23143
ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

# ประสิทธิภาพของสารเจือจาง 4 สูตร ในปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) โดยวิธีการแช่เย็น

# Efficiency of four extender in silver carp (*Puntius gonionotus*) by chilled - storage

T099326

โดย

นายรักชาติ กิติวินิต

วท.ม. ร 284 ว 2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน.เดือน.ปี.....

.b. 11883194
.i.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ใบรับรองปัญหาพิเศษ**
**ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง**

**เรื่อง** ประสิทธิภาพของสารเจือจาง 4 สูตร ในปลาตะเพียนขาว(*Puntius gonionotus*)
โดยวิธีการแช่เย็น

Efficiency of four extender in silver carp (*Puntius gonionotus*) by chilled - storage

**ชื่อนักศึกษา** นายรักชาติ กิติวินิต

**ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา** รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ

**ได้พิจารณาเห็นชอบโดย**

**อาจารย์ที่ปรึกษา**.....
(รองศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

**ภาควิชารับรองแล้ว**

.....
**(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)**
**หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง**
**วันที่** 17 **เดือน** ก.ค. **พ.ศ.** 50

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำนิยม

ในการทำปัญหาพิเศษเรื่องประสิทธิภาพของสารเจือจาง 4 สูตร ในปลาตะเพียนขาวโดยวิธีการแช่เย็น (*Puntius gonionotus*) โดยวิธีการแช่เย็นครั้งนี้สำเร็จลุล่วงลงได้ กระผมขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่เป็นธุระจัดหาอุปกรณ์การทดลอง, คอยติดตามให้คำแนะนำ, ความรู้ต่างๆในการศึกษาทดลอง, ตรวจทานข้อมูลตลอดจนแนะนำการดำรงชีวิตประจำวันในสังคม

ขอขอบพระคุณอาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่านที่ได้ให้วิชาความรู้, อบรมสั่งสอน, ปรึกษาปัญหาด้านต่างๆและคอยถามไถ่ เอาใจใส่ผมในทุกๆด้านจนผมมีวันนี้

ขอขอบคุณพี่บุปผา จงพัฒน์, พี่นิพนธ์ จิตตำนาน และ พี่นภพล เผ่ามนัส นักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง ที่คอยให้ความช่วยเหลือในด้านการใช้ห้องปฏิบัติการมาตลอด 4 ปี

ขอขอบคุณเพื่อนๆ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกๆคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจมาโดยตลอด ร่วมทุกข์, ร่วมสุข มีรอยยิ้ม,มีน้ำตา มีความรู้สึกและความทรงจำที่ดีให้จดจำ ดีใจที่เราได้รู้จักกัน

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดาที่ให้กำเนิดผม สอนและสั่ง, เป็นกำลังใจและช่วยเหลือในทุกๆด้านของการดำรงชีวิต ให้ผมมีการศึกษา เป็นคนดีของพ่อ-แม่และสังคม ทำให้ผมยืนหยัดและมีชีวิตที่สมบูรณ์มาจนถึงทุกวันนี้

นายรักชาติ กิติวินิต

พฤษภาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**บทคัดย่อปัญหาพิเศษ**

**เรื่อง**

# ประสิทธิภาพของสารเจือจาง 4 สูตร ในปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) โดยวิธีการแช่เย็น

**Efficiency of four extender in silver carp (*Puntius gonionotus*) by chilled - storage**


การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) แบบแช่เย็น มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยการนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาเจือจางในสารเจือจาง 4 ชนิด คือ 1. Extender–C Solution, 2. IMmobilizin solution (IM) 3. Kurokura และ 4. salt solution 0.4 % หลังจากนั้นนำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วมาประเมินการเคลื่อนที่ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่งโมง ปรากฏว่าสารเจือจางสูตรที่ 3 มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่เย็นน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว เนื่องจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 72 ชั่วโมง ก่อนที่จะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำเกลือ 0.4%



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| สารบัญ | I |
| สารบัญตาราง | II |
| สารบัญภาพ | III |
| คำนำ | 1 |
| การตรวจเอกสาร | 2 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 17 |
| ผลการทดลอง | 19 |
| สรุป | 24 |
| เอกสารอ้างอิง | 25 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิของปลาตะเพียนขาว | 4 |
| 2 | สูตรสารเจือจาง Cortland salt solution (CSS) และfrog Ringer's solution (FCR) | 5 |
| 3 | สูตรน้ำยา (สูตรที่ 1-8) ที่ประกอบด้วย modified Riger's buffered solution, fructose, lecithin และ mannitol | 6 |
| 4 | องค์ประกอบในเลือดและน้ำปลาไนในปรับสภาพการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 - 22 °C และ 8 - 10 °C | 9 |
| 5 | เปอร์เซ็นต์การแคลื่อนที่ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงในสารเจือจาง 4 สูตร | 20 |
| 6 | เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิปลาดุกเทศที่ทดลองกับสารเจือจางทั้ง 7 สูตร | 21 |
| 7 | คุณภาพน้ำเชื้อของปลาตะเพียนขาว | 22 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | อสุจิของปลาบางชนิด | 8 |
| 2 | ระยะเวลาที่เปลี่ยนที่ไปกับพลังงานที่สะสมไว้ในตัวอสุจิปลาเมื่อมีการเจือปนด้วยน้ำปัสสาวะ 7.5% | 11 |
| 3 | hemocytometer ประกอบด้วยสไลด์มาตรฐานและไปเปตเจือจางนำเชื้อ | 13 |
| 4 | ลักษณะของสไลด์และแผ่นกระจกบางเมื่อมองจากด้านบนและด้านข้าง | 13 |
| 5 | เส้นตารางบนช่องนับสไลด์แบบ Fuchs – Rosenthal (ซ้ายมือ) และแบบ Neubauser (ขวามือ) | 14 |
| 6 | วิธีการนับจำนวนเซลล์อสุจิ โดยส่วนหัวของเซลล์อสุจิที่มีสีดำเท่านั้นที่จะถูกนับ | 15 |
| 7 | ลักษณะของตัวอสุจิปลาตะเพียนผิดปกติ (100x) | 22 |
| 8 | ลักษณะของตัวอสุจิปลาตะเพียนขาวที่ปกติ (100x) | 23 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# คำนำ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความสำคัญต่อประเทศไทยเรามาก เนื่องจากเป็นแหล่งโปรตีนที่หาง่ายและราคาถูก แต่ในปัจจุบันปลาเศรษฐกิจบางชนิดกำลังใกล้จะสูญพันธุ์ เช่น ปลาบึก ปลาเทพา ปลาเทโพ เป็นต้น ปลาหายากเหล่านี้จำเป็นจะต้องได้รับการขยายพันธุ์มากขึ้น ในด้านการเพาะขยายพันธุ์ ประสบปัญหาในการจับพ่อแม่พันธุ์ที่จะนำมาผสมพันธุ์กันได้ไม่พร้อมกัน หรือจับได้เฉพาะเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถนำมาผสมพันธุ์กันได้ ซึ่งการแก้ปัญหาคือ การผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่เย็น โดยก่อนที่จะทำการแช่เย็นน้ำเชื้อของปลาตะเพียนขาว จำเป็นจะต้องใส่สารเจือจางละลายกับน้ำเชื้อเพื่อยืดอายุของอสุจิ (sperm) ให้มีชีวิตอยู่ได้นานยิ่งขึ้น (Linhart, 2000) เพราะว่าน้ำเชื้อของปลาตะเพียนแต่ละชนิดจะมีองค์ประกอบของ $Na^+$ $K^+$ $Ca^+$ และ pH ที่ละลายอยู่ในน้ำเชื้อไม่เท่ากันในปลาแต่ละชนิด ดังนั้นสารเจือจางที่จะใช้จะเป็นสารที่ผสมกันอยู่ในกลุ่มของ NaCl KCl และ $CaCl_2$ เมื่อสารเหล่านี้แตกตัวในน้ำจะให้ $Na^+$ $K^+$ $Ca^+$ และ $Cl^-$ ที่อยู่ในรูปของไอออนและมีความดันออสโมติกที่ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อปลา โดยพบว่าเมื่อใช้สารเจือจางที่เหมาะสมในปลาตะเพียนแต่ละชนิดแล้ว นอกจากจะทำให้ยืดอายุการเก็บรักษาและยังพบว่าอัตราการปฏิสนธิของไข่จะแปรผันโดยตรงกับอสุจิที่มีชีวิตอยู่ (Linhart, 2004)

## วัตถุประสงค์

หาสารเจือจางที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว เพื่อยืดอายุของตัวอสุจินานขึ้นกว่าปกติโดยวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# การตรวจเอกสาร

## ชีวประวัติของปลาตะเพียนขาว

ชื่อสามัญว่าปลาตะเพียนขาว (tawes, Bard, Thai siver bard, Thai carp) สำหรับในประเทศไทยภาคกลางเรียก ปลาตะเพียนขาว หรือปลาตะเพียน ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเรียกว่า ปลาปาก ปลาปึก ส่วนที่อื่นจะเรียกแตกต่างกันไป เช่น ขอนแก่น เรียกว่า ปลาสีน้ำเงิน ปลาบางขาว ในภาคเหนือ เรียกว่า ปลาปึก และมีชื่อวิทยาสตร์ว่า (*Puntius gonionotus*) (Bleeker 1985) จัดอยู่ในครอบครัว Cyprinidae เป็นปลาที่มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่แถบแหลมอินโดจีน ชวา ไทย สุมาตรา อินเดีย ปากีสถาน นอกจากนี้ยังเอามาเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายที่ประเทศศรีลังกาอีกด้วย สำหรับประเทศไทยเรานั้นมีอยู่ทั่วไปในแหล่งน้ำธรรมชาติ อันได้แก่ แม่น้ำ ห้วย หนอง คลอง บึงต่างๆ ทั่วทุกภาคของประเทศที่มีกระแสน้ำไหลอ่อนๆหรือน้ำนิ่ง ปลาตะเพียนขาวจัดเป็นปลากินพืชโดยในระยะที่เป็นลูกปลาจะกินแพลงก์ตอนโดยเฉพาะแพลงก์สัตว์ ปลาวัยรุ่นและปลาโตกินได้ทั้งพืชและสัตว์แต่ชอบกินพืชมากกว่า ปลาตะเพียนขาววางไข่ในน้ำไหล โดยวางไข่ในช่วงฤดูฝน ไข่เป็นชนิดครึ่งลอยครึ่งจม มีลักษณะใส เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตร เมื่อไข่ปลาโดนน้ำจะพองตัวขึ้น ช่วยพยุงให้ลอยน้ำได้บางขณะ เป็นปลาที่ทนต่อสิ่งเปลี่ยนแปลงและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ทั้งยังเจริญเติบโตในน้ำกร่อยที่มีความเค็มไม่เกิน 7 ส่วนพัน อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับปลาชนิดนี้อยู่ระหว่าง 25-33 องศาเซลเซียส ปลาตะเพียนขาวมีลักษณะลำตัวแบนข้าง หัวเล็ก ปากเล็ก ริมฝีปาก ขอบส่วนหลังโค้งยกสูงขึ้นความยาวจากสุดหัวจรดปลายหาง 2.5 เท่าของความสูง จะงอยปากแหลมมีหนวดเส้นเล็กๆ 2 คู่ ต้นของครีบหลังอยู่ตรงข้ามกับเกล็ดที่สิบของเส้นข้างตัว เกล็ดตามแนวเส้นข้างตัวมี 29-31 เกล็ด ลำตัวมีสีเงิน ส่วนหลังมีสีคล้ำ ส่วนท้องมีสีขาว ที่โคนของเกล็ดมีสีเทาจนเกือบดำ ปลาตะเพียนขาว ขนาดโตเต็มที่มีลำตัวยาวสูงสุดถึง 50 เซนติเมตร (วรวุฒิ, 2547) ลักษณะเพศ ลักษณะภายนอกของปลาตะเพียนขาวตัวผู้และตัวเมียคล้ายคลึงกันมาก แต่เมื่อใกล้ฤดูผสมพันธุ์จะสังเกตได้ง่ายขึ้น คือตัวเมียจะมีท้องอูมเป่ง พื้นท้องนิ่มและช่องเพศกว้างกว่าปกติ ส่วนตัวผู้ท้องจะแบน พื้นท้องแข็ง ถ้าเอามือลองรีดเบา ๆ ตรงบริเวณท้อง จะมีสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมไหลออกมาฤดูวางไข่ ปลาตะเพียนขาวจะวางไข่ราวๆปลายเดือนพฤษภาคมถึงกลางเดือนมิถุนายน ซึ่งเป็นระยะเวลาที่ฝนเริ่มตก หลังจากที่ฝนตกหนักเพียง 2-3 ครั้งปลาก็จะวางไข่จนหมด ไข่จะฟักออกเป็นตัวภายใน 8-12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิของน้ำประมาณ 29-30 องศาเซลเซียส แม่ปลาตะเพียนขาวตัวหนึ่งๆ สามารถมีไข่ได้ตั้งแต่ 50,000 - 100,000 ฟอง และชอบวางไข่ตามบริเวณชายฝั่งของลำธารเล็ก ๆ ที่ไหลลงมารวมกับลำธารใหญ่ซึ่งมีสภาพเป็นโคลน ปลาตะเพียนขาวสามารถวางไข่ในบ่อเลี้ยงได้ภายในปีแรก เมื่อแม่ปลามีขนาดตัวยาว 25 ซม. (ศักดิ์ชัย, 2548) การนำปลาตะเพียนขาวมาเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในบ่อเพื่อการผสมพันธุ์ สามารถทำได้ 2 วิธี คือ 1. ปล่อยให้พ่อแม่ปลาผสมพันธุ์กันเอง หากเลือกวิธีการนี้เมื่อฉีดฮอร์โมนเสร็จก็จะปล่อยพ่อแม่ปลาลงในบ่อเพาะรวมกัน โดยใช้อัตราส่วนแม่ปลา 1 ตัว/ปลาเพศผู้ 2 ตัว บ่อเพาะควรมีพื้นที่ไม่ต่ำกว่า 3 ตารางเมตร ลึกประมาณ 1 เมตร บ่อขนาดดังกล่าวจะปล่อยแม่ปลาได้ประมาณ 3 ตัว เพื่อความสะดวกในการแยกพ่อแม่ปลาควรใช้อวนช่องตาห่างปูในบ่อไว้ชั้นหนึ่งก่อน แล้วจึงปล่อยพ่อแม่ปลาลงไป แม่ปลาจะวางไข่หลังการฉีดประมาณ 4 - 7 ชั่วโมง โดยจะไล่รัดกันจนน้ำแตกกระจาย เมื่อสังเกตว่าแม่ปลาวางไข่หมดแล้วก็ยกอวนที่ปูไว้ออกพ่อแม่ปลา จะติดมาโดยไข่ปลาลอดตาอวนลงไปรวมกันในบ่อ จากนั้นก็รวบรวมไข่ปลาไปฟักในกรวยฟัก การผสมพันธุ์วิธีนี้มีข้อดีในเรื่องคุณภาพของไข่ที่ได้มักจะเป็นไข่ที่สุกพอดี นอกจากนั้นผู้เพาะยังไม่ต้องเสียเวลารอด้วย แต่ในบางครั้งปลาตัวผู้อาจไม่ฉีดน้ำเชื้อเข้าผสมทำให้ไข่ที่ได้ไม่ฟักเป็นตัว นอกจากนั้นไข่ที่รวบรวมได้มักจะไม่สะอาด 2. วิธีการผสมเทียม หลังจากฉีดประมาณ 4 - 5 ชั่วโมงจะสามารถรีดไข่ปลาได้โดยปลาจะมีอาการกระวนกระวายว่ายน้ำไปมารุนแรงผิดปกติ บางตัวอาจจะขึ้นมาฮุบอากาศบริเวณผิวน้ำ เมื่อพบว่าปลามีอาการดังกล่าวก็ควรตรวจดูความพร้อมของแม่ปลา โดยจับปลาหงายท้องขึ้นโดยตัวปลายังอยู่ในน้ำและบีบบริเวณใกล้ช่องเพศเบา ๆ หากพบว่าไข่พุ่งออกมาอย่างง่ายดายก็นำแม่ปลามารีดไข่ได้ การผสมเทียมใช้วิธีแห้งแบบดัดแปลงโดยใช้ผ้าขับตัวปลาให้แห้ง แล้วรีดไข่ลงในภาชนะที่แห้งสนิท จากนั้นนำปลาตัวผู้มารีดน้ำเชื้อลงผสมในอัตราส่วนของปลาตัวผู้ 1 - 2 ตัว ต่อไข่ปลาจากแม่ไข่ 1 ตัวใช้ขนไก่คนไข่กับน้ำเชื้อจนเข้ากันดี แล้วจึงเติมน้ำสะอาดเล็กน้อยพอท่วมไข่การคนเล็กน้อย ในขั้นตอนนี้เองเชื้อตัวผู้ก็จะเข้าผสมกับไข่ จากนั้นจึงเติมน้ำจนเต็มภาชนะถ่ายน้ำเป็นระยะๆเพื่อล้างไข่ให้สะอาด ไข่จะค่อยๆพองน้ำและขยายขนาดขึ้นจนพองเต็มที่ภายในเวลาประมาณ 20 นาที ระหว่างช่วงเวลาดังกล่าวต้องคอยถ่ายน้ำอยู่เสมอเพื่อป้องกันไม่ให้ไข่บางส่วนเสีย เมื่อไข่พองเต็มที่แล้วก็สามารถนำไปฟักในกรวยฟักได้ (อุทัยรัตน์, 2545)

**การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง**

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้เป็นระยะเวลานานๆ โดยการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิตั้งแต่ 0 ถึง -196 องศา เพื่อประโยชน์ในการผสมเทียมที่จำเป็นต่อการขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาบางชนิด เช่น ปลากะพง เพราะมีช่วงแก่ของอัณฑะและรังไข่ไม่ตรงกัน (กองประมงน้ำกร่อย, 2523) ปลากะรังเป็นปลาที่มีการกลายเพศในตัวเมีย (พินิจ และคณะ, 2525) และปลาบึก ซึ่งลดน้อยลงทุกปีและในบางฤดูผสมพันธุ์ไม่อาจหาพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ได้ไม่พร้อมกัน (ธีรพันธุ์, 2522) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตัวผู้ไว้ใช้ในการผสมเทียม จึงช่วยแก้ปัญหาการขาดพ่อพันธุ์ปลาได้ และนอกจากนั้นยังช่วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการผสมเทียมได้ง่ายขึ้น เพราะไม่ต้องเตรียมพ่อปลาเพื่อการรีดน้ำเชื้อ ซึ่งยุ่งยากพอสมควร ในกรณีที่ปลามีขนาดใหญ่เช่น ปลาบึก

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งจะต้องทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ซึ่งทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ แต่ถ้าหากทำการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆก็จะมีผลต่อเซลล์คือ จะทำให้เซลล์สูญเสียน้ำ (กฤษณ์, 2536) ซึ่งปัญหาเหล่านี้สามารถป้องกันได้ โดยการสารเคมีบางอย่างลงไปในของแหล่งที่อยู่นอกเซลล์ หรือน้ำยาเจือจางเซลล์ (extender หรือ diluent) สารเคมีเหล่านี้มีหลายชนิดซึ่งเรียกรวมกันว่า "สารไครโอโพรเทคแทนท์" เช่น Dimethyl sulfoxid (DMSO), glycerol, ethylene, methanol, propanediol และ dimethyl – acetamiol (Warnecke and pluta, 2003) Alvares et al., (2003) ทำการทดลองโดยการเติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ในปลาตะเพียนขาวโดยการเติม 5%, 10% และ 15% ของ Dimethyl sulfoxid (DMSO), glycerol และ methanol ผลการทดลองปรากฏว่าที่ 10% ของ DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิดีที่สุด (ตารางที่ 1)

**ตารางที่** 1 ผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิปลาตะเพียนขาว

| Cryoprotectant concentration [v/v] | Motility score[b] |
|---|---|
| Glycerol | |
| 5% | 0 |
| 7% | 1 |
| 10% | 1 |
| Methanol | |
| 5% | 1 |
| 7% | 2 |
| 10% | 2 |
| DMSO | |
| 5% | 2 |
| 7% | 3 |
| 10% | 4 |
| Control | 4 |

**ที่มา** : Alvares et al., (2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งมีสิ่งที่สำคัญคือ สารเจือจางที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อซึ่งมีหลายสูตร สารเจือจางต่างๆเหล่านี้ต่างก็อาศัยการพิจารณาจากส่วนประกอบทางเคมีของสูตรสารเจือจางจะพบว่ามีคุณสมบัติดังนี้ 1. สูตรสารเจือจางนี้ประกอบด้วยไอออนต่างๆใกล้เคียงกับที่ปรากฏในน้ำเลือด และสารเจือจางเหล่านี้จะต้องมีแรงดันออสโมติกใกล้เคียงที่สุดกับแรงดันออสโมติกของน้ำเลือด 2. สารเจือจางดังกล่าวจะประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด–ด่าง เป็นแหล่งพลังงานและสารเคมีบางตัวทำหน้าที่ต้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์หรือมีส่วนประกอบที่เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ 3. เป็นน้ำยาที่ปรับปรุงและพัฒนาจากสูตรน้ำยาที่ใช้อาบหรือหล่อเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดปลา บราวน์เท็ราซ์ ( Cortland salt solution) เลือดของกบ (frog Ringer ' s solution (ตารางที่ 2) การปรับปรุงสูตรสารเจือจางบางสูตร/บางครั้งไม่ได้อาศัยทฤษฎีหรือการทดลองใดๆ เป็นการชี้น้ำการปรับปรุงน้ำ แต่เป็นการกระทำจากการลองผิดลองถูกเป็นเกณฑ์ (ตารางที่ 3) 4. นอกจากนั้นสูตรน้ำยาเหล่านี้ยังประกอบด้วยสารสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดรวมกัน ในกรณีที่ต้องการเจือจางเพื่อการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

**ตารางที่** 2 สูตรสารเจือจาง Cortland salt solution (CSS) และ frog Ringer's solution (FCR)

| | CSS | FRS |
|---|---|---|
| | g | |
| NaCl | 7.25 | 6.50 |
| $CaCL_2.2H_2O$ | 0.23 | 0.16 |
| KCl | 0.38 | 0.14 |
| $NaH_2PO_4.H_2O$ | 0.4 | - |
| $NaH_2CO_3$ | 1.00 | 0.20 |
| $MgSO_4.7H_2O$ | 0.23 | 0.39 (optional) |
| Glucose | 1.00 | - |
| Water | 1000 | 1000 |
| Mean feezing point (°C) | - 0.58 | - 0.45 |

**ที่มา** : กฤษณ์ (2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่** 3 สูตรน้ำยา (สูตรที่ 1 - 8) ที่ประกอบด้วย modified Riger's buffered solution, fructose, lecithin และ mannitol

| น้ำยาสูตรที่ | NaCl | KCl | $MgSO_4.H_2O$ | $KH_2PO_4$ | Tris-HCl | fructose | lecithin | mannitol |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | mM | | | | | | mg% | |
| 1 | 120 | 5 | 5 | 10 | 1 | 100 | - | - |
| 2 | 120 | 5 | 5 | 10 | 1 | 100 | 250 | - |
| 3 | 120 | 5 | 5 | 10 | 1 | 100 | 500 | - |
| 4 | 120 | 5 | 5 | 10 | 1 | 100 | 750 | - |
| 5 | 120 | 5 | 5 | 10 | 1 | 100 | - | 100 |
| 6 | 120 | 5 | 5 | 10 | 1 | 100 | 250 | 100 |
| 7 | 120 | 5 | 5 | 10 | 1 | 100 | 500 | 100 |
| 8 | 120 | 5 | 5 | 10 | 1 | 100 | 750 | 100 |

**ที่มา** : กฤษณ์ (2536)

**การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่เย็น**

เป็นวิธีการที่จะเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลาให้มีชีวิตได้ยาวนานกว่าปกติ ปกติน้ำเชื้อปลาจะมีอายุ 24 ชั่งโมง ถึงแม้ว่าจะจะแช่เย็นในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ก็ตาม ยิ่งปล่อยไว้นานกว่านี้จะทำให้เป็นเจลไม่สามารถเอามาผสมกับไข่และเอาไปประเมินน้ำเชื้อได้ โดยการนำน้ำเชื้อสดมาผสมกับสารเจือจาง สารเจือจางเป็นสารที่มีองค์ประกอบของสารเคมีที่เหมือนกับในน้ำเชื้อปลาแต่อาจมีความดันและองค์ประกอบของสารเคมีที่แต่ต่างกันเล็กน้อย เพื่อที่จะไปยับยั้งการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิของปลา หลังจากที่ได้นำน้ำมาเจือจางด้วยสารเจือจางได้น้ำเชื้อเจือจางแล้วจึงนำน้ำเชื้อเจือจางแช่เย็นเพื่อที่จะทำการลดอุณหภูมิใกล้ๆ 0 องศา การลดอุณหภูมิเป็นการทำให้เกิดการ metabolism เกิดน้อยที่สุด จึงทำให้เซลล์อสุจินำพลังงานที่สะสมไว้ใช้สำหรับการเคลื่อนที่เข้าหาไข่เพื่อให้มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูง และจะทำให้เกิดการขับถ่ายของเสียที่จะไปลดคุณภาพของตัวอสุจิ จนถึงขั้นสุดท้ายคือการเพิ่มอุณหภูมิที่ 20-30 องศา (ศิริพร และคณะ, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อและปริมาณน้ำเชื้อปลา**

ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อควรสังเกตทันทีหลังจากทำการรีดเชื้อออกมา โดยสังเกต สี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่น ๆ (วีรพงศ์, 2536) น้ำเชื้อปลา (milt) ที่ดีควรมีสีขาวขุ่น คล้ายน้ำนมข้นเหนียว และกลิ่นคาว ถ้าน้ำเชื้อปลามีสีเลือดปนคุณภาพน้ำเชื้อปลาจะไม่ดี ส่งผลกระทบต่ออัตราการปฏิสนธิ (วนิคศา, 2533) เกรียงศักดิ์ (2540) รายงานว่าปริมาตรน้ำเชื้อปลาที่รีดได้จากปลาแต่ละชนิดรวมทั้งความหนาแน่นของอสุจิที่มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของปลา เพราะปลาแต่ละชนิดมีวิวัฒนาการดำรงเผ่าพันธุ์ที่แตกต่างกัน เช่น ปลาดุกวางไข่จำนวนน้อยและปริมาตรน้ำเชื้อมีน้อย แต่เปอร์เซ็นต์การฟักตัวสูงเพราะไข่ปลาดุกเป็นชนิดจมติดวัตถุ มีพฤติกรรมเฝ้าดูแลไข่และเลี้ยงตัวอ่อนสำหรับปลาที่มีไข่เป็นชนิดครึ่งลอยครึ่งจมไม่มีการเฝ้าดูและไข่และเลี้ยงตัวอ่อน แต่มีการวางไข่และมีปริมาตรน้ำเชื้อที่มาก เช่น ปลาตะเพียน (ศักดิ์ชัย, 2538) กฤษณ์ (2536) รายงานว่า ช่วงเวลาในฤดูผสมพันธุ์มีผลทำให้เกิดความแตกต่างของปริมาตรน้ำเชื้อ และความเข้มข้นของอสุจิในปลาตัวเดียวกัน เช่น ปลาเรนโบว์ เทราท์ มีปริมาณน้ำเชื้อและความเข้มข้นของอสุจิสูงในระยะต้นฤดูผสมพันธุ์ และคงที่ในระยะต่อมา

**รูปร่างลักษณะของอสุจิปลา**

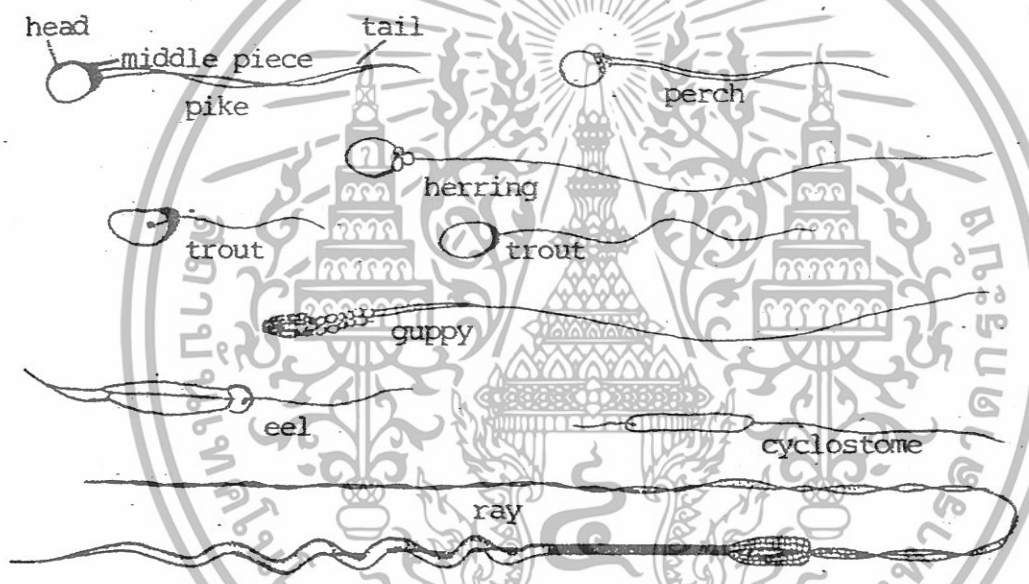
อสุจิของปลามีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วน คือ หัว midpiece และหาง ซึ่งลักษณะของเซลล์อสุจิของปลาแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามชนิดของปลา (ภาพที่ 1) (Billard, 1988) ปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีอสุจิที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกลม (spherical) หรือทรงรี (ovate หรือ acornshaped) โดยส่วนหัวมีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร และความยาวอสุจิจากหัวจนถึงหางประมาณ 40 - 60 ไมโครเมตร ส่วนกลางมีขนาดเล็กและส่วนใหญ่มีหางจำนวนหนึ่งหาง (วีรพงศ์, 2536)

หัวเป็นส่วนที่ประกอบด้วยนิวเคลียส มีโครโมโซม 1 ชุด ล้อมรอบด้วยไซโตรพลาสซึมเพียงบางๆและห่อหุ้มด้วย plasmalemma (cell membrane) รูปร่างลักษณะของส่วนหัวอสุจิมีหลายแบบ เช่น กลม รี แท่งหรือยัก เป็นต้น เช่น ปลาไน ส่วนหัวของอสุจิมีลักษณะกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ไมครอน (Billard, 1988) ปลาตะเพียน ส่วนหัวของอสุจิมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ไมครอน (Billard, 1988) ปลายี่สกเทศส่วนหัวของอสุจิมีลักษณะกลมเรียว (นลินี, 2527)

midpiece เป็นส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างหัวและหาง มีรูปร่างแตกต่างตามชนิดของปลา ประกอบด้วย microtubules ซึ่งเป็นแกนกลางของส่วนหาง ล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึม ภายในมี mitochondria และ centriole (Lahnsteimer, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หางของอสุจิปลาเป็นส่วนช่วยในการเคลื่อนที่ประกอบด้วย microtubles เรียงรอบแกนกลางล้อมรอบด้วย plasma minibrane ปลาส่วนใหญ่มี microtubules เป็นแกนกลางคู่ 1 คู่ และเรียงเป็นวงกลมอีก 9 คู่ ยกเว้นปลาในพวก Anglliformes และ Elopifomes ซึ่งไม่มี microtubules เป็นแกนกลาง โดยส่วนใหญ่อสุจิมีหางเพียงหางเดียว แต่ในปลาบางชนิด เช่น Porichtys notatus จะมี 2 หาง ซึ่งลักษณะอสุจิมี 2 หางนี้พบบ้างบางครั้งในปลา Channel Catfish (Ictalurus punctatus) และปลาหางนกยูง ปลาครอบครัว กลุ่ม Mormyriformes เชื้อเพศผู้ไม่มีหาง (ศักดิ์ชัย, 2538) Lahsteiner and Patzner (1991) รายงานว่า หางของอสุจิปลาแต่ละชนิดจะมีขนาดและลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น ปลาไน มีส่วนหางของอสุจิยาว 28 ไมครอน (Billard, 1988) ปลายี่สกเทศมีส่วนหางของเซลล์อสุจิยาว 38 ไมครอน (นลินี, 2527)




**ภาพที่** 1 อสุจิของปลาบางชนิด

**ที่มา** : Billard (1988)

**ของเหลวในน้ำเชื้อและน้ำเลือด**

Emri et al., (1998) ทำการทดลองหาองค์ประกอบของสารเคมีในน้ำเลือดและน้ำเชื้อปลาของปลา carp ในเดือนพฤษภาคม – เดือนมิถุนายน อุณหภูมิอยู่ระหว่าง (20 – 22 °C ) ซึ่งเป็นช่วงฤดูแล้ง และเดือนธันวาคม อุณหภูมิอยู่ระหว่าง (8 – 10 °C) ซึ่งเป็นช่วงฤดูหนาว พบว่าความเข้มข้นของ $Na^+$ และ $K^+$ ในน้ำเลือดและน้ำเชื้อมีความแตกต่างกันได้อย่างชัดเจน นั้นแสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อความเปลี่ยนแปลงในสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ส่วน pH มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นั้นมาจากการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนไปในช่วงฤดูฝนและฤดูแล้ง ฤดูหนาวมีอัตรา metabolism ที่ต่ำกว่าหรือเป็นเพราะว่าอุณหภูมิที่ต่างกันมากจะมีผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่อการแลกเปลี่ยนประจุของไอออนที่เป็นอัลคาไลด์ที่เกิดขึ้นในไซโตพลาสซึ่มทำให้ pH เพิ่มสูงขึ้นหรือลดลง ดังนั้นสารเจือจางที่ใช้ผสมกับน้ำเชื้อปลาที่เหมาะสมควรมี pH ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อปลานั้นๆ เพราะว่า pH ที่สุดหรือต่ำเกินไปจะไปยับยั้งการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันกับการทดลอง Krasznai et al., (1995) ที่ใช้ 4AM ซึ่งเป็น anion ที่ทำให้ pH ภายนอกเซลล์อสุจิสูงขึ้นจนกระทั้งไปยับยังการแลกไอออนระหว่าง $Na^+/H^+$ ที่เยื่อหุ้มเซลล์ เมื่อความเข็มข้นของเบสภายในเซลล์ (ได้ใช้ $K^+$ เป็นตัววัด) เกินกว่า 100 μMi

**ตารางที่** 4 องค์ประกอบในเลือดและน้ำปลาไนในปรับสภาพการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 20 - 22°C และ 8 - 10 °C

| Sample | Warm - adapted | Cold - adapted |
|---|---|---|
| Seminal plasma [$Na^+$] mM | 63.1 | 83.12 |
| Seminal plasma [$K^+$] mM | 87.16 | 64.11 |
| Seminal plasma pH | 8.3 | 8.6 |
| Blood serum [$Na^+$] mM | 14.53 | 14.43 |
| Blood serum [$K^+$] mM | 2.88 | 2.83 |
| Blood serum pH | 7.12 | 7.16 |
| Intracellular [$K^+$] of sperm cells | 60.7 | 58.8 |
| Intracellular pH of sperm cells | 7.1 | 7.4 |

**ที่มา** : Emri et al., (1998)

**การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ**

โดยธรรมชาติของเซลล์อสุจิปลาจะไม่เคลื่อนไหวในอัณฑะและทางเดินอสุจิ โดยมีความดันและองค์ประกอบของสารเคมีในน้ำเชื้อเป็นตัวยับยั้งการเคลื่อนไหว ซึ่งต่างกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม, สัตว์เลื้อยคลาน, สัตว์ปีกและอื่นๆ แต่เมื่อถึงฤดูกาลผสมพันธุ์เซลล์อสุจิของปลาจะถูกปล่อยออกมาอยู่ ในสภาวะแวดล้อมแบบใหม่ที่มีความดัน องค์ประกอบของไอออน และอุณหภูมิที่แตกต่างไปจากน้ำเชื้อ ผลที่ตามมาสเซลล์อสุจิของปลาจะเคลื่อนไหวได้ชั่วคราว ( Poupara, 1998) เซลล์อสุจิปลาที่ที่ได้รับการกระตุ้นให้เคลื่อนไหวจะมีชีวิตอยู่ไม่นานโดยมีอัตราเร็วในการเคลื่อนไหวและระยะเวลาในการเคลื่อนไหวที่แตกต่างขึ้นอยู่ชนิดของปลา เช่น เซลล์อสุจิของปลาทะเลและปลาน้ำกร่อยส่วนใหญ่จะเคลื่อนไหวได้นานกว่าเซลล์อสุจิของปลาน้ำ ซึ่งอุณหภูมิของน้ำก็มีผลอย่างมากต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิ เพราะว่าอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้อสุจิมีระยะเวลาการเคลื่อนไหว (total motile period) ในน้ำน้อยกว่าอุณหภูมิต่ำกว่า นอกจากนี้การเคลื่อนไหวของ

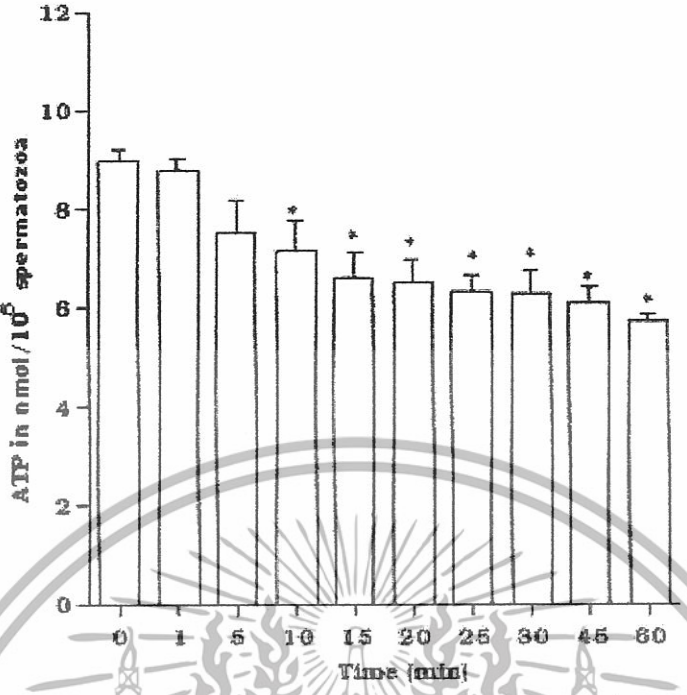
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อสุจิก็มีระยะเวลาจำกัด เช่น ปลาน้ำจืดส่วนมากจะเคลื่อนไหวได้ประมาณ 2-3 นาที โดยว่ายน้ำได้ปราดเปรียวในระยะแรกๆและค่อยๆว่ายน้ำช้าลงจนหยุดการเคลื่อนไหว ซึ่งในช่วงดังกล่าวถ้าอสุจิไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ก็จะทำให้อสุจิตายในที่สุด โดยเฉพาะการผสมเทียมปลาต้องใช้ระยะเวลาผสมเทียมที่เร็วที่สุด เพื่อให้อสุจิไม่ตายและจะได้อัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด (วีรพงศ์, 2536) สำหรับน้ำที่ใช้กระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิก็ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เช่น น้ำจืดกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิปลาน้ำจืดหรือน้ำทะเลกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิปลาทะเล (ศักดิ์ชัย, 2538) การที่อสุจิของปลาน้ำจืดมีการเคลื่อนไหวค่อนข่างน้อยนี้ทำให้มีการนำอสุจิของปลาน้ำจืดมาใสในน้ำเกลือ 0.6 - 0.7% หรือน้ำกร่อย (physiological solution) เพื่อให้มีอายุนานขึ้นและเคลื่อนไหวได้นานขึ้น เช่น ปลาแซลมอนนั้นพบว่าอสุจิจะเคลื่อนไหวในน้ำจืดได้น้อยกว่า 2 นาที แต่เมื่ออยู่ในน้ำที่มีความเค็ม 3 - 6 ppt จะเคลื่อนไหวได้นานถึง 180 นาที (Blaxter, 1969) ดังนั้นจึงสันนิษฐานถึงปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเคลื่อนไหวของอสุจิปลาในแหล่งน้ำได้ดังนี้คือ 1. ภาวะออกซิเจนในแหล่งน้ำมีปริมาณสูงกว่าในสภาพที่อยู่ใน seminal floid 2. ความเป็นกรด - ด่าง (pH) ของน้ำกระตุ้นการเคลื่อนที่ซึ่งปกติมีค่าความเป็นกรด – ด่างของน้ำเชื้ออยู่ระหว่าง 6.5 - 7.5 3. ปริมาณไอออนของสังกะสีและทองแดงเป็นตัวกระตุ้น เช่น พบในปลาทะเลจะมีการเคลื่อนไหวที่เร็วและนานกว่าปลาจืดเพราะในทะเลมีไอออนของสังกะสีและทองแดงเป็นตัวกระตุ้น 4. คุณสมบัติไฮโปโทนิค (Hypotonic) พบในปลาแซลมอนที่อยู่ในน้ำจืด อสุจิจะมีการเคลื่อนไหวที่น้อยกว่า 2 นาที แต่เมื่ออยู่ในน้ำเค็ม 3 - 6 ppt จะเคลื่อนไหวได้นานขึ้นอีกและใน 10 ppt มีการเคลื่อนไหวได้นานที่สุด (ศักดิ์ชัย, 2538) ดังนั้นโดยทั่วไปจึงนิยมใช้เกลือที่มีความเข้มข้น 0.6 % - 0.7% ซึ่งมีคุณสมบัติไฮโปโทนิคมากระตุ้นการเคลื่อนไหวและยืดอายุเซลล์อสุจิ ( Rex, 1999)

**ปัจจัยที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ**

นอกจากอุจจาระ, พันธุ์กรรมของปลา, ของเสีย และน้ำเลือด Goupard et al., (2006) พบว่าน้ำปัสสาวะก็มีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อลดลง นั้นเป็นเพราะว่าในน้ำปัสสาวะมีองค์ประกอบทางเคมีที่ประกอบด้วย 0.3 mM $Ca^{+}$, 12 mM $Na^{+}$, 0.6 mM $K^{+}$, 4 mM $Cl^{-}$, ของเสียจำพวกไนโตรเจน $10^{-2}$ mM, uric acid และกรดยูเรีย $10^{-3}$ ค่าความดันออสโมติก 18 mosM $kg^{-1}$ เมื่อมีการปนเปื้อนด้วยน้ำปัสสาวะพลังงานที่เก็บสะสมไว้ (ATP) ก็มีการสะสมน้อยลงและมีการเคลื่อนไหวช้ากว่า แต่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกันที่นัยสำคัญเมื่อเริ่มต้นที่ 0 นาที แต่หลังจากนั้นจะมีความแตกต่างกันทางนัยสำคัญสถิติเมื่อเวลาผ่านไป 10 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่** 2 ระยะเวลาที่เปลี่ยนที่ไปกับพลังงานที่สะสมไว้เมื่อมีการปนเปื้อนด้วยน้ำปัสสาวะ 7.5% (*, p<0. 05, Tukey HSD Test) (mean±SEM, n=3 male)

**ที่มา** : Goupard et al., (2006)

**การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา**

ภายหลังรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อแม่พันธุ์ปลาแล้ว การที่จะทราบถึงความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility) ของน้ำเชื้อมีมากน้อยเท่าใด สามารถทำโดยนำน้ำเชื้อปลาไปผสมกับไข่ที่รีดออกมาสดๆ แต่ถ้าเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เช่น โคและสุกร กระทำได้โดยนำน้ำเชื้อนั้นไปฉีดให้กกับสัตว์เพศเมียแล้วตรวจผลการตั้งท้อง อย่างไรก็ตามก่อนจะนำน้ำเชื้อปลาที่รีดเก็บได้ไปผ่านขบวนการทำน้ำเชื้อและผสมกับไข่สด ควรมีการตรวจหรือประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในห้องปฏิบัติการก่อน ถึงแม้ว่าการตรวจดังกล่าวจะไม่ใช่วิธีวัดความสมบูรณ์ที่แท้จริง แต่ก็มีประโยชน์คือสามารถคาดคะเนความสามารถในการผสมกับไข่ (probable fertilizing ability) ใช้เป็นเกณฑ์ศึกษาผลกระทบที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อจากปัจจัยต่างๆ และใช้ในการกำหนดอัตราการเจือจาง (dilution rate) ซึ่งจำเป็นมากสำหรับการผสมเทียมโคและสุกร

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเป็นงานที่ควรกระทำอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพเพื่อให้คงคุณภาพและความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อที่เก็บมาได้ การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อดังกล่าวโดยทั่วๆ ได้แก่

1. ลักษณะและปริมาณน้ำเชื้อ (Appearance and volume) ลักษณะและปริมาตรน้ำเชื้อควรสังเกตและตรวจสอบวัดทันทีหลังจากรีดน้ำเชื้อออกมา โดยปกติน้ำเชื้อปลาที่อยู่ในอัณฑะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือรีดออกมาสดๆ จะมีสีขาวคล้ายน้ำนม แต่ข้นเหนียวและมีกลิ่นคาวจัด ไม่ควรมีสีอื่นเจือปน เช่น สีแดงหรือสีชมพู น้ำเชื้อที่รีดออกมาจะใช้ภาชนะที่มีขีดบอกปริมาตรรองรับ ภาชนะที่ใช้ดังกล่าวจะขึ้นอยู่กับปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ เช่น ปลาที่ให้ปริมาตรน้ำเชื้อแต่ละครั้งมากควรใช้ถ้วยตวงหรือกระบอกตวง ปริมาตรน้ำเชื้อที่วัดได้จะนำมาใช้คำนวณหาอัตราการเจือจางน้ำเชื้อ (ศักดิ์ชัย, 2538)

2. การเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ (Sperm motility) น้ำเชื้อปลาที่จะนำมาตรวจสอบการเคลื่อนไหว ต้องรีดจากพ่อพันธุ์ที่เช็ดตัวให้แห้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณที่ท้องเพื่อป้องกันไม่ให้น้ำที่เกาะตามตัวปลาหยดลงปนกับน้ำเชื่อที่รีดได้ ทั้งนี้เพราะหยดน้ำดังกล่าวจะไปกระตุ้นการเคลื่อนไหวและเสื่อมคุณภาพไป นอกจากนั้นแล้วภาชนะที่ใช้รองรับน้ำเชื้อต้องแห้งและสะอาดเช่นกัน

การตรวจอัตราการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ เป็นวิธีที่ทำง่ายมากและรวดเร็ว (Amrit, 1998) สามารถประเมินเปอร์เซ็นต์ของการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ และระดับการเคลื่อนที่ (Mounid, 1998 อ้างตามนลินี, 2527) การประเมินการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิมี 2 แบบ คือ การประเมินการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิเป็นกลุ่ม และประเมินเป็นเปอร์เซ็นต์ การประเมินเป็นเปอร์เซ็นต์เป็นวิธีที่ต้องตรวจดูการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิเป็นรายตัวแล้วประเมินเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยสุ่มบริเวณที่อสุจิเคลื่อนที่แล้วประเมินเซลล์อสุจิ 100 ตัวมีการเคลื่อนที่กี่ตัว สำหรับการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิเป็นกลุ่ม จะใช้วิธีของ Mounid (1979) และวิธีของ Billar et al. ( 1991) โดยแบ่งการเคลื่อนที่เป็น 10 ระดับ ระดับ 1 หมายถึง เซลล์อสุจิมีความอ่อนแอมาก (อสุจิเคลื่อนที่ 0 - 10%) ระดับ 10 หมายถึงเซลล์อสุจิที่เคลื่อนที่มีความปราดเปรียวสูง (90 - 100) วีรพงศ์ (2536) ได้กำหนดอัตราการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิเป็นระบบตัวเลข 0 - 5 ดังนี้

= ไม่มีการเคลื่อนไหว
= (poor) มีการเคลื่อนไหวน้อยกว่า 30% และเคลื่อนไหวช้า
= (fair) อสุจิ 20 - 30% เคลื่อนไหวแข็งแรง แต่สังเกตคลื่น
= (good) อสุจิ 50 - 70% เคลื่อนไหวแข็งแรง และสังเกตคลื่นชัดเจน
= (very good) อสุจิ 70 - 80% เคลื่อนไหวแข็งแรง และมีคลื่นให้เห็นน้อยกว่า 5
= (excellent) อสุจิ 80% ขึ้นไปเคลื่อนไหวรวดเร็ว และมีคลื่นรวมให้เด่นชัดเจน

การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ เป็นวิธีการที่ต้องตรวจดูการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิเป็นรายตัว และประเมินการเคลื่อนที่ออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยการสุ่มนับประมาณ 10 เซลล์ในแต่ละครั้งหรือแต่ละตำแหน่งแล้วเปลี่ยนไปดูตำแหน่งอื่นๆอีกอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ได้เซลล์อสุจิประมาณ 100 เซลล์ (ศักดิ์ชัย, 2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

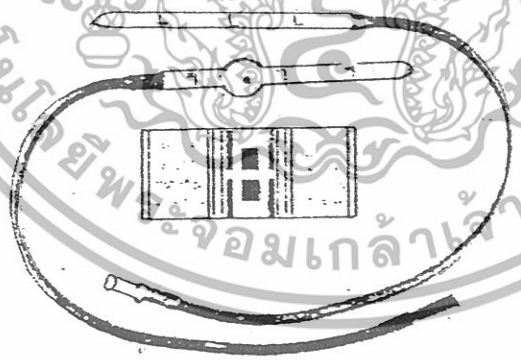
การประเมินแบบนี้ต้องฝึกสม่ำเสมอและต้องใช้ประสบการณ์ และความชำนาญในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยวีการตรวจการเคลื่อนที่ได้ผลไม่ดีนัก เนื่องจากตัวอสุจิของปลาที่นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเคลื่อนไหวระยะเวลาสั้นๆเท่านั้น (William et al., 1985) ปัจจุบันได้มีการใช้กล้องถ่ายภาพบันทึกภาพตัวอสุจิเคลื่อนกำลังเคลื่อนที่โดยวัดระยะทางที่ได้ต่อหน่วยเวลาที่กำหนดให้ (Saac et al., 1988)

3. **ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ** ( sperm concentration) **ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ** หมายถึง จำนวนเซลล์อสุจิต่อลูกบาศก์เซนติเมตร วิธีการประเมินความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ เช่น การหาค่า spermatocrit หรือการใช้ hemocytometer (direct cell cont)

- การหาค่า spermatocrit เป็นการหาความหนาแน่นของเซลล์อสุจิ (pack cell volume ×100/total semen volume) แล้วเทียบกลับเป็นจำนวนเซลล์ต่อจำนวนอสุจิ โดยใช้เสนกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นในห้องปฏิบัติการของตนเอง

- การใช้ hemocytometer เป็นการตรวจนับจำนวนเซลล์โดยตรง โดยการใช้ hemocytometer ซึ่งออกแบบมาเพื่อนับเซลล์เม็ดเลือดแล้วมาดัดแปลงมาใช้ตรวจนับเซลล์อสุจิ

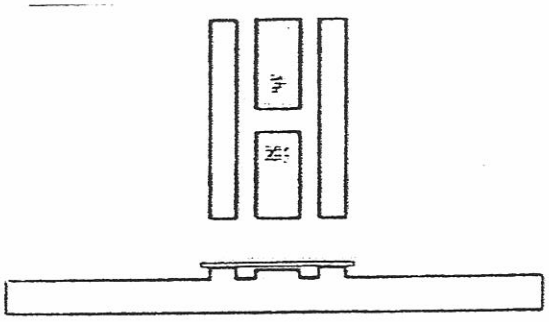
- hemocytometer (ภาพที่ 3) ประกอบด้วยสไลด์ที่มีช่องนับ (counting chamber) 2 ช่อง และไปเปตเจือจางน้ำเชื้อ (dilution pipette) โดยลักษณะดังกล่าวเมื่อมองจากด่านบนและด่านล่าง(ภาพที่ 4) สำหรับสไลด์ของ hemocytomete ที่ใช้กันได้แก่แบบ Fuchs-Rosenthal และแบบ Neubauer (ภาพที่ 5)



**ภาพที่** 3 hemocytometer ประกอบด้วยสไลด์มาตรฐานและไปเปตเจือจางนำเชื้อ

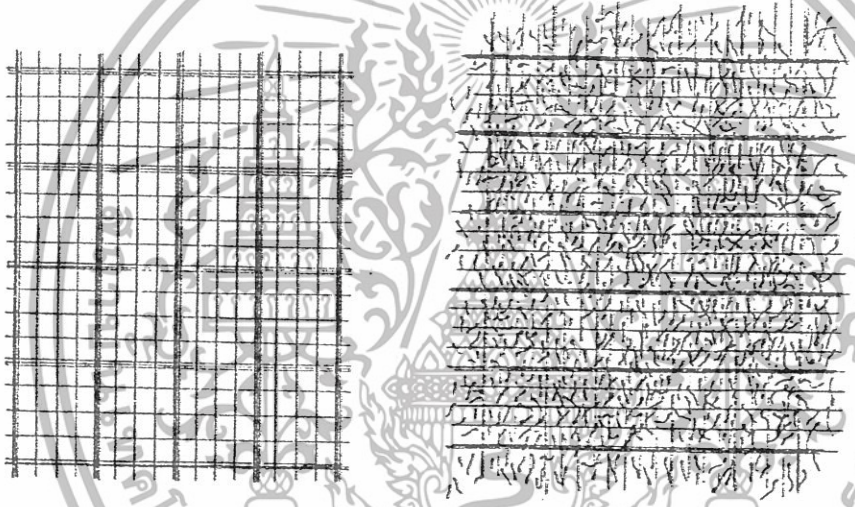
**ที่มา** : Bearden และ Fuguay (1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพที่** 4 ลักษณะของสไลด์และแผ่นกระจกบางเมื่อมองจากด้านบนและด้านข้าง

**ที่มา** : Sorensen (1979)



**ภาพที่** 5 เส้นตารางบนช่องนับสไลด์แบบ Fuchs – Rosenthal (ซ้ายมือ) และแบบ Neubauser (ขวามือ)

**ที่มา** : Liang (1979) และ Sorensen (1979)

Fuchs-Rosenthal hemocymeter จะมีช่องนับซึ่งเมื่อปิดแผ่นกระจกบางแล้ว บริเวณช่องนับจะลึกจากผิวด้านล่างของแผ่นกระจกบาง 0.2 มิลลิเมตร บนช่องนับจะมีตารางอยู่ ซึ่งประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 16 ช่อง แต่ละช่องมีพื้นที่ 1.0 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรน้ำเชื้อระหว่างแผ่นกระจกบางกับสี่เหลี่ยมจัตุรัสแต่ละช่องเท่ากับ 1.0 x 0.2 หรือเท่ากับ 1/5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ส่วน Neubauser hemocytometer จะมีช่องนับซึ่งเมื่อปิดแผ่นกระจกแล้ว บริเวณช่องนับจะลึกจากผิวด้านล่างของแผ่นกระจกบาง 0.1 มิลลิเมตร บนช่องนับแต่ละช่องจะมีตารางอยู่ ซึ่งประกอบไปด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัส 25 ช่อง พื้นที่สี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 25 ช่องเท่ากับ 1.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางมิลลิเมตรดังนั้นปริมาตรน้ำเชื้อระหว่างแผ่นกระจกบางกับสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 5 ช่องเท่ากับ (5/25) (1.0 x 0.1) หรือเท่ากับ 1/50 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

ไปเปตเจือจางน้ำเชื้อ เป็นไปเปตสำหรับการตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดแดง โดยมีอัตราการเจือจาง 1 ต่อ 200

การเจือจางและการเตรียมน้ำเชื่อเพื่อตรวจนับจำนวนเซลอสุจิมีดังนี้คือ

1. กลับหลอดน้ำเชื้อไปมาเพื่อให้น้ำเชื้อเข้ากันดี

2. ดูดน้ำเชื้อเข้าไปในไปเปตเจือจางน้ำเชื้อถึงขีดบอก 0.5

3.ดูดไปเปตเจือจางน้ำเชื้อให้มีอากาศเข้ามาตรงปลายเล็กน้อยแล้วเช็ดปลายไปเปตให้สะอาด

4. ดูดสารเจือจางน้ำเชื้อให้ถึงขีด 101 ด้วยไปเปตเจือจางน้ำเชื้อในข้อ 2. (สารเจือจางน้ำเชื้ออาจใช้สารละลายที่ใช้ในโคที่ประกอบด้วยอีโอซิน 2 % จำนวน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร โซเดียมคลอไรด์ 3 % จำนวน 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร และน้ำกลั่น 50 ลูกบาศก์เซนติเมตร)

5. ใช้นิ้วหัวแม่มือและนิ้วชี้อุดปลายทั้งสองข้างของไปเปต และเขย่าไปเปตเพื่อให้น้ำเชื้อและสารเจือจางน้ำเชื้อเข้ากันดี

6. ปล่อยส่วนผสมทิ้งไป 4 ถึง 5 หยด

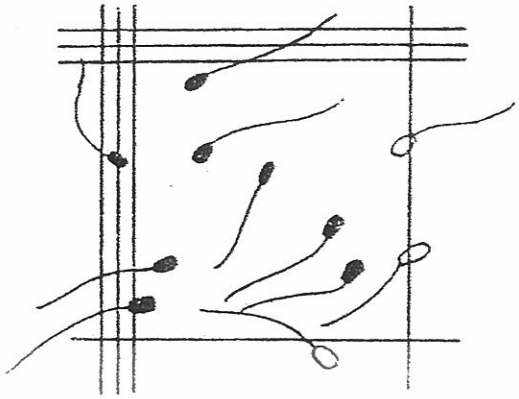
7. วางแผ่นกระจกบางเหนือช่องนับของสไลด์

8. หยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วที่ขอบของแผ่นกระจก เพื่อให้น้ำเชื้อเข้าไปเต็มพื้นที่ใต้แผ่นกระจก การหยดน้ำเชื้อในขั้นตอนนี้ต้องให้พอดีกับพื้นที่ใต้แผ่นกระจกบาง ถ้าหยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วมากเกินไปจะทำให้น้ำเชื้อล้นออกจากขอบของแผ่นกระจกบาง ทำให้การตรวจนับจำนวนเซลอสุจิเป็นไปได้ยากและไม่เที่ยงตรง

9. ปล่อยน้ำเชื้อที่เจือจางไว้สักครู่เพื่อให้เซลอสุจิอยู่คงที่แล้วจึงเริ่มตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิ

วิธีการนับจำนวนเซลอสุจิจากการใช้ Fuchs-Rosenthal hemocytometer จะสุ่มนับจำนวนเซลอสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่เพียง 1 ช่อง ส่วนการใช้ Neubauer hemocytometer นิยมสุ่มนับจำนวนเซลอสุจิจากสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่จำนวน 5 ช่อง วิธีการตรวจนับจำนวนเซลอสุจิภายในสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่แต่ละช่อง ต้องสังเกตเซลอสุจิที่ทับอยู่บนเส้นแบ่งช่อง โดยยึดส่วนหัวของเซลอสุจิเป็นหลักว่าจะนับเข้ามาอยู่ในช่องนั้น ๆ หรือไม่ จากตัวอย่างการนับ ถ้าส่วนหัวของเซลอสุจิทับอยู่บนเส้นแบ่งด้านบนและซ้ายมือก็จะนับเข้ามาอยู่ในช่องนั้น แต่ถ้าส่วนหัวทับอยู่บนเส้นแบ่งด้านล่างและขวามือจะไม่นับรวมเข้ามาในช่องนั้น (ภาพที่ 6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



**ภาพที่** 6 วิธีการตรวจนับจำนวนเซลอสุจิ โดยส่วนหัวของเซลล์อสุจิที่มีสีดำเท่านั้นที่จะถูกนับ
**ที่มา** : Laing (1979)

วิธีการคำนวณหาความเข้มข้นของเซลอสุจิมีดังนี้คือถ้าเป็น Fuchs-Rosenthal hemocytometer จะตรวจนับเซลอสุจิจากสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 1 ช่อง ซึ่งมีปริมาตร 1/5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และสมมติให้มีจำนวนอสุจิ N เซล

ปริมาตรน้ำเชื้อ 1/5 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีอสุจิ N เซล
ปริมาตรน้ำเชื้อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีอสุจิ 5N เซล
ปริมาตรน้ำเชื้อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีอสุจิ 5000N เซล
ถ้าเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 200
ความเข้มข้นของเซลอสุจิ = 5,000N x 200
= 1,000,000 N

หรือเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้
ความเข้มข้นของเซลอสุจิ = จำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 1 ช่อง x 5000 x อัตราการเจือจาง

ส่วนวิธีการคำนวณหาความเข้มข้นของเซลอสุจิ ถ้าใช้ Neubauer hemocytometer ก็คือจะตรวจนับจำนวนเซลอสุจิจากสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 5 ช่อง ซึ่งมีปริมาตร 1/50 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และสมมติให้มีจำนวนเซลอสุจิ N เซล

ปริมาตรน้ำเชื้อ 1/5 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีอสุจิ N เซล
ปริมาตรน้ำเชื้อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีอสุจิ 50N เซล
ปริมาตรน้ำเชื้อ 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีอสุจิ 50000N เซล
ถ้าเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 200
ความเข้มข้นของเซลอสุจิ = 50,000N x 200
= 10,000,000 N

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง



หรือเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

ความเข้มข้นของเซลอสุจิ = จำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 1 ช่อง x 5000 x อัตราการเจือจาง

4. เซลอสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิต (live and dead sperm) การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อวิธีนี้เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบดูว่าน้ำเชื้อมีเซลอสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิตอยู่เป็นเปอร์เซ็นต์เท่าใด

การตรวจสอบดูเพื่อแยกให้เห็นเซลอสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิตจะอาศัยหลักการย้อมสี โดยสีย้อมที่นิยมใช้คือ สี Eosin - Nigrosin ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้คือ

Eosin B : 1 กรัม

Nigrosin : 5 กรัม

ละลายในโซเดียมซิเตรดไดไฮเดรท 2.9%

ในการย้อมสีกระทำได้โดยหยดสีย้อม 1 - 2 หยดบนสไลด์ที่สะอาดแล้วหยดน้ำเชื้อ 1 หยดลงบนสีย้อมและผสมให้เข้ากัน ใช้สไลด์อีกแผ่นลากให้เกิดเป็นฟิล์มบางๆ และทำให้แห้งโดยเร็ว เมื่อตรวจดูสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าเซลอสุจิที่ตายจะติดสีย้อมคือ สี eosin ส่วนเซลอสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม โดยมีสี nigrosin เป็นสีพื้น สุ่มนับเซลอสุจิประมาณ 100 เซลล์ เมื่อทราบถึงจำนวนเซลอสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิตแล้ว ก็สามารถนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้

5. รูปร่างลักษณะของเซลอสุจิ (sperm morphology) การประเมินรูปร่างลักษณะของเซลอสุจิ เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบดูว่าน้ำเชื้อมีเซลอสุจิที่มีรูปร่างลักษณะปกติและผิดปกติอยู่เป็นเปอร์เซ็นต์เท่าใด

การตรวจสอบดูเพื่อแยกให้เห็นเซลอสุจิที่ปกติและผิดปกติ โดยอาศัยหลักการย้อมสีและสีย้อมเช่นเดียวกับการตรวจสอบเซลอสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิตได้ ทั้งนี้ผู้ปฏิบัติต้องทราบถึงลักษณะปกติของปลาแต่ละชนิดเสียก่อน ในการสุ่มนับจำนวนเซลอสุจิควรสุ่มนับประมาณ 100 เซลล์ ซึ่งเมื่อทราบจำนวนอสุจิที่มีรูปร่างลักษณะปกติและผิดปกติแล้ว ก็สามารถทราบเปอร์เซ็นต์เซลอสุจิที่ปกติได้

99826

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## อุปกรณ์

1. ปลาที่ใช้ในการทอลอง คือ ปลาตะเพียนขาว จำนวน 6 ตัว
2. กล้องจุลทรรศน์
3. สีย้อม Eosin – Nigrosin
4. น้ำเกลือ 0.4%
5. HepenDropper
6. ไปเปตเจือจางน้ำเชื้อพร้อมสไลด์ Hemacytometer
7. แผ่นสไลด์พร้อม cover glass
8. ตะเกียงแอลกอฮอล์
9. น้ำกลั่น
10. hependrop
11. หลอดวัดปริมาณน้ำเชื้อ
12. ขวดใส่สารเจือจางขนาด 1 ลิตร จำนวน 4 ใบ
13. กระดาษเช็ดเลนส์
14. ตาชั่ง
15. บีกเกอร์

## วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารเจือจาง

เตรียมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของสารเจือจางที่เป็นองค์ประกอบของสูตรต่างๆ จำนวน 1 ลิตร ดังนี้

- สารเจือจางสูตรที่ 1 ประกอบด้วย NaCl 7.4803 g, KCl 0.1380 g, $CaCl_2$ 0.1442 g, $NaHCO_3$ 0.1230 g ละลายในน้ำกลั้น 1 ลิตร
- สารเจือจางสูตรที่ 2 ประกอบด้วย KCl 14.9112g, TRI-HCl 4.7280 g, ละลายในน้ำกลั้น 1 ลิตร และปรับ pH 8.0
- สารเจือจางสูตรที่ 3 ประกอบด้วย NaCl 0.7480 g, KCl 0.2013 g, $CaCl_2$ 0.1553 g, $NaHCO_3$ 0.1283 g ละลายในน้ำกลั้น 1 ลิตร
- สารเจือจางสูตรที่ 4 ประกอบด้วย สารละลายNaCl 0.4%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การเก็บรวบรวมพ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาว

พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวที่มีอายุ 1 - 1.5 ปี น้ำหนักประมาณ 170 -185 กรัม จำนวน 6 ตัว ได้ถูกรวบรวมมาจากฟาร์มต่างๆในเขตลาดกระบัง จังหวัดกรุงเทพฯ และนำมาพักไว้ในโรงเพาะฝักที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังเป็นเวลา 3 สัปดาห์ ระหว่างนี้พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนก็ให้อาหารด้วยกุ้ง 2 วันต่อ 1 ครั้ง และมีการสเปรย์น้ำเพื่อกระตุ้นให้มีการสร้างตัวอสุจิก่อนเริ่มทำการทดลอง

3. การแช่เย็นน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

น้ำเชื้อปลาตะเพียนได้ถูกเจือจางสารเจือจางชนิดต่างๆที่เตรียมขึ้นมาใน flask ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อปลา : สารเจือจาง 1 : 50 โดยปริมาตร เขย่าเบาเพื่อให้น้ำเชื้อและสารเจือจางผสมเป็นเนื้อเดียวกันก่อนหลังจากนำน้ำเชื้อเจือจางไปขยายลง HepenDrop ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วจึงนำไปแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C การเจือจางในแต่ละชุดการทดลองได้ทำ 3 ซ้ำ โดยในแต่ละ HepenDrop น้ำเชื้อปลาตะเพียนที่ถูกเจือจางด้วยสารเจือจางเหลานี้ ได้ถูกนำมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในระยะเวลาต่างๆกันตั้งแต่ 6, 12 , 24, 48 , 72 และ 96 ชั่วโมง หลังจากน้ำเชื้อถูกเจือจางจนกระทั่งตัวอสุจิหยุดการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย 0.4% NaCl โดยการทดลองนี้ได้นำพ่อพันธุ์จำนวน 6 ตัวมารวบรวมน้ำเชื้อ (pool milt)

**การบันทึกข้อมูล**

บันทึกน้ำหนักและความยาวของปลาตะเพียนที่จะประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

บันทึกผลการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

**การวิเคราะห์ข้อมูล**

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS

**สถานที่ทำการทดลอง**

ห้องปฏิบัติการผสมเทียม ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีทางการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

**ระยะเวลาที่ทดลอง**

เดือนภุมภาพันธ์ ถึง เดือนมีนาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาเจือจางกับสารเจือจางทั้ง 4 สูตร ที่ความเข้มข้น 1 : 50 แช่เย็นในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิเป็นที่เวลา 0, 6 , 12 , 24 , 48 , 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า สารเจือจางสูตรทั้ง 4 สูตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่สารเจือจางสูตรที่ 2 และ 3 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) (ตารางที่ 5)

จะเห็นว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิที่เจือจางกับสารเจือจาง มีความแตกต่างกัน พบว่า สารเจือจางสูตรที่ 3 (ร้อยละ 40.00 ± 0.96) ให้ประสิทธิภาพเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด รองลงมาคือ สูตรที่ 4 (ร้อยละ 31.90 ± 0.96), สูตรที่ 1 (ร้อยละ 31.19 ± 0.96) และสารเจือจางสูตรที่ 2 (ร้อยละ 19.00 ± 0.96) ตามลำดับ โดยพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ที่เวลา 0 ชั่งโมง มีการเคลื่อนที่สูงที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ศิริพร (2550) ที่ทดลองนำน้ำเชื้อปลาดุกเทศเจือจางกับสารเจือจางทั้ง 7 สูตร พบว่าสารเจือจางสูตร Extender 7 และ Ca-F HBSS มีความเหมาะสมมากที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเทศแบบแช่เย็นมากที่สุด เนื่องจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 144 ชั่วโมง ก่อนที่เซลล์อสุจิจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วย 0.4 % NaCl (ตารางที่ 6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่** 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิของปลาตะเพียนขาวในสารเจือจาง 4 สูตร ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

| สารเจือจาง | เวลา (ชั่วโมง) | | | | | | | Mean±SE |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| สูตรที่ | 0 | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 96 | |
| 1 | 73.33±1.83 | 60.00±1.83 | 43.33±1.83 | 36.66±1.88 | 25.00±1.83 | 5.32±1.83 | 0.00±0.00 | 31.19±0.96[b] |
| 2 | 71.66±1.83 | 31.66±1.83 | 16.66±1.83 | 10.00±1.83 | 3.33±1.83 | 0.00±1.83 | 0.00±0.00 | 19.04±0.96[c] |
| 3 | 71.66±1.83 | 68.33±1.83 | 63.3±1.83 | 41.66±1.83 | 23.33±1.83 | 11.66±1.83 | 0.00±0.00 | 31.90±0.96[b] |
| 4 | 81.66±1.83 | 56.66±1.89 | 41.66±1.83 | 23.33±1.83 | 13.33±1.83 | 6.66±1.83 | 0.00±0.00 | 40.00±0.96[a] |
| Mean±SE | 74.58±0.92[a] | 54.16±0.91[b] | 40.83±0.92[c] | 28.75±0.92[d] | 11.25±0.92[e] | 4.58±0.92[h] | 0.00±0.00[g] | |

**ตารางที่** 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิปลาดุกเทศที่ทดลองกับสารเจือจางทั้ง 7 สูตร

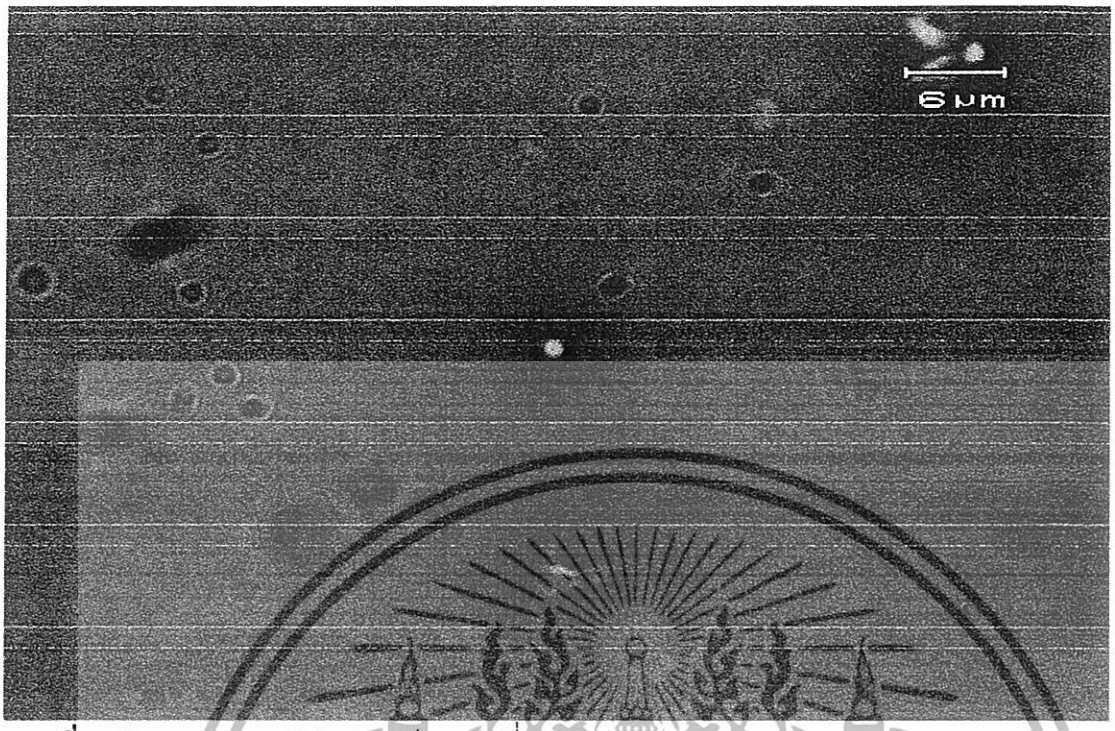
| | | | | | Time (hr.) | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| extender | 0 | 6 | 12 | 24 | 48 | 72 | 96 | 120 | 144 |
| Control | 66.7±3.9 | 13.3±1.9 | 6.7±0.9 | 3.3±0.9 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Ex 7 | 73.3±3.9 | 66.7±3.9 | 66.7±3.9 | 53.3±3.9 | 46.7±3.9 | 33.3±3.9 | 20 | 16.7±0.9 | 10 |
| Ex 13 | 73.3±3.9 | 60 | 53.3±3.9 | 26.7±3.9 | 26.7±3.9 | 1.7±0.9 | 10 | 6.7±0.9 | 1.7±0.9 |
| HBSS | 80 | 66.7±3.9 | 53.3±3.9 | 46.7±3.9 | 40 | 20 | 13.3±1.9 | 8.3±0.9 | 5 |
| Ca-F HBSS | 66.7±3.9 | 53.3±3.9 | 46.7±3.9 | 46.7±3.9 | 40 | 20 | 13.3±1.9 | 8.3±0.9 | 6.7±0.9 |
| Modified Cortland | 66.7±3.9 | 53.3±3.9 | 26.7±3.9 | 20 | 6.7±0.9 | 3.3±0.9 | 0 | 0 | 0 |

**ตารางที่ 7** คุณภาพน้ำเชื้อของปลาตะเพียนขาว

| | |
|---|---|
| น้ำหนักตัวปลา (กรัม) | 175±3.11 |
| ความยาว (เซนติเมตร) | 20.1±5.46 |
| ปริมาตรน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร) | 0.58±0.12 |
| ความเข้มข้นของอสุจิ (เซลล์/มิลลิลิตร) | 26954±492 |
| การเคลื่อนไหวของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์) | 91.66±1.66 |
| อสุจิที่มีชีวิต(เปอร์เซ็นต์) | 96.66±3.11 |
| อสุจิที่มีลักษณะปกติ (เปอร์เซ็นต์) | 97.66±0.88 |
| ตัวอสุจิ | |
| - ขนาดส่วนหัว (ไมครอน) | 2.6 |
| - ขนาดส่วนหาง(ไมครอน) | 32 |

**ภาพที่ 8** ลักษณะของตัวอสุจิปลาตะเพียนผิดปกติ (100x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**ภาพที่** 9 ลักษณะของอสุจิปลาตะเพียนขาวที่ปรกติ (100x)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สรุป

จากการทดลองนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาเจือจางกับสารเจือจางทั้ง 4 สูตร ในอัตราของน้ำเชื้อต่อสารเจือจาง 1 : 50 จากนั้นนำมาแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วนำน้ำเชื้อมาประเมินการเคลื่อนที่ที่เวลา 0, 6, 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ประสิทธิภาพของสารเจือจางสูตรที่ 3 ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารเจือจากสูตรที่ 1, 2 และ 4 อย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## เอกสารอ้างอิง

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ. 2534. การใช้ประโยชน์จากปลาน้ำจืด. เอกสารทางวิชาการฉบับที่1/2534. กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร. 14 น.

กฤษณ์ มงคลปัญญา และทัศนีย์ ภูมิพัฒน์. 2535. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. วารสารการประมง 45(6) : 1111 - 1123.

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 128 น.

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, Stein H. และ E. Mathes. 2537. การเพาะขยายพันธุ์ปลา จากน้ำเชื้อแช่เข็งในสูตรต่าง ๆ กัน. วารสารการประมง 48(6) : 509 – 516.

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2540. คุณภาพของอสุจิสด และอัตราการผสมของไข่ปลาไนยุโรปโดยน้ำเชื้อแช่แข็ง. วารสารการประมง 501(1) : 49 – 53.

นลินี มารคแมน. 2527. การศึกษาเบื้องต้นกรรมวิธีการเก็บน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นลินี มารคแมน อุทัยรัตน์ ณ นคร ประวิทย์ สุรนีรนาถ และกฤษณ์ มงคลปัญญา. 2527. ความก้าวหน้าในการเก็บน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง. เอกสารประชุมวิชาการ ครั้งที่ 22. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. น. 7 – 17.

ธีรพัฒน์ ทองคำ และคณะ. 2534. การทดลองใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ผลิตสัตว์น้ำ. การไฟฟ้าฝ่ายผลิตแห่งประเทศไทย. นนทบุรี. 16 น.

วิทย์ ธารชลานุกิจ. 2512. การเพาะและขยายพันธุ์ปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 300 น.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. การเพาะพันธุ์ปลา. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี. 128 น.

วรวุฒิ เกิดปราง. 2547. การเลี้ยงปลาน้ำจืดเศรษฐกิจ. เอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ. 80 น.

ศักดิ์ชัย ชูโชติ. 2530. การเลี้ยงปลาน้ำจืด. โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพฯ. 233 น.

ศักดิ์ชัย ชูโชติ. 2538. การเพาะและอนุบาลปลาน้ำจืด. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ. 191 น.

ศักดิ์ชัย ชูโชติ และสมศักดิ์ บัณฑุชัย. 2544. คุณภาพน้ำเชื้อและผลของจำนวนอสุจิที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิของปลาน้ำจืดบางชนิด. วารสารพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 44(3) : 25 – 31.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2531. การเพาะขยายพันธุ์ปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 239 น.

Bárbaro, A., F. Roberto., P. Rafael., P. Zoila., C. Edenaida., P. Eulogio, and A. Amilcar. 2003. High fry production rates using post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa under farming conditions. Aquaculture. 220 : 195 - 201

Billard, R. 1998. Artificial ; insemination and gamete management in fish. Mar. Behav. Physiol. 14 : 3 – 21.

Cognie, P.E., R. Billard. And N.H. Cho. 1989. La cryopreservation Dela laitance Del a Carp, *Cyprinus carpio*. 5. Appl. Lchthyo. 5 : 165 – 176.

Emri, m., T. Marian, L. Tron, L. Balkay, and Z. Krasznai. 1998. Temperature adaptation changes ion concentrations in spermatozoa and seminal plasma of common carp without affecting sperm motility. Aquaculture. 167 : 85-94

Ghislaine P.P., P. Christophe., C. Jacky., J. Claudette., F. Francoise, and R. Billard. 1998. Initiation of carp spermatozoa motility and early ATP redocetion after milt contamination by urine. Aquaculture. 160 : 317- 328

Goodal, J.A. , A.W. Blacdshaw and M.F. Capria. 1988. Facturs affecting the activation and duration of sperm motility of the spermatozoa of the Summer Whiting *Sillago cilliata*. Aquaculture. 77 : 243 - 250.

Hofgins, H. and R. Billard. 1998. Cryopreser ration of Salmon sperm. Aquaculture. 36 : 273 – 287.

Kurokura, H., R. Hirano., M. Tomita and M. Iwanashi. 1988. Cryopreser vation of carp sperm. Aquaculture. 37 : 267 – 273.

Lahnsteiner, F., T. Weismann., and R.A. Patzner. 1991. Fine structural changes in spermatozos of the grayling, *Thymallus Thymallos*, during routine cryopreservation. Aquaculature. 103 : 73 - 84.

Lahnsteinor. F. and R.A. Palzner. 1992. Anew method for electron microscopical fixation of spermatozoa of fresh watel eloosts. Aquaculture. 97 : 301 – 304.

Linhart O., M. Rodina., and J. Cosson. 2000. Cryopreservation of Sperm in Common Carp *Cyprinus carpio*: Sperm Motility and Hatching Success of Embryos. *Cryobiology*. 41: 241- 250.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Linhart O., M. Rodina, M. Flajshans., G. David and K. Martin. 2005. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanit* : Sperm Motility, viability, and hatch success of embryos. *Cryobiology*. 51 : 250 – 261.

Lagler, K.F., J.E. Bardach, and R.R. Miller. 1962. Ichthyology. John Wiley and Son, Inc., New York. 545p.

Maurer, R.R. 1978. Freezing mammalian embryosia review of techniques. อ้างโดย นิศา ไชยรักษ์. 2529. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

Rana, K.J., and B.J. Mcandrew. 1989. The viability of cry opreserved Tilapia spermatozoa. Aquaculture. 76 : 335 – 345.

Rex A. Dunham., N.N. Bart, and H. Kueukas. 1999. Effects of fertilization method and of selection for body weight and species on fertilization efficiency of Channel Catfish eggs with Blue or Channel catfish sperm, North American Journal of Aquaculture. 61 : 156 – 161.

Saac. A., R. Billard., M.C. Theran, and M.G. Holluberog. 1988. Short-Term preservation of *Cyprinus carpio* semen. Aquaculture. 71 : 133 – 150.

Steyn. G., J. Van Vuren, and E. Groblier. 1989. Anew sperm diluted for artificial insemination of rainbow trout (*Salmo Gairdheri*). Aquaculture. 83 : 367 – 374.

Willam, D.,N. Hollerman, and E.C. Boyd. 1985. Effect of annual draining on water quality and production of Channel Catfish in ponds. Aquaculture. 46 : 45 - 54.

Warnecke, D., and H.-J. Pluta. 2003. Motility and fertilizing capacity of frozen/thawed common carp (*Cyprinus carpio L.*) sperm using dimethyl-acetamide as the main cryoprotectant. Aquaculture. 215 : 167-185

Young, J.A., M.F. Capra, and A.W. blackshaw. 1993. Cryopreservation of sommer whiting (*Sillago cilliata*) spermatozoa. Aquaculture. 102 : 155 – 160.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้