



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

ปริญญา

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทริน และการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็ง

Breeding Enhancement of Red-tail Catfish (*Hemibagrus wyckioides*, Fang and Chaux, 1949)
by Using Cyclodextrin Complex Administration and Spermatozoa Cryopreservation

นามผู้วิจัย นายวิศณุพร รัตนตรัยวงศ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์วราห์ เทพาคูดี, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์เรืองวิทย์ ยืนพันธ์, D.Tech.Sc.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(อาจารย์ประพันธ์ศักดิ์ ศิริระภูมิ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์พงศ์เชษฐา พิชิตกุล, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ชีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทริน
และการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็ง

Breeding Enhancement of Red-tail Catfish (*Hemibagrus wyckioides*, Fang and Chaux, 1949)
by Using Cyclodextrin Complex Administration and Spermatozoa Cryopreservation

โดย

นายวิศณุพร รัตนธวัชวงศ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาปรัชญาดุษฎีบัณฑิต (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

พ.ศ. 2555

วิศณุพร รัตนศรีวงศ์ 2555: การเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้สารประกอบ
เชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินและการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็ง ปรินญาปรัชญาคุณูปบัณฑิต
(เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) สาขาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
หลัก: รองศาสตราจารย์วราห์ เทพาคูดี, Ph.D. 94 หน้า

การศึกษาครั้งนี้มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาเทคนิคด้านการเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว โดยใช้ฮอร์โมน LHRH (des-Gly¹⁰-, [D-Ala⁶]-LH-RH) ร่วมกับสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินชนิดเฮปตาคิส (Heptakis-(2,6-di-O-ethyl)- β -cyclodextrins (LHRH-CDs) เป็นระบบนำส่งฮอร์โมนเพื่อให้เกิดการออกฤทธิ์แบบเนิ่นนาน และการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็ง แบ่งออกเป็น 4 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของฮอร์โมนต่อการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ปลากดแก้ว วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อก แบ่งออกเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ LHRH-CDs, LHRH ฉีดฮอร์โมนในอัตรา 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และชุดควบคุมฉีดน้ำมัน arachis ดำเนินการทดลอง 3 ช่วง คือ ช่วงมีความสมบูรณ์เพศต่ำ ปานกลาง และความสมบูรณ์เพศสูง พบว่า ค่าระดับฮอร์โมน estradiol ค่า GSI และระยะการพัฒนาของโอโอไซด์ในชุดการทดลองไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งในแต่ช่วงการทดลอง ($P<0.01$) การทดลองที่ 2 ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วพบว่าฮอร์โมน LHRH-CDs และฮอร์โมน LHRH สามารถกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยของระยะเวลาในการวางไข่และน้ำหนักไข่ที่รีดได้ของแม่ปลาไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่อัตราการผสมและอัตราการฟักของไข่ปลาคูที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน LHRH-CDs สูงกว่าฮอร์โมน LHRH อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) การทดลองที่ 3 ศึกษาพัฒนาการของไข่และลูกปลาวัยอ่อน พบว่าสามารถใช้เอนไซม์ pronase ร่วมกับ embryonic medium ขยายสลายสารเหนียวที่ห่อหุ้มเปลือกไข่ออกได้ ลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัวมีขนาดยาว 5.0 มิลลิเมตร มีพัฒนาการเหมือนตัวเต็มวัยเมื่ออายุ 180 วัน ปลาอายุ 1 ปีเริ่มสร้างระบบสืบพันธุ์ และอายุ 2 ปี ปลาเข้าสู่ระยะโตเต็มวัยพร้อมสืบพันธุ์ได้ การทดลองที่ 4 ศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดแก้วโดยการแช่แข็ง พบว่าน้ำเชื้อที่เจือจาง 1:2 ด้วยสารละลาย 0.9% NaCl และ GFR สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีในตู้เย็น 0-4 องศาเซลเซียส นาน 6 วัน DMSO เป็นสารไครโอโพรเทกแทนท์ที่เป็นพิษต่อปลากดแก้วมากที่สุด รองลงมาคือ glycerol และ methanol การเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็งโดยใช้สารละลาย 6% fructose หรือ 5% glucose เจือจางน้ำเชื้อและผสม methanol เข้มข้น 10% ใช้อัตราลดอุณหภูมิ 2 หรือ 5 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนแช่แข็งน้ำเชื้อนาน 20 นาที เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับใช้สารละลาย GFR เจือจางน้ำเชื้อผสม methanol เข้มข้น 10% และอัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนแช่แข็ง การตรวจสอบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บระยะเวลา 1 ปีเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดโดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 วินาที นำไปใช้ผสมเทียมกับไข่ปลากดแก้วในอัตราน้ำเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร (1 หลอดแช่แข็ง) ต่อไข่ 66.67 กรัม ให้อัตราการปฏิสนธิและอัตราฟักไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด ($P>0.05$)

Wisanutporn Ratanatrivong 2012: Breeding Enhancement of Red-tail Catfish (*Hemibagrus wyckioides*, Fang and Chaux, 1949) by Using Cyclodextrin Complex Administration and Spermatozoa Cryopreservation. Doctor of Philosophy (Aquaculture), Major Field: Aquaculture, Department of Aquaculture. Thesis Advisor: Associate Professor Wara Taparhudee, Ph.D. 94 pages.

The aim of this present study was to develop Red-tail Catfish (*Hemibagrus wyckioides*) breeding techniques by using LHRH (des-Gly¹⁰-, [D-Ala⁶]-LH-RH) combined with cyclodextrins (Heptakis-(2,6-di-O-ethyl)- β -cyclodextrins) complex (LHRH-CDs) as hormone vehicle and preservation of spermatozoa by cryopreservation method. The study comprised of four experiments. The first experiment was to study the effectiveness of LHRH-CDs on gonadal development of red-tail catfish. Randomized complete block design (RCBD) was applied having three treatments i.e. 30 μ g/kg LHRH-CDs, 30 μ g/kg LHRH and arachis oil for control with 3 different periods (low, medium and high maturation periods) as blocks. Results found that GSI, estradiol and gonadal development were not significantly different between hormones ($p>0.05$) but highly significantly different between times ($p<0.01$). The second experiment was to enhance red-tail catfish breeding by using LHRH-CDs hormone injection. It revealed that both LHRH-CDs and LHRH could induce spawning of female fishes and no significantly differences ($P>0.05$) in spawning times and eggs weight but LHRH-CDs hormone gave higher fertilization and hatching rates than LHRH ($P<0.05$). The third experiment was to study embryonic and larval development of the fish. Results showed that pronase enzyme combined with embryonic medium could reduce adhesive compound from chorions. The newly hatched larvae were about 5.0 millimeter in length, fully developed in 180 days and became first maturity in 2 years. The fourth experiment was to establish a protocol for red-tail catfish spermatozoa cryopreservation. The red-tail catfish milt was diluted in different extenders and stored in a refrigerator (0-4 degrees Celsius) for 6 days before sperm motility was examined. The result showed that 0.9% NaCl and Ginsberg fish's Ringer (GFR) solution were suitable extenders in terms of sperm motility. The study of protocol for the cryopreservation of red-tail catfish spermatozoa showed that methanol had the least toxic effect to the sperm whereas DMSO had the most toxic effect. The use of 6% fructose and 5% glucose as extenders, 10% (v/v) methanol as cryoprotectant, and cooling rates of 2 and 5 degrees Celsius/min to freeze the sperm above liquid nitrogen (-196 degrees Celsius) for 20 minutes and keep in dewar showed higher thawed sperm motility, compared with using GFR as an extender, 10% methanol and 10 degrees Celsius/min cooling rate. The percentage of eyed stage eggs between thawed and fresh sperms was not different ($P>0.05$).

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์วราห์ เทพาคูดี ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่ให้การสนับสนุน คำปรึกษา ความรู้ คำแนะนำ และตรวจแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์เรืองวิทย์ ยืนพันธ์ และ ดร.ประพันธ์ศักดิ์ ศิริษะภูมิ กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำและแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์นันทวิทย์ อารียัชน ประธานการสอบ และ ดร. สุภัตรา อุไรวรรณ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้ให้ความกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณคุณพลชาติ ผิวฉेर คุณคงภพ อำพลศักดิ์ คุณเบญจพร สัมฤทธิ์เวช คุณศรีจรรยา สุขมโนมนต์ เจ้าหน้าที่ของศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์ และสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ ที่ให้ความช่วยเหลือรวมทั้งอำนวยความสะดวกต่าง ๆ เป็นอย่างดี สำหรับการทำงานวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบคุณคุณอรุณรัตน์ รัตนตรัยวงศ์ และครอบครัว ที่ห่วงใยและเป็นกำลังใจอย่างดีตลอดการศึกษาในครั้งนี้ หากมีคุณค่าและประโยชน์อันเกิดจากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ขออุทิศแด่บิดาผู้ล่วงลับ และมารดาผู้ซึ่งสนับสนุนทางการศึกษาเป็นอย่างดีตลอดมา

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์

พฤษภาคม 2555

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	5
การตรวจเอกสาร	6
อุปกรณ์และวิธีการ	20
อุปกรณ์	20
วิธีการ	21
ผลและวิจารณ์	31
ผล	31
วิจารณ์	70
สรุปและข้อเสนอแนะ	79
สรุป	79
ข้อเสนอแนะ	80
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	81
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	94

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 คำดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (GSI) และผลการวัดระดับฮอร์โมน estradiol ใน plasma	34
2 ระยะการพัฒนาของโอโอไซต์ที่พบในระยะ immature, maturing, mature และ atretic	35
3 ผลการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้ฮอร์โมน LHRH และฮอร์โมน LHRH ผสม สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทริน LHRH-CDs	38
4 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เจือจางด้วยสารละลาย 3 สูตร (GFR, MFR และ 0.9% NaCl) ระหว่างเวลา 0-144 ชั่วโมง	53
5 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เจือจางด้วยสารละลาย 3 สูตร (GFR, MFR และ 0.9% NaCl) ระหว่างเวลา 0-144 ชั่วโมง	53
6 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่ผสมสารไครโอ-โพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (methanol, DMSO และ glycerol) ความเข้มข้น 6 ระดับ (2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) ที่ระยะเวลาเก็บ 0, 30 และ 120 นาที	58
7 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่ผสมสารไครโอ-โพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (methanol, DMSO และ glycerol) ความเข้มข้น 6 ระดับ (2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) ที่ระยะเวลาเก็บ 0, 30 และ 120 นาที	59
8 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อที่ละลาย จากการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดแก้วด้วยอัตราลดอุณหภูมิ 3 อัตรา (2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที) และสูตรสารละลาย 3 สูตร (6% fructose, 5% glucose และ GFR)	63
9 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่นำออกมาละลาย หลังจากเก็บที่ระยะเวลา 1, 7, 42 และ 365 วัน	66
10 ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ความหนาแน่นสเปิร์ม ความหนาแน่นสเปิร์มที่มีชีวิต อัตราส่วนสเปิร์มมีชีวิตต่อไข่ อัตราปฏิสนธิและอัตราฟัก (%) ของไข่ของปลากดแก้วที่ได้รับการผสมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 365 วัน เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วยสารละลายเจือจางสูตรเดียวกันในอัตราเจือจางเดียวกัน	69

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 การพัฒนาของโอโอไซด์ปลากดแก้ว	36
2 การพัฒนาของไข่และลูกปลาวัยอ่อนของปลากดแก้ว	46
3 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เจือจางด้วยสารละลาย 3 สูตร (GFR, MFR และ 0.9% NaCl) จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นที่ระยะเวลาระหว่าง 0-144 ชั่วโมง	54
4 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เจือจางด้วยสารละลาย 3 สูตร (GFR, MFR และ 0.9% NaCl) จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้นที่ระยะเวลาระหว่าง 0-144 ชั่วโมง	54
5 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (methanol, DMSO และ glycerol) ความเข้มข้น 6 ระดับ (2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) ณ ระยะเวลา 0, 30 และ 120 นาที	60
6 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (methanol, DMSO และ glycerol) ความเข้มข้น 6 ระดับ (2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) ณ ระยะเวลา 0, 30 และ 120 นาที	61
7 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้สารละลายเจือจาง คือ 6% fructose (Fruc), 5% glucose (Glu) และ GFR และอัตราลดอุณหภูมิคือ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที เก็บแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง ที่นำมาละลายเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำเชื้อก่อนแช่แข็งในระยะ equilibration (equi)	64
8 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้สารละลายเจือจาง คือ 6% fructose (Fruc), 5% glucose (Glu) และ GFR และอัตราลดอุณหภูมิคือ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที เก็บแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง ที่นำมาละลายเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำเชื้อก่อนแช่แข็งในระยะ equilibration (equi)	64
9 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้สารละลายเจือจาง คือ 6% fructose (Fruc), 5% glucose (Glu) และ GFR และอัตราลดอุณหภูมิคือ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที เก็บแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง ที่นำมาละลาย	65

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
10	ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้สารละลายเจือจาง คือ 6% fructose (Fruc), 5% glucose (Glu) และ GFR และอัตราลดอุณหภูมิคือ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที่ เก็บแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง ที่นำมาละลาย	65
11	ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง นาน 1, 7, 42 และ 365 วัน ที่นำออกมาละลาย เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อก่อนแช่แข็ง	67
12	ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เก็บรักษาโดยวิธี แช่แข็งนาน 1, 7, 42 และ 365 วัน ที่นำออกมาละลาย เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อก่อน แช่แข็ง	67

การเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลาคัดแก้วโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อน ไซโคลเด็กซ์ทรินและการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็ง

Breeding Enhancement of Red-tail Catfish (*Hemibagrus wyckioides*, Fang and Chaux, 1949) by Using Cyclodextrin Complex Administration and Spermatozoa Cryopreservation

คำนำ

ปลาคัดแก้ว (*Hemibagrus wyckioides*, Fang and Chaux, 1949) เป็นปลาน้ำจืดพันธุ์พื้นเมืองที่คนไทยรู้จักกันดี เนื่องจากเป็นปลาที่มีรสดีได้รับความนิยมในการบริโภคสูงและเป็นที่ต้องการของตลาด ราคาของปลาเนื้อขนาด 1-2 กิโลกรัม อยู่ที่กิโลกรัมละ 100-170 บาท จึงเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงกันมากอีกชนิดหนึ่ง (ขงยุทธ, 2548) จากการที่กรมประมงมีนโยบายการพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยใช้พันธุ์ที่มีในท้องถิ่นที่เหมาะสมกับสภาพพื้นที่โดยให้มีความหลากหลายทั้งชนิดสัตว์น้ำและรูปแบบการเพาะเลี้ยงที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อม เพื่อเป็นทางเลือกในการประกอบอาชีพให้เกษตรกร และนโยบายการเพิ่มผลผลิตสัตว์น้ำที่มีคุณภาพจากการเพาะเลี้ยงให้เพียงพอต่อการบริโภคและการส่งออก ปลาคัดแก้วจึงเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่กรมประมงให้ความสำคัญในการส่งเสริมให้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงหลังจากที่ได้ประสบความสำเร็จในด้านการเพาะขยายพันธุ์และพัฒนาสายพันธุ์ให้ได้พันธุ์ที่มีคุณภาพ โดยสนับสนุนให้มีการวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงปลาคัดแก้วเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพและคุณภาพการผลิตในด้านต่าง ๆ เช่น การเพาะพันธุ์ การอนุบาล การเลี้ยง การปรับปรุงพันธุ์ และด้านพันธุกรรมสัตว์น้ำได้ศึกษาการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของปลาคัดแก้วที่อายุต่าง ๆ (สุภัทรา และคณะ, 2544) จากผลงานวิจัยที่กล่าวมาแสดงให้เห็นว่ามีความเป็นไปได้ที่จะจัดการพ่อแม่พันธุ์ปลาคัดแก้วที่เพาะเลี้ยงโดยวิธีการคัดเลือกลักษณะต่าง ๆ เพื่อผลิตลูกพันธุ์ให้มีลักษณะทางเศรษฐกิจที่ดีตามความต้องการของตลาด เป็นการพัฒนาสายพันธุ์ที่ดีมีคุณภาพสู่ภาคเอกชน และเป็นแนวทางในการวางแผนการพัฒนาปรับปรุงพันธุ์ปลาคัดแก้วเพื่อการเพาะเลี้ยงอย่างยั่งยืนต่อไป ประกอบกับประเทศไทยมีข้อได้เปรียบที่ช่วยส่งเสริมศักยภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในหลายด้านไม่ว่าจะเป็นสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสม มีแหล่งน้ำธรรมชาติที่อุดมสมบูรณ์ต่อการเลี้ยงปลาคัดแก้วในกระชัง มีระบบชลประทานในพื้นที่ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงปลาคัดแก้วในบ่อดินแบบพัฒนา ซึ่งแสดงถึงความ

เป็นไปได้สำหรับการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลากดแก้วไปสู่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชิงอุตสาหกรรมในอนาคต กรมประมงจึงได้มีการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงปลากดแก้วอย่างจริงจังจนแพร่หลายไปทั่วประเทศ ปัจจุบันความต้องการลูกปลากดแก้วมีมากขึ้น เนื่องจากความต้องการของผู้บริโภคที่เพิ่มขึ้นทั้งในประเทศและต่างประเทศ แต่ประสบปัญหาขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ที่ดี และใช้เวลานานในการพัฒนาการเลี้ยงให้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในบ่อดิน ดังนั้นจึงมีความจำเป็นต้องมีการพัฒนาสายพันธุ์จากการเลี้ยงที่ดี มีคุณภาพและปริมาณเพียงพอ สามารถผลิตได้ต่อเนื่อง การใช้เทคโนโลยีการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์เพื่อสร้างพ่อแม่พันธุ์ที่ดีจึงเป็นจุดเริ่มต้นที่มีความสำคัญและจำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยในด้านที่ยังขาดข้อมูลอยู่ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนทุกด้านทั้งระบบ ได้แก่ รูปแบบระบบการผลิตและเพาะเลี้ยงที่มีประสิทธิภาพเชิงพาณิชย์ การพัฒนาสายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์รวมถึงแนวทางการอนุรักษ์ที่เหมาะสมอันจะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการพัฒนาการเพาะเลี้ยงปลากดแก้วให้มีประสิทธิภาพเพิ่มมากขึ้น

กรมประมงได้เริ่มดำเนินการปรับปรุงพันธุ์ปลากดแก้วเพื่อผลิตลูกปลากดแก้วจากการเลี้ยงในบ่อเลี้ยงในแต่ละรุ่นให้เพิ่มมากขึ้นแต่ประสบปัญหาคือ การเลี้ยงปลากดแก้วให้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในแต่ละรุ่นนั้นใช้ระยะเวลานาน และการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในที่กักขังให้มีความสมบูรณ์เพศนั้นทำได้ยากเนื่องจากสภาพแวดล้อมในบ่อเลี้ยงแตกต่างจากสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ส่งผลให้การหลังฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเจริญพัฒนาของรังไข่หยุดชะงักหรือมีปริมาณที่ไม่เพียงพอที่จะพัฒนาให้ไข่เจริญถึงขั้นสุดท้าย (Final oocyte maturation) ซึ่งเป็นระยะที่สามารถนำไปเพาะพันธุ์ได้โดยวิธีการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่ และข้อจำกัดอีกอย่างหนึ่งคือ ปลาเพศเมียวัยเจริญพันธุ์ที่เริ่มเจริญพันธุ์ในปีแรก (First maturity) ส่วนใหญ่มีพัฒนาการของรังไข่บกพร่อง (Reproductive dysfunction) ด้วยเหตุนี้จึงจำเป็นต้องศึกษาหาวิธีการกระตุ้นให้ปลามีความพร้อมในการผสมพันธุ์วางไข่ และศึกษาการกระตุ้นการเจริญพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อพัฒนาไปสู่การเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์ต่อไป การฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้รังไข่มีพัฒนาการอย่างต่อเนื่องจนถึงระยะสุดท้ายจนสามารถกระตุ้นให้แม่ปลาตกไข่ได้โดยใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลีสซิง ฮอร์โมน (Gonadotropin releasing hormone, GnRH) หรือลูทีไนซิงฮอร์โมน รีลีสซิงฮอร์โมน (Luteinizing hormone releasing hormone, LHRH) หลาย ๆ ครั้ง แต่ในปัจจุบันนิยมใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์คือ Luteinizing Hormone Releasing Hormone analogue (LHRHa) มากกว่า ซึ่งฮอร์โมนนี้จะมียับยั้งการไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (Gonadotropin) ไปที่อวัยวะสืบพันธุ์ให้หลังฮอร์โมนกลุ่มสเตียรอยด์ชนิดต่าง ๆ ซึ่งทำให้เซลล์สืบพันธุ์มีพัฒนาการจนมีความสมบูรณ์พร้อมผสมพันธุ์วางไข่ (Mylonas and Zohar, 2001a) แต่การ

ฉีดฮอร์โมนเพาะพันธุ์ปลานั้นมีผลให้ระดับฮอร์โมนคงอยู่ในกระแสเลือดในระดับสูงเพียงช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น เนื่องจากฮอร์โมนที่ใช้ส่วนใหญ่มีครึ่งชีวิต (Half life) สั้น ทำให้มีข้อจำกัดในการออกฤทธิ์ต่อปลา ดังนั้นการหาวิธีการที่ทำให้ฮอร์โมนเหล่านี้คงอยู่ในกระแสเลือดในระยะเวลายาวนานขึ้น จะช่วยลดข้อจำกัดและทำให้ฮอร์โมนออกฤทธิ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น ก่อให้เกิดประโยชน์ในการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำที่เพาะพันธุ์ได้ยาก ดังนั้นการทำให้ฮอร์โมนที่กระตุ้นการผสมพันธุ์วางไข่คงระดับอยู่ในกระแสเลือดที่ละน้อย ๆ เป็นระยะเวลานานนอกจากจะลดผลกระทบซึ่งเกิดจากการฉีดฮอร์โมนปริมาณมากเข้าสู่ตัวปลาจากการผสมเทียมโดยวิธีปกติแล้ว ยังอาจเป็นการยืดระยะเวลาการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำให้ยาวนานขึ้นได้ ดังนั้นกระบวนการที่จะแก้ปัญหานี้ได้คือ การใช้ระบบนำส่งยา (Drug delivery system) ที่ช่วยให้ฮอร์โมนออกฤทธิ์คงอยู่ได้ยาวนานต่อเนื่องกันไปเมื่อฉีดเข้าไปในร่างกายเพียงครั้งเดียว ซึ่งในปัจจุบันได้มีการพัฒนาระบบนำส่งยาที่เป็นสารโพลิเมอร์บางชนิด (Benita *et al.*, 1984) ให้มีคุณสมบัติในการในการหุ้มห่อฮอร์โมนเอาไว้เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วสลายตัวช้า ๆ พร้อมกับปลดปล่อยฮอร์โมนออกมาทีละน้อยติดต่อกันยาวนาน (Sustained release) ทำให้ฮอร์โมนชนิดนี้เมื่อฉีดเข้าร่างกายแล้วสามารถออกฤทธิ์อยู่ได้นานจึงเรียกว่า ฮอร์โมนชนิดออกฤทธิ์เนิ่นนาน (Sustained release hormone) และได้มีการนำไปใช้ในวงการแพทย์เพื่อรักษาโรคที่ต้องบำบัดด้วยการให้ฮอร์โมนติดต่อกันเป็นเวลานาน โดยฉีดฮอร์โมนชนิดนี้ครั้งเดียวแล้วสามารถออกฤทธิ์อยู่ในร่างกายได้นาน 1-3 เดือน (Okada *et al.*, 1988; Okada *et al.*, 1994a; Okada *et al.*, 1994b; Okada, 1997) ทำให้ผู้ป่วยไม่ต้องมาพบแพทย์เพื่อฉีดยาบ่อย ๆ เหมือนก่อน ในหลักการเดียวกันเทคโนโลยีนี้ได้ถูกนำไปประยุกต์ใช้กับสัตว์หลายชนิด รวมทั้งปลา (Zohar and Mylonas, 2001) การศึกษาวิธีการให้ฮอร์โมนหรือยาโดยให้ถูกปลดปล่อยออกมาทีละน้อยโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน (Cyclodextrins, CDs) ซึ่งจะทำหน้าที่เป็นพาหะให้กับโมเลกุลอื่น ๆ เช่น ฮอร์โมนหรือยาจะมีผลให้ยาหรือฮอร์โมนถูกปลดปล่อยออกจากสารประกอบเชิงซ้อนทีละน้อย ๆ ในระยะเวลานาน (Sustained-release formulations) ทั้งนี้จากโครงสร้างโมเลกุลของไซโคลเด็กซ์ตรินโดยกระบวนการ sustained-release ซึ่งมีประโยชน์อย่างยิ่งในทางเภสัชศาสตร์ เพราะทำให้ประสิทธิภาพของยาหรือสารเคมีมีผลต่อเป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพในระยะยาว การใช้โมเลกุลพาหะ (Carrier molecule) เช่น กลุ่มสารประกอบไซโคลเด็กซ์ตรินซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลอันจะส่งผลให้เกิด sustained-release ได้อย่างดีในยาและสารเคมีหลายชนิด อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานว่ามีการใช้ฮอร์โมนร่วมกับโมเลกุลพาหะในปลามาก่อน ดังนั้นการใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินร่วมกับฮอร์โมนสังเคราะห์ LHRHa ในการกระตุ้นให้ปลาตกไข่ที่เลี้ยงในบ่อดินมีความสมบูรณ์เพศ และเร่งการ

ตกไข่ของแม่ปลาจะเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลาตกแก้วได้ หากประสบผลสำเร็จจะเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญยิ่งในการนำไปประยุกต์ใช้ในการเพาะขยายพันธุ์ปลาต่อไป

การศึกษาพัฒนาการของไข่และลูกปลาทอดแก้ววัยอ่อนนั้นได้มีรายงานแล้วโดย วิเศษพร และคณะ (2537) และขงยุทธ (2548) แต่ยังขาดข้อมูลที่ครบถ้วนสมบูรณ์ เนื่องจากไข่ปลาตกแก้วเป็นไข่จมติดวัสดุ มีสารเหนียวปกคลุม ทำให้ทึบแสงไม่สามารถมองเห็นพัฒนาการของคัพภะได้ชัดเจน การศึกษาครั้งนี้ได้ทดลองใช้เทคนิคในการแยกเปลือกไข่ที่ปกคลุมด้วยสารเหนียวออกด้วยการใช้เอนไซม์สำหรับย่อยสลายโปรตีนให้แตกออกแล้วบันทึกภาพการพัฒนาของคัพภะทุกขั้นตอนจนฟักออกเป็นตัวและศึกษาการพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนจนถึงระยะตัวเต็มวัยที่สามารถสืบพันธุ์ได้ ทำให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วน ข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนการบริหารจัดการแหล่งน้ำ การวางแผนจัดการเลี้ยงปลาตกแก้วเพื่อให้เป็นพ่อแม่พันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์

นอกจากนี้ในการเพาะพันธุ์ปลาตกแก้วโดยวิธีผสมเทียมนั้น พ่อพันธุ์ปลาตกแก้วไม่สามารถรีดน้ำเชื้อโดยการกดบริเวณส่วนท้องเหมือนปลาชนิดอื่น ๆ ได้ เพราะอวัยวะปลาตกแก้วจะอยู่ลึกลงไป ในช่องท้องใต้ระบบทางเดินอาหาร ในการเพาะพันธุ์จึงต้องมีการฆ่าปลาตกแก้วเพศผู้เพื่อเอาน้ำเชื้อ จึงควรใช้น้ำเชื้อที่ได้มาแต่ละครั้งให้คุ้มค่าที่สุด การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อให้มีชีวิตอยู่นานกว่าปกติจึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการเพาะขยายพันธุ์ โดยจะสามารถแก้ปัญหาคาดแคลนพ่อพันธุ์ในอนาคต และป้องกันการสูญเสียพ่อพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางพันธุกรรมโดยเก็บรักษาน้ำเชื้อในธนาคารเชื้อพันธุ์เพื่อใช้ประโยชน์ในการการอนุรักษ์พันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ปลาตกแก้วในอนาคต โดยในปัจจุบันธนาคารเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมงได้ดำเนินการเก็บรักษาน้ำเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำโดยวิธีเก็บน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง (Spermatozoa cryopreservation) ได้รวบรวมสัตว์น้ำเศรษฐกิจไว้ทั้งสิ้น 7 ชนิด 26 สายพันธุ์ คือ ปลาตะเพียนขาว ปลาไน ปลาดุกอุย ปลาดุกยักษ์ ปลานิล ปลาสวาย ปลาหมอไทย และกำลังพัฒนาวิธีการในกึ่งก้ำมกราม ปลาดุกอุย ปลาขี้สกเทศ และปลาสวาย (พลชาติ และพนม, 2546) การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตกแก้วจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่งเนื่องจากยังไม่มีการศึกษาในปลาสกุลนี้มาก่อน และสามารถนำผลที่ได้ไปพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตกชนิดอื่น หรือปลาในสกุลอื่น ๆ อันมีความจำเป็นและสำคัญยิ่งต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของการใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเดกซ์ทรินร่วมกับฮอร์โมนสังเคราะห์ LHRH ต่อการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ของปลากดแก้วเพศเมียในสภาพการเพาะเลี้ยง
2. เพื่อศึกษาผลของการใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเดกซ์ทรินร่วมกับฮอร์โมนสังเคราะห์ LHRH ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์
3. เพื่อศึกษาการพัฒนาการของคัพภะและลูกปลาวัยอ่อน
4. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดแก้วโดยวิธีแช่แข็ง

การตรวจเอกสาร

อนุกรมวิธานและลักษณะทางชีววิทยา

ปลากดแก้ว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hemibagrus wyckioides* (Fang and Chau, 1949) มีชื่อสามัญเรียกว่า Red-tail Catfish และมีชื่อไทยเรียกหลายชื่อว่า ปลากดคัง เค็ง กดหางแดง จำแนกอนุกรมวิธานตาม Nelson (1994) ดังนี้

Phylum Chordata

Superclass Gnathostomata

Class Actinopterygii

Subclass Neopterygii

Division Teleostei

Subdivision Euteleostei

Superorder Ostariophysi

Order Siluriformes

Family Bagridae

Genus *Hemibagrus wyckioides*

ปลากดแก้วเป็นปลาน้ำจืดชนิดไม่มีเกล็ดขนาดใหญ่ที่สุดในสกุลปลากดที่มีอยู่ พบแพร่กระจายอยู่ในทวีปเอเชียบริเวณตอนกลางของคาบสมุทรอินโดจีน ได้แก่ กัมพูชา ลาวและไทย (Ng and Rainboth, 1999) สำหรับในประเทศไทย พบว่า ปลากดแก้วมีถิ่นอาศัยแพร่กระจายอยู่ตามแหล่งน้ำธรรมชาติ บริเวณแม่น้ำสายหลัก ลำคลองและอ่างเก็บน้ำต่าง ๆ ทั่วทุกภาค เช่น แม่น้ำโขง แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำน่าน แม่น้ำตาปี แม่น้ำแม่กลอง บึงบอระเพ็ด อ่างเก็บน้ำเขื่อนสิริกิติ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ อ่างเก็บน้ำเขื่อนรัชชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี และอ่างเก็บน้ำเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี (ทัพพล, 2537; วิเศษพร และคณะ, 2537; ชวลิต และคณะ, 2543; คีรี และคณะ, 2546)

ลักษณะทั่วไปของปลากดแก้ว มีลำตัวค่อนข้างกลม หัวแบนลง ปากกว้าง มีหนวด 4 คู่ หนวดที่มุมปากยาวเลยจุดเริ่มต้นของครีบกัน ครีบหลังมีก้านครีบแข็งซึ่งมีขอบเรียบ ครีบไขมันยาวจรดครีบหลัง ครีบอกมีก้านครีบที่แข็งและปลายแหลม ปลาบางตัวมีปลายแถบบนยื่นออกเป็นเส้นเดี่ยวยาว ตัวสีเทาอ่อนอมฟ้าหรือเขียวมะกอก ท้องสีจาง ครีบหางแดงสด หรือแดง ไม่มีขอบขาว

ที่ครีบหาง ครีบอื่น ๆ แดงเรื่อหรือคล้ำ กินปลา กุ้ง และสัตว์น้ำอื่น ๆ เป็นอาหาร (สมโภชน์ และ กาญจนรี, 2543)

การแพร่ขยายพันธุ์ของปลากดแก้วจะไม่มีการเคลื่อนย้ายถิ่น จะวางไข่ในถิ่นอาศัยแต่จะเข้าไปอาศัยอยู่ในบริเวณป่าที่น้ำท่วมถึงในขณะที่แหล่งน้ำมีระดับสูง ช่วงเดือนกรกฎาคมถึงตุลาคม (Fishbase, 2005) จากการศึกษาของวิศนุพร และคณะ (2537) พบว่าขนาดของปลากดแก้วที่เริ่มเจริญพันธุ์หรือพร้อมที่จะแพร่ขยายพันธุ์ได้ขนาดเล็กที่สุดมีความยาว 69 เซนติเมตร น้ำหนัก 2,400 กรัม และสุทธิชัย และ อุบลรัตน์ (2532) รายงานว่าแม่ปลากดแก้ว 4 กิโลกรัมขึ้นไปพบว่ามีความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์และพบว่าจะมีระยะเวลาการวางไข่ในระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม ส่วนในเดือนอื่น ๆ ไม่พบปลากดแก้วมีไข่แก่ แม่ปลากดแก้วมีค่าเปอร์เซ็นต์ Gonado Somatic Index (GSI) เฉลี่ยในระยะวางไข่เท่ากับ $3.19 \pm 1.25 \%$

การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากดแก้ว

ขงยุทธ (2548) รายงานว่า การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากดแก้วมีความแตกต่างจากการเลี้ยงปลาทั่วไป เนื่องจากมีวัตถุประสงค์เพื่อให้พ่อแม่พันธุ์ปลาที่เลี้ยงมีไข่แก่และน้ำเชื้อดี พ่อแม่พันธุ์ปลากดแก้วที่จะนำมาใช้ในการเพาะพันธุ์สามารถรวบรวมได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติ หรือคัดเลือกลูกปลาที่ได้จากการเพาะพันธุ์ที่มีลักษณะเด่น โตเร็ว หรือคัดเลือกปลากดแก้วจากบ่อเลี้ยงที่เจริญเติบโตดี และแข็งแรงในแต่ละรุ่นของแต่ละแหล่ง นำมาเลี้ยงขุนให้เป็นพ่อแม่พันธุ์ก็ได้ โดยคัดเลือกปลาที่มีรูปร่างสมส่วน แข็งแรง มีอวัยวะครบสมบูรณ์ น้ำหนัก 2-3 กิโลกรัม และมีอายุ 2 ปีขึ้นไป นำมาเลี้ยงรวมกันในบ่อดินขนาด 800-1,600 ตารางเมตร อัตราปล่อย 1 ตัว/5-10 ตารางเมตร เลี้ยงแบบรวมเพศหรือแยกเพศก็ได้ ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีนไม่ต่ำกว่า 30% ในอัตรา 1-2% น้ำหนักตัว/วัน การขุนพ่อแม่พันธุ์ปลากดแก้วให้มีไข่สมบูรณ์ และมีอัตราการฟักไข่สูงขึ้นสามารถทำได้โดยการให้อาหารสมทบด้วยปลาทะเลผสมรำละเอียด อัตราส่วน 8:2 ปั่นเป็นก้อนเป็นอาหารในอัตราส่วน 5% (น้ำหนักเปียก) ของน้ำหนักตัว/วัน สัปดาห์ละครั้ง และมีการถ่ายน้ำใหม่ลงในบ่อประมาณ 30% ในช่วงฤดูปลาวางไข่ (เดือนพฤษภาคม-สิงหาคม) 2 สัปดาห์/ครั้ง ส่วนการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากดแก้วในกระชังนั้น ศรารุช และคณะ (2547) รายงานว่า การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากดแก้วในกระชังอวน ขนาด 25 ตารางเมตร (5x5x2.5 เมตร) ขนาดตาอวน 3-5 เซนติเมตร แวนลอยในอ่างเก็บน้ำหรือแหล่งน้ำที่มีน้ำไหลถ่ายเทได้สะดวก อัตราการปล่อย 2 ตัว/ตารางเมตร เลี้ยงแบบรวมเพศหรือแยกเพศก็ได้ ให้อาหารเม็ดปลาคูโปรตีนไม่ต่ำกว่า 32% วันละ 1 ครั้ง ในอัตรา 1%

ของน้ำหนักรีด และกระตุ้นให้ปลาสมบูรณ์เพศโดยให้ปลาสดสับเป็นชิ้นเป็นอาหาร 2-3 ครั้ง/สัปดาห์

การเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์

ปลากดแก้วสามารถเพาะพันธุ์ได้โดยวิธีการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่และปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์วางไข่โดยวิธีธรรมชาติ และวิธีการผสมเทียม จากการทดลองเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยวิธีฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่ปลากดแก้ววางไข่แล้วผสมเทียมของวิศณุพร และคณะ (2537) ฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์บูเซอเรลิน อะซีเตท (Buserelin acetate) ในอัตรา 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ดอมเพอริโดน (Domperidone) 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม ฉีดให้กับแม่ปลาครั้งเดียวแม่ปลาจะวางไข่ในระยะเวลา 12-13 ชั่วโมง 30 นาที หรือฉีดฮอร์โมนให้กับแม่ปลา 2 ครั้ง ในอัตราครั้งแรกบูเซอเรลิน อะซีเตท 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับดอมเพอริโดน 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม ครั้งที่ 2 บูเซอเรลิน อะซีเตท 15 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับดอมเพอริโดน 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม โดยเว้นระยะเวลาระหว่างครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แม่ปลาจะวางไข่ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง 30 นาที - 9 ชั่วโมง 30 นาที หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 2 ส่วนการทดลองเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่แล้วปล่อยให้ผสมพันธุ์วางไข่โดยวิธีธรรมชาติ นั้น สมบัติ และ เจริญ (2547) ได้ทดลองเพาะพันธุ์ในบ่อซีเมนต์ ขนาด 2x2x0.5 เมตร พื้นก้นบ่อรองด้วยตาข่ายมุ้งสีฟ้าช่องตา 16 ช่องตาต่อกวadrat ขนาด 1.9x1.9 เมตร ฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ให้กับแม่ปลาครั้งเดียวในอัตราบูเซอเรลิน อะซีเตท 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ดอมเพอริโดน 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม และฉีดฮอร์โมนให้กับแม่ปลา 2 ครั้ง ในอัตราครั้งแรกบูเซอเรลิน อะซีเตท 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับดอมเพอริโดน 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม ครั้งที่ 2 บูเซอเรลิน อะซีเตท 15 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับดอมเพอริโดน 10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม โดยเว้นระยะเวลาระหว่าง 6 ชั่วโมง จากนั้นปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์แต่ละคู่ผสมพันธุ์วางไข่ตามธรรมชาติ พบว่าแม่ปลาจะวางไข่ในระยะเวลา 14.12-15.00 ชั่วโมง หลังการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนครั้งแรกใกล้เคียงกันทั้ง 2 ชุดการทดลอง

วิศณุพร และคณะ (2537) ได้รายงานพัฒนาการของไข่และลูกปลากดแก้ววัยอ่อนว่า ไข่ปลากดแก้วเป็นไข่จมติดมีสารเหนียวห่อหุ้มมีขนาด 2.25 มิลลิเมตร ระยะฟักออกเป็นตัว 30-32

ช่วงโอมง ที่อุณหภูมิ น้ำ 27-29 องศาเซลเซียส ลูกปลากดแก้วฟักออกเป็นตัวมีขนาดความยาว 4.97-6.00 มิลลิเมตร อายุ 3 วัน อุณหภูมิสูงและกินไรแดงขนาดเล็กเป็นอาหาร อายุ 4 วัน มีหนวดครบ 4 คู่ และมีลักษณะคล้ายตัวเต็มวัยเมื่ออายุ 10 วัน ซึ่งสามารถฝึกให้กินอาหารสำเร็จรูปได้ โดยนิสัยการกินอาหารของลูกปลากดแก้วจะออกหากินในเวลากลางวัน สำหรับกลางวันจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มและไม่มีนิสัยกินกันเอง

การควบคุมระบบสืบพันธุ์ของปลา

อุทัยรัตน์ (2538) รายงานว่าเมื่อสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปในทางที่เหมาะสมต่อการสืบพันธุ์ เช่น อุณหภูมิสูงขึ้น น้ำมีคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพเหมาะสม ระบบประสาทจะส่งสัญญาณไปยังสมองส่วนไฮโปทาลามัส (Hypothalamus) ซึ่งตอบสนองโดยการสร้างริลิสซิ่งฮอร์โมนแล้วปล่อยไปกระตุ้นการทำงานของต่อมใต้สมอง (Pituitary gland) ต่อมใต้สมองจะสร้างฮอร์โมนโกนาโดโทรปินซึ่งจะปล่อยตามกระแสเลือดไปออกฤทธิ์ยังรังไข่หรืออวัยวะสืบพันธุ์ ฮอร์โมนนี้กระตุ้นให้รังไข่หรืออวัยวะสืบพันธุ์สร้างฮอร์โมนเพศและได้อ้างอิง (Idler and Ng, 1983) ได้ศึกษาคุณสมบัติทางเคมี กายภาพและชีววิทยา สรุปว่าโกนาโดโทรปินของปลาประกอบด้วยฮอร์โมน 2 ชนิด ต่อไปนี้ 1) มาทิวเรชันนัล ฮอร์โมน (Maturational hormone) 2) ไวลเทโลเจนิค ฮอร์โมน (Vitellogenic hormone) ฮอร์โมนชนิดแรกมีคุณสมบัติในการกระตุ้นการสุกของไข่และสร้างสเตอรอยด์เช่นเดียวกับฮอร์โมน LH ในสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม แต่ไวเทลโลเจนิค ฮอร์โมนมีคุณสมบัติแตกต่างจาก FSH ของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนมชัดเจน และได้อ้างอิง (Ng and Idler, 1983) ที่สรุปว่า มาทิวเรชันนัล โกนาโดโทรปิน ในปริมาณน้อยมีผลกระตุ้นรังไข่ให้สร้างเอสโตรเจนไปกระตุ้นการสร้างไวเทลโลเจนิค (Vitellogenin) ในตับ แต่ในการรับไวเทลโลเจนิคเข้าสู่โอโอไซด์นี้พบว่าอยู่ภายใต้การควบคุมของไวเทลโลเจนิค โกนาโดโทรปิน สเตอรอยด์ที่ถูกสร้างภายในรังไข่ในชั้นฟอลลิเคิลในระยะที่โอโอไซด์กำลังอยู่ในระยะการสะสมยolk คือ 17 β เอสตราไดออล (17 β estradiol) ส่วนระยะการเจริญขึ้นสุดท้าย (Final maturation) มาทิวเรชันนัล โกนาโดโทรปิน จะกระตุ้นให้ฟอลลิเคิลสร้างสเตอรอยด์ควบคุมการสุกของไข่ (Maturational steroids) คือ 17 α , 20 β – dihydroxy-4-pregnen-3-one ทำให้ไข่เจริญในขั้นสุดท้าย ส่วนการตกไข่จะเกิดหรือไม่ขึ้นกับระดับของฮอร์โมนควบคุมการตกไข่ (Ovulation hormone) ซึ่งอาจเป็นโพรสตาแกลนดิน (Prostaglandin) ที่ถูกสร้างโดยโกนาโดโทรปิน

โกนาโดโทรปิน รีลิสซิง ฮอร์โมน ถูกสร้างขึ้นจากสมองส่วน nucleus lateralis tuberlis (NLT) มีหน้าที่ส่งเสริมการสร้างโกนาโดโทรปิน โดย Sherwood *et al.* (1983) พบว่า โกนาโดโทรปิน รีลิสซิง ฮอร์โมนที่สกัดจากปลาปาซิฟิก ซัลมอน (Pacific salmon) เป็นฮอร์โมนที่มีโครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 โมเลกุลต่อกันเป็นสายยาว (Decapeptide) ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายกับลูเทียไลซิง ฮอร์โมน รีลิสซิง ฮอร์โมนที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Donaldson and Hunter, 1982; Peter, 1982, 1983) ดังนี้

ตำแหน่งกรดอะมิโน GnRH ของปลา Pacific salmon										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pyr	Glu-	His-	Trp-	Ser-	Tyr-	Gly-	Trp-	Leu-	Pro-	Gly-NH ₂

ตำแหน่งกรดอะมิโน LHRH										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
pyr	Glu-	His-	Trp-	Ser-	Tyr-	Gly-	Leu-	Arg-	Pro-	Gly-NH ₂

การใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ในการเพาะพันธุ์ปลาจะไปกระตุ้นการหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมองไปมีผลต่อการตกไข่และการวางไข่ของปลา ฮอร์โมนสังเคราะห์ซึ่งสร้างเลียนแบบรีลิสซิงฮอร์โมนที่สร้างขึ้นในสมองส่วนไฮโปทาลามัส โดยฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะขยายพันธุ์ปลามี 3 ชนิดได้แก่ LHRHa, GnRHa และ buserelin acetate สำหรับในประเทศไทยนั้นนิยมใช้ฮอร์โมนบูเซเรลิน อะซีเตทมาก ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า suprefact ที่ผลิตขึ้นมาเพื่อใช้ในการรักษาโรคมะเร็งต่อมลูกหมากในคนมีหน่วยเป็นไมโครกรัม เมื่อนำมาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาต้องนำมาใช้ร่วมกับดอมเพอริโดน หรือ โดปามีน แอนตาโกนิส (Dopamin antagonist) ซึ่งช่วยในการยับยั้งการหลั่งของโดปามีน ดอมเพอริโดนมีชื่อทางการค้าว่า โมทีเลียม ผลิตขึ้นมาเพื่อเป็นยาแก้อาเจียนในคน มีหน่วยเป็นมิลลิกรัม เมื่อใช้ร่วมกับฮอร์โมนสังเคราะห์จะทำให้ฮอร์โมนสังเคราะห์ออกฤทธิ์ได้ดีขึ้น (มานพ และคณะ, 2533)

สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน (Cyclodextrins, CDs)

ไซโคลเด็กซ์ตรินเป็นสารประกอบซึ่งมีโมเลกุลน้ำตาลกลูโคไพราโนสจัดเรียงตัวต่อกันเป็นวงแหวน ผลจากการจัดเรียงโมเลกุลเหล่านี้ทำให้ด้านในและด้านนอกของวงแหวนไม่ละลาย

และละลายน้ำ ตามลำดับ ไซโคลเด็กซ์ทรินที่พบโดยทั่วไปมี 3 แบบ คือ α -CDs, β -CDs และ γ -CDs ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาล D-glucopyranose 6, 7 และ 8 โมเลกุล ตามลำดับ ต่อกันเป็นอนุกรม โดยแต่ละอนุกรมเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α -1,4 glycosidic เป็นโมเลกุลรูปร่างแหวนขนาดใหญ่ ไซโคลเด็กซ์ทรินซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลถูกเติมด้วยหมู่เอทิล (Ethylation) จะทำให้ความสามารถในการละลายลดลง ไซโคลเด็กซ์ทรินที่นิยมใช้ในทางเภสัชกรรมชนิดหนึ่งคือเฮปตาคิส [Heptakis-(2,6-di-O-ethyl)- β -cyclodextrins] เป็นไซโคลเด็กซ์ทรินที่มีคุณสมบัติ sustained-release เมื่อนำไปใช้ร่วมกับยาหลายชนิด กลไกการเกิด sustained-release นั้น เป็นผลจากการจับกันเป็นสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างเฮปตาคิสกับสารเป้าหมาย (Guest molecule) ซึ่งทำให้สารเป้าหมายได้แก่ ยาและฮอร์โมนชนิดต่างๆ มีคุณสมบัติละลายน้ำได้น้อยลง แต่จะเกิดคุณสมบัติ sustained-release เนื่องจากสารประกอบเชิงซ้อนมีคุณสมบัติไม่เสถียรซึ่งทำให้เฮปตาคิสและสารเป้าหมายแยกออกจากกันหรือเข้ามาจับกันใหม่ ผลที่ได้จะทำให้สารเป้าหมายบางส่วนมีคุณสมบัติละลายน้ำกลับคืนมา ทำให้สารเป้าหมายบางส่วนละลายน้ำและออกฤทธิ์ที่ละน้อยๆ ไปยังอวัยวะเป้าหมายในระยะเวลายาวนานขึ้น (Sinha *et al.*, 2002)

จากการทดลองใช้เฮปตาคิสเป็นโมเลกุลพาหะให้กับสารบูเซอเรลิน อะซีเตท ซึ่งเป็นอนุพันธ์ของฮอร์โมนเทียโนซึ่ง ฮอร์โมน รีลีสซิง ฮอร์โมน และมีบทบาทในการกระตุ้นการตกไข่ในคนและสัตว์ พบว่าระดับของบูเซอเรลิน อะซีเตท ที่ถูกปลดปล่อยออกจากตัวกลางเข้าสู่กระแสโลหิตขึ้นอยู่กับสารเฮปตาคิสอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทดลองฉีดสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวในหนูทดลองพบว่าสามารถคงระดับบูเซอเรลินอะซีเตทในกระแสเลือดไว้ได้นานอย่างน้อย 1 เดือน (Uekama *et al.*, 1989)

สเปิร์มและน้ำเชื้อปลา

สเปิร์ม (Sperm) ปลาทุกชนิดยกเว้นปลาในกลุ่ม Chondrosteian จะแตกต่างจากสเปิร์มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมตรงไม่มีส่วน acrosome ทั้งนี้เพราะไข่ปลาไม่มีช่อง micropyle ซึ่งเป็นทางผ่านของสเปิร์มอยู่แล้ว สเปิร์มปลาประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก คือ 1) ส่วนหัว (Head) ซึ่งมีนิวเคลียสภายในมีสารพันธุกรรมที่จะไปปฏิสนธิกับไข่ 2) ส่วนกลาง (Mid piece) เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากส่วนหัว ประกอบด้วย microtubule ที่เป็นแกนกลางของส่วนหาง และมี mitochondria เป็นแหล่งสร้างพลังงานให้สเปิร์มเคลื่อนไหว และ 3) ส่วนหาง (Flagellum) ภายในมี microtubule เรียงเป็นวงรอบแกนกลางหาง ทำหน้าที่ให้สเปิร์มเคลื่อนไหว (อุทัยรัตน์, 2538; Psenicka *et al.*, 2007) สเปิร์มปลา

จะไม่เคลื่อนไหวเมื่ออยู่ในอัมตะหรือในท่อน้ำเชื้อ แต่จะเริ่มเคลื่อนไหวหลังจากสเปิร์มถูกปล่อยลงสู่น้ำในระหว่างการผสมพันธุ์วางไข่ หรือน้ำเชื้อถูกเจือจางด้วยน้ำยาบางชนิดในการผสมเทียม กลไกกระตุ้นการเคลื่อนไหวของสเปิร์มมีอยู่ 2 แบบ คือ 1) ความเข้มข้นของโปรตีนเชื่อมอออนซึ่งพบในปลากลุ่ม Salmonidae และ Acipenseridae และ 2) ระดับออสโมลาริตี (Osmolarity) ซึ่งพบในปลาทั่วไป (Billard *et al.*, 1995; Alavi and Cosson, 2006)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาระยะสั้น (Short, Chilled storage)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาระยะสั้น เป็นการเก็บรักษาในตู้เย็นหรือถ้ำน้ำแข็งในอุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียสเล็กน้อย สามารถเก็บได้ในสภาพน้ำเชื้อเข้มข้นหรือเจือจางด้วยสารละลายที่มีความเหมาะสมกับปลาแต่ละชนิด การเก็บรักษาน้ำเชื้อในลักษณะนี้สามารถเก็บได้หรือไม่ขึ้นอยู่กับสารละลายที่ใช้ ชนิดปลา คุณภาพน้ำเชื้อและเทคนิคในการเก็บรักษา

จากการศึกษาของ นลินี และคณะ (2526) ในปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) โดยเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ใช้สารละลาย 5 สูตร ได้แก่ Ringer's solution, NaCl-KHCO₃, sucrose-KHCO₃, minimal medium สำหรับเลี้ยงยีสต์และ sodium metabisulfite มีอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อสารละลายเป็น 1 ต่อ 3 หลังจากการเก็บรักษานาน 96 ชั่วโมง พบว่าสารละลายทุกสูตรให้เปอร์เซ็นต์ตัวสุกมีชีวิตอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักออกเป็นตัวอยู่ระหว่าง 20-68, 1.6-23.7 และ 0-0.25% ตามลำดับ สารละลายที่ให้เปอร์เซ็นต์ตัวสุกมีชีวิตสูงสุด (68%) ได้แก่ sucrose-KHCO₃ และขณะเดียวกันก็ให้อัตราการปฏิสนธิสูงสุด (23.7%) ด้วย แต่อัตราการฟักออกเป็นตัวมีค่าเป็นศูนย์ (0%)

อุทัยรัตน์ (2526) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในอุณหภูมิตู้เย็นเช่นเดียวกัน โดยเก็บในสภาพเข้มข้น และเจือจางด้วยสารละลาย Ringer's solution และ rinsing solution อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายเป็น 5 ต่อ 3 เก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นเวลานาน 24 และ 72 ชั่วโมง จึงนำมาผสมกับไข่สด พบว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในสภาพเข้มข้นมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 73.14 และ 18.25% ตามลำดับระยะเวลาที่เก็บรักษา เปรียบเทียบอัตราปฏิสนธิระหว่างน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในสารละลาย Ringer's solution และ rinsing solution ที่ระยะเวลาเก็บนาน 24 และ 72 ชั่วโมง พบว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาใน Ringer's solution มีอัตราการปฏิสนธิเป็น 80.64 และ 38.68% ตามลำดับ

ระยะเวลาที่เก็บรักษา มีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาด้วยสารละลาย rinsing solution ที่ให้อัตราการปฏิสนธิเป็น 60.17 และ 3.71% ตามลำดับระยะเวลาที่เก็บรักษา

นลินี (2527) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวโดยศึกษาในสารละลาย 16 สูตร อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายเป็น 1 ต่อ 3 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส นาน 24, 28 และ 72 ชั่วโมง ผลจากการศึกษาพบว่าสารละลายสูตรที่ 16 ซึ่งประกอบด้วย KHCO_3 125 mM, sucrose 250 mM และ reduced glutathione 9.75 mM ให้ผลดีกว่าสารละลายสูตรอื่นๆ คือมีเปอร์เซ็นต์ตัวสุจิเคลื่อนไหวเป็น 76, 71 และ 67% ตามลำดับของระยะเวลาที่เก็บรักษา และในสารละลายสูตรเดียวกันนี้ (สูตรที่ 16) ทศนีย์ และคณะ (2529) ก็นำมาใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพา (*Pangasius sanithwongsei*) ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาผสมกับไข่สดให้อัตราการฟักเป็นตัวถึง 92%

Hulata and Rothbard (1979) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*) ในสภาพเข้มข้นและเจือจางในสารละลาย rinsing solution (0.3% urea, 0.4% NaCl) อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายเป็น 5 ต่อ 3 เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส นาน 45 ชั่วโมง เมื่อนำมาผสมกับไข่สดพบว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในสภาพเข้มข้นและเจือจางด้วยสารรักษาสภาพให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด

Withler (1980) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อในสภาพเข้มข้นโดยศึกษาในปลาอีสกเทศ (*Labeo rohita*), ปลาไน (*Cyprinus carpio*), ปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) และปลาซวาย (*Pangasius sutchi*) โดยบรรจุน้ำเชื้อในหลอดฉีดยา เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-9 องศาเซลเซียส ผลจากการศึกษาพบว่าน้ำเชื้อปลาอีสกเทศหลังจากเก็บรักษานาน 23 นาที นำมาผสมกับไข่ มีอัตราการปฏิสนธิ 92% ปลาไนหลังจากเก็บรักษานาน 75, 100 และ 210 นาที มีเปอร์เซ็นต์ตัวสุจิเคลื่อนไหว 100% แต่เมื่อเก็บรักษานาน 24 ชั่วโมง มีตัวสุจิเคลื่อนไหวเพียง 2% ในปลาตะเพียนขาวเก็บนาน 5 ชั่วโมง 30 นาที มีตัวสุจิเคลื่อนไหว 15% และปลาซวายหลังจากเก็บรักษานาน 10, 50 และ 80 นาที มีเปอร์เซ็นต์ตัวสุจิเคลื่อนไหว 10% แต่เมื่อเก็บรักษานาน 18 ชั่วโมง และ 3 วัน มีตัวสุจิเคลื่อนไหว 10 และ 0% ตามลำดับ

ในงานองเดียวกัน Saad *et al.* (1988) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนในระยะสั้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการเคลื่อนไหวของตัวสุจิและอัตราการผสมกับไข่จะสูงในวันที่ 1 และ 2

และจะลดลงเรื่อย ๆ จนเป็น 0 หลังจากเก็บรักษา 6-8 วัน แต่เมื่อเติมยาปฏิชีวนะ (50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร streptomycin + 50 IU bipenicillin) ในสารละลาย พบว่าในการเก็บรักษา 8 วัน อสุจิยังมีการเคลื่อนไหว 100% เมื่อเก็บรักษานานถึง 16 วัน ก็ยังมีอัตราการผสมกับไข่ถึง 20%

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาระยะยาวโดยวิธีแช่แข็ง (Cryopreservation)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาระยะยาวโดยวิธีแช่แข็ง เป็นการรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง โดยทั่วไปจะเก็บในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่สามารถคงสภาพเซลล์สิ่งมีชีวิตไว้ได้ เนื่องจากในช่วงอุณหภูมินี้ทำให้กลไกการทำงานของเซลล์มีอัตราเกือบเป็นศูนย์ หากเซลล์ไม่เกิดความเสียหายขึ้นเสียก่อนในระหว่างขั้นตอนการลดอุณหภูมิ (Wolfe and Bryant, 2001) ตามหลักการแช่แข็งนั้น การลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วและเหมาะสมจะสามารถทำให้สุจิรอดตายในสภาพแช่เยือกแข็งได้ เนื่องจากการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วจะทำให้ น้ำภายในเซลล์ไหลออกไม่ทันอย่างใดก็ตาม การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเกินไปจะทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (Ice crystallization) ขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์เช่นกัน (McAndrew *et al.*, 1993) ดังนั้นการเก็บโดยวิธีนี้ต้องใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อหรือเอ็กซ์เทนเดอร์ (Extender) ซึ่งผสมสารที่ช่วยป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ระหว่างกระบวนการลดอุณหภูมิ สารเหล่านี้เรียกว่า “ไครโอโพรเทคแทนท์” (Cryoprotectant) ได้แก่ glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO), อัลกอฮอล์ และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เป็นต้น สารเหล่านี้จะช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ป้องกันเซลล์เหี่ยว ป้องกันความเสียหายที่เกิดจากการเสียสมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโตรไลต์ และยังสามารถช่วยคงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์อีกด้วย การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งต้องกำหนดระยะเวลาให้เซลล์ปรับตัวกับสารละลาย (Equilibration) กำหนดอัตราการลดอุณหภูมิ ลักษณะหลอดแช่แข็ง ซึ่งถ้ามีการปฏิบัติถูกต้องและเหมาะสมกับปลาแต่ละชนิดแล้ว จะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานหลายปี (กฤษณ์, 2536; นิศา, 2539)

ตั้งแต่ปี 1953-1996 มีรายงานการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งรวม 185 เรื่อง ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการอย่างน้อย 60 ฉบับ เป็นรายงานที่ครอบคลุมการทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งอย่างน้อย 85 ชนิด จาก 35 วงศ์ ซึ่งเป็นตัวแทนจาก 12 อันดับ จากทั้งหมดประมาณ 60 อันดับในปลา ส่วนใหญ่เน้นไปที่ปลาที่สำคัญทางเศรษฐกิจ โดยเป็นปลากลุ่ม salmonids ประมาณ 12 ชนิด ปลากลุ่ม cyprinids 12 ชนิด และกลุ่ม catfish 8 ชนิด ในวงศ์ Clariidae, Heteropneustidae,

Ictaluridae, Pangasiidae และ Siluridae การศึกษาทั้งหมดยังแบ่งได้เป็นกลุ่มปลาน้ำจืด 49% ปลาทะเล 31% ปลาน้ำกร่อย 7% และปลาที่อพยพระหว่างน้ำจืดกับน้ำทะเลอีก 13% (Tiersch, 2000)

ตลอดเวลาที่ผ่านมาประมาณ 40 กว่าปี จึงมีผู้ศึกษาทดลองพัฒนาวิธีการเก็บแช่แข็งน้ำเชื้อปลานชนิดต่าง ๆ ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด เช่นจากการพัฒนาวิธีการของ Mounib *et al.* (1968) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลา Atlantic cod (*Gadus morhua*) โดยใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายเป็น 1 ต่อ 3 ภายหลังการเก็บรักษานาน 60 วัน นำมาผสมกับไข่สดได้อัตราการปฏิสนธิ 36% เมื่อเปรียบเทียบกับการผสมด้วยน้ำเชื้อสดและไข่สดซึ่งได้ 79%

Ott and Horton (1971) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) และ Coho salmon (*O. kisutch*) แบบแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของ manitol และใช้ DMSO เข้มข้น 8% ภายหลังการเก็บแช่แข็งนาน 7 วัน นำน้ำเชื้อออกมาละลายผสมกับไข่สดได้อัตราการปฏิสนธิ 38 และ 79% ตามลำดับ

Mounib (1978) ได้พัฒนาสูตรสารละลายในการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในปลาแซลมอนและคอด (*Salmon salar* และ *Gadus morhua*) ซึ่งในสารละลายดังกล่าวประกอบด้วย KHCO_3 , sucrose และ reduced glutathione และใช้ 12.5% DMSO เป็นสารไครโอโพรเทกแทนท์ สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดี คือมีอัตราการปฏิสนธิเป็น 80 และ 59% ในปลาแซลมอนและคอด ตามลำดับ ซึ่งนลินี (2527) ก็ได้นำสูตรสารละลายของ Mounib (1978) ดังกล่าวมาใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ในตู้เย็นพบว่าน้ำที่ประกอบด้วย KHCO_3 125 mM, sucrose 250 mM และ reduced glutathione 9.75 mM ให้ผลดีกว่าสารละลายสูตรอื่น จึงได้นำมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็ง โดยใช้ DMSO ระดับความเข้มข้น 8 และ 12% ภายหลังการแช่แข็งนาน 2, 3 และ 18 วัน นำน้ำเชื้อออกมาละลายที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส พบว่ามีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว 35.47 ± 4.03 , 28.33 ± 2.64 และ $22.19 \pm 1.61\%$ และมีอัตราการปฏิสนธิ 5.5 ± 0.54 , 14.6 ± 1.31 และ $14.1 \pm 1.03\%$ ตามลำดับเวลาที่เก็บรักษา

จากการศึกษาเบื้องต้นของ Steyn *et al.* (1985) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*) แบบแช่แข็งในสารละลายต่างๆ ได้ผลเป็นที่น่าพอใจคือ น้ำเชื้อที่เก็บในสารละลาย 50% glucose มี 5% glycerol เป็นไครโอโพรเทกแทนท์ ระยะ equilibration time 60 นาที อัตราการลดอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส/นาที หลังจากการเก็บรักษานาน 1, 30 และ 60 วัน ภายหลัง

การละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส อสุจิมีการเคลื่อนไหว 40, 20 และ 20% ตามลำดับเวลาการเก็บรักษา

Steyn and Van Vuren (1987) ได้ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตุกรัสเซียแบบแช่แข็งในอีกสองปีต่อมา โดยใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองในปี ค.ศ.1985 ตามวรรคก่อน ผลจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อนาน 14 วันพบว่า น้ำเชื้อที่เก็บในสารละลายที่มีส่วนผสมของ 11% glycerol ระยะ equilibration time 20 นาที อัตราการลดอุณหภูมิ 11 องศาเซลเซียส/นาที ภายหลังการละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ผสมกับไข่สด ให้อัตราการฟักเป็นตัวสูงสุด 51.2%

Mongkonpunya *et al.* (1992) ได้ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึก (*Pangasianodon gigas* Chevey) แบบแช่แข็งในสารละลายซึ่งประกอบด้วย KHCO_3 , sucrose และ reduced glutathione (1.25, 8.55 และ 0.3 กรัม/100 มิลลิลิตรตามลำดับ) ใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารละลายเป็น 1 ต่อ 3 และใช้ 8% DMSO ทำการลดอุณหภูมิโดยแขวนในไอของไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส นาน 2, 360 และ 540 วัน นำมาละลายที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที นำไปทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อ โดยดูอัตราการผสมกับไข่สดของปลาบึก ปลาสวายแม่น้ำโขง (*Pangasius choncophilus*) และปลาสวาย (*Pangasius sutchi*) ตามลำดับเวลาในการเก็บรักษา ให้ผลการทดลองเป็น 67.7 ± 7.1 , 67.7 ± 0.8 และ $34.7 \pm 5.7\%$ ตามลำดับ

จากการศึกษาของ Linhart *et al.* (1993) ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา European catfish (*Silurus glanis* L.) ในสารละลายที่ประกอบด้วย NaCl 200 mM, Tris 30 mM, pH 7 ใช้ไครโอ-โพรเทคแทนที่เป็น 12 และ 15% glycerol ทำการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อซึ่งเก็บในรูปของ pellets เหนือไอไนโตรเจนเหลว (-80 ถึง -85 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที ก่อนจะเก็บแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) และนำออกมาละลายที่อุณหภูมิ 36 องศาเซลเซียส นาน 20 วินาที ให้อัตราการผสมกับไข่เฉลี่ย 45.2% และอัตราการฟักเป็นตัว 70.6% และเมื่อเปรียบเทียบความสมบูรณ์ของลูกปลาที่ได้จากน้ำเชื้อเก็บแช่แข็งก็ไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด

สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยเริ่มขึ้นในปี 2519 โดยผู้เชี่ยวชาญจากประเทศแคนาดา โดยได้ทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลายชนิด แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากไม่ได้ศึกษาข้อมูลพื้นฐานของปลาแต่ละชนิดมาก่อน (สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, 2519;

Whitler, 1982) ต่อมาอุทัยรัตน์ (2526) ได้ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในสารละลายริงเจอร์ (Ringer's solution) แล้วเก็บรักษาในตู้เย็น พบว่าสามารถเก็บรักษาได้นาน 72 ชั่วโมง มีอัตราผสมกับไข่ 38.68% ขณะเดียวกันนลินี และคณะ (2526) ได้รายงานความล้มเหลวในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวโดยวิธีแช่แข็ง ซึ่งในเวลาต่อมาได้ปรับปรุงวิธีการจนประสบความสำเร็จ (นลินี, 2527) ตั้งแต่นั้นมาจนถึงปัจจุบันมีรายงานการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ปลาสวาย (อนงค์, 2539) ปลาชุกชุม (นิตา, 2539) ปลาบึก (Mongkonpunya *et al.*, 2000) ปลากะพงแดง (วิโรจน์, 2539) การแช่แข็งตัวอ่อนมีรายงาน 1 ฉบับ โดยศึกษาในตัวอ่อนหอยตะไกร (กนกวรรณ และคณะ, 2530)

พลชาติ และ พนม (2546) พัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็งในสัตว์น้ำ 6 ชนิด คือ ปลาไน ปลาตะเพียนขาว ปลาชุกชุม ปลานิล ปลาหมอไทย และกึ่งก้ามกราม จากการศึกษาในปลาไน พบว่าสารละลาย modified Kurokura หรือ modified Cortland เจือจางน้ำเชื้อต่อสารละลายในอัตรา 1 ต่อ 9 และใช้ 10% DMSO เป็นสารไครโอโพรเทกแทนท์ ให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลายที่ 0 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิที่อัตรา 5 องศาเซลเซียส/นาที จาก 0 ถึง -80 องศาเซลเซียส จึงนำไปแช่ในโตรเจนเหลวที่ -196 องศาเซลเซียส ส่งผลต่อประสิทธิภาพน้ำเชื้อปลาไนแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ และระยะเวลาเก็บ ในปลาตะเพียนขาวสายพันธุ์นีโอเมลพบว่า สารละลาย modified Cortland เจือจางน้ำเชื้อต่อสารละลายในอัตรา 1 ต่อ 3 และใช้ 10% DMSO เป็นสารไครโอโพรเทกแทนท์ ให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลายที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิ 2 อัตรา คือ 5 องศาเซลเซียส/นาที จาก 4 ถึง -4 องศาเซลเซียส และ 10 องศาเซลเซียส/นาที จาก -4 ถึง -80 องศาเซลเซียส จึงนำไปแช่ในโตรเจนเหลวที่ -196 องศาเซลเซียส ส่งผลต่อประสิทธิภาพน้ำเชื้อหลังการละลายในระดับต่ำ ในปลาชุกชุมพบว่า น้ำตาลกลูโคส 5% หรือ ฟรุคโตส 6% เจือจางน้ำเชื้อในอัตรา 1 ต่อ 1 และใช้ 10% DMSO เป็นสารไครโอโพรเทกแทนท์ ให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลายที่ 3 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิ 2 อัตรา คือ 4 องศาเซลเซียส/นาที จาก 3 ถึง -4 องศาเซลเซียส และ 11 องศาเซลเซียส/นาที จาก -4 ถึง -80 องศาเซลเซียส แล้วคงไว้ที่ -80 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ก่อนนำไปแช่ในโตรเจนเหลว ส่งผลต่อประสิทธิภาพน้ำเชื้อหลังการละลายในระดับปานกลาง ในปลานิลพบว่า สารละลาย modified Cortland เจือจางน้ำเชื้อต่อสารละลายในอัตรา 1 ต่อ 5 และใช้ 10% DMSO เป็นสารไครโอโพรเทกแทนท์ ให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลายที่ 20 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิในอัตรา 5 องศาเซลเซียส/นาที จาก 20 ถึง -60 องศาเซลเซียส และคงไว้ที่ -60 องศาเซลเซียส นาน 2 นาที ก่อนนำไปแช่ในโตรเจนเหลวที่ ส่งผลต่อประสิทธิภาพน้ำเชื้อปลานิล

แตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ และระยะเวลาเก็บ ในปลาหมอไทยพบว่า สารละลาย Carp#1 เจือจาง น้ำเชื้อต่อสารละลายในอัตรา 1 ต่อ 5 และใช้ 10% DMSO เป็นสารไครโอโพรเทกแทนท์ ให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลายที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิที่ 5 องศาเซลเซียส/นาทิจาก 4 ถึง -80 องศาเซลเซียส แล้วนำไปแช่ในโตรเจนเหลวส่งผลต่อประสิทธิภาพน้ำเชื้อปลาหมอไทยในระดับปานกลาง โดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาละลายมีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว 60% นาน 24 วินาที อย่างไรก็ตาม น้ำเชื้อแช่แข็งเมื่อนำมาละลายของปลาที่ศึกษาทุกชนิดมีอัตราปฏิสนธิต่ำกว่าน้ำเชื้อสด ส่วนในกึ่งก้ำมกรพบที่สามารถพัฒนาวิธีการเก็บถุน้ำเชื้อจากกึ่งเพศเมียได้ แต่การทดสอบผสมเทียมยังไม่ประสบผลสำเร็จ

สารไครโอโพรเทกแทนท์ (Cryoprotectant)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็งนั้น นอกจากการเลือกใช้สารละลายเจือจางน้ำเชื้อและอัตราลดอุณหภูมิและอัตราละลายที่เหมาะสมแล้ว จำเป็นต้องผสมสารบางชนิดลงในสารละลายน้ำเชื้อ สารนี้เรียกว่า “ไครโอโพรเทกแทนท์” สารไครโอโพรเทกแทนท์จะช่วยลดความเสียหายให้กับเซลล์ที่เกิดจากผลึกน้ำแข็งและมีส่วนในการเปลี่ยนคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของน้ำในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง (Leung, 1991) กลุณ (2536) ได้จำแนกสารไครโอโพรเทกแทนท์ออกเป็น 2 ประเภท คือ 1) สารเคมีประเภทออกฤทธิ์ภายในเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้จำต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดขึ้นขณะแช่แข็งและละลาย ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ได้แก่ glycerol, dimethyl sulfoxide (DMSO) และอัลกอฮอล์หลายชนิดเช่น methanol, ethanol, propanediol เป็นต้น ซึ่งสารเคมีพวกนี้จะออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายได้ดีเมื่อใช้ในระดับความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 โมลาร์) ถ้าจะพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ อัลกอฮอล์มีอัตราการแพร่สูงสุด รองลงมาได้แก่ DMSO และ glycerol ตามลำดับ สารเคมีกลุ่มนี้มีข้อเสียอยู่ประการหนึ่งคือเป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ และ 2) สารเคมีประเภทออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ ขณะที่อยู่นอกเซลล์ และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแรก (0.01-0.2 โมลาร์) และเป็นพิษน้อยกว่าด้วย ตัวอย่างสารเคมีกลุ่มนี้ได้แก่ โพลีไวนิลไพโรลิโดน (Polyvinylpyrrolidone, PVP) และน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เช่น sucrose, glucose, manitol เป็นต้น

Stoss and Holtz (1983) ทดลองเพื่อศึกษาผลของ DMSO และระยะเวลา equilibration time (ช่วงเวลาหลังจากผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทกแทนท์ ก่อนทำการแช่แข็ง) ต่ออัตราการรอดของ

น้ำเชื้อปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) โดยใช้ระดับความเข้มข้นของ DMSO ที่ 5, 10, 13.8, 15 และ 20% และ equilibration time ที่เวลา 0, 1, 2, 5 และ 60 นาที ภายหลังการแช่แข็งนำน้ำเชื้อออกมาละลายผสมกับไข่สด พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10% DMSO มีอัตราการปฏิสนธิเฉลี่ยสูงสุด (71%) ในขณะที่ระดับความเข้มข้นอื่น ๆ มีอัตราการปฏิสนธิอยู่ในช่วง 51.1-66.9 %

ในทำนองเดียวกันก่อนที่จะทำการเก็บแช่แข็งน้ำเชื้อของปลานิล (*Oreochromis niloticus*) Rana and Mcandrew (1989) ได้ทำการศึกษาเพื่อทดสอบความเป็นพิษของ methanol และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10, 15, 20, 30 และ 40% ในสารละลาย modified fish ringers ภายหลังการเจือจาง 15 นาที ให้ได้คะแนนการเคลื่อนไหวของอสุจิ (Motility score) ช่วง 0-10 ผลจากการศึกษาพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 40% ของ methanol และ DMSO ไม่มีอสุจิเคลื่อนไหวเลย อสุจิจะมีคะแนนการเคลื่อนไหว 4-5 และ 2-3 ที่ระดับความเข้มข้น 20% ของ methanol และ DMSO ตามลำดับ ซึ่งที่ระดับความเข้มข้น 15% ทั้ง methanol และ DMSO อสุจิจะมีคะแนนการเคลื่อนไหวเท่ากัน (5-6) ส่วนที่ระดับความเข้มข้น 5 และ 10% อสุจิมีคะแนนการเคลื่อนไหวเป็น 8-9 สำหรับ methanol และ 7-8 สำหรับ DMSO แต่เมื่อ Young *et al.* (1992) ใช้สารไครโอโพรเทคแทนที่เป็น 0.75 M methanol, glycerol และ DMSO ภายหลังการละลายน้ำเชื้อปลา *Sillago ciliata* แช่แข็ง พบว่าการใช้ 0.75 M methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนที่ส่งผลให้ไม่มีอสุจิเคลื่อนไหวเลย ในขณะที่ใช้ 0.75 M glycerol และ DMSO อสุจิมีการเคลื่อนไหวเฉลี่ย 41 ± 12 และ $31 \pm 11\%$ ตามลำดับ

ในการทดลองเก็บน้ำเชื้อของปลาตะเพียนขาวของนลินี (2527) และในปลาบึกของ Mongkonpunya *et al.* (1992) โดยการแช่แข็ง (-196 องศาเซลเซียส) ในสารละลายที่มี 250 mM sucrose ร่วมกับ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนที่ ช่วยให้อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิและความสามารถในการผสมกับไข่ได้ดีที่สุด

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินชนิดเฮปตาคิส (Heptakis-(2,6-di-O-ethyl)- β -cyclodextrins, Fluka[®])
2. ฮอร์โมนสังเคราะห์ LHRH des-Gly¹⁰, [D-Ala⁶]-LH-RH (SIGMA[®], U.S.A.) และยาเสริมฤทธิ์ domperidone (Motilium[®]) และอุปกรณ์ที่จำเป็นในการเพาะพันธุ์ปลาโดยการผสมเทียม
3. เอนไซม์โปรเนส (Sigma[®]) และสารละลาย embryo medium 500 มิลลิลิตร
4. สารละลายคงสภาพ Bouin's solution และสารละลายย้อมสีเซลล์และอุปกรณ์ทำสไลด์เนื้อเยื่อตามกระบวนการมีนุษยวิทยา (Histology)
5. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ
6. สารโครีโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ dimethylsulfoxide (DMSO), methanol และ glycerol
7. สารละลายเจือจาง คือ 6% fructose, 5% glucose, Modified fish's Ringer (MFR), Ginsberg fish's Ringer (GFR) และ 0.9% NaCl
8. ยาสลบปลา 2-phenoxyethanol
9. ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (dewar)
10. สไลด์นับเม็ดโลหิต (haemocytometer)
11. อุปกรณ์ลดอุณหภูมิภาคนามแบบใช้ไนโตรเจนเหลว
12. หลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็ง (straw tube)
13. หลอดบรรจุซีรัมแช่แข็ง (cryotube)
14. หลอดเก็บตัวอย่างเลือด (vacuum tube)
15. หลอดพลาสติกฝาเกลียวสำหรับเก็บและผสมน้ำเชื้อ
16. บ่อดินขนาด 600 ตารางเมตร จำนวน 4 บ่อ
17. แม่พันธุ์ปลากดแก้วอายุ 2-3 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 2-3 กิโลกรัม จำนวน 95 ตัว
18. พ่อพันธุ์ปลากดแก้วอายุ 2-3 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 2-3 กิโลกรัม จำนวน 50 ตัว

วิธีการ

การศึกษาแบ่งออกเป็น 4 การทดลอง คือ

1. ผลของสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินต่อการพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ของปลากดแก้ว เพศเมีย

วิธีการและการเตรียมการทดลอง

1. การเตรียมบ่อดิน ใช้บ่อดินขนาด 600 ตารางเมตร จำนวน 3 บ่อ ตกให้แห้งเป็นเวลา 1 สัปดาห์ โรยปูนขาวในอัตรา 25 กิโลกรัม/บ่อ เติมน้ำให้มีระดับน้ำเฉลี่ย 1 เมตร

2. การเตรียมปลากดแก้ว เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากดแก้วอายุ 2-3 ปี ขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 2-3 กิโลกรัม จำนวน 60 คู่ ในบ่อดินขนาด 600 ตารางเมตร ให้อาหารวันละ 2 ครั้ง โดยตอนเช้าให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 30% และตอนเย็นให้อาหารผสม (ประกอบด้วยปลาทะเลสด ปลาปนกากถั่วเหลือง รำละเอียด) โปรตีนไม่ต่ำกว่า 40% ในอัตรา 3% ของน้ำหนักตัวปลา/วัน

3. การเตรียมสารประกอบเชิงซ้อนใช้ฮอร์โมน LHRH คือ des-Gly¹⁰-, [D-Ala⁶]-LH-RH (SIGMA[®], U.S.A.) และสารไซโคลเด็กซ์ทรินคือ เฮปตาคิส (Heptakis-(2,6-di-O-ethyl)- β -cyclodextrins) (Fluka[®], U.S.A.) ในอัตราส่วนฮอร์โมน : เฮปตาคิส เป็น 1 : 100 (w/w) ด้วยวิธี kneading ตามวิธีการของ Tsuruoka *et al.* (1989) โดยผสม LHRH 1 มิลลิกรัม ในเอธานอลเข้มข้น 50 % (v/v) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และเฮปตาคิส 100 มิลลิกรัม ใช้แท่งแก้วขนาดเคล้าส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที ปลอ่ยให้ส่วนผสมแห้งในสภาพมีความดันอากาศที่อุณหภูมิห้องนาน 1 วัน ปั่นส่วนผสมให้เป็นผงและกรองผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh แล้วนำไปผสมกับน้ำมัน arachis ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นฮอร์โมน LHRH เป็น 250 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($\mu\text{g/ml}$) นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส

4. วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ (Randomized Complete Block Design, RCBD) ที่มี 3 ชุดการทดลอง (Treatment) คือ ชุดการทดลองที่ 1 ฉีดฮอร์โมน LHRH-CDs ผสมน้ำมัน arachis, ชุดการทดลองที่ 2 ฉีดฮอร์โมน LHRH ผสมน้ำมัน arachis, ชุดการทดลองที่ 3 ชุด

ควบคุม (ถั่วลิสง *arachis*) โดยใช้ระยะเวลาในการทดลองที่แตกต่างกัน ในช่วงเวลาที่ต่างกัน 3 ช่วง เป็นบล็อก คือ ครั้งที่ 1 ช่วงก่อนฤดูผสมพันธุ์ (เดือนเมษายน), ครั้งที่ 2 ช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์ (เดือนพฤษภาคม) และครั้งที่ 3 ปลายฤดูผสมพันธุ์ (เดือนมิถุนายน) แต่ละชุดการทดลองใช้แม่พันธุ์ จำนวน 5 ตัว ถั่วลิสง *arachis* ที่ผสมฮอร์โมนและสารประกอบเชิงซ้อนตามวิธีการเตรียมในข้อ 3 ให้กับแม่พันธุ์ปลาที่เตรียมในข้อ 2 ในแต่ละชุดการทดลองแต่ละช่วงระยะเวลา ๆ ละ จำนวน 15 ตัว โดยใช้เข็มฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ฉีดเข้าบริเวณกล้ามเนื้อที่ตำแหน่งโคนครีบหลังในอัตรา 30 ไมโครกรัม/ปลา 1 กิโลกรัม ทำเครื่องหมายที่ตัวปลาโดยการฝังไมโครชิพ แล้วปล่อยลงเลี้ยงร่วมกัน ในบ่อดินขนาด 600 ตารางเมตร เป็นระยะเวลา 30 วัน จึงเก็บรวบรวมข้อมูล

การเก็บรวบรวมข้อมูล

1. ศึกษาความสัมพันธ์ของความสมบูรณ์ของรังไข่ (Gonosomatic index, GSI) นำปลาเพศเมีย มาผ่าเก็บรังไข่มาชั่งน้ำหนักนำไปคำนวณค่า GSI ตามวิธีของ Benfey and Sutterlin (1984) จากสูตร

$$\text{ดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์} = \frac{\text{น้ำหนักรังไข่หรืออวัยวะสืบพันธุ์}}{\text{น้ำหนักตัว}} \times 100$$

2. ศึกษาการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ นำเนื้อเยื่อรังไข่ไปตรวจสอบโดยวิธีฮีสโตเคมีด้วยวิธีมิชเชอวียา เพื่อเปรียบเทียบระยะการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ โดยผ่าตัดปลาบริเวณท้องเพื่อเก็บตัวอย่างรังไข่ แล้วนำไปตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1-2 เซนติเมตร แช่ลงในสารละลายของ Bouin's solution (71.43% saturated picric acid, 23.81% formaldehyde, 4.76% glacial acetic acid) นาน 24 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยสารละลายเอทานอลเข้มข้น 70% จากนั้นนำไปศึกษาพัฒนาการของรังไข่ด้วยวิธีทำสไลด์เนื้อเยื่อตาม Humason (1972) โดยนำไปเข้าเครื่อง tissue processor แล้วทำ paraffin embed และตัดรังไข่ตามขวางความหนา 5 ไมครอนที่ส่วนต้น กลาง และส่วนปลายรังไข่ ด้วยเครื่อง microtome นำชิ้นเนื้อเยื่อวางบนสไลด์และย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี Eosin-Haematoxylin แล้วจึงนำไปนับจำนวนเซลล์โอโอไซตส์ระยะต่างๆ จำนวนโอโอไซตส์ที่พบในแต่ละระยะจะคำนวณกลับเป็น 100 เปอร์เซนต์ เพื่อหาค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์เซลล์โอโอไซตส์ระยะต่างๆ ที่พบ โดยดัดแปลงวิธีการของ Groman (1982) ที่แบ่งระยะการพัฒนาของโอโอไซตส์ปลาออกเป็น 6 ระยะ Al-Daham and Bhatti (1979) ที่ศึกษาในปลา *Barbus luteus* Chinabut *et al.* (1991) ที่ศึกษาในปลาควักคาน (*Clarias batrachus*) ภาณุ และคณะ (2539) ที่ศึกษาในปลาควักคาน และปลาตะเพียนขาว และปลานิล โดย Babiker and Ibrahim (1979); Coward and Bromage (1998); Tacon *et al.* (2000) และ Msiska

(2002) ให้เหมาะสมกับการทดลองครั้งนี้ด้วยการแบ่งระยะพัฒนาการของโอโอไซต์ปลากดแก้วโดยใช้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโอโอไซต์เป็นหลักให้เหลือเพียง 4 ระยะ คือระยะเริ่มต้นพัฒนา (Immature oocytes) ระยะกำลังพัฒนา (Maturing oocytes) ระยะปลายของการพัฒนา (Mature oocytes) และระยะไข่ฝ่อ (Atretic oocytes) ตามลำดับ

3. ศึกษาปริมาณฮอร์โมน estradiol ในซีรัม เก็บตัวอย่างเลือดปริมาตร 1 มิลลิลิตร โดยใช้เข็มฉีดยาที่เคลือบ (Rinse) ด้วยสารละลาย heparin เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ดูดเลือดจากเส้นเลือดใหญ่ใต้กระดูกสันหลังที่บริเวณกึ่งกลางด้านข้างคอดหางใส่ลงในหลอด microcentrifuge ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ที่เติมสารยับยั้งการย่อยโปรตีน (Aprotinin) เข้มข้น 1 ยูนิต/มิลลิลิตร เก็บเลือดแช่ในน้ำแข็งควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ประมาณ 4 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเลือดไปแยกเก็บเฉพาะน้ำเลือด (Plasma) โดยนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงในอัตรา 5,000 รอบ/นาที นาน 15 นาที ดูดเฉพาะสารละลายใสหลอดแช่แข็ง (Cryotube) ขนาด 1 มิลลิลิตร นำไปเก็บในไนโตรเจนเหลวแล้วนำไปตรวจวิเคราะห์ระดับฮอร์โมน estradiol ด้วยวิธี Chemiluminescent Microparticle Immunoassay (CMIA) โดยใช้ชุดสำเร็จรูป Architect® Estradiol (Abbott Laboratories, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลค่า GSI, ปริมาณฮอร์โมน estradiol, เพอร์เซ็นต์โอโอไซต์ที่พบในระยะ immature, maturing, mature และ atretic โดยวิธี analysis of variance ตามแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อกสมบูรณ์ แปลงข้อมูลที่มีค่าสังเกตเป็นทศนิยมและเพอร์เซ็นต์ก่อนวิเคราะห์เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายเป็นแบบปกติ (Normal distribution) ด้วยวิธี angular transformation (จรัญ, 2534) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองในแต่ละชุดข้อมูลที่น่ามาวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เพอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

2. ผลของการใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์

วิธีการและการเตรียมการทดลอง

1. การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ปลากดแก้ว เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากดแก้วที่ผ่านการคัดเลือกรุ่นที่ 1 มีอายุ 3 ปี ขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 2-3 กิโลกรัม จำนวน 50 คู่ ในบ่อดินขนาด 600 ตารางเมตร ให้กินอาหารวันละ 2 ครั้ง โดยตอนเช้าให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 30% และตอนเย็นให้อาหารผสม (ประกอบด้วยปลาทะเลสด ปลาป่น กากถั่วเหลือง รำละเอียด) โปรตีนไม่ต่ำกว่า 40% ในอัตรา 3% ของน้ำหนักตัวปลา/วัน ในระหว่างการเลี้ยงเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อเดือนละครั้ง ตรวจสอบความสมบูรณ์เพศของพ่อแม่พันธุ์และแม่พันธุ์เป็นระยะเมื่อเข้าสู่ฤดูวางไข่ คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีความสมบูรณ์เพศที่มีพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์อยู่ระดับเดียวกัน โดยสังเกตจากลักษณะภายนอกและตรวจสอบตัวอย่างไข่จากรังไข่โดยการสอดท่อเข้าไปในรังไข่และดูไข่ออกมาตรวจสอบการกระจายของไข่ วัดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ แม่พันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดลองจะมีส่วนท้องขยายใหญ่และนูน ตีงเพศมีลักษณะกลมมนสีแดง มีการกระจายของไข่สม่ำเสมอและมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ระหว่าง 1.5-1.9 มิลลิเมตร ส่วนลักษณะภายนอกของพ่อแม่พันธุ์มีดังเพศเรียวยาว

2. เตรียมฮอร์โมนและสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทริน ตามวิธีการในข้อ 3 ขั้นตอนวิธีการและการเตรียมการทดลองในการทดลองที่ 1

3. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว วางแผนการทดลองแบบ Independent-Samples T-Test แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 ฉีดฮอร์โมน LHRH ผสมน้ำมัน arachis และชุดการทดลองที่ 2 ฉีดฮอร์โมน LHRH-CDs ผสมน้ำมัน arachis แต่ละชุดการทดลองมี 6 ซ้ำ (เพศเมีย 6 ตัว) โดยใช้ปลากดแก้วพ่อแม่พันธุ์ที่เตรียมในข้อ 1 ที่มีความพร้อมในการผสมเทียมจำนวน 12 คู่ ฉีดฮอร์โมนให้กับพ่อแม่ปลาเข้าที่บริเวณกล้ามเนื้อที่ตำแหน่งโคนครีบล้างครั้งเดียว โดยเพศเมียใช้อัตราความเข้มข้นของฮอร์โมนทั้งสองชุดการทดลอง 30 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และยาเสริมฤทธิ์ domperidone 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ส่วนเพศผู้ฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ LHRH ในอัตรา 10 ไมโครกรัม/น้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และยาเสริมฤทธิ์ domperidone 10 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม แยกพักพ่อแม่พันธุ์ปลาแต่ละตัวในบ่อปูนขนาด 2 x 2 ตารางเมตร นาน 12 ชั่วโมง จึงเริ่มตรวจสอบความพร้อมของแม่พันธุ์ที่พร้อมวางไข่จึงนำมาฉีดไข่และผสมเทียม

โดยวิธีแห้ง ส่วนเพศผู้นำมาเก็บน้ำเชื้อจากพูอันทะแล้วรวมน้ำเชื้อเข้าด้วยกัน (Pooled milt) นำไปเก็บรักษาแบบระยะสั้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อก่อนนำไปผสมเทียม

การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

1. ศึกษาจำนวนแม่ปลาวางไข่ ระยะเวลาวางไข่ และน้ำหนักรังไข่ที่รีดได้

ตรวจสอบความพร้อมวางไข่ของแม่ปลาโดยจับปลาขึ้นมาสังเกตช่องเพศบวมมีสีแดง ท้องมีลักษณะใหญ่ขึ้นและนิ่ม และมีไข่ไหลออกมาเมื่อใช้มือรีดเบา ๆ ที่ท้อง เมื่อแม่ปลาวางไข่ บันทึกจำนวนแม่ปลาที่วางไข่ ช่วงเวลาที่แม่ปลาแต่ละตัววางไข่หลังจากฉีดฮอร์โมน (Latency period) และนำไข่ปลาที่รีดได้ไปชั่งน้ำหนักเป็นกรัม

2. ศึกษาอัตราปฏิสนธิและอัตราการฟัก สุ่มตัวอย่างไข่ของแม่ปลาแต่ละตัวโดยวิธีการตวงจำนวน 1,000-2,000 ฟอง นำไปโรยในแผงฟัก ศึกษาอัตราปฏิสนธิโดยนับจำนวนไข่ทั้งหมด พร้อมกับนับจำนวนไข่เสียและคัดไข่ที่เสียออกจากแผงฟัก เมื่อลูกปลาฟักออกเป็นตัวนับจำนวนลูกปลาทั้งหมดเพื่อศึกษาอัตราการฟัก คำนวณค่าอัตราปฏิสนธิและอัตราการฟัก โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราปฏิสนธิ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่เจริญถึงขั้น gastrula} \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}}$$

$$\text{อัตราการฟัก (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนลูกปลาที่นับได้} \times 100}{\text{จำนวนไข่ที่ผสม}}$$

นำข้อมูลระหว่างปลา 2 กลุ่ม มาทดสอบความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ทำการแปลงข้อมูลที่มีค่าสังเกตเป็นทศนิยมและเปอร์เซ็นต์ก่อนวิเคราะห์เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายเป็นแบบปกติ (Normal distribution) ด้วยวิธี angular transformation (จริญ, 2534) โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

3. ศึกษาพัฒนาการของคัพพะและลูกปลาวัยอ่อน

ดำเนินการเพาะพันธุ์ปลาคัดแก้วโดยวิธีฉีดฮอร์โมนผสมเทียม แล้วตัดไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิที่มีลักษณะสมบูรณ์จำนวน 200 ฟอง นำไปล้างสารเหนียวและลอกเปลือกไข่ออกโดยใช้เทคนิคที่ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Westerfield (2007) โดยดูดไข่จำนวน 25 ฟองใส่ลงในเพลทวุ้น (2% agar) เติมสารละลายเอนไซม์โปรเนส (Pronase) เข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จนท่วมไข่ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 28.5 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที จากนั้นล้างเอนไซม์โปรเนสออกจากเพลทโดยดูดสารละลายเอนไซม์ทิ้งแล้วเติม embryo medium (5 mM NaCl, 0.17 mM KCl, 0.33 mM CaCl₂, 0.33 mM MgSO₄, 0.00001% (w/v) methylene blue) ในปริมาณเท่ากับสารละลายเอนไซม์นาน 1 นาที แล้วจึงดูดสารละลายทิ้ง ทำการล้างซ้ำโดยเติม embryo medium ใส่เพลทไข่อีก 3-4 ครั้ง จนกระทั่งส่วนที่เป็นสารเหนียวและเปลือกไข่หลุดออกมาจากตัวอ่อน จากนั้นนำไปบันทึกภาพการพัฒนาการของไข่จนฟักเป็นตัวอ่อน โดยใช้กล้อง stereomicroscope และศึกษาการพัฒนาการของตัวอ่อนจนมีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัย ตามรายงานของอภิชาติ (2546)

4. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคัดแก้วโดยวิธีแช่แข็ง

วิธีการและการเตรียมการทดลอง

ใช้พ่อพันธุ์ปลาคัดแก้วที่ได้รับการปรับปรุงพันธุ์โดยวิธีการคัดเลือกโดยคุณลักษณะตัวเอง (mass selection) รุ่นที่ 1 ที่เตรียมในการทดลองที่ 2 นำมาเก็บน้ำเชื้อจากพูอัณฑะโดยฉีดฮอร์โมน LHRH ร่วมกับ domporidone ในอัตรา 10 ไมโครกรัม และ 10 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ พักปลาไว้ในบ่อปูนนาน 12 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาทำให้สลบโดยแช่ปลาในสารละลาย 2-phenoxyethanol เข้มข้น 100 ppm นานจนกระทั่งปลาสลบ ใช้มีดผ่าตัดผ่าท้องตามยาว ใช้คีมคีบและกรรไกรผ่าตัดคีบตัดอัณฑะปลาคัดแก้วซึ่งมีลักษณะเป็นพูสีขาว 2 พูติดอยู่บริเวณผนังช่องท้อง ด้านบนออกจากตัวปลา นำพูอัณฑะที่ได้เก็บแช่ไว้ในสารละลาย 0.9% NaCl และทำความสะอาดโดยซักคราบเลือดและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออก เก็บน้ำเชื้อโดยตัดพูอัณฑะให้เป็นชิ้นเล็กใส่ลงในถุงพลาสติกที่เติมสารละลายเจือจางปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วกดและบดชิ้นพูอัณฑะในถุงพลาสติกให้น้ำเชื้อไหลออกจากพูอัณฑะแล้วจึงดูดสารละลายน้ำเชื้อจากถุงพลาสติกไปกรองบนผ้าโอลอนแก้วแล้วดูดใส่หลอดเก็บน้ำเชื้อขนาด 50 มิลลิลิตร ที่แช่ในน้ำแข็ง นำสารละลายน้ำเชื้อที่ได้ตรวจสอบประสิทธิภาพดังต่อไปนี้

1. จำนวนสเปิร์มต่อหน่วยปริมาตร (Sperm count) (ดัดแปลงจากวิธีการของกฤษณ์, 2536)

เจือจางน้ำเชื้อสดด้วยสารละลายในอัตราเจือจาง 400 เท่า คูดสารละลายน้ำเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร ใส่ลงบนสไลด์นับเม็ดโลหิต (Haemocytometer) ที่ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ออกแบบมาใช้กับสไลด์นับเม็ดโลหิต ทิ้งไว้นาน 10 นาทีเพื่อให้สเปิร์มทุกเซลล์จมลงบนพื้นสไลด์ นับเซลล์สเปิร์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า โดยนับจำนวนสเปิร์มในช่องใหญ่ซึ่งประกอบด้วยช่องเล็ก 16 ช่อง ทั้ง 4 มุม และนับช่องตรงกลาง 1 ช่อง รวมทั้งสิ้น 5 ช่องใหญ่หรือ 80 ช่องเล็ก นำมาคำนวณหาจำนวนสเปิร์มต่อมิลลิลิตรจากสูตร

จำนวนสเปิร์ม/มิลลิลิตร = จำนวนสเปิร์มรวมจาก 5 ช่องใหญ่ x อัตราเจือจางน้ำเชื้อ x 10,000*
(* คือค่าสัดส่วนปริมาตรเทียบเท่าปริมาตรน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร)

2. ปริมาณและระยะเวลาสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (ดัดแปลงจากวิธีการของกฤษณ์, 2536)

วางสไลด์บนกล้องจุลทรรศน์ หยดสารละลายกระตุ้นการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม (Fertilization solution; 68.45 mM NaCl, 50 mM Urea, pH 7.0) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงบนสไลด์ คูดน้ำเชื้อปริมาตร 2 ไมโครลิตร แตะลงบนสไลด์ใกล้หยดสารละลาย จากนั้นลากหยดสารละลายสมกับหยดน้ำเชื้อเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนไหวแล้วมองผ่านกล้องจุลทรรศน์พร้อมทั้งเริ่มจับเวลาหน่วยเป็นวินาที นับตั้งแต่สเปิร์มไม่ต่ำกว่า 25% เคลื่อนไหวและหยุดนับเวลาเมื่อสเปิร์มมากกว่า 75% หยุดนิ่ง บันทึกภาพสเปิร์มที่เคลื่อนไหวไปนับจำนวนสเปิร์มที่เคลื่อนไหวและหยุดนิ่ง แล้วนำไปคำนวณหาปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

รีดไข่ปลาสดแก้ว โดยนำแม่ปลาที่ตรวจสอบแล้วว่าไม่มีไข่แก่มาฉีดฮอร์โมน LHRH ร่วมกับ domporidone ในอัตรา 30 ไมโครกรัม และ 10 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ตามลำดับ พักแม่ปลาไว้นาน 12-16 ชั่วโมง เมื่อตรวจสอบพบว่าแม่ปลาพร้อมวางไข่ นำมารีดไข่ใส่ในกะละมังพลาสติกที่แห้งและสะอาด นำน้ำเชื้อและไข่ปลาสดแก้วที่จะใช้เปรียบเทียบประสิทธิภาพน้ำเชื้อโดยวิธีผสมเทียม มาทำการศึกษาดังนี้

1. สารละลายเจือจางสูตรที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดแก้ว

นำน้ำเชื้อสดจากปลาแต่ละตัวในปริมาณเท่ากันมาผสมรวมกันเป็นน้ำเชื้อรวม (Pooled sperm) แล้วนำไปผสมกับสารละลาย 3 สูตร คือ

1.1 Ginsberg fish's Ringer (GFR) (180.12 mM NaCl, 3.74 mM KCl, 2.55 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.64 mM NaHCO_3 , pH 7.6)

1.2 Modified fish's Ringer (MFR) (111.23 mM NaCl, 40.24 mM KCl, 2.04 mM $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.38 mM NaHCO_3 , pH 7.8)

1.3 0.9% NaCl (0.154 M NaCl, pH 7.0)

ผสมสารละลายลงในน้ำเชื้อในอัตราน้ำเชื้อ : สารละลาย เป็น 1:2 ใส่ในหลอดทดสอบขนาด 50 มิลลิลิตร เติมยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin ให้มีความเข้มข้น 50 IU/มิลลิลิตร และ 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ใช้แผ่นอลูมิเนียมฟอยล์ปิดฝาหลอดทดสอบเพื่อป้องกันน้ำและช่วยให้อากาศผ่านเข้าออกได้ นำไปเก็บรักษาแบบระยะสั้นในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยนำหลอดออกมาเขย่าเบา ๆ ให้น้ำเชื้อที่ตกตะกอนและสารละลายกระจายตัววันละ 3 ครั้ง วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design, CRD) แบ่งสารละลายน้ำเชื้อเป็น 3 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 น้ำเชื้อที่ผสมสารละลาย GFR, ชุดการทดลองที่ 2 น้ำเชื้อที่ผสมสารละลาย MFR และชุดการทดลองที่ 3 น้ำเชื้อที่ผสมสารละลาย 0.9% NaCl ตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวหลังจากถูกกระตุ้นด้วย fertilization solution ของสารละลายน้ำเชื้อแต่ละชุดการทดลอง ณ เวลาหลังผสมสารละลายทันที (0 ชั่วโมง) และทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 144 ชั่วโมง (6 วัน)

วิเคราะห์ความแปรปรวนของปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวในแต่ละระยะเวลา โดยวิธี analysis of variance แปลงข้อมูลที่มีค่าสังเกตเป็นเปอร์เซ็นต์ก่อนวิเคราะห์เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายเป็นแบบปกติด้วยวิธี angular transformation (จริญ, 2534) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

2. ชนิดของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคัดแก้ว

นำน้ำเชื้อผสมกับสารละลายเจือจางในหลอดทดสอบและผสมสารโครีโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ methanol, dimethyl sulfoxide (DMSO) และ glycerol ให้มีความเข้มข้น (v/v) สูงท้าย 6 ระดับ คือ 2, 5, 10, 15, 20 และ 25% เมื่อผสมสารโครีโอโพรเทคแทนท์ลงในสารละลายน้ำเชื้อในหลอดทดสอบเสร็จแล้วจะนำไปแช่ในน้ำแข็งตลอดการทดลอง เก็บข้อมูลโดยตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 3 ระยะเวลา คือ 0 นาที (หลังผสมทันที) 30 นาที และ 120 นาที โดยวางแผนการทดลองแบบ 3 x 6 แฟกทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (3 x 6 Factorial in Completely Randomized Design) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของอิทธิพลจากชนิดของสารโครีโอโพรเทคแทนท์และความเข้มข้นที่แตกต่างกัน และอิทธิพลร่วมต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวในแต่ละระยะเวลาโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน แปลงข้อมูลที่มีค่าสังเกตเป็นเปอร์เซ็นต์ก่อนวิเคราะห์เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายเป็นแบบปกติด้วยวิธี angular transformation (จริญ, 2534) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

3. อัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคัดแก้ว

ผสมน้ำเชื้อปลาคัดแก้วด้วยสารละลายแตกต่างกัน 3 สูตร และผสมสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่วิเคราะห์แล้วว่าเหมาะสมที่สุดจากการทดลองที่ 1 และ 2 ลงในสารละลายน้ำเชื้อจนมีความเข้มข้นสูงท้ายที่ 10% (v/v) คูณสารละลายน้ำเชื้อปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดบรรจุน้ำเชื้อแช่แข็ง (Straw) ขนาด 0.5 มิลลิลิตร ปล่อยให้สารโครีโอโพรเทคแทนท์ซึมเข้าสู่เซลล์สเปิร์มจนสมบูรณ์ (Equilibration) โดยวางหลอดบนน้ำแข็งนาน 15 นาที แล้วจึงนำตัวอย่างไปแช่แข็งโดยใช้ไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen vapor) โดยเติมไนโตรเจนเหลวลงในกล่องโฟม (Styrofoam box) ขนาด 16 x 29 x 15 เซนติเมตร ที่เติมไนโตรเจนเหลวปริมาตร 930 มิลลิลิตร นำหลอดตัวอย่างวางบนแผ่นพลาสติกทนความเย็นที่ออกแบบให้มีที่วางหลอดแช่แข็งห่างจากผิวไนโตรเจนเหลวได้ 3 ระดับ แล้วจึงนำแผ่นพลาสติกวางลงในกล่องโฟมซึ่งจะทำให้หลอดตัวอย่างที่วางแตกต่างกัน 3 ระดับ มีอัตราลดอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 อัตรา คือ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที ดำเนินการแช่แข็งน้ำเชื้อโดยปิดฝากล่องโฟมนาน 20 นาที ซึ่งจะทำให้น้ำเชื้อถูกแช่แข็งโดยมีอุณหภูมิ

อยู่ในช่วง -60 ถึง -80 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำตัวอย่างออกจากกล่องโฟมนำไปเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ในถังเก็บตัวอย่าง (Dewar) ต่อไป

หลังจากเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งในถังเก็บตัวอย่างนาน 1 วัน จะนำออกมาละลายในน้ำอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 วินาที เก็บข้อมูลโดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งจากการใช้อัตราลดอุณหภูมิทั้ง 3 ระดับ และสารละลาย 3 สูตร ที่ละลายไปตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว โดยวางแผนการทดลองแบบ 3×3 แฟกทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (3×3 Factorial in Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาในช่วงระยะเวลา 4 ระยะ คือ 1, 7, 42 และ 365 วัน

วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวด้วยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน แปลงข้อมูลที่มีค่าสังเกตเป็นเปอร์เซ็นต์ก่อนวิเคราะห์เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายเป็นแบบปกติด้วยวิธี angular transformation (จริญ, 2534) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

4. ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลาคัดแก้วที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในระยะเวลาต่าง ๆ

เปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลาคัดแก้วระหว่างน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บไว้ในระยะเวลานาน 365 วัน นำมาละลายกับน้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วยสารละลายและอัตราเจือจางแบบเดียวกันนำไปผสมเทียมกับไข่ที่รีดได้จากแม่ปลาคัดแก้ว วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติของค่าอัตราปฏิสนธิและอัตราการฟักโดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน แปลงข้อมูลที่มีค่าสังเกตเป็นเปอร์เซ็นต์ก่อนวิเคราะห์เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายเป็นแบบปกติด้วยวิธี angular transformation (จริญ, 2534) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลและวิจารณ์

ผล

1. ผลของสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินต่อพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ของปลาอดแก้วเทศเมีย

การทดลองฉีดฮอร์โมน LHRH ในรูปแบบต่างกันให้กับแม่ปลาอดแก้วในช่วงเวลาที่มีความสมบูรณ์เพศแตกต่างกัน หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 30 วัน จึงนำมาศึกษาค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ ปริมาณฮอร์โมน estradiol และพัฒนาการของโอโอไซต์ปลาอดแก้วในระยะต่าง ๆ ดำเนินการ 3 ครั้ง ในช่วงเวลาดังนี้

ครั้งที่ 1 เริ่มดำเนินการทดลองวันที่ 23 เมษายน 2550 เป็นช่วงเริ่มต้นฤดูผสมพันธุ์ซึ่งแม่ปลาเริ่มมีความสมบูรณ์เพศ จากการตรวจสอบแม่ปลาในช่วงที่เริ่มทดลองจำนวน 5 ตัว พบว่ามีน้ำหนักเฉลี่ย 1.7 ± 0.05 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 58.8 ± 0.45 เซนติเมตร ค่าค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์เฉลี่ย 7.6 ± 0.62 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณฮอร์โมน estradiol เฉลี่ย 142.6 ± 179.82 พิโคกรัม/มิลลิลิตร (pg/ml) ความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยของแม่ปลาอดแก้วที่เริ่มทดลองแสดงในตารางที่ 1

ครั้งที่ 2 เริ่มดำเนินการทดลองวันที่ 16 พฤษภาคม 2550 เป็นช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์ซึ่งแม่ปลาเริ่มมีความสมบูรณ์เพศปานกลาง จากการตรวจสอบแม่ปลาในช่วงที่เริ่มทดลองจำนวน 5 ตัว พบว่าแม่ปลาเริ่มมีน้ำหนักเฉลี่ย 1.8 ± 0.16 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 59.8 ± 3.90 เซนติเมตร ค่าค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์เฉลี่ย 8.5 ± 1.93 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณฮอร์โมน estradiol เฉลี่ย 495.4 ± 164.63 พิโคกรัม/มิลลิลิตร ความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยของแม่ปลาอดแก้วที่เริ่มทดลองแสดงในตารางที่ 1

ครั้งที่ 3 เริ่มดำเนินการทดลองวันที่ 20 มิถุนายน 2550 เป็นช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์ เป็นช่วงที่ปลาอดแก้วมีความสมบูรณ์เพศสูง จากการตรวจสอบแม่ปลาในช่วงที่เริ่มทดลองจำนวน 5 ตัว มีน้ำหนักเฉลี่ย 1.6 ± 0.12 กิโลกรัม ความยาวเฉลี่ย 56.1 ± 0.89 เซนติเมตร ค่าค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์เฉลี่ย 9.1 ± 0.73 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณฮอร์โมน estradiol เฉลี่ย $2,486.4 \pm 1,410.33$ พิโคกรัม/มิลลิลิตร ความยาวและน้ำหนักเฉลี่ยของแม่ปลาอดแก้วที่เริ่มทดลองแสดงในตารางที่ 1

1.1 ผลของฮอร์โมน LHRH ในรูปแบบแตกต่างกันต่อค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (GSI) และปริมาณฮอร์โมน estradiol

ผลการทดลองฉีดฮอร์โมน LHRH เปรียบเทียบกับฮอร์โมนสังเคราะห์ผสมสารประกอบเชิงซ้อนไฮโคเลเด็กซ์ตริน LHRH-CDs และชุดควบคุม จำนวน 3 ช่วงการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำแม่ปลาสดตัวไปตรวจสอบค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์และปริมาณฮอร์โมน estradiol ใน plasma พบว่า ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์และปริมาณฮอร์โมน estradiol ของแม่ปลาสดตัวที่ได้รับฮอร์โมนในแต่ละชุดการทดลองและชุดควบคุมไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่ใน 3 ช่วงเวลาของการทดลองมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) โดยค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์เฉลี่ยของแม่ปลาสดตัวในช่วงปลายของฤดูผสมพันธุ์มีค่าสูงกว่าช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์ แต่ไม่แตกต่างจากช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์ และช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์ไม่แตกต่างจากช่วงต้นฤดูผสมพันธุ์ และปริมาณฮอร์โมน estradiol ในช่วงต้นและช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งให้ค่าไม่แตกต่างกัน มีปริมาณฮอร์โมน estradiol มากกว่าช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์ (ตารางที่ 1)

1.2 ผลของฮอร์โมน LHRH ในรูปแบบแตกต่างกันต่อพัฒนาการของรังไข่แม่ปลาสดตัว

ผลการทดลองฉีดฮอร์โมน LHRH เปรียบเทียบกับฮอร์โมนสังเคราะห์ผสมสารประกอบเชิงซ้อนไฮโคเลเด็กซ์ตริน LHRH-CDs และชุดควบคุม จำนวน 3 ช่วงการทดลอง ต่อพัฒนาการของรังไข่ปลาสดตัว เมื่อสิ้นสุดการทดลองนำรังไข่ปลาสดตัวไปศึกษาการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ทางมิวซิววิทยาและได้จำแนกโอโอไซต์ที่พบออกเป็นระยะต่าง ๆ 5 ระยะ ดังแสดงในภาพที่ 1 โดยมีรายละเอียด คือ

1.2.1 ระยะ oogonia ระยะนี้ oogonia มีขนาดเล็กมีรูปร่างกลมรี มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 12-13 ไมครอน ไฮโดพลาสซึมล้อมติดสีชมพูอ่อนเมื่อย้อมด้วย H&E นิวเคลียสมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 7-8 ไมครอน ย้อมติดสีเช่นเดียวกับไฮโดพลาสซึม oogonia มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มเซลล์ที่บริเวณขอบของ lamellae ของรังไข่ (ภาพที่ 1-1)

1.2.2 ระยะ immature oocyte โอโอไซต์ระยะนี้มีขนาดใหญ่ขึ้นมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 35-90 ไมครอน เซลล์โอโอไซต์มีรูปร่างไม่แน่นอนอาจมีรูปร่างกลมหรือเป็นรูปเหลี่ยม ไฮโดพลาสซึมติดสีน้ำเงินเข้มเมื่อย้อมด้วยสีย้อม H&E นิวเคลียสมีลักษณะกลมล้อมติดสีชมพูอ่อน

มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 13-35 ไมครอน ภายในนิวเคลียสมีนิวคลีโอลัสกระจายอยู่ โดยรอบเซลล์โอโอไซค์พบว่า follicle cells หุ้มอยู่ (ภาพที่ 1-2)

1.2.3 ระยะ maturing oocyte โอโอไซค์ระยะนี้มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่าโอโอไซค์ระยะ immature oocyte โดยโอโอไซค์มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 120-470 ไมครอน (ภาพที่ 1-3) ไซโทพลาสตมติดสีน้ำเงินจางกว่าโอโอไซค์ระยะ immature เมื่อย้อมด้วยสีย้อม H&E ภายในจะพบว่าเริ่มมีการสะสม fat vacuoles และ yolk granules ขนาดเล็กจำนวนมาก นิวเคลียสเป็นรูปกลมรี ย้อมติดสีชมพูอ่อน มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 48-130 ไมครอน มีนิวคลีโอลัสอยู่ที่ผนังของนิวเคลียส เริ่มพบว่ามีชั้น zona radiata อยู่ใต้ follicle cells ที่มีรูปร่างเป็นรูปกระสวยจนถึงเป็นรูปสี่เหลี่ยมทรงเตี้ยโดยมีนิวเคลียสรูปร่างกลมเห็นชัดเจน (ภาพที่ 1-4)

1.2.4 ระยะ mature oocyte โอโอไซค์ระยะนี้จะมีขนาดใหญ่ที่สุด โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.9-2.2 มิลลิเมตร ภายในไซโทพลาสตมจะเต็มไปด้วย fat vacuoles และ yolk granules ขนาดใหญ่จำนวนมาก ติดสีชมพูเข้มเมื่อย้อมด้วยสีย้อม H&E นิวเคลียสรูปร่างไม่แน่นอน เนื่องจากผนังนิวเคลียสถูกเบียดโดย fat vacuoles และ yolk granules โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100-110 ไมครอน และพบนิวคลีโอลัสอยู่ที่ผนังนิวเคลียส เห็นชั้น zona radiata ชัดเจน follicle cells มีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมทรงสูงมองเห็นขอบเขตของนิวเคลียสไม่ชัดเจน (ภาพที่ 1-5)

1.2.5 ระยะ atretic oocyte โอโอไซค์ระยะนี้เป็นระยะที่ต่อจาก mature oocyte ซึ่งเป็นระยะที่โอโอไซค์สลายตัวเองหลังจากมีการพัฒนาเต็มที่แล้วยังไม่ถูกปล่อยออกมาอีกครั้งเพื่อทำการผสมโอโอไซค์จะมีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในไซโทพลาสตมพบว่า yolk granules จะสลายตัวรวมกันเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่พบนิวเคลียสชั้น zona radiata ส่วน follicle cells มีการเปลี่ยนรูปร่างโดยเซลล์ขยายตัวใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 1-6)

ผลการเปรียบเทียบระยะการพัฒนาของโอโอไซค์ที่พบในระยะ immature, maturing, mature และ atretic ระหว่างชุดการทดลองและระหว่างช่วงการทดลองพบว่า แม่ปลาตกแก้วที่ได้รับฮอร์โมนในแต่ละชุดการทดลองและชุดควบคุมมีการพัฒนาของโอโอไซค์ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) แต่ช่วงเวลาของการทดลองมีผลให้การพัฒนาของโอโอไซค์ในระยะ immature และ mature แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยพบโอโอไซค์ในระยะ immature นี่มากที่สุดในช่วงต้น และช่วงปลายของฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งมากกว่าช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และพบ

โอโอไฮด์ในระยะ mature นี้น้ำหนักที่สุดในช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์มากกว่าช่วงต้นและช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ส่วนการพัฒนาของโอโอไฮด์ในระยะ maturing และ atretic ของแม่ปลาตกแก้ว พบว่าฮอร์โมนและช่วงเวลาของการทดลองมีผลให้พัฒนาของโอโอไฮด์ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 1 ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ (GSI) และผลการวัดระดับฮอร์โมน estradiol ใน plasma

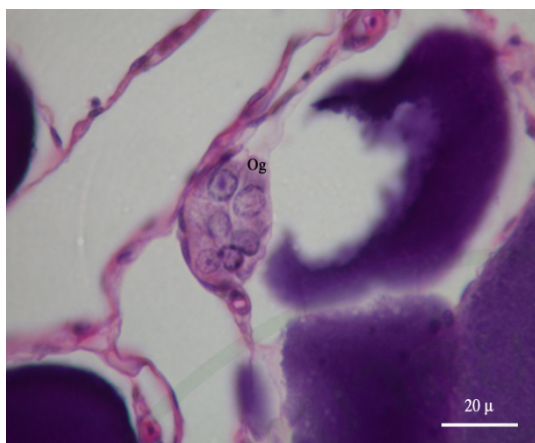
ช่วงการทดลอง	ชุดการทดลอง	ความยาวเฉลี่ย (เซนติเมตร)	น้ำหนักเฉลี่ย (กิโลกรัม)	GSI (%)	estradiol (pg/ml)
1	LHRH-CDs	64.4 ± 1.52	2.2 ± 0.17	8.9 ± 1.92^{ABa}	$1,301.6 \pm 447.4^{Aa}$
	LHRH	63.2 ± 3.89	2.1 ± 0.32	6.7 ± 2.14^{ABa}	850.6 ± 369.65^{Aa}
	Control	61.0 ± 2.00	2.0 ± 0.13	7.3 ± 1.85^{ABa}	821.2 ± 650.23^{Aa}
2	LHRH-CDs	64.6 ± 1.56	2.3 ± 0.17	6.6 ± 1.41^{Ba}	$1,156.0 \pm 604.98^{Aa}$
	LHRH	63.0 ± 2.67	2.3 ± 0.13	8.0 ± 1.69^{Ba}	$1,198.4 \pm 476.23^{Aa}$
	Control	64.7 ± 1.47	2.3 ± 0.17	6.9 ± 1.43^{Ba}	$1,253.2 \pm 259.89^{Aa}$
3	LHRH-CDs	58.6 ± 4.28	1.8 ± 0.20	9.8 ± 0.70^{Aa}	$1,690.0 \pm 572.29^{Ba}$
	LHRH	58.8 ± 1.96	1.8 ± 0.17	8.8 ± 2.25^{Aa}	$1,426.4 \pm 697.82^{Ba}$
	Control	56.1 ± 3.36	1.6 ± 0.15	7.9 ± 1.25^{Aa}	$1,659.2 \pm 272.78^{Ba}$

หมายเหตุ อักษรตัวพิมพ์ใหญ่และอักษรตัวพิมพ์เล็กในแนวตั้งแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างช่วงของการทดลองและชุดการทดลองตามลำดับ

ตารางที่ 2 ระยะการพัฒนของโอโอไซด์ที่พบในระยะ immature, maturing, mature และ atretic

ช่วงการทดลอง	ชุดการทดลอง	ระยะพัฒนาการของโอโอไซด์ (%)			
		immature	maturing	mature	atretic
1	LHRH-CDs	56.9 ± 8.08^{Aa}	18.8 ± 5.53^{Aa}	22.3 ± 8.35^{Aa}	2.0 ± 1.52^{Aa}
	LHRH	72.6 ± 8.18^{Aa}	9.8 ± 6.14^{Aa}	10.4 ± 3.88^{Aa}	7.2 ± 4.05^{Aa}
	Control	67.7 ± 8.13^{Aa}	14.1 ± 8.35^{Aa}	16.6 ± 1.43^{Aa}	2.4 ± 1.28^{Aa}
2	LHRH-CDs	55.6 ± 15.04^{Ba}	14.6 ± 6.44^{Aa}	25.7 ± 9.99^{Ba}	4.13 ± 1.44^{Aa}
	LHRH	55.7 ± 7.97^{Ba}	17.8 ± 3.12^{Aa}	23.8 ± 8.41^{Ba}	2.68 ± 2.46^{Aa}
	Control	57.9 ± 8.98^{Ba}	13.8 ± 6.29^{Aa}	26.9 ± 7.05^{Ba}	1.39 ± 1.02^{Aa}
3	LHRH-CDs	68.8 ± 7.68^{Aa}	10.6 ± 3.51^{Aa}	16.1 ± 4.41^{Aa}	4.6 ± 3.04^{Aa}
	LHRH	54.1 ± 10.60^{Aa}	25.7 ± 7.04^{Aa}	18.8 ± 5.36^{Aa}	1.6 ± 1.18^{Aa}
	Control	73.4 ± 10.59^{Aa}	10.3 ± 6.45^{Aa}	14.1 ± 3.25^{Aa}	3.3 ± 3.41^{Aa}

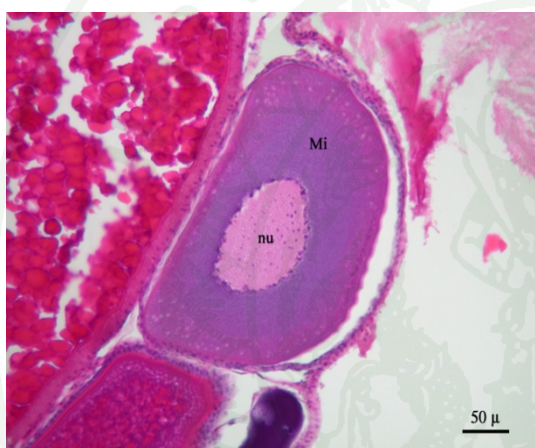
หมายเหตุ อักษรตัวพิมพ์ใหญ่และอักษรตัวพิมพ์เล็กในแนวตั้งแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างช่วงของการทดลองและชุดการทดลองตามลำดับ



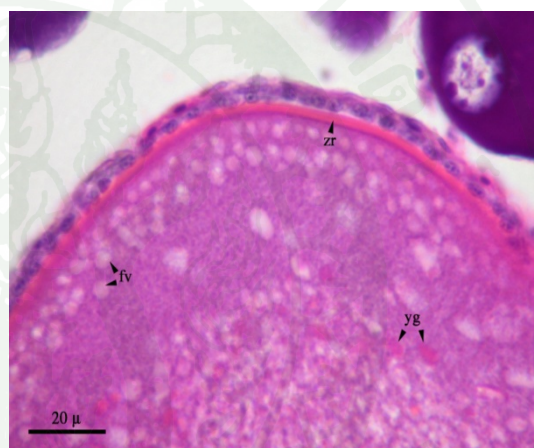
1-1 กลุ่มเซลล์ Oogonia (Og)



1-2 เซลล์โอโอไซต์ระยะ Immature oocyte (Im)



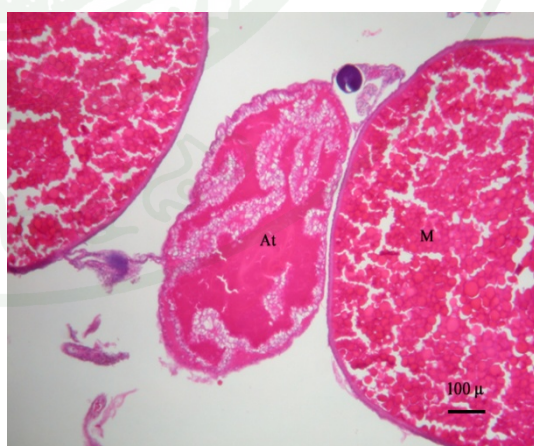
1-3 เซลล์โอโอไซต์ระยะ Maturing oocyte (Mi)



1-4 fat vacuoles (fv), yolk granules (yg) และ zona radiata (zr) รอบเซลล์โอโอไซต์



1-5 เซลล์โอโอไซต์ระยะ Mature oocyte (M)



1-6 เซลล์โอโอไซต์ระยะ Atretic oocyte (At)

ภาพที่ 1 การพัฒนาของโอโอไซต์ปลาแค่น้ำ

2. ผลของการใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์

การเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยวิธีฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่ โดยใช้ฮอร์โมน LHRH เปรียบเทียบกับฮอร์โมน LHRH ผสมสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทริน (LHRH-CDs) แม่ปลาทั้งสองชุดการทดลองมีขนาดความยาวและน้ำหนักตัวไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) โดยแม่ปลากดแก้วในชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH มีความยาวเฉลี่ย 53.5 ± 3.51 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 2.3 ± 0.24 กิโลกรัม แม่ปลากดแก้วในชุดที่ได้รับฮอร์โมน LHRH-CDs มีความยาวเฉลี่ย 53.2 ± 4.17 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 2.3 ± 0.22 กิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

พ่อพันธุ์ปลากดแก้วมีความยาวเฉลี่ย 58.4 ± 2.82 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 2.2 ± 0.17 กิโลกรัม มีน้ำหนักอวัยวะเฉลี่ย 19.7 ± 4.64 กรัม ค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ 0.80 ± 0.126 เปอร์เซ็นต์ จากการนำน้ำเชื้อมารวมกันแล้วตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อพบว่า มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว 89.61 ± 5.067 เปอร์เซ็นต์ มีระยะเวลาเคลื่อนไหว 145.25 ± 12.174 วินาที มีความหนาแน่นสเปิร์ม $2.38 \pm 0.517 \times 10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร

ผลการทดลองพบว่า ฮอร์โมน LHRH และ LHRH-CDs สามารถกระตุ้นให้แม่ปลากดแก้ววางไข่ทุกตัว โดยมีระยะเวลาในการวางไข่เฉลี่ย 12.1 ± 0.09 และ 12.1 ± 0.54 ชั่วโมง, น้ำหนักไข่ที่รีดได้เฉลี่ย 136.3 ± 27.74 และ 136.0 ± 31.29 กรัม, มีอัตราปฏิสนธิเฉลี่ย 52.7 ± 16.46 และ 84.0 ± 9.70 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการฟักเฉลี่ย 35.0 ± 10.35 และ 53.8 ± 18.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า จำนวนแม่ปลาวางไข่และระยะเวลาในการวางไข่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่อัตราปฏิสนธิและอัตราการฟักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยแม่ปลากดแก้วชุดการทดลองที่ได้รับฮอร์โมน LHRH ผสมสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินมีอัตราปฏิสนธิและอัตราการฟักมากกว่าแม่ปลากดแก้วชุดการทดลองที่ได้รับฮอร์โมน LHRH (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 ผลการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้ฮอร์โมน LHRH และฮอร์โมน LHRH ผสม สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทริน LHRH-CDs

ชุด การทดลอง ที่	ตัว ที่	ความยาว (เซนติเมตร)	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	ระยะเวลา วางไข่ (ชั่วโมง)	น้ำหนักไข่ ที่รีดได้ (กรัม)	อัตรา ปฏิสนธิ (%)	อัตรา การฟัก (%)
1 LHRH	1	54.0	2.3	12.00	80.54	70.0	36.0
	2	54.0	2.3	12.00	150.09	62.0	28.0
	3	53.0	2.2	12.10	150.48	68.0	24.0
	4	59.0	2.5	12.10	138.64	30.0	35.0
	5	48.0	1.8	12.15	145.50	47.0	54.0
	6	53.0	2.4	12.25	152.30	39.0	33.0
เฉลี่ย		53.5±3.51 ^a	2.3±0.24 ^a	12.1±0.09 ^a	136.3±27.74 ^a	52.7±16.46 ^b	35.0±10.35 ^b
2 LHRH- CDs	1	54.0	2.5	12.00	129.10	77.0	44.0
	2	53.0	2.4	12.05	127.53	93.0	70.0
	3	53.0	2.0	12.15	176.98	92.0	36.0
	4	59.0	2.4	12.25	142.82	80.0	55.0
	5	46.0	2.0	13.00	155.33	92.0	82.0
	6	54.0	2.2	11.30	84.28	70.0	36.0
เฉลี่ย		53.2±4.17 ^a	2.3±0.22 ^a	12.1±0.54 ^a	136.0±31.29 ^a	84.0±9.70 ^a	53.8±18.91 ^a

หมายเหตุ อักษรกำกับค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

3. พัฒนาการของคัพภะและลูกปลาวัยอ่อน

การพัฒนาของไข่และลูกปลาวัยอ่อนของปลากดแก้ว แสดงในภาพที่ 2 มีรายละเอียด ดังนี้

3.1 ลักษณะของไข่ปลากดแก้ว ไข่ของปลากดแก้วเป็นไข่จมติด มีสารเหนียวหนาห่อหุ้มโดยรอบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.25 มิลลิเมตร มีลักษณะกลม สีเหลืองใส (ภาพที่ 2-1) ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิกับตัวอสุจิแล้วจะมีสีใส ส่วนไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะทึบแสงและมีสีขาวขุ่น

3.2 ระยะบลาสโตเดิร์มเริ่มสูงจากผิวไข่ เริ่มระยะแรกของคลีเวจ (Cleavage) เกิดหลังการปฏิสนธิของไข่ 50 นาที ไซโกต (zygote) จะทำการแบ่งเซลล์ในแบบเมโรบลาสติก (Meroblastic cleavage) คือการแบ่งเซลล์เฉพาะส่วน animal pole ของไข่แบบ mitosis บลาสโตดิสก์ (Blastodisc) จะเป็นรูปคล้ายหมวกครอบไข่แดง หนาที่ขั้วและนูนออกมามีลักษณะใสเป็นเซลล์เดี่ยว (ภาพที่ 2-2)

3.3 ระยะ 2 เซลล์ เกิดในเวลา 1 ชั่วโมง มีการแบ่งเซลล์ในแนวดิ่งตั้งฉากกับผิวของไข่ แบ่งบลาสโตดิสก์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ (Blastomere) 2 เซลล์ (ภาพที่ 2-3)

3.4 ระยะ 4 เซลล์ เกิดในเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 2 ในแนวดิ่งตั้งฉากกับแนวที่ 1 แบ่งบลาสโตดิสก์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ 4 เซลล์ (ภาพที่ 2-4)

3.5 ระยะ 8 เซลล์ เกิดในเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 3 โดยแบ่งเซลล์ในแนวดิ่ง 2 แนว ตั้งฉากกับแนวที่ 2 และขนานกับแนวแรก แบ่งบลาสโตดิสก์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ 8 เซลล์ (ภาพที่ 2-5)

3.6 ระยะ 16 เซลล์ เกิดในเวลา 2 ชั่วโมง มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 4 ในแนวดิ่ง 2 แนว ขนานกับแนวที่ 2 แบ่งบลาสโตดิสก์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ 16 เซลล์ (ภาพที่ 2-6)

3.7 ระยะ 32 เซลล์ เกิดในเวลา 2 ชั่วโมง 15 นาที มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 5 โดยการแบ่งเซลล์ในแนวดิ่ง 4 แนว ขนานกับแนวที่ 2 และแนวที่ 3 แบ่งบลาสโตดิสก์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ 32 เซลล์ (ภาพที่ 2-7)

3.8 ระยะ 64 เซลล์ เกิดในเวลา 2 ชั่วโมง 25 นาที มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 6 ในแนวราบขนานกับผิวไข่ แบ่งบลาสโตซิสต์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ 64 เซลล์ (ภาพที่ 2-8)

3.9 ระยะมอรูลา (Morula) เกิดในเวลา 2 ชั่วโมง 40 นาที มีการแบ่งเซลล์อีกครั้งในแนวราบได้เซลล์บลาสโตเมียร์ 128 เซลล์ (ภาพที่ 2-9) เห็นเซลล์บลาสโตเมียร์ซ้อนกันหนาและเบียดกันแน่นคล้ายหวมกอลบไข่แดง เป็นระยะสุดท้ายของคิลเวจ มีจำนวนเซลล์มากที่สุดแต่เซลล์มีขนาดเล็กกล่ง ทำให้ปริมาตรของเซลล์ไข่ที่แบ่งคงเดิม ระยะนี้เริ่มเกิดเนื้อเยื่อ 2 ชั้น เตรียมเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะบลาสตูลา (Blastula) แต่ยังไม่มีย่อว่างบลาสโตซิสต์ (Blastocoel)

3.10 ระยะบลาสตูลา เกิดในเวลา 4 ชั่วโมง ระยะนี้บลาสโตซิสต์ มีเซลล์รวมกันอยู่เป็นกลุ่มหนาแน่นขึ้นลักษณะทรงค่อนข้างสูง (ภาพที่ 2-10) เซลล์บลาสโตเมียร์จะยึดเกาะกันแน่นขึ้นและเคลื่อนตัวขึ้นไปข้างบนกลายเป็นเยื่อบุบลาสโตเดิร์ม (Epithelial blastoderm) ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างกลุ่มเซลล์ข้างบนซึ่งจะเจริญเป็นคัพภะกับแผ่นเนื้อเยื่อไซโทพลาสซึมที่ล้อมรอบไข่แดงเรียกว่าชั้น periblast หรือ trophoblast ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งอาหารจากไข่แดงไปให้แก่คัพภะทำให้เกิดช่องว่างบลาสโตซิสต์ (ภาพที่ 2-11) ในระยะบลาสตูลาขั้นตอนสุดท้ายเยื่อบุบลาสโตเดิร์มบริเวณต่าง ๆ พร้อมทั้งเกิดการเปลี่ยนแปลงขั้นต่อไปกลายเป็นกลุ่มเซลล์ที่เป็นรากฐานของอวัยวะต่าง ๆ เรียกว่า 프리ซัมทิฟ ออร์แกน ฟอर्मมิง แอเรีย (Presumptive organ forming area) ประกอบด้วย เอ็นโดเดิร์ม (Endoderm) ถัดขึ้นมาตามแนวกึ่งกลางของบลาสโตเดิร์มเป็นส่วนพรีคอร์ดัลเพลท (Prechordal plate) โนโตคอร์ด (Notochord) นิวรัล เอ็กโตเดิร์ม (Neural ectoderm) และอีปีเดอรัล เอ็กโตเดิร์ม (Epidermal ectoderm) ตามลำดับ ส่วนมีโซเดิร์ม (Mesoderm) จะอยู่ด้านข้างทั้งสองด้านของส่วนต่าง ๆ ส่วนเพอริบลาสต์และไข่แดงจะเป็นส่วนที่เรียกว่า เอ็กซ์ทราเอมบริโอนิกเมมเบรน (Extraembryonic membrane) (ภาพที่ 2-12)

3.11 ระยะแกสตรูลา ระยะแรก (Early gastrula) เกิดที่เวลา 7 ชั่วโมง ขอบของบลาสโตซิสต์จะหนาขึ้นทำให้เกิดลักษณะคล้ายวงแหวนล้อมรอบโพล์เรียกว่า เยอรม์ ริง (Germ ring, G) (ภาพที่ 2-13) ส่วนของเยอรม์ ริง บริเวณที่จะเป็นหางของคัพภะมีเซลล์มารวมกันหนาแน่นเป็นจุดกำเนิดของคัพภะเรียกว่า เอ็มบริโอนิกชีลด์ (Embryonic shield) เมื่อเริ่มกระบวนการแกสตรูเลชัน (Gastrulation) เอ็นโดเดิร์มจะเคลื่อนเข้าไปภายในบลาสโตซิสต์ดันให้ช่องนี้มีขนาดเล็กกล่งโดยมีช่องแกสโตรโคเอล (Gastrocoel) เกิดขึ้นมาแทนซึ่งต่อไปจะเจริญเป็นช่องทางเดินอาหาร ปากช่องเปิดเรียกบลาสโตพอร์ (Blastopore)

3.12 ระยะแกสตรูลา ระยะหลัง (Late gastrula) เกิดที่เวลา 10 ชั่วโมง บลาสโตซีสต์จะหายไปหมดและบลาสโตพอร์จะค่อย ๆ ปิดลง ระยะนี้เซลล์ของบลาสโตเดิร์มจะเคลื่อนตัวแผ่ลงมาด้านล่างคลุมโพล์คลงมาเรื่อย ๆ เรียกว่าอีปีโบลิ (Epiboly) เซลล์ในส่วนนิวรัล เอ็กโตเดิร์ม (Neural ectoderm) ซึ่งไม่ได้มีวนตัวเข้าด้านในจะเคลื่อนเข้าสู่แนวกึ่งกลางตามแกนของกัพพะเกิดสันยาวตั้งฉากกับเยอร์มริงซึ่งจะจมตัวลงในแนวโนโตคอร์ด ซึ่งอยู่ด้านล่างเป็นส่วนของนิวรัล เพลท (Neural plate) ในที่สุดหลังจากมีวนตัวเข้าของเอ็นโดเดิร์ม บริเวณพรีคอร์ดัล เพลท และเอ็กโตเดิร์มเกิดการแบ่งชั้นอย่างชัดเจนโดยโนโตคอร์ดลักษณะเป็นแท่งกลมบริเวณกึ่งกลาง มีโซเดิร์มอยู่ด้านข้าง ด้านล่างสุดคือชั้นเอ็นโดเดิร์ม และส่วนของไข่แดงจะถูกคลุมจนหมดเหลือบริเวณแคบ ๆ เรียกว่าโวลค์ พลัก (Yolk plug) (ภาพที่ 2-14)

3.13 ระยะเอ็มบริโอนิกชีลด์ (Embryonic shield, ES) เกิดที่เวลา 11 ชั่วโมง ส่วนของ embryonic disc ตอนกลางจะเจริญเร็วกว่าส่วนขอบ ทำให้ยกตัวสูงขึ้นเกิดเป็นเอ็มบริโอ ครอบคลุมกับส่วนของท่อประสาทเจริญไปทางด้านยาวเร็วมาก ทำให้เอ็มบริโอยาวเป็นรูปทรงกระบอกติดอยู่กับเอ็กซทราเอ็มบริโอนิก โยค (Extraembryonic yolk) (ภาพที่ 2-15) ต่อมาทางด้านหน้าและด้านหลังของเอ็มบริโอจะยกตัวขึ้นเกิดเป็นปุ่มหัวและปุ่มหาง (Head bud, (H) and Tail bud, (T)) ซึ่งจะเจริญเติบโตเป็นส่วนหัวและหางของตัวอ่อน (ภาพที่ 2-16)

3.14 ระยะลำตัวเริ่มเกิดปล้อง (Somite, S) เกิดที่เวลา 13 ชั่วโมง เกิดจากเนื้อเยื่อมีโซเดิร์มบริเวณด้านข้างของตัวอ่อน (Lateral body fold) และจะเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ เริ่มจากหัวไปยังหางอยู่ 2 ข้างของท่อประสาทซึ่งต่อไปจะเจริญไปเป็นกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 2-17)

3.15 ระยะเริ่มเกิดโอฟัลทอรี เพลท (Olfactory plate, OP) เกิดที่เวลา 17 ชั่วโมง บริเวณทางด้านหน้าของท่อประสาทจะแผ่ขยายออกไปเป็นส่วนของสมอง และผนังของสมองบริเวณ cephalic region เจริญออกไม่เท่ากัน ซึ่งจะเกิดส่วนคอด (Constriction) ขึ้น 2 แนว แบ่งสมองออกเป็น 3 ส่วน คือ สมองส่วนหน้า (Fore brain) เป็นส่วนแคบอยู่ปลายด้านหน้า สมองส่วนกลาง (Mid brain) มีลักษณะกว้าง และสมองส่วนหลัง (Hind brain) สั้นกว่าสมองส่วนอื่นๆ สมองส่วนหน้าจะเจริญยื่นออกไปทางด้านข้างจนถึงชั้นเยื่อบุผิวด้านนอกเกิดเป็น optic vesicle (OV) ต่อไปจะเจริญเป็นลูกตา (ภาพที่ 2-18)

3.16 ระยะเริ่มเกิดออติทอรี เวสสิเคิล (Auditory vesicle, AV) เกิดที่เวลา 19 ชั่วโมง เกิดส่วนที่เป็นหูโดยเซลล์ที่ผิวหนังในของเยื่อหูชั้นนอก บริเวณสมองส่วนที่เจริญขึ้นมามีช่องกลวงเกิดขึ้นภายใน ตัวอ่อนเริ่มเคลื่อนไหวทางยืดยาวมากขึ้นมองเห็น neural cord (ภาพที่ 2-19)

3.17 ระยะเริ่มเกิดคอคัล เวสสิเคิล (Caudal vesicle, CV) เกิดที่เวลา 20 ชั่วโมง ปุ่มหางของตัวอ่อนจะโผล่ออกมาจากไข่แดง มีเยื่อหุ้มหาง (Fin fold) เห็นชัดเจน เริ่มเกิดเลนส์ตาโดยส่วนโคนของ optic vesicle ส่วนที่ต่อกับสมองส่วนหน้าจะคอดเข้าเกิดเป็นก้านตา (Optic stalk) ซึ่งต่อไปจะเจริญไปเป็นประสาทเลี้ยงตา (Optic nerve) ในขณะเดียวกันผนังด้านนอกของ optic vesicle จะบางลงและบุเข้าไปข้างในเกิดเป็น optic cup เนื้อเยื่อชั้นนอกสุดตรงบริเวณ optic vesicle จะแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและหนาขึ้นเป็น lens placode และบุเข้ามาเป็น lens rudiments แล้วหลุดจากเอ็กโตเดิร์มกลายเป็นเลนส์อยู่ในส่วนของ optic cup (ภาพที่ 2-20)

3.18 ระยะกล้ามเนื้อเริ่มทำงาน เกิดที่เวลา 24 ชั่วโมง กล้ามเนื้อเริ่มมีการหดตัวและคลายตัว (ภาพที่ 2-21)

3.19 ระยะหัวใจเริ่มทำงาน เกิดที่เวลา 25 ชั่วโมง หัวใจเริ่มมีการเต้นเร็วขึ้น เริ่มมีการไหลเวียนของโลหิตจากหัวใจไปยังส่วนล่างของโพล์ เริ่มมีอวัยวะขับถ่ายเกิดขึ้น ตัวอ่อนเจริญเติบโตมากขึ้นโดยส่วนหัวและลำตัวค่อย ๆ เหยียดตรงออกมา ส่วนหางขยายกว้างและเหยียดยาวเลยจากโพล์ออกไป (ภาพที่ 2-22)

3.20 ระยะเกิดปุ่มหนวด เกิดที่เวลา 26 ชั่วโมง เกิดปุ่มหนวด (Barbel bud) 2 ปุ่ม ที่ริมฝีปากบน (Maxillary barbells, MD) (ภาพที่ 2-23) เวลา 27 ชั่วโมง 30 นาที ตัวอ่อนเจริญเติบโตมากขึ้น ส่วนหางยืดยาวและมีการเคลื่อนไหวโดยสะบัดไปมาเร็วและแรงขึ้น (ภาพที่ 2-24)

3.21 ระยะออกจากไข่ (Hatched out) เกิดที่เวลา 30 ชั่วโมง ลูกปลาฟักเป็นตัวออกจากไข่โดยสะบัดหางเร็วและแรงจนผนังไข่แตกออก ตัวอ่อนจะคืบคลานออกมาโดยเอาส่วนหางออกมา ก่อนแล้วลำตัวและส่วนหัวจึงหลุดจากเปลือกไข่ มีขนาดความยาวลำตัวอยู่ระหว่าง 5.0-6.0 มิลลิเมตร ไข่แดงมีลักษณะกลม เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.04 มิลลิเมตร และจะใช้เวลาในการฟักออกเป็นตัวจนหมดประมาณ 38 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 2-25)

3.22 ลูกปลาวัยอ่อนระยะ prolarval stage เป็นการพัฒนาของลูกปลากดแก้ววัยอ่อนระยะแรกที่ยังมีถุงอาหารสำรองปรากฏอยู่

ลูกปลาอายุ 12 ชั่วโมง มีลำตัวใสเห็นอวัยวะภายในชัดเจน มีหนวดที่ขากรรไกรบน ยึดยาว บริเวณปากและตายังไม่มีเมือคิเกิดขึ้น และปากเริ่มแบ่งออกเป็นริมฝีปากบน (Upper lip) และริมฝีปากล่าง (Lower lip) แต่ยังปิดอยู่ การเจริญพัฒนาของครีบในแนวดังจะเป็นรูปของเยื่อหุ้มตัวในแนวดัง (Fin fold) จะต่อกันหมดทั้งตัวทั้งด้านบน ด้านล่างและส่วนหาง โนโตคอร์ด (Notochord) เป็นแท่งยาวตลอดลำตัว ลักษณะตรงปลายโค้งขึ้นเล็กน้อย ตามลำตัวเห็นกล้ามเนื้อเป็นปล้องๆ (Segment) ชัดเจน ท่อทางเดินอาหารเป็นท่อตรงสั้นและมีช่องเปิดบริเวณท้ายลำตัว ส่วนของลูกตาอยู่ระหว่างการพัฒนา (ภาพที่ 2-26)

ลูกปลาอายุ 1 วัน ความยาวเฉลี่ย (Total length) 8.0 ± 0.02 มิลลิเมตร ฝูงไข่แดงยุบลงมาก ลำตัวมีลักษณะกว้างขึ้น ส่วนของเยื่อหุ้มตัวเริ่มมีการคอดเว้าตอนปลายแยกออกเป็นส่วนของครีบต่าง ๆ เริ่มแบ่งส่วนของปากชัดเจน มองเห็นหนวด 2 คู่ คือ หนวดที่ริมฝีปากบนและล่าง (Mandibular barbel) และเกิดปุ่มหนวดใต้คาง (Chin barbel) (ภาพที่ 2-27)

ลูกปลาอายุ 2 วัน ความยาวเฉลี่ย 9.2 ± 0.25 มิลลิเมตร ฝูงไข่แดงยุบลงมาก มีลักษณะเป็นรูปรี ครีบหาง (Caudal fin fold) เริ่มสร้างส่วนต่างๆ ของครีบ ปากเปิด ตาดำ มีจุดสี (Pigment) สีดำกระจายอยู่บริเวณหัว กระดูกกระดูกซี่โครงเห็น ผิวด้านบนของทางเดินอาหารและลำตัว โดยลำตัวจะมีการแบ่งออกเป็นส่วนหัวและลำตัวชัดเจน มองเห็นหนวด 3 คู่ (ภาพที่ 2-28)

ลูกปลาอายุ 3 วัน ความยาวเฉลี่ย 10.4 ± 1.63 มิลลิเมตร ฝูงไข่แดงยุบเกือบหมด ปากกว้างมากขึ้นเริ่มกินอาหารได้ ครีบหางมีก้านครีบ 2-4 ก้าน มีจุดสีดำกระจายอยู่บนส่วนหัวและลำตัวมากขึ้น เริ่มมีจุดสีที่บริเวณจะงอยปากและขากรรไกรล่าง มองเห็นปุ่มหนวดคู่ที่ 4 (Nasal barbels) บริเวณส่วนหัว (ภาพที่ 2-29)

3.23 ลูกปลาวัยอ่อนระยะ larval stage เป็นการพัฒนาของลูกปลากดแก้ววัยอ่อนระยะแรก หลังจากที่ถูกอาหารสำรองได้ยุบหมดแล้ว ระยะนี้ส่วนของปากจะเปิดและใช้งานได้ดี

ลูกปลาอายุ 4 วัน ความยาวเฉลี่ย 11.05 ± 1.08 มิลลิเมตร ส่วนของถุงไข่แดงยุบหมด ปากเปิดเริ่มกินอาหารได้ดี ครีบกันเริ่มแยกจากครีบหางและมีก้านครีบ 6-8 ก้าน จุดสีบริเวณส่วนหัวและลำตัวเพิ่มจำนวนและขยายขนาดมากขึ้น จุดสีบริเวณด้านล่างของกระดูกกระพุ้งแก้มและขากรรไกรล่างมากขึ้น มองเห็นหนวด 4 คู่ชัดเจน (ภาพที่ 2-30)

ลูกปลาอายุ 5 วัน ความยาวเฉลี่ย 12.3 ± 1.12 มิลลิเมตร ครีบหูเจริญดี มีก้านครีบอ่อนเกิดขึ้น 4-6 ก้าน ครีบกันแยกจากครีบหางเด็ดขาด จุดสีแผ่ขยายเต็มทางเดินอาหารส่วนบนและกระจายด้านล่างของทางเดินอาหาร (ภาพที่ 2-31)

ลูกปลาอายุ 6 วัน ความยาวเฉลี่ย 13.2 ± 0.78 มิลลิเมตร ครีบหูเจริญมากขึ้น มีก้านครีบ 6-8 ก้าน ครีบหลังมีก้านครีบ 8 ก้าน กระดูกปลายหาง urostyle โค้งงอขึ้น ครีบหางมีก้านครีบ 16-18 ก้าน แบ่งออกเป็นข้อชัดเจน ส่วนหัวและลำตัวมีจุดสีดำกระจายอยู่หนาแน่นมากขึ้น (ภาพที่ 2-32)

3.24 ลูกปลาวัยอ่อนระยะ postlarval stage เป็นการพัฒนาของลูกปลากดแก้ววัยอ่อนระยะหลังจากที่กระดูกปลายหาง urostyle โค้งงอขึ้น

ลูกปลาอายุ 7 วัน ความยาวเฉลี่ย 15.5 ± 0.31 มิลลิเมตร ตัวปลาเริ่มมีจุดสีบริเวณหัวเพิ่มจำนวนและกระจายอยู่ทั่วลำตัว จุดสีบริเวณทางเดินอาหารแผ่ขยายเต็มทางเดินอาหาร (ภาพที่ 2-33)

ลูกปลาอายุ 8 วัน ความยาวเฉลี่ย 16.5 ± 0.23 มิลลิเมตร ตัวปลาเริ่มมีจุดสีบริเวณสมองขยายขนาดปกคลุมเต็มบริเวณสมอง คาง ทางเดินอาหารเชื่อมต่อถึงกันจนถึงหาง (ภาพที่ 2-34)

ลูกปลาอายุ 9 วัน ความยาวเฉลี่ย 18.1 ± 0.17 เซนติเมตร ตัวปลาเริ่มมีจุดสีดำกระจายอยู่ทั่วลำตัว มองไม่เห็นส่วนของกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 2-35)

ลูกปลาอายุ 12 วัน ลำตัวมีความยาว 2.3 ± 0.28 เซนติเมตร ปลาเริ่มมีลำตัวหนาแน่นขึ้น การพัฒนาก้านครีบทั้งหมดเกิดขึ้นสมบูรณ์ มองเห็นลูกปลาเป็นสีดำตลอดทั้งตัว (ภาพที่ 2-36)

3.25 ลูกปลาระยะ juvenile phase เป็นระยะลูกปลานขนาดเล็ก ที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมาแล้ว ไม่มีลักษณะของลูกปลาวัยอ่อนเหลืออยู่ มีรูปร่างเหมือนกับลูกปลาที่โตเต็มวัยทุกประการ แต่มีขนาดเล็กกว่า และระบบสืบพันธุ์ยังไม่สมบูรณ์

ลูกปลาอายุ 30 วัน ความยาวมาตรฐาน (standard length) 4.20 ± 0.38 เซนติเมตร ความยาวเหี้ย 5.08 ± 0.48 เซนติเมตร น้ำหนัก 1.22 ± 0.36 กรัม (ภาพที่ 2-37)

ลูกปลาอายุ 40 วัน ความยาวมาตรฐาน 5.12 ± 0.85 เซนติเมตร ความยาวเหี้ย 7.52 ± 0.93 เซนติเมตร น้ำหนัก 3.10 ± 0.68 กรัม (ภาพที่ 2-38)

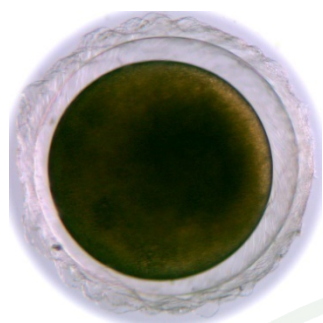
ลูกปลาอายุ 60 วัน ความยาวมาตรฐาน 9.13 ± 1.24 เซนติเมตร ความยาวเหี้ย 11.55 ± 1.51 เซนติเมตร น้ำหนัก 12.80 ± 4.77 กรัม (ภาพที่ 2-39)

ลูกปลาอายุ 180 วัน ความยาวมาตรฐาน 15.54 ± 1.38 เซนติเมตร ความยาวเหี้ย 19.26 ± 1.74 เซนติเมตร น้ำหนัก 55.96 ± 13.90 กรัม มีรูปร่างเหมือนตัวเต็มวัย แต่ยังไม่มีการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ (ภาพที่ 2-40)

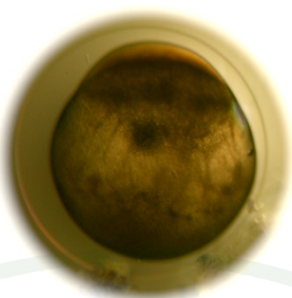
ลูกปลาอายุ 1 ปี ความยาวมาตรฐาน 32.36 ± 2.95 เซนติเมตร ความยาวเหี้ย 39.27 ± 2.97 เซนติเมตร น้ำหนัก 434.53 ± 122.75 กรัม อวัยวะสืบพันธุ์เริ่มมีการพัฒนา (ภาพที่ 2-41)

3.26 ปลาระยะโตเต็มวัย adult phase เป็นระยะที่ปลาโตเต็มที่ทั้งขนาดและมีการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ สร้างเซลล์สืบพันธุ์พร้อมที่จะทำการผสมพันธุ์ได้แล้ว การที่ปลาพร้อมที่จะสืบพันธุ์วางไข่ได้ครั้งแรกของปลาโตเต็มวัย เรียกว่า “first mature”

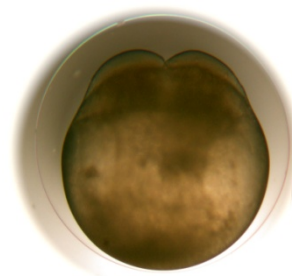
ลูกปลาอายุ 2 ปี ความยาวมาตรฐาน 45.14 ± 4.25 เซนติเมตร ความยาวเหี้ย 54.69 ± 5.43 เซนติเมตร น้ำหนัก $1,274.53 \pm 354.97$ กรัม ระบบสืบพันธุ์เจริญเต็มที่ที่สามารถสืบพันธุ์ได้ (ภาพที่ 2-42)



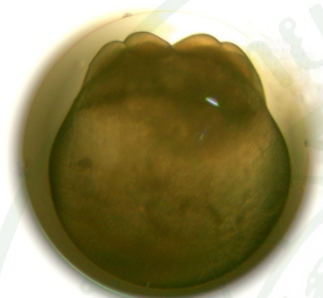
2-1



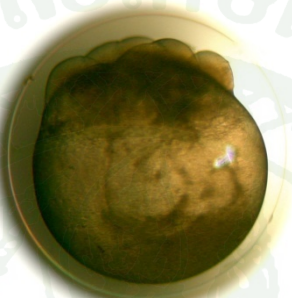
2-2



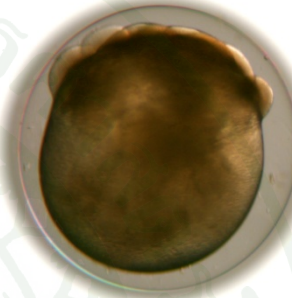
2-3



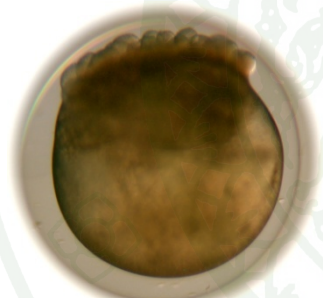
2-4



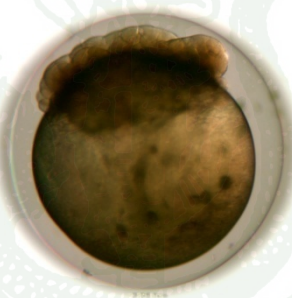
2-5



2-6



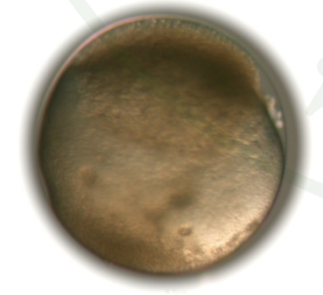
2-7



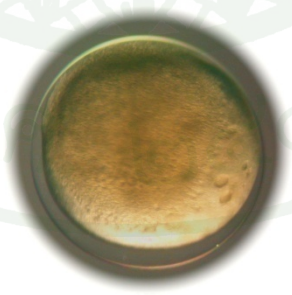
2-8



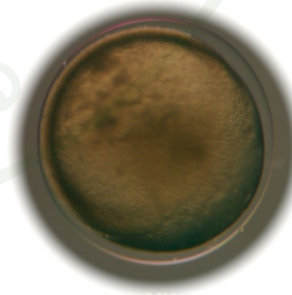
2-9



2-10

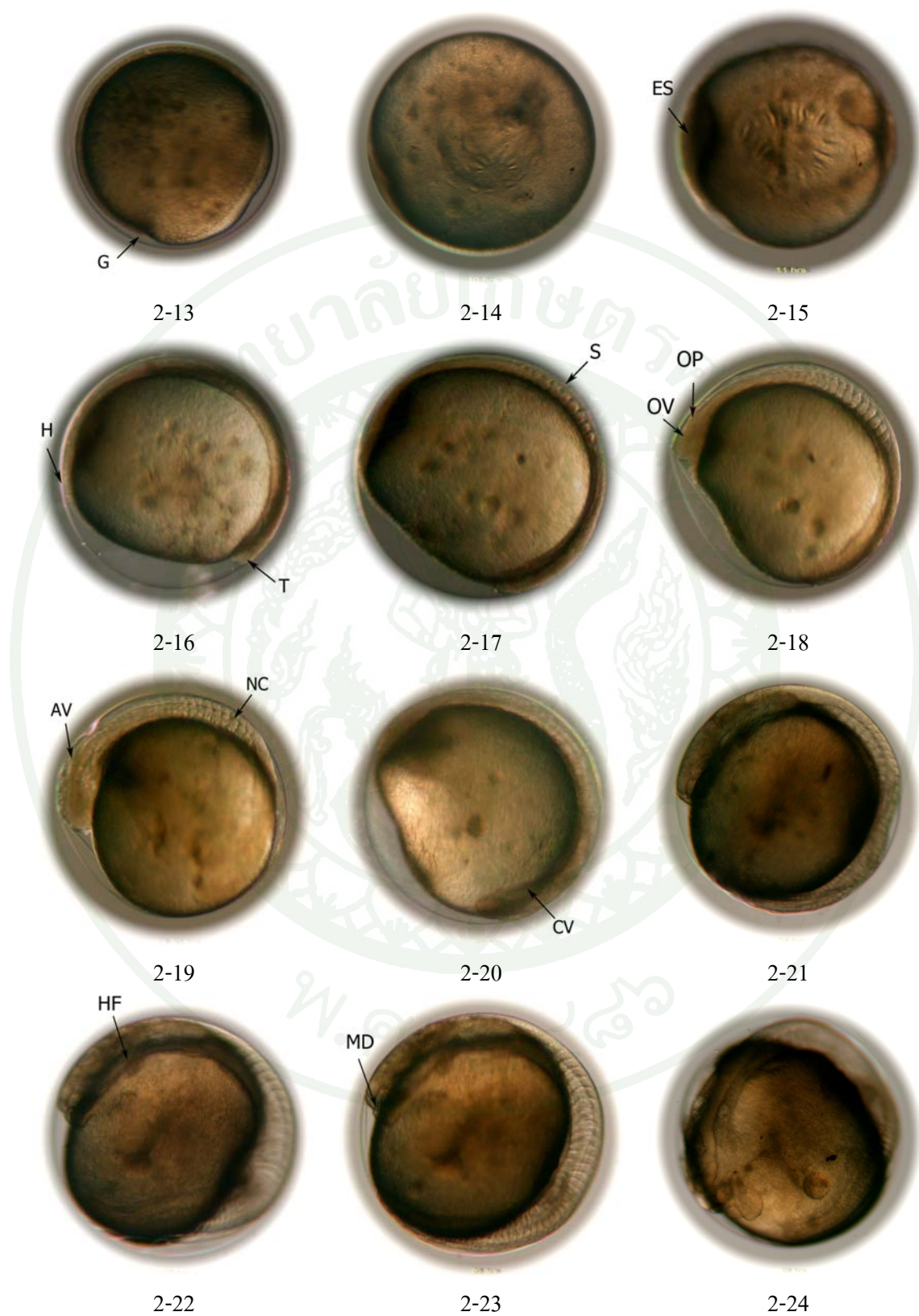


2-11

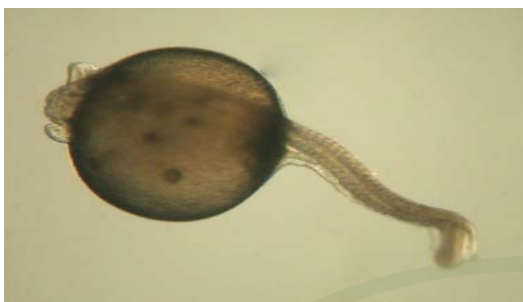


2-12

ภาพที่ 2 การพัฒนาของไข่และลูกปลาวัยอ่อนของปลากดแก้ว



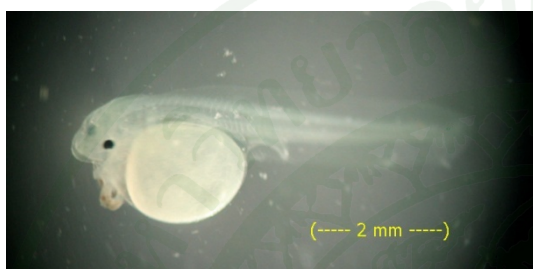
ภาพที่ 2 (ต่อ)



2-25



2-26



2-27



2-28



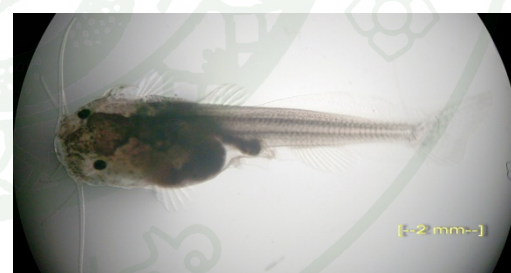
2-29



2-30



2-31



2-32



2-33



2-34

ภาพที่ 2 (ต่อ)



2-35



2-36



2-37



2-38



2-39

ภาพที่ 2 (ต่อ)



2-40



2-41



2-42

ภาพที่ 2 (ต่อ)

4. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดแก้วโดยวิธีแช่แข็ง

4.1 สารละลายเจือจางสูตรที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดแก้ว

จากการตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อที่ผสมสารละลาย 3 สูตร ณ เวลาหลังผสมสารละลายทันที (0 ชั่วโมง) และตรวจสอบทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 144 ชั่วโมง (6 วัน) แสดงผลดังตารางที่ 4 และ 5 และภาพที่ 3 และ 4 จากการวิเคราะห์สถิติแสดงผลแยกตามระยะเวลาที่ตรวจสอบดังต่อไปนี้

4.1.1 ที่ระยะเวลาหลังผสมสารละลายทันที (0 ชั่วโมง) พบว่าอิทธิพลจากสูตรสารละลายที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($P>0.05$) โดยสารละลายทั้ง 3 สูตร มีปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกัน มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวอยู่ในช่วง 88.15-96.08% และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวอยู่ในช่วง 127.50-146.50 นาที

4.1.2 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าอิทธิพลจากสูตรสารละลายที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($P<0.05$) โดยสารละลาย GFR มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว $75.06 \pm 5.81\%$ ซึ่งมีค่ามากกว่าสารละลาย MFR และ 0.9% NaCl ($46.49 \pm 1.58\%$ และ $44.52 \pm 2.35\%$ ตามลำดับ) ซึ่งสารละลาย 2 สูตรหลังนี้มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวไม่แตกต่างกัน ส่วนสารละลาย 0.9% NaCl มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวนานที่สุด ไม่แตกต่างจากสารละลาย GFR รองลงมาคือ สารละลาย MFR ซึ่งสารละลาย 2 สูตรหลังไม่แตกต่างกัน โดยมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว 125.00 ± 2.83 , 107.50 ± 10.61 และ 95.50 ± 6.36 วินาที ตามลำดับ

4.1.3 ที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าอิทธิพลจากสูตรสารละลายที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($P>0.05$) โดยน้ำเชื้อที่เก็บในสารละลายทั้ง 3 สูตรมีปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกัน โดยมีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวอยู่ในช่วง 13.48-40.82% และมีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวอยู่ในช่วง 74.5-107.0 วินาที

4.1.4 ที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าอิทธิพลจากสูตรสารละลายที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($P<0.05$) แต่ไม่มีผลต่อระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($P>0.05$) โดย

สารละลาย GFR มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวสูงที่สุด ($16.17 \pm 6.27\%$) ซึ่งไม่แตกต่างจากสารละลาย 0.9% NaCl ($11.31 \pm 6.95\%$) และมีค่ามากกว่าสารละลาย MFR ($1.24 \pm 1.75\%$) และสารละลายทั้ง 3 สูตร มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกัน โดยมีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวอยู่ในช่วง 65.0-93.0 วินาที

4.1.5 ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าอิทธิพลจากสูตรสารละลายที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($P < 0.05$) โดยสารละลาย 0.9% NaCl มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวสูงที่สุด ($6.91 \pm 0.10\%$) ซึ่งไม่แตกต่างจากสารละลาย GFR ($5.80 \pm 5.05\%$) โดยสารละลาย MFR พบว่าสเปิร์มตายทั้งหมด (0%) และสารละลาย GFR มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 87.00 ± 2.83 วินาที มากกว่าสารละลาย 0.9% NaCl ที่มีระยะเวลาสเปิร์มเคลื่อนไหว 68.50 ± 6.36 วินาที ส่วนสารละลาย MFR ไม่มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว

4.1.6 ที่ระยะเวลา 144 ชั่วโมง พบว่าอิทธิพลจากสูตรสารละลายที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($P < 0.05$) โดยสารละลาย 0.9% NaCl มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวสูงสุด ($3.72 \pm 0.95\%$) รองลงมาคือสารละลาย GFR ($0.32 \pm 0.46\%$) และต่ำที่สุดคือสารละลาย MFR ซึ่งพบว่าสเปิร์มตายทั้งหมดตั้งแต่ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง (0%) ส่วนสารละลาย 0.9% NaCl มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวนานที่สุด 72.00 ± 7.07 วินาที มากกว่าสารละลาย GFR (29.00 ± 41.01 วินาที) และสารละลาย MFR ไม่มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว อย่างไรก็ตาม น้ำเชื้อที่เก็บในสารละลาย 2 สูตรที่เหลือคือ GFR และ 0.9% NaCl มีสเปิร์มที่มีชีวิตเหลือน้อยมาก

ตารางที่ 4 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เจือจางด้วยสารละลาย 3 สูตร (GFR, MFR และ 0.9% NaCl) ระหว่างเวลา 0-144 ชั่วโมง

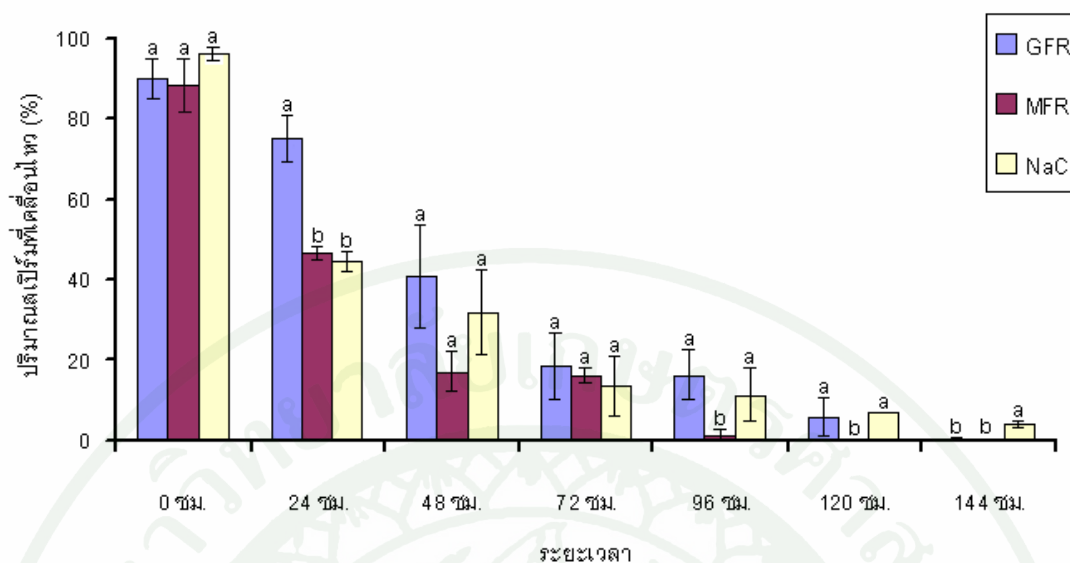
ระยะเวลา/สูตรสารละลาย	GFR	MFR	0.9% NaCl
0 ชั่วโมง	89.89 ± 5.08 ^a	88.15 ± 6.42 ^a	96.08 ± 1.69 ^a
24 ชั่วโมง	75.06 ± 5.81 ^a	46.49 ± 1.58 ^b	44.52 ± 2.35 ^b
48 ชั่วโมง	40.82 ± 12.54 ^a	17.03 ± 5.35 ^a	31.54 ± 11.07 ^a
72 ชั่วโมง	18.78 ± 8.12 ^a	16.04 ± 2.31 ^a	13.48 ± 7.53 ^a
96 ชั่วโมง	16.17 ± 6.27 ^a	1.24 ± 1.75 ^b	11.31 ± 6.95 ^a
120 ชั่วโมง	5.80 ± 5.05 ^a	0 ^b	6.91 ± 0.10 ^a
144 ชั่วโมง	0.32 ± 0.46 ^b	0 ^b	3.72 ± 0.95 ^a

หมายเหตุ อักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวนอนแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างสูตรสารละลาย

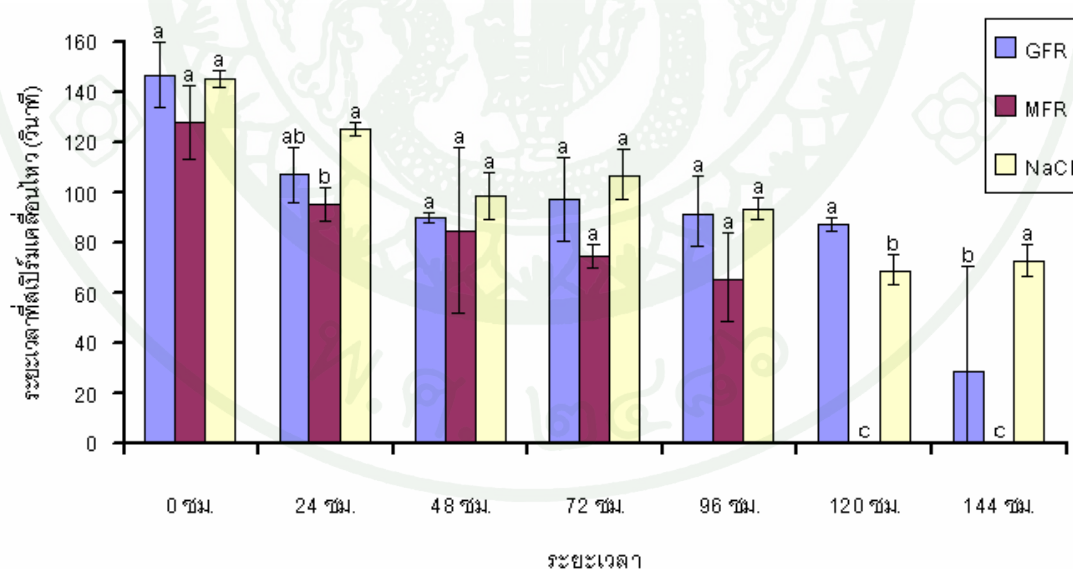
ตารางที่ 5 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เจือจางด้วยสารละลาย 3 สูตร (GFR, MFR และ 0.9% NaCl) ระหว่างเวลา 0-144 ชั่วโมง

ระยะเวลา/สูตรสารละลาย	GFR	MFR	0.9% NaCl
0 ชั่วโมง	146.50 ± 13.44 ^a	127.50 ± 14.85 ^a	145.00 ± 2.83 ^a
24 ชั่วโมง	107.50 ± 10.61 ^{ab}	95.50 ± 6.36 ^b	125.00 ± 2.83 ^a
48 ชั่วโมง	89.50 ± 2.12 ^a	84.50 ± 33.23 ^a	98.00 ± 9.90 ^a
72 ชั่วโมง	97.00 ± 16.97 ^a	74.50 ± 4.95 ^a	107.00 ± 9.90 ^a
96 ชั่วโมง	91.00 ± 15.56 ^a	65.00 ± 18.38 ^a	93.00 ± 4.24 ^a
120 ชั่วโมง	87.00 ± 2.83 ^a	0 ^c	68.50 ± 6.36 ^b
144 ชั่วโมง	29.00 ± 41.01 ^b	0 ^c	72.00 ± 7.07 ^a

หมายเหตุ อักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวดิ่งแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างสูตรสารละลาย



ภาพที่ 3 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เจือจางด้วยสารละลาย 3 สูตร (GFR, MFR และ 0.9% NaCl) จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้น ที่ระยะเวลา ระหว่าง 0-144 ชั่วโมง



ภาพที่ 4 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เจือจางด้วยสารละลาย 3 สูตร (GFR, MFR และ 0.9% NaCl) จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้น ที่ระยะเวลาระหว่าง 0-144 ชั่วโมง

4.2 ชนิดของสารโครโอโพเรทแทนท์ที่เหมาะสมต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดแก้ว

จากการตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวของสารละลายน้ำเชื้อปลากดแก้วที่ผสมสารโครโอโพเรทแทนท์ 3 ชนิด คือ methanol, dimethyl sulfoxide (DMSO) และ glycerol ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ระหว่าง 2-25% (v/v) หลังจากผสม ณ 3 ช่วงเวลา คือ หลังผสมทันที (0 นาที) 30 และ 120 นาที จากการวิเคราะห์สถิติพบว่าอิทธิพลจากชนิดของสารโครโอโพเรทแทนท์และความเข้มข้นที่แตกต่างกันและอิทธิพลร่วมมีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ทั้ง 3 ช่วงระยะเวลาที่ตรวจสอบอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) พบว่าเมื่อสารโครโอโพเรทแทนท์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวลดลง ผลการทดลองแยกตามช่วงเวลาหลังผสมแสดงผลในตารางที่ 6 และ 7 ภาพที่ 5 และ 6 เมื่อพิจารณาแต่ละระยะเวลาตามชนิดของสารโครโอโพเรทแทนท์ได้ผลการทดลองดังนี้

4.2.1 ระยะเวลา 0 นาที พบว่า methanol ส่งผลให้มีปริมาณที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูงที่สุด รองลงมาคือ DMSO และต่ำที่สุดคือ glycerol และที่ความเข้มข้นของสารละลาย 2% และ 5% มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวสูงที่สุดซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน รองลงมาคือที่ 10% และ 15% แต่ก็ไม่ให้ค่าไม่แตกต่างไปจากที่ 10% รองลงมาคือที่ 20% แต่ก็ให้ค่าไม่แตกต่างไปจากที่ 15% และที่ 25% ส่งผลให้ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวต่ำที่สุด โดย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 15, 20 และ 25% มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเฉลี่ย 78.60 ± 2.73 , 76.75 ± 1.58 , 71.62 ± 2.23 , 56.82 ± 1.87 , 57.79 ± 6.10 และ 44.59 ± 8.58 % ตามลำดับ DMSO ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวก็ทำให้มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเฉลี่ย 68.61 ± 4.54 , 66.78 ± 0.54 , 43.49 ± 4.65 , 31.90 ± 3.85 , 31.90 ± 3.63 และ 11.11 ± 1.55 % ตามลำดับ และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวก็ทำให้มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเฉลี่ย 78.39 ± 3.22 , 57.48 ± 3.71 , 26.53 ± 0.96 , 21.82 ± 2.91 , 12.80 ± 3.19 และ 4.50 ± 1.82 % ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 0% โครโอโพเรทแทนท์ (น้ำเชื้อสด) มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว 92.67 % ซึ่งจะเท่ากันในสารโครโอโพเรทแทนท์ทั้ง 3 ชนิด

ส่วนระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวพบว่า methanol ส่งผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวนานที่สุด รองลงมาคือ glycerol และต่ำที่สุดคือ DMSO ที่ความเข้มข้นของสารละลาย 2% และ 5% ส่งผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวนานที่สุดซึ่งให้ค่าไม่แตกต่างกัน รองลงมาตามลำดับคือที่ 10%, 15%, 20% และที่ความเข้มข้น 25% ส่งผลให้ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวต่ำที่สุด โดย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 15, 20 และ 25% มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 179.0 ± 2.83 ,

168.5 $\pm$ 2.12, 172.5 $\pm$ 2.12, 142.0 $\pm$ 2.83, 141.5 $\pm$ 6.36 และ 105.5 $\pm$ 14.85 วินาที ตามลำดับ DMSO ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวก็ทำให้มีเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 150.5 $\pm$ 9.19, 162.0 $\pm$ 11.31, 111.0 $\pm$ 14.14, 84.5 $\pm$ 12.02, 73.5 $\pm$ 10.61 และ 45.0 $\pm$ 5.66 วินาที ตามลำดับ และ glycerol ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวก็ทำให้มีเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 184.5 $\pm$ 4.95, 158.0 $\pm$ 12.73, 134.0 $\pm$ 11.31, 93.5 $\pm$ 12.02, 88.5 $\pm$ 13.44 และ 57.0 $\pm$ 9.90 วินาที ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 0% ไครโอโพรเทคแทนท์ (น้ำเชื้อสด) มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 187 วินาที ซึ่งจะเท่ากันในการไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิด

4.2.2 ระยะเวลา 30 นาที พบว่า methanol ส่งผลให้มีปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูงสุด รองลงมาคือ glycerol และต่ำสุดคือ DMSO ที่ความเข้มข้น 2% 5% และ 10% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวสูงสุด รองลงมาตามลำดับคือที่ 15% 20% และต่ำสุดคือที่ 25% โดยน้ำเชื้อที่ผสม DMSO เข้มข้น 25% ส่งผลให้สเปิร์มตายทั้งหมด (มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว 0%) โดย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 15, 20 และ 25% มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเฉลี่ย 54.21 $\pm$ 3.92, 61.75 $\pm$ 0.79, 72.56 $\pm$ 6.14, 41.89 $\pm$ 1.72, 14.54 $\pm$ 4.59 และ 5.45 $\pm$ 1.86 % ตามลำดับ ส่วน glycerol ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวก็ทำให้มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเฉลี่ย 40.31 $\pm$ 9.67, 27.85 $\pm$ 4.84, 28.77 $\pm$ 3.51, 25.12 $\pm$ 5.16, 12.34 $\pm$ 1.60 และ 3.99 $\pm$ 2.50 % ตามลำดับ และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวก็ทำให้มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเฉลี่ย 34.65 $\pm$ 5.00, 42.72 $\pm$ 3.11, 32.95 $\pm$ 1.50, 2.80 $\pm$ 1.34, 2.15 $\pm$ 0.58 และ 0 % ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 0% ไครโอโพรเทคแทนท์ (น้ำเชื้อสด) มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว 91.83 % ซึ่งจะเท่ากันในการไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิด

ส่วนระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวพบว่า ที่ความเข้มข้น 2% ส่งผลให้สเปิร์มเคลื่อนไวนานที่สุด รองลงมาคือที่ 5% และ 10% ซึ่งไม่แตกต่างกัน รองลงมาคือที่ 15% และ 20% และที่ 25% ส่งผลให้ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวยาวต่ำที่สุด โดย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 15, 20 และ 25% มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 181.5 $\pm$ 7.78, 157.5 $\pm$ 4.95, 160.5 $\pm$ 7.78, 139.0 $\pm$ 2.83, 99.5 $\pm$ 3.54 และ 49.5 $\pm$ 10.61 วินาที ตามลำดับ ส่วน glycerol ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวก็ทำให้มีเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 160.0 $\pm$ 8.49, 120.0 $\pm$ 5.66, 128.0 $\pm$ 15.56, 99.0 $\pm$ 2.83, 63.0 $\pm$ 9.90 และ 51.0 $\pm$ 9.90 วินาที ตามลำดับ และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวก็ทำให้มีเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 131.5 $\pm$ 6.36, 123.5 $\pm$ 16.26, 85.0 $\pm$ 12.73, 28.0 $\pm$ 7.07, 42.5 $\pm$ 6.36 และ 0 วินาที ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 0% ไครโอโพรเทคแทนท์ (น้ำเชื้อ

สด) มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 190 วินาที ซึ่งจะเท่ากับในสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิด

4.2.3 ระยะเวลา 120 นาที พบว่า methanol ส่งผลให้มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวสูงกว่า DMSO และ glycerol ที่ความเข้มข้น 2% 5% และ 10% ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกันให้ปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวสูงสุด รองลงมาคือที่ 15% และต่ำสุดคือที่ 20% และ 25% โดยน้ำเชื้อที่ผสม DMSO เข้มข้น 15%, 20% และ 25% และน้ำเชื้อที่ผสม methanol และ glycerol เข้มข้น 25% ส่งผลให้สเปิร์มตายทั้งหมด (มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว 0%) โดย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 15 และ 20 % มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเฉลี่ย 54.15 ± 0.23 , 57.34 ± 2.04 , 64.23 ± 4.41 , 25.52 ± 1.98 และ 3.84 ± 2.08 % ตามลำดับ ส่วน glycerol ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวก็ทำให้มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเฉลี่ย 22.02 ± 2.46 , 25.58 ± 4.70 , 25.54 ± 5.44 , 21.26 ± 3.20 และ 6.27 ± 2.26 % ตามลำดับ และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 2%, 5% และ 10% มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเฉลี่ย 35.81 ± 8.13 , 40.55 ± 5.64 และ 12.09 ± 4.12 % ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 0% ไครโอโพรเทคแทนท์ (น้ำเชื้อสด) มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว 91.04 % ซึ่งจะเท่ากับในสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิด

ส่วนระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวพบว่า methanol ส่งผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวนานที่สุด รองลงมาคือ glycerol และต่ำสุดคือ DMSO ที่ความเข้มข้น 2% ส่งผลให้สเปิร์มเคลื่อนไหวนานที่สุด รองลงมาตามลำดับคือที่ 5% 10% 15% 20% และต่ำสุดที่ 25% โดยน้ำเชื้อที่ผสม methanol และ glycerol ที่ความเข้มข้น 25% ส่งผลให้สเปิร์มตายทั้งหมด (มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว 0%) โดย methanol ที่ระดับความเข้มข้น 2, 5, 10, 15 และ 20 % มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 172.0 ± 11.31 , 156.5 ± 9.19 , 148.0 ± 11.31 , 115.5 ± 7.78 และ 72.0 ± 8.49 วินาที ตามลำดับ ส่วน glycerol ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวก็ทำให้มีเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 77.0 ± 14.14 , 111.5 ± 13.44 , 120.0 ± 22.63 , 87.0 ± 12.73 และ 45.0 ± 4.24 วินาที ตามลำดับ และ DMSO ที่ระดับความเข้มข้น 2%, 5% และ 10% มีเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 135.5 ± 6.36 , 80.0 ± 8.49 และ 35.5 ± 6.36 วินาที ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 0% ไครโอโพรเทคแทนท์ (น้ำเชื้อสด) มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 181 วินาที ซึ่งจะเท่ากับในสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิด

ตารางที่ 6 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (methanol, DMSO และ glycerol) ความเข้มข้น 6 ระดับ (2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) ที่ระยะเวลาเก็บ 0, 30 และ 120 นาที

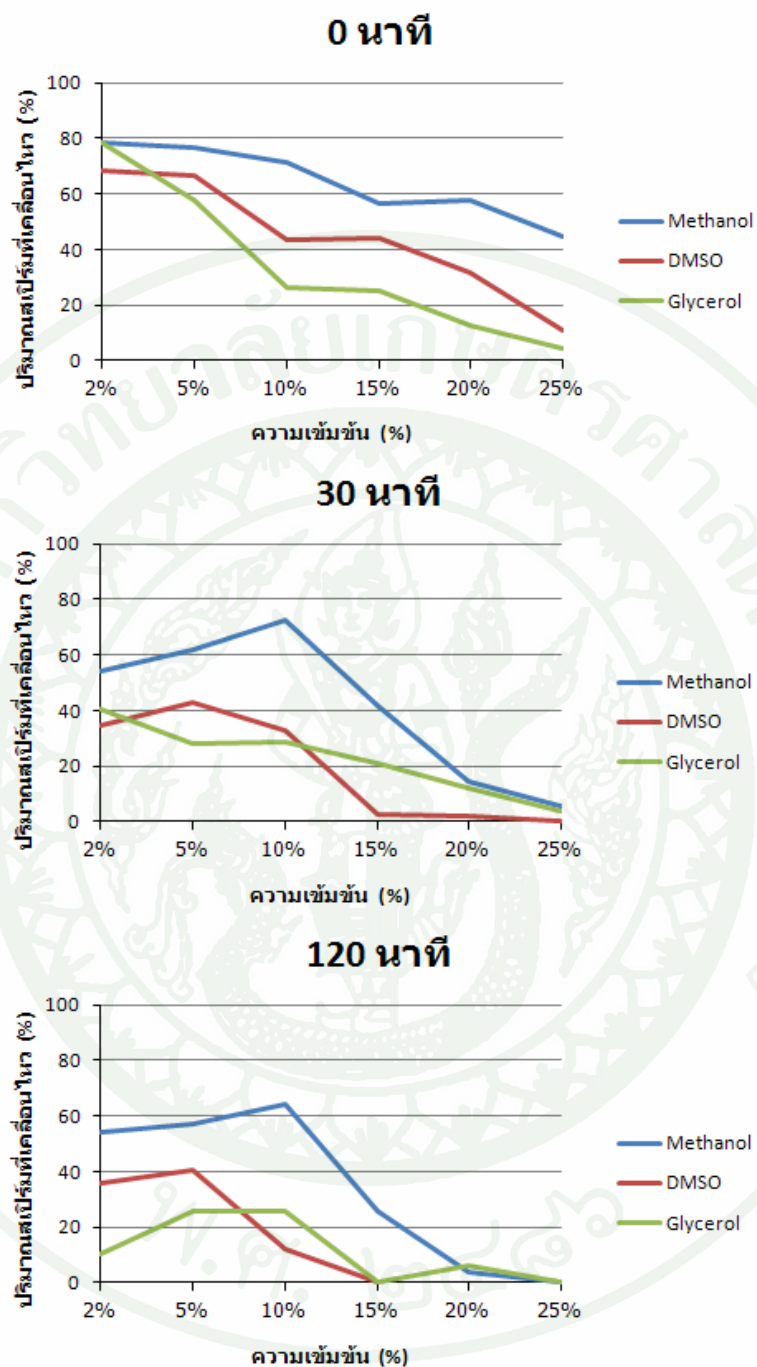
สารไครโอ- โพรเทคแทนท์	ความเข้มข้น (%)	ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%)		
		0 นาที	30 นาที	120 นาที
	0% (น้ำเชื้อสด)	92.67	91.83	91.04
methanol	2	78.60 ± 2.73 ^{Aa}	54.21 ± 3.92 ^{Aa}	54.15 ± 0.23 ^{Aa}
	5	76.75 ± 1.58 ^{Aa}	61.75 ± 0.79 ^{Aa}	57.34 ± 2.04 ^{Aa}
	10	71.62 ± 2.23 ^{Ab}	72.56 ± 6.14 ^{Aa}	64.23 ± 4.41 ^{Aa}
	15	56.82 ± 1.87 ^{Abc}	41.89 ± 1.72 ^{Ab}	25.52 ± 1.98 ^{Ab}
	20	57.79 ± 6.10 ^{Ac}	14.54 ± 4.59 ^{Ac}	3.84 ± 2.08 ^{Ac}
	25	44.59 ± 8.58 ^{Ad}	5.45 ± 1.86 ^{Ad}	0 ^{Ac}
DMSO	2	68.61 ± 4.54 ^{Ba}	34.65 ± 5.00 ^{Ca}	35.81 ± 8.13 ^{Ba}
	5	66.78 ± 0.54 ^{Ba}	42.72 ± 3.11 ^{Ca}	40.55 ± 5.64 ^{Ba}
	10	43.49 ± 4.65 ^{Bb}	32.95 ± 1.50 ^{Ca}	12.09 ± 4.12 ^{Ba}
	15	31.90 ± 3.85 ^{Bbc}	2.80 ± 1.34 ^{Cb}	0 ^{Bb}
	20	31.90 ± 3.63 ^{Bc}	2.15 ± 0.58 ^{Cc}	0 ^{Bc}
	25	11.11 ± 1.55 ^{Bd}	0 ^{Cd}	0 ^{Bc}
glycerol	2	78.39 ± 3.22 ^{Ca}	40.31 ± 9.67 ^{Ba}	22.02 ± 2.46 ^{Ba}
	5	57.48 ± 3.71 ^{Ca}	27.85 ± 4.84 ^{Ba}	25.58 ± 4.70 ^{Ba}
	10	26.53 ± 0.96 ^{Cb}	28.77 ± 3.51 ^{Ba}	25.54 ± 5.44 ^{Ba}
	15	21.82 ± 2.91 ^{Cbc}	25.12 ± 5.16 ^{Bb}	21.26 ± 3.20 ^{Bb}
	20	12.80 ± 3.19 ^{Cc}	12.34 ± 1.60 ^{Bc}	6.27 ± 2.26 ^{Bc}
	25	4.50 ± 1.82 ^{Cd}	3.99 ± 2.50 ^{Bd}	0 ^{Bc}

หมายเหตุ อักษรตัวพิมพ์ใหญ่คือชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอักษรตัวพิมพ์เล็กคือความเข้มข้น อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่แตกต่างกันตามลำดับ

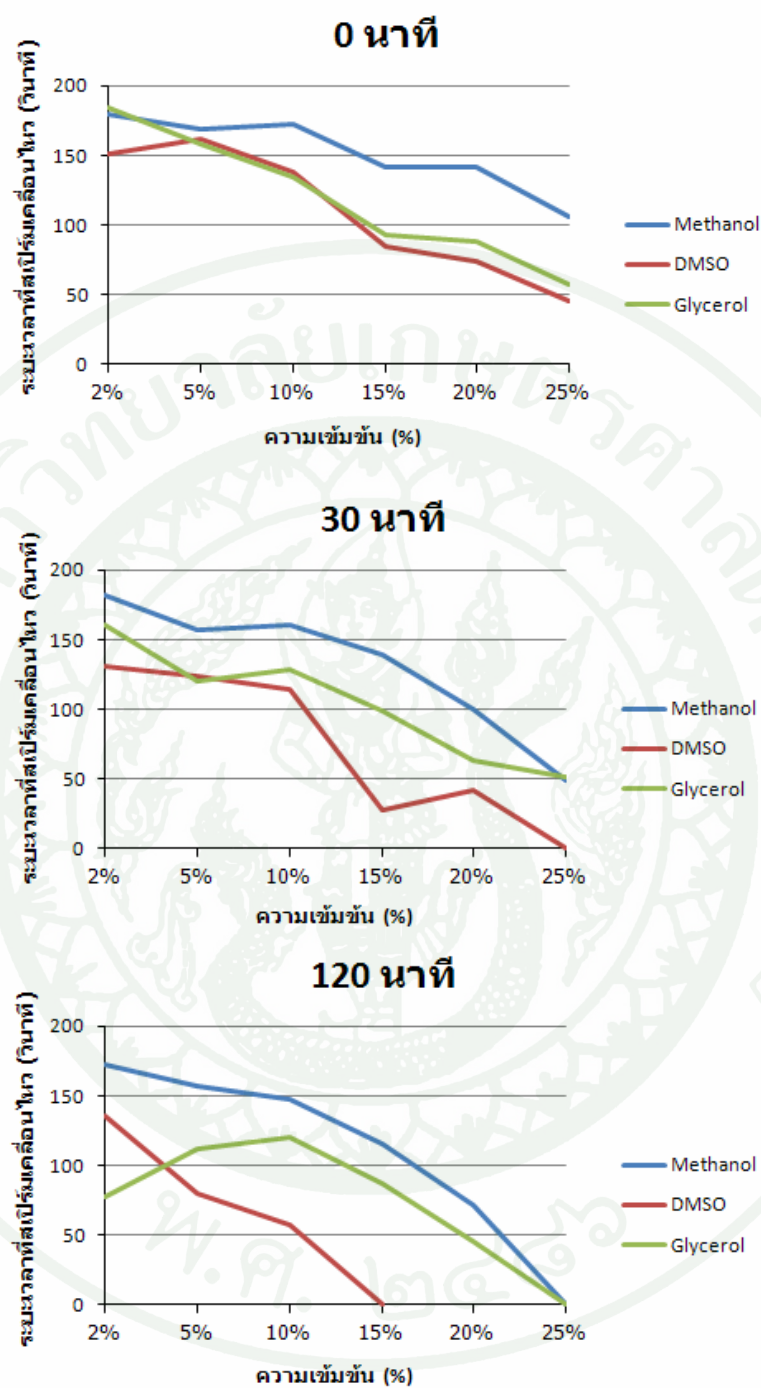
ตารางที่ 7 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่ผสมสารโครีโอโปรเทคแทนท์ 3 ชนิด (methanol, DMSO และ glycerol) ความเข้มข้น 6 ระดับ (2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) ที่ระยะเวลาเก็บ 0, 30 และ 120 นาที

สารโครีโอ- โปรเทคแทนท์	ความเข้มข้น (%)	ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที)		
		0 นาที	30 นาที	120 นาที
	0% (ไม่ผสม)	187	190	181
methanol	2	179.0 ± 2.83 ^{Aa}	181.5 ± 7.78 ^{Aa}	172.0 ± 11.31 ^{Aa}
	5	168.5 ± 2.12 ^{Aa}	157.5 ± 4.95 ^{Ab}	156.5 ± 9.19 ^{Ab}
	10	172.5 ± 2.12 ^{Ab}	160.5 ± 7.78 ^{Ab}	148.0 ± 11.31 ^{Ac}
	15	142.0 ± 2.83 ^{Ac}	139.0 ± 2.83 ^{Ac}	115.5 ± 7.78 ^{Ad}
	20	141.5 ± 6.36 ^{Ac}	99.5 ± 3.54 ^{Ad}	72.0 ± 8.49 ^{Ae}
	25	105.5 ± 14.85 ^{Ad}	49.5 ± 10.61 ^{Ae}	0 ^{Af}
DMSO	2	150.5 ± 9.19 ^{Ca}	131.5 ± 6.36 ^{Ca}	135.5 ± 6.36 ^{Ca}
	5	162.0 ± 11.31 ^{Ca}	123.5 ± 16.26 ^{Cb}	80.0 ± 8.49 ^{Cb}
	10	111.0 ± 14.14 ^{Cb}	85.0 ± 12.73 ^{Cb}	35.5 ± 6.36 ^{Cc}
	15	84.5 ± 12.02 ^{Cc}	28.0 ± 7.07 ^{Cc}	0 ^{Cd}
	20	73.5 ± 10.61 ^{Cc}	42.5 ± 6.36 ^{Cd}	0 ^{Ce}
	25	45.0 ± 5.66 ^{Cd}	0 ^{Ce}	0 ^{Cf}
glycerol	2	184.5 ± 4.95 ^{Ba}	160.0 ± 8.49 ^{Ba}	77.0 ± 14.14 ^{Ba}
	5	158.0 ± 12.73 ^{Ba}	120.0 ± 5.66 ^{Bb}	111.5 ± 13.44 ^{Bb}
	10	134.0 ± 11.31 ^{Bb}	128.0 ± 15.56 ^{Bb}	120.0 ± 22.63 ^{Bc}
	15	93.5 ± 12.02 ^{Bc}	99.0 ± 2.83 ^{Bc}	87.0 ± 12.73 ^{Bd}
	20	88.5 ± 13.44 ^{Bc}	63.0 ± 9.90 ^{Bd}	45.0 ± 4.24 ^{Be}
	25	57.0 ± 9.90 ^{Bd}	51.0 ± 9.90 ^{Be}	0 ^{Cf}

หมายเหตุ อักษรตัวพิมพ์ใหญ่คือชนิดของสารโครีโอโปรเทคแทนท์ และอักษรตัวพิมพ์เล็กคือความเข้มข้น อักษรที่แตกต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างชนิดและความเข้มข้นของสารโครีโอโปรเทคแทนท์ที่แตกต่างกันตามลำดับ



ภาพที่ 5 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (methanol, DMSO และ glycerol) ความเข้มข้น 6 ระดับ (2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) ณ ระยะเวลา 0, 30 และ 120 นาที



ภาพที่ 6 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่ผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (methanol, DMSO และ glycerol) ความเข้มข้น 6 ระดับ (2%, 5%, 10%, 15%, 20%, 25%) ณ ระยะเวลา 0, 30 และ 120 นาที

4.3 อัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคัดแก้ว

ผลของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคัดแก้วโดยใช้อัตราลดอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 อัตรา คือ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาทีก และใช้สารละลายแตกต่างกัน 3 สูตร คือ 6% fructose, 5% glucose และ GFR หลังจากแช่แข็งโดยใช้ไนโตรเจนเหลวแล้วนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้นาน 24 ชั่วโมง มาละลายแล้วตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 8 และภาพที่ 7, 8, 9 และ 10 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า สารละลายน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งที่สิ้นสุดระยะ equilibration ที่ผสมสารละลาย 6% fructose, 5% glucose และ GFR มีปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว 93.26 ± 2.73 , 94.37 ± 3.54 และ 94.04 ± 3.13 % ตามลำดับ และมีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 162.33 ± 8.50 , 173.00 ± 5.578 และ 175.67 ± 9.29 วินาที ตามลำดับ

จากการศึกษาพบว่า อิทธิพลจากอัตราลดอุณหภูมิ สูตรสารละลายที่แตกต่างกัน มีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาละลายอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) และอิทธิพลร่วมมีผลต่อปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) แต่ไม่มีผลต่อระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($P>0.05$) โดยอัตราลดอุณหภูมิ 2 และ 5 องศาเซลเซียส/นาทีก ร่วมกับการใช้สารละลาย 6% fructose และ 5% glucose ซึ่งมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวไม่แตกต่างกัน มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวมากกว่าการใช้สารละลาย GFR ที่อัตราลดอุณหภูมิทั้ง 3 อัตรา

ในส่วนของระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว พบว่าที่อัตราลดอุณหภูมิ 2 และ 5 องศาเซลเซียส/นาทีก ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างกัน ให้ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูงกว่าที่อัตรา 10 องศาเซลเซียส/นาทีก และสารละลาย 5% glucose ให้ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูงกว่าสารละลาย 6% fructose และ GFR ซึ่งสารละลายทั้งสองสูตรหลังนี้ให้ผลไม่แตกต่างกันในด้านระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว

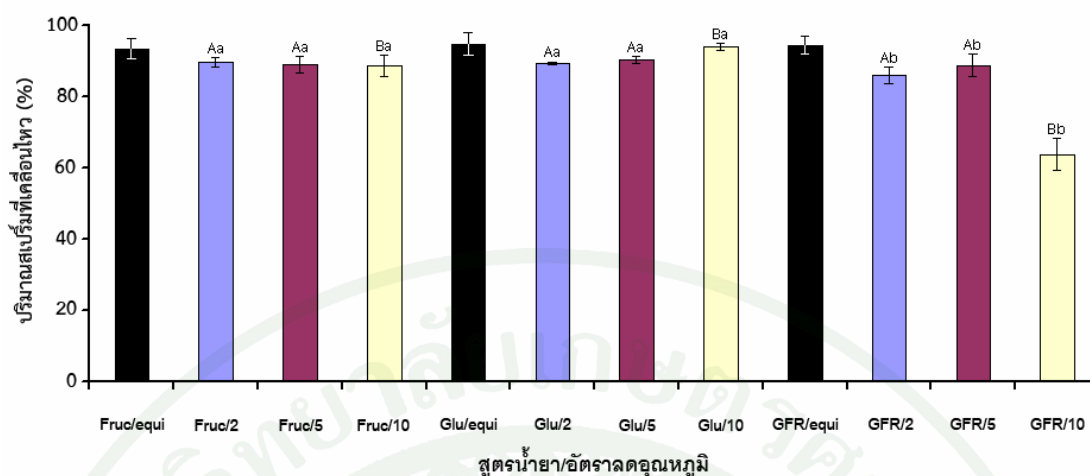
เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้อัตราลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาทีก ร่วมกับการใช้ 6% fructose ที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว 4 ช่วงเวลา คือ 1, 7, 42 และ 365 วัน มาละลายแล้วตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 9 และภาพที่ 7 และ 8 จากการวิเคราะห์สถิติพบว่าอิทธิพลของระยะเวลาที่เก็บรักษาที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อที่ละลายอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) โดยน้ำเชื้อ

แช่แข็งที่เก็บนาน 1 วัน มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว $85.93 \pm 3.13\%$ ซึ่งมีค่ามากกว่าที่เวลา 7, 42 และ 365 วัน (69.65 ± 8.57 , 60.27 ± 5.97 และ $67.85 \pm 4.96\%$ ตามลำดับ) ซึ่ง ณ 3 ช่วงเวลานี้ให้ค่าไม่แตกต่างกัน และพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 1 และ 365 วัน ซึ่งมีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 173.50 ± 0.71 และ 164.67 ± 7.09 วินาที ตามลำดับ มีค่ามากกว่าที่ระยะเวลา 7 และ 42 วัน (150.33 ± 8.33 และ 146.67 ± 9.29 วินาที ตามลำดับ)

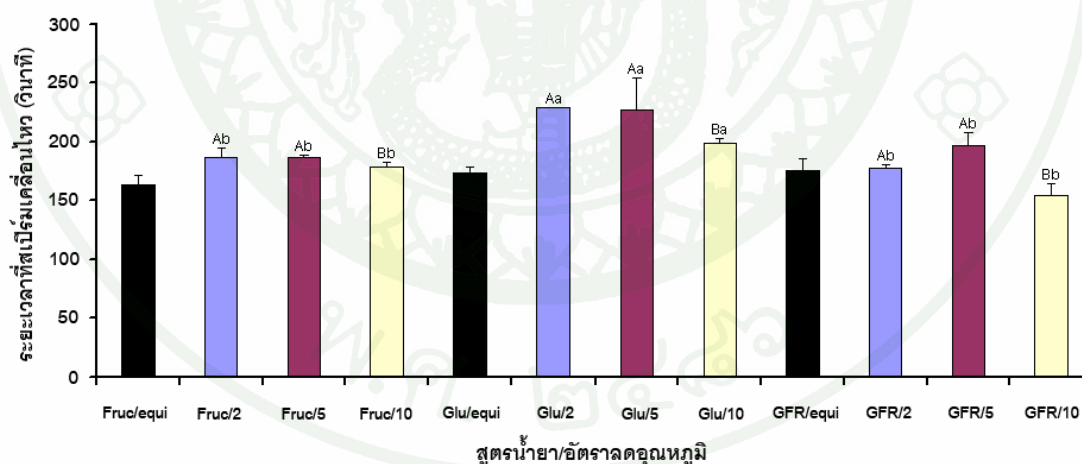
ตารางที่ 8 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อที่ละลาย จากการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดแก้วด้วยอัตราลดอุณหภูมิ 3 อัตรา (2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาทีก) และสูตรสารละลาย 3 สูตร (6% fructose, 5% glucose และ GFR)

อัตราลด อุณหภูมิ (°C/นาทีก)	สูตร สารละลาย	ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%)		ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที)	
		ก่อนแช่แข็ง	หลังละลาย	ก่อนแช่แข็ง	หลังละลาย
2	6% fructose	93.26 ± 2.73	89.58 ± 1.14^{Aa}	162.33 ± 8.50	186.00 ± 8.49^{Ab}
	5% glucose	94.37 ± 3.54	88.96 ± 0.37^{Aa}	173.00 ± 5.578	228.50 ± 0.71^{Aa}
	GFR	94.04 ± 3.13	85.83 ± 2.41^{Ab}	175.67 ± 9.29	177.50 ± 3.54^{Ab}
5	6% fructose	93.26 ± 2.73	88.88 ± 2.51^{Aa}	162.33 ± 8.50	186.00 ± 2.83^{Ab}
	5% glucose	94.37 ± 3.54	90.21 ± 1.18^{Aa}	173.00 ± 5.578	226.50 ± 27.58^{Aa}
	GFR	94.04 ± 3.13	88.35 ± 3.62^{Ab}	175.67 ± 9.29	196.50 ± 10.61^{Ab}
10	6% fructose	93.26 ± 2.73	88.59 ± 2.86^{Ba}	162.33 ± 8.50	178.50 ± 3.54^{Bb}
	5% glucose	94.37 ± 3.54	93.69 ± 0.89^{Ba}	173.00 ± 5.57	199.00 ± 2.83^{Ba}
	GFR	94.04 ± 3.13	63.68 ± 4.38^{Bb}	175.67 ± 9.29	154.00 ± 9.90^{Bb}

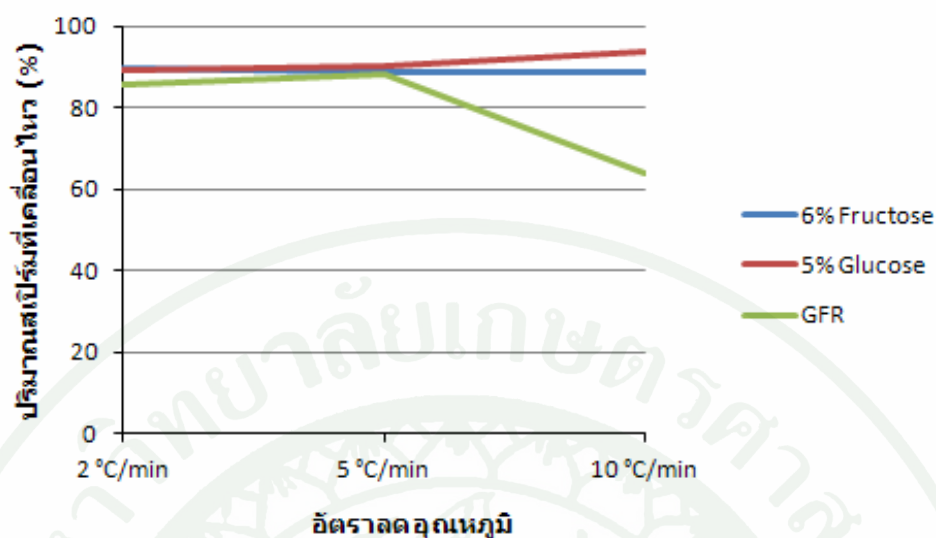
หมายเหตุ อักษรตัวพิมพ์ใหญ่คืออัตราลด และอักษรตัวพิมพ์เล็กคือเวลาที่เปลี่ยน อักษรตัวพิมพ์ใหญ่และเล็กกำกับที่แตกต่างกันในแถวแนวนั้นเดียวกันของอัตราลดและเวลาที่เปลี่ยน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างอัตราลดอุณหภูมิและสูตรสารละลายที่แตกต่างกัน ตามลำดับ



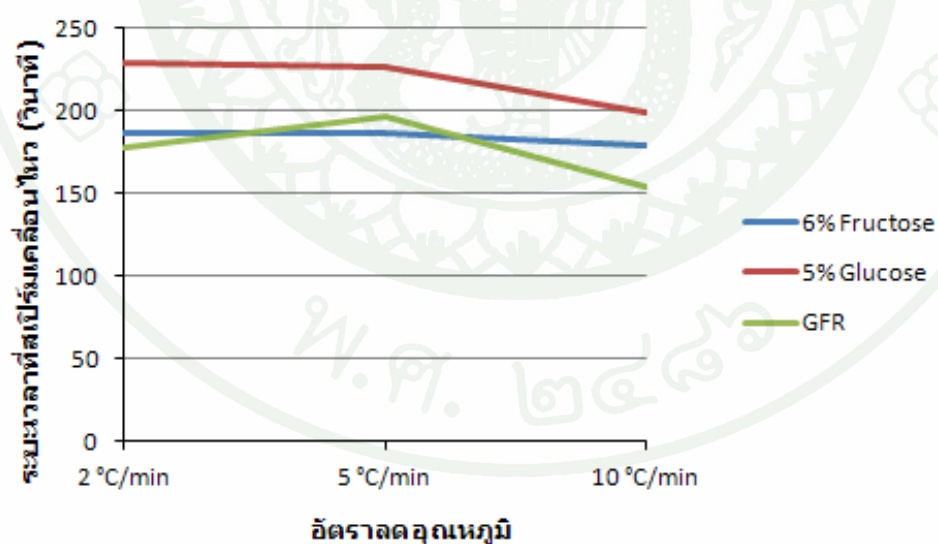
ภาพที่ 7 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้สารละลายเจือจาง คือ 6% fructose (Fruc), 5% glucose (Glu) และ GFR และอัตราลดอุณหภูมิคือ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที่ เก็บแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง ที่นำมาละลายเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำเชื้อก่อนแช่แข็งในระยะ equilibration (equi)



ภาพที่ 8 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้สารละลายเจือจาง คือ 6% fructose (Fruc), 5% glucose (Glu) และ GFR และอัตราลดอุณหภูมิคือ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที่ เก็บแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง ที่นำมาละลายเปรียบเทียบกับสารละลายน้ำเชื้อก่อนแช่แข็งในระยะ equilibration (equi)



ภาพที่ 9 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้สารละลายเจือจาง คือ 6% fructose (Fruc), 5% glucose (Glu) และ GFR และอัตราดองหนุมิคือ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที่ เก็บแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง ที่นำมาละลาย

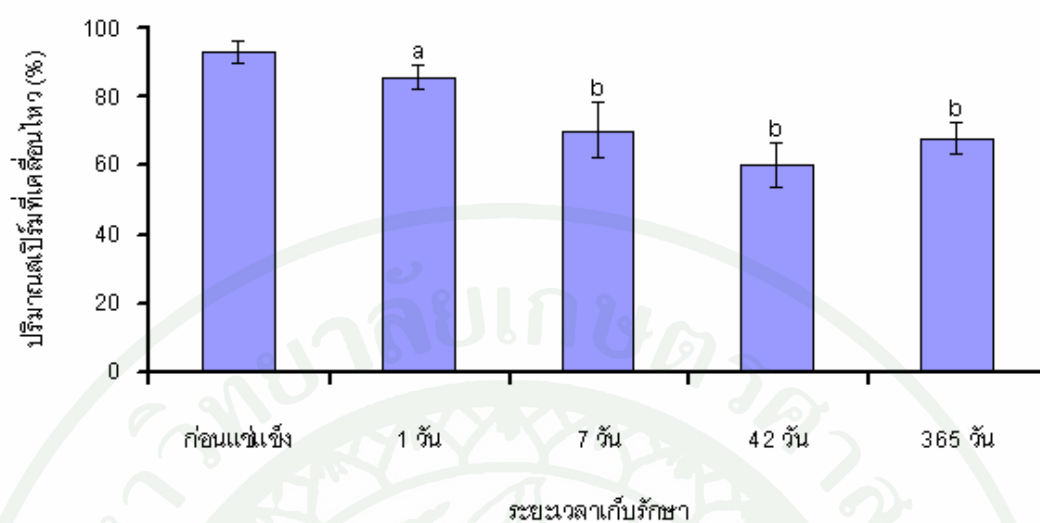


ภาพที่ 10 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อแช่แข็งที่ใช้สารละลายเจือจาง คือ 6% fructose (Fruc), 5% glucose (Glu) และ GFR และอัตราดองหนุมิคือ 2, 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที่ เก็บแช่แข็งนาน 24 ชั่วโมง ที่นำมาละลาย

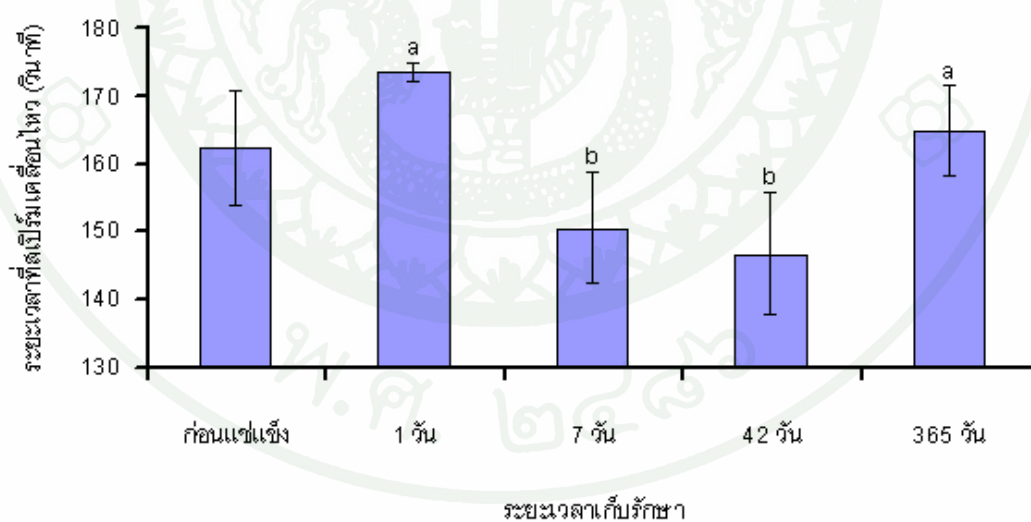
ตารางที่ 9 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อ ปลาคอดแก้วที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่นำออกมาละลาย หลังจากเก็บที่ระยะเวลา 1, 7, 42 และ 365 วัน

ระยะเวลา	ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%)	ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที)
น้ำเชื้อก่อนแช่แข็ง	92.95 ± 3.78	162.33 ± 8.50
1 วัน	85.93 ± 3.13 ^a	173.50 ± 0.71 ^a
7 วัน	69.65 ± 8.57 ^b	150.33 ± 8.33 ^b
42 วัน	60.27 ± 5.97 ^b	146.67 ± 9.29 ^b
365 วัน	67.85 ± 4.96 ^b	164.67 ± 7.09 ^a

หมายเหตุ อักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวตั้งแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ของปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว



ภาพที่ 11 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งนาน 1, 7, 42 และ 365 วัน ที่นำออกมาละลาย เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อก่อนแช่แข็ง



ภาพที่ 12 ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งนาน 1, 7, 42 และ 365 วัน ที่นำออกมาละลาย เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อก่อนแช่แข็ง

4.4 ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในการผสมเทียม

ผลการทดลองนำน้ำเชื้อปลากดแก้วที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่เจือจางด้วยสารละลาย 6% fructose และใช้ methanol เข้มข้น 10% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนที่แช่แข็งโดยใช้อัตราลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนเก็บรักษาไว้นาน 365 วัน มาละลายและนำน้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วยสารละลาย 6% fructose ในอัตราเจือจางเดียวกันกับน้ำเชื้อแช่แข็ง จากการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายมีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว $43.90 \pm 7.06\%$ นาน 124.33 ± 8.39 วินาที มีความหนาแน่นสเปิร์ม $1.34 \pm 0.03 \times 10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร และมีความหนาแน่นสเปิร์มที่มีชีวิต $0.59 \pm 0.11 \times 10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร และน้ำเชื้อสดมีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว $83.32 \pm 4.23\%$ นาน 195.33 ± 22.81 วินาที มีความหนาแน่นสเปิร์ม $1.34 \pm 0.02 \times 10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร และมีความหนาแน่นสเปิร์มที่มีชีวิต $1.12 \pm 0.05 \times 10^9$ เซลล์/มิลลิลิตร เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าอิทธิพลจากน้ำเชื้อที่แตกต่างกันมีผลต่อปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว และความหนาแน่นของสเปิร์มที่มีชีวิตอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) แต่ไม่มีผลต่อความหนาแน่นสเปิร์ม ($P > 0.05$) โดยน้ำเชื้อสดมีปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว และมีความหนาแน่นสเปิร์มที่มีชีวิตมากกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) แต่มีความหนาแน่นสเปิร์มไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) (ตารางที่ 10 และภาพที่ 9)

เมื่อทำการผสมเทียมโดยนำน้ำเชื้อที่ละลายและน้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วยสารละลาย 6% fructose ในอัตราเจือจางเดียวกับน้ำเชื้อที่ละลายไปผสมกับไข่ปลากดแก้วในอัตราปริมาณน้ำเชื้อ 0.15 มิลลิลิตร ต่อไข่ปริมาณ 20 กรัม (ประมาณ 5,200 ฟอง) ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 10 และภาพที่ 9 จากการวิเคราะห์สถิติพบว่าอัตราส่วนสเปิร์มมีชีวิตต่อไข่ (เซลล์/ฟอง) ระหว่างน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.01$) โดยน้ำเชื้อสดมีอัตราส่วนสเปิร์มมีชีวิตต่อไข่ $2.15 \pm 0.09 \times 10^5$ เซลล์/ฟอง สูงกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายซึ่งมีอัตราส่วนสเปิร์มมีชีวิตต่อไข่ $1.13 \pm 0.20 \times 10^5$ เซลล์/ฟอง เมื่อวิเคราะห์สถิติพบว่าอิทธิพลจากน้ำเชื้อไม่มีผลต่ออัตราปฏิสนธิและอัตราฟัก ($P > 0.05$) โดยไข่ที่ได้รับการผสมด้วยน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งมีอัตราปฏิสนธิ 72.16 ± 10.32 และ $73.43 \pm 13.93\%$ ตามลำดับ และมีอัตราฟัก 48.15 ± 5.62 และ $49.79 \pm 1.41\%$ ตามลำดับ

ตารางที่ 10 ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ความหนาแน่นสเปิร์ม ความหนาแน่นสเปิร์มที่มีชีวิต อัตราส่วนสเปิร์มมีชีวิตต่อไข่ อัตราปฏิสนธิและอัตราฟัก (%) ของไข่ปลาแค้แก้วที่ได้รับการผสมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 365 วัน เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วยสารละลายเจือจางสูตรเดียวกันในอัตราเจือจางเดียวกัน

พารามิเตอร์	น้ำเชื้อสด	น้ำเชื้อแช่แข็ง
ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%)	83.32 ± 4.23^a	43.90 ± 7.06^b
ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที)	195.33 ± 22.81^a	124.33 ± 8.39^b
ความหนาแน่นสเปิร์ม (เซลล์/มล)	$1.34 \pm 0.02 \times 10^{9a}$	$1.34 \pm 0.03 \times 10^{9a}$
ความหนาแน่นสเปิร์มที่มีชีวิต (เซลล์/มล)	$1.12 \pm 0.05 \times 10^{9a}$	$0.59 \pm 0.11 \times 10^{9b}$
อัตราส่วนสเปิร์มมีชีวิตต่อไข่ (เซลล์/ฟอง)	$2.15 \pm 0.09 \times 10^{5a}$	$1.13 \pm 0.20 \times 10^{5b}$
อัตราปฏิสนธิ (%)	72.16 ± 10.32^a	73.43 ± 13.93^a
อัตราฟัก (%)	48.15 ± 5.62^a	49.79 ± 1.41^a

หมายเหตุ อักษรกำกับที่แตกต่างกันในแนวนอนแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) ระหว่างน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง

วิจารณ์

1. ผลของสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินต่อการพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ของปลากดแก้วเทศเมีย

การทดลองใช้ฮอร์โมน LHRH และฮอร์โมน LHRH-CDs ฉีดให้กับแม่ปลากดแก้ว ในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมน LHRH และฮอร์โมน LHRH-CDs ซึ่งใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินเพื่อให้เป็นระบบนำส่งฮอร์โมน LHRH ให้ออกฤทธิ์แบบเนิ่นนาน ซึ่งทำหน้าที่เสมือนฮอร์โมน gonadotropin releasing hormone (GnRH) โดยจะไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินส่งไปกระตุ้นให้เซลล์สืบพันธุ์สร้างฮอร์โมน estradiol ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ไปทำให้รังไข่มีการพัฒนาเซลล์ไข่ และฮอร์โมนดังกล่าวยังมีผลให้ปลากดแก้วพัฒนาไข่จนถึงระยะสุดท้ายจนสามารถไข่ไปผสมเทียมได้ (วิเศษพร และคณะ, 2537) และจากผลการทดลองในการศึกษาครั้งนี้พบว่าการใช้ LHRH-CDs ในอัตรา 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ domperidone 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถกระตุ้นการตกไข่ของแม่ปลากดแก้วและผลิตลูกปลาวัยอ่อนได้ สำหรับการวางแผนการทดลองในครั้งนี้ใช้ปลาชุดที่ฉีดฮอร์โมนและชุดควบคุมเป็นปลารุ่นเดียวกัน มีความยาวและน้ำหนักไม่แตกต่างกัน ปลากดแก้วที่ทดลองจึงมีความสมบูรณ์เพศอยู่ในระดับเดียวกัน และมีระดับฮอร์โมน estradiol และค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์ก่อนฉีดกระตุ้นไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) สำหรับการแบ่งการทดลองออกเป็น 3 ช่วงเวลา ซึ่งเป็นช่วงที่แม่ปลากดแก้วมีระดับความสมบูรณ์เพศต่างกัน คือ ช่วงมีความสมบูรณ์เพศต่ำ ปานกลาง และความสมบูรณ์เพศสูง การฉีดฮอร์โมนในอัตรา 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 30 วัน จึงนำมาศึกษาสัมประสิทธิ์ความสมบูรณ์ของรังไข่ ปริมาณฮอร์โมน estradiol และพัฒนาการของโอโอไซด์ปลากดแก้วในระยะต่าง ๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นความแตกต่างของระดับฮอร์โมน ค่า GSI และระยะพัฒนาการของโอโอไซด์ ในปลาชุดการทดลองจะเป็นผลมาจากฮอร์โมนในรูปแบบที่แตกต่างกันเป็นหลัก ฮอร์โมน estradiol นั้นมีรายงานว่าส่งผลไปกระตุ้นให้ตับสร้างสารตั้งต้นของไข่แดงคือ vitellogenin และไปสะสมในไข่ (hepatic vitellogenesis) ในปลานิล (Coward and Bromage, 2000) และระดับ estradiol มีความผันแปรโดยตรงต่อระดับ LHRH โดยมีรายงานว่าระดับ estradiol ในปลา Gilthead seabream (*Sparus aurata*) และปลา silver perch (*Bidyanus bidyanus*) จะเพิ่มขึ้นหลังจากฉีดฮอร์โมน LHRH (Zohar et al., 1988; Levavi-Sivan et. al., 2004) ดังนั้นหากมีการวัดระดับฮอร์โมน LHRH ใน plasma ของปลากดแก้วจะสามารถทราบถึงประสิทธิภาพของสารไซโคลเด็กซ์ทรินได้โดยตรง แต่ในการศึกษา

ครั้งนี้ได้วัดระดับฮอร์โมน estradiol ซึ่งเป็นผลทางอ้อมของฮอร์โมน LHRH ที่ฉีดกระตุ้นจึงอาจมีข้อผิดพลาดเนื่องจาก estradiol ที่วัดได้นอกจากเป็นผลจาก LHRH แล้วยังมีผลมาจาก GnRH ที่มีอยู่ในตัวปลาด้วยอีกส่วนหนึ่ง อย่างไรก็ตามผลการศึกษานี้ยังไม่พบความแตกต่างของปริมาณฮอร์โมน estradiol และค่า GSI ที่เป็นผลมาจาก LHRH และ LHRH-CDs แต่พบความแตกต่างที่เป็นผลมาจากช่วงความสมบูรณ์เพศของแม่ปลาคอดแก้ว แสดงให้เห็นว่าผลของฮอร์โมนในรูปแบบสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินส่งผลในระดับต่ำต่อปลาคอดแก้วทำให้ระดับ estradiol ใน plasma ของปลาคอดที่ฉีดฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นไม่แตกต่างจากปลาคอดควบคุม ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณฮอร์โมน LHRH ที่ใช้ในอัตรา 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม นั้นต่ำเกินไป เมื่อเทียบกับการทดลองในปลากะพงขาว (Almendras *et al.*, 1988), ปลา Herring (*Clupea harengus*) (Carolsfeld *et al.*, 1988) และปลา Greenback flounder (*Rhombosolea tapirina*) (Lim *et al.*, 2004) ที่ทดลองโดยใช้ระบบนำส่งฮอร์โมน LHRH แบบฮอร์โมนเม็ด (Hormone pellet) และมีความเข้มข้นฮอร์โมนอยู่ในช่วง 100-1,000 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ในขณะที่การทดลองนี้ที่ใช้ความเข้มข้นฮอร์โมนเพียง 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม จึงทำให้ฮอร์โมนถูกปล่อยออกจากระบบในช่วงเวลาแรกจนเกือบหมดส่งผลให้ฮอร์โมนช่วงระยะหลัง ๆ มีออกมาน้อยมาก จนทำให้ระดับฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นในปลาคอด การทดลองไม่แตกต่างกัน และอาจเกิดจากกลไก dopaminergic inhibition ซึ่งพบในปลาหลายชนิด โดยกลไกนี้เกิดขึ้นเมื่อมีระดับฮอร์โมน LHRH สูงในกระแสโลหิต ทำให้สมองสร้างสาร dopamine ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน LHRH (Levavi-Sivan *et al.*, 2003)

อย่างไรก็ตาม ผลของฮอร์โมนในรูปแบบสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินมีผลต่อการพัฒนาของโอโอไซด์ปลาคอดแก้วเมื่อเปรียบเทียบกับระยะพัฒนาการของโอโอไซด์ในระยะต่าง ๆ โดยพบโอโอไซด์ในระยะ maturing และ atretic มากที่สุดในช่วงที่ได้รับฮอร์โมน LHRH และ LHRH-CDs แสดงให้เห็นผลของการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน LHRH และการออกฤทธิ์แบบเนิ่นนานของฮอร์โมน LHRH-CDs โดยทำให้โอโอไซด์ในระยะ maturing มีเปอร์เซ็นต์เพิ่มมากขึ้น ในขณะที่ฮอร์โมนไม่มีผลต่อพัฒนาของโอโอไซด์ในระยะ mature และทำให้โอโอไซด์ในระยะ mature เปลี่ยนสภาพเป็นไข่ฝ่อ (Atresia couste) เมื่อแม่พันธุ์ไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่แต่ก็พบในเปอร์เซ็นต์ที่น้อยมากสอดคล้องกับ Lam (1982) ได้สรุปว่า การตอบสนองต่อฮอร์โมน LHRH และ LHRHa เปลี่ยนแปลงไปตามระยะการเจริญของรังไข่และอวัยวะโดยปลาที่มีไข่และน้ำเชื้อเจริญเต็มที่ตอบสนองต่อฮอร์โมนนี้ได้ดีกว่าและการฉีดฮอร์โมน LHRHa ในระดับฮอร์โมนที่สูงเกินไปจะมีผลในทางยับยั้งการตกไข่ อย่างไรก็ตามปริมาณฮอร์โมนที่ฉีดให้แม่ปลาในครั้งนี้ไม่สามารถกระตุ้นให้แม่ปลาคอดไข่ เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะพันธุ์ปลาคอดแก้วโดยใช้ฮอร์โมนชนิดเดียวกันในอัตรา

เดียวกันที่รายงานในวิศณุพร และคณะ (2551) ที่ระดับฮอร์โมนเดียวกันพบว่าสามารถกระตุ้นให้แม่ปลาตกไข่ที่มีความสมบูรณ์เพศตกไข่ได้ แต่แตกต่างกันตรงไม่ได้ใช้ร่วมกับ domperidone และไม่ได้นำแม่ปลามาตรวจสอบการตกไข่และรีดไข่เพื่อผสมเทียม ทั้งนี้อาจจะมีสาเหตุจากสาร dopamine (DA) ที่สมองสร้างขึ้นมาต่อต้านการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน LHRH ต่อต่อมใต้สมอง ทำให้ต่อมใต้สมองไม่สามารถสร้างโกนาโดโทรปินที่จะไปกระตุ้นพัฒนาการของรังไข่ให้พัฒนาก้าวหน้าต่อไปจนถึงขั้นสุดท้ายที่เรียกว่า dopaminergic inhibition ซึ่งพบในกลุ่มปลา Tilapia ปรากฏการณ์นี้มีเกิดขึ้นให้เห็นชัดเจนเป็นปกติ (Levavi-Sivan *et al.*, 2003; Levavi-Sivan *et al.*, 2004; Levavi-Sivan *et al.*, 2006) และในปลา rainbow trout (Vacher *et al.*, 2000; Vacher *et al.*, 2002) ปลาคุกออฟริกา *Clarias gariepinus* (Van Asselt *et al.*, 1990) และปลาไหลทะเล *Anguilla anguilla* (Vidal *et al.*, 2004) เป็นต้น ดังนั้นในการเพาะพันธุ์ปลาในกลุ่มที่มีปรากฏการณ์เช่นนี้จะต้องใช้สารยับยั้ง DA ที่เรียกว่า dopamine antagonist เช่น pimozide, domperidone, metoclopramide เป็นต้น ฉีดเข้าตัวปลาพร้อมกับฮอร์โมน GnRHa เพื่อไปยับยั้งการออกฤทธิ์ของ DA ทำให้ GnRHa ที่ฉีดสามารถกระตุ้นต่อมใต้สมองให้สร้างโกนาโดโทรปินขึ้นไปกระตุ้นรังไข่ให้พัฒนาก้าวหน้าต่อไปจนถึงขั้นสุดท้าย (Peter and Yu, 1997; Mylonas and Zohar, 2001a, 2001b; Ando *et al.*, 2003; Yaron *et al.*, 2003; Aizen *et al.*, 2005)

2. ผลของการใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์

การทดลองใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินผสมกับฮอร์โมนสังเคราะห์ฉีดกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะพันธุ์ปลาตกไข่ โดยใช้พ่อแม่พันธุ์จากการเพาะเลี้ยงที่ผ่านการคัดพันธุ์รุ่นที่ 1 มีอายุ 3 ปี และเริ่มเจริญพันธุ์ในปีแรก เปรียบเทียบผลการเพาะพันธุ์ระหว่างการใช้ฮอร์โมน LHRH กับฮอร์โมน LHRH-CDs พบว่า ฮอร์โมนทั้งสองชุดการทดลองสามารถกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่และผลิตลูกปลาวัยอ่อนได้ โดยมีระยะเวลาในการวางไข่และน้ำหนักไข่ของแม่ปลาไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) อัตราการผสมติดและอัตราการฟักของไข่ปลาชุดที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน LHRH-CDs สูงกว่าฮอร์โมน LHRH อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แม่ปลาตกไข่ที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน LHRH และฮอร์โมน LHRH-CDs วางไข่ในเวลา 12.1 ± 0.09 ชั่วโมง และ 12.1 ± 0.54 ชั่วโมง มีน้ำหนักไข่เฉลี่ย 136.3 ± 27.74 กรัม และ 136.0 ± 31.29 กรัม มีอัตราการผสมติดเฉลี่ย 52.7 ± 16.46 เปอร์เซ็นต์ และ 84.0 ± 9.70 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการฟักไข่ 35.0 ± 10.35 เปอร์เซ็นต์ และ 53.8 ± 18.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่ารายงานของวิศณุพร และคณะ (2551) ที่เพาะพันธุ์ปลาตกไข่จากการเพาะเลี้ยงที่ผ่านการคัดพันธุ์รุ่นที่ 1 เช่นเดียวกัน

โดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ buserelin acetate ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ domperidone โดยแม่ปลาชุดควบคุมและชุดกักเลือดวางไข่ในระยะเวลา 12-13 ชั่วโมง มีน้ำหนักรังไข่เฉลี่ย 100.6 ± 42.97 กรัม และ 94.1 ± 46.46 กรัม มีอัตราการผสม 55.9 ± 23.78 เปอร์เซ็นต์ และ 54.4 ± 16.31 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการฟัก 27.8 ± 18.67 เปอร์เซ็นต์ และ 30.0 ± 15.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ชนิดของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะพันธุ์มีผลให้ประสิทธิภาพของการเพาะพันธุ์ปลา กัดแก้วแตกต่างกัน โดยฮอร์โมน LHRH มีประสิทธิภาพในการเพาะพันธุ์ดีกว่าฮอร์โมนสังเคราะห์ buserelin acetate และฮอร์โมน LHRH-CDs มีประสิทธิภาพในการเพาะพันธุ์สูงกว่าฮอร์โมน LHRH และ buserelin acetate สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินจึงสามารถทำหน้าที่เป็น โมเลกุลพาหะให้กับฮอร์โมน LHRH มีผลให้ฮอร์โมนถูกปลดปล่อยออกจากสารประกอบเชิงซ้อน ที่ละน้อย ๆ มีประสิทธิภาพในการช่วยออกฤทธิ์ของฮอร์โมน LHRH ให้เนิ่นนาน ทำให้กระตุ้นการ สังเคราะห์ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมองและหลั่งออกมาอย่างต่อเนื่องและคงอยู่ใน กระแสเลือดในระยะเวลายาวนานขึ้น ทำให้การควบคุมการเจริญขึ้นสุดท้ายของไข่และการตกไข่ ของโกนาโดโทรปินทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ส่วนการฉีดฮอร์โมน LHRH และ buserelin acetate ให้ค่าอัตราการผสมและอัตราการฟักต่ำกว่านั้น ซึ่งอุทัยรัตน์ (2538) อธิบายว่าการ ฉีดฮอร์โมนในอัตราสูงเกินไป (Overdose) จะมีผลให้รังไข่ถูกเร่งมากเกินไป ทำให้คุณภาพของไข่ที่ได้ เลวลง เนื่องจากไข่อาจหลุดจากฟอลลิเคิลโดยที่ยังเจริญขึ้นสุดท้ายไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามผล การทดลองในครั้งนี้ แสดงค่าอัตราการผสมและอัตราการฟักที่ต่ำกว่ารายงานของวิศนุพร และคณะ (2537) และสมบัติ และ เจริญ (2547) เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ปลาที่ใช้มีความแตกต่างกันที่อายุและ ขนาดของพ่อแม่พันธุ์ พ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นพ่อแม่พันธุ์จากการเพาะเลี้ยงที่มีอายุ แรกเริ่มเจริญพันธุ์ในปีแรก การพัฒนาของรังไข่และอวัยวะอาจจะยังไม่สมบูรณ์โดยอุทัยรัตน์ (2538) อธิบายว่าการตอบสนองต่อ LHRH และ LHRHa จะเปลี่ยนแปลงไปตามระยะการเจริญของ รังไข่และอวัยวะ โดยปลาที่มีไข่และน้ำเชื้อเจริญเต็มที่ตอบสนองต่อฮอร์โมนนี้ได้ดีกว่า

3. พัฒนาการของกัพพะและลูกปลาวัยอ่อน

การศึกษาพัฒนาการของไข่ โดยใช้เอนไซม์โปรเนสย่อยสลายสารเหนียวที่ห่อหุ้มบริเวณ เปลือกไข่ออกและเลี้ยงไข่และตัวอ่อนในเพลทวุ้น 2% agar และเติม embryonic medium พบว่าไข่ ปลากัดแก้วมีรูปร่างกลมรี มีสีเหลืองใส เป็นไขจมนิดเดียว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.25 มิลลิเมตร มีสารเหนียวห่อหุ้มหนาและไข่จะเริ่มพัฒนาเข้าสู่ระยะคลีเวลหลังจากผสมสเปิร์ม 45 นาที และเริ่มฟักออกเป็นตัวในเวลา 30-38 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลูกปลาที่ฟัก

ออกเป็นตัวมีความยาวเฉลี่ย 5.0 มิลลิเมตร ฝูงไข่แดงจะยุบหมดเมื่ออายุ 3 วัน เริ่มกินอาหารและเข้าสู่ลูกปลาวัยอ่อนระยะแรกเมื่ออายุ 4-8 วัน ลูกปลาวัยอ่อนระยะหลังเมื่ออายุ 9-12 วัน ซึ่งมีระยะการพัฒนากลไกและลูกปลาวัยอ่อนใกล้เคียงกับรายงานของวิศนุพร และคณะ (2537) พบว่าปลาตกแก้วที่มีระยะฟักออกเป็นตัว 30-32 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27-29 องศาเซลเซียส ลูกปลากดแก้วฟักออกเป็นตัวมีความยาว 4.97-6.0 มิลลิเมตร อายุ 3 วัน ให้อาหารยุบและกินไรแดงขนาดเล็กเป็นอาหาร อายุ 4 วัน มีหนวดครบ 4 คู่ และมีลักษณะคล้ายตัวเต็มวัยเมื่ออายุ 10 วัน ส่วนพัฒนาการของลูกปลาน้ำจืดจนถึงระยะตัวเต็มวัยนั้น ลูกปลากดแก้วอายุ 180 วัน มีรูปร่างเหมือนตัวเต็มวัย แต่อวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่พัฒนาและจะเริ่มสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เมื่อปลาอายุ 1 ปี และพัฒนาเข้าสู่ระยะโตเต็มวัยเมื่อปลาอายุ 2 ปี ระบบสืบพันธุ์เจริญเต็มที่และสร้างเซลล์สืบพันธุ์พร้อมที่จะทำการผสมพันธุ์ได้ โดยปลากดแก้วระยะนี้มีความยาวมาตรฐาน 45.14 ± 4.25 เซนติเมตร ความยาวเหยีด 54.69 ± 5.43 เซนติเมตร น้ำหนัก $1,274.53 \pm 354.97$ กรัม

4. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดแก้วโดยวิธีแช่แข็ง

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ 3 สูตร ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดแก้วแบบระยะสั้น พบว่าสารละลาย GFR และ 0.9% NaCl ที่ผสมยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin เข้มข้น 50 IU/มิลลิลิตร และ 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดแก้วไว้ได้นาน 6 วัน ส่วนสารละลาย MFR พบว่ามีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารละลาย 2 สูตรแรก โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นาน 4 วันเท่านั้น ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของนิศา (2539), อนงค์ (2539) และพลชาติ และคณะ (2547) ซึ่งพบว่าสารละลายสูตรที่มีเกลือ NaCl เป็นหลักมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคูอุย ปลาสร้อยและปลานิลแบบระยะสั้นได้ผลดีกว่าสารละลายสูตรอื่น ๆ ส่วนสารละลาย GFR นั้นเป็นสารละลายที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคูอุย (Viveiros *et al.*, 2000) ซึ่งเป็นปลาในกลุ่ม catfish ที่มีความสัมพันธ์ในทางอนุกรมวิธานใกล้ชิดกับปลากดแก้วมากที่สุด ณ ปัจจุบัน ที่มีรายงานวิชาการด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็ง ส่วนสารละลาย MFR นั้นแม้ว่าจะมีเกลือ NaCl เป็นหลักเช่นเดียวกันและเป็นสารละลายที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล (Rana and McAndrew, 1989) แต่กลับมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารละลาย 0.9% NaCl และ GFR เมื่อนำมาใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากดแก้ว ซึ่งเมื่อพิจารณาองค์ประกอบอื่น ๆ จะพบว่าสารละลาย MFR มีเกลือ KCl เป็นส่วนผสมเข้มข้น 40.24 mM ซึ่งมีความเข้มข้นมากกว่าในสารละลาย GFR (3.74 mM) ถึง 10.76 เท่า ในขณะที่ในสารละลาย 0.9% NaCl ไม่มี KCl เป็นส่วนผสมอยู่เลย ผลที่ได้บ่งบอกว่าสารละลายที่มีปริมาณ

K^+ สูงอาจมีผลกระทบต่อสเปิร์มปลาคอดแก้ว ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของนิสา (2539) และ อนงค์ (2539) ซึ่งรายงานว่าสูตรสารละลายที่มีปริมาณ K^+ สูง ๆ อาจเป็นพิษต่อสเปิร์มปลาคอดกูด และปลาสวาย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ K^+ ไม่ใช่ส่วนประกอบในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (Seminal fluid) เซรุ่มหรือน้ำหล่อเลี้ยงไข่ (Ovarian fluid) แต่การศึกษากครั้งนี้ไม่อาจจะสรุปว่า K^+ มีพิษต่อสเปิร์ม ปลาคอดแก้วซึ่งจะต้องมีการทดลองที่เฉพาะเจาะจงต่อไป อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อปลาคอดแก้วที่เก็บ รักษาในสารละลาย GFR และ 0.9% NaCl เมื่อเก็บนาน 72 ชั่วโมง (3 วัน) พบว่า มีปริมาณ สเปิร์ม เคลื่อนไหวลดลงเหลือเพียง 14-20% สันนิษฐานว่าอาจเป็นผลมาจากการปนเปื้อนจากเลือดและ สิ่งปนเปื้อนอื่นๆ ซึ่งเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงได้ยากหากเป็นการเก็บน้ำเชื้อจากพูอัณฑะ เนื่องจากอัณฑะมี เส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงมาก และในเลือดปลาน้ำจืดนั้นจะมีองค์ประกอบของโปรตีนชนิดต่าง ๆ และ มีกิจกรรม anti-proteinase สูงกว่าในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์มถึง 20 เท่า (Ciereszko *et al.*, 2000) ซึ่งสิ่ง เหล่านี้อาจก่อให้เกิดพิษต่อสเปิร์มปลาคอดแก้วเนื่องจากการย่อยสลายหรือการเสียสภาพของโปรตีน เหล่านี้อาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสเปิร์มเมื่อเก็บรักษาจนถึงช่วงเวลาดังกล่าว

จากการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารโครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ซึ่งนิยมใช้ในการ แช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลาย ๆ ชนิด คือ methanol, DMSO และ glycerol ที่ความเข้มข้น 2-25% จะเห็นว่า เมื่อความเข้มข้นของสารโครโอโพรเทคแทนท์ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์ม เคลื่อนไหวลดลงเมื่อเก็บนานทั้ง 3 ช่วงเวลา ทั้งนี้เป็นผลมาจากความเป็นพิษต่อเซลล์สเปิร์มของ โครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิด ซึ่งอยู่ในกลุ่มที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (Permeating) โครโอโพรเทคแทนท์กลุ่มนี้สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์สเปิร์มได้อย่างรวดเร็ว ส่งผลให้เกิดการสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) จากการปรับสมดุลความเข้มข้นระหว่างน้ำภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่ง ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์สเปิร์ม (Jamieson, 1991; Denniston *et al.*, 2000) อย่างไรก็ตามการ เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งจำเป็นต้องผสมโครโอโพรเทคแทนท์ในความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจาก สารโครโอโพรเทคแทนท์จะช่วยลดความเสียหายให้กับเซลล์ได้ในกระบวนการแช่แข็ง จากผล การศึกษาในครั้งนี้พบว่า methanol มีพิษต่อสเปิร์มปลาคอดแก้วต่ำสุด เมื่อเปรียบเทียบกับสาร DMSO และ glycerol ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Mongkonpunya *et al.* (2000) ซึ่งพบว่า methanol มีพิษต่อสเปิร์มปลาสวาย ปลาคอดกูด และปลาบึก ต่ำที่สุด methanol เป็นสารโครโอโพรเทคแทนท์ที่มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาหลาย (Danio rerio) ปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) (Tiersch *et al.*, 1994) นอกจากนี้ methanol ยังสามารถแพร่เข้าสู่เซลล์ได้เร็ว กว่า DMSO เพราะมีขนาดโมเลกุลที่เล็กกว่า ดังนั้น methanol จึงใช้ระยะเวลาในการให้สเปิร์ม ปรับตัวสั้นกว่าจึงทำให้สามารถลดพิษของ methanol ที่มีต่อเซลล์ได้ดี (Tiersch *et al.*, 1994) โดย

สารละลายน้ำเชื้อที่มี methanol เข้มข้น 10% ซึ่งเป็นความเข้มข้นทั่วไปของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา (McAndrew *et al.*, 1993)

จากการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคอดแก้วโดยใช้อัตราลดอุณหภูมิแตกต่างกัน 3 อัตรา และใช้สารละลายแตกต่างกัน 3 สูตร โดยใช้ methanol เข้มข้น 10% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ซึ่งความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ 10% ถือว่าอยู่ในช่วงที่เหมาะสมสำหรับแช่แข็งปลาน้ำจืดทั่วไป (McAndrew *et al.*, 1993) เนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่สามารถยับยั้งการสูญเสียน้ำของเซลล์สเปิร์มจากความเข้มข้นของสารละลายน้ำเชื้อที่เพิ่มขึ้น (Solute effect) ในกระบวนการแช่แข็งที่เกิดในช่วงอุณหภูมิ 0 ถึง -20 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นช่วงอุณหภูมิที่น้ำเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็งส่งผลให้ทำให้สารละลายที่เหลือมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นจนทำให้น้ำภายในเซลล์ไหลออกจากเซลล์เพื่อรักษาสมดุลระหว่างน้ำภายในและภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์สเปิร์มเสียหายเนื่องจากเซลล์เหี่ยว (Leung, 1991) จากการทดลองพบว่าการใช้สารละลาย 6% fructose และ 5% glucose แช่แข็งน้ำเชื้อที่อัตราลดอุณหภูมิ 2 และ 5 องศาเซลเซียส/นาที่ ส่งผลให้น้ำเชื้อที่ละลายมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวสูงกว่าสารละลาย GFR ที่ใช้อัตราลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที่ ผลที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาของ Gwo *et al.* (1999), Steyn *et al.* (1985) และ Urbányi *et al.* (2000) ซึ่งรายงานว่าการใช้สารละลาย fructose และ glucose มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*) และปลาคูกยักษ์ (*Clarias gariepinus*) และการใช้อัตราลดอุณหภูมิต่ำ (2 และ 5 องศาเซลเซียส/นาที่) มีประสิทธิภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคอดแก้วมากกว่าการใช้อุณหภูมิสูง (10 องศาเซลเซียส/นาที่) ซึ่งอัตราลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็งนั้นถือเป็นปัจจัยที่สำคัญอย่างยิ่งในการแช่แข็งเซลล์ให้ประสบความสำเร็จ นอกจากนี้อัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับสเปิร์มยังมีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดปลา ซึ่งผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าสเปิร์มปลาคอดแก้วควรใช้อัตราลดอุณหภูมิต่ำๆ ในการแช่แข็ง สิ่งที่น่าสังเกตคือสารละลาย GFR ในการศึกษาครั้งนี้แม้จะมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคอดแก้วแบบระยะสั้น แต่เมื่อนำมาใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาคอดแก้วกลับมีประสิทธิภาพต่ำกว่าสารละลาย fructose และ glucose ทั้งนี้สันนิษฐานว่าสารละลาย 2 สูตรนี้มีน้ำตาล fructose และ glucose เป็นองค์ประกอบซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์แบบออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Non-permeating cryoprotectant) (Jamieson, 1991) ซึ่งอาจช่วยเสริมฤทธิ์การปกป้องเซลล์จากการถูกแช่แข็งร่วมกับ methanol ได้เป็นอย่างดี ข้อพึงสังเกตจากการทดลองครั้งนี้คือ น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษานาน 7 วัน 42 วัน และ 365 วัน มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวต่ำกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 1 วัน ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Cabrita *et al.* (1998) ที่ว่าน้ำเชื้อแช่แข็งจะมีสเปิร์มส่วนหนึ่ง

เสียหายในระหว่างการแช่แข็ง การละลาย และระหว่างการเก็บรักษา แต่น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 1 วันและ 365 วัน กลับมีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูงกว่าที่ระยะเวลาเก็บ 7 วัน 42 วัน แม้ว่าจะไม่มีรายงานวิชาการเกี่ยวกับระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งที่ระยะเวลาต่างๆ มาก่อนก็ตาม สันนิษฐานว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 1 วัน สเปิร์มยังไม่ถูกทำลายไปมากจึงยังคงมีพลังงานสำรองที่เก็บไว้ใช้ในเซลล์ไม่เปลี่ยนแปลงไปมาก ขณะที่น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษานาน 7 และ 42 วัน สเปิร์มส่วนหนึ่งเริ่มสูญเสียพลังงานสำรอง จึงทำให้มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวน้อยกว่า ส่วนที่ระยะเวลา 365 วัน ที่ให้ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูง สันนิษฐานว่าที่ระยะเวลาดังกล่าวสเปิร์มปลาคดแก้วอาจสามารถนำพลังงานจากภายนอกเซลล์ซึ่งได้แก่น้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสที่เป็นส่วนผสมในสารละลายเจือจางน้ำเชื้อมาใช้เป็นพลังงานได้ จึงทำให้น้ำเชื้อที่ละลายมีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูงกว่าที่ 7 และ 42 วัน อย่างไรก็ตาม ความสามารถในการใช้น้ำตาลจากภายนอกเซลล์เป็นพลังงานในการเคลื่อนไหวมีรายงานพบในปลาบางกลุ่มเท่านั้น (Gardiner, 2003) ซึ่งต้องมีการศึกษาถึงคุณสมบัติด้านนี้ของสเปิร์มปลาคดแก้วโดยเฉพาะเจาะจงต่อไป

การทดลองผสมเทียมปลาคดแก้วโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 365 วันมาละลายแล้วนำไปผสมเทียมกับไข่ปลาคดแก้ว โดยเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วยสารละลายสูตรเดียวกันที่อัตราเจือจางเดียวกัน จะเห็นว่าน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายมีปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ความหนาแน่นสเปิร์มที่มีชีวิต และอัตราส่วนสเปิร์มที่มีชีวิตต่อไข่ต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P < 0.01$) แต่กลับมีอัตราปฏิสนธิและอัตราฟักไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ผลที่ได้เป็นที่ยืนยันว่าน้ำเชื้อปลาคดแก้วที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งนาน 365 วัน เมื่อนำมาละลายแม้ว่าจะมีคุณภาพต่ำกว่าน้ำเชื้อสด แต่ก็สามารถใช้ผสมเทียมได้ผลไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด ผลที่ได้สอดคล้องกับผลการศึกษาในปลาคุยกัย (Steyn and Van Vuren, 1987) ซึ่งเป็นปลาที่จำเป็นต้องผ่าท้องเก็บน้ำเชื้อจากพู่อันทะเช่นเดียวกัน ซึ่งพบว่าน้ำเชื้อปลาคูยกัยที่แช่แข็งโดยใช้สารละลาย 5% glucose และใช้ glycerol เข้มข้น 5% เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ แช่แข็งด้วยอัตราลดอุณหภูมิ 2 อัตรา คือ 6.5 และ 11 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนแช่แข็งไว้นาน 480 วัน เมื่อนำมาละลายแม้ว่าจะมีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหวประมาณ 20% แต่ก็ให้อัตราฟัก 51% ซึ่งไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด สิ่งที่น่าสนใจจากการทดลองผสมเทียมครั้งนี้คือ น้ำเชื้อแช่แข็งซึ่งมีอัตราส่วนสเปิร์มมีชีวิตต่อไข่ $1.13 \pm 0.20 \times 10^5$ เซลล์/ฟองโดยมีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อสด ($2.15 \pm 0.09 \times 10^5$ เซลล์/ฟอง) หรือน้ำเชื้อสดมีค่ามากกว่าน้ำเชื้อแช่แข็ง 1.87 เท่า แต่ก็ให้อัตราฟักและอัตราปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน โดยน้ำเชื้อทั้ง 2 แบบในการทดลองนี้มีอัตราเจือจาง 3 เท่า สิ่งนี้สะท้อนให้เห็นว่า น้ำเชื้อสดของปลา

กุดแก้วนั้นสามารถเจือจางสำหรับใช้ผสมเทียมได้ถึง $3 \times 1.87 = 5.61$ เท่า ซึ่งสิ่งนี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อการเพาะพันธุ์ปลากุดแก้วเพราะจะเป็นการเพิ่มปริมาณน้ำเชื้อให้มีความสะดวกต่อการผสมเทียมและเป็นการเพิ่มโอกาสให้สเปิร์มสัมผัสกับไข่มากขึ้น อย่างไรก็ตาม อัตราส่วนสเปิร์ม/ไข่ที่เหมาะสมสำหรับการผสมเทียมปลากุดแก้วนั้นควรมีการทดลองโดยเฉพาะเจาะจงต่อไป



สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. การใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นสื่อขนส่งฮอร์โมน LHRH เพื่อให้เกิดการออกฤทธิ์แบบเนิ่นนานในปลาตกแก้วพบว่าระดับฮอร์โมน estradiol ซึ่งเป็นผลทางอ้อมจากฮอร์โมน LHRH ให้ผลไม่ชัดเจน โดยระดับฮอร์โมนเพิ่มสูงขึ้นในระยะเวลาที่แม่ปลามีความสมบูรณ์เพศมากขึ้น แต่ฮอร์โมนในรูปแบบนี้มีผลให้ไข่ปลาตกแก้วมีพัฒนาการมากกว่าปลาในชุดควบคุม

2. ปลาตกแก้วที่ผ่านการปรับปรุงพันธุ์ 1 รุ่น อายุ 2-3 ปี ขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 1,800-2,500 กรัม สามารถเลี้ยงให้มีความสมบูรณ์เพศในที่กักขังได้ โดยการเลี้ยงในบ่อดินขนาด 60 ตารางเมตร โดยการเลี้ยงแบบรวมเพศจำนวน 60 คู่ หรือ 120 ตัว อัตราการปล่อย 1 ตัว/5 ตารางเมตร ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีนไม่ต่ำกว่า 40% ในอัตรา 3%/น้ำหนักตัว/วัน แม่ปลามีค่าดัชนีอวัยวะสืบพันธุ์อยู่ในพิสัย 4.4-10.4 ส่วนพ่อพันธุ์อยู่ในพิสัย 0.52-0.92

3. การใช้ฮอร์โมน LHRH ร่วมกับสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ทรินเป็นระบบนำส่งสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลาตกแก้วได้ โดยฉีดฮอร์โมน LHRH-CDs ในอัตรา 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับ domperidone ในอัตรา 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม สามารถกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่และผลิตลูกปลาไว้อ่อนได้ แม่ปลาวางไข่หลังจากได้รับฮอร์โมน 12-13 ชั่วโมง โดยใช้เวลาในการวางไข่และน้ำหนักไข่ของแม่ปลาไม่แตกต่างจากการฉีดกระตุ้นกระตุ้นด้วย LHRH ($p>0.05$) แต่อัตราการผสมและอัตราการฟักของไข่ปลาชุดที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน สูงกว่าฮอร์โมน LHRH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

4. สามารถศึกษาพัฒนาการของไข่ปลาที่มีสารเหนียวห่อหุ้มได้ด้วยการใช้เอนไซม์ pronase ร่วมกับ embryonic medium ในการย่อยสลายสารที่ห่อหุ้มเปลือกไข่ออก ไข่ปลาตกแก้วมีรูปร่างกลมรี มีสีเหลืองใส มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.25 มิลลิเมตร เป็นไข่จมติดวัสดุ เริ่มมีการพัฒนาของคัพภะเข้าสู่ระยะคลิเวจหลังจากผสม 45 นาที และเริ่มฟักออกเป็นตัวในเวลา 30-38 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัวมีความยาวเฉลี่ย 5.0 มิลลิเมตร ไข่แดงจะยุบหมดเมื่ออายุ 3 วัน เริ่มกินอาหารและเข้าสู่ลูกปลาไว้อ่อนระยะแรกเมื่ออายุ 4-8 วัน ลูกปลาไว้อ่อนระยะหลังเมื่ออายุ 9-12 วัน และเข้าสู่ระยะลูกปลานานเต็มตัวอายุ 180 วัน มีพัฒนาการเหมือน

ตัวเต็มวัย ปลาตกแก้วอายุ 1 ปี เริ่มสร้างระบบสืบพันธุ์และเข้าสู่ระยะปลาโตเต็มวัยเมื่ออายุ 2 ปี เริ่มสร้างเซลล์สืบพันธุ์พร้อมที่จะผสมพันธุ์วางไข่ได้

5. การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตกแก้วแบบระยะสั้น ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยผสมน้ำเชื้อด้วยสารละลาย 0.9% NaCl หรือ GFR ในอัตราน้ำเชื้อ: สารละลายเจือจาง เป็น 1:2 หรืออัตราเจือจาง 3 เท่า และผสมด้วยยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin เข้มข้น 50 IU/ มิลลิลิตร และ 0.05 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตกแก้วแบบระยะสั้นได้นาน 144 ชั่วโมง โดยยังคงมีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว

6. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตกแก้วโดยวิธีการเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย 6% fructose หรือ 5% glucose และผสม methanol เข้มข้น 10% เป็นสารไครโอโพรเทกแทนท์ และแช่แข็งด้วยวิธีใช้ไอน์โตรเจนเหลวโดยใช้อัตราลดอุณหภูมิ 2 หรือ 5 องศาเซลเซียส/นาทิจ แช่แข็งน้ำเชื้อนาน 20 นาที แล้วจึงนำไปเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) การนำน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาใช้ทำได้โดยการละลายในน้ำที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 8 วินาที แล้วจึงนำไปใช้ในการผสมเทียมกับไข่ในอัตราน้ำเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร (1 หลอดแช่แข็ง) ต่อไข่ 66.67 กรัม ซึ่งมีผลทำให้อัตราปฏิสนธิและอัตราฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งไม่แตกต่างไปจากน้ำเชื้อสด

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการพัฒนาวิธีการวัดระดับฮอร์โมน LHRH ใน plasma ปลาเพื่อนำไปใช้วัดระดับฮอร์โมนโดยตรง การปรับปรุงการทำสารประกอบเชิงซ้อนๆ และระบบนำส่งฮอร์โมนๆ เช่น การใช้สารประกอบชนิดอื่นที่ทำให้ฮอร์โมนออกฤทธิ์เนิ่นนานมากขึ้น การเพิ่มปริมาณฮอร์โมน LHRH และทำระบบนำส่งสาร dopamine antagonist ควบคุมไปกับระบบนำส่งฮอร์โมน LHRH เพื่อลดผลกระทบจาก dopaminergic inhibition

2. ควรมีการศึกษาผลของ K^+ ต่อสเปิร์มปลาตกแก้ว การใช้น้ำตาลภายนอกเซลล์เป็นพลังงานในการเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อ และอัตราส่วนน้ำเชื้อหรือสเปิร์มต่อไข่ที่เหมาะสมสำหรับการผสมเทียมเพิ่มเติม

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กนกวรรณ วรรณะศักดิ์, คมนันท์ ศิลปอาจารย์, จินตนา นักระนาด และ ทรงชัย สหวัชรินทร์. 2530. การเก็บรักษาไข่ที่ปฏิสนธิแล้วจากหอยตะกอมโดยวิธีแช่แข็ง. เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 46/2530. สถานีประมงน้ำจืดร้อยจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศิริ กอนันตกุล, ขวลิต วิทยานนท์, อภิชาติ เดิมวิชากร, ชัยศิริ ศิริกุล และ นิพนธ์ จันทร์ประทีป. 2546. พรรณปลาในบึงบอระเพ็ด (ลุ่มน้ำเจ้าพระยา). เอกสารเผยแพร่. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

จรัญ จันทลักขณา. 2534. สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช, กรุงเทพฯ.

ขวลิต วิทยานนท์, อภิชาติ เดิมวิชากร และ ชัยศิริ ศิริกุล. 2543. ความหลากหลายของปลาในบึงบอระเพ็ด (ลุ่มน้ำเจ้าพระยา), น. 6-66. ใน ศิริ กอนันตกุล, ขวลิต วิทยานนท์, อภิชาติ เดิมวิชากร และ ชัยศิริ ศิริกุล, บรรณาธิการ. พรรณปลาในบึงบอระเพ็ด (ลุ่มน้ำเจ้าพระยา). กองประมงน้ำจืด และสถาบันพิพิธภัณฑสถานสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์, บุญนำ สุขทิส, สุริยา ทานสุทัศน์ และ เพียงใจ แก้วจรรยา. 2529. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาและปลาบึก. เอกสารวิชาการฉบับที่ 66. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ทัฬหฬ กระจ่างดารา. 2537. อนุกรมวิธานและชีวประวัติบางประการของปลาอ่างเก็บน้ำเขื่อนรัชชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นลินี มาร์คแมน. 2527. การศึกษาเบื้องต้นกรรมวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____, กฤษณ์ มงคลปัญญา, อุทัยรัตน์ ณ นคร และ ประวิทย์ สุรนิรนาถ. 2526. ความล้มเหลว
ในความพยายามเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลาเพื่อประโยชน์ในการผสมเทียม,
น. 55-73. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 21 สาขาประมง. มหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิตา ไชยรักษ์. 2539. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พลชาติ ผิวฉะ และ พนม กระจ่างพจน์ สอดสุข. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อ
แช่แข็ง. เอกสารเผยแพร่ฉบับที่ 1/2546. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ
กรมประมง, กรุงเทพฯ.

_____, คงภพ อำพลศักดิ์, ถาวร จินหมิก และ ชมพูนุช มรรคทรัพย์. 2547. การเก็บรักษาน้ำเชื้อ
ปลานิลโดยวิธีแช่แข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2547. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรม
สัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, สุจินต์ หนูขวัญ และ กำชัย ลาวัณยวุฒิ. 2539. การพัฒนาระบบสืบพันธุ์ใน
รอบปีของปลาดุกและปลาคะเพียนขาวเทศเมีย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 188.
สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

มานพ ตั้งตรงไพโรจน์, สุจินต์ หนูขวัญ, ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ และ กำชัย ลาวัณยวุฒิ. 2533. การ
เพาะปลาดุกบักโดยวิธีผสมเทียม, น. 53-63. ใน เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการ
ด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ขยุมุท ทักนิญ. 2548. หลักการเพาะเลี้ยงปลากดแก้ว. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์,
กรุงเทพฯ.

วิโรจน์ หิริญชัยพฤกษ์. 2539. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดงแบบแช่เยือกแข็ง, *Lutjanus argentimaculatus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์, ยงยุทธ ทักษิณ และ สุภาพ แก้วละเอียด. 2537. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2537. กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

_____, สุภัทรา อุไรวรรณ, พลชาติ ผิวฉะ, ทองอยู่ อุดเลิศ, โสภิต แก้วชนะ และ รุ่งนภา หนูกล้า. 2551. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้วที่ผ่านการคัดเลือกรุ่นที่ 1, น. 33-38. ใน รายงานประจำปี 2551. ศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์น้ำอุตสาหกรรม สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ศราวุธ เจ๊ะไ้สะ, อนัญญา คำจตุ, สุชาติ จุลอคง, กฤษณพันธ์ โกเมนไปรินทร์, เมตตา ทิพย์บรรพต และ นพพร สิทธิเกษมกิจ. 2547. เทคนิคการเพาะเลี้ยงปลากดก้าง. เอกสารเผยแพร่. ศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์น้ำชุมพร สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. 2519. การเก็บรักษาไข่และน้ำเชื้อปลา, น. 402-409. ใน รายงานประจำปี 2519. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

สมบัติ สิงห์สี และ เจริญ อุดมการณ์. 2547. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยวิธีฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์เร่งให้วางไข่ตามธรรมชาติ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 19/2547. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

สมโภชน์ อัคระทวิวัฒน์ และ กาญจน์รี พงษ์ฉวี. 2543. อนุกรมวิธานของปลาสายงามเพื่อการส่งออกของไทย. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

สุทธิชัย ฤทธิธรรม และ อุบลรัตน์ สุนทรรัตน์. 2532. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว, น. 66-73. ใน รายงานประจำปี 2532. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดเลย กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

สุภัทรา อุไรวรรณ, วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์ และ สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์. 2544. การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของปลากดแก้ว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2544. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

อนงค์ หัมพานนท์. 2539. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทรายโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิชาติ เตมวิชากร. 2546. ลูกปลาน้ำจืดวัยอ่อน. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2526. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว *Puntius gonionotus* Bleeker ในช่วงเวลาสั้น. ว. เกษตรศาสตร์ 17 (2): 53-57.

_____. 2538. การเพาะขยายพันธุ์ปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

Aizen, J., I. Meiri, I. Tzchori, B. Levavi-Sivan and H. Rosenfeld. 2005. Enhancing spawning in the grey mullet (*Mugil cephalus*) by removal of dopaminergic inhibition. **Gen. Comp. Endocr.** 142: 212-221.

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

Al-Daham, N.K. and M.N. Bhatti. 1979. Annual changes in the ovarian activity of the freshwater teleost, *Barbus luteus* (Heckel) from Southern Iraq. **J. Fish Biol.** 14: 381-387.

Almendras, J.M., C. Duenas, J. Nacario, N. Sherwood, L.W. Crim. 1988. Sustained hormone release. III. Use of gonadotropin releasing hormone agonists to induce multiple spawnings in seabass, *Lates calcarifer*. **Aquaculture** 74: 97-111.

- Ando, H., P. Swanson and A. Urano. 2003. Regulation of LH synthesis and release by GnRH and gonadal steroids in masu salmon. **Fish Physiol. Biochem.** 28: 61-63.
- Babiker, M.M., and H. Ibrahim. 1979. Studies on the biology of reproduction in the cichlid *Tilapia nilotica* (L.): gonadal maturation and fecundity. **J. Fish Biol.** 14: 437-448.
- Benfey, T.J. and A.M. Sutterlin. 1984. Growth and gonad development in triploid landlocked Atlantic salmon (*Salmo salar*). **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 41: 1387-1392.
- Benita, S., J.P. Benoit, F. Puisieux and C. Thies. 1984. Characterization of drug-loaded poly (*d,l*-lactide) microspheres. **J. Pharm. Sci.** 73: 1721-1724.
- Billard, R., J. Cosson, G. Perchee and O. Linhart. 1995. Biology of sperm and artificial reproduction in carp. **Aquaculture** 129: 95-112.
- Cabrita, E., R. Alvarez, L. Anel, K. J. Rana and M. P. Herraiez. 1998. Sublethal damage during cryopreservation of Rainbow trout sperm. **Cryobiology** 37: 245-253.
- Carolsfeld, J., N.M. Sherwood, H. Kreiberg and S.A. Sower. 1988. Induced sexual maturation of herring using GnRH 'Quick-Release' Cholesterol Pellets. **Aquaculture** 70: 169-181.
- Chinabut, S., C. Limsuwan and P. Kitsawat. 1991. **Histology of the Walking Catfish, *Clarias batrachus***. Department of Fisheries, Bangkok.
- Ciereszko, A., J. Glogowski and K. Dabrowski. 2000. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes, pp. 20-48. *In* Tiersch, T.R. and P.M. Mazik, eds. **Cryopreservation in Aquatic Species**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, U.S.A.

- Coward, K. and N.R. Bromage. 1998. Histological classification of oocyte growth and the dynamics of ovarian recrudescence in *Tilapia zillii*. **J. Fish Biol.** 53: 285-302.
- _____ and _____. 2000. Reproductive physiology of female tilapia broodstock. **Fish Biol. Fish.** 10: 1-25.
- Denniston, R.S., S. Michelet and R.A. Godke. 2000. Principles of cryopreservation, pp. 59-74. In Tiersch, T.R. and P.M. Mazik, eds. **Cryopreservation in Aquatic Species**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Donaldson, E.M. and G.A. Hunter. 1982. Induced final maturation, ovulation and spermiation, pp. 351-403. In Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson, eds. **Fish Physiology Vol. IX B**. Academic Press, Inc., New York, USA.
- Fishbase. 2005. **Species summary: *Hemibagrus wyckioides***. Available Source: <http://www.fishbase.org/Summary/speciesSummary.php?ID=26973&genusname=Hemibagrus&speciesname=wyckioides>, November 21, 2006.
- Gardiner, D. M., 2003. Utilization of extracellular glucose by spermatozoa of two viviparous fishes. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology** 59: 165–168.
- Groman, D.B. 1982. **Histology of the Stripes Bass**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland.
- Gwo, J.C., H. Ohta, K. Okuzawa and H.C. Wu. 1999. Cryopreservation of sperm from the endangered formosan landlocked salmon (*Oncorhynchus masou formosanus*). **Theriogenology** 51: 569-582.
- Hulata, G. and S. Rothbard. 1979. Cold storage of carp semen for short periods. **Aquaculture** 16: 267-269.

- Humason, G. 1972. **Animal Tissue Techniques**. W.H. Freeman, New York, USA.
- Idler, D.R. and T.B. Ng. 1983. Teleost gonadotropins : isolation, biochemistry, and function, pp. 187-222. *In* Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donalson, eds. **Fish Physiology Vol. IX B**. Academic Press, Inc., New York, USA.
- Jamieson, B.G.M. 1991. **Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa**. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Lam, T.J. 1982. Application of endocrinology of fish culture. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 39: 111-137.
- Leung, L.K.P. 1991. Principles of biological cryopreservation, pp. 231-244. *In* B.G.M. Jamieson, ed. **Fish Evolution and Systematic: Evidence from Spermatozoa**. Cambridge Univ. Press, Cambridge.
- Levavi-Sivan, B., A. Ayelet and K. Tamir. 2003. Characterization of the inhibitory dopamine receptor from the pituitary of tilapia. **Fish Physiol. Biochem.** 28: 73-75.
- _____, R. Vaiman, O. Sachs and I. Tzchori. 2004. Spawning induction and hormonal levels during final oocyte maturation in the silver perch (*Bidyanus bidyanu*). **Aquaculture** 229: 419-431.
- _____, J. Biran and E. Fireman. 2006. Sex steroids are involved in the regulation of gonadotropin-releasing hormone and dopamine D2 receptors in female tilapia pituitary. **Biol. Reprod.** 75: 642-650.
- Lim, H.K., N.W. Pankhurst and Q.P. Fitzgibbon. 2004. Effects of slow release gonadotropin releasing hormone analog on milt characteristics and plasma levels of gonadal steroids in greenback flounder, *Rhombosolea tapirina*. **Aquaculture** 240: 505-516.

- Linhart, O., R. Billard and J.P. Proteau. 1993. Cryopreservation of European catfish (*Silurus glanis* L.) spermatozoa. **Aquaculture** 115: 347-359.
- McAndrew, B. J., K. J. Rana and D. J. Penman. 1993. Conservation and preservation of genetic variation in aquatic organisms, pp. 295-336. In J.F. Muir and R. J. Roberts, eds. **Recent Advances in Aquaculture IV**. Oxford, Blackwell Scientific Publication, London.
- Mongkonpunya, K., T. Pupipat, S. Pholprasith, M. Chantasut, R. Rittaporn, S. Pimolboot, S. Wiwatcharakoses and M. Chaengkij. 1992. Cryopreservation of sperm of the Mekong giant catfish, *Pangasianodon gigas* Chevey, pp. 56-60. In **NRC Report on Aquaculture and Schistosomiasis: Proceedings of a Network Meeting Held in Manila, Philippines**. 6-10 August 1991, National Academy Press, Washington, D.C.
- _____, _____ and T.R. Tiersch. 2000. Cryopreservation of sperm of Asian catfishes including the endangered Mekong giant catfish, pp. 108-116. In T. R. Tiersch and P. M. Mazik, eds. **Cryopreservation in Aquatic Species**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- Mounib, M.S. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. **J. Report. Fertil.** 53: 13-18.
- _____, P.C. Hwang and O.R. Idler. 1968. Cryogenic preservation of Atlantic cod (*Gadus morhua*) sperm. **J. Fish Res. Board Can.** 25: 2623-2632.
- Msiska, O.V. 2002. The histology of mature gonads of *Oreochromis* (Nyasalapia) *karongae* (Trewavas). **Afr. J. Ecol.** 40: 164-171.
- Mylonas, C.C. and Y. Zohar. 2001a. Endocrine regulation and artificial induction of oocyte maturation and spermiation in basses of the genus *Morone*. **Aquaculture** 202: 205-220.

Mylonas, C.C. and Y. Zohar. 2001b. Use of GnRHa-delivery systems for the control of reproduction in fish. **Fish Biol. Fish.** 10: 463-491.

Nelson, J.S. 1994. **Fishes of the World**. 3rd ed., John Wiley & Sons, New York.

Ng, T.B. and D.R. Idler. 1983. Yolk formation and differentiation in teleost fishes, pp. 373-404.

In Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson, eds. **Fish Physiology Vol. IX A**.

Academic Press, Inc., New York, USA.

Ng, H.H. and W.J. Rainboth. 1999. The bagrid catfish genus *Hemibagrus* (Teleostei: Siluriformes) in central Indochina with a new species from the Mekong River. **Raffles Bull. Zool** 47 (2): 555-576.

Okada, H. 1997. One-and three-month release injectable microspheres of the LH-RH superagonist leuporelin acetate. **Adv. Drug Deliver. Rev.** 28: 43-70.

_____, T. Heya, Y. Ogawa and T. Shimamoto. 1988. One-month release injectable microcapsules of a luteinizing hormone-releasing hormone agonist (leuprolide acetate) for treating experimental endometriosis in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 244: 711-749.

_____, Y. Doken, Y. Ogawa, and H. Toguchi. 1994a. Sustained suppression of the pituitary-gonadal axis by leuporelin three-month depot microspheres in rats and dogs. **Pharm. Res.** 11: 1199-1206.

_____, M. Yamamoto T. Heya, Y. Inoue, S. Kamei, Y. Ogawa and H. Toguchi. 1994b. Drug delivery using biodegradable microspheres. **J. Contr. Rel.** 28: 121-129.

Ott, A.G. and H.F. Horton. 1971. Fertilization of chinook and coho salmon eggs with cryopreserved sperm. **J. Fish. Res. Board Can.** 28: 745-749.

Peter, R.E. 1982. Neuroendocrine control of reproduction in teleosts. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 39: 48-55.

_____. 1983. The brain and neurohormones in teleost reproduction, pp. 97-136. *In* Hoar, W.S., D.J. Randall and E.M. Donaldson, eds. **Fish Physiology Vol. IX A**. Academic Press, Inc., New York, USA.

_____ and K.L. Yu. 1997. Neuroendocrine regulation of ovulation in fish basic and applied aspects. **Fish Biol. Fish.** 7: 173-197.

Psenicka, M., S.M. Hadi Alavi, M. Rodina, D. Gela, J. Nebesarova and O. Linhart. 2007. Morphology and ultrastructure of Siberian sturgeon (*Acipenser baerii*) spermatozoa using scanning and transmission electron microscopy. **Biol. Cell** 99: 103-115.

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

Saad, A., R. Billard, M.C. Theron and M.G. Hollebeeque. 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) sperm. **Aquaculture** 71: 133-150.

Sherwood, N., L. Eiden, M. Brownstein, J. Spiess, J. Rivier and W. Vale. 1983. Characterization of a teleost gonadotropin-releasing hormone. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 80: 2794-2798.

Sinha, V.R., A. Nanda and R. Kumria. 2002. **Cyclodextrins as sustained-release carriers**. Available Source: <http://www.pharmtech.com/pharmtech/data/articlestandard/pharmtech/432002/36186/article.pdf>, November 21, 2006.

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

- Steyn, G.J., J.H.J. Van Vuren., H.J. Schoonbee and N.H. Chao. 1985. Preliminary investigations on the cryopreservation of *Clarias gariepinus* (Clariidae: Pisces) sperm. **Water SA**. 11: 15-18.
- Stoss, J. and W. Holtz. 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm IV. The effect of DMSO concentration and equilibration time on sperm survival, sucrose and KCl as extender components and the osmolality of the thawing solution. **Aquaculture** 32: 321-330.
- Tacon, P., J.F. Baroiller, P.Y. Le Bail, P. Prunet and B. Jalabert. 2000. Effect of egg deprivation on sex steroids, gonadotropin, prolactin, and growth hormone profiles during the reproductive cycle of the mouthbrooding cichlid fish *Oreochromis niloticus*. **Gen. Comp. Endocri.** 117: 54-65.
- Tiersch, T.R. 2000. Introduction, pp. xix-xxvii. In T.R., Tiersch and P.M. Mazik, eds. **Cryopreservation in Aquatic Species**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana.
- _____, C.A. Goudie and G.J. Carmichael. 1994. Cryopreservation of channel catfish sperm: storage in cryoprotectants, fertilization trials and growth of channel catfish produced with cryopreserved sperm. **Trans. Am. Fish Soc.** 123: 580-586.
- Tsuruoka, M., T. Hashimoto, H. Seo, S. Ichimasa, O. Fujinaga, K. Uekama, H. Arima, T. Irie, K. Matsubara and T. Kuriki. 1989. Sustained release of buserelin acetate, a luteinizing hormone-releasing hormone agonist, from an injectable oily preparation utilizing ethylated β -cyclodextrin. **J. Pharm. Pharmacol.** 41: 874-887.
- Uekama, K., Y. Tahara, T. Ijitsu and T. Yamada. 1989. **Sustained Release Drug Preparation**. Nisshin Flour Milling Co., Ltd., Tokyo, Japan.

- Urbányi, B., I. Magyary, A. Horváth, B. Baranyai and A. Dinnyés. 2000. Cryopreservation of sperm and eggs of sharptooth catfish, pp. 188-198. *In* T.R. Tiersch and P.M. Mazik, eds. **Cryopreservation in Aquatic Species**. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana, USA.
- Vacher, C., E.L. Mananos, B. Breton, M.H. Marmignon and C. Saligaut. 2000. Modulation of pituitary dopamine D₁ or D₂ receptors and secretion of follicle stimulating hormone and luteinizing hormone during the annual reproductive cycle of female rainbow trout. **J. Neuroendocrinol.** 12: 1219-1226.
- _____, F. Ferriere, M.-H. Marmignon, E. Pekkegrini and C. Saligaut. 2002. Dopamine D₂ receptors and secretion of FSH and LH: role of sexual steroids on the pituitary of the female rainbow trout. **Gen. Comp. Endocri.** 127: 198-206.
- Van Asselt, L.A.C., H.J.Th. Goos, R. De Leeuw, R.E. Peter, E.M. Hol, F.P. Wassenberh and P.G.W.J. Van Oordt. 1990. Characterization of dopamine D₂ receptors in the pituitary of the African catfish, *Clarias gariepinus*. **Gen. Comp. Endocri.** 80: 107-115.
- Vidal, B., C. Pasqualini, N. Le Belle, M.C.H. Holland, M. Sbaihi, P. Verier, Y. Zohar and S. Dufour. 2004. Dopamine inhibits luteinizing hormone synthesis and release in the juvenile European eel: a neuroendocrine lock for the onset of puberty. **Biol. Reprod.** 40: 1491-1500.
- Viveiros, A.T.M., N. So and J. Komen. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm:egg dilution ration. **Theriogenology** 54: 1395–1408.
- Westerfield, M. 2007. The Zebrafish Book, 5th Edition; A guide for the laboratory use of zebrafish (*Danio rerio*). Eugene, University of Oregon Press.

Withler, F.C. 1980. Chilled and cryogenic storage of gametes of Thai carps and catfishes. **Can. Tech. Rep. Fish. Aquat. Sci.** No.948: 15p.

_____. 1982. Cryopreservation of spermatozoa of some freshwater fishes cultures in south and southeast Asia. **Aquaculture** 26: 395-398.

Wolfe, J. and G. Bryant. 2001. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **Int. J. Refrig.** 24: 438-450.

Yaron, Z., G. Gur, P. Melamed, H. Rosenfeld, A. Elizur and B. Levavi-Sivan. 2003. Regulation of fish gonadotropins. **Int. Rev. Cytol.** 225 (1): 131-185.

Young, J.A., M.F. Capra and A.W. Blackshaw. 1992. Cryopreservation of summer whiting (*Sillago ciliata*) spermatozoa. **Aquaculture** 102: 155-160.

Zohar, Y. and C.C. Mylonas. 2001. Endocrine manipulations of spawning in fish cultured: from hormones to genes. **Aquaculture** 197: 99-136.

Zohar, Y., G. Pagelson and M. Tosky. 1988. Daily changes in reproductive hormone levels in the female gilthead seabream *Sparus aurata* at the spawning period, pp. 119-125. In I. Paris, Ed. **Reproduction in Fish – Basic and Applied Aspects in Endocrinology and Genetics**. Les Colloques de l'INRA.

ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ นายวิศณุพร รัตนตรัยวงศ์
 เกิดวันที่ 21 พฤศจิกายน 2509
 สถานที่เกิด จังหวัดพิษณุโลก
 ประวัติการศึกษา วท.บ. (ประมง) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 วท.ม. (เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
 ตำแหน่งปัจจุบัน ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์
 (นักวิชาการประมงชำนาญการพิเศษ)
 สถานที่ทำงานปัจจุบัน ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์
 สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง
 บทความตีพิมพ์

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์. 2552. การเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้สารประกอบ
 เจริญเชื้อไซโคลเด็กซ์ทริน. ว. วิจัยเทคโนโลยีการประมง 3 (1): 34-51.

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์. 2553. ผลของฮอร์โมนและสารประกอบเจริญเชื้อไซโคลเด็กซ์ทรินต่อ
 พัฒนาการของรังไข่ปลากดแก้ว. ว. วิจัยเทคโนโลยีการประมง 4 (1): 15-32.

Ratanatrivong, W., W. Taparhudee, R. Yoonpundh and P. Srisapoome. 2011. Cryopreservation
 of bagrid catfish *Hemibagrus wyckioides* spermatozoa. **KU. Fish. Res. Bull** 35 (2): 33-
 43.