248925
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248925

รหัสโครงการ SUT3-303-50-24-13

รายงานการวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดและการศึกษาอัตราส่วนระหว่างสเปิร์มและไข่ที่เหมาะสม ของการใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง

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

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

b00853367

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
248925

รหัสโครงการ SUT3-303-50-24-13

รายงานการวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดและการศึกษาอัตราส่วนระหว่างสเปิร์มและไข่ที่เหมาะสม ของการใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง

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

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

รหัสโครงการ SUT3-303-50-24-13

รายงานการวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดและการศึกษาอัตราส่วนระหว่างสเปิร์มและไข่ที่เหมาะสม ของการใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง

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

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

อาจารย์ ดร. สมร พรชื่นชูวงศ์

สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมวิจัย

1. นายอรรณพ อิ่มศิลป์

2. นายสมบัติ สิงห์สี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2550-2551

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

ตุลาคม 2554

กิตติกรรมประกาศ

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

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2554

บทคัดย่อ

248925

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

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

248925

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

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

การศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิทั้งในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด (การทดลองที่ 3) ในน้ำเชื้อสดพบว่าเมื่อใช้น้ำเชื้อ 1×10^6: 1 และ 1.5×10^6: 1 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ($P<0.05$) ส่วนในน้ำเชื้อแช่แข็งพบว่าเมื่อใช้จำนวน sperm: egg ratio ที่อัตราส่วน 1.30×10^6:1, 1.95×10^6: 1 และ 2.60×10^6: 1 ส่งผลให้มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่เมื่อมีการเพิ่มหรือลดจำนวน sperm: egg ratio ทั้งในน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง มีผลทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ABSTRACT

248925

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

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

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

248925

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

สารบัญ

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

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

1.2) ศึกษาอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 23

2) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาวหรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง 25

2.1) ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 25

2.2) ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 28

3) ศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ 30

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

3.2) ศึกษาจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด 31

บทที่ 4 ผลการศึกษา 34

4.1 ส่วนประกอบไอออน ค่าออสโมลาลิตี้ และค่า pH ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด 33

4.2 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 34

4.2.1 ผลของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 34

4.2.2 ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 40

4.3 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง 42

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.3.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสม สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 42

4.3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 44

4.4 จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ 45

4.4.1 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด 45

4.4.2 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด 46

บทที่ 5 อภิปรายผล 48

5.1 ผลของชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 47

5.2 ผลของอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 49

5.3 ผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว หรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง 51

5.3.1 ผลของชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant ที่เหมาะสม สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 51

5.3.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 52

5.4 จำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ 53

5.4.1 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลานวลจันทร์น้ำจืด 53

5.4.2 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืด 55

บทที่ 6 สรุป และข้อเสนอแนะ 56

6.1 สรุป 56

6.2 ข้อเสนอแนะ 56

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	58
ภาคผนวก ก. ตารางแสดงการวิเคราะห์วาเรียนซ์	65
ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย	79

สารบัญตาราง

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

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

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

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

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการพัฒนาของอสุจิ และการพัฒนาของไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืด 13

ภาพที่ 2 การรีดน้ำเชื้อ (ก) การรีดไข่ (ข) 14

ภาพที่ 3 สไลด์สำหรับนับเม็ดโลหิต (hemacytometer) (ก) ภาพแสดงตำแหน่งที่นับจำนวนอสุจิทั้ง 5 บริเวณ (1, 2, 3, 4 และ 5) (ข) 15

ภาพที่ 4 อสุจิมีชีวิตมีลักษณะสีขาว และอสุจิตัวตายจะติดสีชมพูแดงหรือสีม่วงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี eosin-nigrosin ส่องภายใต้กล้อง compound microscope กำลังขยาย 100 เท่า 17

ภาพที่ 5 ขวดเพาะฟักขนาด 1.25 ลิตร และระบบการฟักไข่ปลานวลจันทร์น้ำจืด 18

ภาพที่ 6 การพัฒนาของคัพภะปลานวลจันทร์น้ำจืดระยะ gastrula stage (8 ชั่วโมง) 19

ภาพที่ 7 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น 22

ภาพที่ 8 กระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง 26

ภาพที่ 9 ชุดควบคุมการลดอุณหภูมิในระหว่างกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งโดยใช้ freezer control (CL 3300) ร่วมกับโปรแกรม Cryogenesis Version 4 28

ภาพที่ 10 ผลของสาร extender ที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิต (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ระยะเวลาการเก็บต่าง ๆ (6-120 ชั่วโมง) 38

ภาพที่ 11 อัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ทำการเก็บรักษาด้วยสาร extender 10 ชนิด ที่ระยะเวลาการเก็บ 48 ชั่วโมง 39

ภาพที่ 12 อัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่ทำการเก็บรักษาด้วยสาร extender 3 ชนิด ที่ระยะเวลาการเก็บ 72 ชั่วโมง 40

ภาพที่ 13 ค่าเฉลี่ย (mean±S.E.) อัตราการเคลื่อนที่ อัตราการมีชีวิต และอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืด ที่อัตราการลดอุณหภูมิแบบต่าง ๆ 44

ภาพที่ 14 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ต่ออัตราการปฏิสนธิ (mean±S:E.) ของน้ำเชื้อสดปลานวลจันทร์น้ำจืด 45

ภาพที่ 15 ผลของจำนวนอสุจิ (sperm: egg ratio) ต่ออัตราการปฏิสนธิ (mean±S.E.) ของน้ำเชื้อแช่แข็งปลานวลจันทร์น้ำจืด 46