บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

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

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

1.1 ศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

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

การทดลองที่ 2 ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

2.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

2.2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (feezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทั้งแบบระยะสั้นและระยะยาว มีการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อจากอัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิ

การทดลองที่ 3 ศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

3.1 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

3.2 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

โดยใช้วัสดุอุปกรณ์หลัก สารเคมี พร้อมทั้งวิธีการศึกษาดังนี้

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

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

27) ขวดสีชา ขนาด 50 มิลลิลิตร

28) ขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร

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

30) liquid nitrogen storage with dispenser

31) cryobath

32) cryochamber

33) cryocane

34) cryo gloves

35) freezer control (CL 3300)

36) compound microscope and stereo microscope

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

38) Hach pH Meter รุ่น EC10

39) universal high speed centrifuges รุ่น Z 323 K

3.2 สารเคมี

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

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

18) domperidone (Motilium M)

19) human chorionic gonadotropin (HCG)

20) eosin B

21) nigrosin

22) sodium citrate dihydrate

23) gilson solution

24) น้ำยาเช็ดเลนส์

25) น้ำยาเคลือบเล็บ

26) oil

3.3 วิธีการศึกษา

3.3.1 การคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์

เมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม ก่อนทำการทดลองต้องคัดพ่อแม่พันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืดที่สมบูรณ์เพศ และแข็งแรง จากบ่อดินมาพักไว้ในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 2 ลูกบาศก์เมตร โดยแยกเพศผู้ และเพศเมียเพื่อทำการฉีดฮอร์โมน โดยมีวิธีการตรวจสอบความสมบูรณ์เพศ และวิธีการฉีดฮอร์โมนของพ่อแม่พันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืดดังนี้

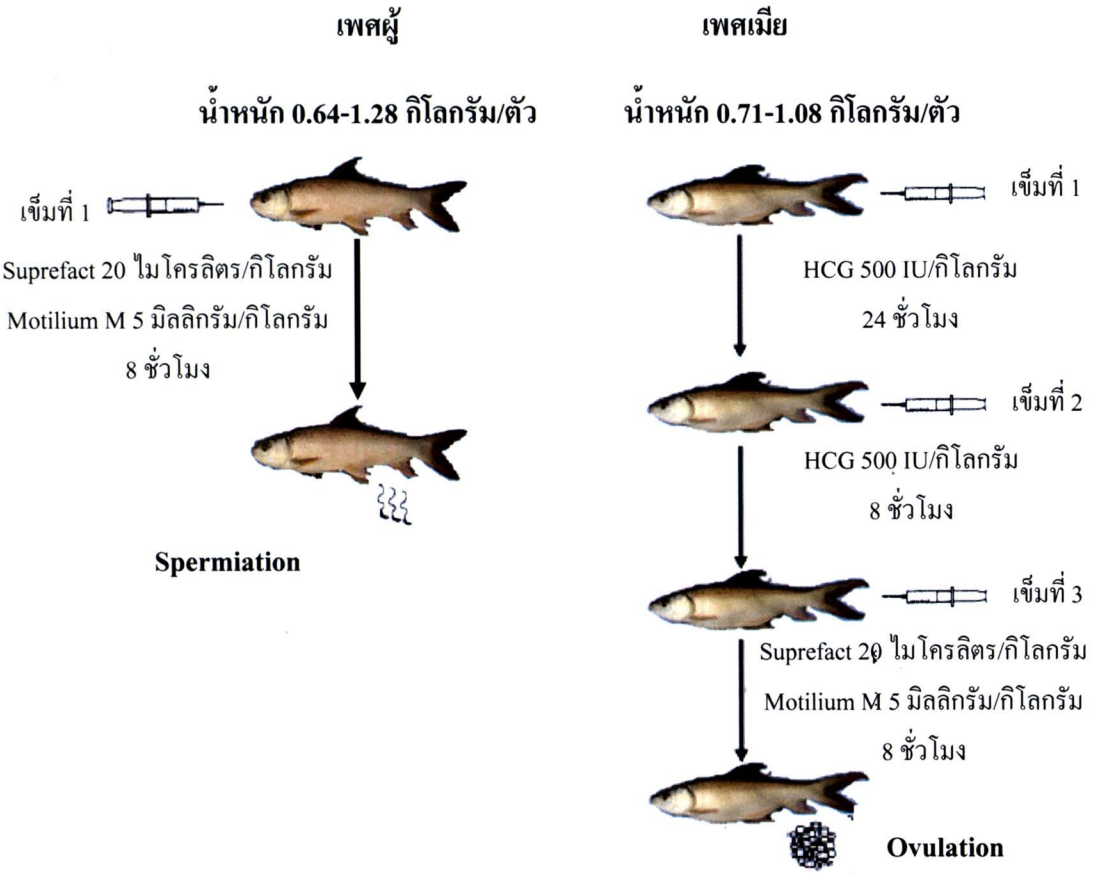
- ปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศผู้

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

- ปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศเมีย

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

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



ภาพที่ 1 การฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของอสุจิ และการพัฒนาของไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 11 ต.ค. 2555
เลขทะเบียน 248925
เลขเรียกหนังสือ

(ก) (ข)

ภาพที่ 2 การรีดน้ำเชื้อ (ก) การรีดไข่ (ข)

3.3.2 การศึกษาส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

3.3.3 การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ โดยศึกษาจากลักษณะต่าง ๆ ดังนี้

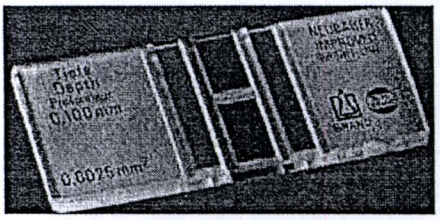
3.3.3.1 ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

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

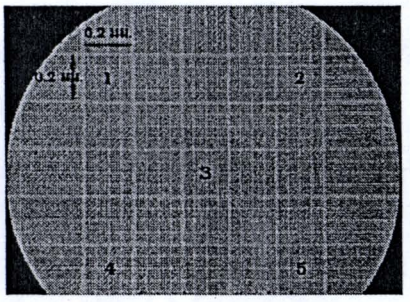
3.3.3.2 การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (จำนวนอสุจิต่อหนึ่งมิลลิลิตร)

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

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



(ก)



(ข)

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

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

3.3.3.3 การศึกษาการเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility)

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

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์การสังเกตอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ

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

ดัดแปลงจาก: Guest (1973)

3.3.3.4 การศึกษาการมีชีวิตของอสุจิ (viability)

การศึกษาการมีชีวิตของอสุจิทำได้โดยวิธีการย้อมสี eosin-nigrosin ซึ่งส่วนประกอบสีย้อมแสดงในตารางที่ 2 และมีวิธีการเตรียมสีย้อมดังนี้

ตารางที่ 2 ส่วนประกอบของสีย้อม eosin-nigrosin

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

ที่มา: Hambananda (1996)

วิธีการเตรียมสีย้อมสำหรับดูตัวเป็นตัวตายสามารถเตรียมได้ดังนี้

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

ขั้นตอนการศึกษาอัตราการมีชีวิตมีขั้นตอนดังนี้

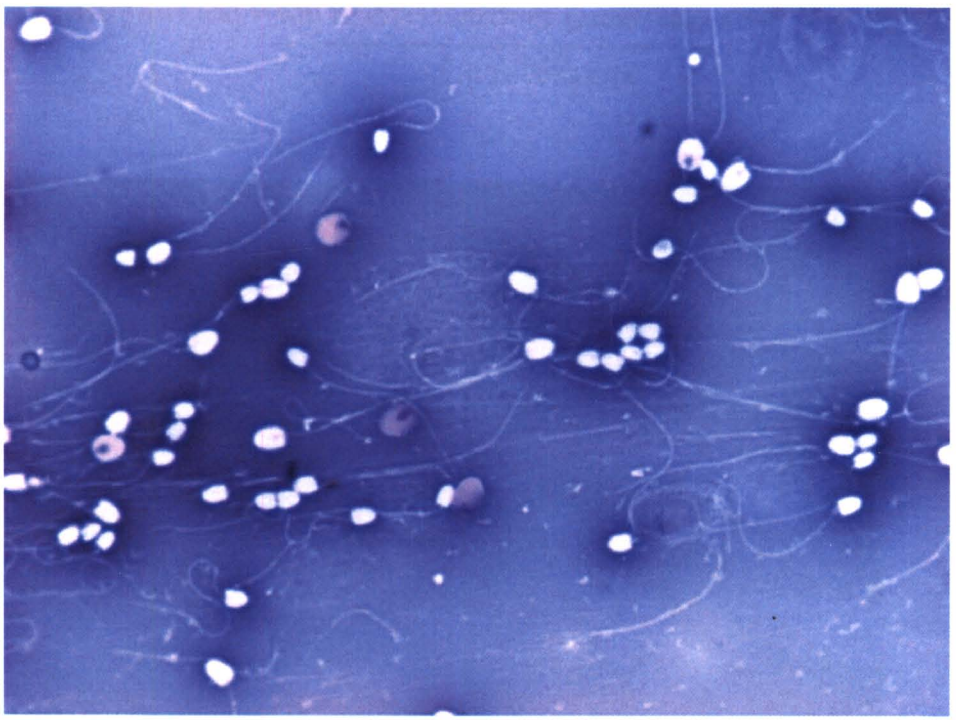
- หยดสี eosin-nigrosin ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (5 ไมโครลิตร) แล้วหยดน้ำเชื้อลงข้าง ๆ สีย้อมประมาณ 1 ไมโครลิตร

- ใช้เข็มเขี่ยคนน้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากันจากนั้นใช้แผ่นสไลด์อีกแผ่นหนึ่งเกลี่ยน้ำเชื้อให้กระจายบาง ๆ โดยเกลี่ยเพียงครั้งเดียว

- นำแผ่นสไลด์ที่เกลี่ยแล้ว ผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง

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

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



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

3.3.3.5 การศึกษาการปฏิสนธิ (fertilization)

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

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

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

ภาพที่ 5 ขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร และระบบการฟักไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืด

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาพที่ 6 การพัฒนาของคัพภะปลานวลจันทร์น้ำจืดระยะ gastrula stage (8 ชั่วโมง)

3.3.4 ขั้นตอนและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ

1. ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

1.1 ศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

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

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

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบทางเคมีของสาร extender ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

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

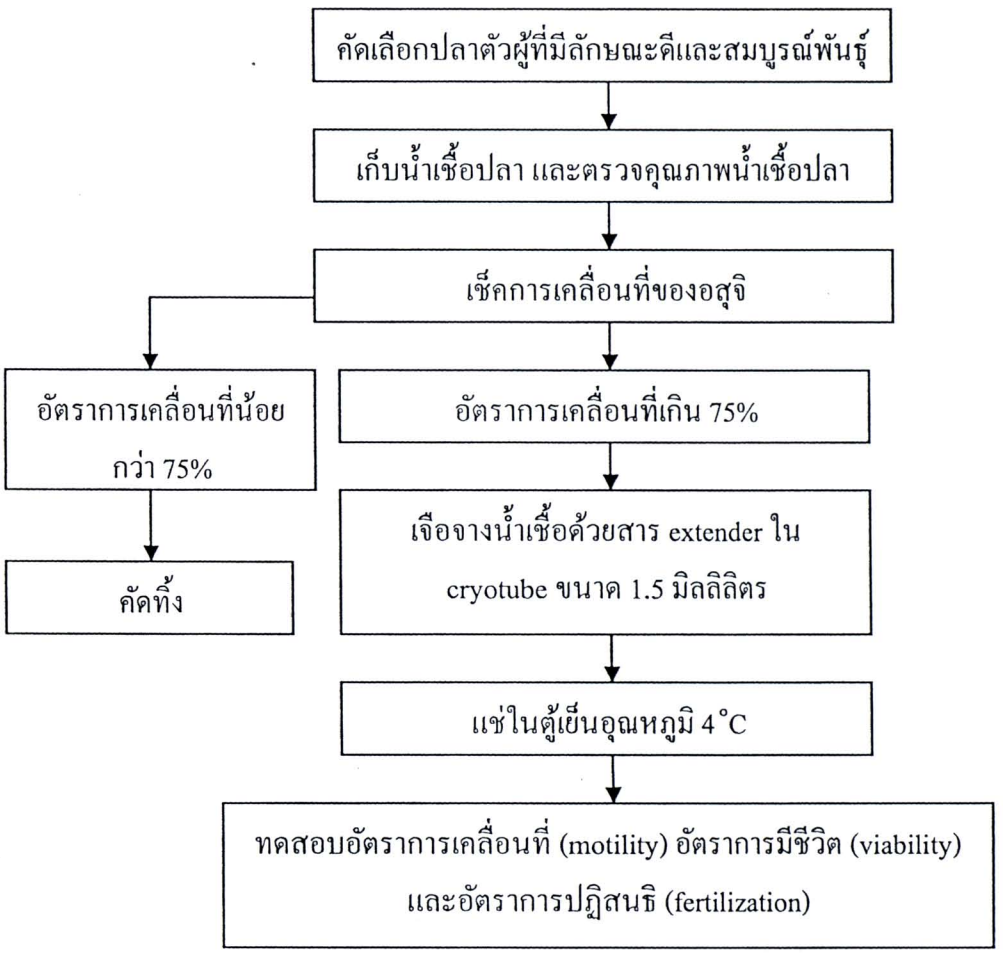
ตารางที่ 4 แผนการทดลองผลของสาร extender 10 ชนิด (KU, MC, C-F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น โดยทำการทดสอบอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต ที่ระยะเวลาการเก็บ 6, 12, 24, 36, 48, 60, 72, 84, 96, 108 และ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

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

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

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

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



ภาพที่ 7 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

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

1.2 ศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

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

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

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

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

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

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

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

2. ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

2.1 ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

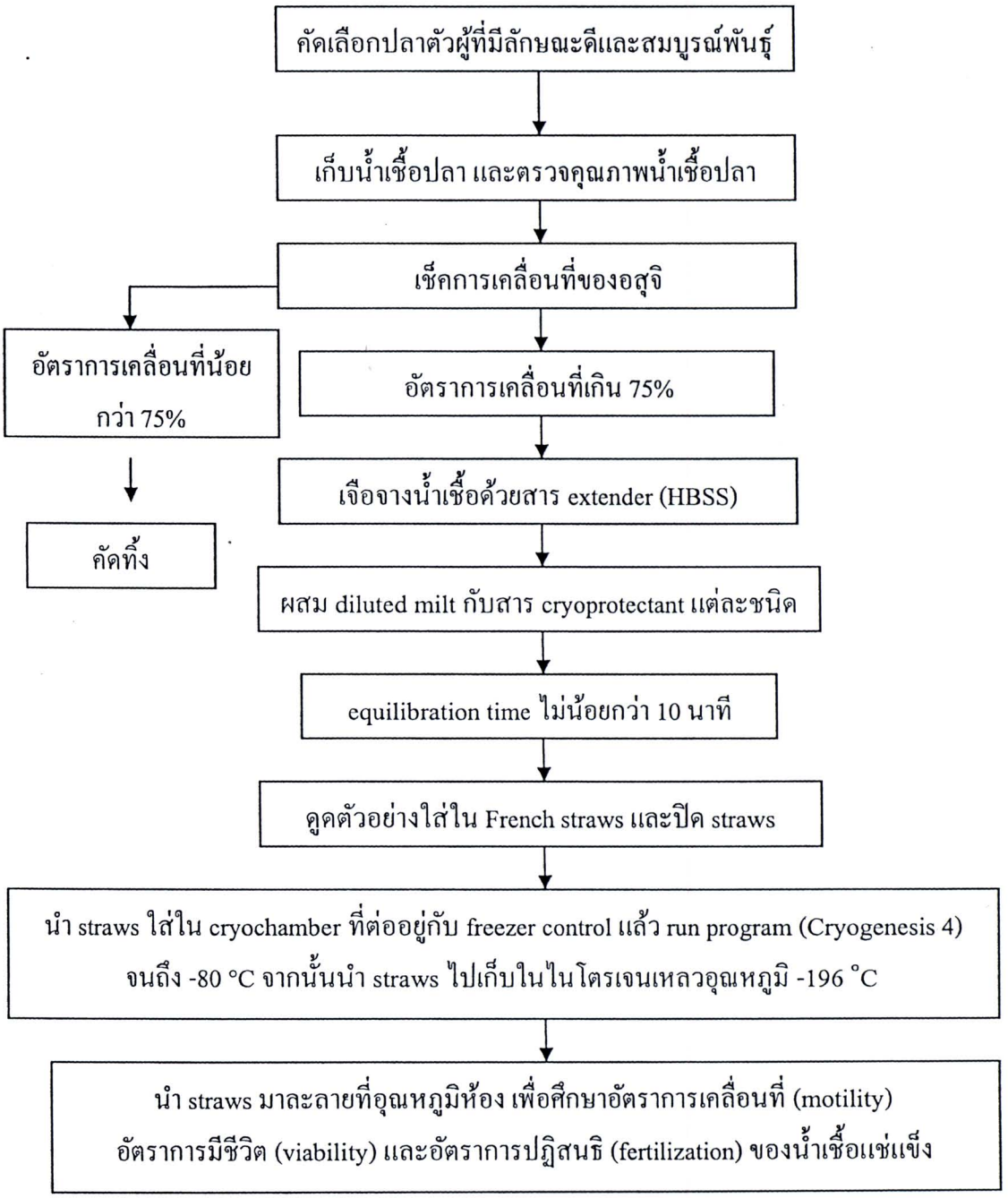
เลือกสาร extender ที่ให้ผลดีที่สุด (HBSS) จากการทดลองที่ 1 มาทำการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง ในครั้งนี้ทำการศึกษาใช้สาร cryoprotectant 4 ชนิด ได้แก่ dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMA), glycerol และ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

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

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

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

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

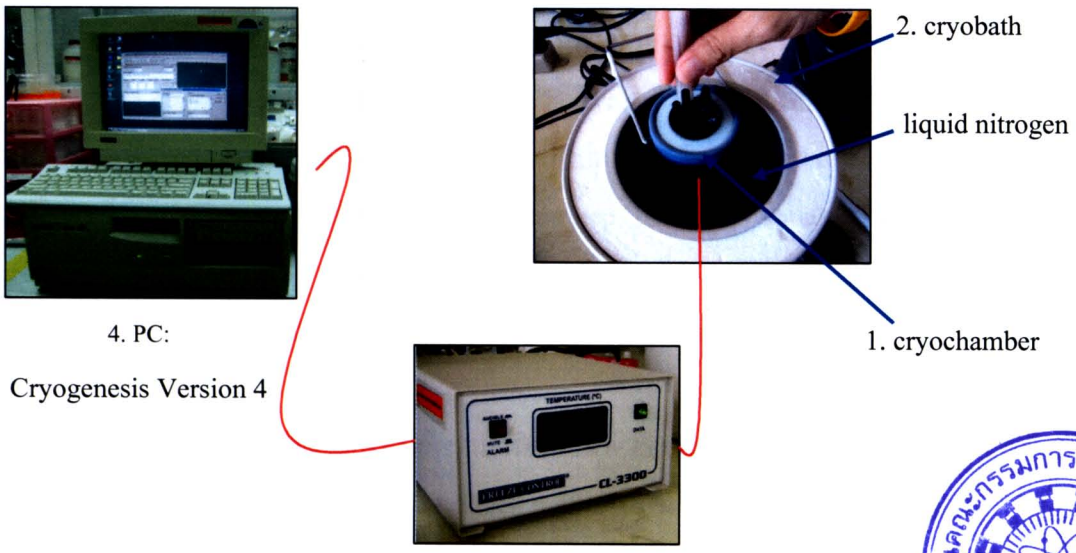


ภาพที่ 8 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

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

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

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



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

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

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

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

2.2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

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

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

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

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

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

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

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

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

3. ศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

ในการทดลองนี้ได้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองย่อย ดังนี้

3.1 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

ซึ่งมีขั้นตอนการทดลองดังนี้

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

ตารางที่ 8 แผนการทดลองการศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

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

3.2 ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

ตารางที่ 9 แผนการทดลองการศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

ขั้นตอนการศึกษาจำนวน sperm: egg ratio ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบแช่แข็ง มีดังนี้

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

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

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

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

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