

ใบรับรองปัญหาพิเศษ  
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง ผลของจำนวนอสุจิต่ออัตราการปฏิสนธิในปลาดุกอุย  
Effect of Sperm Number Per Egg on Fertilization Rate in Walking Catfish  
(*Clarias macrocephalus* Gunther)

ชื่อนักศึกษา นางสาว ชุติมา ไหม่มกข์

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ

ได้รับพิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....

(รองศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

ภาควิชารับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

วันที่ 20 เดือน 11 พ.ศ. 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของจำนวนอสุจิต่ออัตราการปฏิสนธิในปลาอุกอุย

Effect of Sperm Number Per Egg on Fertilization Rate in Walking Catfish

(*Clarias macrocephalus* Gunther)



T099341

โดย

นางสาว ชุติมา ไช้มุข

ร.ท.

ร.ท. 617 ค

9547

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน..... 99541

วันเดือนปี.....

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร 10520

ปีการศึกษา 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

### เรื่อง

#### ผลของจำนวนอสุจิต่ออัตราการปฏิสนธิในปลาดุกอุย

Effect of Sperm Number Per Egg on Fertilization Rate in Walking Catfish

(*Clarias macrocephalus* Gunther)

จากการทดลอง เปรียบเทียบอัตราปฏิสนธิในปลาดุกอุย Walking Catfish (*Clarias macrocephalus* Gunther) โดยใช้ไข่จากพ่อพันธุ์ปลาดุกอุยที่มีความยาวตัวเฉลี่ย 32.2 เซนติเมตร น้ำหนักตัวเฉลี่ย 216.25 กรัมต่อตัวและ น้ำหนักอณฑะเฉลี่ย 1.33 กรัมต่อตัว ความเข้มข้นของอสุจิ  $860 \times 10^6$  ตัวต่อลูกบาศก์เซนติเมตร อัตราการเคลื่อนไหว 50 เปอร์เซ็นต์ และแม่พันธุ์ปลาดุกอุยที่มีความยาวตัวเฉลี่ย 34.13 เซนติเมตร น้ำหนักตัวเฉลี่ย 450 กรัมต่อตัว น้ำหนักไข่ทั้งหมดเฉลี่ย 32.03 กรัมต่อตัว ในระดับ ความเข้มข้นอสุจิที่  $50 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  และ  $150 \times 10^4$  ตัวต่อฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิ 70.92, 73.11, 68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ )

## คำนิยาม

การทำปัญหาพิเศษในครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ศักดิ์ชัย ชูโชติ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาวิชาปัญหาพิเศษ ที่คอยให้คำแนะนำปรึกษาตลอดการทดลอง รวมทั้งช่วยแก้ไข ปัญหาข้อบกพร่องต่างๆตั้งแต่ต้น จนสามารถจัดทำปัญหาพิเศษเล่มนี้เสร็จอย่างสมบูรณ์ ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ สมศักดิ์ บัณทุชัย ที่ให้ความช่วยเหลือระหว่างการทดลองและอาจารย์ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่านที่อบรมสั่งสอนและให้วิชาความรู้แก่ข้าพเจ้าตลอดมา

ขอขอบพระคุณ พี่นุพผา จงพัฒน์ , พี่นิพนธ์ จิตตำนาน และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่าน รวมทั้งขอบคุณเพื่อนๆทุกคนและน้องๆที่คอยให้ความช่วยเหลือแก่ข้าพเจ้าตลอดการทดลอง สุดท้าย ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ผู้ให้กำเนิดเลี้ยงดูข้าพเจ้าอย่างดีตลอดมา และคอยให้คำปรึกษาชี้แนะแนวทางที่ดีแก่ลูกคนนี้ด้วยความรัก

นางสาว ชุตินา ไช้มุข

เมษายน 2548

## สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	i
สารบัญตาราง	ii
สารบัญภาพ	iii
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	23
ผลการทดลองและวิจารณ์	27
สรุปและข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	34



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. อัตราปฏิสนธิของปลาอุกอุย	29
ตารางผนวกที่	หน้า
1. เปอร์เซนต์ค่าเฉลี่ยอัตราปฏิสนธิของไขปลา channel catfish ( <i>Ictalurus punctatus</i> ) ที่ระดับความเข้มข้นของอสุจิปลา Blue catfish ( <i>I. Furcatus</i> ) ที่แตกต่างกัน.	34
2. เปอร์เซนต์ค่าเฉลี่ยอัตราปฏิสนธิของไขปลา channel catfish ( <i>Ictalurus punctatus</i> ) ที่ความหลากหลายของปริมาณไข่ที่ใช้ในการปฏิสนธิกับอสุจิปลา Blue catfish ( <i>I. Furcatus</i> )	34
3. อัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักของปลา Asian catfish ( <i>C. macrocephalus</i> ) จากการผสมน้ำเชื้อกับ ASP ในอัตราส่วนต่างๆ.	35
4. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแม่พันธุ์ปลาอุกอุย	35
5. อัตราปฏิสนธิของปลาอุกอุย	36
6. ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการปฏิสนธิปลาอุกอุย	36

## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. อัตราการปฏิสนธิของปลาตกอุยตามระดับความเข้มข้นของอสุจิ	29



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ผลของจำนวนอสุจิต่ออัตราการปฏิสนธิในปลาดุกอุย

Effect of Sperm Number Per Egg on Fertilization Rate in Walking catfish ,  
(*Clarias macrocephalus*)

### คำนำ

สภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำทางธรรมชาติในปัจจุบันนี้ ได้เปลี่ยนแปลงไปมาก จากที่เคยอุดมสมบูรณ์ด้วยพันธุ์ปลาต่างๆ ดังที่คนรุ่นก่อน เคยกล่าวไว้ว่า “ในน้ำมีปลา ในนามีข้าว” ซึ่งคนรุ่นปู่ย่าตายายของเราเคยจับปลาจากแม่น้ำลำคลอง มาเพื่อบริโภคกันในครัวเรือน อย่างพอเพียง แต่ปัจจุบันนี้ ประชากรโลกเพิ่มจำนวนมากขึ้นทำให้มีความต้องการอาหารซึ่งเป็น แหล่งพลังงานมากขึ้น และปลาเป็นแหล่งโปรตีนที่ประชากรนิยมรับประทาน เนื่องจาก ราคา ค่อนข้างถูกและมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แต่มีไขมันและคอเรสเตอรอลต่ำ ย่อยง่ายเหมาะที่ นำมาเป็นอาหารแก่คนทุกวัยเพื่อสุขภาพที่ดีของผู้บริโภค (ชนิกา,2542) ทำให้จำเป็นที่จะต้องมีการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเพื่อการบริโภค จนกลายเป็นการค้า และพัฒนาไปจนถึงขั้นการเพาะเลี้ยง สัตว์น้ำเชิงอุตสาหกรรม ศักดิ์ชัย (2538) กล่าวว่า ปัจจุบันนี้ สัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญของ ประเทศบางชนิดเริ่มที่จะหายาก หรือใกล้ที่จะสูญพันธุ์ไปจากสภาพแวดล้อม เช่น ปลาดุกอุย ปลา บึก ปลาเทโพ ปลาเทพา ฯลฯ ปลาที่หายากเหล่านี้จึงจำเป็นต้องได้รับการเพาะขยายพันธุ์ให้มี ปริมาณมากขึ้น แต่ในทาง ปฏิบัติมักประสบปัญหา การจับปลาเพศผู้และเพศเมียได้ไม่พร้อมกัน หรือจับได้แต่เพศเมียเท่านั้น ทศนิยมและคณะ (2529) พบว่า จากปัญหาการจับเพศผู้และเพศเมีย ได้ไม่พร้อมกันทำให้พ่อแม่พันธุ์ที่ถูกจับได้ก่อนบอบช้ำ และตาย ศักดิ์ชัย (2538) เสนอแนวทางการ แก้ปัญหาโดย การเก็บน้ำเชื้อปลาไว้เพื่อการผสมเทียม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อ ปลาโดยวิธีการแช่แข็ง ซึ่งน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถนำมาใช้ผสมพันธุ์ได้ตลอดเวลา

การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์แบบแช่แข็ง จึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยพัฒนา ด้านการ เพาะขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ เนื่องจาก สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการอนุรักษ์สายพันธุ์ที่ สำคัญ และการปรับปรุงพันธุ์ เช่น เพาะพันธุ์ลูกผสม ได้แก่ ปลาไน และ ปลาดุก การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลา จะเป็นประโยชน์มาก หากสามารถพัฒนาจนสามารถ มีอัตราการผสมติด หรือ เปอร์เซนต์การผสมติดใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด สามารถใช้ง่ายและมีปริมาณมากพอ (เกรียงศักดิ์ , 2545) อย่างไรก็ตาม น้ำเชื้อที่จะเก็บรักษาไว้ในสภาพแช่แข็ง ต้องผ่านกระบวนการทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลิตหลายขั้นตอน และ ก่อนที่จะนำน้ำเชื้อที่รีดได้จากพ่อพันธุ์ปลา มาทำเป็น น้ำเชื้อปลาแช่แข็ง ควรที่จะมีการตรวจสอบ หรือประเมินคุณภาพน้ำเชื้อก่อน เพื่อที่จะทราบว่า น้ำเชื้อที่ได้มานั้น ควรนำไปผ่านกระบวนการแช่แข็ง เพื่อเก็บไว้ใช้ในงานผสมเทียมหรือไม่ หากว่าตรวจสอบแล้ว พบว่าคุณภาพน้ำเชื้อนั้นๆ ไม่ได้มาตรฐาน จะได้ไม่เสียเวลา และ ค่าใช้จ่ายในการผลิตน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง ที่มีคุณภาพต่ำเพื่อนำไปใช้งานอย่างด้อยประสิทธิภาพ (ศักดิ์ชัย,2538) ชนิกา,(2542)อ้างตาม วิทย์,(2521) พบว่าการผสมเทียมปลาโดย ไม่คำนึงถึงอัตราส่วนระหว่างไข่และอสุจิ มีผลทำให้น้ำเชื้อหรือพ่อพันธุ์ปลา ในกรณีที่ต้องผ่าเอาอวัยวะออกมาสูญเสียไปโดยไม่เหมาะสมกับคุณค่าทางเศรษฐกิจ เกียรติศักดิ์,(2540) กล่าวว่า คุณภาพน้ำเชื้อที่ผ่านการประเมินสามารถที่จะคาดคะเนอัตราการปฏิสนธิได้ เช่น การเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ และอัตราการปฏิสนธิจะแปรผันตามกัน ส่วน การฉีดฮอร์โมนช่วยให้การรีดอสุจิ และปริมาณอสุจิและของเหลวมากขึ้น แต่ไม่ช่วยสร้างอสุจิเพิ่มขึ้น รวมทั้งความหนาแน่นของอสุจิจะสัมพันธ์กับปริมาณอสุจิในของเหลวทั้งหมด ชนิกา (2542) พบว่า ถ้าเราทราบ ความหนาแน่นของอสุจิต่อไข่ในการปฏิสนธิ จะทำให้สามารถเตรียมน้ำเชื้อแช่แข็งในความเข้มข้นที่พอดีกับจำนวนไข่และนำมาใช้ได้เร็วขึ้น การทราบจำนวนอสุจิต่อไข่ที่มีอัตราการปฏิสนธิดีที่สุดจะสามารถนำไปปรับใช้ในการผสมเทียมได้ทั้งแบบใช้น้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง ให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นช่วยลดความฟุ่มเฟือยในการใช้น้ำเชื้อเพื่อให้ได้ลูกปลาจำนวนมากขึ้น มณีรัตน์ (2544) รายงานว่า ในปลาดุกซึ่งมีอวัยวะอยู่ลึกลงไปใต้ระบบทางเดินอาหารและผนังท้องหนาจึงจำเป็นต้องผ่าท้องปลาดุกเอาน้ำเชื้อ ดังนั้นน้ำเชื้อที่ได้มาจึงควรทำให้เกิดประโยชน์คุ้มค่ามากที่สุด ลีติมา (2545) กล่าวว่า ในกรณีที่ต้องการผสมพันธุ์ข้ามถิ่นหรือ ชนิดเพื่อสายพันธุ์ใหม่ การขนย้ายไปเฉพาะน้ำเชื้อย่อมสะดวกกว่าการขนย้ายพ่อพันธุ์ไป การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา มีขอบเขตการเก็บรักษา ตั้งแต่ 2-3 ชั่วโมง จนถึงเก็บได้เป็นปีๆ ขึ้นอยู่กับขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและวิธีในการเก็บรักษา อย่างไรก็ตาม การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งเหมาะสำหรับการอนุรักษ์เชื้อพันธุ์ หรืออสุจิเพื่อการศึกษา และคัดเลือกผสมพันธุ์หรือการผสมข้ามชนิดพันธุ์ (กฤษณ์และทัศนีย์,2532) จากที่กล่าวมา จะเห็นได้ว่าการศึกษาถึงความหนาแน่นของอสุจิต่อไข่ปลาเพื่อคาดคะเนการปฏิสนธิมีประโยชน์อย่างมากต่อการพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง และน้ำเชื้อปลาแบบสด เพื่อให้ได้น้ำเชื้อปลาคุณภาพดี อัตราผสมดีสูงและยังเป็นการใช้ประโยชน์จากน้ำเชื้อให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งปัจจุบันนี้ กรมประมงได้จัดตั้งธนาคารเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำ เพื่อเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งให้เพียงพอที่จะใช้งานในอนาคต โดยเฉพาะในสัตว์น้ำที่ใกล้สูญพันธุ์สัตว์น้ำเศรษฐกิจที่สำคัญสามารถเก็บน้ำเชื้อในรูปแบบแช่แข็งได้นานสูงสุดประมาณ 500วันขึ้นไป (กรมประมง,2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาถึง อัตราส่วนที่เหมาะสมของอสุจิต่อไข่ ที่ทำให้มีอัตราการปฏิสนธิที่ดีที่สุดในปลาตุ๊กตุย โดยใช้ความหนาแน่นของอสุจิที่แตกต่างกันใน 3 ระดับความเข้มข้น

## ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐาน ในการพัฒนากระบวนการผสมเทียมโดยการใช้ความเข้มข้นและปริมาณอสุจิต่อไข่ที่เหมาะสมในปลาตุ๊กตุย และการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีคุณภาพ เพื่อให้เกิดผลผลิตทดเทียบกับการใช้น้ำเชื้อสด



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## การตรวจเอกสาร

ปลาดุกอุยเป็นปลาที่อาศัยอยู่ทั่วไปทั้งในน่านน้ำจืดแถบเขตร้อนบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น อินдия ไทย พม่า ลาว กัมพูชา เวียดนาม อินโดนีเซีย และหมู่เกาะบอร์เนียว ฟิลิปปินส์ สำหรับประเทศไทย จะพบว่ามียูอยู่ทั่วไปทั่วทุกภาค โดยธรรมชาติปลาดุกอุยจะอาศัยในแหล่งน้ำจืด (กรมประมง,2530) แม้แต่ในแหล่งน้ำค่อนข้างกร่อยก็สามารถอาศัยอยู่ได้ เช่น แถบสมุทรปราการ และ ฉะเชิงเทรา (สุภาพร,2538) ปลาดุกอุย จัดอยู่ในครอบครัว Clariidae ชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Calrias macrocephalus* ชื่อสามัญ คือ Gunther's walking catfish ขนาดตั้งแต่ 15-35 เซนติเมตร ส่วนของกระดูกท้ายทอยของปลาดุกอุยจะกลมมน ต่างจากปลาดุกด้านที่ยื่นแหลมคล้ายรูปสามเหลี่ยม (สัมฤทธิ์,2544) มีหนวด 4 คู่ ไม่มีเกล็ด รูปร่างยาวเรียว ครีบหลังยาวไม่มีกระดูก ครีบท้องยาวเกือบถึงโคนหาง มีอวัยวะช่วยในการหายใจเรียกว่า เดนไดรท์ หรือ อวัยวะอาร์บอเรสเซนต์ (dendrite หรือ arborescent organ) มีลักษณะเป็นกลุ่มท่อเล็กๆ รวมกันซึ่งรวมกันเป็นช่องที่แตกกิ่งก้านสาขา จึงช่วยให้ปลาดุกสามารถอยู่พ้นน้ำได้นาน ตามีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับขนาดของลำตัวผนังท้องสีขาวถึงเหลือง สัดส่วนระหว่างหัว:ตัวคือ 1:4 (สุภาพร,2539)

ภาณุ และคณะ (2538) รายงานว่า ระยะจากปลายกระดูกท้ายทอยถึงจุดเริ่มต้นของครีบหลังประมาณ 1 ใน 5-7 ของความยาวจากปลายสุดของจงอยปากถึงปลายกระดูกท้ายทอย ครีบหลังมีก้านครีบ 68-72 ก้าน ครีบกันมีก้านครีบ 47-52 ก้าน มีจำนวนกระดูกซี่โครงประมาณ 32 ซี่ ลักษณะสีของลำตัวมีสีเทาปนดำและเหลือง กรมประมง (2530) รายงานว่า หนวดของปลาดุก สามารถรับความรู้สึกได้ดีจึงใช้หนวดในการหาอาหาร มากกว่าใช้ตาเมื่อหาอาหารตามพื้นดิน โดยปกติปลาดุกมีนิสัยขบเคี้ยว ชอบกินอาหารจำพวกเนื้อสัตว์มากกว่า อาหารประเภทพืชและแป้ง ในการเลี้ยงควรให้อาหารประเภทเนื้อประมาณ 30-50% ของอาหารประเภทพืชและแป้ง เพื่อให้ปลาดุกโตได้สัดส่วนไม่อ้วนสั้นเกินไป

ปลาดุกอุยมีรสชาติดี โตเร็ว สามารถนำมาเพาะพันธุ์ได้ ตั้งแต่อายุ 8 เดือนขึ้นไป ก็สามารถสังเกตอวัยวะเพศได้ชัดเจน ปลาเพศเมียมีอวัยวะเพศรูปไข่ปลายมน ส่วนเพศผู้มีอวัยวะเพศเรียวยาวแหลม ฤดูวางไข่ คือ ฤดูฝน ระหว่างเดือน พฤษภาคม – ตุลาคม เมื่อถึงฤดูวางไข่ปลาเพศเมียท้องจะอูมพอง ท้องนิ่ม อวัยวะเพศจะเป็นรูปร่างกว้างใหญ่กว่าเพศผู้ ไข่ปลาดุกอุยเป็นไข่จม และติดตัวสด มีสีน้ำตาลอมแดง มีลักษณะเป็นเม็ดกลมเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.2-2.4 มิลลิเมตร อุณหภูมิน้ำที่เหมาะสมแก่การฟักเป็นตัวที่ 25-32 องศาเซลเซียส ปริมาณของไข่ขึ้นกับความสมบูรณ์ของแม่ปลา แม่ปลาหนัก 300-800 กรัมจะวางไข่ได้ครั้งละประมาณ 5000-7000 ฟอง (วิริยา,2546) ลูกปลาอายุ 15 วันสามารถแยกเพศได้จากอวัยวะสืบพันธุ์ภายใน (พรรณศรี และคณะ,2538)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ระบบสืบพันธุ์ของปลาตุ๊กตอ

### อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (female reproductive organ)

ปลาตุ๊กตอมีรังไข่ 2 ฟัก แบ่งการพัฒนาของไข่โดยการศึกษาในรังไข่ปลาเป็น 6 ระยะ ตามการแบ่ง ของ Groman (1982) และ ปวีณา (2530) ดังนี้

ไข่ระยะที่ 1 (Oocyte stage1) ไข่มีขนาดเล็กมากยังอยู่ในรูปของ oogonia ติดสีชมพูจางอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันล้อมรอบ มีนิวเคลียสกลมตรงกลางเซลล์ พบมากในปลาอายุน้อย เช่นเมื่อปลาอายุ 15 วัน 1 เดือน และ 1.5 เดือน (99%,90%และ 80%) ตามลำดับ ส่วนปลาที่มีอายุถึงวัยเจริญพันธุ์จะพบน้อยมาก

ไข่ระยะที่ 2 (Oocyte stage2) ไข่จะมีขนาดใหญ่ขึ้น ติดสีชมพูจาง นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น ติดสีจางกว่าไซโตพลาซึม ยังไม่เห็น follicular cell พบตั้งแต่ปลาตุ๊กตออายุ 1 เดือน จะพบมากเมื่อปลามีอายุ 2.5 เดือน (35.5%)

ไข่ระยะที่ 3 (Oocyte stage3) ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น ค่อนข้างเป็นรูปสามเหลี่ยม นิวเคลียสอาจไปอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของไข่ปลา มีการพัฒนาของเซลล์เยื่อ follicular ไซโตพลาซึมติดสีน้ำเงินเข้ม ภายในนิวเคลียสเริ่มเห็น provitelline nucleoli กระจายทั่วไป พบในปลาตุ๊กตอตั้งแต่ อายุ 1.5 เดือนขึ้นไป ประมาณ 2% พบไข่ระยะนี้มากเมื่อปลามีอายุ 3 และ 3.5 เดือน

ไข่ระยะที่ 4 (Oocyte stage4) ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น มีรูปร่างค่อนข้างกลม พบว่ามี provitelline nucleoli เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ขอบของนิวเคลียส นิวเคลียสติดสีชมพูไซโตพลาซึมติดสีน้ำเงินปนชมพู เมื่อเปรียบเทียบกับไข่ระยะที่ 2 และ 3 เริ่มเห็น yolk granules และ fat vacuole เริ่มพบเมื่อปลามีอายุ 2 เดือน มีไข่ระยะนี้ประมาณ 3% จนถึง 1 ปี พบมากที่สุดเมื่อปลามีอายุประมาณ 4.5 เดือน ประมาณ 30%

ไข่ระยะที่ 5 (Oocyte stage5) ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น มี yolk granules และ fat vacuole เพิ่มมากขึ้นในไซโตพลาซึม พบ zona radiata และเยื่อ follicular บริเวณขอบเซลล์ไข่ จะเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์รูปทรงเหลี่ยม หรือสี่เหลี่ยมทรงสูง พบตั้งแต่ปลาตุ๊กตออายุ 2 เดือนมีประมาณ 2% ซึ่งพบค่อนข้างน้อย แต่จะพบมากที่สุด เมื่อปลามีอายุ 5 เดือนจนถึง 1 ปี (30%)

ไข่ระยะที่ 6 (Oocyte stage6) ไข่มีขนาดใหญ่มากขึ้น ลักษณะเด่นของไข่ระยะนี้คือในไซโตพลาซึมมี yolk granules ใหญ่ขึ้น กระจายใน fat vacuole ซึ่งมีปริมาณมาก นิวเคลียสเล็ก ติดสีชมพู ส้ม เกิด เห็นว่าผนังที่ล้อมรอบไข่ระยะนี้จะหนาไม่เท่ากันตลอด ยังคงเห็น zona radiata , follicular cell และ theca ชัดเจน เริ่มพบไข่ระยะนี้เมื่อปลามีอายุ 3.5 เดือน ประมาณ 17% และเพิ่มพบมากขึ้นเมื่อปลามีอายุ 9 เดือน เป็นต้นไปจะมีไข่ระยะนี้ประมาณ 35% ขึ้นไปและ พบว่ามีจำนวน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มากที่สุดเมื่อปลามีอายุปี ประมาณ 50% แสดงว่าปลาสามารถผสมพันธุ์ได้ดีมากเมื่ออายุ 9 เดือนขึ้นไป และเมื่อปลาอายุ 1ปี คาดว่าเป็นช่วงที่ดีที่สุดในการผสมพันธุ์

ไข่เสีย (degenerate egg) เป็นไข่ที่เสื่อมสลายไป มีลักษณะรูปร่างไม่แน่นอน ไม่เห็นนิวเคลียส หรือไซโตพลาซึม พบน้อยมากในปลาอายุ 6.5-8.5เดือน (ประมาณ1-3%) พบมากที่สุดเมื่อปลามีอายุ 7 เดือน (5%) อาจเนื่องจากไข่ในระยะที่6 จำนวนมากเมื่อปลามีอายุ6.5 เดือน แต่ปลายังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์ ไข่จึงเริ่มเสื่อมสลายลงเมื่อปลามีอายุ 7-8.5เดือน (พรรณศรีและคณะ,2538 อ้างตาม Groman ,1982และ ปวีณา ,2530)

### ลักษณะทั่วไปของไข่

ส่วนประกอบของไข่ปลามี 3 ส่วน (ศักดิ์ชัย,2538) คือ

1. นิวเคลียส และไซโตพลาซึมหรือ germinal disc เมื่อเกิดการปฏิสนธิส่วนนี้จะแบ่งเซลล์เจริญเป็นคัพภะ (embryo)
2. yolk ถูกล้อมรอบไว้ด้วย vitelline membrane ระหว่าง yolk กับเปลือกไข่ (chorion) มีช่องว่างเรียกว่า perivitelline space yolk ประกอบด้วย protein 2 ชนิด คือ lipovitelline กับ phosvitin ทั้ง 2 ชนิดเป็นโปรตีนที่รวมกับฟอสฟอรัส ไลปิด และคาร์โบไฮเดรต มีความแตกต่างกันคือ lipovitelline มีฟอสฟอรัสน้อย ไลปิด และคาร์โบไฮเดรตมาก แต่ phosvitinมีฟอสฟอรัสมาก ไลปิด และคาร์โบไฮเดรตน้อย นอกจากนี้ในปลาหลายชนิดยังมีหยดน้ำมันเป็นแหล่งพลังงานของคัพภะ และยังเป็นส่วนที่ช่วยลดความตึงจำเพาะของไข่ปลามีผลต่อการลอยน้ำ
3. เปลือกไข่ เป็นสิ่งที่ห่อหุ้มส่วนต่างๆ ที่อยู่ภายในไม่ได้รับอันตราย เปลือกไข่มีรูเล็กๆ 1รู เป็นทางเข้าของเชื้อตัวผู้ เรียกว่า micropyle อยู่ทาง animal pole ความหนาของเปลือกไข่ แตกต่างกันไปตามชนิดปลา

Linhart และคณะ (1995) อ้างตาม Ginsburg (1968) รายงานว่า ปลาตระกูล Cyprinids มีรู micropyle 1 รู บริเวณ animal pole มีเส้นผ่านศูนย์กลางของรู micropyle กว้างมากกว่า ปลาSalmonid และ Kudo .,(1983) รายงานว่า ในรู micropyle มีช่อง micopylar ซึ่งจะปิดเมื่อออกสุกผสมกับไข่ โดยทั่วไป cytoplasmic จะบวมพองขึ้นและมี 19-27 cytoplasmic finger รองรับอยู่

### อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male reproductive organ)

ปลาดุกอูย มีอัณฑะ (testis) 2 พู อยู่บริเวณเหนือเยื่อช่องท้อง ติดกับกระดูกสันหลัง และอยู่ภายใต้ไตส่วนปลาย เป็นพูเล็กๆ คล้ายนิ้วมือเป็นริ้วๆ มีสีขาวครีม ถ้าปลาดุกอูยยังเจริญพันธุ์ไม่เต็มที ลักษณะเป็นริ้วคล้ายนิ้วมือจะเห็นไม่ชัด แต่ละพูของอัณฑะจะล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อเอกลำารนเป็นเอกลำารนทงสวนไวสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตเห็นไปไซประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกี่ยวพัน (tunica albugina) บางๆ โดยมีกล้ามเนื้อเรียบล้อมรอบแยกจากกันอย่างชัดเจน ภายในเนื้อเยื่อมี interstitial กระจายอยู่ใน semiferous tubule จะมี germ cell ซึ่งจะพัฒนาการเจริญเป็นเซลล์สืบพันธุ์ต่างๆ Lehari (1967), Htun – Han (1987) , Billaid (1986) และ Sukumasavin (1992) ได้แบ่งการพัฒนาการสืบพันธุ์เพศผู้ (testis) แบ่งออกได้ 5 ระยะ ดังนี้

ระยะที่1 Spermatogonia เป็น germ cell เกิดขึ้นใน gonadal lamella ไฮโดพลาซึมจะติดสีอีโอซิน (Eosin) นิวเคลียสค่อนข้างใหญ่ติดสีชมพู พบในทุกอายุของปลา ตั้งแต่อายุ 0.5 เดือน (15วัน) มีประมาณ 1%เป็นต้นไป มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.01-0.005 มิลลิเมตร พบมากเมื่อปลามีอายุ 1.5 เดือน มีประมาณ 99%

ระยะที่2 Primary spermatocytes มีขนาดเล็กกว่า spermatogonia โดยเกิดจากการแบ่งเซลล์ของ spermatogonia มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.005-0.003 มิลลิเมตร ติดสีชมพูเข้มกว่า spermatogonia นิวเคลียสติดสีเข้มซึ่งเป็นกลุ่มของ chromatin พบ ตั้งแต่ปลามีอายุ 1.5เดือน เป็นต้นไปประมาณ 1% พบมากเมื่อปลามีอายุ 5 เดือน มีประมาณ 30%

ระยะที่3 Secondary spermatocytes มีจำนวนมากกว่าและขนาดเล็กกว่า Primary spermatocytes ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.003-0.006 มิลลิเมตร โดยเกิดจากการแบ่งเซลล์ของ Primary spermatocytes นิวเคลียสติดสีชมพูเข้ม พบ ตั้งแต่ปลามีอายุ 2.5 เดือน (5%) พบมากเมื่อปลามีอายุ 6เดือน มีประมาณ30%

ระยะที่4 Spermatids มีขนาดเล็กมากกว่า secondary spermatocytes ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.001-0.003 มิลลิเมตร ซึ่งมีขนาดเล็กมาก เกิดจากการแบ่งเซลล์ของ secondary spermatocytes นิวเคลียสติดสีน้ำเงินเข้ม พบ ตั้งแต่ปลามีอายุ 3 เดือน (3%) พบมากที่สุดเมื่อปลามีอายุ 11.5เดือน ประมาณ 31%

ระยะที่5 Spermatozoas เกิดจากการเปลี่ยนรูปร่างจาก spermatid โดยไม่ได้แบ่งเซลล์ แต่เปลี่ยนรูปร่างโดยมีหางเกิดขึ้น จะติดสีชมพู เริ่มพบเมื่อปลามีอายุ 3.5 เดือน (29%) พบมากที่สุดเมื่อปลามีอายุ 12 เดือน ประมาณ 45% ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระยะที่ปลาสามารถผสมพันธุ์ได้เมื่ออายุ 9เดือน และผสมพันธุ์ได้ดีที่สุดเมื่อมีอายุ 12เดือน (พรรณศรีและคณะ,2538)

### ลักษณะทั่วไปของอสุจิปลา

อสุจิของปลาไม่มี acrosome เหมือนอย่างในสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มอื่นๆ อาจเป็นเพราะไม่มีความจำเป็นต่อการใช้เพื่อเข้าไปในไข่เนื่องจากไข่ปลามีรู micropyle ไว้รองรับอยู่แล้ว (ศักดิ์ชัย,2538)

## อสุจิมีส่วนประกอบ ดังนี้

1. หัว (head) ส่วนนี้ประกอบด้วยนิวเคลียส มีโครโมโซม 1 ชุด ล้อมรอบด้วยไซโตพลาซึม เพียงบางๆ และห่อหุ้มด้วย plasmalemma (cell membrane) รูปร่างลักษณะของส่วนหัวมีหลายแบบแล้วแต่ชนิดปลา

2. ส่วนลำตัว (midpiece) เชื่อมต่อระหว่างหัวและหาง มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันตามชนิดของปลา ประกอบด้วย microtubules เป็นแกนกลางของส่วนหางล้อมรอบด้วยไซโตพลาซึมซึ่งภายในมี mitochondria และ centriole

3. หาง (fagellum) เป็นส่วนที่ช่วยในการเคลื่อนที่ประกอบด้วย microtubules เรียงกันรอบแกนกลางล้อมรอบด้วย plasmalemma membrane ปลาส่วนใหญ่มี microtubules เป็นแกนกลาง 1 คู่ และเรียงรอบวงกลมอีก 9 คู่ ยกเว้น ในปลาพวก Anguiliformes และ Elopiformes ซึ่งไม่มี microtubules เป็นแกนกลางโดยส่วนใหญ่เพื่อเพศผู้มีหางเพียงหางเดียว ซึ่งลักษณะอสุจิที่มี 2 หางพบบ้างในปลา Channel catfish ; *Ictalurus punctatus*

อสุจิของปลาดุกอสุจิส่วนหัวมีความกว้าง 2 ไมครอน ความยาวหาง 67.50 ไมครอน (ศักดิ์ชัยและสมศักดิ์, 2543) อสุจิปลาสามารถเคลื่อนไหวได้แตกต่างกันตามชนิดปลาและสภาพแวดล้อม เช่น อสุจิปลาน้ำกร่อยและปลาทะเลมักเคลื่อนไหวได้นานกว่าปลาน้ำจืด (ศักดิ์ชัย, 2538) น้ำเชื้อปลา (milt) เมื่ออยู่ในอัตรหรือรีดออกมาสดๆ จะมีสีขาวคล้ายน้ำนม แต่ข้นเหนียวและมีกลิ่นคาว ถ้าน้ำเชื้อปลามีเลือดปนน้ำเชื้อจะไม่ดีส่งผลกระทบต่ออัตราการปฏิสนธิ (มณีรัตน์, 2544 อ้างตาม นิสิต, 2533) การเพาะพันธุ์ปลาดุกอสุจิ มี 2 วิธี คือ การผสมเทียมและการผสมแบบธรรมชาติ ซึ่งการผสมเทียมปลาดุกอสุจิวิธีที่เหมาะสมที่สุดเนื่องจากได้จำนวนลูกปลามากกว่าปล่อยให้ผสมพันธุ์ และน้ำเชื้อจากปลาดุกเพศตัวผู้ที่สมบูรณ์พันธุ์สามารถผสมกับไข่ปลาที่รีดได้จากเพศเมียประมาณ 10 ตัว (วริยา, 2546)

## การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลา

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยทั่วไป มี 5 วิธี ได้แก่

1. ลักษณะและปริมาตรน้ำเชื้อ (appearance and volume) ควรสังเกตและตรวจวัดทันทีหลังการรีดน้ำเชื้อ น้ำเชื้อสดๆ จะมีสีขาวคล้ายน้ำนม มีกลิ่นคาวจัด ไม่ควรมีสีอื่นปน น้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาได้ควรมีการตรวจวัดปริมาตรเพื่อนำมาคำนวณหาอัตราการเจือจางน้ำเชื้อ ปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดได้จากปลาต่างชนิดและความหนาแน่นของอสุจิต่างกันในแต่ละชนิด เพราะปลาต่างชนิดมีวิวัฒนาการดำรงเผ่าพันธุ์ต่างกัน เช่น ปลาดุก วางไข่จำนวนน้อยและปริมาตรน้ำเชื้อน้อย แต่เปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวสูง เพราะไข่ปลาดุกจมติดวัตถุ และมีพฤติกรรม

เผ่าคู่ไข่และตัวอ่อน แต่ในปลาที่มีการวางไข่และปริมาตรน้ำเชื้อมาก เช่น ปลาดุกตะเพียน ซึ่งไข่มีจำนวนมากไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครึ่งลยครึ่งจม พบว่าไม่มีพฤติกรรมเผ่าดูแลไซและตัวอ่อน (ศักดิ์ชัย,2538) การประเมินรูปร่างลักษณะของเซลล์อสุจิ ใช้ในการตรวจสอบเซลล์อสุจิที่มีลักษณะปกติและผิดปกติที่เปอร์เซ็นต์ โดยอาศัยไลด์ย้อมสีควร์ใช้กล้อง phase contrast ทำให้เห็นชัดง่ายต่อการประเมิน (กรรณิการ์ ,2542) เซลล์อสุจิ เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดของไซจะมีขนาดเล็กมากกว่าไซถึง 1 ใน 100,000 เท่า เนื่องจากไม่มีอาหารสะสม ไซไซไม่แน่นอนแล้วแต่ชนิดปลา (สุภาพร,2539)

2. การเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ (sperm motility) สามารถประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ของอสุจิ และระดับการเคลื่อนที่ (กรรณิการ์,2542อ้างตาม Mounib,1998) การประเมินระดับการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิมี 2 วิธี คือ

2.1 การประเมินเป็นเปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นวิธีที่ต้องตรวจดูการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิเป็นรายตัวแล้วประเมินเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยสุ่มบริเวณที่อสุจิเคลื่อนที่แล้วประเมินว่า เซลล์อสุจิ 100 ตัว มีการเคลื่อนที่กี่ตัว

2.2 การประเมินเป็นกลุ่ม จะใช้วิธีของ Mounib (1978) และ วิธีของ Billard et. al (1991) โดยแบ่งการเคลื่อนที่เป็น 10 ระดับ,โดยระดับที่ 1 หมายถึง เซลล์อสุจิที่มีความอ่อนแอมาก (อสุจิเคลื่อนที่ 0-10%) ระดับที่ 10 หมายถึง เซลล์อสุจิที่มีการเคลื่อนที่มีความปราดเปรี้ยวสูง (90-100%)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยการตรวจการเคลื่อนที่ได้ผลไม่ดีนักเนื่องจาก อสุจิของปลาที่นำมาตรวจสอบ ด้วยกล้องจุลทรรศน์จะมีการเคลื่อนไหวแค่เพียงช่วงสั้นๆเท่านั้น (กรรณิการ์,2542อ้างตาม Williamและคณะ,1985) ปลาตู้กอย มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ 80% ปลาไนมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ 90% (ชนิกา ,2542) คุณหมุขของน้ำมีผลอย่างมากต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิ ถ้าคุณหมุขสูงจะทำให้อสุจิมีระยะเวลาในการเคลื่อนไหวน้อยกว่าคุณหมุขต่ำกว่า เช่น จากการศึกษาการเคลื่อนไหวของอสุจิ ในปลา sturgeon ที่คุณหมุขต่างกันที่ 10,12.5,15 และ 17.5 องศาเซลเซียส พบว่าที่คุณหมุขที่10 องศาเซลเซียสมีอัตราการเคลื่อนไหวสูงสุด 65% (มณีรัตน์,2544อ้างตาม Williot et al.,2000 )

ศักดิ์ชัย (2538) ปัจจัยที่ก่อให้เกิดการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิในแหล่งน้ำ ได้แก่

1. ภาวะออกซิเจนในน้ำที่สูงกว่าในสภาพที่อยู่ใน seminal fluid
2. ความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของน้ำกระตุ้นการเคลื่อนที่ซึ่งปกติมีค่า 6.7-7.5
3. ปริมาณอิออนของสังกะสี และทองแดงเป็นตัวกระตุ้น เช่นพบในปลาทะเลมีการเคลื่อนที่เร็วและนานกว่าปลาน้ำจืดเพราะในทะเลมีอิออนของสังกะสี และทองแดงเป็นตัวกระตุ้น
4. คุณสมบัติไฮโปโทนิค (Hypotonic) พบในปลาแซลมอนที่อยู่ในน้ำจืด อสุจิจะมีการเคลื่อนไหวน้อยกว่า 2นาทื แต่เมื่ออยู่ในน้ำเค็ม 3-6 ppt จะเคลื่อนไหวได้นานขึ้น และใน 10pptมีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเคลื่อนไหวมากที่สุดโดยทั่วไปจึงนิยมใช้น้ำเกลือ 0.6 - 0.7% มากระตุ้นการเคลื่อนไหวและยืดอายุอสุจิให้นานขึ้น

3. ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ (sperm concentration) หมายถึง จำนวนเซลล์อสุจิ ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร วิธีการประเมินความเข้มข้นของเซลล์ เช่น การหาค่า spermatocrit หรือ การใช้ hemocytometer (direct cell count)

3.1 การหาค่า spermatocrit คือ การหาค่าความหนาแน่นของอสุจิ (packed cell volume x100/total semen volume) แล้วเทียบกลับเป็นจำนวนเซลล์อสุจิต่อหน่วยปริมาตร โดยใช้เส้นกราฟมาตรฐานที่สร้างขึ้นเองในห้องปฏิบัติการ

3.2 การใช้ homocytometer เป็นการตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิโดยตรง โดยการใช้ hemocytometer ที่ดัดแปลง มาจากวิธีการนับเซลล์เม็ดเลือด ประกอบด้วยสไลด์ที่มีช่องนับ (counting chamber) 2 ช่องและไปเปตเจ็จจางน้ำเชื้อ (dilution pipette) ซึ่งเป็นไปเปตสำหรับนับเซลล์เม็ดเลือด โดยมีอัตราเจ็จจาง เท่ากับ 1:1200 (ศักดิ์ชัย,2538) มี 2 แบบ คือ

3.2.1 Fuchs –Rosenthal hemocytometer จะใช้การสุ่มนับจำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่เพียงช่องเดียวซึ่งมีปริมาตร 1/5 ลูกบาศก์เซนติเมตร สูตร ในการคำนวณดังนี้

$$* \text{ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ} = \text{จำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่} \times 1 \text{ ช่อง} \times 50,000 \times \text{อัตราการเจ็จจาง}$$

3.2.2 Neubauer hemocytometer ใช้การสุ่มนับเซลล์อสุจิจากสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่ 5 ช่อง มีปริมาตร 1/50 ลูกบาศก์เซนติเมตร สูตรดังนี้

$$* \text{ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ} = \text{จำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่} \times 5 \text{ ช่อง} \times 50,000 \times \text{อัตราการเจ็จจาง}$$

การเจ็จจางและเตรียมน้ำเชื้อเพื่อตรวจนับเซลล์อสุจิ ทำได้โดย ควบน้ำเชื้อถึงขีด 0.5 ของไปเปตแล้วดูดสารละลายเจ็จจางน้ำเชื้อให้ถึงขีด 101 ของไปเปตแล้วเขย่าไปเปตเพื่อให้น้ำเชื้อเจ็จจางผสมกันได้ดี หยดน้ำเชื้อที่เจ็จจางที่ขอบสไลด์ที่มีขอบแผ่นกระจกวางเหนือช่องสไลด์ทิ้งไว้สักครู่ให้เซลล์อสุจิคงที่แล้วนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ (กรรณิการ์,2542 อ้างตาม นลินี,2527) ช่วงเวลาในฤดูผสมพันธุ์ มีผลทำให้เกิดความแตกต่างของปริมาตรน้ำเชื้อและความเข้มข้นของอสุจิในปลาตัวเดียวกัน เช่น ปลาเรนโบว์ เทร์น มีปริมาตรน้ำเชื้อและความเข้มข้นของอสุจิสูงในระยะต้นฤดูผสมพันธุ์และคงที่ในเวลาต่อมา (กรรณิการ์,2542 อ้างตาม กฤษณ์,2536)

4. เซลล์อสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิต (live and dead sperm) เป็นวิธีการตรวจสอบว่าน้ำเชื้อที่มีเซลล์อสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิตอยู่ที่เปอร์เซ็นต์ อาศัยหลักการย้อมสี Eosin-Nigrosin จะพบว่า เซลล์อสุจิที่ตายจะติดสีย้อมคือสี Eosin ส่วนอสุจิมีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม โดยมี Nigrosin เป็นสีพื้นสุมันบอสมมาประมาณ 100 เซลล์เพื่อตรวจเซลล์อสุจิมีชีวิตและไม่มีชีวิตแล้วนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ (ศักดิ์ชัย,2538)

5. การประเมินรูปร่างลักษณะของเซลล์อสุจิ ใช้ในการตรวจสอบเซลล์อสุจิที่มีลักษณะปกติและผิดปกติที่เปอร์เซ็นต์ โดยอาศัยสไลด์ย้อมสีควรใช้กล้อง phase contrast ทำให้เห็นชัดง่ายต่อการประเมิน (กรรณิการ์,2542) ทั้งนี้ผู้ปฏิบัติต้องทราบลักษณะปกติของอสุจิปลาแต่ละชนิดเสียก่อน (ศักดิ์ชัย,2538)

### การเพาะขยายพันธุ์ปลาอุกอุย

การเพาะพันธุ์ปลาอุกอุย ในปัจจุบันนิยมใช้ การฉีดฮอร์โมนกระตุ้น หลังจากนั้นจึงรีดไข่และ น้ำเชื้อมาผสมเทียม (ภาณุและคณะ,2538 อ้างตาม มานพและคณะ,2528 ) วิธีที่เหมาะสมในการผสมเทียมปลาอุกอุย คือ วิธีแห้งแบบดัดแปลง (Modified Dry method) คือนำอสุจิผสมกับไข่ในภาชนะแห้งก่อน 1-2 นาที แต่ก่อนนำไปพัก เติมน้ำลงไปเพื่อกระตุ้นให้ไข่ผสมกับน้ำเชื้อ ทั้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออก เติมน้ำใหม่ และนำไปพัก (มณีรัตน์,2544 อ้างตาม วีระพงศ์,2536) วิธีนี้มีข้อดีคือ น้ำเชื้อไม่ถูกเจือจางมากไป แม้บางครั้งอาจจะไม่ได้เข้าผสมกับไข่ทันที ก็สามารถว่ายน้ำเข้าไข่ได้ง่าย นอกจากนี้ ยังล้างสิ่งสกปรกที่ติดมากับไข่และน้ำเชื้อได้ ลดปัญหาการขาดออกซิเจนในอุปกรณ์พักไข่ได้ ใช้ได้ดีกับไข่แบบลอย ครึ่งลอยครึ่งจม และจมติดวัตถุ (มณีรัตน์,2544)

### การปฏิสนธิในปลา

ปลาที่ออกลูกเป็นไข่และมีการผสมหรือปฏิสนธิภายนอกตัว เรียกว่า โอวิพารัส (oviparus) ไข่ที่ได้รับการผสม จะใช้อาหารจากถุงไข่แดง (yolk sac) จนกระทั่งอวัยวะต่างๆเจริญครบและฟักออกเป็นตัวอ่อน (larva) พบในปลากระดูกแข็งทั้งไป (สุภาพร,2539) ได้แก่ ปลาอุก ปลาใน ปลาตะเพียน เป็นต้น การปฏิสนธิในปลาแบบนี้ อสุจิจะเข้าสู่ไข่ทางรู micropyle โดยสามารถเข้าได้ที่ละตัวเท่านั้น เนื่องจากรู micropyle มีขนาดเล็กและจะปิดเมื่ออสุจิตัวแรกเข้าสู่ไข่ หลังจากนั้นไข่ปลาจะพัฒนาการแบ่งเซลล์พร้อมกับดูดน้ำเข้าไปแทรกระหว่างผนังเปลือกไข่ เกิดช่องว่างเรียกว่า perivitelline space ทำให้ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น เรียกการดูดน้ำเข้าไปในไข่ว่า water hardening (ศักดิ์ชัย,2538) ไข่ปลาที่แก่ มีความสามารถในการดูดน้ำได้ดีกว่าไข่ที่แก่เกินไปไข่ปลาอุกอุยเมื่อสัมผัสน้ำจะเริ่มเหนียวและติดกับวัตถุ (มณีรัตน์,2544 อ้างตาม อุทัยรัตน์,2538) <sup>ในด้านการค้า</sup>ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ปัจจัยที่มีผลต่อการปฏิสนธิ ได้แก่

### 1. คุณภาพของน้ำเชื้อ

1.1 จำนวนอสุจิต่อไข่ การปฏิสนธิของอสุจิกับไข่จะมีประสิทธิภาพดีถ้าจำนวนอสุจิมีย่ออัตราส่วนเหมาะสมกับจำนวนไข่ ซึ่งปริมาณของอสุจิจะแตกต่างกันไปตามชนิดปลา (มณีรัตน์ 2544 อ้างตาม กิจจาและคณะ 2526) เช่น ปลาใน *Cyprinus carpio* เมื่อนำปริมาณอสุจิสด 1 มิลลิลิตรผสมกับไข่ 1 กรัม มีอัตราปฏิสนธิ 70% แต่เมื่อเพิ่มปริมาตรไข่เป็น 100 กรัม อัตราปฏิสนธิลดลงความสำเร็จของการผสมไข่ปลาในจะลดลงเมื่อใช้ปริมาณอสุจิต่อไข่ลดลงในไข่ดี การผสมเฉลี่ย 81% จากปริมาณอสุจิ  $6 \times 10^4$  ถึง  $2 \times 10^6$  ตัวต่อไข่ 100 ml การผสมเป็น 54% จากการใช้อสุจิ  $8 \times 10^3$  ถึง  $2 \times 10^6$  ตัวต่อไข่ 100 ml ถ้าใช้อสุจิ  $10^3$  ตัวต่อไข่ 100 ml อัตราผสมเท่ากับ 0% ถ้าไข่ไม่ดี อสุจิ  $2 \times 10^6$  ตัวต่อไข่ 100 ml อัตราผสมเป็น 42% การผสมปกติควรใช้อสุจิอย่างน้อย  $6 \times 10^4$  หรือ 300 ไมโครลิตร/100 มิลลิลิตร (เกรียงศักดิ์ 2540 อ้างตาม Fauvel et al., 1991) ส่วนในปลา Rainbow trout; *Salmo gairdneri* ใช้สัดส่วน 5-10  $\times 10^6$  ตัว/ฟองให้อัตราปฏิสนธิ 100% (มณีรัตน์ 2544 อ้างตาม Stoss และ Holtz, 1983) ส่วน Billard et al. (1974) ได้ทดลองใช้ความเข้มข้นอสุจิต่อไข่ต่ำสุดที่ระดับ  $2 \times 10^5$  ตัว/ไข่ได้อัตราปฏิสนธิเป็น 80% ในปลา Rainbow trout แต่ Sequet et al. (1995) สามารถทำให้อัตราปฏิสนธิเพิ่มเป็น 89% เมื่อใช้ความเข้มข้นอสุจิที่  $6 \times 10^3$  ตัว/ไข่ในปลา Rainbow trout (*Scophthalmus maximus*)

เกรียงศักดิ์ (2540) ทดลองหาความหนาแน่นของอสุจิปลาใน โดยเปรียบเทียบระหว่าง 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่มีการฉีดฮอร์โมนจากต่อมใต้สมอง มีปริมาณเซลล์อสุจิเฉลี่ย  $14 \times 10^6$  ล้านเซลล์/ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตรของเหลวทั้งหมดเฉลี่ย 14.2 มล./กก. ปริมาณอสุจิต่อของเหลวมีค่าเฉลี่ย 48% ส่วนกลุ่มที่ไม่ฉีดฮอร์โมน มีปริมาณเซลล์อสุจิเฉลี่ย  $24 \times 10^6$  ล้านเซลล์/ลูกบาศก์เซนติเมตร ปริมาตรของเหลวทั้งหมดเฉลี่ย 2.72 มล./กก. ปริมาณอสุจิต่อของเหลวมีค่าเฉลี่ย 65% ผลของฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองมีผลต่อปริมาตรและความหนาแน่นของอสุจิสดในกลุ่มที่ฉีดฮอร์โมนมีมากกว่ากลุ่มที่ไม่ฉีดแต่ฮอร์โมนมีผลแค่ทำให้เกิดของเหลวในพลาสมาปริมาณน้ำเชื้อได้ง่ายขึ้นแต่ไม่ทำให้เกิดการสร้างจำนวนอสุจิเพิ่ม ชนิกา (2542) ได้ทดลองในปลาดุกอุยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ 80% ในความเข้มข้นอสุจิ  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  และ  $10 \times 10^4$  ตัว/ฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิคือ 64.58, 69.50, 73.17 และ 86.33% ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) อัตราการปฏิสนธิที่ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ  $10 \times 10^4$  ตัว/ฟอง มีค่าสูงที่สุด คือ 86.33%

มณีรัตน์ (2544) ได้ทดลอง ปลาดุกกรัสเซียมีอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ 90% ในความเข้มข้นของน้ำเชื้อ  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  และ  $10 \times 10^4$  ตัว/ฟอง มีอัตราการปฏิสนธิไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับไขปลาตุ๋นคือ 43.84, 49.69, 50.02 และ 46.59% ตามลำดับซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) อัตราการปฏิสนธิที่ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ  $8 \times 10^4$  ตัว/ฟอง มีค่าสูงที่สุด คือ 50.02% อย่างไรก็ตาม ปลาตุ๋นแช่แข็งยังมีอัตราปฏิสนธิต่ำกว่าปลาตุ๋นที่ใช้ความเข้มข้นน้ำเชื้อ  $4 \times 10^4$  ตัว/ฟองมีอัตราปฏิสนธิ 64.58% ปลาในที่ใช้ น้ำเชื้อความเข้มข้น  $4 \times 10^4$  ตัว/ฟองมีอัตราการปฏิสนธิ 66.54% ซึ่งพบว่า อัตราปฏิสนธิสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของอสุจิ (ชนิกา, 2542) อัตราการปฏิสนธิของปลาตุ๋นมีค่าอยู่ในช่วง  $68.3 \pm 3.6\%$  และปลาตุ๋นมีอัตราการฟัก 50-70% (กฤษณ์, 2536 อ้างตามตามชนิกา, 2542) Fermin et al. (1999) พบว่า อัตราการปฏิสนธิในปลาตุ๋น Asian catfish (*clarias macrocephalus*) มีอัตราการปฏิสนธิสูง

อัตราส่วนอสุจิต่อไข่ที่ต้องการให้อัตราปฏิสนธิสูงที่สุดในปลาหลายสายพันธุ์ Bichler (1882) และ Billard (1978) แนะนำ ให้ใช้ความเข้มข้นอสุจิที่  $10 \times 10^6$  และ  $12 \times 10^6$  ตัว/ไข่ ตามลำดับในปลาตระกูล Salmonids ในขณะที่ Stoss และ Holtz (1981), Wheeler และ Thorgaard (1991), Billard et al. (1974), Rana และ McAndrew (1989) แนะนำให้ใช้ระดับความเข้มข้นอสุจิที่  $3 \times 10^6$ ,  $7.6 \times 10^5$ ,  $2 \times 10^5$  ตัว/ไข่ ในปลาตระกูลแซลมอน และระดับความเข้มข้นอสุจิต่อไข่ที่  $1.4 \times 10^5$  ตัว/ไข่ 500 ฟอง ในตระกูลปลานิลมีอัตราปฏิสนธิเป็น 93% ตามลำดับ แต่อัตราส่วนอสุจิต่อไข่ดังกล่าวยังไม่เป็นที่ยอมรับในปลาตุ๋น และ ปลา Blue catfish ซึ่งอัตราส่วนดังกล่าวสอดคล้องกับรายงานของ Ginzberg (1972), Hourston และ Rosenthal, (1976) ที่ได้แนะนำอัตราปฏิสนธิสูงที่สุดเมื่อให้ความหนาแน่นของอสุจิที่  $10^5 - 10^6$  ตัว/มิลลิลิตร ซึ่งการระบุอัตราส่วนอสุจิต่อไข่ที่เหมาะสมกับผลผลิตที่ต้องการ เพื่อเป็นการลดจำนวนเพศผู้ที่ต้องสูญเสียไปในการผสมเทียมแต่ละครั้ง

Bart และ Duham (1995) ได้ทำการทดลองถึงผลของความเข้มข้นของอสุจิ และจำนวนของไข่ ต่ออัตราปฏิสนธิในปลาตุ๋น channel catfish (*Ictalurus punctatus*) และปลา Blue catfish (*I. furcatus*) โดยได้ทดลองที่ระดับความเข้มข้นของอสุจิ/ไข่ที่  $5 \times 10^4$  ถึง  $1.2 \times 10^7$  ตัว/ฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิตั้งแต่ 17-87% ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 65% โดยอัตราปฏิสนธิต่ำที่สุด คือ ที่ความเข้มข้นของอสุจิต่อไข่ที่  $5 \times 10^4$  ตัว/ฟอง มีอัตราปฏิสนธิเพียง 16.6% ที่ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า คือที่  $1.2 \times 10^5$  ถึง  $1.2 \times 10^8$  ต่อไข่จำนวน 450, 2,000, 5,000, 8,000 และ 11,000 ฟอง ซึ่งมีอัตราปฏิสนธิในทำนองเดียวกันที่ระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน ซึ่งมีอัตราปฏิสนธิอยู่ระหว่าง 25-67% ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 53% และ ปริมาณไข่มากที่สุด พบว่ามีอัตราปฏิสนธิต่ำสุดที่ ( $P < 0.05$ ) ส่วนชุดที่ไข่จำนวน 450 ฟอง พบว่ามีอัตราปฏิสนธิสูงที่สุด คือ 67-87% ค่าเฉลี่ยอัตราการปฏิสนธิของไขปลาตุ๋น (channel catfish) ที่ความแตกต่างของจำนวนอสุจิที่มีความหลากหลายสูง (ตารางที่ 2 ภาคผนวก) และมีรายงานว่าหน่วยทดลองที่ใช้จำนวนอสุจิ 50,000 ตัวต่อไข่ พบว่ามีอัตราปฏิสนธิต่ำที่สุด เป็น 17% ที่ใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

( $P < 0.05$ ) อย่างไรก็ตาม เมื่อจำนวนอสุจิต่อไข่เพิ่มขึ้นเป็น 125,000 ตัว/ไข่ พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิคิดเป็น 52% และ ที่ระดับความเข้มข้นของอสุจิระหว่าง 125,000 และ 250,000 ตัว/ไข่ พบว่าอัตราการปฏิสนธิไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ ( $P > 0.05$ ) ดังนั้น อัตราปฏิสนธิสูงสุด คิดเป็น 87% เมื่อใช้ความเข้มข้นอสุจิ  $1.2 \times 10^7$  ตัว/ฟอง และ พบว่าที่ระดับอสุจิ  $1.25 \times 10^5$  ถึง  $1.2 \times 10^7$  ตัว/ฟอง ไม่มีความแตกต่างกันที่ ( $P > 0.05$ )

นอกจากความเข้มข้นของอสุจิแล้ว จำนวนไข่ที่ใช้ในการผสมก็มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ อัตราปฏิสนธิต่ำที่สุด เป็น 25% ที่ ( $P < 0.05$ ) เมื่อใช้ไข่ 11,000 ฟอง และ อัตราปฏิสนธิสูงที่สุด เป็น 67% เมื่อใช้ไข่ 450 ฟอง แต่ไม่มีความแตกต่างของอัตราการปฏิสนธิเมื่อใช้ไข่จำนวน 2,000 , 5,000 และ 8,000 ฟองที่ ( $P > 0.05$ ) (ตารางที่ 2 ภาคผนวก) Alderson และ MacNeil (1984) ได้รายงานชุดการทดลองที่ใช้ไข่จำนวน 300 – 400 ฟองในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) พบว่า มีอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด คือ 90% ซึ่งสูงมากกว่าชุดที่ใช้ไข่ 3,000-5,000 ฟอง คิดเป็น 25-58% จากอสุจิแช่แข็ง สอดคล้องกับการทดลองของ Bart และ Duham (1995) ซึ่งทำการทดลองอัตราปฏิสนธิในปลาดุก channel catfish (*Ictalurus punctatus*) และปลา Blue catfish (*I. furcatus*) โดยใช้ไข่จำนวน 450 , 2,000 , 5,000 , 8,000 และ 11,000 ฟองที่ระดับความเข้มข้นของอสุจิ/ไข่ที่  $1.2 \times 10^5$  ถึง  $1.2 \times 10^7$  ตัวต่อฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิตั้งแต่ อัตราปฏิสนธิอยู่ระหว่าง 25-67% ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 53% และ ปริมาณไข่มากที่สุด พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิต่ำสุดที่ ( $P < 0.05$ ) และพบว่า ชุดที่ไข่จำนวน 450 ฟอง ซึ่งมีอัตราการปฏิสนธิมีอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด คือ 67-87% ส่วนหน่วยทดลองที่ใช้จำนวนอสุจิ 50,000 ตัวต่อไข่ พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิต่ำที่สุด เป็น 17% ที่ ( $P < 0.05$ ) แสดงว่า ยิ่งมีปริมาณสูงอัตราการฟักจะลดน้อยลง

#### 1.2 การเคลื่อนไหวของอสุจิ โดยการวัดเป็นเปอร์เซ็นต์จากการตรวจสอบ

หาจำนวนอสุจิที่มีการเคลื่อนไหว ที่มีความสามารถจะเข้าไปผสมกับไข่ ได้ เช่นการประเมินการเคลื่อนไหวของอสุจิได้ 90% จะหมายถึง มีอสุจิจำนวน 90 ตัว จาก 100 ตัวที่สามารถเข้าผสมกับไข่ได้ (ชนิกา, 2542 อ้างตามวิทย์, 2521) ศักดิ์ชัย (2538) อสุจิปลาเมื่ออยู่ใน seminal fluid และเมื่อรีดได้จะไม่เคลื่อนไหว แต่เมื่ออยู่ในน้ำจะปราดเปรียว เซลล์อสุจิที่ได้รับการกระตุ้นแล้วจะมีชีวิตอยู่ได้ไม่นานมีอัตราเร็วและระยะเวลาในการเคลื่อนไหวแตกต่างกันไปตามชนิดปลา ทศนีย์ และคณะ (2529) จากการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาน้ำจืดแช่แข็งไว้ 4 เดือนยังคงมีอัตราการเคลื่อนไหวในระดับ 4-5 และตัวอสุจิที่เคลื่อนไหวได้มีถึง 55-60% ปลาดุกอุยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ 80% (ชนิกา, 2542) มณีรัตน์ (2544) ปลาดุกรัสเซียมีอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิที่ 90% ศักดิ์ชัย และสมศักดิ์ (2544) รายงานการทดลองหาอัตราการปฏิสนธิในปลาตะเพียนขาว ปลานิลและปลาดุกอุย โดยใช้น้ำเชื้อที่มีอัตราการเคลื่อนไหว 90, 90 และ 80% ตามลำดับที่ระดับความเข้มข้นอสุจิต่อไข่  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  และ  $10 \times 10^4$  ตัวต่อฟอง พบว่า ขั้นตอนการคำนวณว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราปฏิสนธิในปลาตะเพียนขาวและในปลาดุกอุยที่ทุกระดับความเข้มข้น มีความแตกต่างกัน อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนในปลาไน ความเข้มข้นของอสุจิมิผลต่อการปฏิสนธิ แต่ที่ความเข้มข้นอสุจิที่สูงกว่า $6 \times 10^4$  ตัวต่อฟองให้อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน Lahnsteiner et al.,(1996) กล่าวว่า การเคลื่อนที่ของอสุจิ, เปอร์เซนต์การเคลื่อนไหว และ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่มีความสำคัญต่อคุณภาพพอสูจิ

ส่วน Fermin et.al., (1999) ได้ทำการทดลอง ศึกษาผลจากการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของอสุจิในปลาดุกอุย (Asian catfish, *Clarias macrocephalus*; Gunther) พบว่า อัตราปฏิสนธิสูงเป็น 89–94% เมื่อกระตุ้นด้วย 0.06% NaCl (198.24mOsm/kg) และเจือจางน้ำเชื้อที่ 10  $\mu$ m โดยเจือจางด้วย 1,000 $\mu$ m ASP ผสมกับไข่ 5 และ 10 กรัม พบว่าสามารถนำไปใช้ในการเพิ่มอัตราปฏิสนธิและผลผลิตลูกปลาดุกอุยในโรงเพาะฟักได้อย่างมีประสิทธิภาพ ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิปลาและอัตราปฏิสนธิ มีดังนี้

1.2.1 ผลของ pH ต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ การใช้ pH ของ ASP ที่ต่างกัน โดยทดลองในอสุจิปลา catfish ที่ pH (7.0, 7.4, 7.8, 8.2, 8.6, 9.0 และ 9.4) พบว่ามีความสัมพันธ์ของเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของอสุจิสูง ในสารละลาย ASP solution ที่ pH 6.4–9.0 (มีการเคลื่อนที่ 50–75%) มากกว่าที่ pH 9.4 (มีการเคลื่อนที่ 25–50%) และระยะเวลาที่เคลื่อนที่สัมพันธ์กับเวลา ในการใช้สารละลาย ASP solution ที่ pH 6.4 (ใช้เวลา 3.9 นาที) และที่ pH 7.8 (ใช้เวลา 2.73 นาที) ซึ่งที่ pH ทั้งสองใช้เวลามากกว่า pH อื่นๆ ที่ทดลอง  
หมายเหตุ ASP solution ย่อมาจาก Artificial seminal plasma หรือ ของเหลวที่พัฒนาขึ้นมาเพื่อการเจือจางน้ำเชื้อ

1.2.2 ผลของอัตราส่วนการเจือจางน้ำเชื้อต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิ ในปลา *Clarias macrocephalus* โดยทดลองใช้อัตราส่วนเจือจางที่ 1:100, 1:200, 1:300, 1:400, 1:500 และ 1:1000 ที่ 25 องศาเซลเซียส พบว่า อสุจิปลา catfish ประมาณ 50–75% มีการเคลื่อนที่คล่องแคล่วในน้ำเมื่อทำการเจือจางน้ำเชื้อที่ 1:100, 1:200 เคลื่อนที่ 2.2 และ 1.9 นาที ตามลำดับ ส่วนการเจือจางที่อัตราส่วน 1:300 ถึง 1:1000 พบว่าส่วนมาก 90% อสุจิปลา catfish มีอัตราการเคลื่อนที่น้อยมากเคลื่อนที่ได้เพียง 10% หรือน้อยกว่านี้ที่เวลา 0.14–0.16 นาที

1.2.3 ผลของการเจือจางน้ำเชื้อต่ออัตราปฏิสนธิและอัตราการฟักเมื่อทำการเจือจางน้ำเชื้อที่ 1:10, 1:50 และ 1:100 ต่อไข่ 5 และ 10 กรัม (ตารางที่ 3 ภาคผนวก) พบว่า ที่ ( $p < 0.01$ ) อัตราการปฏิสนธิของไข่ปลา catfish ไม่มีความแตกต่างของไข่ทั้งสองกลุ่ม (5 และ 10 กรัม) แต่อัตราการฟักจะสูงมากเมื่อใช้ไข่ในกลุ่ม 5 กรัม (ปริมาณน้อย) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Bart และ Duham (1995) ที่ทดลอง ในปลา Blue catfish พบว่า ในกลุ่มทดลองที่ใช้ไข่ปริมาณมากอัตราปฏิสนธิจะน้อยลง ซึ่งสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ Baulny et al. (1999) ได้ทดลองประเมินการเคลื่อนไหวน้ำของอสุจิที่ถูกแช่แข็ง หลังจากทำการละลายและเจือจาง น้ำเชื้อปลาจาก European catfish พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เมื่อแช่แข็งด้วย DMA มีการเคลื่อนที่ของอสุจิ 60% หลังทำการละลาย เมื่อเทียบกับก่อนทำการแช่แข็งซึ่งมีการเคลื่อนที่ 90% อสุจิที่มีเนื้อเยื่อปกติไม่แปรสภาพหลังการแช่แข็งมี 30-90% การแช่แข็งที่ดีที่สุดเมื่อเก็บรักษาด้วย DMA; dimethylacetamide (10 และ 15%) และ methanol (10 และ 15%) ที่แนะนำให้แช่แข็งและมีอัตราการเคลื่อนที่สูงสุดด้วย โดยเวลาที่เคลื่อนที่หลังจากเก็บน้ำเชื้อสด 45 วินาที ไม่เปลี่ยนแปลงหลังจากทำการละลายด้วย DMA หรือ Methanol ซึ่งสอดคล้องกับ Viveiros et al. (2000) ที่แนะนำให้แช่แข็งอสุจิปลา American catfish โดยใช้ DMA หรือ Methanol แต่ Chen et al. (2004) แนะนำการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลา Turbot (*Scophthalmus maximus*) มีประสิทธิภาพมากที่สุดเมื่อเก็บรักษาใน 10% DMSO; dimethyl sulfoxide มีอัตราการปฏิสนธิ ( $70.1 \pm 8.9\%$ ) และอัตราการฟัก ( $46.8 \pm 5.2\%$ ) ซึ่งไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสดที่คืออัตราการปฏิสนธิ ( $74.7 \pm 8.0\%$ ) และอัตราการฟัก ( $47.5 \pm 6.8\%$ ) สอดคล้องกับคำแนะนำของ Alvarez et al. (2003) ที่ว่า การใช้ 10% DMSO ในการเก็บรักษาอสุจิปลาแช่แข็งในปลา Silver carp เหมาะสมมากกว่า การใช้ methanol หรือ glycerol โดย การใช้ 10% DMSO มีอัตราการเคลื่อนที่ที่ดีที่สุดหลังการละลายน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตาม อสุจิของปลา Branchydanio rerio พบว่ามีประสิทธิภาพการเก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งโดยใช้ methanol (Alvarez et al., 2003 อ้างตาม Harvey et al., 1982) สอดคล้องกับ Viveiros et al. (2000) ที่แนะนำว่า methanol เหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งในปลา Zebra fish และเก็บรักษาได้ดีที่สุดในปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) และ glycerol มีความเป็นพิษต่ออสุจิของปลา Salmonid จึงควรใช้ DMSO ในการเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง และ Alvarez et al. (2003) ยังได้รายงานเพิ่มเติมว่า นอกจาก DMSO จะเหมาะสมที่จะใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งในปลา *C. chalcoides* ส่วน glycerol, N-N-dimethyl acetamide และ 1,2-propanediol มีความเป็นพิษต่ออสุจิปลาก่อนการแช่แข็ง และ methanol และ ethylene glycol ไม่มีความเป็นพิษแต่กลับให้ผลล้มเหลวในการป้องกันรักษาเซลล์อสุจีก่อนการแช่แข็งและการละลาย

อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อปลา ในปลา *H. molitrix* ทำการละลายที่ 30 องศาเซลเซียส ส่วนปลา Cyprinid มีความหลากหลายของอุณหภูมิที่ใช้ โดยในปลา *C. carpio* ใช้ที่ 30 หรือ 40 องศาเซลเซียส และ *C. chalcoides* ใช้ 25 องศาเซลเซียส ในการละลายน้ำเชื้อปลา (Alvarez et al., 2003 อ้างตาม Babiak et al., 1995; Aagyaryal., 1996; Lahnsteiner et al., 2000)

จากการทดลอง Baulny et al. (1999) จะเห็นว่า อสุจิมีการสูญเสียพลังงาน ATP ไประหว่างที่อสุจิปลาเคลื่อนที่ทั้งระหว่างทำการแช่แข็งและละลาย โดยพบว่าการใช้ DMA ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุก European catfish เป็นวิธีที่ดีที่สุด โดยมีการเพิ่มขึ้นของระดับพลังงานในตัวอสุจิ (เสียพลังงานน้อยลง) ในกรณีปลาดุก Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) พบว่า DMA มีความเป็นพิษมากกว่าและประสิทธิภาพน้อยกว่า methanol มาก และจากการทดลองของ Lahnsteiner et al. (2003) การปฏิสนธิของไข่ปลา Cyprinid ที่ใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง โดยวิธีการผสมเทียมแบบเปียกมีอัตราการฟักต่ำมากและหยุดพัฒนาหลังระยะ molular พบว่ามีความผิดปกติอาจเกิดจากการที่มีน้ำปนไปในขณะที่ทำการแช่แข็งทำให้เซลล์อสุจิถูกทำลาย เป็นสาเหตุให้อัตราปฏิสนธิลดลง และตัวกลางที่ใช้ในการเจือจางมีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่จะส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

### 1.3 อายุของอสุจิ

Viveiros et al. (2000) แนะนำให้เก็บรักษาอสุจิแช่แข็งที่  $-196$  องศาเซลเซียสในไนโตรเจนเหลว ( $LN_2$ ) พบว่ามี อัตราการปฏิสนธิที่ดีในปลา catfish , American catfish (*Clarias gariepinus*) โดย สามารถเก็บได้นานถึง 6 สัปดาห์ และ 16 เดือน (1ปี 4เดือน) และจากการทดลองของ Steyn และ VanVuren (1987) พบว่า ปลาดุก African catfish (*H. longifilis*) สามารถใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ 8 เดือน มีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับน้ำเชื้อสด ส่วนในปลาดุก channel catfish สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยการแช่แข็งได้นาน 13 เดือน และชนิก (2542) อ้างตาม Kurokura et al. (1984) รายงานว่า จากการทดลองผสมพันธุ์ปลาใน *Cyprinus carpio* โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งอายุ 342 วัน ผสมกับไข่ในสัดส่วน ไข่ 5 กรัมต่อน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร และใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่ 0, 1, 5 และ 10 นาที ที่เก็บในสารละลาย DMSO เปรียบเทียบกับ DMSO+BSA 5 มิลลิลิตรต่อลิตร พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 นาที อัตราการปฏิสนธิลดลงโดยในสารละลาย DMSO อัตราปฏิสนธิลดลงจาก 80% เหลือเพียง 40% ส่วนสารละลาย DMSO+BSA อัตราปฏิสนธิลดลงจาก 75% เหลือเพียง 60% และที่ 8 นาที อัตราปฏิสนธิต่ำกว่า 5% ทั้ง 2 สารละลาย ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า หลังจากการละลายน้ำเชื้อแล้วเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นอัตราการปฏิสนธิจะลดลง

## 2. คุณภาพของไข่

จากการทดลองศึกษาอัตราการผสมของไข่ปลาใน พบว่าไข่ดีมีอัตราการผสมติดเฉลี่ยดีกว่าไข่ปลาที่ไม่ดี (เกรียงศักดิ์, 2540 อ้างตาม Fauvel et al., 1991) อัตราการปฏิสนธิในปลาดุกรัสเซียและปลาดุกอุยมีค่าสูงสุดเพียง 50.02% น่าจะเกิดจากคุณสมบัติของไข่ที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการผสมเทียม เนื่องจากเป็นไข่ที่ยังไม่สุกเต็มที่และบางส่วนเกาะกันเป็นแพจึงไม่เกิดการปฏิสนธิได้ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(มณีรัตน์,2544) หรือไข่อาจแก่เกินไป คือไม่รอดเมื่อไข่สุกไข่อาจจะแก่เกินไปจนเสียและไม่สามารถผสมได้ (มณีรัตน์,2544อ้างตามอุทัยรัตน์ ,2531)

คุณภาพของไข่ที่มีผลต่อความสำเร็จในการปฏิสนธิ หรือ fertilization success โดยที่ Suquet และ Billard et al. (1995) ได้ทดลอง ในปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) ใช้ชุดที่ไข่คุณภาพสูง (ค่าเฉลี่ยความสามารถ 89.6%) พบว่า อัตราส่วน FS สูงที่สุดเมื่อ อสุจิที่  $6 \times 10^3$  ตัว/ฟอง (58.4-93.9%) ส่วนในอัตราส่วนต่ำที่สุด FS ลดลงและมีความผันแปรสูง และในชุดที่ใช้ไข่คุณภาพต่ำ (ค่าเฉลี่ยความสามารถ 72 -75.9%) เมื่ออัตราส่วนของอสุจิต่อไข่สูง FS มีความผันแปรสูง และอัตราส่วนที่  $1.5 \times 10^3$  ตัว/ฟอง (27.6 - 89.9%) พบว่า FS สูงที่สุด ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของระยะเวลาระหว่างการแพร่กระจายและการเข้ารวมกันของเซลล์สืบพันธุ์ ส่วนใหญ่ภายหลังการผสม 2-3 นาที สำหรับ อัตราส่วนอสุจิต่อไข่ที่  $6 \times 10^3$  ตัว/ฟอง มี FS สูงที่สุด หลังการเข้ารวมกันของเซลล์สืบพันธุ์ 1 นาที ในการผลิตเพื่อการค้า อัตราส่วนอสุจิที่ใช้น้อยที่สุด คือ ที่  $6 \times 10^3$  ตัว/ฟอง และระยะเวลาที่ใช้ในการรวมตัวกันของเซลล์สืบพันธุ์ คือ 3 นาที สำหรับการใช้น้ำเชื่อมผสมเทียมกับไข่ปลา turbot

## 2.1 จำนวนไข่ต่ออสุจิที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ

นอกจากความเข้มข้นของอสุจิและคุณภาพไข่ที่ดีแล้ว จำนวนไข่ที่ใช้ในการผสมก็มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ Bart และ Duham (1995) ได้ทำการทดลองถึงผลของความเข้มข้นของอสุจิและจำนวนของไข่ ต่ออัตราปฏิสนธิในปลาดุก channel catfish (*Ictalurus punctatus*) และปลา Blue catfish (*I. furcatus*) โดยได้ทดลองที่ระดับความเข้มข้นของอสุจิ/ไข่ที่  $5 \times 10^4$  ถึง  $1.2 \times 10^7$  ตัว/ฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิตั้งแต่ 17-87% ซึ่งมีค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 65% โดยอัตราปฏิสนธิต่ำที่สุด คือ ที่ความเข้มข้นของอสุจิต่อไข่ที่  $5 \times 10^4$  ตัว/ฟอง มีอัตราปฏิสนธิเพียง 16.6% ที่ ( $P < 0.05$ ) ซึ่งมีค่าต่ำกว่าที่ระดับความเข้มข้นที่สูงกว่า คือที่  $1.2 \times 10^5$  ถึง  $1.2 \times 10^6$  ต่อ อัตราปฏิสนธิต่ำที่สุด เป็น 25% ที่ ( $P < 0.05$ ) เมื่อใช้ไข่ 11,000 ฟอง และอัตราปฏิสนธิสูงที่สุด เป็น 67% เมื่อใช้ไข่ 450 ฟอง แต่ไม่มีความแตกต่างของอัตราปฏิสนธิเมื่อใช้ไข่จำนวน 2,000 , 5,000 และ 8,000 ฟองที่ ( $P > 0.05$ ) (ตารางที่ 2 ภาคผนวก) Alderson และ MacNeil (1984) ได้รายงานชุดการทดลองที่ไข่จำนวน 300 -400 ฟองในปลา Atlantic salmon (*Salmo salar*) พบว่า มีอัตราปฏิสนธิสูงที่สุด คือ 90% ซึ่งสูงมากกว่าชุดที่ไข่ไข่ 3,000-5,000 ฟอง คิดเป็น 25-58% จากอสุจิแช่แข็ง สอดคล้องกับการทดลองของ Bart และ Duham (1995) ซึ่งทำการทดลอง อัตราปฏิสนธิในปลาดุก channel catfish (*Ictalurus punctatus*) และปลา Blue catfish (*I. furcatus*) โดยใช้ไข่จำนวน 450 , 2,000 , 5,000 , 8,000 และ 11,000 ฟองที่ระดับความเข้มข้นของอสุจิ/ไข่ที่  $1.2 \times 10^5$  ถึง  $1.2 \times 10^6$  ตัวต่อฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิตั้งแต่ อัตรา

ปฏิสนธิอยู่ระหว่าง 25-67% ค่าเฉลี่ยอยู่ที่ 53%และ ปริมาณไข่มากที่สุด พบว่ามีอัตราปฏิสนธิต่ำสุดที่ ( $P<0.05$ ) และพบว่า ชุดที่ไข่จำนวน 450 ฟอง ซึ่งมีอัตราปฏิสนธิมีอัตราปฏิสนธิสูงที่สุดคือ 67-87% ส่วนหน่วยทดลองที่ใช้จำนวนอสุจิ 50,000 ตัวต่อไข่ พบว่ามีอัตราปฏิสนธิต่ำที่สุดเป็น 17% ที่ ( $P<0.05$ ) อย่างไรก็ตาม ยังไข่มิมีปริมาณสูงอัตราการฟักจะลดน้อยลง

สูตรคำนวณอัตราปฏิสนธิและอัตราฟัก (Unuma and Kondo et.al., 2004)

$$\text{อัตราการปฏิสนธิ (Fertilization rate)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ได้รับการผสมกับอสุจิ} \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมดที่ใช้ผสมกับอสุจิ}}$$

$$\text{อัตราการฟักเป็นตัว (Hatching rate)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ฟักเป็นตัวอ่อน} \times 100}{\text{จำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ}}$$

หรือ สูตรอัตราการฟักเป็นตัวของ Silva et al. (2003)

$$\text{อัตราการฟัก(H)} = \frac{(\text{จำนวนไข่ที่ฟัก} - \text{จำนวนไข่เสีย}) \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}}$$

### 3. ตัวกลางที่ใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อ

ถ้าตัวกลางมีความเข้มข้นไม่เท่ากับความเข้มข้นของอสุจิ จะเป็นกากระตุ้นให้อสุจิเกิดการเคลื่อนไหวและตายน้อยลง (ชนิกา,2542 อ้างตาม Kurokura et.al.,1984) นอกจากนี้การเจือจางน้ำเชื้อยังส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติอื่นๆ เช่น pH โดยการเจือจางน้ำเชื้อในปลา rainbow trout;*Salmo gairdneri* ทำให้ pHเพิ่มขึ้นและจากการศึกษาถึงผลของ pHที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากการเจือจางต่ออัตราการปฏิสนธิพบว่า ช่วงpH5.5-7 มีอัตราการปฏิสนธิต่ำ และจะมีอัตราการปฏิสนธิมากขึ้นเมื่อ pHสูงขึ้น แต่พบว่าที่ pH7-8 มีการลดลงของอัตราการปฏิสนธิซึ่งไม่สามารถอธิบายได้ และที่ pH 8.5การลดลงของอัตราการปฏิสนธิต่ำมากไม่สามารถอธิบายได้เช่นกัน (ชนิกา,2542 อ้างตาม Stoss and Holtz.,1981) การศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

#### 4. วิธีการที่ใช้ในการผสมเทียม

เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่ออัตราการปฏิสนธิ โดย Dunham et al. (1995) ได้ทำการทดลองวิธีผสมพันธุ์ปลาตุ๊กตุ๊กทั้ง 3 แบบ (ชนิกา, 2544) ดังนี้

4.1 Drip method โดยนำไข่ที่อยู่ใน Hank's solution มาใส่ในชามแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร ที่บรรจุน้ำอยู่สูง 5-7 เซนติเมตร ให้ไข่เรียงกันเป็นชั้นที่ 1 แล้วหยดน้ำเชื้อลงไปเล็กน้อย แล้วเทไข่ลงไปในชามให้เกิดเป็นไข่ชั้นที่ 2 แล้วหยดน้ำเชื้อลงไปทำอย่างนี้ไปเรื่อยๆจนเป็นไปตามต้องการจึงนำไปฟัก

4.2 Mix method จะใช้ Hank's solution ในการยัดอายุไข่และน้ำเชื้อและป้องกันไม่ให้ไข่ติดภาชนะ การผสมทำโดยผสมน้ำเชื้อกับ Hank's solution ส่วนไข่จะรีดลงใน Hank's solution จากนั้นก็เอาน้ำเชื้อผสมกับไข่ แล้วเติมน้ำลงไป 3-4 เท่าของปริมาณไข่ด้วยการเทน้ำลงไปช้าๆ แล้วตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที โดยไม่มีการเขย่า แต่ถ้ามีไข่ปริมาณมากให้เขย่าเบาๆ

4.3 Decanted method ทำโดยรีดน้ำเชื้อสดจากอวัยวะผสมลงในไข่ที่อยู่ใน Hank's solution แล้วเติมน้ำลงไป 3-4 เท่าของปริมาณไข่

จากการทดลองนี้ สรุปว่า Mix method และ Decanted method มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกันแต่ให้ผลดีกว่า Drip method (ชนิกา, 2544)

#### ขั้นตอนการพัฒนาคัพภะของปลาตุ๊กตุ๊ก

ภานูและคณะ (2538) การพัฒนาคัพภะของปลาตุ๊กตุ๊ก เริ่มตั้งแต่ไข่ได้รับการผสมกับน้ำเชื้อจนกระทั่งฟักออกเป็นตัว จากการศึกษาพบว่า ไข่ปลาตุ๊กตุ๊กมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.66 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 29-32 องศาเซลเซียส จึงฟักออกจากไข่ใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง 20 นาที ขั้นตอนการพัฒนาคัพภะของปลาตุ๊กตุ๊ก มีดังนี้

1. Cleavage stage เป็นระยะแรกของการพัฒนาคัพภะ เกิดการแบ่งเซลล์แบบ mitosis เพิ่มจำนวนเซลล์โดยจะเกิดขึ้นเฉพาะบริเวณ animal pole การแบ่งเซลล์ในระยะนี้ไม่มีการสังเคราะห์โปรตีน ดังนั้นในขณะที่มีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นขนาดเซลล์จะลดลงเรื่อยๆ เรียกแต่ละเซลล์ว่า blastomere เมื่อสิ้นสุดระยะนี้ได้คัพภะอยู่ในระยะ morula ซึ่งกลุ่มเซลล์นี้มีลักษณะคล้ายจานกลมอยู่บนเนื้อ yolk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Blastula stage ภายใต้นี้กลุ่มเซลล์ blastomere หรือที่เรียกว่า blastoderm (blastodisc) มีการจัดตัวเป็น blastoderm ชั้นบน และ blastoderm ที่อยู่ติดกับส่วน yolk เรียกว่าชั้น periblast ทำให้เกิดช่องว่างภายในคัพภะ เรียกช่องว่างนี้ว่า blastocoel ในระยะนี้ ยังคงมีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนอยู่ และ blastoderm เริ่มเคลื่อนลงมาคลุม yolk

3. Gastrula stage ในระยะนี้ขอบของ blastoderm หนาขึ้นโดยรอบ เกิดเป็นลักษณะคล้ายวงแหวนล้อมรอบ yolk เรียกว่า germ ring blastoderm มีการม้วนตัวเข้าไปใน blastocoel ทาง blastopore และในระยะนี้เกิด embryonic shield ซึ่งเป็นบริเวณที่จะเป็นหางของคัพภะ โดยบริเวณนี้มีเซลล์รวมกันหนาแน่นเหนือ germ ring นอกจากนี้ ในขณะที่ blastoderm มีการม้วนตัวก็มีการขยายตัวของ blastoderm ลงมาคลุมจนกระทั่งส่วนของ yolk ถูกคลุมเกือบหมด เหลือเพียงบริเวณแคบๆ เท่านั้น เรียกบริเวณนั้นว่า yolk plug และสิ้นสุดระยะนี้เมื่อ blastopore ปิด

4. Early embryo เป็นระยะตัวอ่อนระยะแรกๆ ตัวอ่อนมีพัฒนาเกิดการคอดที่บริเวณส่วนหัวและหาง มีการกำเนิด neural tube ช่องทางเดินอาหาร somite และมีการพัฒนาของอวัยวะต่างๆ เช่นสมอง และ optic vesicle เป็นต้น

5. Late embryo ในระยะนี้ตัวอ่อนมีการพัฒนารูปร่างและอวัยวะ หัวใจเริ่มทำงาน ตัวอ่อนมีการเคลื่อนไหวพร้อมที่จะออกจากไข่

6. Embryo เป็นระยะที่ลูกปลามีพัฒนาการขั้นสุดท้าย ลูกปลามีถุงไข่แดง (yolk sac) ชัดเจนส่วนของหางแยกเป็นอิสระจากถุงไข่แดงสามารถว่ายน้ำได้ทันที

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการฟักเป็นตัวของไข่ปลา (สุภาพร, 2539) มีดังนี้

1. อุณหภูมิ อุณหภูมิของน้ำมีความสำคัญมากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิมักอาจทำให้ไข่ฝ่อและฟักเป็นตัวไม่ได้ โดยปกติน้ำที่มีอุณหภูมิสูงขึ้นทำให้ไข่ฟักออกเป็นตัวเร็วกว่าปกติ แต่ถ้าเร็วเกินไปลูกปลาอาจไม่แข็งแรงอดตาย ถ้าอุณหภูมิลดต่ำลง การฟักจะใช้เวลานานขึ้น ในการเพาะเลี้ยงจึงควรเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิช้าๆ เช่น การทดลองในปลาเทราต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาฟาเรนไฮน์ ระยะเวลาในการฟักเป็น 165 ชั่วโมง , อุณหภูมิ 41 องศาฟาเรนไฮน์ ระยะเวลาในการฟักเป็น 103 ชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 50 องศาฟาเรนไฮน์ ระยะเวลาในการฟักเป็น 47 ชั่วโมง (สุภาพร, 2539)

2. แสงสว่าง ไข่ปลาที่ฟักตัวในที่มีดีใช้เวลานานกว่าในที่สว่าง

3. คุณภาพน้ำ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1 ความเค็ม ถ้าความเค็มไม่เหมาะสมไซปลาจะไม่ฟักตัว ถ้าความเค็มเปลี่ยนแปลงขณะไซปลากำลังฟักตัว การเจริญของไซปลาอาจหยุดชะงักและตายในที่สุด

3.2 ก๊าซที่ละลายในน้ำ ออกซิเจนมีความสำคัญต่อการพัฒนาการของไซปลา ในปริมาณที่เหมาะสม คือ 4-12ppm ถ้าน้อยกว่านี้อัตราการฟักจะต่ำ อัตราการตายสูง เช่น แอมโมเนีย มากเกินไปไซปลาอาจหยุดฟักและตาย

3.3 ความเป็นกรดและด่างของน้ำ (pH) โดย จิรัชัยและคณะ (2543) ศึกษาผลของความเป็นกรดของน้ำต่ออัตราการฟักไซปลาในปลาดุก พบว่าที่ความเป็นกรด-ด่างต่ำสุดสำหรับการฟักไซปลาดุกคือ pH 5.2 และอัตราการฟักในปลาดุกเป็น 0% ที่ระดับ pH  $\leq 4.6$  และอัตราการฟักเป็น 0% ในปลาดุกเทศเมื่อน้ำมี pH  $\leq 4.5$  และพบว่า เมื่อ pH เพิ่มขึ้นจะมีอัตราการฟักไซปลาเพิ่มขึ้นจนถึงระดับ pH 5.2 จะพบว่าอัตราการฟักไซปลาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กับกลุ่มควบคุม ดังนั้นระดับ pH 5.2 จึงเหมาะสมกับการฟักไซปลาดุกเทศ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Keinanen et al. (2003) ที่แนะนำให้ใช้ pH  $> 5.5$  ในปลา Whitefish เพื่อป้องกันความเป็นพิษของ Al ซึ่งสนับสนุนกับบทสรุปของ Peterson et al. (1982) ที่ว่า การปฏิสนธิของปลาหลายสายพันธุ์ส่วนมากล้มเหลวที่ pH  $< 4.0$  และพบว่าที่ pH 5.0 จะไม่มีการลดลงของอัตราการปฏิสนธิเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในปลา Atlantic salmon แต่ในทางตรงกันข้ามอัตราการปฏิสนธิในปลา Whitefish ลดลง

นอกจาก ปัจจัยที่กล่าวมาข้างต้น ความเข้มข้นของไอออนที่สำคัญ อย่างเช่น แคลเซียม ( $Ca^{+}$ ) และ แมกนีเซียม ( $Mg^{+}$ ) ก็เป็นไอออนสำคัญสำหรับปลาน้ำจืด เพราะ ไอออนทั้ง 2 ชนิด สามารถซึมผ่านเนื้อเยื่อผ่านเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตเข้าไปได้ โดย Silva et al. (2003) ได้ศึกษาทดลองหาอัตราการฟักเป็นตัวของไซปลา Silver catfish, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae) ที่ความเข้มข้นของแคลเซียม ( $Ca^{+}$ ) และ แมกนีเซียม ( $Mg^{+}$ ) ที่ต่างกัน โดยใช้ความแตกต่างของ  $Ca^{+}$  และ  $Mg^{+}$  ที่ 70–150 mg/l ที่ 24 องศาเซลเซียส พบว่า ที่ระดับ  $CaCO_3$  ที่ 70 mg/l ทั้ง  $Ca^{+}$  และ  $Mg^{+}$  จะปรับปรุงอัตราการฟักเป็นตัวของไซปลาเพิ่มขึ้น แต่ระดับ  $Ca^{+}$  ที่เพิ่มปริมาณสูงทำให้อัตราการรอดตายหลังการฟักลดลง และการฟักไซปลาในน้ำที่มีปริมาณ  $CaCO_3$  ที่เกิน 150 mg/l ทำให้อัตราการฟักเป็นตัวต่ำและอัตราการรอดตายหลังการฟักลดลงจาก การเพิ่มขึ้นของระดับ  $Ca^{+}$  ที่สูงกว่า 20 mg/l ทำให้เกิดน้ำกระด้างซึ่งไม่เหมาะสมกับการฟักไซปลา Silver catfish.

## อุปกรณ์และวิธีการ

### อุปกรณ์

1. ฟอ-แม่พันธุ์ ปลาอุกอุย ใช้ฟอพันธุ์จำนวน 4 ตัวและ แม่พันธุ์จำนวน 4 ตัว ตามลำดับ
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการผสมเทียม
  - 2.1 ชุดเครื่องมือผ่าตัด และเข็มฉีดยา
  - 2.2 ฮอริโมนผสมเทียม (Motilium และ Suprefect)
  - 2.3 น้ำเกลือ 0.9%
  - 2.4 ผ้าขาวบาง
  - 2.5 กะละมังเคลือบ
  - 2.6 เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดชั่งได้ละเอียด ทศนิยม 4ตำแหน่ง
3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของอสุจิและตรวจสอบการเคลื่อนไหว
  - 3.1 กล้องจุลทรรศน์
  - 3.2 Slide และ Cover slide
  - 3.3 Dilution pipet
  - 3.4 Hemacytometer
  - 3.6 กระจกชลิทมัส
  - 3.7 ตะเกียงแอลกอฮอล์
4. อุปกรณ์ในการตรวจสอบการปฏิสนธิ
  - 4.1 กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำที่สามารถต่อสัญญาณภาพเข้าวงจรโทรทัศน์ได้
  - 4.2 เครื่องมือช่วยบันทึกการนับจำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## วิธีการ

### แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ  $150 \times 10^6$  ตัวต่อไข่ 300 ฟอง หรือ  $50 \times 10^4$  ตัวต่อฟอง

กลุ่มที่ 2 ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ  $300 \times 10^6$  ตัวต่อไข่ 300 ฟอง หรือ  $1 \times 10^5$  ตัวต่อฟอง

กลุ่มที่ 3 ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ  $450 \times 10^6$  ตัวต่อไข่ 300 ฟอง หรือ  $150 \times 10^4$  ตัวต่อฟอง

นำน้ำเชื้อแต่ละกลุ่ม ไปผสมกับไข่ปลาจากแม่ปลา 4 ตัว โดยแต่ละกลุ่มให้อสุจิเข้าปฏิสนธิกับไข่จำนวน 300 ฟอง กลุ่มละ 4 ซ้ำ

### วิธีการทดลอง

#### 1. ขั้นตอนการเตรียมพ่อแม่พันธุ์

ซึ่งนำหนัก และวัดความยาวของปลาอุกอุยเพศผู้และเพศเมียแต่ละตัว ฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ ให้แก่ แม่ปลาอุกอุย 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ใช้ อัตราส่วนของฮอร์โมนสังเคราะห์ suprefect 10 ไมโครกรัมต่อปลา 1kg ผสมกับ motilium 5 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม จากนั้นห่างจากการฉีดครั้งที่แรก เป็นเวลา 6 ชั่วโมงจึงฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 2 แก่พ่อแม่ปลา ซึ่งในการฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 2 ให้แม่ปลา และฉีดฮอร์โมนกระตุ้นความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อให้แก่พ่อปลาอุกอุยเพียงครั้งเดียวโดยฉีดพร้อมกับการฉีดให้แม่ปลาในความเข้มข้นเดียวกันคือใช้ suprefect 10 ไมโครกรัมต่อปลา 1kg ผสมกับ motilium 5 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม แล้วพักไว้ 8 - 11 ชั่วโมงจึงนำมาฉีดไข่

#### 2. ขั้นตอนการเตรียมน้ำเชื้อปลา

##### 2.1 ซึ่งนำหนักและวัดความยาวของพ่อพันธุ์

##### 2.2 ริดน้ำเชื้อปลาอุกอุย ซึ่งนำเขื่อน้อยต้องผ่าเอา testis ออกมา ห่อด้วยผ้ากรองล้าง

เลือดด้วยน้ำเกลือ 0.9% จากนั้นบีบ testis จากพ่อปลาด้วยผ้ากรองใส่ในชามเคลือบ เติมน้ำเกลือ 5 ml นำไปใส่หลอดทดลองขนาด 15 ml จากนั้นเติมน้ำเกลือ 0.9% จนได้ปริมาตร 15 ml

##### 2.3 นับเซลล์อสุจิมีสีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยการย้อมสี (Eosin -Nigrosin) ซึ่ง

ประกอบด้วย Eosin B : 1 กรัม และ Nigrosin : 5 กรัม ละลายในโซเดียมซิเตรตไดไฮเดรต 2.9% ในการย้อมสี ทำได้โดยหยดสีย้อม 1-2 หยด บนแผ่นกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วหยดน้ำเชื้อลงบนสไลด์

ย้อมผสมให้เข้ากัน ใช้แผ่นกระจกสไลด์อีกแผ่นลากให้เกิดฟิล์มบางๆ และทำให้แห้งโดยเร็วโดยใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตะเกียง แอลกอฮอล์ เมื่อนำไปตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าเซลล์อสุจิที่มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม แต่เซลล์อสุจิที่ไม่มีชีวิตจะติดสีย้อม

2.4 ตรวจสอบรูปร่างลักษณะว่าเซลล์อสุจิผิดปกติหรือไม่ นำน้ำเชื้อที่ได้ไปหาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิโดยวิธีการสุ่มของ Suquet et al. (1992) โดยประเมินด้วยกล้อง phase contrast จากนั้นสุ่มเซลล์อสุจิประมาณ 100 เซลล์ มานับจำนวนเซลล์อสุจิที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยการย้อมสี (Eosin –Nigrosin) 3 ซ้ำ แล้วหาค่าเฉลี่ยนำมาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้

2.5 ตรวจสอบความเข้มข้นของอสุจิโดยวิธีการของ Liang (1979) และ Sorensen (1979) โดยวิธีการนับจำนวนเซลล์อสุจิจากการใช้ Fuchs-Rosent Hemacytometer ซึ่งจะสุ่มนับจำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจตุรัสใหญ่เพียง 1 ช่อง

2.6 นำค่าที่ได้จากการนับมาหาความเข้มข้นของอสุจิต่อ 1 ml เจือจางน้ำเชื้อ 3 ระดับ คือ  $150 \times 10^6$ ,  $300 \times 10^6$ ,  $450 \times 10^6$  ต่อไข่ 300 ฟอง

### 3. ขั้นตอนการเตรียมไข่ปลา

3.1 ชั่งน้ำหนักของไข่ปลาดุกอยู่ที่วัดได้จากปลาเพศเมียแต่ละตัว

3.2 ชั่งไข่ประมาณ 1 กรัมแล้วนับจำนวนไข่เพื่อคำนวณหาค่าเฉลี่ยต่อฟองของไข่ทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3 คำนวณหาน้ำหนักไข่ปลา 300 ฟอง

3.4 ชั่งไข่ปลาให้ได้ตามน้ำหนักเฉลี่ยที่มีไข่ปลาประมาณ 300 ฟอง

### 4. ขั้นตอนตรวจสอบการปฏิสนธิ

ตรวจสอบการปฏิสนธิหลังการผสมกับไข่ ประมาณ 22 ชั่วโมง โดยนำมาตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำแสดงภาพทางจอโทรทัศน์ โดยจะพบว่าไข่ที่มีการปฏิสนธิจะมีการแบ่งเซลล์เพื่อเจริญเป็นตัวอ่อน ส่วนไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิจะไม่มีการแบ่งเซลล์เพื่อเจริญเป็นตัวอ่อน

### การบันทึกข้อมูล

บันทึกน้ำหนักและความยาวตลอดลำตัวของพ่อ-แม่พันธุ์ปลา , การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ (sperm motility) , ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ (sperm concentration) และ อัตราการปฏิสนธิ ( fertilization rate)

### การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ หาความแปรปรวนของอัตราการปฏิสนธิในปลาดุกอุย (Walking Catfish; *Clarias macrocephalus*) ด้วยวิธี Analysis of Variance และหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan 's Multiple Range Test

### สถานที่ทดลอง

ห้องปฏิบัติการผสมเทียม และ โรงเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

### ระยะเวลาในการทดลอง

กรกฎาคม - สิงหาคม พ.ศ. 2547



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

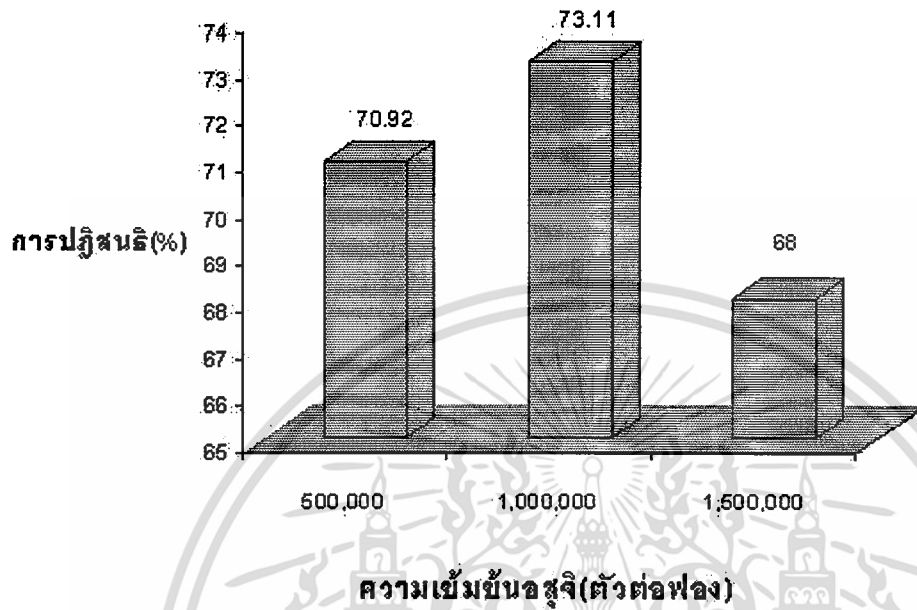
### การปฏิสนธิในปลาอุกอุย

จากการทดลองผสมน้ำเชื้อกับไข่ปลาอุกอุย โดยใช้น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหว 50 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นอสุจิ  $50 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  และ  $150 \times 10^4$  ตัวต่อฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิ คือ 70.92, 73.11, 68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 1, ตารางที่ 1) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) (ตารางผนวกที่ 6) และพบว่า อัตราการปฏิสนธิสูงสุดในหน่วยทดลองที่ใช้ความเข้มข้นอสุจิ  $1 \times 10^6$  ตัวต่อฟองมีอัตราการปฏิสนธิ 73.11 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับ การทดลองของ Bart และ Duhan (1995) ที่ทดลองในปลาอุก channel catfish ที่ระดับความเข้มข้นอสุจิตั้งแต่  $5 \times 10^4$  -  $1.2 \times 10^7$  ตัวต่อฟองซึ่งมีอัตราปฏิสนธิตั้งแต่ 17-87% และรายงานของ Ginzberg (1972), Hourston และ Rosenthal (1976) ที่แนะนำ ให้ใช้ความหนาแน่นอสุจิที่  $10^5$ - $10^6$  ตัว/มิลลิลิตร ที่จะทำให้มีอัตราปฏิสนธิสูงที่สุดในการผสมเทียม และชนิกา (2544) อ้างตามกฤษณ์ (2536) ได้รายงานไว้ว่า อัตราการปฏิสนธิของปลาอุกอุยอยู่ในช่วง  $68.3 \pm 3.6$  เปอร์เซ็นต์ และปลาอุกอุยมีอัตราการฟัก 50-70 เปอร์เซ็นต์ (Puna et al., 1996) จากการทดลองครั้งนี้ในสองหน่วยทดลองแรกที่ใช้ความเข้มข้นอสุจิ  $50 \times 10^4$  และ  $1 \times 10^6$  ตัวต่อฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของอสุจิที่สูงขึ้น (70.92 และ 73.11 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) แต่ในหน่วยทดลองที่ใช้ความเข้มข้นอสุจิสูงสุด  $150 \times 10^4$  ตัวต่อฟอง กลับมีอัตราปฏิสนธิลดลงเป็น 68 เปอร์เซ็นต์ ต่างจากการทดลองของ ศักดิ์ชัย (2544) ที่ทดลองในปลาอุกอุยที่มีอัตราการปฏิสนธิสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของอสุจิ โดยใช้ น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหว 80 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับอสุจิ  $4 \times 10^4$ ,  $6 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^4$  และ  $10 \times 10^4$  ตัวต่อฟอง มีอัตราปฏิสนธิ 64.58, 69.5, 73.17 และ 86.33% ซึ่งอาจเป็นเพราะน้ำเชื้อที่ใช้ในการทดลองมีอัตราการเคลื่อนไหวค่อนข้างน้อย คือ 50 เปอร์เซ็นต์ ต่างจากของ รายงานการทดลองของกรรณิการ์ (2542) ในปลาอุกอุยว่าน้ำเชื้อมีอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ย  $70.76 \pm 8.62$  เปอร์เซ็นต์ โดยการเคลื่อนไหวของอสุจิที่วัดได้น้อยอาจเกิดจากการใช้น้ำเชื้อที่ได้จากพ่อพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์ต่ำ และอัตราการปฏิสนธิต่ำในหน่วยทดลองที่ใช้ความเข้มข้นอสุจิสูง อาจเกิดจาก การที่ใช้อสุจิที่อัตราการเคลื่อนที่น้อย 50 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ความสามารถในการเข้าผสมกับไข่ซึ่งอาจมีบางส่วนเกาะกันเป็นแพ ซึ่งเป็นไข่ที่ยังไม่สุกเต็มที่ จึงไม่เกิดการปฏิสนธิ อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ Bart et al. (1999) ที่รายงาน การผสมเทียมในปลา channel catfish โดยใช้ความเข้มข้นอสุจิ  $5 \times 10^5$  ตัวต่อฟอง มีอัตราการปฏิสนธิ 100 เปอร์เซ็นต์ดังนั้นในการทดลองนี้จึงถือว่า มีอัตราปฏิสนธิต่ำ อาจเนื่องมาจากการใช้อสุจิที่มีอัตรา

การเคลื่อนไหวน้อย นอกจากนี้ มณีรัตน์ (2544) อ้างตาม นิตา (2533) กล่าวว่า คุณภาพของน้ำเชื้อที่รดได้มีเลือดปนก็เป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลง และความผิดปกติอื่นๆที่อาจเกิดขึ้นในขณะที่ทำการทดลองและคุณภาพของไข่ที่ใช้ก็มีส่วนทำให้อัตราการปฏิสนธิต่ำหรือผิดพลาดได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 อัตราการปฏิสนธิของปลาอุกอุยตามระดับความเข้มข้นของออกซิเจน

ตารางที่ 1 อัตราการปฏิสนธิของปลาอุกอุย

ความเข้มข้นของออกซิเจน (ตัวต่อฟอง)	อัตราการปฏิสนธิ (เปอร์เซ็นต์)
1. $50 \times 10^4$	70.92 <sup>a</sup>
2. $1 \times 10^6$	73.11 <sup>a</sup>
3. $150 \times 10^4$	68 <sup>a</sup>

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกัน หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

### สรุปและข้อเสนอนแนะ

การปฏิสนธิในปลาตุกอุย โดยใช้น้ำเชื้อที่มีอัตราการเคลื่อนไหว 50 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งถือว่าค่อนข้างต่ำ ที่ระดับความเข้มข้นของอสุจิ  $50 \times 10^4$ ,  $1 \times 10^6$  และ  $150 \times 10^4$  ตัวต่อฟอง มีอัตราการปฏิสนธิ คือ 70.92, 73.11, 68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $P > 0.05$ ) แต่ อัตราการปฏิสนธิค่อนข้างต่ำ จึงควรมีการศึกษาทดลองการปฏิสนธิในปลาตุกอุย โดยใช้ความเข้มข้นอสุจิมากกว่า  $150 \times 10^4$  ตัวต่อฟอง โดยใช้อสุจิที่มีอัตราการเคลื่อนไหว 80 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเปรียบเทียบผลของอัตราการปฏิสนธิ และควรเลือกแม่ปลาที่มีความสมบูรณ์ของไข่สม่ำเสมอขึ้นให้มากที่สุด เพื่อให้ได้อัตราปฏิสนธิที่เพิ่มขึ้นและดีที่สุด



## เอกสารอ้างอิง

- กฤษณ์ มงคลปัญญา และทัศนีย์ ภูมิพัฒน์. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. วารสารการประมง. 36 (3) : 1111-1123.
- กรมประมง. 2530. ปลาที่เพาะเลี้ยงง่ายตามโครงการบำรุงพันธุ์ปลาแบบประชาอาสา. น. 29-38.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2540. คุณภาพของอสุจิสดและอัตราการผสมของไข่ปลาในยุโรปโดยน้ำเชื้อแช่แข็ง. วารสารการประมง. 40 (1) : 47-53.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2545. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง. วารสารการประมง. 45 (1) : 65-69.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน ,จنگล พรหมยะ, อานุกาฬ วรณคนาพล, รัชต์ ชัดติยะ, จีระเดช มโนสร้อย และ อรุณญา มโนสร้อย. 2547. ปริมาณฮอร์โมนเพศ การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในรอบปีและอายุของปลาบึกในบ่อดิน. วารสารการประมง. 47 (5) : 447-449.
- กรรณิการ์ พวงเพชร. 2542. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ปลาไน และปลาดุกอุย. ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.
- จิรัชย์ จันทนะ, จุริรัตน์ สงน้อย และ ประดิษฐ์ เพ็ชรจรรยา. 2543. ผลความเป็นกรดของน้ำต่ออัตราการฟักไข่ และอัตราการรอดลูกปลาวัยอ่อนของปลาน้ำจืดบางชนิด. วารสารการประมง. 47 (5) : 437-443.
- ชนิกา คงสวัสดิ์. 2542. ผลของจำนวนอสุจิต่ออัตราการปฏิสนธิในปลาตะเพียนขาว ปลาไน และปลาดุกอุย. ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.
- ฐิติมา วัฒนจิง. 2545. วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นและระยะยาว. สัมมนา ปริญญาตรี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร.
- ทัศนีย์ ภูมิพัฒน์และคณะ. 2529. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาและปลาบึก. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ .กรมประมง. 10 น.
- ประเสริฐ สีสลิทธิ. 2531. การเลี้ยงปลาดุก. สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. กรุงเทพมหานคร. 8 น.
- พวรรณศรี จริโมภาส, ภาณุ เทวรัตน์, สุปราณี ชินบุตร และอรรถพล วงศ์อมฤต. 2538. พัฒนาการระบบสืบพันธุ์ของปลาดุกอุย. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรุงเทพมหานคร. 42 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, สุจินต์ หนูขวัญ และวีระ วัชรกรโยธิน.2538. การพัฒนาการเจริญพันธุ์และอนุบาลลูกปลาตุ๊กตุย. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรุงเทพมหานคร. 73 น.
- มณีรัตน์ รัตนวิชัย.2544. คุณภาพน้ำเชื้อและผลของจำนวนอสุจิปลาตุ๊กตุยที่แช่ไปปลาตุ๊กตุยในการปฏิสนธิ. ปัญหาพิเศษ ปริญญาตรี. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง, คณะเทคโนโลยีการเกษตร, สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. วิทยาสรรคชา.2546. คู่มือการเพาะเลี้ยงปลาตุ๊กตุยอย่างมืออาชีพ. พิมพ์ครั้งที่1/2546. สำนักพิมพ์เพชรกระรัต. กรุงเทพมหานคร. 81 น.
- ศักดิ์ชัย ชูโชติ.2538. การเพาะและอนุบาลปลาน้ำจืด. ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพมหานคร. 191 น.
- ศักดิ์ชัย ชูโชติ และสมศักดิ์ บัณชูชัย.2544. คุณภาพน้ำเชื้อและผลของจำนวนอสุจิที่มีต่ออัตราการปฏิสนธิของปลาน้ำจืดบางชนิด. วารสารพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 44 (3) : 25-31.
- สุภาพร สุกสีเหลือง.2539. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพฯ. กรุงเทพมหานคร. 282 น.
- สุภาพร สุกสีเหลือง.2542. มินวิทยา. ศูนย์ส่งเสริมกรุงเทพฯ. กรุงเทพมหานคร. 192 น.
- A. Marconato and D.Y.Shapiro.1996. Sperm allocation, sperm production and fertilization rates in the bucktooth parrotfish. *Animal Behav.* 52 : 971-980.
- A. N. Bart and R.A. Duham.1995. Effects of sperm concentration and egg number on fertilization efficiency with Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) eggs and Blue catfish (*I. furcatus*). *Theriogenology.* 45 : 673-682.
- A.T.M. Viveiros , N. So and J .Komen.2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: Cryoprotectants, freezing rates and sperm : egg dilution ratio. *Theriogenology.* 54 : 1395-1408.
- Barbaro Alvarez, Roberto Fuentes, Rafael Pimentel, Zoila Abad, Edenaida Cabrera, Eulogio Pimentel, Amilcar Arenal.2002. High fry production rates using post- thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa under farming conditions. *Aquaculture.*220 :195-201.
- B. Ogier de Baulny , C. Labbe, and G. Maise.1999. Membrane integrity , mitochondrial activity, ATP content, and motility of the European Catfish (*Silurus glanis*).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- testiscular spermatozoa after freezing with different cryoprotectants. *Cryobiology*. 39 :177-184.
- F. Lahnsteiner , B. Berger, T. Weismann.2002. Effect of media, fertilization technique, extender, straw volume, and sperm to egg ratio on hatchability of cyprinid embryos, using cryopreserved semen. *Theriogenology*. 60 : 829-841.
- Josefa D. Tan-Fermin , Takeshi Miura, Shinji Adachai , Kohei Yamauchi.1999. Seminal plasma composition, sperm motility, and milt dilution in Asian catfish *Clarias Macrocephalus* (Gunther). *Aquaculture*. 171 : 323-338.
- L.VF Silva, J.I. Golombieski , B. Baladisserotto.2003. Incubation of silver carp, *Rhamdia quelen* (Pimelodidae), eggs at different calcium and magnesium concentrations. *Aquaculture*. 62462 : 1-9.
- Marji Keinanen, Christina Tigerstedt, Pia Kalax, and Pekka J. Vuorinen.2003. Fertilization and embryonic development of Whitefish (*Coregonus lavaretus lavaretus*) in acidic low –ionic-strength water with aluminum. *Ecotoxicology and environmental safety*. 55 : 314-329.
- M. Suquet , R. Billard ,J. Cosson ,Y.Normant, C. Fauvel.1995. Artificial insemination in turbot (*Scophthalmus maximus*) : determination of the optimal sperm to egg ratio and time of gamete contact. *Aquaculture*.133 : 83-90.
- Otomar Linhart , Shigeharu Kudo, Roland Billard, Vlastimil Slechta, Ekatherine V. Mikodina. 1995. Morphology, composition and fertilization of carp eggs : a review. *Aquaculture*.129 : 75-93.
- Song-Lin Chen, Xiang-Shan Ji , Guo-Cai Yu , Yong-Sheng Tian, Zhen-Xia Sha.2004. Cryopreservation of sperm from turbot (*Scophthalmus maximus*) and application to large-scale fertilization. *Aquaculture*. 236 : 547-556.
- Tatsuya Unuma ,Shigenori Kondo, Hideki Tanaka, Hirohiko Kagawa, Kazuharu Nomura, Hiromi Ohta.2004. Determination of the rates of fertilization, hatching and larval Survival eel, *Anguilla japonica* , using tissue culture microplates. *Aquaculture*. 241 : 345-356.

## ภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 เปอร์เซนต์ค่าเฉลี่ยอัตราปฏิสนธิของไข่ปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ที่ระดับความเข้มข้นของอสุจิปลา Blue catfish (*I. Furcatus*) ที่แตกต่างกัน.

จำนวนอสุจิต่อไข่ (10 <sup>6</sup> )	จำนวนตัว	ค่าเฉลี่ย% อัตราการปฏิสนธิ (S.D.)
0.05	30	16.6 <sup>b</sup> (15.3)
0.125	32	51.8 <sup>c</sup> (31.6)
0.25	71	57.6 <sup>c</sup> (31.0)
0.5	42	76.0 <sup>c</sup> (21.1)
1	16	67.6 <sup>c</sup> (17.5)
4	42	73.7 <sup>c</sup> (26.9)
8	6	79.3 <sup>c</sup> (10.5)
10	18	75.8 <sup>c</sup> (27.8)
12	6	87.2 <sup>c</sup> ( 7.9)

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน  
ที่มา Bart and Duham (1995).

ตารางภาคผนวกที่ 2 เปอร์เซนต์ค่าเฉลี่ยอัตราปฏิสนธิของไข่ปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ที่ความหลากหลายของปริมาณไข่ที่ใช้ในการปฏิสนธิกับอสุจิปลา Blue catfish (*I. Furcatus*)

ปริมาณไข่	จำนวนตัว	ค่าเฉลี่ย% อัตราการปฏิสนธิ (S.D.)
450	211	67.0 <sup>b</sup> (30.2)
2,000	6	54.2 <sup>b</sup> (33.0)
5,000	21	63.5 <sup>b</sup> (28.8)
8,000	9	57.3 <sup>b</sup> (23.1)
11,000	4	25.0 <sup>c</sup> (41.0)

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน  
ที่มา Bart and Duham (1995).

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 อัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักของปลา Asian catfish  
(*C. macrocephalus*) จากการผสมน้ำเชื้อกับASPในอัตราส่วนต่างๆ.

น้ำหนักไข่ (กรัม)	อัตราส่วนน้ำเชื้อ : ASP	อัตราการปฏิสนธิ (%)	อัตราการฟัก (%)
5	1:10	94.0±1.5	40.4±3.5 <sup>a</sup>
	1:50	94.2±0.9	39.0±3.6 <sup>a</sup>
	1:100	93.3±1.2	43.2±3.5 <sup>a</sup>
10	1:10	94.2±0.8	31.4±3.2 <sup>b</sup>
	1:50	92.6±1.4	33.1±3.8 <sup>b</sup>
	1:100	89.2±2.1	31.1±3.4 <sup>b</sup>

หมายเหตุ ตัวอักษรภาษาอังกฤษเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกัน  
ที่มา Fermin et al., (1998)

การประเมินพ่อพันธุ์ปลาอุย

1. น้ำหนักรวม 216.25 กรัมต่อตัว
2. ความยาวตลอดลำตัวเฉลี่ย 32.12 เซนติเมตร
3. อัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิ 50 เปอร์เซ็นต์
4. ความเข้มข้นของอสุจิ  $860 \times 10^6$  ตัวต่อลูกบาศก์เซนติเมตร
5. น้ำหนักอณฑะรวม 5.34 กรัม

ตารางภาคผนวกที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแม่พันธุ์ปลาอุย

จำนวนไข่	น้ำหนักรวม (กรัม)	ความยาวตลอดลำตัว (เซนติเมตร)	น้ำหนักไข่รวม (กรัม)	น้ำหนักไข่เฉลี่ยต่อ 300 ฟอง (กรัม)
1	400	32.5	22.93	0.55
2	600	42	52.59	0.64
3	400	32	24.4	0.46
4	400	30	28.22	0.49
ค่าเฉลี่ย	450	34.13	32.03	0.54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า  
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

### ตารางภาคผนวกที่5 อัตราปฏิสนธิของปลาตุ๊กตุย

กลุ่ม/ซ้ำ	กลุ่มที่1	กลุ่มที่2	กลุ่มที่3
ซ้ำที่1	82.5	83.21	77.22
ซ้ำที่2	68.22	71.7	77.84
ซ้ำที่3	73.92	73.95	75.79
ซ้ำที่4	59.06	63.6	41.17
ค่าเฉลี่ย <sup>ns</sup>	70.92	73.11	68

หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

### ตารางภาคผนวกที่6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการปฏิสนธิปลาตุ๊กตุย

#### ANOVA

Source of Variation	SS	df	MS	F	P-value	F crit
Between Groups	52.57947	2	26.28973	0.16334	0.851764	4.256492
Within Groups	1448.556	9	160.9507			
Total	1501.136	11				

Fcrit =4.256492 และ F =0.16334

Fcrit > F แสดงว่า ไม่มีความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มที่ 1 , 2 และ 3