modified extender ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด (51% หรือ 73%ของน้ำเชื้อสด) ไม่แตกต่างกับการใช้สาร MC (P>0.05) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเก็บผ่านไปถึง 4 วัน พบว่าการใช้สาร Modified extender ยังคงให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด (19% หรือ 27%ของน้ำเชื้อสด) และแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05 ; ดังตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.2 ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ (Mean±SE) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำที่ระยะเวลาการเก็บ 1-5 วัน

สาร extender	ระยะเวลาการเก็บ (วัน)				
	1	2	3	4	5
MC	71.67±3.06^{b}	57.53±1.62^{b}	51.93±2.47^{b}	24.40±1.69^{b}	4.07±0.78^{b}
HBSS	70.67±3.21^{b}	48.33±2.11^{c}	24.07±1.31^{d}	12.13±1.37^{cd}	2.40±0.46^{b}
0.9% NaCl	73.40±1.75^{ab}	51.80±2.59^{bc}	20.93±1.54^{d}	9.20±1.02^{d}	0.40±0.19^{cd}
KU	74.40±1.94^{ab}	49.00±1.98^{c}	33.87±1.07^{c}	13.67±1.48^{c}	0.93±0.27^{c}
Modified	79.47±1.62^{a}	65.73±1.97^{a}	61.27±2.26^{a}	38.67±2.26^{a}	11.53±1.65^{a}
Control	41.73±0.90^{c}	12.60±1.65^{d}	0^{e}	0^{e}	0^{d}

หมายเหตุ : ตัวอักษรในแนวตั้งที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 4.3 ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต (Mean±SE) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำที่ระยะเวลาการเก็บ 1-5 วัน

สาร extender	ระยะเวลาการเก็บ (วัน)				
	1	2	3	4	5
MC	84.47±0.58^{a}	70.53±2.35^{a}	55.93±2.55^{a}	34.00±1.06^{a}	9.80±1.68^{ab}
HBSS	83.73±1.09^{a}	73.07±1.88^{a}	55.53±2.57^{a}	32.07±1.46^{a}	9.00±2.05^{b}
0.9% NaCl	83.67±0.98^{a}	69.73±2.32^{a}	55.00±2.93^{a}	25.00±1.89^{b}	7.73±2.21^{b}
KU	82.07±0.90^{a}	69.13±2.19^{a}	55.67±2.04^{a}	27.33±0.87^{b}	6.07±1.78^{b}
Modified	84.53±0.82^{a}	73.80±1.42^{a}	58.60±2.29^{a}	33.93±1.50^{a}	17.07±3.08^{a}
Control	54.73±1.82^{b}	29.53±0.49^{b}	9.13±0.62^{b}	0^{c}	0^{c}

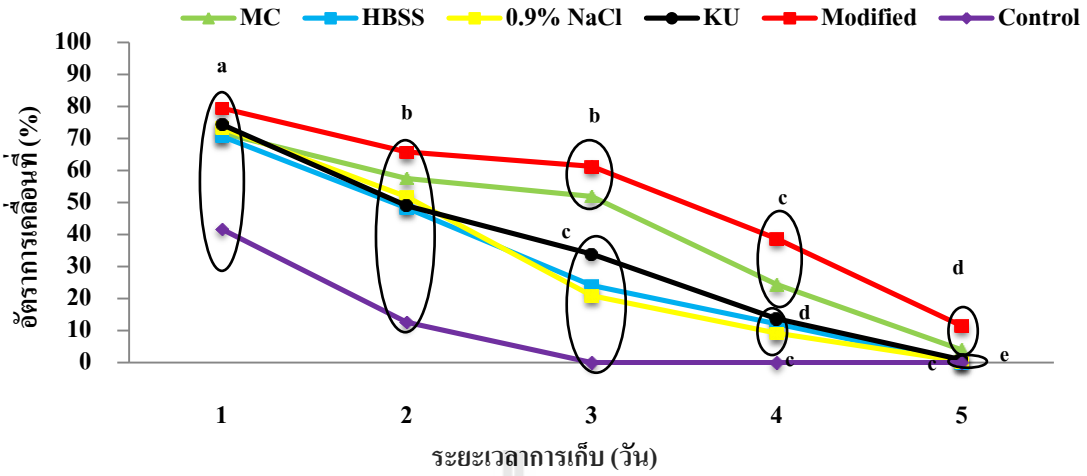
หมายเหตุ : ตัวอักษรในแนวตั้งที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 4.4 ผลของสาร extender ต่ออัตราการปฏิสนธิ (Mean±SE) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำที่ระยะเวลาการเก็บ 1-5 วัน

สาร extender	ระยะเวลาการเก็บ (วัน)				
	1	**2**	**3**	**4**	**5**
MC	58.02±0.57[a] (82.71)	49.61±0.44[a] (70.72)	31.55±0.81[b] (44.93)	4.40±0.27[b] (6.21)	0
HBSS	55.12±0.29[bc] (78.57)	36.38±1.35[c] (51.77)	21.06±0.70[d] (30.00)	2.56±0.32[d] (3.53)	0
0.9% NaCl	53.91±0.72[c] (76.85)	16.61±0.93[d] (23.55)	3.72±0.19[e] (5.27)	0[e]	0
KU	56.09±0.59[b] (79.95)	44.83±0.99[b] (63.89)	28.12±0.91[c] (40.02)	3.33±0.23[c] (4.70)	0
Modified	59.28±0.50[a] (84.50)	51.06±0.56[a] (72.79)	40.58±0.57[a] (57.83)	19.23±0.55[a] (27.37)	0

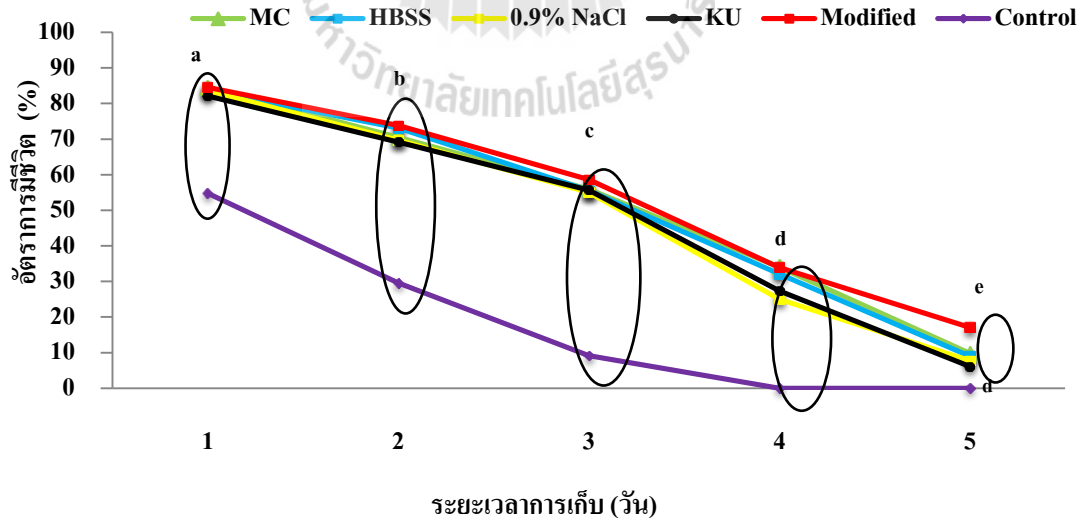
หมายเหตุ : ตัวอักษรในแนวตั้งที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)
อัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดเท่ากับ 70.15±0.48%
ตัวเลขในวงเลขคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าการใช้สาร extender แต่ละชนิด มีแนวโน้มของอัตราการเคลื่อนที่ลดลงแบบเส้นโค้งยกกำลังสาม (Cubic) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น (P<0.05) ซึ่งการใช้สาร extender ทุกชนิดทำให้อัตราการเคลื่อนที่ ลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บที่ 2 วัน (P<0.05) และการใช้ Modified extender สามารถยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ยาวนานที่สุด 3 วัน โดยให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุด (61%) (ภาพที่ 4.1)



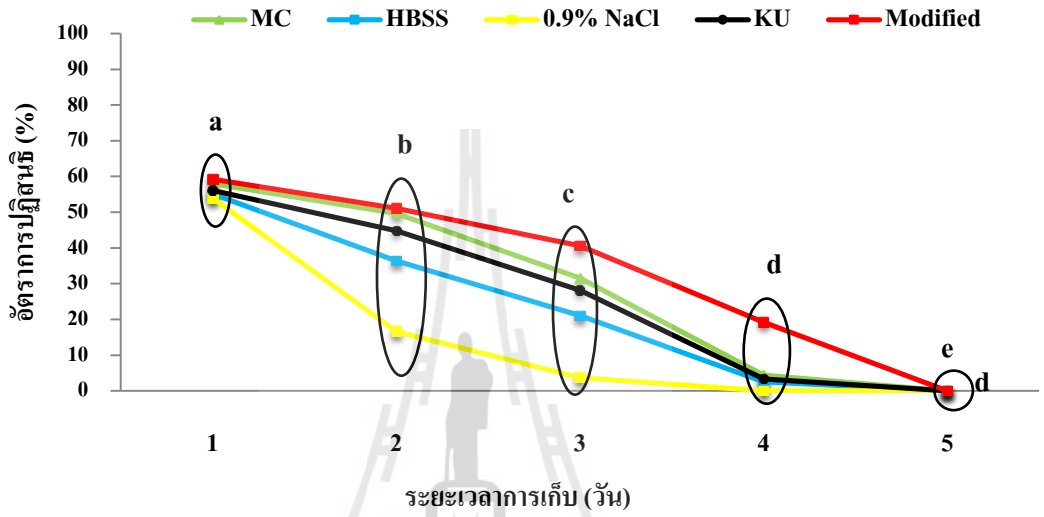
ภาพที่ 4.1 ผลของระยะเวลาการเก็บ 1-5 วัน ต่ออัตราการเคลื่อนที่ (%) ของน้ำเชื้อปลากาดำ
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

สำหรับผลของอัตราการมีชีวิต พบว่ามีแนวโน้มของอัตราการมีชีวิตลดลงแบบเส้นโค้งยกกำลังสี่ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น (P<0.05) โดยการใช้สาร extender ทุกชนิดลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บที่ 2 วัน (P<0.05) แต่อย่างไรก็ตามการใช้ Modified extender สามารถยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ของอสุจิได้ยาวนานที่สุด 3 วัน โดยให้อัตราการมีชีวิตสูงที่สุด (59 %) (ภาพที่ 4.2)



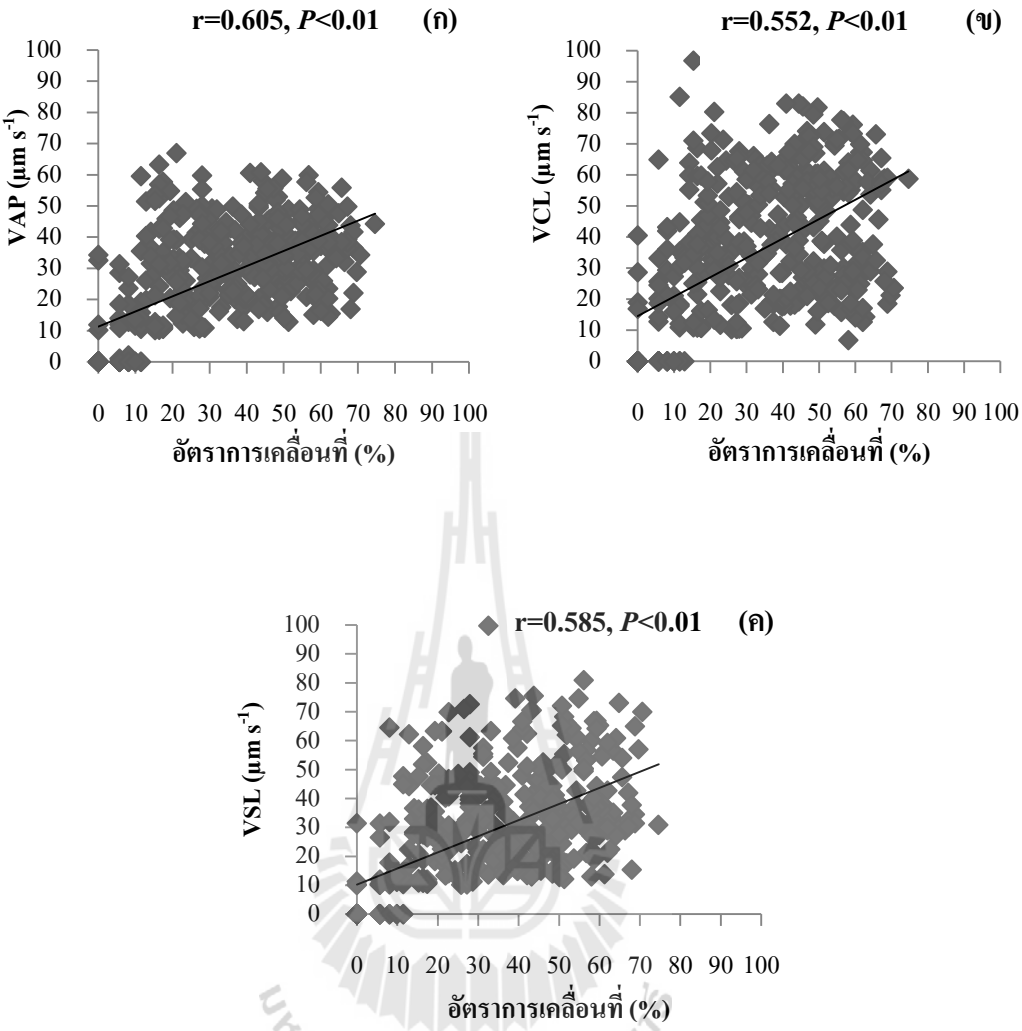
ภาพที่ 4.2 ผลของระยะเวลาการเก็บ 1-5 วัน ต่ออัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลากาดำ
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

สำหรับผลของอัตราการปฏิสนธิ พบว่ามีแนวโน้มของอัตราการปฏิสนธิลดลงแบบเส้นโค้งยกกำลังสี่ เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้น (P<0.05) ซึ่งการใช้สาร extender ทุกชนิดลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บที่ 2 วัน (P<0.05) และการใช้ Modified extender สามารถยืดระยะเวลาการปฏิสนธิของอสุจิได้ยาวนานที่สุด 3 วัน โดยให้อัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด (41% หรือ 58% ของน้ำเชื้อสด) และแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05 ; ภาพที่ 4.3)

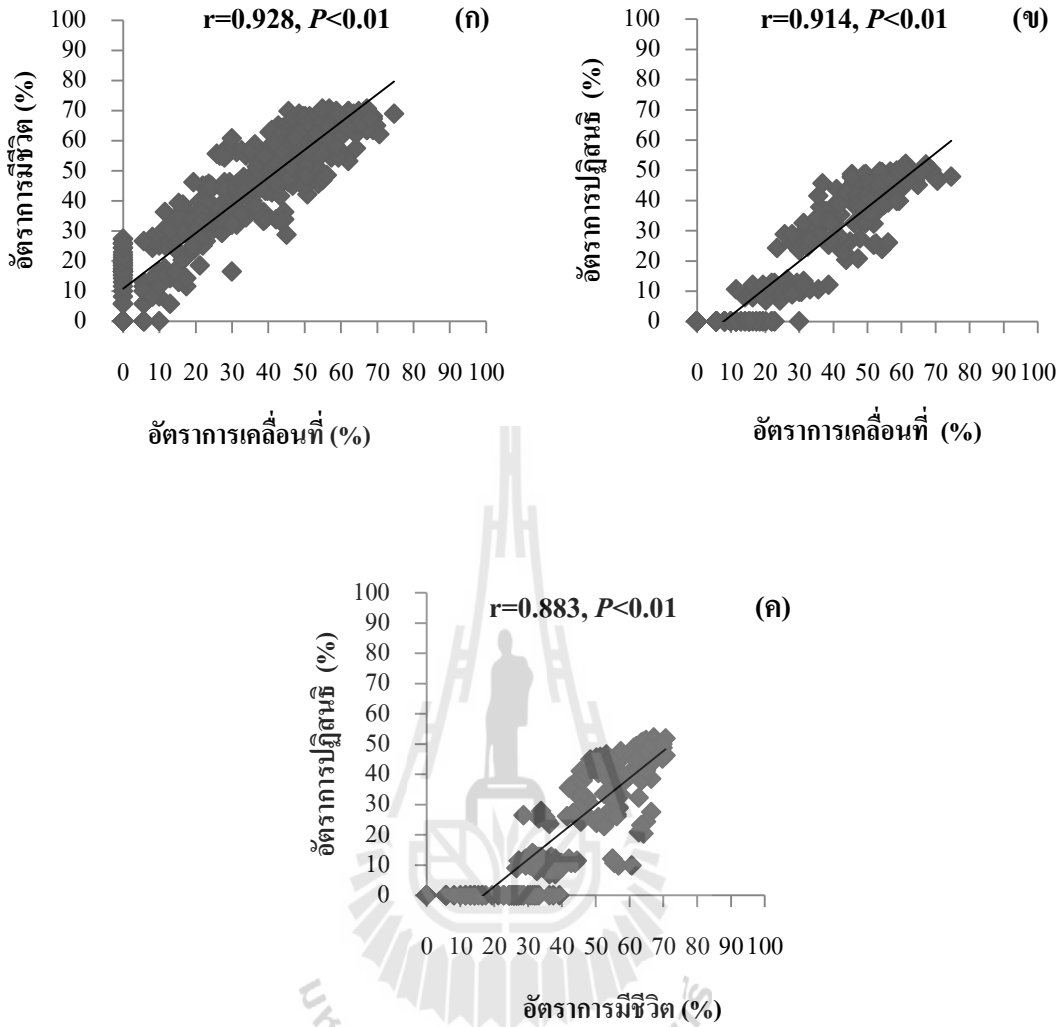


ภาพที่ 4.3 ผลของระยะเวลาการเก็บ 1-5 วัน ต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากาดำ
หมายเหตุ : ตัวอักษรที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

นอกจากนี้ยังศึกษาหาความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VCL และ VSL) อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ และระหว่างอัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อปลากาดำที่เก็บรักษาเป็นเวลา 1-5 วัน พบว่า อัตราการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VCL และ VSL) ในระดับปานกลาง (r=0.605 r=0.552 และ r=0.585, P<0.01 ตามลำดับ) (ภาพที่ 4.4 ก-ค) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่า อัตราการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิในระดับสูง (r=0.928 และ r=0.914, P<0.01 ตามลำดับ) เช่นเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการมีชีวิตกับอัตราการปฏิสนธิ (r=0.883, P<0.01) (ภาพที่ 4.5 ก-ค)



ภาพที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (ก) VCL (ข) และ VSL (ค) ที่ระยะเวลาการเก็บ 1-5 วัน



ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการมีชีวิต (ก) และอัตราการปฏิสนธิ (ข) และระหว่างอัตราการมีชีวิตกับอัตราการปฏิสนธิ (ค) ที่ระยะเวลาการเก็บ 1-5 วัน

4.3. ผลของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

จากการศึกษาผลของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งโดยใช้สาร extender 2 ชนิด คือ Modified extender และ MC ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSO MeOH และ glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10°C min^{-1} พบว่ามีอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ระหว่างชนิดของสาร extender กับชนิดของสาร cryoprotectant

การใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO ให้อัตราการเคลื่อนที่ (54% หรือ60% ของน้ำเชื้อสด) อัตราการมีชีวิต (63% หรือ 66% ของน้ำเชื้อสด) และอัตราการปฏิสนธิ (45% หรือ 64% ของน้ำเชื้อสด) ไม่แตกต่างจากการใช้ MC ร่วมกับ 15% DMSO (P>0.05) ส่วนการใช้ Modified extender และ MC ร่วมกับ glycerol ทุกระดับความเข้มข้น พบว่า ให้อัตราการเคลื่อนที่ (0%) อัตราการมีชีวิต (1%) และอัตราการปฏิสนธิ (0%) ต่ำที่สุดและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ส่วนการใช้ MeOH เป็นสาร cryoprotectant พบว่า ให้อัตราการเคลื่อนที่ 3-11% อัตราการมีชีวิต 7-14% และอัตราการปฏิสนธิ 0-1% (ดังตารางที่ 4.5)

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากาดำในสาร extender 2 ชนิด (Modified extender และ MC) ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSO MeOH และglycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

สาร extender	สาร cryoprotectant	ความเข้มข้น (%)	อัตราการเคลื่อนที่ (%)	อัตราการมีชีวิต (%)	อัตราการปฏิสนธิ (%)
Modified extender	DMSO	5	20.00±1.15 [d] (21.86)	23.70±1.31 [d] (24.88)	9.52±0.49 [d] (13.51)
		10	54.10±1.83 [b] (59.50)	62.70±0.78 [b] (66.13)	44.76±0.22 [b] (63.94)
		15	11.00±0.98 [e] (11.90)	15.80±1.18 [e] (16.49)	5.53±1.50 [e] (6.03)
	MeOH	5	4.30±1.15 [f] (3.20)	7.80±1.73 [f] (7.12)	0.38±0.27 [fg] (0.11)
		10	3.30±1.09 [f] (2.09)	6.50±1.65 [f] (5.75)	0.96±0.52 [f] (0.41)
		15	8.20±1.21 [e] (8.61)	12.40±1.34 [e] (12.79)	0.43±0.20 [fg] (0.28)
	glycerol	5	0 [g]	1.30±0.26 [g] (1.18)	0 [g]
		10	0 [g]	1.30±0.34 [g] (1.03)	0 [g]
		15	0 [g]	1.40±0.31 [g] (1.14)	0 [g]
MC	DMSO	5	21.00±1.05 [d] (22.98)	26.60±0.85 [d] (28.01)	9.47±0.99 [d] (13.23)
		10	39.50±1.83 [c] (43.34)	41.80±1.61 [c] (44.03)	33.17±1.74 [c] (47.22)
		15	56.30±2.31 [b] (61.94)	63.60±0.72 [b] (67.08)	43.70±0.55 [b] (62.42)

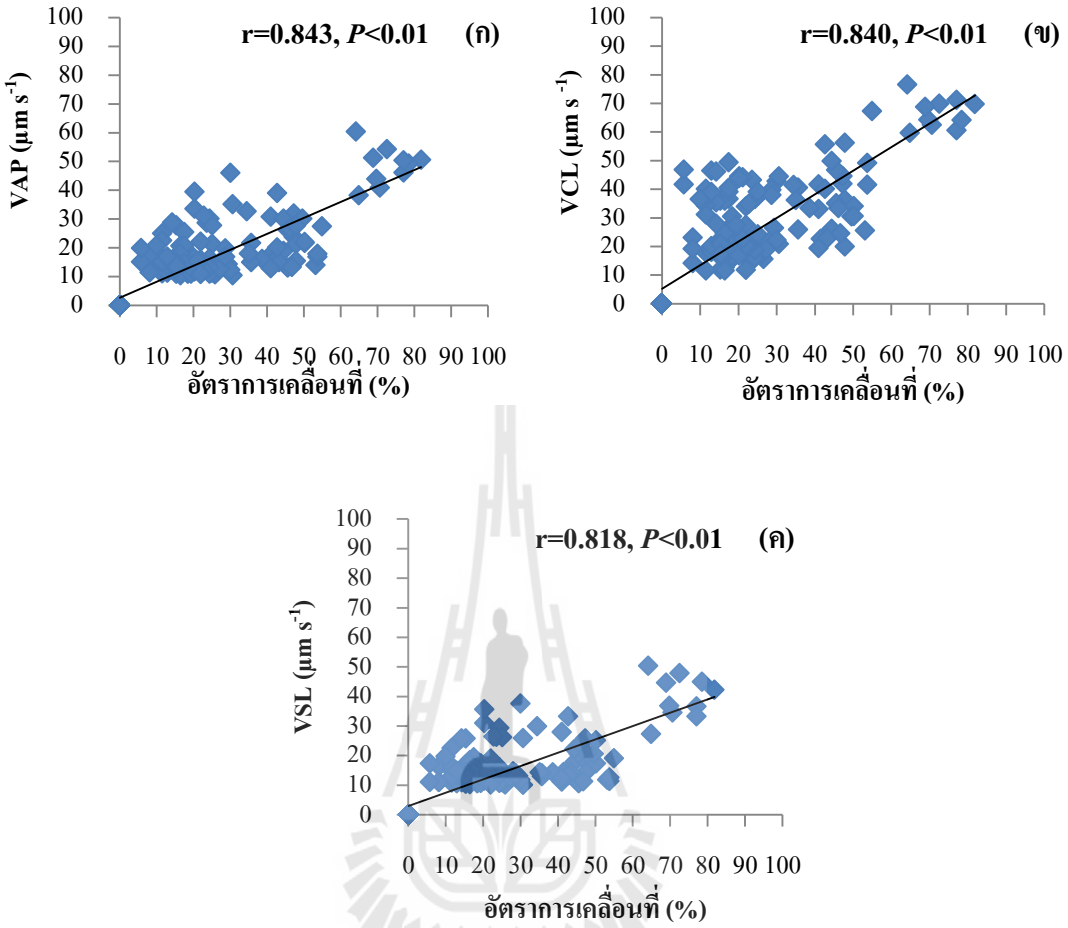
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ 4.5 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากาดำในสาร extender 2 ชนิด (Modified extender และ MC) ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSO MeOH และ glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15% (ต่อ)

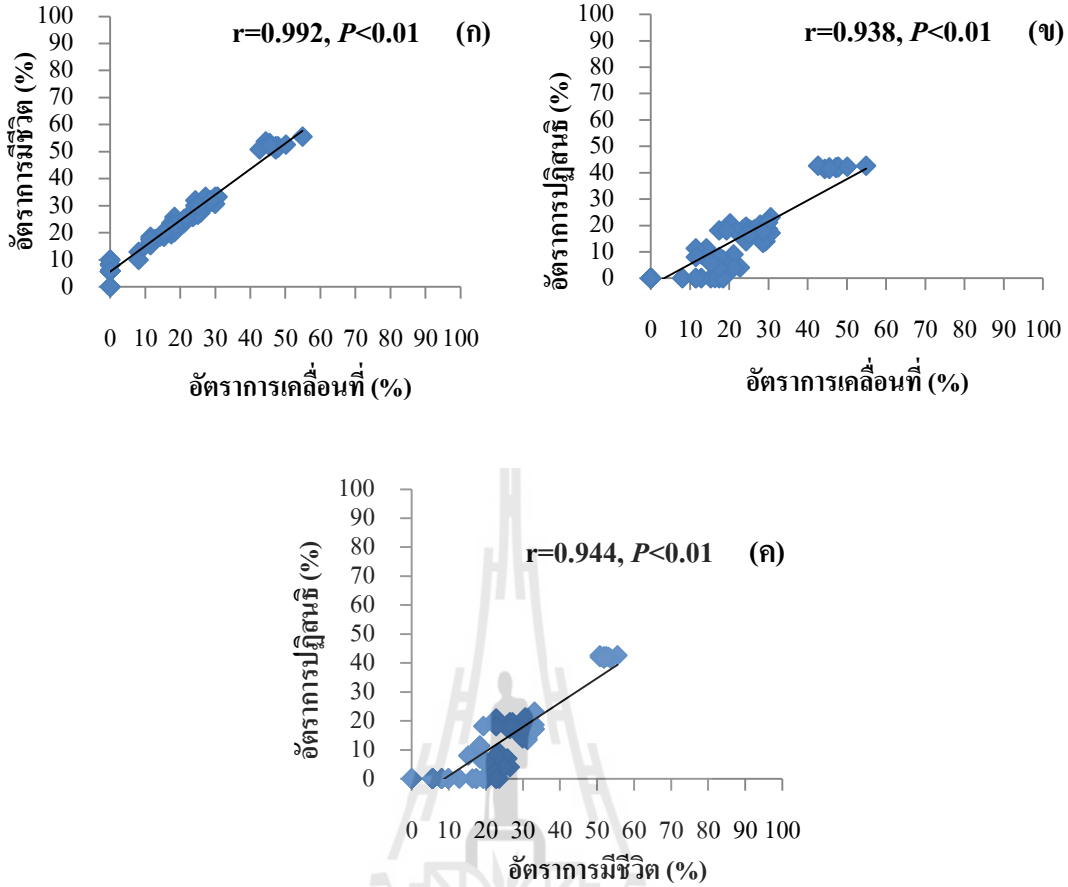
สาร extender	สาร cryoprotectant	ความเข้มข้น (%)	อัตราการเคลื่อนที่ (%)	อัตราการมีชีวิต (%)	อัตราการปฏิสนธิ (%)
MC	MeOH	5	11.00±0.93^{e} (11.91)	13.41±1.81^{e} (12.95)	0.14±0.10^{fg} (0.04)
		10	10.10±0.99^{e} (10.88)	14.20±1.21^{e} (14.78)	0.29±0.16^{fg} (0.12)
		15	5.10±1.61^{f} (3.66)	7.00±1.76^{f} (6.17)	0.19±0.11^{fg} (0.08)
	glycerol	5	0^{g}	1.80±0.20^{g} (1.84)	0^{g}
		10	0.40±0.31^{g} (0.08)	1.90±0.41^{g} (1.84)	0^{g}
		15	0.10±0.10^{g} (0.01)	1.40±0.22^{g} (1.84)	0^{g}
	น้ำเชื้อสด		90.20±1.85^{a}	94.40±1.00^{a}	70.00±0.32^{a}

หมายเหตุ : ตัวอักษรในแนวตั้งที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ตัวเลขในวงเลขคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VCL และ VSL) อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ และระหว่างอัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น พบว่า อัตราการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VCL และ VSL) (r=0.843 r=0.840 และ r=0.818, P<0.01 ตามลำดับ) (ภาพที่ 4.6 ก-ค) อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ (r=0.992 และ r=0.938, P<0.01 ตามลำดับ) ในระดับสูงเช่นเดียวกับความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการมีชีวิตมีกับอัตราการปฏิสนธิ (r=0.944, P<0.01) (ภาพที่ 4.7 ก-ค)

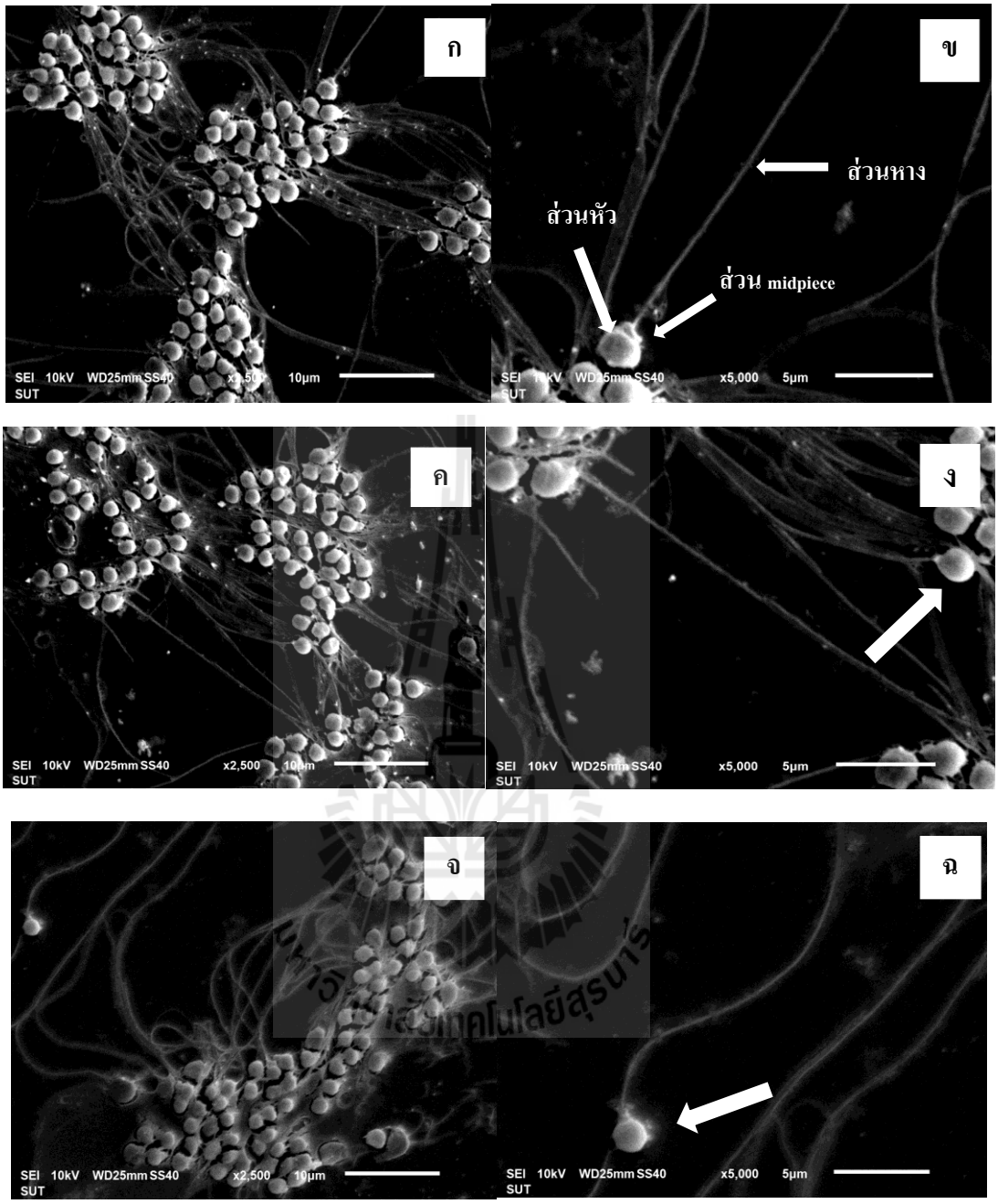


ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (ก) VCL (ข) และ VSL (ค) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น

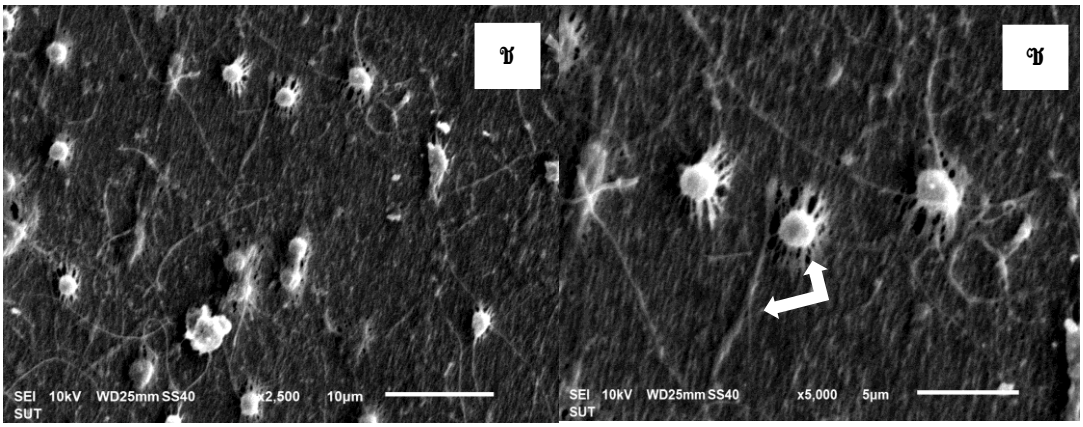


ภาพที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการมีชีวิต (ก) และอัตราการปฏิสนธิ (ข) และระหว่างอัตราการมีชีวิตกับอัตราการปฏิสนธิ (ค) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น

นอกจากนี้จากการตรวจสอบความผิดปรกติของตัวอสุจิที่เก็บรักษาแบบแช่เย็น ที่กำลังขยาย 2,500 เท่า และ 5,000 เท่า จากภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM โดยนำทรีทเมนต์ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุดคือ Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และ MC ร่วมกับ 15% DMSO และนำทรีทเมนต์ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิต่ำที่สุด คือ Modified extender ร่วมกับ 15% glycerol โดยมีน้ำเชื้อสดเป็นกลุ่มควบคุมมาทำการศึกษา พบว่าลักษณะของโครงสร้างของตัวอสุจิปลากาดำปรกติจากน้ำเชื้อสดจะประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วน midpiece และส่วนหาง (ภาพที่ 4.8 ก และ 4.8 ข) โดยลักษณะของส่วนหัวจะมีลักษณะกลม ส่วน midpiece จะมีขนาดสั้นและส่วนหางมีลักษณะยาว เมื่อใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และ MC ร่วมกับ 15% DMSO มีความเป็นพิษต่อโครงสร้างของตัวอสุจิน้อยกว่าการใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 15% glycerol ซึ่งยังคงรักษาโครงสร้างของตัวอสุจิบางตัวให้อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ (ภาพที่ 4.8 ค-ฉ) ส่วนการใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 15% glycerol พบว่าโครงสร้างของตัวอสุจิส่วนใหญ่ถูกทำลายโดยเฉพาะบริเวณส่วนหัวเกิดการแตกและแยกออกจากส่วนหาง (ภาพที่ 4.9 ช และ 4.9 ซ)



ภาพที่ 4.8 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิปลากาดำปรกติ ประกอบด้วย 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วน midpiece และส่วนหาง โดยส่วนหัวจะมีลักษณะกลม ส่วน midpiece จะมีขนาดสั้นและส่วนหางมีลักษณะยาว (น้ำเชื้อสด (ก และ ข) น้ำเชื้อที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งด้วยสาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และสาร MC ร่วมกับ 15% DMSO (ค-ฉ) ที่กำลังขยาย 2,500 เท่า และ 5,000 เท่า ตามลำดับ จากภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM



ภาพที่ 4.9 ลักษณะโครงสร้างของตัวอสุจิที่ถูกทำลาย โดยเฉพาะบริเวณส่วนหัว เกิดการแตกและแยกออกจากส่วนหาง เมื่อทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งด้วยสาร Modified extender ร่วมกับ 15% glycerol ที่กำลังขยาย 2,500 เท่า (ช) และ 5,000 เท่า (ซ) จากภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM

4.4 ผลของสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

จากการศึกษาชนิดของสาร activation solution ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งโดยนำทรีทเมนต์ที่ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุดจากการทดลองที่ 2 คือ Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และ MC ร่วมกับ 15% DMSO มาทำการศึกษาโดยใช้สาร activation solution 5 ชนิด ได้แก่ Tap water 17 mM NaCl+5 mM Tris-HCl 50 mM NaCl KCl (100 mM KCl+20 mM Tris-HCl) และ SAS (50 mM NaCl+30 mM KCl+30 mM Tris-HCl) จากการศึกษา พบว่าชนิดของสาร activation solution มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ และอัตราการปฏิสนธิ การใช้ 50 mM NaCl ให้อัตราการเคลื่อนที่ (74% หรือ 81% ของน้ำเชื้อสด) ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (61 s) และอัตราการปฏิสนธิ (50% หรือ 72% ของน้ำเชื้อสด) ซึ่งสูงกว่าและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษา (P<0.05) ส่วนการใช้ SAS ให้อัตราการเคลื่อนที่ (19% หรือ 20% ของน้ำเชื้อสด) ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (11 s) และอัตราการปฏิสนธิ (11% หรือ 15% ของน้ำเชื้อสด) ต่ำที่สุดและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ ที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05 ; ดังตารางที่ 4.6)

ตารางที่ 4.6 ค่าเฉลี่ย (Mean±SE) อัตราการเคลื่อนที่ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากาดำ ในสาร activation solution 5 ชนิด (Tap water 17 mM NaCl+5 mM Tris-HCl 50 mM NaCl KCl (100 mM KCl+20 mM Tris-HCl) และ SAS) เมื่อใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และ MC ร่วมกับ 15% DMSO

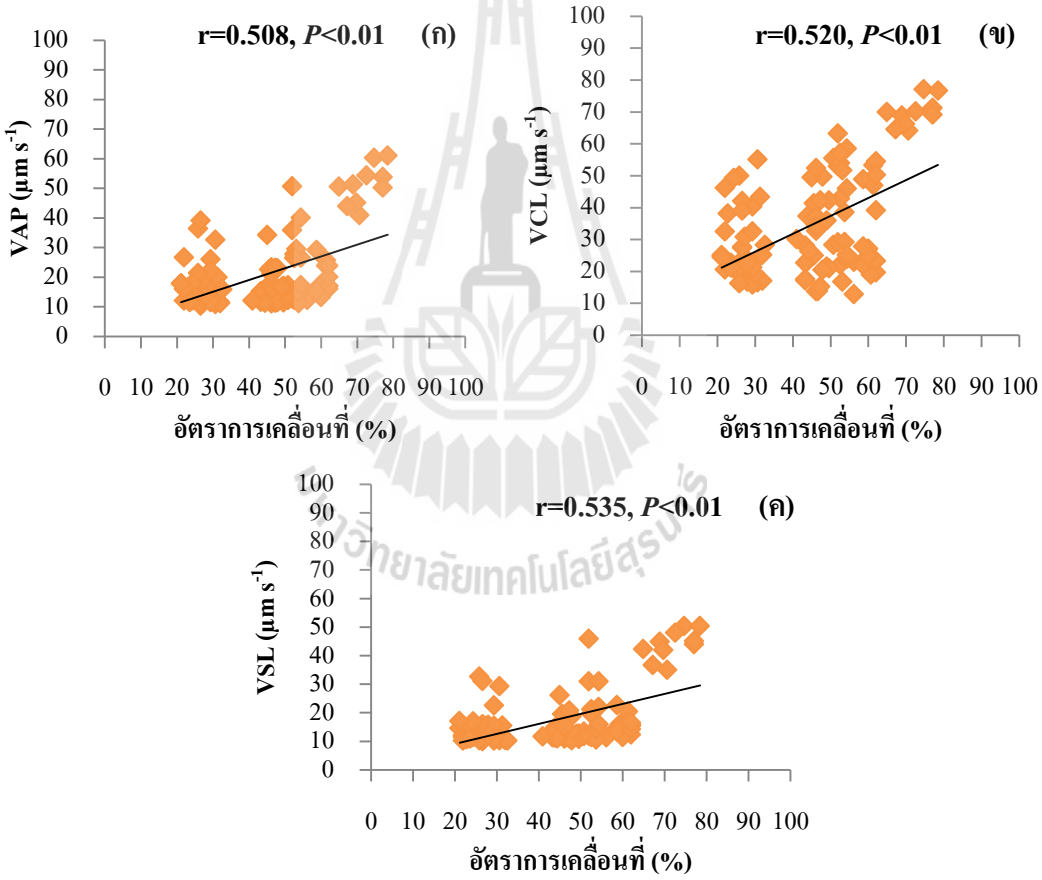
Treatment	activation solution	อัตราการเคลื่อนที่ (%)	ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (s)	อัตราการปฏิสนธิ (%)
Modified extender+ 10% DMSO	Tap water	50.70±1.08^{d} (55.98)	10.90±0.28^{d}	45.05±0.28^{d} (64.17)
	17 mM NaCl+ 5 mM Tris-HCl	62.10±1.72^{c} (68.64)	50.90±0.41^{b}	48.12±0.50^{c} (68.88)
	50 mM NaCl	73.60±1.54^{b} (81.39)	60.80±0.36^{a}	50.58±0.35^{b} (72.06)
	100 mM KCl+ 20 mM Tris-HCl	23.30±0.87^{e} (25.67)	19.60±0.16^{c}	13.82±0.26^{e} (19.76)
	SAS[1]	18.60±1.37^{f} (20.34)	11.80±0.29^{d}	10.97±0.27^{g} (15.68)
MC+15% DMSO	Tap water	50.60±1.36^{d} (55.87)	10.70±0.21^{d}	44.42±0.23^{d} (63.28)
	17 mM NaCl+ 5 mM Tris-HCl	61.20±1.22^{c} (67.61)	51.10±0.31^{b}	47.20±0.35^{c} (67.56)
	50 mM NaCl	73.80±1.51^{b} (81.61)	60.90±0.69^{a}	50.44±0.18^{b} (71.85)
	100 mM KCl+ 20 mM Tris-HCl	23.30±1.32^{e} (25.59)	20.30±0.37^{c}	12.85±0.32^{f} (18.38)
	SAS[1]	18.60±1.27^{f} (20.37)	11.20±0.33^{d}	10.63±0.35^{g} (15.18)
น้ำเชื้อสด		90.10±1.49^{a}	11.00±0.33^{d}	70.19±0.19^{a}

หมายเหตุ : [1]SAS (50 mM NaCl+30 mM KCl+30 mM Tris-HCl)

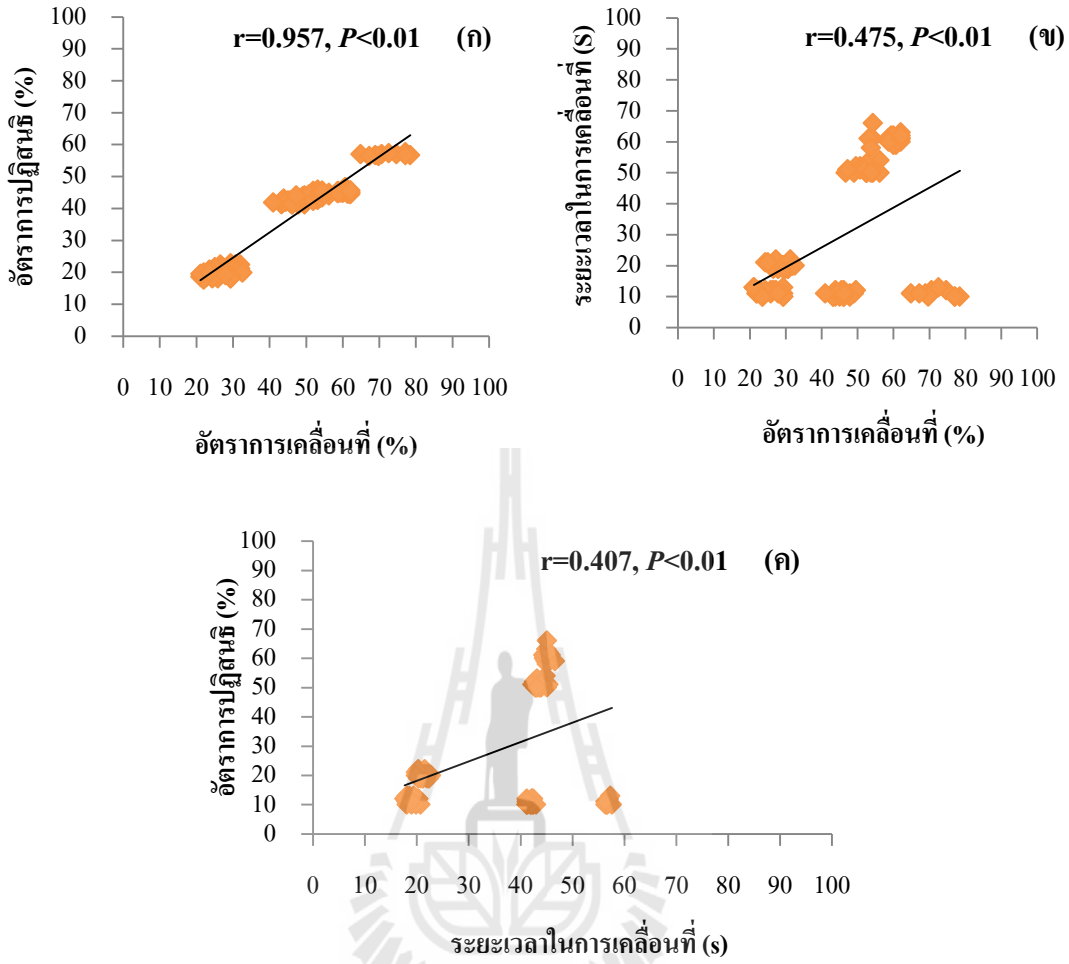
ตัวอักษรในแนวตั้งที่แตกต่างกัน แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตัวเลขในวงเลขคือ เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด (% of control)

นอกจากนี้ยังศึกษาหาความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VCL และ VSL) ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิ และระหว่างระยะเวลาในการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิ ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น โดยใช้สาร activation solution 5 ชนิด พบว่า อัตราการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP VCL และ VSL) ในระดับปานกลาง (r=0.508 r=0.520 และ r=0.535, $P<0.01$ ตามลำดับ) (ภาพที่ 4.10ก-ค) แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าอัตราการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการปฏิสนธิในระดับสูง (r=0.957, $P<0.01$) (ภาพที่ 4.11ก) ส่วนระยะเวลาในการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิในระดับต่ำ (r=0.475 และ r=0.407, $P<0.01$ ตามลำดับ) (ดังภาพที่ 4.11ข และ 4.11ค)



ภาพที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับลักษณะการเคลื่อนที่แบบต่าง ๆ (VAP (ก) VCL (ข) และ VSL (ค) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็งที่ใช้สาร activation solution 5 ชนิด



ภาพที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิ (ก) และระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (ข) และระหว่างอัตราการปฏิสนธิกับระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของอสุจิ (ค) ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งที่ใช้สาร activation solution 5 ชนิด

บทที่ 5
อภิปรายผล

5.1 ส่วนประกอบไอออนค่าออสโมลาลิตี้และค่า pH ของน้ำเชื้อปลากาดำ

จากการศึกษาส่วนประกอบของไอออนชนิดต่างๆของน้ำเชื้อปลากาดำพบว่ามีโซเดียม(Na^+) และคลอไรด์(Cl^-) เป็นองค์ประกอบหลักซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลา*Barbussharpeyi* (Alavi, Jorfi, Hatef and Mortezavi, 2010) โซเดียม(Na^+)และโพแทสเซียม(K^+) มีบทบาทสำคัญต่อการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิในปลากลุ่ม cyprinids เช่น ในปลา Java carp (*Puntiusjavanicus*) (Morita, Okuno, Susilo, Setyo, Martarini, Harnadi and Takemura, 2006) ปลา common barbel (*Barbusbarbus*) (Alavi*et al.*, 2009) ปลา Bunnei (*B. sharpeyi*) (Alavi*et al.*, 2010) และปลา Grass carp (*Ctenopharyngodonidella*) (Khara, 2014) นอกจากนี้โพแทสเซียม (K^+) ยังมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มความเร็วและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในปลา carp โดยอสุจิของปลา carp มีความไวต่อโพแทสเซียม (K^+) น้อยกว่าอสุจิของปลา Trout (Alavi and Cosson, 2006) Alavi*et al.* (2010) รายงานว่าความเข้มข้นของไอออนใน seminal plasma ของปลากลุ่ม cyprinids มีความแปรปรวนที่กว้างและแตกต่างกัน จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าความเข้มข้นของ K^+ในน้ำเชื้อปลากาดำมีค่าเท่ากับ 37.40±2.35mM L^{-1} ซึ่งมีค่ามากกว่าที่รายงานในปลา *Tincatinca*(1.90 mM L^{-1}; Linhart, Rodina, Bastl and Cosson, 2003) และในปลา *B.sharpeyi* (28.80 mM L^{-1}; Alavi*et al.*, 2010) ซึ่งความแตกต่างนี้น่าจะขึ้นอยู่กับชนิดของปลา

นอกจากนี้ค่า osmolality ยังเป็นตัวแปรสำคัญที่มีผลต่อคุณภาพของอสุจิ โดยค่าosmolality ที่พบใน seminal plasma ของปลากาดำอยู่ในช่วง 244.00-258.00 mOsm kg^{-1} ซึ่งค่า osmolality ของ seminal plasma ที่รายงานไว้ในปลากลุ่ม cyprinidsซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 230.00-346.00 mOsm kg^{-1}ค่า osmolalityในseminal plasma ของปลากาดำพบว่ามีค่าต่ำกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับปลากลุ่ม cyprinids ชนิดอื่น ๆ เช่น จากการรายงานของ Alavi, Psenicka, Rodina, Policar and Linhart(2008) พบว่าค่า osmolalityใน seminal plasma ของปลา *B. barbus*มีค่าอยู่ระหว่าง 268.00-276.00 mOsm kg^{-1} เช่นเดียวกับค่า osmolality ที่พบใน seminal plasma ของปลา *C. carpio*มีค่าอยู่ระหว่าง 264.30-267.00 mOsm kg^{-1}(Cejko, Krejszeff, Judycka, Sarosiek, Dietrich, Kucharczyk and Kowalski, 2014) ซึ่งค่า osmolality ที่ แตกต่างกันนี้ น่าจะเกี่ยวข้องกับส่วนประกอบของไอออนและองค์ประกอบทางชีวเคมีใน seminal plasma ที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของปลา ฤดูสืบพันธุ์และยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง เช่น อายุของตัวอสุจิ ตลอดจนความเข้มข้นของอสุจิเป็นต้น (Alavi and Cosson, 2006; Alavi, Linhart, Coward and Rodina, 2008) สำหรับค่า pH ใน seminal plasma ของปลากาดำ พบว่ามี

ค่าความเป็นด่างอ่อนๆ (8.10) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานในปลากลุ่ม cyprinids ชนิดอื่น ๆ เช่น ในปลา *C. carpio* (pH 8.55-8.63; Cejko*et al.*, 2014) ปลา *C. idella* (pH 6.00-8.50;Bozkurt, Ogretmen, Ercin and Yildiz, 2008)ปลา *P. jullieni* (pH 7.14-7.85; Chew *et al.*, 2010) และปลา*L. calbasu* (pH 7.56; Hassan *et al.*, 2014) เป็นต้น การศึกษาเกี่ยวกับลักษณะของน้ำเชื้อนับว่าเป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญ สำหรับการประยุกต์ใช้เพื่อ ปรับปรุงวิธีการ ผสมเทียมโดยการพัฒนา สาร extender หรือ สาร activation ตลอดจนใช้เป็นข้อมูลสำหรับ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งในน้ำเชื้อปลากาดำ

5.2 ผลของสาร extender และระยะเวลาการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น

สาร extender นับว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบ แช่เย็น โดยทำหน้าที่ควบคุมค่า osmolality และค่า pH เพื่อรักษาความสามารถในการทำงานและการเข้าปฏิสนธิของตัวอสุจิ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าชนิดของสาร extender และระยะเวลาในการเก็บมีผลต่อ อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิโดยมีแนวโน้มลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บเพิ่มขึ้น (P<0.05) ในทุก ๆ ทรีทเมนต์ที่ทำการศึกษาโดย Modified extender เป็นสาร extender ที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำได้ดีที่สุดสามารถเก็บรักษาได้นานที่สุดถึง 3วันทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาร Modified extender มีค่า osmolality และค่า pH (252±1.00mOsm kg^{-1}และ 8.11±0.05 ตามลำดับ) ใกล้เคียงกับค่า osmolality และค่า pH ใน seminal plasma ของน้ำเชื้อปลากาดำ(251±4.24 mOsm kg^{-1}และ 8.10±0.01ตามลำดับ)ในปลากลุ่ม cyprinids ค่า osmolality และค่า pH มีบทบาทสำคัญที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ (Kraszani*et al.*, 1995) โดยปกติอสุจิของปลาจะไม่มีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในอัณฑะเนื่องจากอยู่ในภาวะisotonic osmolality แต่อสุจิจะเริ่มเคลื่อนที่เมื่อปล่อยออกมาสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก ซึ่งปรากฏการณ์ ดังกล่าวสอดคล้องกับที่พบในอสุจิของปลากลุ่ม carp (Alavi and Cosson, 2005) นอกจากนี้ Billard (1986) รายงานว่าโดยปกติค่า osmolality และส่วนประกอบของ seminal plasma มีหน้าที่ป้องกันการเคลื่อนที่ของอสุจิปลาในท่ออสุจิ ซึ่ง ค่า osmolality ใน seminal plasma ของปลากลุ่ม cyprinids อยู่ในช่วง 230.00-346.00 mOsm kg^{-1}จากการศึกษาในครั้งนี้ ถึงแม้ว่าจะมีการใช้ extender ทุกชนิดที่มีค่า osmolality ใกล้เคียงกับที่พบในปลากลุ่ม cyprinids แต่การใช้สาร modified extender ที่มีคุณสมบัติเป็น isotonic osmolality ให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้สาร extender ที่มีคุณสมบัติเป็น hypertonic osmolality (MC HBSS และ 0.9% NaCl) หลังจากระยะเวลาการเก็บรักษาเป็นเวลา4 วัน ซึ่งสอดคล้องการศึกษาของ Chew *et al.* (2010)ที่พบว่าการใช้สาร extender ที่มีคุณสมบัติเป็น isotonic osmolality (calcium free Hank's balance salt solution, CF-HBSS)ให้อัตราการเคลื่อนที่ (69.3±5.9%)สูงกว่าการใช้สาร

extender ชนิดอื่น ๆ ($P<0.05$) ในปลา *P. jullieni*ยังสอดคล้องกับการศึกษาในปลา silver barb (*P. gonionotus*) พบว่าการจำลองสาร extender-4 เป็นสารที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งเนื่องจากมีค่าใกล้เคียงกับ seminal plasma ของอสุจิปลา(Routray, Dash, Dash, Swain, Sarkar and Sarangi, 2008)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสาร Modified extender ยังมี glucose และ Tris-HClเป็นองค์ประกอบ ซึ่ง glucose จะเป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิและนอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็นexternal cryoprotectantสำหรับป้องกันเซลล์เมมเบรนของอสุจิไม่ให้ถูกทำลาย ส่วน Tris-HClมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ ซึ่งสารละลายบัฟเฟอร์จะมีความสามารถในการป้องกันการเปลี่ยนแปลงของค่า pH เมื่อมีค่า pKa ใกล้เคียงกับค่า pH ของสารละลาย โดยค่าpKa ของ Tris-HCl (8.06) มีค่าใกล้เคียงกับค่า pH ของสาร Modified extender (8.11±0.05) จึงทำให้ Tris-HClทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพสอดคล้องกับการศึกษาในปลา Grass carp (*C. idella*) ซึ่งรายงานโดย Bozkurt*et al.* (2009) พบว่าสารextender ที่มี glucose เป็นองค์ประกอบในสาร extender มีความเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นในปลา Grass carp และยังสอดคล้องกับการรายงานของJing *et al.* (2009) พบว่าสาร extender ที่มี glucose เป็นองค์ประกอบ (HBSS) และมีคุณสมบัติเป็นด่างอ่อน ๆ (pH 7.5-8.0) เป็นสาร extender ที่มีความเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นในปลาZebrafish (*Daniorerio*)

การใช้สาร MCHBSS และ 0.9% NaClเป็นสาร extender ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้สาร Modified extender ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาร extendersเหล่านี้มีคุณสมบัติเป็น hypertonic osmolality และไม่มี glucose และTris-HClเป็นองค์ประกอบในสูตร ถึงแม้ว่าสาร HBSSจะมี glucose เป็นองค์ประกอบในสูตรแต่มีปริมาณน้อยกว่า Modified extenderถึง 3 เท่า จึงอาจจะทำให้มีพลังงานไม่เพียงพอสำหรับการเก็บรักษาคุณภาพของอสุจิหลังจากระยะการเก็บรักษาที่ 3 วัน พบว่า การใช้ 0.9% NaClไม่มีอัตราการปฏิสนธิ อาจเนื่องมาจากสาร 0.9% NaClมีความไวต่อค่า osmolalityและความเข้มข้นของNa^+และCl^-ที่สูงอาจส่งผลต่อส่วนหางของอสุจิแต่อย่างไรก็ตามมีการรายงานไว้ว่าการใช้ saline solutions เป็นสาร extender ที่ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นของปลากลุ่ม cyprinids บางชนิดเช่น ในปลา Tench (*T. tinca*) (Rodina*et al.*, 2004) ปลา *Cirrhinusmicrolepis*(Singsee*et al.*, 2005)และปลา Java carp (*P. javanicus*) (Morita *et al.*, 2006)เป็นต้น จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าน้ำเชื้อที่ไม่ได้เจือจางด้วยสาร extender (กลุ่มควบคุม) ให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตต่ำที่สุด ทั้งนี้อาจเกิดจาก anaerobic conditions และ dehydration effect ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในปลาน้ำจืดชนิดอื่น ๆ เช่นปลา*C. capio* (Bozkurt and Secer, 2005)และปลา Grass carp (*C. idella*) (Bozkurt*et al.*, 2009)เป็นต้น

คุณภาพของอสุจิถือว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการผสมเทียมในปลา อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิถือว่าเป็นพารามิเตอร์หนึ่งที่นิยมใช้ประเมินคุณภาพของอสุจิ พบว่าอัตรา

การเคลื่อนที่ของอสุจิที่สูงเป็นปัจจัยสำคัญต่ออัตราการปฏิสนธิ จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าอัตราการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์ในระดับสูงกับอัตราการปฏิสนธิ(r=0.914, P<0.01) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็นในปลาน้ำจืดของ Mansour, Ramoun and Lahnsteiner (2005) ในปลา African catfish (*Clariasgariepinus*) พบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิ (r=0.899, P<0.01) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลาwalking catfish (*C. macrocephalus*) พบว่า อัตราการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์ในระดับสูงกับอัตราการปฏิสนธิ (r=0.89, P=0.0001) (Vuthiphandchai*et al.*, 2009)

5.3 ผลของสาร extenderชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectantที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

การใช้สาร extender และ cryoprotectant ที่เหมาะสมนับว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญในการประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งจากการศึกษาผลของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectantที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็งโดยใช้สาร extender 2ชนิดคือ Modified extender และ MC ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSO MeOH และglycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 510 และ 15% พบว่ามีอิทธิพลร่วมกัน (interaction) ระหว่างชนิดของสาร extender กับ ชนิดของสาร cryoprotectantเนื่องมาจากการทำงานร่วมกันระหว่างชนิดของสาร extender กับ ชนิดของสาร cryoprotectant ต่างชนิดกัน ส่งผลให้มีการเพิ่มแรงดันออสโมติกที่แตกต่างกัน ดังนั้นการเลือกใช้สาร cryoprotectant ต้องคำนึงถึงชนิดของสาร extender ด้วย จากการศึกษาพบว่า การใช้สาร Modifiedextender ร่วมกับ 10% DMSO ให้อัตราการเคลื่อนที่ (54% หรือ 60% ของน้ำเชื้อสด) อัตราการมีชีวิต (63% หรือ 66% ของน้ำเชื้อสด) และอัตราการปฏิสนธิ (45% หรือ 64% ของน้ำเชื้อสด) ไม่แตกต่างจากการใช้สาร MC ร่วมกับ 15% DMSO(P>0.05) แต่สูงและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสาร DMSO สามารถซึมผ่านเข้าไปในเซลล์และรักษาสมดุลความเข้มข้นของของเหลวระหว่างภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว (Ciereszko, Ramseyer and Dabrowski, 1993) จึงสามารถป้องกันความเสียหายที่จะเกิดกับเซลล์อสุจิได้ สอดคล้องกับ ลักษณะโครงสร้างทางกายภาพของตัวอสุจิจากภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า เมื่อ ใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และสารMC ร่วมกับ 15% DMSOยังคงรักษาโครงสร้างของตัวอสุจิบางตัวให้อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์(ดังภาพที่ 4.8ค-จ)ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Rani and Munuswamy (2014) ที่ทำการศึกษาโครงสร้างของตัวอสุจิที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งจากภาพถ่ายด้วยกล้อง SEMพบว่าการใช้DMSOเป็นสาร cryoprotectantซึ่งสามารถรักษาโครงสร้างของอสุจิปลาให้อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ได้จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้ 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant

ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งปลาตระกูล cyprinids หลายชนิดเช่น ในปลา silver carp (*Hypophthalmichthysmolitrix*) (Alvarez *et al.,* 2003; Hossain and Sarder, 2009) ปลา mahseer (*Tor khudree*) (Basavarajaet *al.*, 2006) ปลา mrigal (*Cirrhinuscirrhosus*) (Sarder*et al.*, 2009) ปลาไน (*Cyprinuscarpio*) (Irawan*et al.*, 2010 ; Sultana *et al.*, 2010 ; Bozkurt*et al.*, 2012) ปลา olive barb (*Puntiussarana*) (Nahiduzzaman*et al.*, 2011) ปลายี่สกเทศ (*Labeorohita*) (Sarder, Rahman, Samad, Nazrul and Bhuiyan, 2011) ปลา shabout (*Barbusgrypus*) (Dogu, 2012) ปลา Indian major carp (*Labeocalbasu*) (Nahiduzzaman*et al.*, 2012) และในปลาตะเพียนขาว (*Barbodesgonionotus*) (Vuthiphandchai*et al.*, 2014) เป็นต้น และพบว่าการใช้ 15% DMSO เป็นสาร cryoprotectant ที่ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinuscarpio*) (Bozkurt, 2005) และยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Yavas*et al.* (2014) ซึ่งทำการศึกษาในปลาไนเช่นกันพบว่าการใช้ 5% DMSO ให้อัตราการฟักไม่ต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ($P>0.05$)

ส่วนการใช้สาร Modified extender และ MC ร่วมกับ glycerol ทุกระดับความเข้มข้นพบว่า ให้อัตราการเคลื่อนที่ (0%) อัตราการมีชีวิต (1%) และอัตราการปฏิสนธิ (0%) ต่ำที่สุดและแตกต่างจากทรีทเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการใช้ระยะ equilibration time (10 นาที) ที่เท่ากัน ทำให้ glycerol ซึ่งมีมวลโมเลกุล (92.09) มากกว่า DMSO (78.13) และ MeOH (32.04) มีอัตราการแพร่ผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ช้ากว่าสาร cryoprotectant ชนิดอื่น ๆ อาจทำให้มีประสิทธิภาพไม่เพียงพอในการป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์อสุจิ ดังนั้นการใช้ glycerol อาจจะต้องใช้ระยะ equilibration time ที่นานขึ้นเพื่อให้ glycerol สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์อสุจิได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจสอบความผิดปกติของตัวอสุจิที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งจากภาพถ่ายด้วยกล้อง SEM พบว่า การใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 15% glycerol ทำให้โครงสร้างของตัวอสุจิส่วนใหญ่ถูกทำลาย โดยเฉพาะ บริเวณส่วนหัวเกิดการแตกและแยกออกจากส่วนหาง (ภาพที่ 4.9ช และ 4.9ซ) จึงส่งผลให้อสุจิไม่สามารถเข้าไปผสมกับไข่ปลาได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Tsai, Spikings, Hwang and Lin (2010) ที่พบความผิดปกติของตัวอสุจิในปลา Taiwan shoveljaw carp (*Varicorhinusbarbatulus*) มีการแตกของส่วนหัวและการบวมของส่วน midpiece เป็นต้น สอดคล้องกับการรายงานของ Alvarez *et al.* (2003) ที่พบว่าการใช้สาร glycerol มีความเป็นพิษต่ออสุจิของปลา silver carp (*Hypophthalmichthysmolitrix*) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้ glycerol เป็นสาร cryoprotectant ที่ไม่ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งในปลาบางชนิด เช่น ปลา grouper (*Epinephelustauvina*) (Withler and Lim, 1982) ปลา pacific herring และปลา turbot (Pillai, Yanagimachi and Cherr, 1994 ;Dréanno, Suquet, Quemener, Cosson, Fierville, Normant and Billard, 1997) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาของ Francis, Archana Deviand Selvamagheswaran (2013) พบว่าการใช้สาร glycerol เป็นสาร cryoprotectant ประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา CatlaRohu และ Mrigal โดยจะต้องมีการใช้ระยะ equilibration time ที่อยู่ในช่วง 20-40 นาที

ส่วนการใช้ MeOHเป็นสาร cryoprotectantพบว่า ให้อัตราการเคลื่อนที่3-11% อัตราการมีชีวิต 7-14% และอัตราการปฏิสนธิ0-1% ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในการศึกษาครั้งนี้มีการใช้ระยะequilibration time(10 นาที) ที่เท่ากัน อาจทำให้สารMeOH ซึ่งมีมวลโมเลกุลต่ำกว่ามวลโมเลกุลของสารDMSO และ glycerol ทำให้สามารถซึมเข้าสู่เซลล์ได้อย่างรวดเร็วกว่าสาร cryoprotectant ชนิดอื่น ๆและยังสัมผัสกับเซลล์เป็นเวลานาน จึงอาจมีความเป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งนี้ เพราะสารcryoprotectantแต่ละชนิดมีความสามารถในการซึมผ่านเซลล์ที่แตกต่างกัน อีกทั้งตัวอสุจิมี ระดับความทนต่อความเป็นพิษของสาร cryoprotectantที่แตกต่างกันอีกด้วย (Cabrita*et al.*, 2003) โดยประสิทธิภาพของสารcryoprotectant จะขึ้นอยู่กับความสมดุลระหว่างความเป็นพิษและความสามารถในการป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ (Lahnsteiner*et al.*, 1996a) แต่อย่างไรก็ตามบางรายงาน พบว่า การใช้MeOHประสบความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากลุ่ม cyprinidsบางชนิดเช่น ในปลาไน (*Cyprinuscarpio*) (Horvath *et al.*, 2003) ปลา roach (*Rutilusrutilus*) silver bream (*Bliccabjoerkna*) และในปลาbarbel (*Barbusbarbus*) (Urbanyi*et al*., 2006) และในปลายี่สกไทย (*Probarbusjullieni*) (Chew *et al.,* 2010) เป็นต้น

อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ นิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้ที่สำคัญในการประเมินคุณภาพของอสุจิภายหลังจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็น(Kime, Van Look, McAllister, Huyskens, Rurangwa and Ollevier, 2001)จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิมีความสัมพันธ์ในระดับสูง (r=0.94, *P*<0.01) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง เช่น ในปลาไน (*Cyprinuscarpio*) (Linhart, Rodina and Cosson, 2000 ; Bozkurt*et al.*, 2012)ปลา African catfish (Rurangwa, Volckaert, Huyskens, Kime and Ollevier, 2001) และในปลา Grass carp (Bozkurt, Yavas, Ogretmen, Sivaslıgil and Karaca, 2011) เป็นต้น

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าอัตราการเคลื่อนที่อัตราการมีชีวิตและอัตราการปฏิสนธิจะขึ้นอยู่กับ interaction ระหว่างชนิดของสาร extender กับ ชนิดของสาร cryoprotectantและนอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร cryoprotectantอีกด้วยนอกจากนี้การเลือกใช้ชนิดของสาร extender ยังขึ้นอยู่กับชนิดของปลาอีกด้วย และการเลือกใช้สาร cryoprotectantควรจะคำนึงถึงชนิดและระดับความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เนื่องจาก เซลล์อสุจิของปลาแต่ละชนิดจะมีขนาดและรูปร่างที่แตกต่างกัน อีกทั้งส่วนประกอบต่าง ๆ ของโครงสร้างที่แตกต่างกัน เช่น ไขมัน ฟอสโฟลิพิดและโปรตีน จึงอาจส่งผลให้ประสิทธิภาพการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของสารแต่ละชนิดแตกต่างกันออกไปด้วยและควรพิจารณาถึง ระยะequilibration timeประกอบด้วย โดยพบว่าการใช้สาร Modifiedextender ร่วมกับ 10% DMSOเป็นสารที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง เมื่อพิจารณาจากส่วนประกอบของ Modifiedextender มีกลูโคสเป็น แหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิและนอกจากนี้ยังทำหน้าที่เป็น external cryoprotectantสำหรับป้องกันเซลล์เมมเบรน ของ อสุจิไม่ให้ถูกทำลายและมีTris-HClมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์

5.4 ผลของสารactivation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

สาร activation solution นับว่าเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการประสบความสำเร็จในการผสมเทียม การเลือกใช้สาร activation solution ที่เหมาะสมสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลาได้ จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าชนิดของสาร activation solution มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิ การใช้50 mMNaCl (0.3% NaCl)เป็นสาร activation solution ที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง โดยให้อัตราการเคลื่อนที่ (74% หรือ 81% ของน้ำเชื้อสด) ระยะเวลาในการเคลื่อนที่(61s) และอัตราการปฏิสนธิ (50% หรือ 72% ของน้ำเชื้อสด) สูงที่สุด (P<0.05)ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากค่า osmolalityของสาร 50 mMNaCl (96mOsm kg^{-1}) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่า osmolalityใน seminal plasma ของน้ำเชื้อปลากาดำ(251mOsm kg^{-1}) โดยปกติอสุจิของปลาในกลุ่ม cyprinids จะเคลื่อนที่เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารละลายที่เป็น hypotonic solution (คือสารละลายภายนอกเซลล์มีความเข้มข้นน้อยกว่าภายในเซลล์) (Morisawa and Suzuki, 1980)ซึ่งการเคลื่อนที่ของอสุจิปลาเกิดจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของไอออนและค่า osmolalityของสารละลายภายนอกเซลล์ (Alavi and Cosson, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Basavarajaet al. (2006)ที่พบว่าการใช้สาร 0.3% NaCl(50 mMNaCl) ที่มีคุณสมบัติเป็นhypotonic solutionเป็นสาร activation solutionที่ให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิดีที่สุด (P<0.05) ในน้ำเชื้อปลา mahseer (*Tor khudree*)ที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งและยังสอดคล้องกับการศึกษาของ Cosson, Billard, Redondo-Muller and Cosson(1991)และ Billard, Cosson, Perchec and Linhart(1995)ที่พบว่า ค่า osmolality อยู่ในช่วง 90-110mOsm kg^{-1} ให้อัตราการเคลื่อนที่สูงที่สุดในปลาไนเช่นเดียวกับการศึกษาของYasuiet al. (2009) พบว่าการใช้สาร activation solution(50mMNaCl)ที่มีคุณสมบัติเป็น hypotonic solutionสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งและน้ำเชื้อสดในปลา loach (*Misgurnusanguillicaudatus*) เช่นเดียวกับการศึกษาในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งของปลา bleak (*Chalcalburnuschalcalburnus*) (Lahnsteineret al., 2003) นอกจากนี้ยังพบว่าสาร activation solution ที่มีคุณสมบัติเป็น hypotonic solutionสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในปลากลุ่มอื่น ๆ เช่น จาก การศึกษาของ Viveiroset al.(2009) พบว่าการใช้ 0.29% NaClสามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในปลาcurimba (*Prochiloduslineatus*) ได้ จากการรายงานของAlavi, Cosson, Karami, MojaziAmiri, and Akhoundzadeh(2004) และ Morita *et al.*(2006) พบว่า ค่า osmolality ของสาร activation solution มีบทบาทที่สำคัญต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิแต่อย่างไรก็ตามค่า osmolality ที่เหมาะสมนั้นยังขึ้นอยู่กับชนิดของปลาอีกด้วย นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ เช่นความเข้มข้นของไอออน(K^+ Na^+และ Ca^{2+}) ค่า pH และอุณหภูมิ เป็นต้น(Islam and Akhter, 2011)จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า Na^+ มีบทบาทที่สำคัญต่อการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิในปลากลุ่ม cyprinids เช่นปลาcommon

barbell (*Barbusbarbus*) (Alavi*et al.*, 2009) ปลาbunnei (*Barbussharpeyi*) (Alavi*et al.*, 2010) และปลาไน(Khara*et al.*, 2014) เป็นต้นซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวสัมพันธ์กับcationic channel activities ที่พบในส่วนของ membrane ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมกลไกการเคลื่อนที่ของอสุจิ(Alavi and Cosson, 2006) อีกทั้ง ค่า pH ภายนอกเซลล์ยังมีผลต่อความเข้มข้นของโปรตอนที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งมีผลต่อการเคลื่อนที่ (Boitano and Omoto, 1991) โดยปกติอสุจิของปลากลุ่ม carp จะสามารถเคลื่อนที่ได้ดีในสารละลายที่มีค่า pH ภายนอกเซลล์มีค่าอยู่ระหว่าง6-9 (Redondo-Muller *et al.*, 1991 ; Perchec-Poupard*et al.*, 1997) จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าการใช้สาร activation solution ที่มีค่า osmolality ต่ำกว่า 100mOsm kg^{-1} ให้อัตราการเคลื่อนที่ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ และอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าสาร activation solution ที่มีค่า osmolality สูงกว่า 100mOsm kg^{-1} ขึ้นไป ส่วนการใช้ 100mMKCl+20mMTris-HCl (230mOsm kg^{-1}) และ SAS (191mOsm kg^{-1}) พบว่า ให้อัตราการเคลื่อนที่ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิลดลงซึ่งสอดคล้องการการรายงานของNahiduzzaman*et al.* (2011)ที่พบว่า อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิในปลา*Puntiussarana*จะลดลงเมื่อค่า osmolality ในสารละลายNaClเพิ่มสูงขึ้นจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารละลาย 100mM KCl+20mMTris-HClและ SAS (50mM NaCl+30mM KCl+30mMTris-HCl) มีสาร KClเป็นองค์ประกอบซึ่งมีความเข้มข้นเกิน 5 mMอาจจะมีความเป็นพิษต่อตัวอสุจิหรือไข่ปลาจึงทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิลดลงซึ่งโพแทสเซียมมีบทบาทสำคัญต่อการขนส่งไอออนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้น ระดับความเข้มข้นของโพแทสเซียมที่สูงเกินไปหรือความไม่สมดุลระหว่างโซเดียมกับโพแทสเซียมในสารละลายภายนอกเซลล์ อาจจะส่งผลกระทบต่อการขนส่งของไอออนชนิดอื่น ๆ ที่จำเป็นสำหรับ การปฏิสนธิหรือการพัฒนาของไข่(Yasui, Fujimoto, Arias-Rodriguez, Takagi and Arai, 2012)สอดคล้องกับการรายงานของSaad andBillard (1987)พบว่าการใช้สารละลาย KCl ที่มีความเข้มข้น เพียง5 mMทำให้อัตราการปฏิสนธิของปลาไน(*C. carpio*) ลดลง เช่นเดียวกับการรายงานของLahnsteiner*et al.*(2003) พบว่าการใช้สารละลายKClเป็นสารที่ช่วยในการปฏิสนธิ ทำให้อัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งใน ปลา bleak (*Chalcalburnuschalcalburnus*) ลดลงแต่เมื่อใช้สารละลาย NaCl เป็นสารที่ช่วยในการปฏิสนธิ พบว่าให้อัตราฟักสูงกว่าเมื่อเทียบกับการใช้สารละลายKCl ทั้งในน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสดอีกทั้งสอดคล้องกับการศึกษาในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งของปลา loach (*Misgurnusanguillicaudatus*) ที่พบว่าการใช้สารละลายKClที่มีความเข้มข้นเพียง1.25 mMมีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเช่นเดียวกัน (Yasui*et al.*, 2012)สำหรับการใช้Tap water และ 17 mM NaCl+5 mMTris-HClเป็นสาร activation solutionถึงแม้จะมีคุณสมบัติเป็น hypotonic solution พบว่าให้ผลอัตราการเคลื่อนที่ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้สาร50 mMNaClทั้งนี้อาจเนื่องจากมีค่า osmolality ที่ต่ำเกินไป(10 และ 39 mOsm kg^{-1} ตามลำดับ)โดยปกติเมื่อเซลล์ของอสุจิอยู่ในสารละลาย hypotonic solution(hypotonic shock) น้ำจากภายนอกเซลล์จะไหลเข้าสู่เซลล์เพื่อเป็นการรักษาสมดุลของความเข้มข้นระหว่างภายนอก

เซลล์และภายในเซลล์จึงทำให้เซลล์บวม (cell swelling) แต่อย่างไรก็ตามหากเซลล์อสุจิได้รับการกระตุ้นจากสาร activation solution ที่มีค่า osmolality ต่ำมาก (extreme osmotic) อาจทำให้เซลล์อสุจิเกิดการบวมที่มากกว่าปกติ จึงทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง สอดคล้องกับการศึกษาในปลาน้ำเชื้อปลา carp (*Cyprinuscarpio*) (Perchec, Cosson, Cosson, Jeulin and Billard, 1996) และปลา Northern pike (*Esoxlucius*) (Alavi, Rodina, Viveiros, Cosson, Gela, Boryshpolets and Linhart, 2009) เป็นต้น นอกจากนี้จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิ พบว่าอัตราการเคลื่อนที่มีความสัมพันธ์กับอัตราการปฏิสนธิในระดับสูง (r=0.958, P<0.01) โดยเมื่ออัตราการเคลื่อนที่สูงจะส่งผลทำให้อัตราการปฏิสนธิสูงตามไปด้วย (Cosson, 2004 ; Rurangwa *et al.*, 2004)

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าชนิดของสาร activation solution มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิ การใช้สาร 50 mM NaCl เป็น สาร activation solution สามารถเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลากาดำที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งได้ ดังนั้นการเลือกใช้ชนิดของสาร activation solution ควรที่จะคำนึงถึงค่า osmolality ค่า pH ตลอดจนส่วนประกอบของไอออนชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในน้ำเชื้อปลาอีกด้วย

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

บทที่ 6
สรุปและข้อเสนอแนะ

6.1 สรุป

1. จากการศึกษาชนิดของสาร extender พบว่า Modified extender เป็นสาร extender มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น

2. จากการศึกษาชนิดของสาร extender ชนิดและระดับความเข้มของสาร cryoprotectant พบว่ามีอิทธิพลร่วมกันการใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 10%DMSO มีความเหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

3. จากการศึกษาชนิดของสาร activation solution พบว่า 50 mMNaCl มีความเหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อปลากาดำที่เก็บรักษาแบบแช่แข็ง

4. จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่ กับลักษณะการเคลื่อนที่ในรูปแบบต่างๆ (VAP VCL และ VSL) อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ และระหว่างอัตราการมีชีวิตกับอัตราการปฏิสนธิของทุกการทดลอง พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน

6.2 ข้อเสนอแนะ

1. เปลือกไข่ของปลากาดำเป็นไข่ที่มีลักษณะครึ่งจมครึ่งลอยและมีลักษณะบางมากหากมีการกระทบกระเทือนมากเกินไปอาจทำให้เปลือกไข่แตกได้ดังนั้นขณะที่ทำการ load ไข่เพื่อผสมกับน้ำเชื้อนั้นควรทำด้วยความระมัดระวังและการติดตั้งระบบเพาะฟักไข่ควรมีการไหลเวียนของน้ำตลอดเวลาและควรมีวาล์วสำหรับปรับระดับความแรงของน้ำเพื่อให้ไข่ลอยขึ้นป้องกันการซ้อนทับกันของไข่

2. จากการศึกษาหาความสัมพันธ์ (Correlation) ระหว่างอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการมีชีวิต พบว่ามีความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกันดังนั้นในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อควรทำการทดสอบแค่เพียงอัตราการเคลื่อนที่กับอัตราการปฏิสนธิเนื่องจากการทดสอบอัตราการมีชีวิตเป็นวิธีการที่ใช้เวลานานทั้งนี้เพื่อเป็นการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย

รายการอ้างอิง

ชวลิต วิทยานนท์. (2547). **คู่มือปลาน้ำจืด.**กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์สารคดี. 232.

สถาบันวิจัยสัตว์น้ำสวยงามและพรรณไม้น้ำ (2549). **100 ชนิดปลาสวยงามของไทย** สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดกรมประมงกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์ และกาญจนรี พงษ์ฉวี (2543).**อนุกรมวิธานของปลาสวยงามเพื่อการส่งออกของไทย.** กรมประมงกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Akcay, E., Bozkurt, Y., Secer, S., and Tekin, N. (2004). Cryopreservation of mirror carp semen.**Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences.** 28(5): 837-843.

Alavi, S. M. H., and Cosson, J. (2005).Sperm motility and fertilizing ability in the Persian sturgeon *Acipenserpersicus*.**Aquaculture Research.** 36: 841-850.

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

Alavi, S. M. H., Cosson, J., Karami, M., MojaziAmiri, B., and Akhoundzadeh, M.A. (2004). Spermatozoa motility in the Persian sturgeon, *Acipenserpersicus*: effects of pH, dilution rate, ions and osmolality. **Reproduction.** 128: 819-828.

Alavi, S. M. H., Linhart, O., Coward, K., and Rodina, M. (2008). Fish spermatology: implications for aquaculture management. In Alavi, S. M. H., Cosson, J., Coward, K., and Rafiee, G. (eds.).**Fish Spermatology.** pp. 397-461. Alpha Science, Oxford, UK.

Alavi, S. M. H., Psenicka, M., Rodina, M., Policar, T., and Linhart, O. (2008). Changes of sperm morphology, volume, density and motility and seminal plasma composition in *Barbus barbus* (Teleostei: Cyprinidae) during the reproductive season. **Aquatic Living Resources.** 21:75-80.

Alavi, S. M. H., Rodina, M., Policar, T., and Linhart, O. (2009). Relationship between semen characteristics and body size in *Barbusbarbus* L. (Teleostei: Cyprinidae) and effects of ions and osmolality on sperm motility. **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A.** 153: 430-437.

Alavi, S. M. H., Rodina, M., Viveiros, A. T. M., Cosson, J., Gela, D., Boryshpolets, S., and Linhart, O. (2009).Effects of osmolality on sperm morphology, motility and flagellar wave parameters in Northern pike (*Esoxlucius* L.).**Theriogenology.** 72: 32-43.

Alavi, S. M. H., Jorfi, E., Hatef, A., and Mortezavi, S. A. S. (2010).Sperm motility and seminal plasma characteristics in *Barbussharpeyi*(Gunther, 1874).**Aquaculture Research.**41: e688-e694.

Alvarez, B., Fuentes, R., Pimentel, R., Abad, Z., Cabrera, E., Pimentel, E., and Arenal, A. (2003). High fry production rates using post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthysmolitrix*) spermatozoa under farming conditions. **Aquaculture.** 220: 195-201.

Basavaraja, N., and Hegde, S. N. (2004).Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition, cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability. **Cryobiology.** 49: 149-156.

Basavaraja, N., Hegde, S. N., and Palaksha, K. J. (2006). Cryopreservation of the endangered mahseer (*Tor khudree*) spermatozoa: effect of dimethyl sulfoxide, freezing, activating media and cryostorage on post-thaw spermatozoa motility and fertility. **Cell Preservation Technology.**4: 31-47.

Billard, R. (1986). Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species.**Reproduction Nutrition Development.**2: 877-920.

Billard, R., Cosson, J., Perchec, G., and Linhart, O. (1995).Biology of sperm and artificial reproduction in carp.**Aquaculture.** 124: 95-112.

Boitano, S., and Omoto, C.K. (1991). Membrane hyperpolarization activates trout sperm without an increase in intracellular pH.**Journal of Cell Science.** 98: 343-349.

Boitano, S., and Omoto, C.K. (1992).Trout sperm swimming patterns and role of intracellular Ca^{2+}.**Cell Motil Cytoskeleton.** 21:74-82.

Bozkurt, Y. (2005). Effect of different cryoprotectants on viability of Mirror Carp (*Cyprinus carpio*) spermatozoa.**SüleymanDemirelÜniversitesiEgirdir Su ÜrünleriFakültesi Dergisi.**63-67.

Bozkurt, Y., and Secer, S. (2005). Effect of short-term preservation of mirror carp (*Cyprinus carpio*) semen on motility, fertilization and hatching rates.**The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh.**57(3): 207-212.

Bozkurt, Y., Ogretmen, F., Ercin, U.,and Yildiz, U.M. (2008).Seminal plasma composition and its relationship with physical spermatological parameters of grass carp (*Ctenopharyngodonidella*) semen: with emphasis on sperm motility. **Aquaculture Research**. 39: 1666-1672.

Bozkurt, Y., Ogretmen, F.,and Secer, F.H. (2009).Effect of different extenders and storage periods on motility and fertilization success of Grass Carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm during spawning season.**TarimBilimleriDergisi.** 15(3): 277-284.

Bozkurt, Y., Yavas, I., Ogretmen, F., Sivaslıgil, B., and Karaca, F. (2011).Effect of glycerol on fertility of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodonidella*) sperm.**The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh.**63: 1-6.

Bozkurt, Y., Yavas, I.,and Karaca, F. (2012).Cryopreservation of Brown Trout (*Salmo truttamacrostigma*) and Ornamental Koi Carp (*Cyprinuscarpio*) sperm.In Katkov, I. (eds.).**Current Frontiers in Cryopreservation.** pp. 293-304.In Tech.

Cabrita, E., Robles, V., Cherguinni, O., Wallace, J. C.,and Herraez,M. P. (2003). Effect of different cryoprotectants and vitrificant solutions on the hatching rate of turbot embryos (*Scophthalmusmaximus*).**Cryobiology.** 47(3): 204-213.

Cejko, I.B., Sarosiek, B., and Koealski, K.R. (2013).Application of Computer-assisted sperm analysis in selecting the suitable solution for common carp, *Cyprinuscarpio* L., sperm motility.**Journal of the word aquaculture society.** 44(3): 466-472.

Cejko, B.I., Krejszeff, S., Judycka, S., Sarosiek, B., Dietrich, M., Kucharczyk, D., and Kowalski, R.K. (2014). Sperm quality and selected biochemical markers of seminal plasma at the beginning of the reproductive period of common carp, *Cyprinuscarpio* L. **Aquaculture International.** 22: 111-122.

Chew, P. C., Hassan, R., Rashid, Z. A., and Chuah, H. P. (2010). The current status of sperm cryopreservation of the endangered *Probarbusjullieni* (Sauvage) in Malaysia.**Journal of Applied Ichthyology.**26: 797-805.

Ciereszko, A. (2008). Chemical composition of seminal plasma and its physiological relationship with sperm motility, fertilizing capacity and cryopreservation success in fish. InAlavi, S. M. H., Cosson, J., Coward, R., andRafiee, G. (eds.).**Fish Spermatology.**pp. 215-240.Alpha Science Ltd, Oxford.

Ciereszko, A., Ramseyer, L., and Dabrowski, K. (1993).Cryopreservation of yellow perch semen.**The Progressive Fish-Culturist.** 55: 261-264.

Cosson, J. (2004). The ionic and osmotic factors controlling motility of fish spermatozoa. **Aquaculture International.** 12: 69-85.

Cosson, J., Billard, R., Redondo-Muller, C., and Cosson, M. P. (1991).In vitro incubation and maturation of carp (*Cyprinuscarpio*) spermatozoa.**Bulletin of the Institute of Zoology Academia Sinica (Taipei) monographs.**16: 249-261.

Cosson, J., Billard, R., Cibert, C., Dreanno, C., and Suquet, M. (1999).Ionic factors regulating themotility of fish sperm. In Gagnon, C. (eds.).**The male gamete: From basic to clinical applications.** pp. 161-186. Cache Rive Press, Vienna, IL.

Dang, T. M., Pham, M. A., Pham, A. T., and Jun Lee, K. (2006). Effect of Dimethyl-sulfoxide on sperm cryopreservation of Grass carp (*Ctenopharyngodonidellus*).**Journal of Aquaculture.**19(1): 52-56.

Dogu, Z. (2012). Cryopreservation of semen in shabout (*Barbusgrypus*Heckel, 1843): sperm motility and fertilization rates. **Journal of Applied Ichthyology.** 28: 952-955.

Dréanno, C., Suquet, M., Quemener, L., Cosson, J., Fierville, F., Normant, Y., and Billard, R. (1997). Cryopreservation of turbot (*Scophthalmusmaximus*) spermatozoa.**Theriogenology.**48: 589-603.

Francis, T., Archana Devi, C.,and Selvamagheswaran, M. (2013).Cryopreservation of carp spermatozoa.**Indian Journal of Science and Technology.**6(5): 4524-4530.

Gwo, J. C. (2000). Cryopreservation of sperm of some marine fishes In: cryopreservation in aquatic species. In Tiersch, T. R., and Mazik, P. M. (eds.). **World aquaculture society**. pp. 138-160. Baton Rouge, LA.

Hassan, M. M., Nahiduzzaman, M., Mamun, S.N. A., Taher, M. A., and Hossain, M. A. R. (2014).Fertilization by refrigerator stored sperm of the Indian major carp, *Labeocalbasu* (Hamilton, 1822). **Aquaculture Research.**45: 150-158.

Horvath, A., Miskolczi, E., and Urbanyi, B.(2003).Cryopreservation of common carp sperm. **Aquatic Living Resources.** 16: 457-460.

Hossain, M. S., and Sarder, M. R. I. (2009). Cryogenic freezing of silver carp spermatozoa for conservation of gene pool. **Progressive Agriculture.** 20(1 & 2): 99-106.

Hu, J., Zhang, Y., Zhou, R., and Zhang, Y. (2009). Changes in extracellular osmolality initiate sperm motility in freshwater teleost rosy barb *Puntiusconchonius*. **Theriogenology.** 72: 704-710.

Irawan, H., Vuthiphandchaia, V., and Nimratc, S. (2010).The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinuscarpio*) sperm.**Animal Reproduction Science.**122: 236-243.

Islam, M. S., andAkhter, T. (2011).Tale of fish sperm and factors affecting sperm motility: a review. **Advances in Life Sciences.** 1: 11-19.

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.

Kainin, S., Ponchunchoovong, S., Imsilp, U., and Singsee, S. (2014). Cryopreservation of Mekong catfish, *Pangasiusbocourti*Sauvage, 1880 spermatozoa.**Aquaculture research.** 45: 859-867.

Kalbassi, M.R., Lorestani, R., and Ghafle, M.J. (2013). Analysis of saline activator solution effects on sperm quality indices of *Barbussharpeyi*by Image J software. **Iranian Journal of Fisheries Sciences.**12(2): 357-377.

Khara, H. (2014). Sperm characteristics in Grass carp, *Ctenopharyngodonidella*; effect of ions on spermatozoa motility and fertilization capacity**.Iranian Journal of Fisheries Sciences.** 13(2): 354-364.

Khara, H.,Noveiri, S. B.,Hadiseh, D.,Rahbar, M.,Ahmadnejad, M., and Khodadoost, A. (2014). Effect of different activation solutions on motility and fertilizing ability of spermatozoa in common carp *Cyprinuscarpio* Linnaeus, 1758. **Indian Journal of Fisheries.**61(3): 63-68.

Kime, D. E., Van Look, K. J. W., McAllister, B. G., Huyskens, G., Rurangwa, E., and Ollevier, F. (2001). Computer-assisted sperm analysis (CASA) as a tool for monitoring sperm quality in fish.**Comparative Biochemistry and Physiology.** 130: 425-433.

Krasznai, Z., Marian, T., Balkay, L., Gasper, R. Jr., and Tron, L. (1995). Potassium channels regulate hypo-osmotic shock-induced motility of common carp, *Cyprinuscarpio*. sperm. **Aquaculture.** 129: 123-128.

Kruger, J.C., Smith, G.L., Van Vuren, J.H.J., and Ferreira, J.T. (1984).Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinuscarpio* and*Oreochromismossambicus*.**Journal of Fish Biology.**24: 263-272.

Kurokura, H., Hirano, R., Tomita,M., and Iwahashi, M. (1984).Cryopreservation of carp sperm.**Aquaculture.** 37: 267-273.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., and Patzner, R. A. (1996a).The influence of various cryoprotectants on semen quality of the rainbow trout (*Oncorhynchusmykiss*) before and after cryopreservation.**Journal of Applied Ichthyology.** 12: 99-106.

Lahnsteiner, F., Berger, B., Weismann, T., and Patzner, R.A. (1996b).Motility of spermatozoa of *Alburnusalburnus* (Cyprinidae) and its relationship to seminal plasma composition and sperm metabolism.**Fish Physiology and Biochemistry.**15: 167-179.

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

Linhart, O., and Rodina, M. (2000).Cryopreservation of common carp (*Cyprinuscarpio*) and tench (*Tincatinca*) sperm for gene resources conservtion.**Reproductive Physiology of Fishes.** 23: 402-404.

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

Linhart, O., Rodina, M., Bastl, J., and Cosson, J. (2003).Urinary bladder, ionic composition of seminal fluid and urine with characterization of sperm motility in tench (*Tincatinca* L.). **Journal of Applied Ichthyology.** 19:177-181.

Mansour, N., Ramoun, A., and Lahnsteiner, F. (2005).Quality of testicular semen of the African catfish *Clariasgariepinus* (Burchell, 1822) and its relationship with fertilization and hatching success. **Aquaculture Research.** 36: 1422-1428.

Marian, T., Krasznai, Z.,Balkay, L., Balazs, M.,Emri, M., Bene, L., and Tron, L. (1993).Hypoosmotic shock induces an osmolality dependent permeabilization and structural changes in the membrane of carp sperm. **Journal of Histochemistry&Cytochemistry.** 41: 291-297.

Marian, T., Krasznai, Z., Balkay, L.,Emri, M., andTron, L. (1997).Role ofextracellular and intracellular pH in carp sperm motilityand modifications by hyperosmosis of regulation of Na^{+}/H^{+} exchanger.**Cytometry.** 27: 374-382.

Melo, F. C. S. A., andGodinho, H. P.(2006).A protocol for cryopreservation of spermatozoa of the fish *Bryconorthotaenia.***Animal Reproduction.** 3(3): 380-385.

Morisawa, M., and Suzuki, K. (1980). Osmolality and potassium ion: their roles in initiation of sperm motility in teleosts. **Science.** 210: 1145-1147.

Morisawa, M., Suzuki, K., Shimizu, H., Morisawa, S., and Yasuda, K. (1983). Effect of osmolality and potassium on motility of spermatozoa from freshwater cyprinid fishes.**The Journal of Experimental Biology.** 107: 95-103.

Morisawa, M., Oda, S., Yoshida, M., and Takai, H. (1999).Transmembrane signal transduction for the regulation of sperm motility in fishes and ascidians. In Gagnon, C. (eds.). **The male gamete: From basic to clinical applications.** pp. 149-160. Cache Rive Press, Vienna, IL.

Morita, M., Okuno, M., Susilo, E. S., Setyo, B. P., Martarini, D., Harnadi, L., and Takemura, A. (2006). Changes in sperm motility in response to osmolality/Ca^{2+} in three Indonesian fresh water teleosts:Goby (*Oxyeleotrismarmorata*), Java carp (*Puntiusjavanicus*) and catfish (*Clariasbatrachus*). **Comparative Biochemistry and Physiology-Part A.** 143: 361-367.

Nahiduzzaman, M., Hassan, M.M., Khanam, U.H., Mamun, S.N.A., Hossain, M.A.R., and Tiersch, T. R.(2011). Sperm cryopreservation of the critically endangered olive barb (Sarpunti) *Puntiussarana*(Hamilton, 1822).**Cryobiology.** 62: 62-67.

Nahiduzzaman, M., Hassan, M.M., Roy, P.K., Hossain, M.A., Hossain, M.A.R., and Tiersch, T.R. (2012). Sperm cryopreservation of the Indian major carp, *Labeocalbasu*: Effects of cryoprotectants, cooling rates and thawing rates on egg fertilization. **Animal Reproduction Science.**136: 133-138.

Perchec, G., Cosson, M. P., Cosson, J., Jeulin, C., andBillard, R. (1996). Morphological and kinetic sperm changes of carp (*Cyprinuscarpio*) spermatozoa after initiation of motility in distilled water. **Cell Motility and the Cytoskeleton.**35:113-120.

Perchec-Poupard, G., Gatti, J. L., and Cosson, J. (1997). Effects of extracelular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. **Journal of Reproduction and Fertility.**110: 315-327.

Pillai, M. C., Yanagimachi, R., and Cherr, G. N. (1994).In vivo and in vitro initiation of sperm motility using fresh and cryopreserved gametes from Pacific herring, *Clupeapallasi*.**Journal of Experimental Zoology**. 269: 62-68.

Poulsen, A. F., Hortle, K. G., Valbo-Jorgensen, J., Chan, S., Chhuon, C. K., Viravong, S., Bouakhamvongsa, K., Suntornratana, U., Yoorong, N., Nguyen, T. T., and Tran, B. Q. (2004). Distribution and ecology of some important riverine fish species of the Mekong river basin. In Hortle, K. G., Booth, S. J., and Visser, T. A. M. (eds.).**Mekong River Commission Technical Paper 10.** pp. 1-116. Phnom Penh.

Rainboth, W. J. (1996). **Fishes of the Cambodian Mekong.**FAO species identification field guide for fishery purposes. FAO, Rome. pp. 265.

Rani, K. U., and Munuswamy, N. (2014). Preliminary studies on the cryopreservation of spermatozoa in the fresh water fish common carp (*Cyprinuscarpio* L.). **Journal of Coastal Life Medicine.**2(3): 181-186.

Redondo-Muller, C., Cosson, M. P., and Cosson, J. (1991).In vitro maturation of the potential for movement of carp spermatozoa.**Molecular Reproduction & Development.** 29: 259-270.

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

Rosengrave, P., Taylor, H., Montgomerie, R., Metcalf, V., McBride, K., and Gemmell, N. J. (2009). Chemical composition of seminal and ovarian fluids of Chinook salmon (*Oncorhynchustshawytscha*) and their effects on sperm motility traits.**Comparative Biochemistry and Physiology-Part A.** 152: 123-129.

Routray, P., Dash, S. N., Dash, C., Swain, P., Sarkar, S. K., and Sarangi, N. (2008). Cryopreservation of silver barb *Puntiusgonionotus* (Bleeker) spermatozoa: effect of extender composition, cryoprotective agents and freezing rate on their postthawing fertilization ability. **Aquaculture research.** 39: 1597-1605.

Rurangwa, E., Volckaert, F. A. M., Huyskens, G., Kime, D. E., and Ollevier, F. (2001).Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilisation in African catfish (*Clariasgariepinus*). **Theriogenology.** 55: 751-769.

Rurangwa, E., Kime, D.E., Ollevier, F., and Nash, J.P. (2004).The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish.**Aquaculture**.234: 1-28.

Saad, A., and Billard, R. (1987). Composition etemploi d'un dilueurd'ins´emination chez la carpe, *Cyprinuscarpio*. **Aquaculture.** 66: 329-345.

Sarder, M. R. I., Rafiquzzaman, S. M., Sultana, R., and Faridul Islam, M. (2009).Cryopreservation of spermatozoa of Mrigal, *Cirrhinuscirrhosus* with a view to minimize inbreeding and hybridization.**Journal of the Bangladesh Agricultural University.**7(1): 211-218.

Sarder, M. R. I., Rahman, A. K. M. A., Samad, M. S., Nazrul, K. M. S., and Bhuiyan, M. K. J. (2011). Cryopreservation of sperm of *Labeorohita* (Hamilton,1822) and its use in fertilization and hatching of eggs.**Progressive Agriculture.** 22(1 & 2): 123-137.

Singsee, S., Imsilp, U., Pewnane, P., and Sukumasavin, N. (2005).Preservation of *Cirrhinusmicrolepis* sperm.In **Proceedings of 7th Technical Symposium on Mekong Fisheries**2005 (pp. 205-211). Thailand: UbonRatchathani.

Stoss, J. (1983).Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In Hoar, W. S., Randall D. J., and Donaldson, E. M.(eds.). **Fish physiology**, IX B. pp. 50-305. Academic Press, New York.

Sultana, M., Nahiduzzaman, M., Hassan, M.M., Khanam, M.U.H., and Hossain, M.A.R. (2010). Fertility of cryopreserved common carp (*Cyprinuscarpio*) spermatozoa.**University Journal of Zoology, Rajshahi University.**28: 51-55.

Taghizadeh, V., Imanpoor, M. R., and Sadeghi, A. (2013).Effect of extenders and different concentrations of methanol on motility parameters of goldfish (*Carassiusauratus gibelio*) spermatozoa after short-term storage.**World Journal of Fish and Marine Sciences.** 5(5): 492-496.

Tsai, S., Spikings, E., Hwang, C. C., and Lin, C. (2010).Effects of the slow cooling during cryopreservation on the survival and morphology of Taiwan shoveljaw carp (*Varicorhinus barbatulus*) spermatozoa.**Aquatic Living Resources.** 23: 119-124.

Urbanyi, B., Szabo, T., Miskolczi, E., Mihalffy, S., Vranovics, K., and Horvath, A. (2006). Successful fertilization and hatching of four European cyprinid species using cryopreserved sperm. **Journal of Applied Ichthyology.**22: 201-204.

Viveiros, A. T. M., Orfão, L. H., Maria, A. N., and Allaman, I. B. (2009).A simple, inexpensive and successful freezing method for curimba*Prochiloduslineatus* (Characiformes) semen.**Animal reproduction science.** 112: 293-300.

Viveiros, A. T. M., Amaral, T. B., Orfão, L. H., Isaú, Z. A., Caneppele, D., and Leal, M. C. (2011). Sperm cryopreservation of tiete tetra *Bryconinsignis* (Characiformes): effects of cryoprotectants, extenders, thawing temperatures and activating agents on motility features. **Aquaculture Research.**42: 858-865.

Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S., and Nimrat, S. (2009).Cryopreservation of red snapper (*Lutjanusargentimaculatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability and fertilization capacity.**Theriogenology.** 72: 129-138.

Vuthiphandchai, V., Thadsri, I., and Nimrat, S. (2009). Chilled storage of walking catfish (*Clariasmacrocephalus*) semen.**Aquaculture.** 296: 58-64.

Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T., and Nimrat,S.(2014). Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodesgonionotus*): cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. **Aquaculture Research.**1-9.

Wayman, W.R., and Tiersch, T.R. (2000).Research methods for cryopreservation of sperm. In Tiersch, T. R., and Mazik, P. M. (eds.). cryopreservation in aquatic species. **World aquaculture society**.pp. 264-275. Baton Rouge, Lousiana.

Withler, F. C., and Lim, L. C. (1982).Preliminary observations of chilled and deep-frozen storage of grouper (*Epinephelustauvina*) sperm.**Aquaculture.** 27: 389-392.

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*Daniorerio*.**Theriogenology**. 68: 128-136.

Yasui, G. S., Arias-Rodriguez, L., Fujimoto, T., and Arai, K. (2009).A sperm cryopreservation protocol for the loach *Misgurnusanguillicaudatus* and its applicability for other related species. **Animal Reproduction Science.**116: 335-345.

Yasui, G. S., Fujimoto, T., Arias-Rodriguez, L., Takagi, Y., and Arai, K. (2012).The effect of ions and cryoprotectants upon sperm motility and fertilization success in the loach *Misgurnus anguillicaudatus.***Aquaculture.**344-349: 147-152.

Yavas, L., Bozkurt, Y., and Yildiz,C. (2014).Cryopreservation of scaly carp (*Cyprinuscarpio*) sperm: effect of different cryoprotectant concentrations on postthaw motility, fertilization and hatching success of embryos. **Aquaculture International.** 22: 141-148.

http://www.fisheries.go.th/cf-chan/plankton/hema/hema.htm

http://www.thaitechno.net/t1/profile.php?uid=44348

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางแสดงผลการวิเคราะห์วาเรียนซ์

1. การศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เย็น

1.1 อัตราการเคลื่อนที่

ตารางที่ ก. 1 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	5004.054	5	1000.811	30.757	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	2733.269	84	32.539		
Total	7737.323	89			

ตารางที่ ก. 2 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	10447.707	5	2089.541	89.330	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1964.872	84	23.391		
Total	12412.579	89			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ตารางที่ ก. 3 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	24770.076	5	4954.015	315.940	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1317.142	84	15.680		
Total	26087.218	89			

ตารางที่ ก. 4 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 4 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	12419.476	5	2483.895	136.116	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1532.859	84	18.248		
Total	13952.335	89			

ตารางที่ ก. 5 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการเคลื่อนที่ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 5 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	3726.698	5	745.340	46.827	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1337.023	84	15.917		
Total	5063.721	89			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.2 อัตราการมีชีวิต

ตารางที่ ก. 6 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	4330.783	5	866.157	100.507	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	723.898	84	8.618		
Total	5054.682	89			

ตารางที่ ก. 7 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	7839.639	5	1567.928	70.287	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1873.830	84	22.308		
Total	9713.469	89			

ตารางที่ ก. 8 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	12180.013	5	2436.003	87.359	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	2342.344	84	27.885		
Total	14522.357	89			

ตารางที่ ก. 9 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 4 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	14335.862	5	2867.172	293.476	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	820.653	84	9.770		
Total	15156.515	89			

ตารางที่ ก. 10 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 5 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	4517.383	5	903.477	13.308	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	5702.686	84	67.889		
Total	10220.069	89			

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.3 อัตราการปฏิสนธิ

ตารางที่ ก. 11 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการปฏิสนธิ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	62.928	4	15.732	15.373	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	46.051	45	1.023		
Total	108.979	49			

ตารางที่ ก. 12 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการปฏิสนธิ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	3150.041	4	787.510	232.977	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	152.110	45	3.380		
Total	3302.151	49			

ตารางที่ ก. 13 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการปฏิสนธิ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 3 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	4706.837	4	1176.709	565.533	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	93.632	45	2.081		
Total	4800.469	49			

ตารางที่ ก. 14 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ต่ออัตราการปฏิสนธิ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 4 วัน

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (ชนิดของสาร extender)	3495.217	4	873.804	576.109	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	68.253	45	1.517		
Total	3563.470	49			

2. การศึกษาผลของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

ตารางที่ ก. 15 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสม ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	74428.739	18	4134.930	244.963	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	2886.452	171	16.880		
Total	77315.191	189			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 2 ชนิด (Modified extender และ MC) ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSO MeOH และ glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ก. 16 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมต่ออัตราการมีชีวิตของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	69135.028	18	3840.835	245.318	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	2677.276	171	15.657		
Total	71812.303	189			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 2 ชนิด (Modified extender และ MC) ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSO MeOH และ glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

ตารางที่ ก. 17 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร extender ชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมต่ออัตราการปฏิสนธิของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	58521.599	18	3251.200	444.462	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	1250.850	171	7.315		
Total	59772.450	189			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร extender 2 ชนิด (Modified extender และ MC) ร่วมกับสาร cryoprotectant 3 ชนิด (DMSO MeOH และ glycerol) ที่ระดับความเข้มข้น 5 10 และ 15%

3. การศึกษาผลของสาร activation solution ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

ตารางที่ ก. 18 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร activation solution ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่เข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	25224.933	10	2522.493	288.916	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	864.357	99	8.731		
Total	26089.290	109			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร activation solution 5 ชนิด (Tap water 17mM NaCl+5 mM Tris-HCl 50 mM NaCl KCl (100 mM KCl+20 mM Tris-HCl) และ SAS) เมื่อใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และ MC ร่วมกับ 15% DMSO

ตารางที่ ก. 19 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร activation solution ต่อระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	47600.964	10	4760.096	3597.956	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	131.000	99	1.323		
Total	47731.964	109			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร activation solution 5 ชนิด (Tap water 17mM NaCl+5 mM Tris-HCl 50 mM NaCl KCl (100 mM KCl+20 mM Tris-HCl) และ SAS) เมื่อใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และ MC ร่วมกับ 15% DMSO

ตารางที่ ก.20 แสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์ผลของสาร activation solution ต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลากาดำแบบแช่แข็ง

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups (Treatment)	17741.647	10	1774.165	3742.964	.000
Within Groups (ความคลาดเคลื่อน)	46.896	99	.474		
Total	17788.543	109			

หมายเหตุ : Treatment คือ สาร activation solution 5 ชนิด (Tap water 17mM NaCl+5 mM Tris-HCl 50 mM NaCl KCl (100 mM KCl+20 mM Tris-HCl) และ SAS) เมื่อใช้สาร Modified extender ร่วมกับ 10% DMSO และ MC ร่วมกับ 15% DMSO

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพิมพันธ์ ละดอกท่า เกิดเมื่อวันที่ 16กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2530ที่จังหวัดนครพนม เริ่มศึกษาชั้นประถมศึกษาและมัธยมศึกษาตอนต้นที่โรงเรียนชุมชนบ้านคำพอกท่าดอกแก้วอำเภอท่าอุเทน จังหวัดนครพนม ได้ศึกษาต่อชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายที่โรงเรียนอุเทนพัฒนา อำเภอท่าอุเทน จังหวัดนครพนม และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาวิชาการประมงวิทยาลัยเกษตรและเทคโนโลยีนครพนม มหาวิทยาลัยนครพนม ในปีการศึกษา 2554และได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์ สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี จังหวัดนครราชสีมา ในปี2555

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี