บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

ตารางที่ 10 ปริมาตร ความเข้มข้น ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

4.2 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

4.2.1 ผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

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

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

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

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

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

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

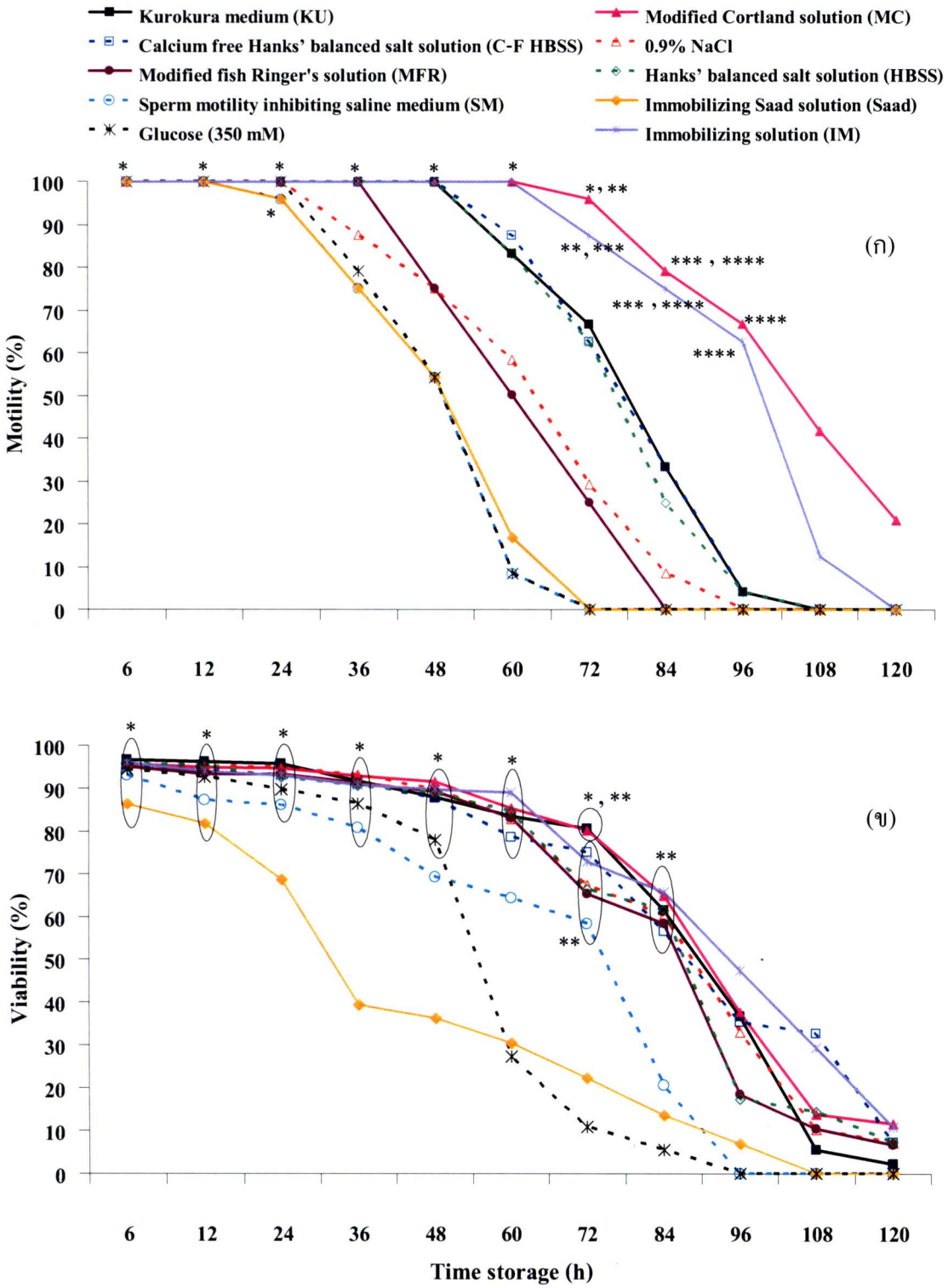
ตารางที่ 12 ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการมีชีวิต (mean±S.E.) ต่อการเก็บที่ระยะเวลาต่าง ๆ

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

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

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

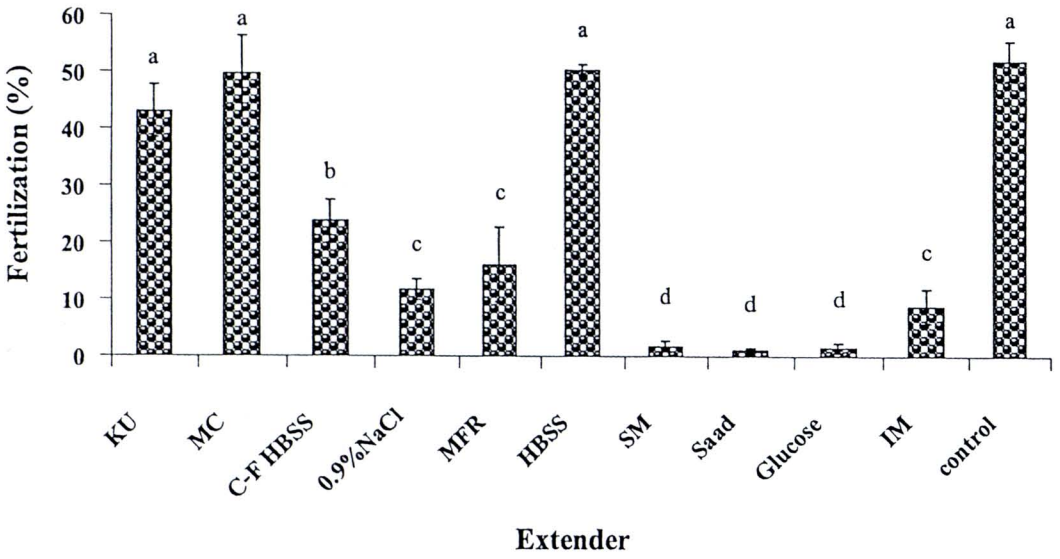
นอกจากนี้จากการศึกษายังพบว่าการใช้สาร extender แต่ละชนิด มีแนวโน้มของอัตราการเคลื่อนที่ลดลงเป็นแบบเส้นโค้งยกกำลังเก้า (nonic trend) เมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) และพบว่าการใช้ MC สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานถึง 72 ชั่วโมง โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ 95.8±4.2% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างจากการเก็บที่ระยะเวลาเริ่มต้นที่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



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

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

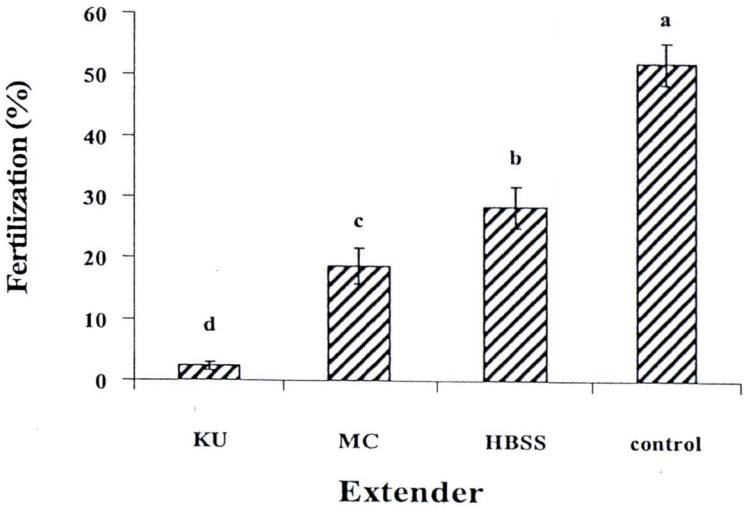
จากการทดสอบอัตราการปฏิสนธิที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง ในสาร extender ทั้ง 10 ชนิด (KU, MC, C- F HBSS, 0.9% NaCl, MFR, HBSS, SM, Saad, glucose (350 mM) และ IM พบว่า การใช้ HBSS, MC และ KU ให้ผลอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด และมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าและแตกต่างจากการใช้สาร extender ชนิดอื่น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



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

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต ($P<0.05$)

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



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

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิต ($P<0.05$)

4.2.2 ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

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

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

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

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

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแต่ละคอลัมน์ แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ตัวเลขในวงเล็บ คือเปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

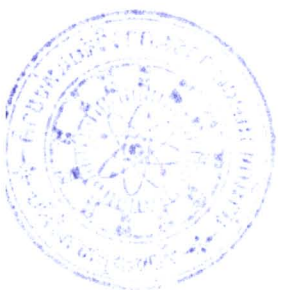
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

4.3 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง

4.3.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

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

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



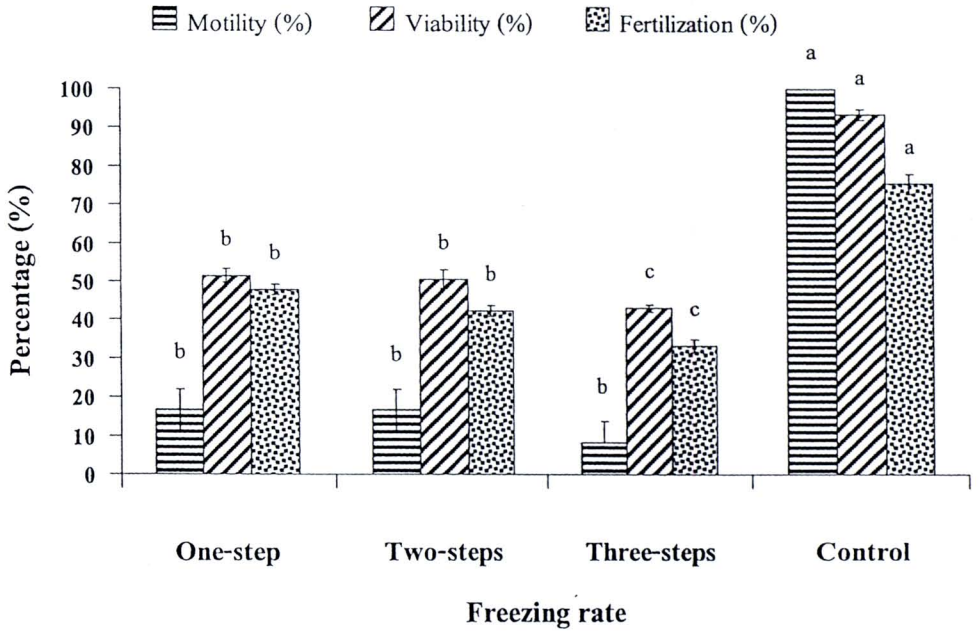
ตารางที่ 14 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราเคลื่อนที่ ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดในสาร extender (HBSS) ร่วมกับสาร cryoprotectant แต่ละชนิด (DMSO, DMA, glycerol และ MeOH) ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 15%

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

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

4.3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง

จากการศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง ที่อัตราการลดอุณหภูมิ One-step ($10^{\circ}C\ min^{-1}$ 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 $-80^{\circ}C$) โดยใช้ 5% glycerol ร่วมกับ HBSS พบว่าเมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 แบบดังกล่าวให้ผลอัตราการปฏิสนธิ อัตราการมีชีวิต และอัตราการเคลื่อนที่ ต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ One-step และ Two-steps ให้ผลไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยมีอัตราการปฏิสนธิ 47.84±1.42% และ 42.37±1.44% และอัตราการมีชีวิต 51.50±1.71% และ 50.66±2.49% ตามลำดับ แต่ให้ผลสูงกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิแบบ Three-steps สำหรับอัตราการเคลื่อนที่พบว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิทั้ง 3 แบบดังกล่าวไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ($P>0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 13



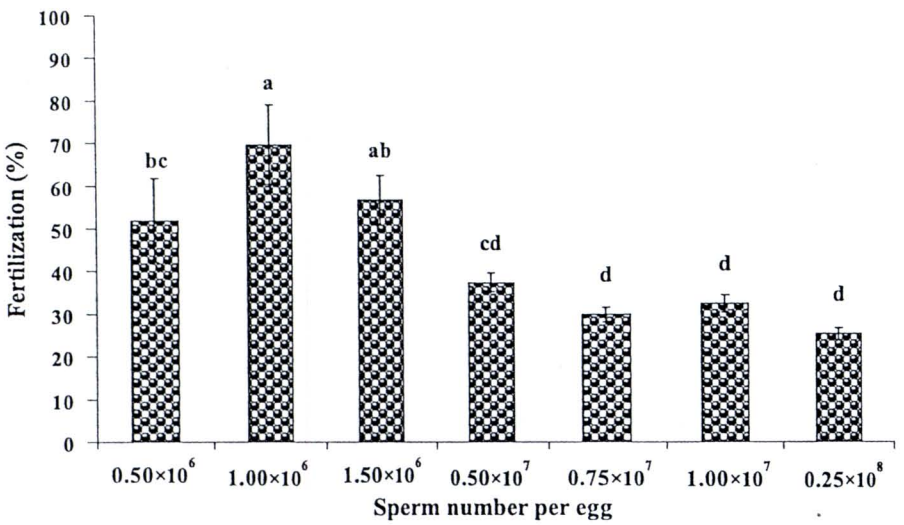
ภาพที่ 13 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.4 จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

4.4.1 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด

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

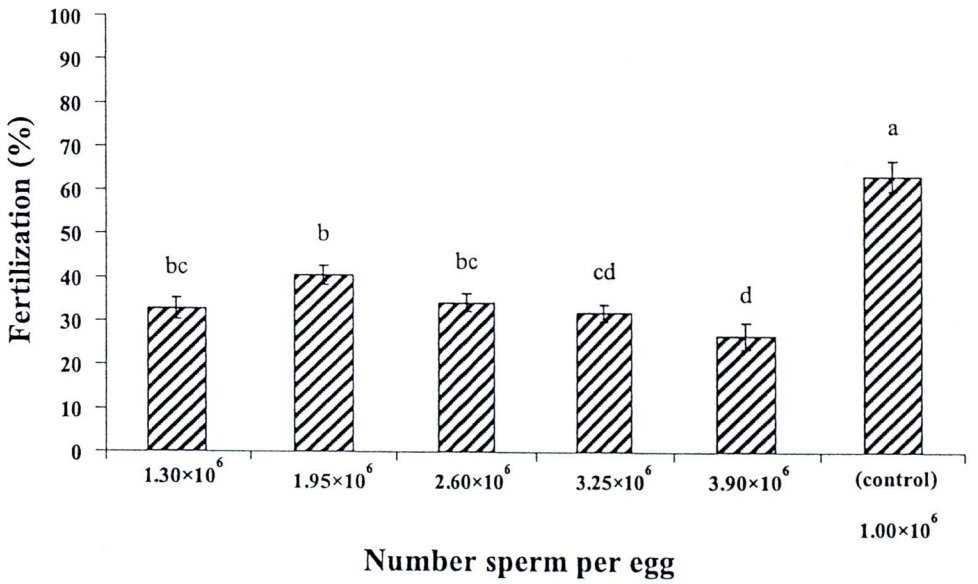


ภาพที่ 14 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ต่ออัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืด

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4.4.2 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด

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



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

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่แตกต่างกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)