ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ
Semen Evalution of Rohu (*Labeo rohita*)

ชื่อนักศึกษา นายธีรวัฒน์ จันทระ

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ บัณฑุชัย

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....
(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

.....
(รองศาสตราจารย์สมศักดิ์ บัณฑุชัย)

ภาควิชารับรองแล้ว

.....
(รองศาสตราจารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ)
หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
วันที่ 27 เดือน ธ.ค. พ.ศ. 48

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20536

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ

Semen Evalution of Rohu (*Labeo rohita*)

T099178

โดย

นายธีรวัฒน์ จันทระ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา 2547

ปก.
ธ674ก
2547

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....99178
วัน.เดือน.ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ

Semen Evaluation of Rohu (*Labeo rohita*)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ ในด้านการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ ความเข้มข้นของอสุจิ รูปร่างลักษณะเซลล์อสุจิ อสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต และค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเชื้อ ผลปรากฏว่า น้ำเชื้อของปลายี่สกเทศมีการเคลื่อนไหวของอสุจิ 90 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของอสุจิ 44291.67 x 10^6 ± 15099 x 10^6 เซลล์ / มิลลิลิตร รูปร่างลักษณะของเซลล์อสุจิมีส่วนหัวที่กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.17 ± 0.2 ไมครอน หางมีความยาว 34.33 ± 2.02ไมครอน อสุจิที่มีชีวิต 99.67 ± 1.24เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเชื้อ 6.75 ± 0.37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ในการทำปัญหาพิเศษนี้ สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของ รองศาสตร์จารย์ศักดิ์ชัย ชูโชติ และรองศาสตร์จารย์สมศักดิ์ บัณฑุชัย อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษซึ่งได้ให้คำแนะนำปรึกษาที่มีประโยชน์อย่างยิ่งตลอดเวลาการทำปัญหาพิเศษ จึงขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบคุณอาจารย์ทุกท่านที่คอยให้คำปรึกษาแนะนำในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ให้สำเร็จได้ไปด้วยดี

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมสารเคมีและอุปกรณ์ในการทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ให้สำเร็จลงด้วยดี

ขอขอบคุณ เพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ทุกคนที่คอยช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอระลึกถึงบุญคุณพ่อ แม่ และญาติพี่น้องที่คอยให้ความรักความห่วงใย และคอยเป็นกำลังใจให้ข้าพระเจ้ามาถึงวันนี้ได้

นายธีรวัฒน์ จันทระ

20 เมษายน 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	13
ผลการทดลองและวิจารณ์	15
สรุป	18
ข้อเสนอแนะ	19
เอกสารอ้างอิง	20
ภาคผนวก	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1	อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิในสัตว์ชนิดต่างๆ	4
2	ค่าเฉลี่ยขนาดปลา ปริมาตรน้ำเชื้อ และคุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ	16
3	คุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ	25
4	ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักปลายี่สกเทศ (กิโลกรัม) กับปริมาตรน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (มิลลิลิตร)	26
5	ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (มิลลิลิตร) กับความเข้มข้นของอสุจิปลายี่สกเทศ ($x10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร)	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะอสุจิในปลากระดูกแข็งส่วนมาก	8
2	อสุจิของปลาบางชนิด	9
3	ความสัมพันธ์ของน้ำหนักตัวกับปริมาตรน้ำเชื้อในปลายี่สกเทศ	16
4	รูปร่างของอสุจิปลายี่สกเทศ (100X)	17
5	รูปร่างของอสุจิปลายี่สกเทศที่ผิดปกติ (ศรชี้) (100X)	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ปัจจุบันปลาที่มีความสำคัญของประเทศบางชนิดเริ่มที่จะหายากหรือบางชนิดก็กำลังสูญพันธุ์ไปจากสภาพแวดล้อม เช่น ปลาบึก ปลาเทพา ปลาเสือตอ เป็นต้น ปลาหายากเหล่านี้จำเป็นต้องได้รับการขยายพันธุ์ให้มีปริมาณมากขึ้น ดังนั้นการเพาะขยายพันธุ์โดยวิธีผสมเทียมจึงเข้ามามีบทบาทในการเพิ่มปริมาณสัตว์น้ำ (กฤษณ์, 2536) และในงานผสมเทียมปลาจะมีความเกี่ยวข้องทั้งในด้านการรีดเก็บน้ำเชื้อ การประเมินลักษณะและคุณภาพน้ำเชื้อ การเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อที่ให้ผลดีต่อการเก็บรักษาทั้งในสภาพน้ำเชื้อและน้ำเชื้อแช่แข็ง และการนำน้ำเชื้อไปผสมกับไข่เพื่อให้เกิดการปฏิสนธิ และการฟักออกเป็นตัว การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อมีวัตถุประสงค์เพื่อคาดคะเนความสามารถของน้ำเชื้อในการผสมกับไข่ เพื่อให้ทราบว่าควรนำน้ำเชื้อไปใช้ในงานผสมเทียมหรือไม่ เพราะถ้าน้ำเชื้อที่นำมาประเมินคุณภาพไม่ได้มาตรฐาน ก็จะไม่ต้องเสียเวลา และค่าใช้จ่ายในการนำน้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่ำไปใช้ในงานผสมเทียม การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อยังเป็นเกณฑ์ในการศึกษาผลกระทบของปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ และเป็นข้อมูลในการคำนวณเพื่อกำหนดอัตราการเจือจางให้มีจำนวนอสุจิที่เหมาะสมต่อการผสมเทียม (ศักดิ์ชัยและสมศักดิ์, 2544) การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโดยทั่วไปก็เพื่อที่จะทราบถึง ลักษณะ ปริมาตร และคุณภาพของน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด เช่น เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ (sperm motility) ความเข้มข้นของอสุจิ (sperm concentration) รูปร่างลักษณะของเซลล์อสุจิ (sperm morphology) เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิต และไม่มีชีวิต (live and dead sperm) และค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเชื้อ เพราะคุณสมบัติของน้ำเชื้อดังกล่าวสามารถคาดคะเนความสามารถในการผสมกับไข่ (probable fertilizing ability) ซึ่งเกรียงศักดิ์ (2540) รายงานว่าอัตราการผสมติดของไข่แปรผันกับระดับการเคลื่อนที่ของอสุจิ

ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีความมุ่งหมายที่จะเก็บรวบรวมข้อมูลพื้นฐานด้านคุณภาพของน้ำเชื้อในแง่ดังกล่าวข้างต้น ของปลายี่สกเทศ (Rohu, *Labeo rahita*) ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ

วัตถุประสงค์

เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ ในด้านการเคลื่อนไหวของอสุจิ ความเข้มข้นของอสุจิ รูปร่างลักษณะของเซลล์อสุจิ เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต และค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ชีวประวัติของปลายี่สกเทศ

ปลายี่สกเทศหรือปลาโรฮู มีแหล่งกำเนิดในประเทศอินเดีย พบทั่วไปในแม่น้ำลำคลองหรือแหล่งน้ำจืดของประเทศอินเดีย ปากีสถาน และพม่า ขนาดใหญ่ที่สุดที่พบในประเทศอินเดียยาวถึง 6 ฟุต หนักมากกว่า 100 ปอนด์ เรียกกันทั่วไปว่าโรฮู (Rohu) มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Labeo rohita* จัดอยู่ในครอบครัว Cyprinidae ถูกนำเข้ามาในประเทศไทยเป็นครั้งแรกเมื่อวันที่ 23 พฤษภาคม พ.ศ. 2511 มีลักษณะลำตัวยาวสีเทาดำ ทางด้านหลังและด้านท้องจะมีสีจางกว่าหรือเป็นสีเทาเงินในบางครั้งจะมีจุดสีทองแดงบนเกล็ด ลำตัวแบนข้างเล็กน้อย ส่วนหัวกว้าง ริมฝีปากหนา ปากจะตั้งอยู่ทางด้านหน้าในระดับต่ำใต้ส่วนหัว ริมฝีปากบนจะมีลักษณะเป็นชายครุยต่อกับริมฝีปากล่าง ทำให้มีรูปร่างคล้ายปากดูด ส่วนริมฝีปากล่างเป็นติ่งเล็กๆ เชื่อมต่อกับ isthmus ที่ริมฝีปากล่างและบนจะมีสันแข็งของขากรรไกรยื่นออกมา ซึ่งเป็นสารพวกเคอลาติน (keratin) บนขากรรไกรบน และล่างมีหนวดแหล่งละ 1 คู่ เกล็ดมีลักษณะกลมเรียบ มีเกล็ดข้างลำตัว 40-42 เกล็ด และเกล็ดรอบโคนหางมีจำนวน 20 เกล็ด บนเกล็ดมีจุดสีแดง ลำตัวมีสีฟ้า หรือสีน้ำตาล ครีบหลังอยู่ในบริเวณกึ่งกลางลำตัวระหว่างครีบอกกับครีบท้อง และอยู่ล้ำหน้าครีบท้องเพียงเล็กน้อย ครีบหลังประกอบด้วยก้านครีบแข็งเรียบไม่แตกแขนง 3 ก้าน และก้านครีบอ่อนที่แตกแขนง 12-13 ก้าน ครีบก้นประกอบด้วยก้านครีบแข็ง ไม่แตกแขนง 3 ก้าน และก้านครีบอ่อนที่แตกแขนง 5 ก้าน ครีบอกมีก้านครีบ 17-18 ก้าน ครีบท้องมีก้านครีบ 9 ก้าน ครีบหางมีก้านครีบ 19 ก้าน (กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, 2534) ปลายครีบทุกครีบมีสีชมพูอ่อน ครีบหางเป็นแฉกเว้าลึก ระยะห่างระหว่างลูกตาทั้งสองด้านจะแบนไม่โค้งนูนขึ้นมาเหมือนปลาชนิดอื่นๆ ปลายี่สกเทศเป็นปลากินพืชและสิ่งเน่าเปื่อยเป็นอาหาร ลูกปลาขนาดเล็กจะกินพวกสาหร่ายและแพลงก์ตอน เมื่อปลามีขนาดประมาณ 25 เซนติเมตร จะเริ่มเปลี่ยนนิสัยมากินอาหารจำพวกเศษพืชที่เน่าเปื่อยมากขึ้น ในกระเพาะปลาขนาดใหญ่ พบว่ามีส่วนประกอบของอาหารจำพวกสิ่งเน่าเปื่อยเกินกว่าครึ่งหนึ่งของอาหารทั้งหมด ปลาตัวผู้มีครีบหูสากเวลาสัมผัส ส่วนปลาตัวเมียเรียบเกลี้ยงและลื่น โดยทั่วไปไม่ว่างไข่ในบ่อ ฤดูว่างไข่อยู่ในระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนกันยายน การเพาะขยายพันธุ์ใช้วิธีฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้ปลาว่างไข่ และผสมเทียม จากการศึกษาของธีรพัฒน์ และคณะ (2534) พบว่าปลายี่สกเทศเพศเมียใช้ suprefect ที่ความเข้มข้น 5-12 µg. ร่วมกับ motilium 10 mg. (ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) ส่วนปลายี่สกเทศเพศผู้ใช้ suprefect ที่ความเข้มข้น 5 µg. ร่วมกับ motilium 10 mg. (ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) โดยฉีดปลาเพศผู้หลังจากฉีดปลาเพศเมียแล้ว 1 ชั่วโมง และปล่อยให้พ่อแม่ปลารัดกันเอง พบว่าภายหลัง 6-8 ชั่วโมง ปลาจะว่างไข่และมีอัตราการผสมประมาณ 80-90% (ธีรพัฒน์ และคณะ, 2534) ไข่เป็นประเภทครึ่งลอยครึ่งจม สีแดงเรื่อย เมื่อพองน้ำเต็มที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร แม่ปลาขนาดน้ำหนัก 2 กิโลกรัม สามารถให้ไข่ได้ประมาณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

500,000 ฟอง ไข่ฟักออกเป็นตัวในเวลา 16-18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิน้ำ 26-30 องศาเซลเซียส (ศักดิ์ชัย, 2536)

ประโยชน์ของปลายี่สกเทศ

ปลายี่สกเทศเป็นปลาที่มีส่วนประกอบของโปรตีนที่ค่อนข้างสูงกว่าปลาชนิดอื่นๆ นำมาประกอบอาหารได้หลายชนิดทั้งแบบอาหารจีน และอาหารไทย นอกจากนี้ยังสามารถใช้ต่อมใต้สมองของปลายี่สกเทศฉีดเพื่อเร่งให้ปลาว่างไข่ได้ (กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ, 2534)

ความสำคัญของการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ปัจจุบันจำนวนประชากรของประเทศไทยเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว แต่ปริมาณสัตว์น้ำที่จับได้ต่อปีมีจำนวนลดลง อันเนื่องมาจากสาเหตุหลายประการ เช่น ปริมาณปลาที่จับมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นตามอัตราการเพิ่มขึ้นของประชากร ปัญหาการเน่าเสียของน้ำ ทำให้เกิดโรคระบาดของโรคสัตว์น้ำในแหล่งธรรมชาติและบ่อเลี้ยง ดังนั้นการเพาะขยายพันธุ์ทางด้านการผสมเทียมจึงเข้ามามีบทบาทในการเพิ่มปริมาณสัตว์น้ำ (กฤษณ์, 2536) แต่การผสมเทียมยังประสบปัญหาจับพ่อแม่พันธุ์ได้ไม่พร้อมกัน หรือจับได้เฉพาะเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้น ทำให้ไม่สามารถผสมพันธุ์กันได้ ซึ่งแนวทางในการแก้ปัญหาคือการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งหรือประเมินคุณภาพน้ำเชื้อก่อนผสมเทียม เพื่อให้ทราบว่าควรนำน้ำเชื้อไปใช้ในการผสมเทียมหรือไม่ เพราะถ้าน้ำเชื้อที่นำมาประเมินมีคุณภาพไม่ได้มาตรฐานก็จะไม่ต้องเสียเวลาและค่าใช้จ่ายในการนำน้ำเชื้อไปใช้ในงานผสมเทียม คุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการประเมินสามารถคาดคะเนการปฏิสนธิได้ เช่น การเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิและการปฏิสนธิจะแปรผันตามกัน (เกรียงศักดิ์, 2540)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา (Evaluation of sperm quality)

โดยทั่วไปอสุจิจะไม่เคลื่อนไหวเมื่ออยู่ในเซมินอล ฟลูอิด (seminal fluid) แต่จะเคลื่อนไหวปราดเปรียว (swim energetically) เมื่ออยู่ในน้ำ โดยจะมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดปลา เช่น อสุจิของปลาเทร้า ปลาไวท์ฟิช ปลาออสแมน และปลามารินกา เคลื่อนที่ในอัตรา 164-330 ไมโครเมตรต่อวินาที ซึ่งใกล้เคียงกับอสุจิของเอ็คไคโนเดิม (echinoderm) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammal) (ตารางที่ 1)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิในสัตว์ชนิดต่างๆ (Blaxter, 1969)

Class	Species	Temperature (°c)	Maximum rate, u/sec
Bivalvia	Ostrea gigas	28	50
Echinoidea	Echinus	18	120
	Psammechinus milians	18	190
Pisces	Huso huso	16	100
	Salmon trutta m. fario	12.5	164
	Coregonus lavaretus maraena	11	180
	Esox lucius	21	100
	Abramis brama	19	50
	Leuciscus idus	19	33
	Leuciscus bergi		105
	Diptychus dybowskii		220
	Schizothorax psuedak-saiensis issykkuli		300
Mammalia	Equus caballus	37	87
	Ovis aries	39	250
	Bos taurus	38	352
	Homo sapiens	37	100

ที่มา : วีรพงศ์ (2536)

วิธีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาจะมีการประเมิน 5 วิธี ที่เป็นที่นิยมและเหมาะสม คือ 1.การเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ 2.ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ 3.เซลล์อสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต 4.รูปร่างลักษณะของเซลล์อสุจิ และ5.การตรวจอัตราการปฏิสนธิ (นลินี, 2527)

การตรวจอัตราการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ เป็นวิธีที่ทำง่ายมากและรวดเร็ว (Amrit, 1998) สามารถประเมินเปอร์เซ็นต์ของการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ และระดับการเคลื่อนที่ (Mounib, 1998 อ้างตามนลินี, 2527) การประเมินระดับการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิมี 2 แบบ คือ การประเมินการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิเป็นกลุ่ม และประเมินเป็นเปอร์เซ็นต์ การประเมินเป็นเปอร์เซ็นต์เป็นวิธีที่ต้อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจดูการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิเป็นรายตัวแล้วประเมินเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยสุ่มบริเวณที่อสุจิเคลื่อนที่แล้วประเมินว่าเซลล์อสุจิ 100 ตัว มีการเคลื่อนที่กี่ตัว สำหรับการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิเป็นกลุ่ม จะใช้วิธีของ Mounib (1978) และวิธีของ Billard *et al.* (1991) โดยแบ่งการเคลื่อนที่เป็น 10 ระดับ ระดับ 1 หมายถึงเซลล์อสุจิมีความอ่อนแอมาก (อสุจิเคลื่อนที่ 0 – 10%) ระดับ 10 หมายถึงเซลล์อสุจิที่เคลื่อนที่มีความปราดเปรียวสูง (90 – 100%) วีรพงศ์ (2536)ได้กำหนดอัตราการเคลื่อนไหวของสเปิร์มเป็นระบบตัวเลข 0-5 ดังนี้

0 = ไม่มีการเคลื่อนไหว

1 = (poor) มีการเคลื่อนไหวน้อยกว่า 30% และเคลื่อนไหวช้า

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

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

4 = (very good) อสุจิ 70-80% เคลื่อนไหวแข็งแรง และมีคลื่นให้เห็นน้อยกว่า 5

5 = (excellent) อสุจิ 80% ขึ้นไปเคลื่อนไหวรวดเร็ว และมีคลื่นรวมให้เห็นชัดเจน

การประเมินแบบนี้ต้องฝึกสม่ำเสมอและต้องใช้ประสบการณ์ และความชำนาญในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยวิธีการตรวจการเคลื่อนที่ได้ผลไม่ดีนัก เนื่องจากตัวอสุจิของปลาที่นำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเคลื่อนไหวในระยะสั้นๆ เท่านั้น (William *et al.*, 1985) ปัจจุบันได้มีการใช้กล้องถ่ายภาพบันทึกภาพตัวอสุจิที่กำลังเคลื่อนที่โดยวัดระยะทางที่ได้ต่อหน่วยเวลาที่กำหนดให้ (Saac *et al.*, 1988)

การตรวจความเข้มข้นของอสุจิหมายถึง จำนวนเซลล์อสุจิต่อลูกบาศก์เซนติเมตร วิธีการนี้ดัดแปลงมาจากวิธีการนับเซลล์เม็ดเลือด โดยใช้เครื่อง hemacytometer ซึ่งมี 2 แบบคือ Fichs-Rosenthal และ Neubauer Hemacytometer ประกอบด้วยสไลด์มีช่องนับ (countingchamber) 2 ช่อง และไปเปตเจือจางน้ำเชื้อ (dilution pipette) ซึ่งเป็นไปเปตสำหรับการตรวจนับเม็ดเลือด โดยมีอัตราเจือจาง 1:200 (ศักดิ์ชัย, 2538)

การเจือจางและเตรียมน้ำเชื้อเพื่อตรวจนับเซลล์กระทำดังนี้ คือ ดูดน้ำเชื้อถึงขีด 0.5 ของไปเปตแล้วดูดสารเจือจางน้ำเชื้อให้ถึงขีด 101 ของไปเปต แล้วเขย่าไปเปตเพื่อให้น้ำเชื้อของสารเจือจางผสมกันได้ดี หยดน้ำเชื้อที่เจือจางที่ขอบสไลด์ที่มีขอบแผ่นกระจกวางเหนือช่องสไลด์ ทิ้งไว้สักครู่เพื่อให้เซลล์อสุจิคงที่และนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ (นลินี, 2527) แต่วิธีการนับและคำนวณความเข้มข้นของเซลล์อสุจิจากการใช้เครื่อง Fuchs-Rosenthal hemacytometer และ Neubauer hemacytometer แตกต่างกัน วิธีการนับเซลล์จากการใช้ Fuchs-Rosenthal hemacytometer จะสุ่มนับจำนวนเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่เพียงช่องเดียวส่วนการใช้ Neubauer hemacytometer สุ่มนับเซลล์อสุจิจากสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 5 ช่อง (ศักดิ์ชัย, 2538)

วิธีการคำนวณความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ

Fuchs-Rosenthal hemacytometer

ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ = จำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 1 ช่อง x 50,000 x อัตราการเจือจาง

Neubauer hemacytometer

ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ = จำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง x 50,000 x อัตราการเจือจาง

การตรวจตัวเป็นตัวตายของเซลล์อสุจิ (live-dead sperm) เป็นวิธีการตรวจสอบดูว่าน้ำเชื้อมีเซลล์อสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตเป็นกี่เปอร์เซ็นต์ (กฤษณ์, 2536) โดยการย้อมสีดูตัวเป็นตัวตายวิธีนี้ต้องอาศัยกล้องจุลทรรศน์โดยมีหลักการว่าอสุจิที่ตายจะติดสีย้อม วิธีนี้ยังมีข้อดีที่สามารถรู้ความสมบูรณ์ของอสุจิที่มีชีวิตได้ ก็จะเสริมผลในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อได้ดีขึ้น เนื่องจากการตรวจการเคลื่อนไหวเพียงอย่างเดียวอาจพลาดได้ เช่นอสุจิที่มีการเคลื่อนไหวอย่างปราดเปรียว อาจทำให้ตัวที่ตายอยู่ใกล้ๆ เคลื่อนที่ตามไปด้วย (วีรพงศ์, 2536) การตรวจตัวเป็นตัวตายของเซลล์อสุจิโดยอาศัยหลักการย้อมสีนั้นจะใช้สารประกอบฟาโลเจนที่เป็น derivative ของฟูออเรสซิน เช่น eosin และ erythrocin โดยใช่ร่วมกับ สีที่ทำให้เกิดความแตกต่างของ back ground ให้เห็นเด่นชัดคือ nigrosin (วิทย์, 2522) ดังนั้นสี Eosin-Nigrosin จะเป็นที่นิยม eosin เป็นสีย้อมพิเศษไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของตัวอสุจิที่มีชีวิต แต่สามารถซึมผ่านเข้าไปในตัวอสุจิที่ตายให้เป็นสีชมพู ส่วน nigrosin จะทำให้ back ground ติดสีเข้ม จึงทำให้สามารถเห็นตัวอสุจิที่มีชีวิตซึ่งไม่ติดสี

การประเมินรูปร่างลักษณะของเซลล์อสุจิเป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบเซลล์อสุจิมีรูปร่างลักษณะที่ปกติและผิดปกติกี่เปอร์เซ็นต์ โดยอาศัยสไลด์ย้อมสีจากการตรวจตัวอสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต การตรวจควรใช้กล้องจุลทรรศน์ ที่มี phases contrast ซึ่งทำให้มองเห็นชัดเจน ง่ายต่อการประเมิน

การตรวจอัตราการปฏิสนธิเป็นวิธีที่สามารถเชื่อมั่นได้ดีที่สุดสำหรับการตรวจคุณภาพเชื้อ (กฤษณ์, 2536) แต่ต้องใช้เวลามาก (อุทัยรัตน์, 2535) และเป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งที่แพร่หลาย (Lannsteinor and Palzner, 1992)

ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ และปริมาณน้ำเชื้อปลา

ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อควรสังเกตทันทีหลังจากทำการรีดเชื้อออกมา โดยสังเกตสี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่นๆ (วิรพงศ์, 2536) น้ำเชื้อปลา (milte) ที่ดีควรมีสีขาวขุ่นคล้าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำนมข้นเหนียว และกลิ่นคาว ถ้าน้ำเชื้อปลามีสีเลือดปนคุณภาพน้ำเชื้อปลาจะไม่ดี ส่งผลกระทบต่ออัตราการปฏิสนธิ (วนิศา, 2533) เกรียงศักดิ์ (2540) รายงานว่าปริมาตรน้ำเชื้อปลาที่รีดได้จากปลาแต่ละชนิดรวมทั้งความหนาแน่นของอสุจิมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของปลา เพราะปลาแต่ละชนิดมีวิวัฒนาการดำรงเผ่าพันธุ์ที่แตกต่างกัน เช่น ปลาดุกวางไข่จำนวนน้อยและปริมาตรน้ำเชื้อมีน้อย แต่เปอร์เซ็นต์การฟักตัวสูงเพราะไข่ปลาดุกเป็นชนิดจมติดวัตถุ มีพฤติกรรมเฝ้าดูแลไข่และเลี้ยงตัวอ่อน สำหรับปลาที่มีไข่เป็นชนิดครึ่งลอยครึ่งจมไม่มีการเฝ้าดูและไข่และเลี้ยงตัวอ่อน แต่มีการวางไข่และมีปริมาตรน้ำเชื้อที่มาก เช่น ปลาตะเพียน (ศักดิ์ชัย, 2538) กฤษณ์ (2536) รายงานว่า ช่วงเวลาในฤดูผสมพันธุ์มีผลทำให้เกิดความแตกต่างของปริมาตรน้ำเชื้อ และความเข้มข้นของอสุจิในปลาตัวเดียวกัน เช่น ปลาเรนโบว์ เทราน์ มีปริมาณน้ำเชื้อและความเข้มข้นของอสุจิสูงในระยะต้นฤดูผสมพันธุ์ และคงที่ในระยะต่อมา

รูปร่างลักษณะของอสุจิปลา

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

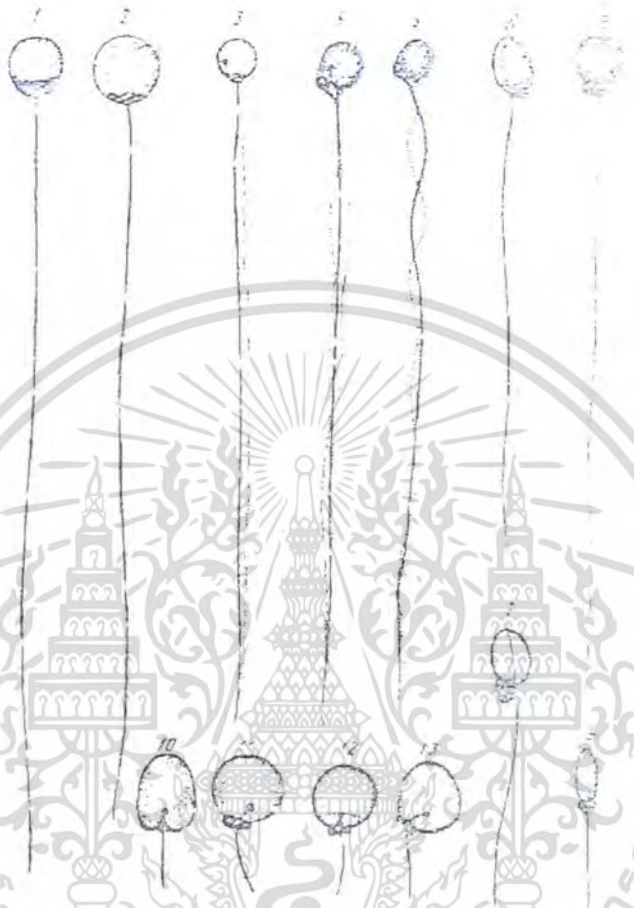
หัวเป็นส่วนที่ประกอบด้วยนิวเคลียส มีโครโมโซม 1 ชุด ล้อมรอบด้วยไซโตรพลาสซึมเพียงบางๆ และห่อหุ้มด้วย plas malemma (cell membrane) รูปร่างลักษณะของส่วนหัวอสุจิมีหลายแบบ เช่น กลม รี แท่งหรือยัก เป็นต้น เช่น ปลาไน ส่วนหัวของอสุจิมีลักษณะกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 3 ไมครอน (Bilard, 1988) ปลาตะเพียน ส่วนหัวของอสุจิมีเส้นผ่าศูนย์กลาง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

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

หางของอสุจิปลาเป็นส่วนช่วยในการเคลื่อนที่ประกอบด้วย microtubles เรียงรอบแกนกลาง ล้อมรอบด้วย plasma minibrane ปลาส่วนใหญ่มี microtobules เป็นแกนกลางคู่ 1 คู่ และเรียงเป็นวงกลมอีก 9 คู่ ยกเว้นปลาในพวก Angulliformes 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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

and Patzner (1991) รายงานว่า หางของอสุจิปลาแต่ละชนิดจะมีขนาดและลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น ปลาไน มีส่วนหางของอสุจิยาว 28 ไมครอน (Billard, 1988) ปลายี่สกเทศมีส่วนหางของเซลล์อสุจิยาว 38 ไมครอน (นลินี, 2527)

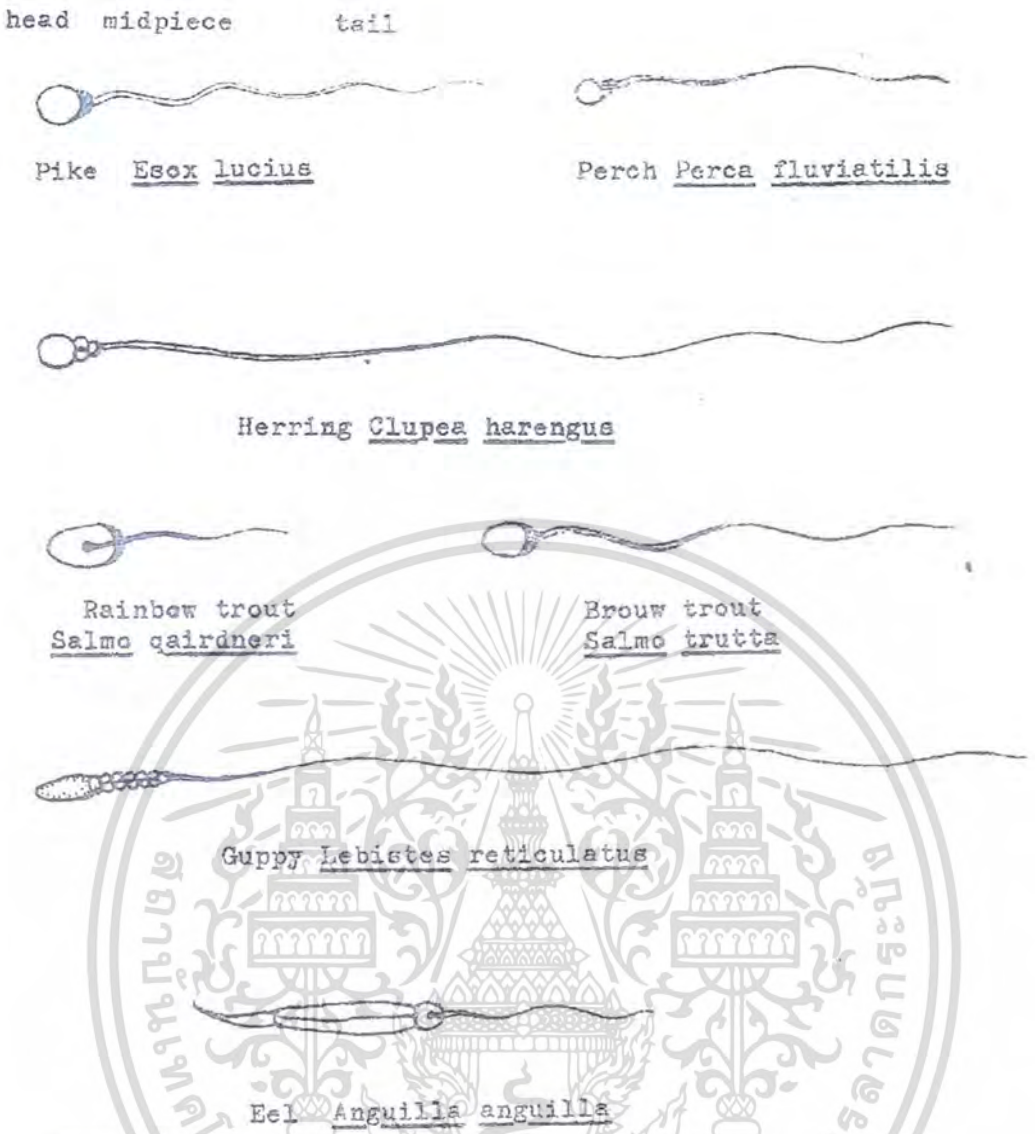


ภาพที่ 1 ลักษณะอสุจิในปลากระดูกแข็งส่วนมาก

1. spermatozoa ของ bowfish และ teleoste
2. carp
3. pike
4. -5. perch
6. -7. viviparous blenny
8. -9. brook trout
10. unaffected head
11. 11.-13. swollen heads

ที่มา : วีรพงศ์ (2536)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 อสุจิของปลาบางชนิด

ที่มา : Lagler *et al.*, 1962

การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิปลา

โดยทั่วไปเซลล์อสุจิปลาเมื่ออยู่ใน seminal fluid หรือเมื่อรีดได้จะไม่เคลื่อนที่ แต่เมื่ออยู่ในน้ำจะเคลื่อนที่อย่างปราดเปรียว (swim energetically) ซึ่งต่างจากน้ำเชื้อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่รีดออกมาจะเคลื่อนไหว เซลล์อสุจิปลาที่ได้รับการกระตุ้นให้เคลื่อนไหวจะมีชีวิตอยู่ได้ไม่นานโดยมีอัตราเร็วในการเคลื่อนไหวและระยะเวลาในการเคลื่อนไหวแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เช่น เซลล์อสุจิของปลาทะเลและปลาน้ำกร่อยส่วนใหญ่จะเคลื่อนไหวได้นานกว่าเซลล์อสุจิของปลาน้ำจืด หรือโดยทั่วไปอสุจิที่อยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารละลายภายในตัวก็มีชีวิตนาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กว่า อุณหภูมิน้ำก็มีผลอย่างมากต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิ เพราะถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้อสุจิมีระยะเวลาการเคลื่อนไหว (total motile period) ในน้ำน้อยกว่าอุณหภูมิต่ำกว่า นอกจากนี้การเคลื่อนไหวของอสุจิก็มีระยะเวลาจำกัด เช่น ปลาน้ำจืดส่วนมากจะสามารถเคลื่อนไหวได้นานประมาณ 2-3 นาที โดยจะว่ายน้ำปราดเปรียวในระยะแรก และค่อยๆ ว่ายน้ำช้าลงจนหยุดการเคลื่อนไหว ซึ่งในช่วงดังกล่าวถ้าอสุจิไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ก็ทำให้อสุจิตายในที่สุด โดยเฉพาะการผสมเทียมปลาต้องใช้ระยะเวลาผสมเทียมที่เร็วที่สุด เพื่อให้อสุจิไม่ตาย เพื่อที่จะได้อัตราปฏิสนธิสูงที่สุด (วีรพงศ์, 2536) สำหรับน้ำที่ใช้กระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิก็ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เช่น น้ำจืดกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิปลาน้ำจืดหรือน้ำทะเลกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิปลาทะเล (ศักดิ์ชัย, 2538) การที่อสุจิของปลาน้ำจืดมีการเคลื่อนไหวในช่วงเวลาค่อนข้างน้อยนี้ทำให้มีการนำอสุจิของปลาน้ำจืดมาใส่ในน้ำกร่อยหรือน้ำเกลือ 0.6-0.7% (physiological solution) เพื่อให้มีอายุนานขึ้น และเคลื่อนไหวได้นานขึ้น เช่นปลาแซลมอนนั้นพบว่าอสุจิจะเคลื่อนที่ในน้ำจืดได้น้อยกว่า 2 นาที แต่เมื่ออยู่ในน้ำที่มีความเค็ม 3-6 ppt จะเคลื่อนที่ได้นานถึง 180 นาที (Blaxter, 1969) อย่างไรก็ตาม โดยทั่วไปแล้วการผสมเทียมในประเทศไทยนิยมใช้น้ำเกลือ 0.6-0.7% เพื่อช่วยยืดอายุของอสุจิให้นานขึ้น (วีรพงศ์, 2536) ดังนั้นจึงสันนิษฐานถึงปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิปลาในแหล่งน้ำได้ดังนี้คือ

1. ภาวะออกซิเจนในน้ำมีปริมาณที่สูงกว่าในสภาพที่อยู่ใน seminal fluid
2. ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ของน้ำกระตุ้นการเคลื่อนที่ซึ่งปกติมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเชื้อ 6.5 – 7.5
3. ปริมาณอิออนของสังกะสีและทองแดงเป็นตัวกระตุ้น เช่น พบในปลาทะเลจะมีการเคลื่อนที่เร็วและนานกว่าปลาน้ำจืดเพราะในทะเลมีอิออนของสังกะสีและทองแดงเป็นตัวกระตุ้น
4. คุณสมบัติไฮโปโทนิค (Hypotonic) พบในปลาแซลมอนที่อยู่น้ำจืด อสุจิจะมีการเคลื่อนไหวที่น้อยกว่า 2 นาที แต่เมื่ออยู่ในน้ำเค็ม 3 – 6 ppt จะเคลื่อนไหวได้นานขึ้นอีก และใน 10 ppt มีการเคลื่อนไหวได้นานที่สุด (ศักดิ์ชัย, 2538)

ดังนั้นโดยทั่วไปจึงนิยมใช้เกลือที่มีความเข้มข้น 0.6 – 0.7% ซึ่งมีคุณสมบัติไฮโปโทนิคมากระตุ้นการเคลื่อนไหวและยืดอายุเซลล์อสุจิ (Rex, 1999)

ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ

ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิที่ได้จากปลาแต่ละชนิดจะมีความเข้มข้นแตกต่างกัน เพราะพฤติกรรมและแหล่งน้ำที่ใช้ในการผสมพันธุ์แตกต่างกัน เช่น ปลานวลจันทร์ (*Chanos chanos*) มีความเข้มข้น $3.619 \pm 0.72 \times 10^{-12}$ เซลล์/มิลลิลิตร (William, 1985) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) มีความเข้มข้น $2700 \pm 1650 \times 10^{6}$ เซลล์/มิลลิลิตร (Rana, 1989) ปลาเรนโบว์เทราว์ มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

20536

ความเข้มข้น 25 x 10^2 เซลล์/มิลลิลิตร ปลา Trout มีความเข้มข้น 40 x 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร (Hochman *et al.*, 1985) ปลา Perch มีความเข้มข้น 3 x 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร (Koemig *et al.*, 1978) เป็นต้น

การเก็บน้ำเชื้อปลาโดยการแช่แข็ง

การเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไว้เป็นเวลานานๆ เพื่อประโยชน์ในการผสมเทียมนั้นจำเป็นต่อการขยายพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์ปลา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปลาบางชนิด เช่น ปลากะพงขาว เพราะมีช่วงแก่ของอัณฑะและรังไข่ไม่ตรงกัน (กองประมงน้ำกร่อย, 2523) ปลากะรังเป็นปลาที่มีการกลายเพศในตัวเมียเดียวกัน (พินิจ และคณะ, 2525) และปลาบึก ซึ่งมีจำนวนลดน้อยลงทุกปีและในบางฤดูผสมพันธุ์ไม่อาจหาปลาพ่อ-แม่พันธุ์ได้พร้อมกัน (ธีรพันธุ์, 2522) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตัวผู้ไว้ใช้ในการผสมเทียม จึงช่วยแก้ปัญหาการขาดพ่อพันธุ์ปลาได้ และนอกจากนั้นยังจะช่วยให้ขั้นตอนของการผสมเทียมง่ายขึ้น เพราะไม่ต้องเตรียมพ่อปลาเพื่อรีดน้ำเชื้อซึ่งยุ่งยากพอสมควรในกรณีที่เป็นปลาชนิดที่มีขนาดใหญ่เช่น ปลาบึก

ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจะต้องทำการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ซึ่งอาจทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ แต่ถ้าหากทำการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ ก็มีผลต่อเซลล์คือ จะทำให้เซลล์สูญเสียน้ำ (Maurer, 1978 อ้างโดย นิศา, 2539) ซึ่งปัญหาเหล่านี้สามารถป้องกันได้ โดยการเติมสารเคมีบางอย่างลงไปในของเหลวที่อยู่นอกเซลล์ หรือน้ำยาเจือจางเซลล์ (extender หรือ diluent) สารเคมีเหล่านี้มีหลายชนิดซึ่งเรียกรวมว่า "สารไครโอโพรเทคแทนท์"

การเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งเป็นวิธีที่ช่วยในการเพาะเลี้ยง การปรับปรุงพันธุ์ และยังสามารถเก็บรักษาไว้เพื่อการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ (อสุจิ) เพื่อการศึกษาทางพันธุกรรมได้ (กฤษณ์ และทัศนีย์, 2536) ซึ่งเป็นขบวนการนำน้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำยาเจือจางที่ไม่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้อสุจิเคลื่อนที่เพื่อรักษาตัวอสุจิและสามารถผสมกับไข่ได้ผลใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด (ศักดิ์ชัย, 2538)

น้ำเชื่อที่จะใช้ในการเก็บรักษาทั้งแบบแช่แข็งและเก็บระยะสั้นในตู้เย็น จะต้องเป็นน้ำเชื้อที่ไม่มีการปนเปื้อนด้วยน้ำเลือด ปัสสาวะ และของเสียอื่นๆ (กฤษณ์ และทัศนีย์, 2536) วิธีเก็บน้ำเชื้อปลานิยมทำกัน 2 แบบ คือ เก็บรักษาในระยะสั้นในถังน้ำแข็งหรือตู้เย็นที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 0 °C เล็กน้อย และอีกวิธีหนึ่งเก็บรักษาแบบระยะยาวนาน โดยการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196 °C การเก็บรักษาในระยะสั้นอาจเก็บแบบเข้มข้นหรือแบบดัดแปลงโดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารเคมีต่างๆ เก็บในอุณหภูมิสูงกว่า 0 °C เล็กน้อย เก็บรักษาได้ในระยะเวลาที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เช่น ปลาไน (*Cypinus carpio*) เก็บได้ 45 ชั่วโมง (Hulala and Rothbard, 1979) ปราเรนโบร์เทราว์ (*Salmon gairdneri*) เก็บได้ 5 วัน (Billard, 1981) ส่วนการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ –196 °C ผสมน้ำเชื้อกับ protective agent เช่น glycerol หรือ dimethly sulfide (DMSO) ในอัตราส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เหมาะสม วิธีนี้จะสามารถเก็บรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อไว้ได้นาน เช่น ปลาแซลมอน เก็บรักษาได้นาน 2 ปี (Hofgins and Ridgway, 1964)

การทำน้ำเชื้อแช่แข็ง สิ่งสำคัญคือ น้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อซึ่งมีหลายสูตรซึ่งน้ำยาต่างๆเหล่านี้ต่างก็อาศัยหลักการดังต่อไปนี้ 1.สูตรน้ำยาต่างๆเหล่านี้ต่างประกอบด้วยอิออนต่างๆที่ใกล้เคียงกับอิออนที่ปรากฏในน้ำเลือด และน้ำยานั้นต้องมีแรงดันออสโมติกใกล้เคียงที่สุดกับแรงดันออสโมติกของน้ำเลือด 2. น้ำยาดังกล่าวจะประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่างเป็นแหล่งพลังงาน และสารเคมีบางตัวทำหน้าที่ต้าน หรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือมีส่วนประกอบที่เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ 3. เป็นน้ำยาที่ปรับปรุงและพัฒนามาจากสูตรน้ำยาที่ใช้อาบหรือหล่อเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดปลา 4. นอกจากนั้น สูตรน้ำยาเหล่านี้ยังประกอบด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดรวมกัน ในกรณีที่ต้องการเจือจางเพื่อการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง(กฤษณ์ และทัศนีย์, 2536) ซึ่งแต่ละสูตรที่เลือกใช้ต้องมีค่า osmolality ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนไหวหรือการใช้พลังงานของอสุจิ จึงมีการเปลี่ยนแปลงสูตรให้เหมาะสม เช่น ใช้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มี Na^+ K^+ ซึ่งจะช่วยการเคลื่อนที่ของอสุจิดีขึ้น โดยการกระตุ้นใช้พลังงานจาก Adenosine Triphosphate (ATP) และ Cyclic Adenosine Monophosphate (AMP) ใน Mitochondia ซึ่งจะช่วยเพิ่มโอกาสในการผสมติด (Goodal *et al.*, 1982) Chen *et al.* (1991) ทดลองเก็บอสุจิปลาไนแช่แข็งในสารประกอบด้วย NaCl, KCl, glcouse และ DMSO 10 – 12% มีระดับการเคลื่อนไหวของอสุจิ 60% สารละลายแช่แข็งควรมี pH 7.39 – 10.8 อัตราการผสมติด 75% โดยใช้อสุจิ 0.5×10^6 เซลล์/ไข่ นอกจากปรับสูตรน้ำยาเจือจางแล้ว การปรับปรุงเทคนิคการผสมเทียมก็เป็นเรื่องที่น่าพิจารณาเพื่อส่งผลให้อัตราการผสมติดเพิ่มขึ้น เช่น ผสมเทียมโดยใช้น้ำยากระตุ้นการเคลื่อนที่ คือ borax-boric acid buffer แทนการใช้จ้าจากแหล่งธรรมชาติ ซึ่งอาจมีการปนเปื้อนของสารพิษ (steyn *et al.*, 1989) หรือปรับระดับแมกนีเซียมในน้ำที่ใช้เพาะฟักอาจเป็นการช่วยให้ไข่ได้รับการผสม และมีเปอร์เซ็นต์การฟักตัวเพิ่มขึ้น (Vanet *et al.*, 1991 อ้างตาม กฤษณ์, 2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ปลาที่ใช้ในการทดลองคือ ปลายี่สกเทศเพศผู้ จำนวน 6 ตัว
2. น้ำเกลือ 0.9% และ 0.7%
3. สไลด์ Hemacytometer
4. หลอดวัดปริมาตรน้ำเชื้อ
5. สีย้อม Eosin-Nigrosin
6. ไปเปตเจือจางน้ำเชื้อ
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์
8. กล้องจุลทรรศน์
9. กระดาษลิตมัส
10. cover glass
11. แผ่นสไลด์
12. น้ำกลั่น

วิธีการ

วิธีการทดลอง

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

1.1 ชั่งน้ำหนัก และวัดความยาวของปลายี่สกเทศจำนวน 6 ตัว

1.2 ตรวจการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้น้ำกลั่นกระตุ้น

1.3 ตรวจนับตัวเป็นตัวตายของเซลล์อสุจิ โดยใช้หลักการย้อมสีของ Eosin-Nigrosin ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

1.4 วัดขนาดหัวและหางของเซลล์อสุจิ

1.5 ตรวจความเข้มข้นของเซลล์อสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้ไปเปต เจือจางน้ำเชื้อ ซึ่ง มีอัตราการเจือจาง 1/5000 ด้วยสไลด์ Hemacytometer ตรวจนับด้วยวิธี Neubauer สูตรคำนวณความเข้มข้นของอสุจิ

= จำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง x 50,000 x อัตราการเจือจาง

1.6 วัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเชื้อปลา โดยใช้กระดาษลิตมัส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกน้ำหนัก และความยาวของปลาที่จะประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ
2. บันทึกผลการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ, ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ, เปอร์เซ็นต์ตัวเป็นตัวตาย, ขนาดของเซลล์อสุจิ และค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเชื้อ

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการผสมเทียม ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
กรุงเทพมหานคร

ระยะเวลาในการทดลอง

เดือนมีนาคม 2548 ถึงเดือนเมษายน 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

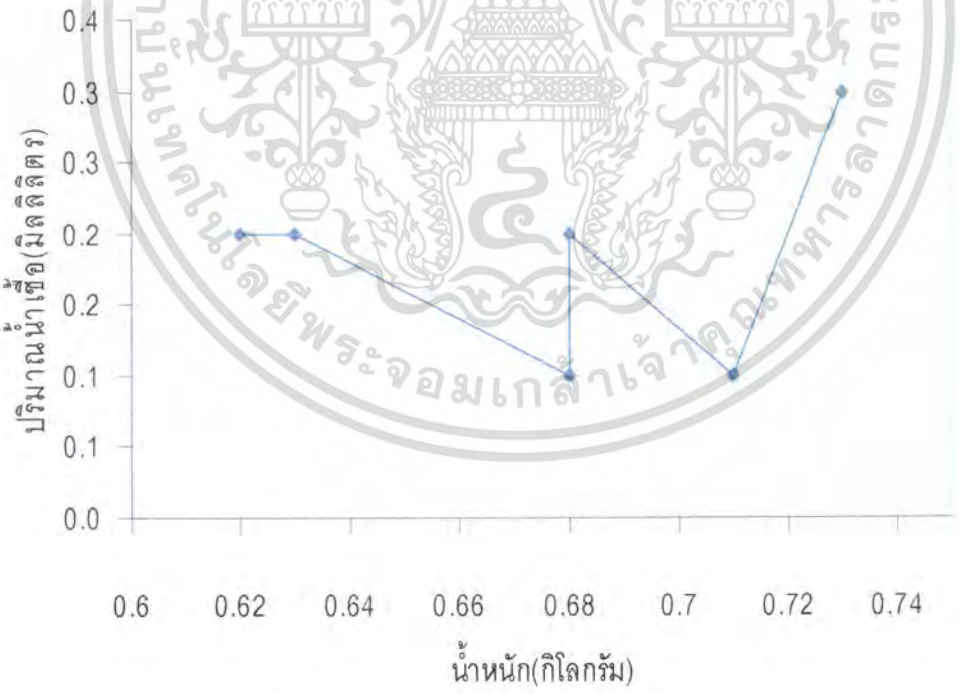
ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการศึกษาการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศที่แสดงในตารางที่ 2 พบว่าปลายี่สกเทศมีน้ำหนักเฉลี่ย 675.17 ± 39.44 กรัม ความยาวเฉลี่ย 38.92 ± 1.36 เซนติเมตร มีปริมาตรน้ำเชื้อเฉลี่ย 0.18 ± 0.07 มิลลิลิตร ซึ่งมีปริมาตรน้อยเมื่อเทียบกับปลา Perch ซึ่งมีปริมาตรน้ำเชื้อ 1.5 มิลลิลิตร, ปลา Burbot ซึ่งมีปริมาตรน้ำเชื้อ 2.5มิลลิลิตร, ปลา Salmon ซึ่งมีปริมาตรน้ำเชื้อ 20 มิลลิลิตร และปลา Mekong giantcatfish ซึ่งมีปริมาตรน้ำเชื้อ 500 มิลลิลิตร (กฤษณ์, 2536)น้ำเชื้อปลายี่สกเทศที่รีดได้มีลักษณะขาวขุ่นคล้ายน้ำนม มีกลิ่นคาว และเมื่อผสมกับน้ำจะมีลักษณะเป็นเจล ปลายี่สกเทศส่วนใหญ่จะมีปริมาตรน้ำเชื้อแปรผันตามน้ำหนักตัว (r = 0.081) (ภาพที่ 3) เนื่องจากการสร้างน้ำเชื้อของปลาจะพัฒนาพร้อมกับการเจริญเติบโตจนกระทั้งมีความสมบูรณ์เพศเต็มที่ (ศักดิ์ชัย, 2538) แต่มีปลายี่สกเทศบางตัวที่มีปริมาตรน้ำเชื้อไม่แปรผันตามน้ำหนักตัวซึ่งอาจจะเกิดจากปลามีการเจริญเติบโตไม่ดีหรือแคระแกร็น แต่มีอายุอยู่ในวัยเจริญพันธุ์ที่สามารถสร้างน้ำเชื้อได้ ค่าความเป็นกรดเป็นด่างเฉลี่ยเท่ากับ 6.75 ± 0.37 สอดคล้องกับ Gvest *et al.*, (1996) ที่รายงานว่าค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเชื้อปลาส่วนใหญ่จะอยู่ระหว่าง 6.5-7.5 ค่าการเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ย 90 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นการเคลื่อนไหวของอสุจิที่อยู่ในระดับสูง (กฤษณ์, 2536) และมีการเคลื่อนไหวในระดับที่สูงกว่าปลาไนซึ่งเป็นปลาที่อยู่ในครอบครัว Cyprinidae เหมือนกับปลายี่สกเทศ จากผลการทดลองของ Chen *et al.*, (1991) พบว่าค่าการเคลื่อนไหวของอสุจิในปลาไนเฉลี่ย 70 – 80 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิเฉลี่ย 44291.67 x 10^6 ± 15099 x 10^6 เซลล์/มิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ไม่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับ ปลา Perch ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์อสุจิเฉลี่ย 127400 x 10^6 , ปลา Burbot ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์อสุจิเฉลี่ย 59300 x 10^6 , ปลา Mekong giantcatfish ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์อสุจิเฉลี่ย 85000 x 10^6 (กฤษณ์, 2536) และปลาไนยุโรป ที่เป็นปลาที่อยู่ในครอบครัว Cyprinidae เหมือนกับปลายี่สกเทศ แต่มีความเข้มข้นของอสุจิเฉลี่ย 140,000 x 10^6 เซลล์/มิลลิเมตร (เกรียงศักดิ์, 2540) เพราะปลาทั้ง 2 ชนิด มีความแตกต่างทางด้านพฤติกรรมและแหล่งที่อยู่อาศัย (Boncari, 1983) อสุจิที่มีชีวิตเฉลี่ย 99.67 ± 1.24 เปอร์เซ็นต์ อสุจิที่มีลักษณะปกติเฉลี่ย 96.50 ± 1.70 เปอร์เซ็นต์ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางส่วนหัวเฉลี่ย 3.17 ± 0.2 ไมครอน และมีความยาวหางเฉลี่ย 34.33 ± 2.02 ไมครอน ลักษณะส่วนหัวของเซลล์อสุจิมีลักษณะกลม (ภาพที่4 และ5) ซึ่งสอดคล้องกับวีรพงศ์ (2536) ที่รายงานว่าปลากระดูกแข็งส่วนมากจะมีอสุจิที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกลม (spherical) โดยส่วนหัวมีขนาดประมาณ 2-3 ไมครอนและความยาวอสุจิจากหัวจนถึงหางประมาณ 40-60 ไมครอน ส่วนกลางมีขนาดเล็กและส่วนใหญ่มีหางจำนวนหนึ่งหาง สำหรับเซลล์อสุจิที่ผิดปกติส่วนหัวจะมีขนาดใหญ่ เส้นผ่านศูนย์กลางส่วนหัวเฉลี่ย 4.34 ไมครอน หรือมีส่วนหางที่ผิดปกติ เช่น ส่วนหางขาดหาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

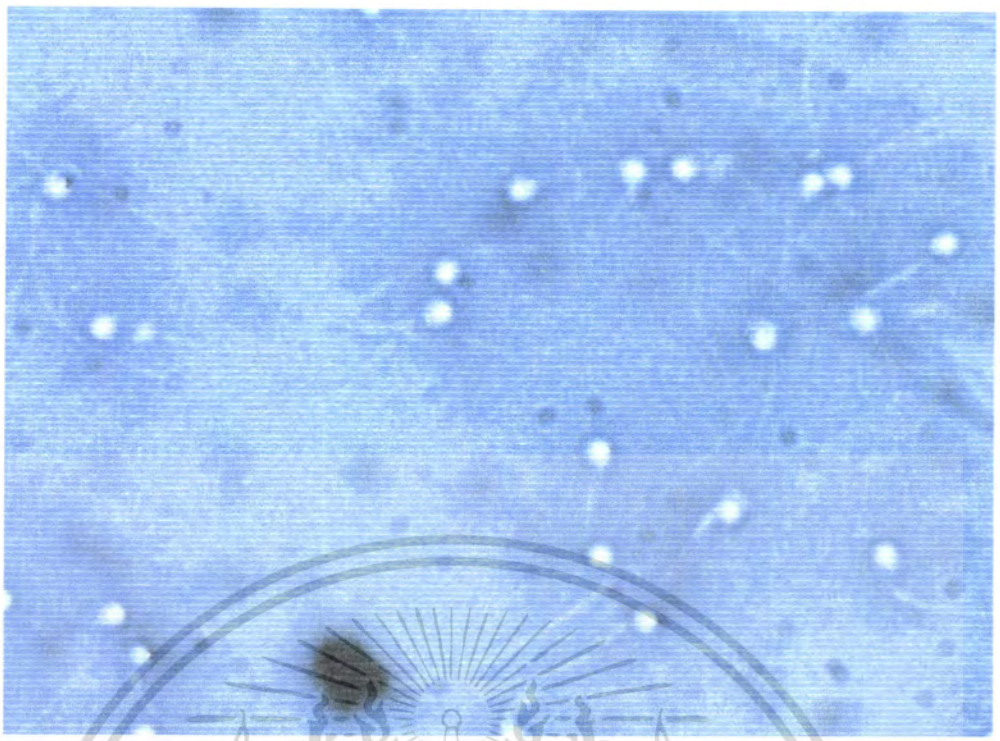
ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยขนาดปลา ปริมาตรน้ำเชื้อ และคุณภาพน้ำเชื้อของปลายี่สกเทศ

ชนิดปลา	ปลายี่สกเทศ
1. น้ำหนักตัวปลา (กรัม)	675.17 ± 39.44
2. ความยาว (เซนติเมตร)	38.92 ± 1.36
3. ปริมาตรน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)	0.18 ± 0.07
4. ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง	6.75± 0.37
5. ความเข้มข้นของอสุจิ ($\times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร)	44291.67± 15099
6. การเคลื่อนไหวของอสุจิ (เปอร์เซ็นต์)	90
7. อสุจิที่มีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)	99.67 ± 1.24
8. อสุจิที่มีลักษณะปกติ (เปอร์เซ็นต์)	96.50 ± 1.70
8.1 ขนาดของส่วนหัว (ไมครอน)	3.17 ± 0.2
8.2 ขนาดของส่วนหาง (ไมครอน)	34.33 ± 2.02

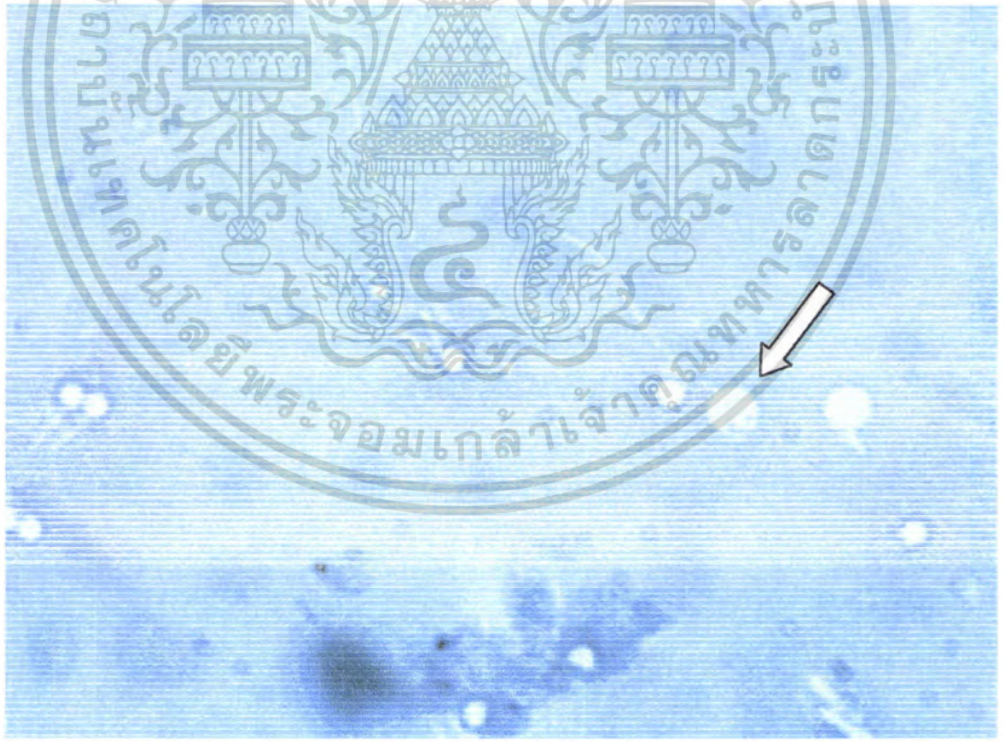


ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ของน้ำหนักตัวกับปริมาตรน้ำเชื้อในปลายี่สกเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 รูปร่างของอสุจิปลายี่สกเทศ (100X)



ภาพที่ 5 รูปร่างของอสุจิปลายี่สกเทศที่ผิดปกติ (ศรชี้) (100X)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
99178

สรุป

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ ในด้านการเคลื่อนไหวของอสุจิ ความเข้มข้นของอสุจิ รูปร่างลักษณะของเซลล์อสุจิ อสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต และค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเชื้อ ผลปรากฏว่า

น้ำเชื้อของปลายี่สกเทศ มีการเคลื่อนไหวของอสุจิ 90 เปอร์เซ็นต์ ความเข้มข้นของอสุจิ $44291.67 \times 10^6 \pm 15099 \times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร รูปร่างลักษณะของเซลล์อสุจิมีส่วนหัวที่กลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 3.17 ± 0.2 ไมครอน หางมีความยาว 34.33 ± 2.02ไมครอน อสุจิที่มีชีวิต 99.67 ± 1.04 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำเชื้อ 6.75 ± 0.37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข้อเสนอแนะ

1. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา ผู้ประเมิน ต้องมีความชำนาญ และแม่นยำในการประเมิน
2. การประเมินการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ ต้องประเมินอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเซลล์อสุจิที่ถูกน้ำกลั่นกระตุ้นจะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว ในระยะเวลาประมาณ 1-2 นาที จะหยุดการเคลื่อนไหวทำให้ไม่สามารถประเมินการเคลื่อนไหวได้
3. สไลด์ที่ย้อมด้วยสี Eosin-Nigrosin เพื่อประเมินตัวเป็นตัวตาย ต้องเก็บไว้ในที่มีความชื้นน้อย เพราะความชื้นสูงทำให้สีย้อมซึมเข้าไปในเซลล์อสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กองพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ. 2534. การใช้ประโยชน์จากปลาน้ำจืด. เอกสารทางวิชาการฉบับที่ 1/2534. 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 จากน้ำเชื้อแช่แข็งในสูตรต่างๆ กัน. วารสารการประมง 48(6) : 509 – 516.

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

นลินี มารคแมน. 2527. การศึกษาเบื้องต้นกรรมวิธีการเก็บน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์วิยาศาสตร์มหาบัณฑิต. 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. ภาควิชาวารีชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี. 128 น.

ศักดิ์ชัย ชูโชติ. 2530. การเลี้ยงปลาน้ำจืด. โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพฯ. 223 น.

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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 Carpe, *Cyprinus carpio*. 5. Appl. Ichthyo. 5 : 165 – 176.

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.

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 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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

วิธีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ

1. ชั่งวัด ความยาว และน้ำหนักของปลา
2. รีดน้ำเชื้อปลา
   2.1 เช็ดตัวปลาให้แห้งด้วยผ้าสะอาด ก่อนรีดน้ำเชื้อบริเวณท้อง ใส่หลอดวัดปริมาณน้ำเชื้อที่เตรียมไว้
3. ประเมินอัตราการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์
   3.1 หยดน้ำเชื้อบนสไลด์ (หยดให้บางที่สุด)
   3.2 หยดน้ำกลั่นเพื่อกระตุ้นอสุจิ ปิดด้วย cover glass
   3.3 ประเมินการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ เป็นเปอร์เซ็นต์ โดยสุ่มบริเวณที่เซลล์อสุจิเคลื่อนที่ใน 100 ตัว มีการเคลื่อนไหวกี่ตัว
4. ประเมินตัวเป็นตัวตายของเซลล์อสุจิ และวัดขนาดของหัวและหางของเซลล์อสุจิ
   4.1 หยดน้ำเชื้อ 1 หยดบนสไลด์ หยดน้ำกลั่นลงบนน้ำเชื้อ 1 หยดแล้วคนให้เข้ากัน หลังจากนั้นหยดสีย้อม Eosin-Nigrosin ลงบนน้ำเชื้อ คนน้ำเชื้อและสีย้อมผสมกันและสเมียร์เป็นฟิล์มบางๆ fix ด้วยความร้อนโดยลนบนตะเกียงแอลกอฮอล์
   4.2 ทิ้งไว้สักครู่ และนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 100 เท่า เพื่อตรวจเปอร์เซ็นต์ตัวเป็นตัวตายและวัดขนาดเซลล์อสุจิ

   ส่วนประกอบของสีย้อม Eosin-Nigrosin คือ Eosin B 1 g Nigrosin 5 g ละลายในโซเดียมซิเตรดไดไฮเดตท 29% (ศักดิ์ชัย, 2538)การประเมินตัวเป็นตัวตายของเซลล์อสุจิ (live-dead sperm) จะอาศัยหลักการย้อมสีซึ่ง Eosin-Nigrosin มีคุณสมบัติของสารคือ Eosin เป็นสีย้อมพิเศษ ไม่สามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ตัวอสุจิที่มีชีวิต แต่สามารถซึมผ่านเข้าในเซลล์อสุจิที่ตายให้เห็นเป็นสีชมพู ส่วน Nigrosin จะทำให้พื้นสไลด์ติดสีเข้ม จึงสามารถมองเห็นตัวอสุจิที่มีชีวิต ซึ่งจะไม่ติดสีของ Eosin จึงมองเห็นเป็นสีขาว สำหรับเซลล์อสุจิไม่มีชีวิตจะมีสีชมพู
5. ประเมินความหนาแน่นของเซลล์อสุจิ (sperm comcentration)
   5.1 นำไมโครไปเปตเจือจางน้ำเชื้อ (เจือจาง 1/5000) ดูดน้ำเชื้อ 1 ไมโครลิตร และใช้ไปเปต10 มิลลิลิตร ดูดน้ำเกลือ 0.9% จำนวน 50 มิลลิลิตรผสมกับน้ำเชื้อ
   5.2 ผสมน้ำเชื้อกับน้ำเกลือ 0.9% โดยใช้ปลายหลอดหยดคนให้เข้ากัน
   5.3 นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว ไปหยดบนสไลด์ Hemacytometer นำมาตรวจด้วยวิธี Neubauer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนวณ

ความเข้มข้นของอสุจิ = จำนวนเซลล์อสุจิ 5 ช่อง x 50,000 x อัตราการเจือจาง หน่วยเป็นเซลล์/มิลลิลิตร

6. **วัดค่าความเป็นกรดเป็นด่างน้ำเชื้อปลาด้วยกระดาษลิตมัส**

   6.1 **ใช้กระดาษลิตมัสแตะน้ำเชื้อรอให้แห้ง 2-3 นาที**

   6.2 **นำกระดาษลิตมัสมาเทียบสีวัดค่า pH**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 คุณภาพน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ

ปลาตัวที่	1	2	3	4	5	6	ค่าเฉลี่ย ± SD
1. น้ำหนักปลา (กรัม)	680	730	710	618	620	630	675.17 ± 39.44
2. ความยาวปลา (เซนติเมตร)	39	40	41.5	38	37.5	37.5	38.92 ± 1.36
3. ปริมาตรน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)	0.2	0.3	0.1	0.1	0.2	0.2	0.18 ± 0.07
4. ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง	6.5	6.5	7.5	6.5	7	6.5	6.75 ± 0.37
5. ความเข้มข้นอสุจิ ($\times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร)	37500	59500	24000	27750	57750	59250	44291.67 ± 15099
6. Motility (เปอร์เซ็นต์)	90	90	90	90	90	90	90
7. อสุจิที่มีชีวิต (เปอร์เซ็นต์)	100	100	100	99	100	99	99.67 ±1.24
8. อสุจิที่มีลักษณะปกติ (เปอร์เซ็นต์)	98	97	96	94	99	95	96.50 ± 1.70
8.1 ขนาดของส่วนหัว (ไมครอน)	3	3	3	3	3.5	3.5	3.17 ± 0.2
8.2 ขนาดของความยาวหาง (ไมครอน)	31	35	34	33	37	36	34.33 ± 2.02

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักปลายี่สกเทศ (กิโลกรัม) กับปริมาตรน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (มิลลิลิตร)

น้ำหนัก; X_1	ปริมาตรน้ำเชื้อ; X_2	X_1^2	X_2^2	X_1X_2
0.680	0.2	0.4624	0.04	0.136
0.730	0.3	0.5329	0.09	0.219
0.710	0.1	0.5041	0.01	0.071
0.681	0.1	0.4637	0.01	0.068
0.620	0.2	0.3844	0.04	0.124
0.630	0.2	0.3969	0.04	0.126
$\sum X_1$ 4.051	$\sum X_2$ 1.1	$\sum X_1^2$ 2.7444	$\sum X_2^2$ 0.23	$\sum X_1X_2$ 0.744
Mean 0.6751	0.1833			

Sxx = 2.7444 – (4.051 × 4.051) / 6 = 0.0093

Syy = 0.23 – (1.1 × 1.1) / 6 = 0.0284

Sxy = 0.744 – (4.051 × 1.1) / 6 = 0.0014

b = 0.0014/ 0.0093 = 0.1505

a = 0.1833 – 0.1505 (0.6751) = 0.0817

สมการถดถอยเชิงเส้นคือ $\hat{Yi} = 0.0817 + 0.1505Xi$

γ = 0.081 หมายถึง น้ำหนักตัวของปลาตะเพียนมีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำเชื้อในเชิงบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (มิลลิลิตร) กับความเข้มข้นของอสุจิปลายี่สกเทศ ($\times 10^6$ เซลล์ / มิลลิลิตร)

ปริมาตรน้ำเชื้อ; X_1	ความเข้มข้นอสุจิ; X_2	X_1^2	X_2^2	X_1X_2
0.2	37500	0.04	1,406,250,000	7500
0.3	59500	0.09	3,540,250,000	17850
0.1	24000	0.01	576,000,000	2400
0.1	27750	0.01	770,062,500	2775
0.2	57750	0.04	3,335,062,500	11550
0.2	59250	0.04	3,510,562,500	11850
$\sum X_1$ 1.1	$\sum X_2$ 265750	$\sum X_1^2$ 0.2:	$\sum X_2^2$ 13,138,187,500	$\sum xy$ 53925
Mean 0.1833	44291.66			

Sxx = 0.23 – (1.1 x 1.1) / 6 = 0.028

Syy = 13,138,187,500 – (265750 x 265750) / 6 = 1,367,677,083.33

Sxy = 53,925 – (1.1 x 265750) / 6 = 5204.16

b = 5204.16 / 0.028 = 185,862.85

a = 44,291.66 - (185,862.85) (0.1833) = 10,222.99

สมการถดถอยเชิงเส้นคือ $\hat{Y}i = 10{,}222.99 + 185{,}862.85Xi$

γ = 0.836 หมายถึง ปริมาตรน้ำเชื้อมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของอสุจิปลายี่สกเทศเป็นเชิงบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้