

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

##### 3.1 การเตรียมตัวอย่างปลาทดลอง

รวบรวมปลาคูกลำพันจากธรรมชาติในจังหวัดนครราชสีมาและจากโรงเพาะฟักของสาขาวิทยาศาสตร์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง จำนวนทั้งหมด 11 ตัว เพศผู้ 10 ตัวและเพศเมีย 1 ตัว อายุประมาณ 2 ปี น้ำหนักประมาณ 700 กรัมต่อตัว นำปลาที่รวบรวมได้มาเลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์ขนาด 6 X 10 เมตร ให้อาหารสำเร็จรูปวันละ 1 ครั้งในปริมาณ 3 % ต่อน้ำหนักตัว จนกระทั่งสมบูรณ์เพศและสามารถนำมาใช้ในการทดลองได้

##### 3.2 การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อจากปลาเพศผู้

นำปลาเพศผู้ มากระตุ้นการพัฒนาของน้ำเชื้อโดยฉีดฮอร์โมนบูเซอรีลิน (Buserelin) 10 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับดอมเพอริโดน (domperidone) 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำปลามาผ่าท้องเพื่อเอาถุงน้ำเชื้อ และนำถุงน้ำเชื้อมาแช่ในน้ำเกลือ 0.85 % ที่เย็น (4 °C) เป็นระยะเวลาประมาณ 30 วินาที เพื่อล้างเลือดและเมือกที่ติดมาออก ใช้กรรไกรที่สะอาดตัดบริเวณปลายถุงน้ำเชื้อและรีดเอาน้ำเชื้อออกจากถุง ใส่รวมกันในจานแก้ว (petri dish) ที่วางบนน้ำแข็ง (ไม่เกิน 10 นาทีก่อนนำมาทดลอง)

##### 3.3 การเตรียมสูตรน้ำยาที่ใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อ

สูตรน้ำยาที่ใช้ในการศึกษาในการทดลองที่ 1 และ 2 มีทั้งหมด 5 สูตร มีวิธีการเตรียมดังต่อไปนี้

สูตรที่ 1: น้ำมะพร้าว (coconut water extender) เตรียมโดยนำน้ำมะพร้าวแก่จัด จำนวน 100 มิลลิลิตร ให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 15 นาที กรองและเก็บในขวดสเตอร์ไลต์ (Mollineau *et al.*, 2011)

สูตรที่ 2 : Calcium Free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) เตรียมตามวิธีการของ Vuthiphandchai *et al.* (2009) โดยชั่งสารตามส่วนประกอบดัง Table 3.1 ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสเตอร์ไลต์ และเก็บไว้ในตู้เย็น

สูตรที่ 3: ไตรโซเดียม ซิเตรท (trisodium citrate) เตรียมตามวิธีการของ Adeyemo *et al.* (2007) โดยชั่งไตรโซเดียม ซิเตรท จำนวน 2.9 กรัม เติมน้ำกลั่นที่ต้มและทิ้งไว้ให้เย็นจำนวน 97.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเก็บในขวดสเตอร์ไลต์ และเก็บไว้ในตู้เย็น

สูตรที่ 4 : Modified TSU 1 เป็นสูตรน้ำยาที่ดัดแปลงโดยนำน้ำยาสูตรที่ 2 ผสมกับน้ำมะพร้าว (Ca-F HBSS + น้ำมะพร้าว) ในอัตรา 1:1 โดยซึ่งสารตามส่วนประกอบดัง Table 3.1 ใส่ในบีกเกอร์ ขนาด 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสเตอร์ไลต์ และเก็บไว้ในตู้เย็น

สูตรที่ 5 : Modified TSU 2 เป็นสูตรน้ำยาที่ดัดแปลงโดยนำน้ำยาสูตรที่ 3 ผสมกับน้ำมะพร้าว (ไตรโซเดียม ซิเตรท + น้ำมะพร้าว) ในอัตรา 1:1 โดยซึ่งสารตามส่วนประกอบดัง Table 3.1 ใส่ใน บีกเกอร์ ขนาด 200 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เก็บในขวดสเตอร์ไลต์ และเก็บไว้ในตู้เย็น

Table 3.1 Chemical compositions and pH of the five extenders used in this experiment

Ingredients (g)	Extender				
	Coconut water	Ca-F HBSS	Trisodium citrate	Modified TSU 1	Modified TSU 2
NaCl	-	0.8890	-	0.4445	-
KCl	-	0.0440	-	0.0220	-
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	0.0130	-	0.0065	-
NaHCO <sub>3</sub>	-	0.0390	-	0.0195	-
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	0.0070	-	0.0035	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	-	0.0220	-	0.0110	-
glucose	-	0.1110	-	0.0555	-
Trisodium citrate			2.9	-	1.45
Coconut water (ml)	100	-	-	50	50
distilled water (ml)		100	97.1	50	48.55
pH	5.5	7.5	8.5	7.0	7.5

### 3.4 การเตรียมสารละลายที่ใช้ย้อมสี สำหรับการประเมินการมีชีวิตของอสุจิ

การประเมินการมีชีวิตของอสุจิ (sperm viability) ทำโดยการย้อมสี (dye) อีโอซิน-นิโกรซิน (eosin – nigrosin) ซึ่งมีวิธีการเตรียมตามวิธีการของ นิพนธ์ เสนอินทร์ (2555) ดังต่อไปนี้

3.4.1 ละลาย Nigrosin 5 กรัมในน้ำกลั่น (น้ำอุ่น) 50 มิลลิลิตร

3.4.1 ละลาย Eosin Y 1 กรัมในน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร

3.4.3 นำสารละลายที่ได้ทั้ง 2 ชนิดมาผสมให้เข้ากันแล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 4 จนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ นำสีย้อมที่ได้เก็บไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

### 3.5 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อก่อนการทดลอง

ประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ตามวิธีของ Vuthiphandchai and Zohar (1999) โดยใช้ น้ำเชื้อสด 1 ไมโครลิตร วางบนกระจกสไลด์และเติม 0.4 % NaI ลงไป 50 ไมโครลิตร แล้วประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิ ภายในเวลาไม่เกิน 30 วินาที น้ำเชื้อที่จะนำไปทดลองต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ ไม่น้อยกว่า 75 %

### 3.6 วิธีดำเนินการทดลอง

การวิจัยแบ่งออกเป็น 5 การทดลอง ดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่างๆ ในการเก็บรักษา น้ำเชื้อปลาคูกำพันแบบแช่เย็น มีวิธีดำเนินการทดลองดังต่อไปนี้

#### 1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มตลอด (Completely Randomize Design, CRD) โดยใช้ น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender) แตกต่างกัน 5 สูตร

สูตรที่ 1 : น้ำมะพร้าว (coconut water extender: CWE)

สูตรที่ 2 : Calcium Free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS)

สูตรที่ 3 : ไตร โซเดียม ซิเตรท (trisodium citrate)

สูตรที่ 4 : Modified TSU 1 (น้ำมะพร้าว + Ca-F HBSS)

สูตรที่ 5 : Modified TSU 2 (น้ำมะพร้าว + ไตร โซเดียม ซิเตรท)

แต่ละชุดการทดลองทำการทดลอง 3 ซ้ำ

#### 2. วิธีการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาคูกำพัน

นำน้ำเชื้อที่ผ่านการตรวจคุณภาพ มาเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender) ที่ระดับความเข้มข้นของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ในอัตราส่วน 1:9 แล้วเขย่าเบาๆ เพื่อให้ น้ำเชื้อและน้ำยา ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน การเจือจางน้ำเชื้อในแต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ นำน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยา จำนวน 1 มิลลิลิตร ใส่ใน tissue culture flasks (Thomas Scientific 229320, NJ, USA) ขนาด 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C

3. การประเมินประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่เย็น โดยดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ (motility) และดูเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิต (viability) โดยนำอสุจิมาประเมินทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่งอสุจิหยุดการเคลื่อนที่ ดังต่อไปนี้

#### 3.1 การประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิ

โดยคือนำน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาแต่ละสูตรมาจำนวน 5 ไมโครลิตร หยดบนสไลด์หลุมหยด 0.4% NaCl ลงไป 100 ไมโครลิตรและปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover slide) และนำไปส่องดูด้วย

กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X และประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ โดยกำหนดเกณฑ์ ตามวิธีของเกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2540) ดัง Table 3.2 ทำการประเมิน 3 ชั่วโมง ต่อชุดการทดลอง

**Table 3.2 Score ranking of sperm motility**

Score ranking	Motility (%)
1	0 < 10
2	10 < 20
3	20 < 30
4	30 < 40
5	40 < 50
6	50 < 60
7	60 < 70
8	70 < 80
9	80 < 90
10	90 < 100

### 3.2 การประเมินเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิต

ประเมินเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตโดยดูน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาแต่ละสูตรมาจำนวน 5 ไมโครลิตรหยดบนสไลด์ หยดสี eosin – nigrosin 5 ไมโครลิตร ลงบนน้ำเชื้อ ผสมให้เข้ากัน ใช้สไลด์อีกอันหนึ่งลากส่วนผสมของน้ำเชื้อและสี จากปลายด้านหนึ่งของแผ่นสไลด์ไปยังปลายอีกด้านหนึ่ง นำไปผ่านเปลวไฟ 1-2 ครั้งให้น้ำเชื้อแห้งจากนั้นหยด permount ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 x นับจำนวนเซลล์ตัวเป็นตัวตาย โดยการสุ่มนับ 5 บริเวณๆ ละ 20 เซลล์ (มุมซ้ายด้านบน มุมซ้ายด้านล่าง มุมขวาด้านบน มุมขวาด้านล่าง และบริเวณตรงกลางแผ่นสไลด์) โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีสีใสคือไม่ติดสีข้อม ส่วนเซลล์ตายจะติดสีข้อมเป็นสีชมพูแดงหรือสีม่วง ทำการประเมิน 3 ชั่วโมง ต่อชุดการทดลอง

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเจือจางน้ำเชื้อสูตรต่างๆ ในการเก็บรักษา น้ำเชื้อปลาตุ๊กดำพันแบบแช่แข็ง มีวิธีดำเนินการทดลองดังต่อไปนี้

#### 1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มตลอด (Completely Randomize Design, CRD) โดยใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ แตกต่างกัน 5 สูตรเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ทำการทดลอง 4 ชั่วโมง

## 2. วิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาคูกำพัน

รวบรวมน้ำเชื้อจากปลาเพศผู้โดยนำปลาเพศผู้มาฉีดฮอร์โมนและผ่าท้องเพศผู้เพื่อเอาน้ำเชื้อมาขยี้เพื่อเอาน้ำเชื้อ และประเมินคุณภาพน้ำเชื้อก่อนการทดลอง โดยมีวิธีการทำ เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 นำน้ำเชื้อที่ผ่านการประเมินคุณภาพ มาใส่ใน tissue culture flask จำนวน 15 ใบ จำนวนใบละ 0.1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำยาสูตรต่างๆ จำนวน 0.9 มิลลิลิตร (อัตราส่วนเจือจาง 1:9) ผสมให้น้ำเชื้อและน้ำยาผสมเป็นเนื้อเดียวกันแล้ว จึงเติมสารละลาย ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulphoxide, DMSO) จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 8% และ คูดสารละลายใส่ในหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ปิดหลอดฟางให้สนิทด้วยผงอุดหลอดน้ำเชื้อ ปล่อยให้ให้น้ำเชื้อปรับตัวกับสารละลาย (equilibration) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปลดอุณหภูมิในกล่องโฟมขนาดเล็ก ที่บรรจุสารไนโตรเจนเหลวสูง 2 เซนติเมตรโดยเทไนโตรเจนเหลวทิ้งไว้ 5 นาทีเพื่อปรับอุณหภูมิในกล่องโฟม และทำการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ โดยการนำหลอดฟางวางแนวนอนบนตะแกรง (racks) เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ความสูง 5 เซนติเมตรเป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นนำหลอดฟางใส่ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C ) เป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้วทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิ

## 3. การประเมินประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง

นำหลอดน้ำเชื้อที่แช่ในถังไนโตรเจนเหลวมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 1 นาที (Pan *et al.*, 2008) ตัดหลอดฟางเพื่อนำน้ำเชื้อออกมา ประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิวิธีการเดียวกับการทดลองที่ 1 โดยกำหนดเกณฑ์ ตามวิธีของเกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน (2540) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ และประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิ โดยวิธีการย้อมสี (dye) อีโอซิน-นิโกรซิน (eosin-nigrosin) เช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X

การทดลองที่ 3 เปรียบเทียบอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ อัตราต่างๆ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคูกำพันแบบแช่เย็น

### 1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มตลอด (Completely Randomize Design, CRD) โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อแตกต่างกัน 5 อัตรา คือ 1:1, 1:3, 1:5, 1: 7 และ 1:9 แต่ละอัตราส่วนทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2. การเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาในอัตราส่วนต่างๆ

รวบรวมน้ำเชื้อและประเมินคุณภาพของอสุจิโดยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 เตรียมน้ำเชื้อที่จะนำไปแช่เย็นในปริมาตร 1 มิลลิลิตร เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาสูตรที่ 4 ซึ่งเป็นสูตรน้ำยาที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 1 โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาสูตรที่ 4 ในอัตราส่วนความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ คืออัตราส่วน 1:1 (น้ำเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร : น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร) อัตราส่วน 1:3 (น้ำเชื้อ 0.25

มิลลิลิตร : น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 0.75 มิลลิลิตร) อัตราส่วน 1:5 (น้ำเชื้อ 0.17 มิลลิลิตร น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 0.83 มิลลิลิตร) อัตราส่วน 1:7 (น้ำเชื้อ 0.125 มิลลิลิตร น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 0.875 มิลลิลิตร) และ อัตราส่วน 1:9 (น้ำเชื้อ 0.10 มิลลิลิตร น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 0.9 มิลลิลิตร) อัตราส่วนละ 3 ซ้ำ นำน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ในอัตราส่วนต่างๆ ใส่ใน tissue culture flasks (Thomas Scientific 229320, NJ, USA) ขนาด 25 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ประเมินประสิทธิภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็น โดยคูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิที่เก็บไว้ทุก 12 ชั่วโมง จนกระทั่งอสุจิหยุดการเคลื่อนที่ นับเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิต โดยวิธีการย้อมสีและนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X

การทดลองที่ 4 เปรียบเทียบอัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ในอัตราต่างๆ ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตุ๊กตาพื้นแบบแช่แข็ง

#### 1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomize Design, CRD) โดยใช้อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ แตกต่างกัน 5 อัตรา คือ 1:1, 1:3, 1:5, 1: 7 และ 1:9 แต่ละอัตราทำการทดลอง 4 ซ้ำ

#### 2. วิธีการทดลอง

รวบรวมน้ำเชื้อและประเมินคุณภาพของอสุจิโดยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาสูตรที่ 4 ซึ่งเป็นสูตรน้ำยาที่ให้ผลดีที่สุดจากการทดลองที่ 3 โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยา ในอัตราส่วน 1:1 (น้ำเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร : น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 0.5 มิลลิลิตร) อัตรา 1:3 (น้ำเชื้อ 0.25 มิลลิลิตร : น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 0.75 มิลลิลิตร) อัตรา 1:5 (น้ำเชื้อ 0.17 มิลลิลิตร น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 0.83 มิลลิลิตร) อัตรา 1:7 (น้ำเชื้อ 0.125 มิลลิลิตร น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 0.875 มิลลิลิตร) และ อัตรา 1:9 (น้ำเชื้อ 0.10 มิลลิลิตร น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 0.90 มิลลิลิตร) อัตราส่วนละ 3 ซ้ำ เติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyle sulphoxide, DMSO) จำนวน 80 ไมโครลิตรลงในน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ในอัตราต่างๆ ควบน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วจำนวน 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ปิดหลอดฟางให้สนิทด้วยผงอุดหลอดน้ำเชื้อ วางหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อ ที่อุณหภูมิ 4 °C ประมาณ 30 นาที และนำไปลดอุณหภูมิ โดยวางหลอดที่บรรจุน้ำเชื้อบนตะแกรงในกล่องโฟมที่บรรจุไนโตรเจนเหลว วางหลอดบรรจุน้ำเชื้อเหนือไนโตรเจนเหลวสูง 2 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที เช่นเดียวกับการทดลองที่ 3 นำหลอดน้ำเชื้อที่ลดอุณหภูมิตามกำหนดใส่ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 °C เป็นเวลา 1 สัปดาห์

#### 3. การประเมินประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง

ประเมินประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยวิธีการเช่นเดียวกับการทดลองที่ 3

การทดลองที่ 5 อัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟักไข่ ของปลาคูกลำพัน โดยใช้น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และ น้ำเชื้อแช่แข็ง

### 1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก (Randomize Completely Block Design, RCBD) มี 3 ชุดการทดลองคือ น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

### 2. การเตรียมน้ำเชื้อปลา

#### 2.1 การเตรียมน้ำเชื้อสด

นำปลาเพศผู้ น้ำหนักประมาณ 300 กรัม ความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร มากระตุ้นการ พัฒนาของน้ำเชื้อตามวิธีการของ Kiriratnikom *et al.* (2007) โดยฉีดบูเซอริลิน 10 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับคอมเพอร์โคโน 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม โดยฉีดฮอร์โมนดังกล่าวในเวลาเดียวกัน กับที่ฉีดฮอร์โมนเพศเมียในเข็มที่ 2 หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำปลามาผ่าท้องเพื่อเอาถุงน้ำเชื้อ และนำถุงน้ำเชื้อมาแช่ในน้ำเกลือ 0.85 % ที่เย็น ( $4^{\circ}\text{C}$ ) เป็นระยะเวลาประมาณ 30 วินาที เพื่อล้างเลือดและเมือกที่ติดมาออก ใช้กรรไกรที่สะอาดตัดบริเวณปลายถุงน้ำเชื้อและรีดเอาน้ำเชื้อออกจากถุง ใส่ในจานแก้ว (petri dish) ใช้น้ำเชื้อ 30 ไมโครลิตรเจือจางด้วยน้ำกลั่นจำนวน 120 ไมโครลิตร

#### 2.2 การเตรียมน้ำเชื้อแช่เย็น

นำปลาเพศผู้ มากระตุ้นการพัฒนาของน้ำเชื้อและเก็บน้ำเชื้อวิธีการเดียวกับการเตรียมน้ำเชื้อสด นำน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพโดยประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:50 และนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำน้ำเชื้อที่ผ่านการประเมินซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่ น้อยกว่า 75 % มาเจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender) ซึ่งประกอบด้วยน้ำมะพร้าวสุกคั้นที่อุณหภูมิ  $65^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 15 นาทีผสมกับ Calcium-free Hanks' balanced salt solution (Ca-F HBSS) ( $\text{NaCl}$  0.8890,  $\text{KCl}$  0.0440,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.0130,  $\text{NaHCO}_3$  0.0390,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.0070,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.0220, glucose 0.1110 น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ในอัตรา 1:1 และนำมาเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:4 (น้ำเชื้อ 60 ไมโครลิตร : น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 240 ไมโครลิตร) นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว 150 ไมโครลิตรใส่ใน หลอดทดลองขนาดเล็ก (eppendorf tube) ขนาด 1 มิลลิลิตร และนำไปแช่เย็นในตู้เย็น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ผสมกับไข่ นำน้ำเชื้อที่แช่เย็นมาปรับอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

#### 2.3 การเตรียมน้ำเชื้อแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วจากการเตรียมเพื่อแช่เย็นจำนวน 150 ไมโครลิตร เติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulphoxide, DMSO) จำนวน 12 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที และบรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร นำไปลดอุณหภูมิโดยใส่ในกล่องโฟม ขนาด 25 X 30 X 30 เซนติเมตร ที่มีไนโตรเจนเหลวสูง 2 เซนติเมตร วางหลอดฟางในแนวอนบนตะแกรงเหนือไนโตรเจนเหลว 5 เซนติเมตรเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -

196 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ผสมเทียม นำน้ำเชื้อมาละลาย (thawing) ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 นาที

### 3. การเตรียมแม่พันธุ์ปลาอุบลาคำพัน

นำปลาอุบลาคำพันเพศเมีย น้ำหนักประมาณ 300 กรัม ความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร มากระตุ้นการตกไข่ ตามวิธีการของ Kiriratnikom *et al.* (2007) โดยการฉีดฮอร์โมนบูเซอริน 5 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับคอมเพอริโดน 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม หลังจากฉีดเข็มแรก 6 ชั่วโมง ฉีดเข็มที่ 2 ด้วยบูเซอริน 30 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับคอมเพอริโดน 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม

### 4. การผสมเทียมไข่กับน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง

หลังจากฉีดฮอร์โมนปลาเพศเมีย เข็มที่ 2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำปลา มารีดไข่ลงในจานแก้วใช้กระบอกฉีดขนาด 1 มิลลิลิตร ฉีดไข่ปลาใส่จานแก้วจำนวน 3 ใบๆ ละ 1 มิลลิลิตร (ประมาณ 900 ฟอง) ฉีดน้ำเชื้อสดที่เจือจางแล้ว น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง อย่างละ 150 ไมโครลิตรผสมกับไข่ในจานแก้วใบที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ใช้ขนไก่คนไข่และน้ำเชื้อให้เข้ากัน หลังจากนั้นค่อยๆ เติมน้ำสำหรับการเพาะฟักลงไป ประมาณ 25 มิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นให้อสุจิเคลื่อนไปหาไข่ไปผสมกับไข่ ทั้งไข่ประมาณ 3 นาทีแล้วล้างน้ำเชื้อส่วนเกินและเมือกออก นำไข่ที่ผสมแล้วไปฟักโดยโรยไข่บนผ้ามุ้งเขียวเบอร์ 20 ขนาด 30 X 50 เซนติเมตรที่แบ่งเป็นช่อง ขนาด 10 X 10 เซนติเมตร จำนวน 3 ช่อง ที่ขึงตั้งในกระบะเพาะฟัก ขนาด 35 X 60 X 30 เซนติเมตร ที่ระดับต่ำกว่าผิวน้ำประมาณ 5-10 เซนติเมตร จำนวน 3 กระบะ (3 ชั้น) ให้ออกซิเจนและให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา

### 5. การเก็บข้อมูล

นับจำนวนไข่ที่ปฏิสนธิซึ่งมีลักษณะสีน้ำตาลโปร่งแสงและจำนวนไข่ที่ไม่ปฏิสนธิซึ่งมีลักษณะสีขาวขุ่น หลังจากผสมไข่กับน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 12 และ 48 ชั่วโมง เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักตามลำดับ โดยคำนวณจากสูตรตามวิธีของ Omitogun *et al.* (2012) ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมดเมื่อเริ่มทดลอง}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การฟัก} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ} - \text{จำนวนไข่ปฏิสนธิที่ไม่ฟัก}}{\text{จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ}} \times 100$$

### 3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ 1-4 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

การทดลองที่ 5 วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การฟัก โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Least significance difference (LSD) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS