ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง ประสิทธิภาพของสารเจือจางน้ำเชื้อ 4 สูตรในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ โดยวิธีการแช่เย็น

Efficiency of four extender for keeping semen in Rohu *(Labeo rohita)* by chilled Storage

ชื่อนักศึกษา นาย จัตุรงค์ น่วมนา

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตร์จารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตร์จารย์ สมศักดิ์ บัณฑุชัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....

(รองศาสตร์จารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

.....

(รองศาสตร์จารย์ สมศักดิ์ บัณฑุชัย)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รองศาสตร์จารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

วันที่ 17 เดือน พ.ค. พ.ศ. 56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

23103

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ประสิทธิภาพของสารเจือจางน้ำเชื้อ 4 สูตรในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยวิธีการแช่เย็น

Efficiency of four extender for keeping semen in Rohu *(Labeo rohita)* by chilled storage

T099293

โดย

นาย จัตุรงค์ น่วมนา

วพ
ว2372
2549

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 99293
วัน,เดือน,ปี.....

b.11885354
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร 10520
ปีการศึกษา2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ประสิทธิภาพของสารเจือจางน้ำเชื้อ 4 สูตรในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยวิธีการแช่เย็น

Efficiency of four extender in Rohu *(Labeo rohita)* by chilled storage

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ*(Labeo rohita)* แบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการแช่เย็นน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ โดยนำน้ำเชื้อปลายี่สกเทศมาเจือจางในสารละลาย 4 ชนิด (สารเจือจางสูตรที่ 1 ประกอบด้วย NaCl 7.4803 g, KCl 0.1380 g, CaCl2 0.14428 g, NaHCO 0.1230 g ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร, สารเจือจางสูตรที่ 2 ประกอบด้วย KCl 14.91122 g , TRI-HCl 4.728 g ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร และปรับ pH 8.0, สารเจือจางสูตรที่ 3 ประกอบด้วย NaCl 0.7480 g, KCl 0.2013 g, CaCl2 0.1553 g, NaHCo3 0.1283 g, สารเจือจางสูตรที่ 4 น้ำเกลือ 0.4% ในอัตราส่วน 1: 50 ปรากฏว่าสารละลายสูตรที่ 1 และ สูตรที่ 2 มีอัตราการเคลื่อนไหวดีที่สุดส่วนปริมาณตัวพิการมีการพิการมากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลองและวิจารณ์	17
สรุปและข้อเสนอแนะ	20
เอกสารอ้างอิง	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลการทดลองและวิจารณ์	17
สรุปและข้อเสนอแนะ	20
เอกสารอ้างอิง	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	สูตรน้ำยา (สูตรที่ 1-8) ที่ประกอบด้วย modified Riger's buffered solution,fructose, lecithin และ mannitol	4
2	แสดงการเคลื่อนไหวเมื่อคำณวนเป็นเปอร์เซ็นต์	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีความสำคัญต่อประเทศไทย มากเพราะสัตว์น้ำเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศได้ช่องทางเนื่องจากคนในประเทศนิยมบริโภคสัตว์น้ำกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากปลามีราคาไม่แพง, ประกอบอาหารได้หลายชนิด, มีคุณค่าทางโภชนาการที่สูง แต่ในปัจจุบันปริมาณสัตว์น้ำในแหล่งน้ำมีจำนวนลดลง อย่างเห็นได้ชัดอันเนื่องมาจากการจับที่มากเกินไป ดังนั้นผู้คนจึงได้ตระหนักถึงความสำคัญของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจึงมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำกันอย่างแพร่หลายและได้เห็นความสำคัญของการอนุรักษ์พันธ์ปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ เช่น ปลาบึก ปลาเทพา ปลาม้า ปลาเสือตอ กฤษณ์ (2536) ดังนั้นจึงมีการเพาะขยายพันธุ์โดยวิธีการผสมเทียม ซึ่งการผสมเทียมนั้นจะต้องมีความเกี่ยวข้องในการรีดน้ำเชื้อเพื่อนำมาผสมกับไข่ ในการขยายพันธุ์นั้นประสบปัญหาในด้านการหาพ่อแม่พันธุ์ที่ได้ไม่พร้อมกันเนื่องจากต้องจับจากธรรมชาติทำให้เกิดการ เสียเวลาที่ต้องรอเพศใดเพศหนึ่ง ดังนั้นจึงมีวิธีการแก้ไขปัญหาคือ การใช้น้ำเชื้อแช่เย็น ซึ่งน้ำเชื้อแช่เย็นก่อนการนำไปแช่เย็นนั้นต้องทำการ เจือจางสารเคมีบางชนิดเพื่อที่จะดำรงสภาพเชื้ออสุจิไว้ให้นานที่สุด

วัตถุประสงค์

เพื่อทำการศึกษาหาสารเจือจางที่เหมาะสม ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลาปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) โดยการแช่เย็นเพื่อที่จะให้อสุจิมีอายุที่ยาวนานที่สุด โดยมีการตรวจสอบในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ การเคลื่อนไหวของอสุจิ, รูปร่างลักษณะของอสุจิ, เปอร์เซ็นต์การอดและการตายของอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของ รองศาสตร์จารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ และรองศาสตร์จารย์ สมศักดิ์ บัณฑุชัย อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษซึ่งได้ให้คำแนะนำปรึกษาที่มีประโยชน์อย่างยิ่งตลอดเวลาการทำปัญหาพิเศษ จึงขอขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ให้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือ เป็นที่ปรึกษาให้คำแนะนำ ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอระลึกถึงบุญคุณพ่อ แม่ ที่คอยให้ความรักความห่วใยและคอยเป็นกำลังใจให้ข้าพระเจ้าจนมาถึงวันนี้ได้

นาย จัตุรงค์ น่วมนา

14 พฤษภาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ชีวประวัติของปลายี่สกเทศ

ปลายี่สกเทศหรือปลาโรฮู่ มีแหล่งกำเนิดในประเทศอินเดีย พบทั่วไปในแม่น้ำลำคลองหรือแหล่งน้ำจืดของประเทศอินเดีย ปากีสถาน และพม่า ขนาดใหญ่ที่สุดพบในประเทศอินเดียยาวถึง 6 ฟุต หนักมากถึง 100 ปอนด์ เรียกกันทั่วไปว่าโรฮู่ (Rohu) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Labeo rohita* จัดอยู่ในครอบครัว Cyprinidae ถูกนำเข้ามาประเทศไทยเป็นครั้งแรกเมื่อวันที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2511 มีลักษณะลำตัวยาวสีเทาดำ ทางด้านหลังและด้านท้องจะมีสีจางกว่าหรือเป็นสีเทาเงินในบางครั้งจะมีจุดสีทองแดงบนเกล็ด ลำตัวแบนข้างเล็กน้อย ส่วนหัวกว้าง ริมฝีปากหนา ปากจะตั้งอยู่ทางด้านหน้าในระดับต่ำใต้ส่วนหัว ริมฝีปากบนจะมีลัการะเป็นชายครุยต่อกับริมฝีปากล่าง ทำให้มีรูปร่างคล้ายปากดูด ส่วนริมฝีปากล่างเป็นติ่งเล็กๆเชื่อมต่อกับ isthmus ที่ริมฝีปากล่างและบนจะมีสันแข็งของขากรรไกรยื่นออกมา ซึ่งเป็นสารพวกเคอลาติน(keratin) บนขากรรไกรบนและล่างมีหนวดแห่งละ 1 คู่เกล็ดมีลักษณะกลมเรียบมีเกล็ดข้างลำตัว 40-42 เกล็ด และเกล็ดรอบโคนหางมีจำนวน 20 เกล็ด บนเกล็ดมีจุดสีแดง ลำตัวมีสีฟ้า หรือสีน้ำตาล ครีบหลังอยู่ในบริเวณกึ่งกลางลำตัวระหว่างครีบอกและครีบท้อง และอยู่ล้ำหน้าครีบท้องเพียงเล็กน้อย ครีบหลังประกอบด้วยก้านครีบแข็งเรียบไม่แตกแขนง 3 ก้าน และก้านครีบอ่อนที่แตกแขนง 12-13 ก้าน ครีบก้นประกอบด้วยก้านครีบแข็งไม่แตกแขนง 3 ก้าน และก้านครีบอ่นที่แตกแขนง 5 ก้าน ครีบอกมีก้านครีบ 17-18 ก้าน ครีบท้องมีก้านครีบ 9 ก้านครีบหางมีก้านครีบ 19 ก้าน (กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, 2534)ปลายครีบทุกครีบมีสีชมพูอ่อนครีบหางเป็นแฉกเว้าลึก ระยะห่างระหว่างลูกตาทั้งสองด้านจะแบนไม่โค้งนูนเหมือนปลาชนิดอื่นๆ ปลายี่สกเทศเป็นปลากินพืชและสิ่งเน่าเปื่อยเป็นอาหาร ลูกปลาขนาดเล็กจะกินพวกสาหร่ายและแพลงก์ตอน เมื่อปลามีขนาดประมาณ 25 เซนติเมตรจะเริ่มเปลี่ยนนิสัยมากินอาหารจำพวกเศษพืชที่เน่าเปื่อยมากขึ้น ในกระเพาะปลาขนาดใหญ่พบว่ามีส่วนประกอบของอาหารจำพวกสิ่งเน่าเปื่อยเกินกว่าครึ่งหนึ่งของอาหารทั้งหมด ปลาตัวผู้มีครีบหูที่สากเมื่อสัมผัส ส่วนปลาตัวเมียเรียบเกลี้ยงและลื่นโดยทั่วไปไม่วางไข่ในบ่อ การขยายพันธุ์ปลาชนิดนี้ใช้การฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้ปลาวางไข่ และผสมเทียมฤดูวางไข่จะอยู่ในเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน (ศักดิ์ชัย, 2538)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยการแช่แข็ง

การเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นวิธีที่ช่วยในการเพาะเลี้ยง การปรับปรุงพันธุ์และยังสามารถเก็บรักษาไว้เพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ (อสุจิ) เพื่อการศึกษาทางพันธุกรรมได้ (กฤษณ์ และทัศนีย์, 2536) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง เป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นเวลานานในถังไนโตรเจนเหลวที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิตั้งแต่ 0 – 196 องศาเซลเซียส มีผลดีในการผสมเทียมในปลาที่มีลักษณะที่เป็นกระเทยแบบที่เป็นเพศเมียในระยะแรก (protandrous hermapyrodite) แต่เมื่อโตไปแล้วจะกลายเป็นเพศผู้เช่น ปลาเก๋า ปลาไหลนาจากข้างต้นที่กล่าวมาจะทำการผสมได้ง่ายเมื่อไข่ตัวเมียสุกก็ทำการผสมเทียมกับน้ำเชื้อที่เตรียมไว้โดยไม่ต้องแสวงหาตัวผู้มาเลี้ยงกักตุนเป็นพ่อพันธุ์ทุกๆ ฤดูการผสมพันธุ์ (อุทัยรัตน์ ,2531) และอีกประการหนึ่งเป็นการแก้ปัญหาการขาดพ่อพันธุ์ปลาที่หาได้ยากหรือใกล้จะสูญพันธุ์เช่น ปลาบึก ปลาเทพา ซึ่งมีจำนวนน้อยลงทุกปีและในบางฤดูผสมพันธุ์อาจหาพ่อ-แม่พันธุ์ได้ไม่พร้อมกัน (ทัศนีย์ และคณะ, 2528)

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบที่ต้องลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วซึ่งทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลได้แต่ถ้าหากลดอุณหภูมิอย่างช้าๆก็จะมีผลต่อเซลคือทำให้เซลสูญเสียน้ำซึ่งปัญหาเหล่านี้สามารถป้องกันได้ โดยการใช้สารเคมีบางชนิดลงไปในของเหลวที่อยู่ภายนอกเซลล์ หรือน้ำยาเจือจางเซลล์ (extender หรือ diluent) สารเคมีเหล่านี้มีหลายชนิดซึ่งเรียกรวมกันว่า “สารไครโอโพรเทคแทนท์” (ตารางที่ 1)สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทคือ 1. สารออกฤทธิ์ภายในเซลล์ได้แก่ Dimethyl sulfoxid, glycerol , methanol, ethanol, propanediol 2. สารออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ได้แก่ polyvinylpyrrolidon, sucrose, glucose, manitol (กฤษณ์, 2536)

Harvey and Kelley, 1988 ได้มีการใช้ Dimethyl sulfoxid ในระดับ 8 เปอร์เซ็นต์ได้ผลดีกว่าการใช้ glycerol และอสุจิมีการเคลื่อนไหวหลังการละลายประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

น้ำยา สูตรที่	NaCl	KCl	$MgSO4H_2O$	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)

สารเจือจาง

สารเจือจางที่ที่จะนำไปเก็บรักษาน้ำเชื้อจะต้องมีองค์ประกอบของสารเคมีที่มีไอออนและแรงดันออสโมติกที่ ใกล้เคียงกับในน้ำเชื้อ (กฤษณ์, 2536) Gooddall (2001) ได้ทำการศึกษาใช้สารเคมีของ Na^+ และ K^+ ใช้ในการเก็บรักษาอสุจิแช่แข็ง ปรากฏว่าจะมีผลทำให้อสุจิเคลื่อนที่ดีขึ้น

ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อและปริมาณของน้ำเชื้อปลา

ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อควรสังเกตทันที่หลังจากทำการรีดเชื้อออกมาดดยสังเกตสี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่นๆ (วีรพงศ์, 2536) น้ำเชื้ปลาที่ดีควรมีสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนมข้นเหนียว และมีกลิ่นคาว ถ้าน้ำเชื้อปลามีสีเลือดปนคุณภาพน้ำเชื้อปลาจะไม่ดี ส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิ (วนิศา, 2533) เกรียงศักดิ์ (2540) รายงานว่าปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดได้จากปลาแต่ละชนิดรวมถึงความหนาแน่นของอสุจิที่มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของปลาเพราะปลาแต่ละชนิดมีวิวัฒนาการการดำรงเผ่าพันธุ์ที่แตกต่างกัน เช่น ปลาดุกวางไข่จำนวนน้อยและปริมาณน้ำเชื้อมีน้อยแต่เปอร์เซนต์การฟักตัวสูงเพราะไข่ปลาดุกเป็นไข่จมติดวัตถุ มีพฤติกรรมเฝ้าดูแลไข่และเลี้ยงตัวอ่อน สำหรับปลาที่มีชนิดครึ่งลอยครึ่งจมไม่มีการเฝ้าดูไข่และเลี้ยงตัวอ่อน แต่มีการวางไข่และมีปริมาตรน้ำเชื้อที่มาก เช่น ปลาตะเพียน (ศักดิ์ชัย, 2538) กฤษณ์ (2536) รายงานว่าปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดที่รีดได้จากปลาตัวหนึ่งครั้งหนึ่ง และความหนาแน่นของตังอสุจิในน้ำเชื้อนั้น มีความผันแปรไปตามชนิดของปลาและอาจแตกต่างกันตามฤดูกาลและช่วงระยะเวลาในฤดูผสมพันธุ์

รูปร่างลักษณะของอสุจิปลา

อสุจิปลามีส่วนประกอบที่สำคัญ 3 ส่วนคือส่วนหัว, ส่วน midpiece และหาง ซึ่งลักษณะของเซลล์อสุจิของปลาแต่ละชนิดจะแตกต่างกันตามชนิดของปลา (ภาพที่ 1) และ (ภาพที่ 2) เชื้อของปลาเพศผู้จะไม่มี acrosome เหมือนอย่างในสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มอื่นๆซึ่งอาจเป็นเพราะว่าไม่มีความจำเป็นต่อการใช้เข้าไปในไข่เนื่องจากไข่ปลามีรู micropyle ไว้รอรับอยู่ (ศักดิ์ชัย , 2538) ปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีอสุจิที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกลม (spherical) หรือทรงรี (ovate หรือ acornshaped) โดยส่วนหัวมีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร และความยาวจากหัวถึงหางยาวประมาณ 40-60 ไมโครเมตร ส่วนกลางมีขนาดเล็กและส่วนใหญ่มีหางจำนวน 1 หาง (วีรพงศ์,2536)

หัวเป็นส่วนประกอบด้วยนิเครียสมีโครโมโซม 1 ชุดล้อมรอบด้วยไซโตรพลาสซึมเพียงบางๆ และห่อหุ้มด้วย plas membrane (cell membrane) รูปร่างลักษณะของส่วนหัวอสุจิมี

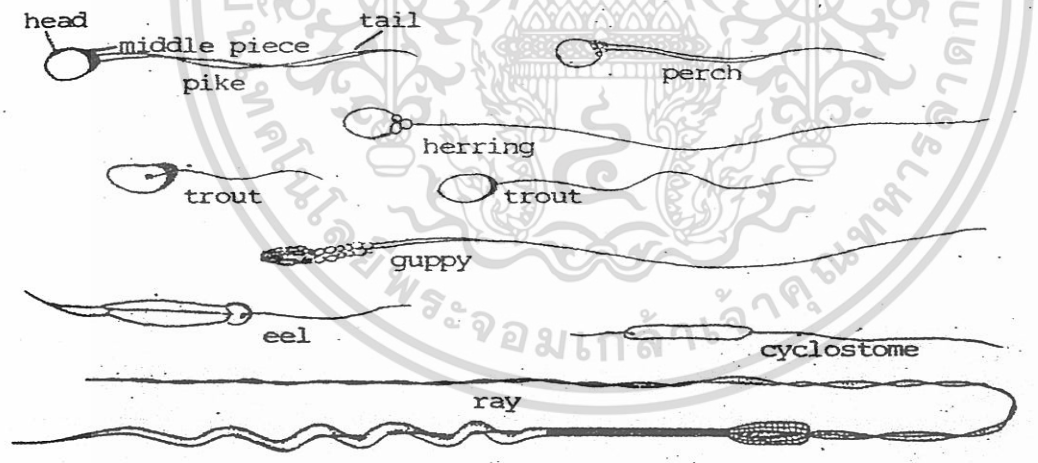
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายแบบเช่น กลม รี แท่งหรือหยัก เป็นต้น ตัวอย่างเช่น ปลาตะเพียนส่วนหัวของอสุจิมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ไมโครเมตร (Billard, 1998) ปลาไน ส่วนหัวของอสุจิมีลักษณะกลมมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ไมโครเมตร(Billard, 1998) ปลายี่สกเทศส่วนหัวมีลักษณะกลมเรียว (นลินี, 2527)

Midpiece เป็นส่วนที่เชื่อมต่อระหว่างหัวและหาง มีรูปร่างแตกต่างตามชนิดของปลา ประกอบด้วย microtubules ซึ่งเป็นแกนกลางของส่วนหาง ล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึมภายในมี mitochondria และ centriole (Lahnsteimer et al., 1991)

หาง เป็นส่วนที่ช่วยในการเคลื่อนที่ประกอบด้วย microtubules เรียงกันรอบแกนกลาง ล้อมรอบด้วย plasma membrane ปลาส่วนใหญ่มี microtubules เป็นแกนกลาง 1 คู่ และเรียงรอบ
เป็นวงกลมอีก 9 คู่ ยกเว้นปลาในพวก Anguilliformes และ Elopiformes ซึ่งไม่มี microtubules เป็นแกนกลาง โดยส่วนใหญ่เชื้อเพศผู้มีหางเพียงหางเดียว แต่ในปลาบางชนิดเช่น Porichtys notatus จะมี 2 หางนี้พบบ้างเป็นบางครั้งในปลา channel catfish และปลาหางนกยูง ปลาบางครอบครัวในกลุ่ม Mormyriformes เชื้อเพศผู้ไม่มีหาง (ศักดิ์ชัย, 2538)

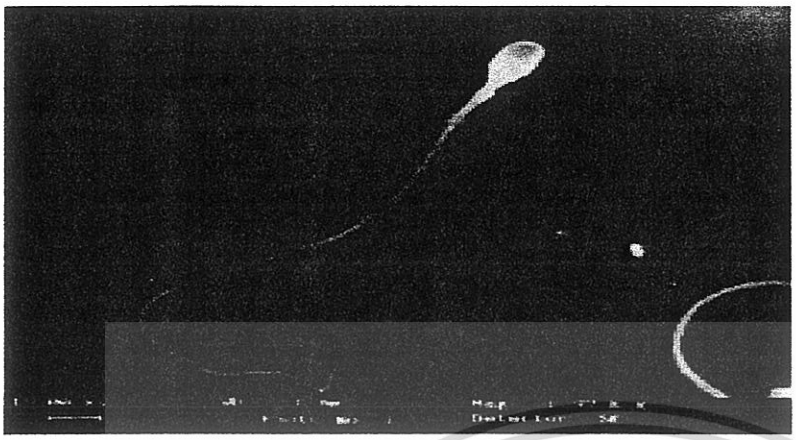
ภาพที่ 1 อสุจิของปลาบางชนิด



ที่มา : Lagler et al., 1962

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2 อสุจิของปลายี่สกเทศที่ถ่ายด้วยกล้อง อิเล็กตรอน



ที่มา Routray, (2006)

การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิของปลา

โดยทั่วไปเซลอสุจิปลาเมื่ออยู่ใน seminal fluid หรือเมื่อรีดได้จะไม่เคลื่อนไหว แต่เมื่ออยู่ในน้ำจะมีการเคลื่อนไหวอย่างปราดเปรียว ซึ่งต่างจากน้ำเชื้อสัตว์ที่เลี้ยงลูกด้วยนมที่รีดออกมาแล้วมีการเคลื่อนไหว เซลอสุจิปลาที่ได้รับการกระตุ้นให้เคลื่อนไหวจะมีชีวิตอยู่ได้ไม่นาน โดยมีอัตราเร็วในการเคลื่อนไหว และระยะเวลาในการเคลื่อนไหวแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เช่น อสุจิของปลาทะเล และปลาน้ำกร่อยส่วนใหญ่จะเคลื่อนไหวได้นานกว่าเซลอสุจิของปลาน้ำจืด สำหรับน้ำที่จะใช้กระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิก็ขึ้นอยู่ชนิดปลา เช่น น้ำจืดกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิปลาน้ำจืด หรือน้ำทะเลกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิปลาทะเล อย่างไรก็ตามได้มีการนำน้ำกร่อยมากระตุ้นการเคลื่อนไหวของเซลอสุจิปลาน้ำจืดพบว่าเวลอสุจิเคลื่อนไหวได้นานขึ้น (ศักดิ์ชัย, 2538) ซึ่งผลสอดคล้องกับ ได้มีการนำอสุจิปลาน้ำจืดมาใส่ในน้ำเกลือ 0.6 – 0.7 % หรือน้ำกร่อย พบว่าอสุจิมีอายุการเคลื่อนไหวนานขึ้น(วีรพงศ์,2536)จึงสันนิษฐานถึงปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเคลื่อนไหวของอสุจิปลาในแหล่งน้ำได้ดังนี้

1. ภาวะออกซิเจนในแหล่งน้ำมีปริมาณสูงกว่าในสภาพที่อยู่ใน seminal floid

2. ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของน้ำกระตุ้นการเคลื่อนที่ซึ่งปกติมีความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเชื้อ 6.5 – 7.5

3.ปริมาณอิออนของสังกะสีและทองแดงเป็นตัวกระตุ้น เช่น พบในปลาทะเลจะมีการเคลื่อนที่เร็ว และนานกว่าปลาน้ำจืดเพราะในทะเลมีอิออนของสังกะสีและทองแดงเป็นตัวกระตุ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. คุณสมบัติไฮโปโทนิค (Hypotonic) พบในปลาแซลมอนที่อยู่น้ำจืด อสุจิมีการเคลื่อนไหวที่น้อยกว่า 2 นาทีแต่เมื่ออยู่ในน้ำเค็ม 3 – 6 ppt จะเคลื่อนไหวได้นานขึ้นอีก และใน 10 ppt มีการเคลื่อนไหวได้นานที่สุด (ศักดิ์ชัย, 2538)

ดังนั้นโดยทั่วไปจึงนิยมใช้เกลือที่มีความเข้มข้น 0.6 – 0.7% ซึ่งมีคุณสมบัติไฮโปโทนิคมากระตุ้นการเคลื่อนไหวและยืดอายุเซลล์อสุจิ (Rex, 1999)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา

ภายหลังรีดเก็บน้ำเชื้อจากพ่อแม่พันธุ์ปลาแล้ว การที่จะทราบถึงความสมบูรณ์พันธุ์ (fertility) ของน้ำเชื้อมีมากน้อยเท่าใด สามารถทำโดยนำน้ำเชื้อปลาไปผสมกับไข่ที่รีดออกมาสดๆ แต่ถ้าเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เช่น โคและสุกร กระทำได้โดยนำน้ำเชื้อนั้นไปฉีดให้กกกับสัตว์เพศเมียแล้วตรวจผลการตั้งท้อง อย่างไรก็ตามก่อนจะนำน้ำเชื้อปลาที่รีดเก็บได้ไปผ่านขบวนการทำน้ำเชื้อและผสมกับไข่สด ควรมีการตรวจหรือประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในห้องปฏิบัติการก่อน แม้ว่าการตรวจดังกล่าวจะไม่ใช่วิธีวัดความสมบูรณ์ที่แท้จริง แต่ก็มีประโยชน์คือสามารถคาดคะเนความสารามาในการผสมกับไข่ (probable fertilizing ability) ใช้เป็นเกณฑ์ศึกษาผลกระทบที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อจากปัจจัยต่างๆ และใช้ในการกำหนดอีตราการเจือจาง (dilution rate) ซึ่งจำเป็นมากสำหรับการผสมเทียมโคและสุกร

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเป็นงานที่ควรกระทำอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพเพื่อให้คงคุณภาพและความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อที่เก็บมาได้ การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อดังกล่าวโดยทั่วๆ ได้แก่

1. ลักษณะและปริมาณน้ำเชื้อ (Appearance and volume) ลักษณะและปริมาตรน้ำเชื้อควรสังเกตและตรวจสอบวัดทันทีหลังจากรีดน้ำเชื้อออกมา โดยปกติน้ำเชื้อปลาที่อยู่ในอัณฑะหรือรีดออกมาสดๆ จะมีสีขาวคล้ายน้ำนม แต่ข้นเหนียวและมีกลิ่นคาวจัด ไม่ควรมีสีอื่นเจือปน เช่น สีแดงหรือสีชมพู น้ำเชื้อที่รีดออกมาจะใช้ภาชนะที่มีขีดบอกปริมาตรรองรับ ภาชนะที่ใช้ดักล่าวจะขึ้นอยู่กับปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้ เช่น ปลาที่ให้ปริมาตรน้ำเชื้อแต่ละครั้งมากควรใช้ถ้วยตวงหรือกระบอกตวง ปริมาตรน้ำเชื้อที่วัดได้จะนำมาใช้คำนวณหาอัตราการเจือจางน้ำเชื้อ (ศักดิ์ชัย, 2538)

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

0 = ไม่มีการเคลื่อนไหว

1 = (poor) มีการเคลื่อนไหวน้อยกว่า 30% และเคลื่อนไหวช้า

2 = (fair) อสุจิ 20-30% เคลื่อนไหวแข็งแรง แต่สังเกตคลื่น

3 = (good) อสุจิ 50- 70% เคลื่อนไหวแข็งแรง และสังเกตคลื่นชัดเจน

4 = (very good) อสุจิ 70- 80% เคลื่อนไหวแข็งแรง และมีคลื่นให้เห็นน้อยกว่า

5 = (excellent) อสุจิ 80% ขึ้นไปเคลื่อนไหวรวดเร็ว และมีคลื่นรวมให้เด่นชัดเจน

การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิเป็นวิธีการที่ต้องตรวจดูการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิเป็นรายตัว และประเมินการเคลื่อนที่ออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยการสุ่มนับประมาณ 10 เซลล์ในแต่ละครั้งหรือแต่ละตำแหน่งแล้วเปลี่ยนไปดูตำแหน่งอื่นๆอีกอย่างรวดเร็วเพื่อให้ได้เซลล์อสุจิประมาณ 100 เซลล์ (ศักดิ์ชัย, 2538)

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

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

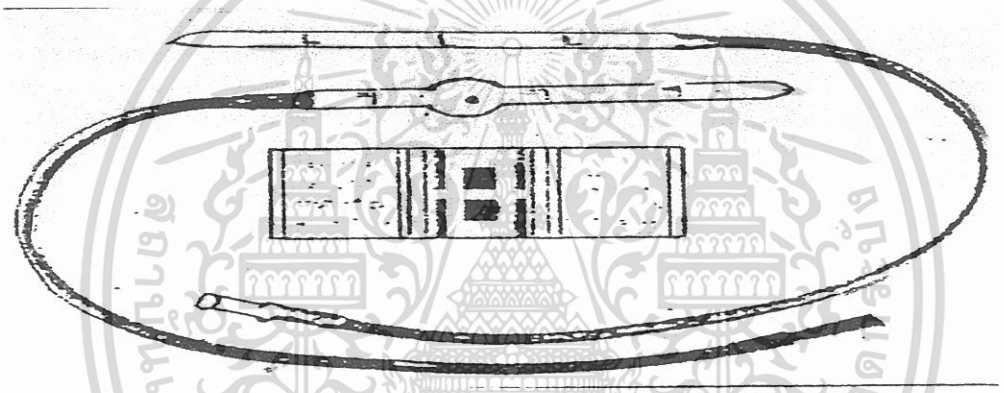
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

- การใช้ hemocytometer เป็นการตรวจนับจำนวนเซลล์โดยตรง โดยการใช้ hemocytometer ซึ่งออกแบบมาเพื่อนับเซลล์เม็ดเลือดแล้วมาดัดแปลงมาใช้ตรวจนับเซลล์อสุจิ

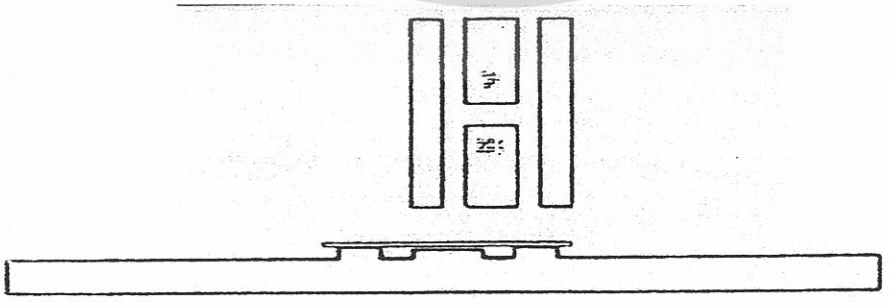
- hemocytometer (ภาพที่ 3)ประกอบด้วยสไลด์ที่มีช่องนับ (conting chamber) 2 ช่อง และไปเปตเจือจางน้ำเชื้อ (dilution pipette) โดยลักษณะดังกล่าวเมื่อมองจากด่านบนและด่านล่าง (ภาพที่ 4) สำหรับสไลด์ของ hemocytomete ที่ใช้กันได้แก่แบบ Fuchs- Rosenthal และแบบ Neubauer

ภาพที่ 3 hemocytometer ประกอบด้วยสไลด์มาตรฐานและไปเปตเจือจางนำเชื้อ



ที่มา : Bearden และ Fuguay, 1980

ภาพที่ 4 ลักษณะของสไลด์และแผ่นกระจกบางเมื่อมองจากด้านบนและด้านข้าง



ที่มา : Sorensen (1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Fuchs-Rosenthal hemocymeter จะมีช่องนับซึ่งเมื่อปิดแผ่นกระจกบางแล้ว บริเวณช่องนับจะลึกจากผิวด้านล่างของแผ่นกระจกบาง 0.2 มิลลิเมตร บนช่องนับจะมีตารางอยู่ ซึ่งประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 16 ช่อง แต่ละช่องมีพื้นที่ 1.0 ตารางมิลลิเมตร ดังนั้นประมาตรน้ำเชื้อระหว่างแผ่นกระจกบางกับสี่เหลี่ยมจัตุรัสแต่ละช่องเท่ากับ 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 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

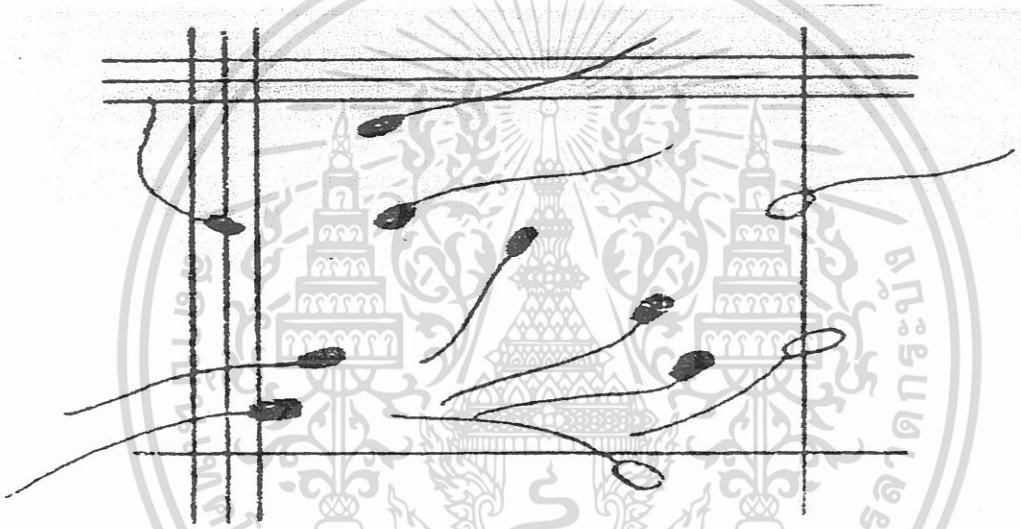
8. หยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วที่ขอบของแผ่นกระจก เพื่อให้น้ำเชื้อเข้าไปเต็มพื้นที่ใต้แผ่นกระจก การหยดน้ำเชื้อในขั้นตอนนี้ต้องให้พอดีกับพื้นที่ใต้แผ่นกระจกบาง ถ้าหยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วมากเกินไปจะทำให้น้ำเชื้อล้นออกจากขอบของแผ่นกระจกบาง ทำให้การตรวจนับจำนวนเซลอสุจิเป็นไปได้ยากและไม่เที่ยงตรง

9. ปล่อยน้ำเชื้อที่เจือจางไว้สักครู่เพื่อให้เซลอสุจิอยู่คงที่แล้วจึงเริ่มตรวจนับจำนวนเซลอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

ภาพที่ 5 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 5,000N เซล

ถ้าเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1 ต่อ 200

ความเข้มข้นของเซลอสุจิ = 5,000N x 200

= 1,000,000 N

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

ความเข้มข้นของเซลอสุจิ = จำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 1 ช่อง x 5,000x 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

หรือเขียนเป็นสูตรได้ดังนี้

ความเข้มข้นของเซลอสุจิ = จำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 1 ช่อง x 50,00 0x 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 ใช้สไลด์อีกแผ่นลากให้เกิดเป็นฟิล์มบาง ๆ และทำให้แห้งโดยเร็ว เมื่อตรวจดูสไลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าเซลอสุจิที่ตายจะติดสีย้อมคือ สี eosin ส่วนเซลอสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม โดยมีสี nigrosin เป็นสีพื้น สุ่มนับเซลอสุจิประมาณ 100 เซล เมื่อทราบถึงจำนวนเซลอสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิตแล้ว ก็สามารถนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้

5. รูปร่างลักษณะของเซลอสุจิ (sperm morphology) การประเมินรูปร่างลักษณะของเซลอสุจิเป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบดูว่าน้ำเชื้อมีเซลอสุจิที่มีรูปร่างลักษณะปกติและผิดปกติอยู่เป็นเปอร์เซ็นต์เท่าใด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจสอบดูเพื่อแยกให้เห็นเซลอสุจิที่ปกติและผิดปกติ โดยอาศัยหลักการย้อมสีและสีย้อมเช่นเดียวกับการตรวจสอบเซลอสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิตได้ ทั้งนี้ผู้ปฏิบัติต้องทราบถึงลักษณะปกติของปลาแต่ละชนิดเสียก่อน จึงจะสามารถแยกลักษณะที่ผิดปกติได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์

1.ปลาที่ใช้ในการทดลอง คือ ปลายี่สกเทศ

2. กล้องจุลทรรศน์

3. สีย้อม Eosin – Nigrosin

4. น้ำเกลือ 0.4%

5. Dropper

6. ไปเปตเจือจางน้ำเชื้อพร้อมสไลด์ Hemacytometer

7. แผ่นสไลด์พร้อม cover glass

8. ตะเกียงแอลกอฮอล์

9. น้ำกลั่น

10. hependrop จำนวน 120 อัน

11. หลอวัดปริมาณน้ำเชื้อ

12. ขวดใส่สารเจือจางขนาด 1 ลิตรจำนวน 4 ใบ

13. กระดาษเช็ดเลนส์

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารเจือจาง

เตรียมสารเคมีที่เป็นส่วนประกอบของสารเจือจางที่เป็นองค์ประกอบของสูตรต่างๆ จำนวน 1 ลิตร ดังนี้

- สารเจือจางสูตรที่ 1 ประกอบด้วย NaCl 7.4803 g, KCl 0.1380 g, $CaCl_2$ 0.14428 g, NaHCO 0.1230 g ละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร

- สารเจือจางสูตรที่ 2 ประกอบด้วย KCl 14.91122 g , TRI-HCl 4.728 g ละลายในน้ำกลั่น 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

- สารเจือจางสูตรที่ 4 น้ำเกลือ 0.4%

2. ปลาที่ใช้เป็นปลายี่สกเทศจำนวน 6 ตัว (ได้ทำการรีดที่บ่อเลี้ยงปลาแห่งหนึ่งย่านลาดกระบัง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อ

3.1 ตรวสอบความเข้มข้นของเซลล์อสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์โดคยใช้ไปเปตเจือจางน้ำเชื้อแล้วตรวจนับด้วยสไลด์ Heamacytometer ด้วยวิธีการ Neubauer สูตรคำนวณมีดังนี้

ความเข้มข้นของอสุจิ = จำนวนอสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง × 50,000 × อัตราการเจือจาง

3.2 ดูการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยการใช้น้ำกลั่นกระตุ้น

3.3 ตรวจนับตัวเป็นตัวตาย, ตัวพิการ, โดยวิธีการย้อมสี Eosin – Nigrosin

4. การบันทึกข้อมูล

4.1 บันทึกน้ำหนักและความยาวของปลายี่สกเทศที่จะประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

4.2 บันทึกผลการประเมินน้ำเชื้อ

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ, เปอร์เซ็นต์ตัวเป็นตัวตายของน้ำเชื้อ

6. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการผสมเทียม ภาควิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

7. ระยะเวลาที่ทดลอง

เดือนกุมภาพันธุ์ ถึง เดือนมีนาคม 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลจากการศึกษาการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อที่อยู่ในสารเจือจางทั้ง 4 ชนิดที่แสดงในตารางที่ 2 ผลปรากฏว่าสารเจือจางชนิดที่ 1 ซึ่งมีส่วนประกอบของ NaCl 7.4803 g, KCl 0.1380 g, $CaCl_2$ 0.14428 g, NaHCO 0.1230 g มีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยอยู่ที่ 28.810 ± 0.777 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีการเคลื่อนที่มากที่สุด ส่วนในสารเจือจางสูตรที่ 2 ซึ่งมีส่วนประกอบของ KCl 14.91122 g , TRI-HCl 4.728 g มีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยอยู่ที่ 28.095 ± 0.772 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ผลที่ดีเช่นกัน ส่วนในสารเจือจางสูตรที่ 3 ซึ่งมีส่วนประกอบของ NaCl 0.7480 g, KCl 0.2013 g, $CaCl_2$ 0.1553 g, $NaHCo_3$ 0.1283 g มีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยอยู่ที่ 26.905 ± 0.772 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ผลที่ต่ำกว่า 2 สูตรแรก ส่วนในสารเจือจางสูตรที่ 4 ซึ่งมีส่วนประกอบของ น้ำเกลือ 0.4% มีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยอยู่ที่ 12.619 ± 0.772 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งได้ผลที่ต่ำที่สุด(ดังตารางที่2 และรูปที่7) ส่วนสเปิมร์ที่มีการพิการนั้นมี จำนวนมากขึ้นเรื่อยๆเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลทำให้อัตราการผสมติด นั้นมีค่าต่ำลง (ดังรูปที่6) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Saac et al . (1998) ผลการทดลองที่แช่น้ำเชื้อในสารเจือจาง 8 สูตรผลปรากฏว่ามีจำนวนตัวพิการเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น

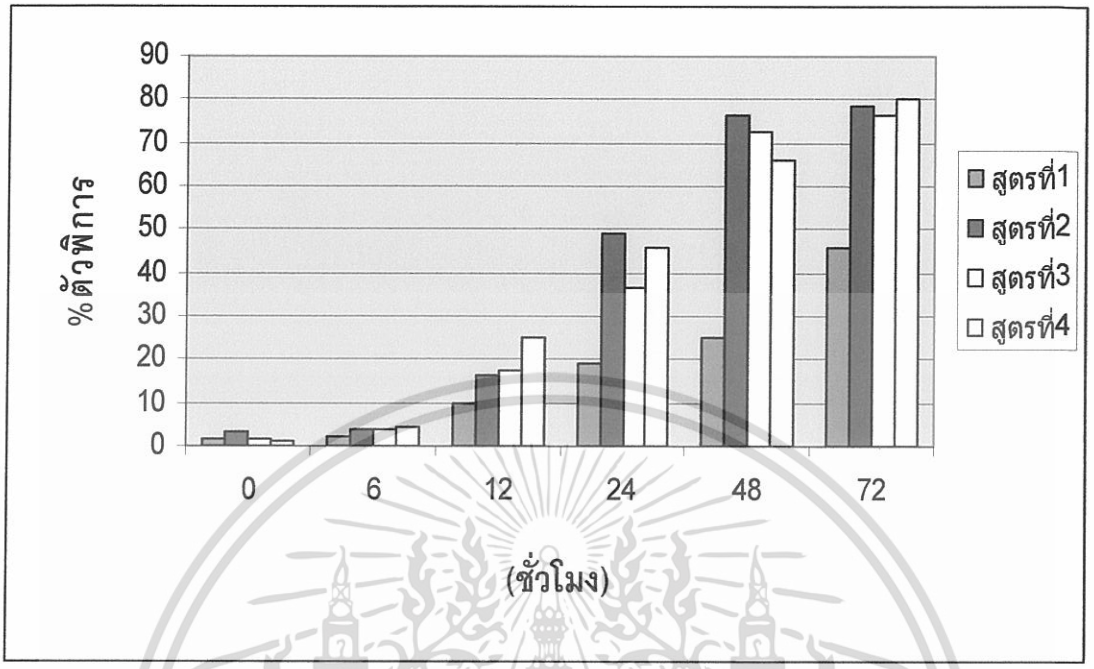
99293

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

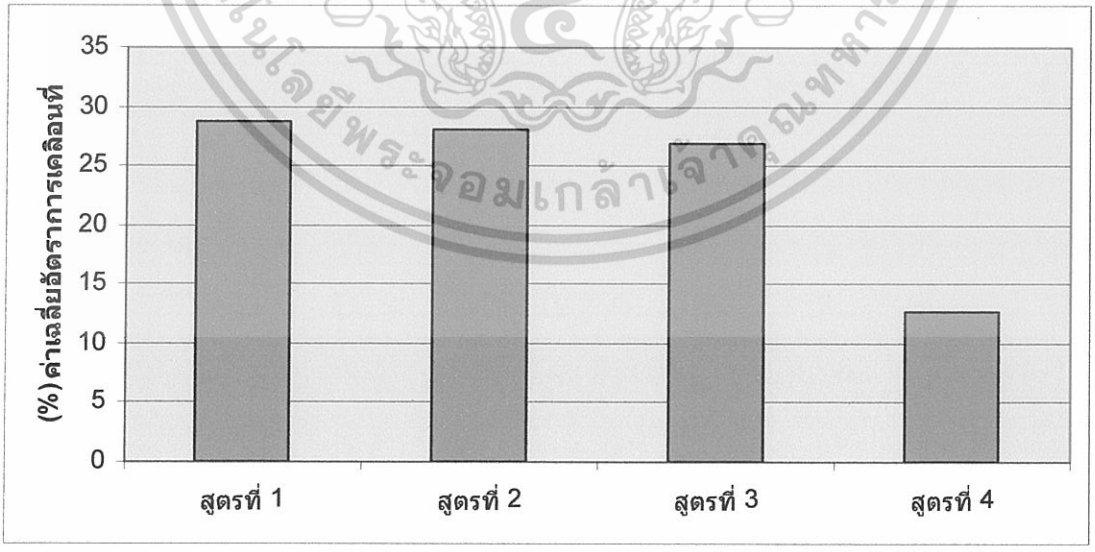
ตารางที่ 2 แสดงการเคลื่อนไหวเมื่อคำณวนเป็นเปอร์เซ็นต์

สูตรที่	เวลา(ชั่วโมง)							
	0	6	12	24	48	72	96	mean±se
1	78.33±2.041	60.0±2.041	21.0±2.041	20.0±2.041	13.33±2.041	8.33±2.041	0±0.00	28.81±0.772[a]
2	83.33±2.041	56.66±2.041	26.66±2.041	18.33±2.041	8.33±2.041	3.33±2.041	0±0.00	28.095±0.772[a]
3	78.33±2.041	60.0±2.041	31.66±2.041	11.66± 2.041	5.0±2.041	1.66±2.041	0±0.00	26.905±0.772[a]
4	30.0±2.041	26.66±2.041	20.0±2.041	8.333±2.041	1.66±2.041	1.66±2.041	0±0.00	12.619±0.772[b]
mean±se	67.50±1.021[a]	50.833±1.021[b]	25.00±1.021[c]	14.583±1.021[d]	7.083±1.021[e]	3.750±1.021[f]	0±0.00	

ภาพที่ 6แสดงเปอร์เซ็นต์ตัวพิการในสารละลายเจือจางทั้ง 4 สูตร



ภาพที่ 7แสดงค่าเฉลี่ยอัตราการเคลื่อนที่ของสารละลายเจือจางทั้ง 4 สูตร



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุป

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ ในด้านการเคลื่อนไหวของอสุจิ ที่อยู่ในสารเจือจางทั้ง 4 ชนิด ผลปรากฏว่าสารเจือจางสูตรที่ 1 ให้ผลดีที่สุด ส่วนในสารเจือจางสูตรที่ 2ให้ผลที่ใกล้เคียงกับสารเจือจางที่ 1 ส่วนในสารเจือจางสูตรที่ 3 ให้ผลที่ใกล้เคียงกับสารเจือจางสูตรที่ 2 และในสารเจือจางสูตรที่ 4 ให้ผลที่แตกต่างมากที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับสารเจือจางทั้ง 3 สูตรแรก

ข้อเสนอแนะ

1. การรีดน้ำเชื้อปลาควร ใช้ผ้าแห้งเช็ดตัวปลาให้แห้งเพื่อป้องกันน้ำจะเข้าไปผสมกับเชื้ออสุจิ เพราจะทำให้ผลการประเมินผิดพลาดได้
2. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา ผู้ประเมินต้องมีความชำนาญและแม่นยำในการประเมิน
3. การประเมินการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ ต้องประเมินอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเซลล์อสุจิที่ถูกน้ำลั่นกระตุ้นจะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาประมาณ 1-2 นาที จะหยุดการเคลื่อนไหวทำให้ไม่สามารถประเมินการเคลื่อนไหวได้
4. สไลด์ที่ย้อมสี Eosin-Nigrosin เพื่อประเมินตัวเป็นตัวตาย ต้องเก็บไว้ในที่มีความชื้นน้อย เพราะความชื้นสูงทำสีย้อมซึมเข้าไปในเซลล์อสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ. 2534. การใช้ประโยชน์จากปลาน้ำจืด. เอกสารทางวิชาการ ฉบับที่ 1/2534. กรมประมง.กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพมหานคร. 14 น.

กฤษณ์ มงคลปัญญา และ ทัศนีย์ ภูมิพัฒน์. 2535. การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. วารสารการประมง 45(6) : 1111 – 1123.

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตร์ศาสตร์, กรุงเทพ. 128 หน้า

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, stein H. และ E. Mathe. 2537. การเพาะขยายพันธุ์ปลา จากน้ำเชื้อแช่แข็งในสูตรต่างๆกัน. วารสารการประมง 48(6) : 509 - 516.

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2540.คุณภาพของอสุจิสด และอัตราการผสมของไข่ปลาไนยุโรปโดยน้ำเชื้อแช่แข็ง. วารสารการประมง 501(1) : 509 – 516

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์. ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ และกฤษณ์ มงคลปัญญา 2528. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพา และปลาบึก. วารสารสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 2(2) : 24 – 32

นลินี มารคแมน. 2527. การศึกษาเบื้องต้นกรรมวิธีการเก็บน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์วิยาศาสตร์มหาบัณฑิต. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ

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

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

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

ศิริพร คชรัตน์,. จุฑามาศ พบสุข, สุบัณฑิต นิ่มรัตน และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกเทศ แบบแช่เย็น การประชุมวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 2550

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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.

Harvey, B.J. and R.N. Kelly. 1998. Practical methods of chilled and frozen storage of Tilapia spermatozoa ICLARM conference p. 187 – 196

Lahnsteiner, F., T. Weismann, and R.A patzner. 1991. Fine structural changes in sper Matozoa of the grayling, Thymallus Thymallos, during routine cryopreservation. Aquaculature. 103 : 73 – 84.

Linhart. O. , Marek. R.O. and Jacky Cosson. Cryopreservation of sperm in common carp *cyprinus carpio* sperm Motility and Hatching of Embryos cryobiology 41 241 – 250.

Rana, K.J., and B.J Mcandrew. 1989 The viability of cryopreserved 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

Routray P., A.K. choudhary and S.N. Pash. 2006 cryopreservation of dead fish sper – matozoa several hours after death of Indian major carp, *Labeo rohita* and its successful untilization in fish production. Aquaculture. 261 : 1204 – 1211

saac. A., R. Billard., M.C. Thern, 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 insemi- Nation of rainbow trout (salmo gairdheri). Aquaculture. 83 : 367 – 374

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้