ใบรับรองปัญหาพิเศษปริญญาตรี

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง

ผลของจำนวนอสุจิต่ออัตราการปฏิสนธิในปลาตะเพียนขาว ปลาไน และปลาดุกอุย

Effect of Sperm Number Per Egg on Fertilization Rate in Common Silver Barb, Common Carp and Walking Catfish

โดย

นางสาวชนิกา คงสวัสดิ์

ได้รับความเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....

(รศ. ศักดิ์ชัย ชูโชติ)

.....

(รศ.สมศักดิ์ บัณฑุชัย)

ปพ
ช 152ผ
2542

17030
13 พ.ย. 2543

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

อาจารย์สมชาย หวังวิบูลย์กิจ

รักษาการหัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17036

ห้องสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของจำนวนอสุจิต่ออัตราการปฏิสนธิในปลาตะเพียนขาว ปลาไน และปลาดุกอุย

Effect of Sperm Number Per Egg on Fertilization Rate in Common Silver Barb, Common Carp and Walking Catfish

T099394

โดย

นางสาวชนิกา คงสวัสดิ์

ปพ.
ช152ผ
2542

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 99394
วัน,เดือน,ปี.....

เสนอ

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า

เจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

พ.ศ.2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของจำนวนอสุจิต่ออัตราการปฏิสนธิในปลาตะเพียนขาว ปลาไน และปลาดุกอุย

Effect of Sperm Number Per Egg on Fertilization Rate in Common Silver Barb, Common Carp and Walking Catfish

จากการทดลองผสมน้ำเชื้อกับไข่ปลาตะเพียนขาว (common silver barb; *Puntius gonionotus*)โดยใช้น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหว 90 เปอร์เซ็นต์ ในความเข้มข้นของอสุจิ$4x10^4$, $6x10^4$, $8x10^4$, $10x10^4$ ตัวต่อฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิคือ 98.75, 99.3, 99.67 และ98.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ($P>0.05$)

จากการทดลองผสมน้ำเชื้อกับไข่ปลาไน (common carp; *Cyprinus carpio*)โดยใช้น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหว 90 เปอร์เซ็นต์ ในความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$, $6x10^4$, $8x10^4$ และ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิ 66.54, 72.34, 74.58 และ 79.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.05$) อัตราการปฏิสนธิมีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$ กับ$8x10^4$, $10x10^4$ ตัวต่อฟอง ส่วนอัตราการปฏิสนธิของกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$ กับ $6x10^4$ ตัวต่อฟอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และอัตราการปฏิสนธิของกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $6x10^4$, $8x10^4$ และ$10x10^4$ ตัวต่อฟองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

จากการทดลองผสมน้ำเชื้อกับไข่ปลาดุกอุย (walking catfish; *Clarias macrocephalus*) โดยใช้น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหว 80 เปอร์เซ็นต์ ในความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$, $6x10^4$, $8x10^4$ และ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิคือ 64.58, 69.50, 73.17 และ86.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ($P>0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนิยม

ปัญหาพิเศษเล่มนี้จะไม่มีวันสำเร็จสมบรูณ์ลงได้ถ้าไม่ได้รับความอนุเคราะห์ช่วยเหลือจากท่านทั้งหลายผู้มีพระคุณต่อข้าพเจ้าเป็นอย่างยิ่ง ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ศักดิ์ชัย ชูโชติ และ รศ.สมศักดิ์ บัณฑุชัย อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ให้คำแนะนำแก้ไขข้อบกพร่องทั้งปวงอันพึงมีต่อขั้นตอนต่างๆในการทำปัญหาพิเศษตั้งแต่ต้นจนจบ ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่านที่ให้ความรู้และอบรมสั่งสอนข้าพเจ้ามาโดยตลอด

ขอขอบคุณ คุณบุปผา จงพัฒน์ คุณนิพนธ์ จิตตำนาน และเจ้าหน้าที่ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่านที่ให้คำแนะนำและให้ความช่วยเหลือในการทดลอง ขอขอบคุณเพื่อนๆภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและคอยให้กำลังใจมาโดยตลอด และขอกราบขอบพระคุณ บิดามารดาผู้ให้กำเนิด และทุกสิ่งทุกอย่างอันเต็มเปี่ยมด้วยความรัก และความเมตาแก่ข้าพเจ้าตลอดมา

ชนิกา คงสวัสดิ์

22 เมษายน 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	10
ผลการทดลองและวิจารณ์	13
สรุปและข้อเสนอแนะ	19
เอกสารอ้างอิง	20
ภาคผนวก	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	อัตราการปฏิสนธิที่มีความแตกต่างกันทางสถิติของปลาไน	16

ตารางผนวกที่

1	ส่วนประกอบของสารละลายทั้ง 4 ชนิด	24
2	อัตราการปฏิสนธิของปลาแซลมอนต่อวิธีการทั้ง 4 ชนิด	25
3	อัตราการปฏิสนธิของไข่ปลาต่อเวลา	25
4	ลักษณะทางสันฐานวิทยาของแม่ปลาตะเพียนขาว	26
5	อัตราการปฏิสนธิของปลาตะเพียนขาว	26
6	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการปฏิสนธิปลาตะเพียนขาว	26
7	ลักษณะทางสันฐานวิทยาของแม่ปลาไน	27
8	อัตราการปฏิสนธิของปลาไน	27
9	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการปฏิสนธิปลาไน	27
10	ลักษณะทางสันฐานวิทยาของแม่ปลาดุกอุย	28
11	อัตราการปฏิสนธิของปลาดุกอุย	28
12	ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการปฏิสนธิปลาดุกอุย	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	อัตราการปฏิสนธิของปลาตะเพียนขาวตามระดับความเข้มข้นของอสุจิ	14
2	อัตราการปฏิสนธิของปลาไนตามระดับความเข้มข้นของอสุจิ	16
3	อัตราการปฏิสนธิของปลาดุกอุยตามระดับความเข้มข้นของอสุจิ	18

ภาพผนวกที่

1	hemacytometer และ dilution pipette	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของจำนวนอสุจิต่ออัตราการปฏิสนธิในปลาตะเพียนขาว ปลาไน และปลาดุกอุย

Effect of Sperm Number Per Egg on Fertilization Rate in Common Silver Barb, Common Carp and Walking Catfish

คำนำ

ในปัจจุบันโลกมีการพัฒนาทางด้านเทคโนโลยีและวิทยาการในทุกศาสตร์เพิ่มมากขึ้นรวมทั้งวิทยาการทางด้านการแพทย์ เพื่อลดอัตราการตายและความเจ็บป่วยของมนุษย์ ทำให้อัตราการตายของประชากรลดลงและอัตราการรอดตายจากการเกิดก็เพิ่มขึ้นทำให้จำนวนประชากรโลกเพิ่มสูงขึ้นโดยเฉพาะประเทศกำลังพัฒนาการวางแผนควบคุมการเพิ่มของประชากรยังไม่มีประสิทธิภาพดี ทำให้มีประชากรหนาแน่น การเพิ่มของประชากรโลกนำมาซึ่งความต้องการอาหารเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย ไม่ว่าจะเป็นอาหารที่เป็นแหล่งโปรตีน คาร์โบไฮเดรต เกลือแร่ ไขมัน และวิตามิน ทำให้จำนวนอาหารที่ได้จากธรรมชาติไม่เพียงพอต่อการบริโภคจึงต้องมีการเพาะเลี้ยงสัตว์และเพาะปลูกพืชเพิ่มเติม ในการเลี้ยงสัตว์ ปลาเป็นสัตว์น้ำชนิดหนึ่งที่นิยมเลี้ยง เนื่องจากตลาดมีความต้องการปลาในปริมาณมาก เพราะว่าปลาเป็นแหล่งโปรตีนที่ประชากรนิยมรับประทานเนื่องจากมีราคาค่อนข้างถูกนอกจากนี้ยังมีโปรตีนและคุณค่าทางโภชนาการสูงแต่มีไขมันและคอเรสเตอรอลต่ำซึ่งเป็นผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภค

การเลี้ยงปลาในปัจจุบันนี้ลูกปลาที่นำมาใช้ในการเลี้ยงนั้นได้มาจากการเพาะพันธุ์ของมนุษย์เกือบทั้งสิ้น ยกเว้นปลาบางชนิด เช่น ปลากะรัง เนื่องจากมีอัตราการตายขณะเป็นตัวอ่อนสูงมากจึงไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ในการเพาะพันธุ์ลูกปลานั้นมีด้วยกันหลายวิธีได้แก่ วิธีกึ่งควบคุมธรรมชาติ วิธีควบคุมธรรมชาติ วิธีการฉีดฮอร์โมน และวิธีการผสมเทียม แต่ปัจจุบันวิธีที่ได้รับความนิยมที่สุดคือวิธีการฉีดฮอร์โมนและผสมเทียมร่วมกัน โดยการฉีดฮอร์โมนให้ปลาเพศเมียตกไข่และปลาเพศผู้มีน้ำเชื้อสมบรูณ์ จากนั้นจึงรีดไข่และน้ำเชื้อของปลาออกมาผสมกันในภาชนะ (ศักดิ์ชัย, 2538) การเพาะพันธุ์ปลาจะประสบความสำเร็จหรือไม่ขึ้นอยู่กับการปฏิสนธิของไข่กับอสุจิ (วิทย์, 2521) การผสมเทียมปลาที่ไม่คำนึงถึงอัตราส่วนระหว่างไข่และอสุจิมีผลทำให้น้ำเชื้อหรือพ่อพันธ์ปลา (ในกรณีที่ต้องผ่าเอาอัณฑะออกมา)สูญเสียไปโดยไม่เหมาะสมกับคุณค่าทางเศรษฐกิจและการศึกษาผลของจำนวนอสุจิต่อไข่ยังจะส่งผลไปถึงการพัฒนาการวิจัยเกี่ยวกับการทำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งด้วย กล่าวคือถ้าทราบความหนาแน่นของอสุจิต่อไข่ในการปฏิสนธิ จะทำให้สามารถเตรียมน้ำเชื้อแช่แข็งในความเข้มข้นที่พอดีกับจำนวนไข่และนำมาใช้ได้รวดเร็วขึ้น (เกรียงศักดิ์, 2540) การทราบจำนวนอสุจิต่อไข่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่มีอัตราการปฏิสนธิดีที่สุด จะสามารถนำไปปรับใช้ในการผสมเทียมทั้งการผสมเทียมแบบใช้น้ำเชื้อสดและแบบน้ำเชื้อแช่แข็ง ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้นสามารถลดความฟุ่มเฟือยในการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งจึงเป็นการลดค่าใช้จ่ายที่ต้องใช้ซื้อน้ำเชื้อแช่แข็งหรือได้จำนวนลูกปลาจากการเพาะมากขึ้น ส่งผลให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำพัฒนาดีขึ้น ซึ่งจะเป็นไปตามนโยบายของรัฐบาลที่ได้กำหนดให้เร่งรัดพัฒนาการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์สัตว์น้ำไว้ในแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติฉบับที่ 8

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมของจำนวนอสุจิต่อปริมาณไข่ ที่ให้ผลดีต่ออัตราการปฏิสนธิในปลาตะเพียนขาว(common silver barb; *Puntus gonionotus*) ปลาไน(common carp; *Cyprinus carpio*) และปลาดุกอุย(walking catfish; *Clarias macrocephalus*)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

ลักษณะทั่วไปของอสุจิปลา

อสุจิของปลาไม่มี acrosome เหมือนอย่างในสัตว์มีกระดูกสันหลังกลุ่มอื่นๆอาจเป็นเพราะไม่มีความจำเป็นต่อการใช้เพื่อเข้าไปในไข่เนื่องจากไข่ปลามีรู micropyleไว้รอรับอยู่แล้ว(ศักดิ์ชัย, 2538)

อสุจิ มีส่วนประกอบดังนี้

1. หัว ส่วนนี้ประกอบด้วยนิวเคลียส มีโครโมโซม 1 ชุด ล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึมเพียงบางๆและห่อหุ้มด้วย plasmalemma (cell membrane) รูปร่างลักษณะของส่วนหัวมีหลายแบบแล้วแต่ชนิดของปลา (ภาพผนวกที่ 1)

2. midpiece เชื่อมต่อระหว่างหัวและหางมีรูปร่างลักษณะต่างกันตามชนิดปลา ประกอบด้วย microtubules เป็นแกนกลางของส่วนหางล้อมรอบด้วยไซโตพลาสซึมซึ่งภายในมี mictochodria และ centriole

3. หาง เป็นส่วนที่ช่วยในการเคลื่อนที่ประกอบด้วย microtubules เรียงกันรอบแกนกลางล้อมรอบด้วย plasma membrane ปลาส่วนใหญ่มี microtubules เป็นแกนกลาง 1 คู่ และเรียงรอบเป็นวงกลมอีก 9 คู่ ยกเว้นปลาในพวก Anguilliformes และ Elopiformes ซึ่งไม่มี microtubules เป็นแกนกลางโดยส่วนใหญ่เชื้อเพศผู้มีหางเพียงหางเดียว ซึ่งลักษณะอสุจิมี 2 หางพบบ้างในปลา channel catfish; *Ictalurus punctatus*

ลักษณะทั่วไปของไข่

ส่วนประกอบที่สำคัญของไข่ปลามี 3 ส่วน (ศักดิ์ชัย, 2538)(ภาพผนวกที่ 2) คือ

1. นิวเคลียสและไซโตพลาสซึมหรือ germinal disc เมื่อเกิดการปฏิสนธิส่วนนี้จะแบ่งเซลล์เจริญเป็นคัพภะ (embryo)

2. yolkถูกล้อมรอบไว้ด้วย vitelline membrane ระหว่าง yolk กับ เปลือกไข่ (chorion) มีช่องว่างเรียกว่า perivitelline space yolk ประกอบด้วย yolk protein 2 ชนิด คือ lipovitelline กับ phosvitin ทั้ง 2 ชนิดเป็นโปรตีนที่รวมกับฟอสฟอรัส ไลปิด และคาร์โบไฮเดรต มีความแตกต่างกันคือ lipovitelline มีฟอสฟอรัสน้อย ไลปิดและคาร์โบไฮเดรตมาก แต่ phosvitin มีฟอสฟอรัสมาก ไลปิดและคาร์โบไฮเดรตน้อย นอกจากนี้ในปลาหลายชนิดยังมีหยดน้ำมันเป็นแหล่งพลังงานของคัพภะและยังเป็นส่วนที่ช่วยลดความถ่วงจำเพาะของไข่ปลาซึ่งมีอิทธิผลต่อการลอยน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. เปลือกไข่ เป็นสิ่งที่ห่อหุ้มส่วนต่างๆที่อยู่ภายในไว้ไม่ให้ได้รับอันตราย เปลือกไข่มีรูเล็กๆ 1 รูเป็นทางเข้าของเชื้อตัวผู้เรียกว่า micropyle ซึ่งอยู่ทาง animal pole ความหนาของเปลือกไข่แตกต่างกันไปตามชนิดของปลา เช่น ไข่ปลาทองและปลา rainbow trout หนาประมาณ 7-8 และ 30 ไมครอน ตามลำดับ

การพัฒนาการของรังไข่ของปลาตะเพียนขาวพบว่า รังไข่ปลาตะเพียนขาวจะมีการพัฒนาไม่สม่ำเสมอ โดยจะพบไข่ทุกขั้นตอนการพัฒนาอยู่ในรังไข่เดียวกันตลอดทั้งปี จึงแสดงให้เห็นว่าแม่ปลาตะเพียนขาวสามารถวางไข่ได้หลายครั้งในหนึ่งฤดูกาล โดยไข่ที่รีดออกมาใหม่จะมีสีเทา ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1,150 ไมครอน เส้นผ่าศูนย์กลางไข่แดง 1,050 ไมครอน ภายหลังนำมาผสมเมื่อไข่แช่น้ำประมาณ 5 นาที ไข่จะเริ่มขยายขนาดขึ้นจนกระทั่งโตสุดจะมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5 มิลลิเมตร ไข่ฟักออกเป็นตัวภายใน 8-11 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26-31 องศาเซลเซียส (เมฆและคณะ, 2510) ไข่ปลาดุกอุยเป็นไข่จมและติดกับวัสดุมีสีน้ำตาลอมแดง มีลักษณะเป็นเม็ดกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2-1.6 มิลลิเมตร (เฉิดฉายและคณะ, 2538) ไข่ปลาไนจะเป็นไข่จมและติดวัตถุเช่นเดียวกับปลาดุกอุย (ศักดิ์ชัย, 2538)

การสืบพันธุ์ของปลา

เนื่องจากปลาเป็นสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังกลุ่มใหญ่ และมีวิวัฒนาการที่แตกต่างกันมากภายในกลุ่มจึงทำให้ปลามีการสืบพันธุ์หลายแบบ หลายวิธีการ โดยแบ่งการสืบพันธุ์ของปลาออกเป็น 3 แบบ (ศักดิ์ชัย, 2538) คือ

1. การสืบพันธุ์แบบแยกเพศ (bisexual reproduction)วิธีนี้เป็นการสืบพันธุ์ของปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่ โดยสร้างอสุจิและไข่แล้วมีการปฏิสนธิระหว่างอสุจิกับไข่ภายนอกหรือภายในตัวของแม่ปลา จากนั้นไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะเจริญเติบโตฟักเป็นตัวอ่อน โดยไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วจะมีการเจริญเติบโต 3 ลักษณะ คือ

1. oviparous เป็นการผสมภายนอกแม่ปลา ไข่เจริญเติบโตโดยอาศัยอาหารจาก yolk จนฟักออกเป็นตัว

2. viviparous ไข่ได้รับการผสมภายในตัวของแม่ปลา ไข่ได้รับอาหารทางเส้นเลือดของแม่

3. ovoviviparous ไข่ได้รับการผสมภายในตัวของปลา คล้ายกับ viviparous แต่ไข่ได้รับอาหารจาก yolk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การสืบพันธุ์แบบกะเทย (hermaphrodite) เป็นการสืบพันธุ์ที่มีการสร้างไข่และอสุจิในปลาตัวเดียวกัน การสืบพันธุ์แบบนี้แบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ

1.ลักษณะที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้ง 2 เพศพร้อมกัน (synchronous hermaphroditism) ปลากลุ่มนี้มีเนื้อเยื่อที่สามารถสร้างไข่และอสุจิได้พร้อมๆกันโดยไม่คำนึงว่าจะผสมกันเองหรือไม่

2.ลักษณะที่มีการเปลี่ยนเพศ (consecutive hermaphroditism) จะพบทั้งเนื้อเยื่ออัณฑะและรังไข่ปรากฏอยู่ด้วยกันแต่ช่วงหนึ่งๆของชีวิตจะสร้างไข่หรืออสุจิเพียงชนิดเดียวและจะเปลี่ยนไปสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศตรงข้ามในภายหลัง

3. การสืบพันธุ์แบบ parthenogenesis จะไม่มีการปฏิสนธิคือแม่ปลาผสมพันธุ์กับพ่อปลาเพื่อเป็นการกระตุ้นให้ไข่เจริญเท่านั้นลูกที่เกิดขึ้นเป็นเพศเมียทั้งหมด

การปฏิสนธิ

ส่วนมากปลาจะมีการปฏิสนธิภายนอกตัวโดยแม่ปลาปล่อยไข่ออกมาในน้ำและพ่อปลาปล่อยน้ำเชื้อออกมาเพื่อผสมกับไข่ เมื่อไข่ปลาถูกปล่อยออกมาในน้ำจะรับน้ำ และอสุจิจะเข้าทางรู micropyle โดยอสุจิสามารถเข้าทางรู micropyleได้ทีละตัวเท่านั้น เนื่องจากรู micropyle มีขนาดเล็กและจะปิดเมื่ออสุจิตัวแรกเข้าสู่ภายในไข่ โดยไข่จะป้องกันไม่ให้อสุจิตัวอื่นเข้าไปด้วยการที่ cortical alveoli ที่ egg cortex จะหลั่งสารมาปิดรู micropyle หลังจากนั้น vitelline membrane จะเปลี่ยนเป็น fertilization membrane ทำให้อสุจิไม่สามารถเข้าไปได้อีก ป้องกันการเกิด polyspermy แต่น้ำยังสามารถผ่านเข้าได้ทางรูเล็กๆบนเปลือกไข่ทำให้เปลือกไข่แข็งขึ้นเรียก water hardening โดยไข่ที่มี perivitelline space กว้างเช่นไข่ลอย ไข่ครึ่งลอยครึ่งจมจะขยายตัวได้มาก ส่วนไข่จมรับน้ำเข้าสู่ภายในได้น้อยจึงเพิ่มขนาดไม่มาก (ศักดิ์ชัย, 2538) ซึ่งไข่ที่ได้รับการผสมแล้วจะมีการแบ่งเซลล์ออกเป็นเซลล์เล็กๆเรียก blastomere เรียกระยะนี้ว่า blastula มีช่องว่างเรียกว่า blastocoel ต่อมาเป็นระยะ gastrulation เกิดเนื้อเยื่อ 2 ชั้นคือ epiblast และ hypoblast พร้อมกันนั้นเกิดแกนกลางแบ่งครึ่งซ้ายขวา การแบ่งเซลล์ที่กล่าวมานี้จะใช้เป็นตัวกำหนดว่าไข่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว (วิมล, 2540)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการปฏิสนธิ

1. **จำนวนอสุจิต่อไข่**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปฏิสนธิระหว่างอสุจิกับไข่จะมีประสิทธิภาพดีถ้าจำนวนอสุจิมีอัตราส่วนพอเหมาะสมกับจำนวนไข่ ปลาแต่ละชนิดมีปริมาณความเข้มข้นของอสุจิในน้ำเชื้อแตกต่างกันไป ปลาบางชนิดมีน้ำเชื้อน้อยอัตราการปฏิสนธิจึงต่ำ เช่น พ่อพันธุ์ปลาเนื้ออ่อนจะมีน้ำเชื้อน้อยมาก ในขณะที่แม่พันธุ์ปลามีไข่ประมาณ 20,000 – 30,000 ฟอง จึงทำให้ไข่ได้รับการปฏิสนธิน้อยมาก (กิจจาและคณะ,2526)

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อความเข้มข้นของอสุจิปลา ได้แก่

1. ชนิดพันธุ์ปลา ปลาแต่ละชนิดมีความเข้มข้นของอสุจิในน้ำเชื้อไม่เท่ากัน (วิทย์, 2521) เช่น ปลากะพง (yellow perch) มีจำนวนอสุจิเฉลี่ย 48.5 $\pm$ 1.6x10^9 ตัวต่อพ่อ ปลา *Esox masquinongy* มีจำนวนอสุจิเฉลี่ย 17.9 $\pm$ 20x10^9 ตัวต่อพ่อ (Glogowski และCiereszko, 1999) ปลา *Aspius aspius* ซึ่งเป็นปลาในตระกูล cyprinide มีความเข้มข้นของอสุจิ 7.1x10^9 ตัวต่อมิลลิลิตร (Babike และGlogowski, 1998) ปลานิลมีจำนวนอสุจิ 200 ตัวต่อไมโครลิตร หรือ 5x10^6 ตัวต่อมิลลิลิตร(Ranaและ Mcandrew, 1989) ปลาแต่ละชนิดสร้างอสุจิต่อน้ำหนักอัณฑะไม่เท่ากันรวมทั้งความเข้มข้นของอสุจิก็ไม่เท่ากันด้วยดังจะเห็นได้จากปลา guppy มีการสร้างอสุจิ 150x10^6 ตัวต่อน้ำหนักอัณฑะ1กรัมต่อวัน ปลา trout มีการสร้างอสุจิ 1.59x10^6 ตัวต่อน้ำหนักอัณฑะ1กรัมต่อวัน และมีความเข้มข้นของอสุจิ 10-20x10^9 ตัวต่อมิลลิลิตร และปลา pike มีการสร้างอสุจิ 110x10^6 ตัวต่อน้ำหนักอัณฑะ1กรัมต่อวัน และมีความเข้มข้นของอสุจิ 40x10^9 ตัวต่อมิลลิลิตร (Billard, 1988) นอกจากการมีความเข้มข้นของอสุจิในน้ำเชื้อไม่เท่ากันแล้ว อัตราส่วนของอสุจิต่อการปฏิสนธิกับไข่ยังแตกต่างไปตามชนิดปลาด้วยเช่นกัน เช่น ปลาไน *Cyprinus carpio* เมื่อนำปริมาณอสุจิสด 1 มิลลิลิตร ผสมกับไข่ 1 กรัม อัตราการปฏิสนธิ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพิ่มปริมาตรไข่เป็น 100 กรัม อัตราการปฏิสนธิลดลงมาก ส่วนการใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 1 มิลลิลิตรผสมกับไข่ 5 กรัม อัตราการปฏิสนธิลดลงเหลือ 31 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ไข่ 10 กรัมอัตราการปฏิสนธิลดลงเหลือ 25 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้ไข่ 50 กรัม อัตราการปฏิสนธิเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ (เกรียงศักดิ์, 2540 อ้างตาม Kurokura และคณะ, 1984) และการปฏิสนธิในปลาไนจะลดลงเมื่อใช้ปริมาณอสุจิต่อไข่ลดลง ถ้าใช้จำนวนอสุจิ 6x10^4 – 2x10^6 ตัวต่อไข่ อัตราการปฏิสนธิเฉลี่ย 81 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อใช้จำนวนอสุจิ 8x10^3 – 2x10^6 ตัวต่อไข่ อัตราการปฏิสนธิเฉลี่ย 54 เปอร์เซ็นต์ แต่ถ้าใช้จำนวนอสุจิ 10^3 ตัวต่อไข่ อัตราการปฏิสนธิจะเท่ากับ 0 เปอร์เซ็นต์ การเพาะพันธุ์ปลาไนควรใช้อสุจิอย่างน้อย 6x10^4 ตัวต่อไข่ (เกรียงศักดิ์, 2540 อ้างโดย Fauvelและคณะ, 1991) ปลา rainbow trout; *Salmo gairdneri* ใช้สัดส่วน 5-10x10^6 ตัวต่อฟอง ให้อัตราการปฏิสนธิ 100 เปอร์เซ็นต์ (Stoss และHoltz, 1983) Bart และคณะ (1988) ทดลองผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 3 ความเข้มข้น เพื่อหาความเข้มข้นของอสุจิแช่แข็งที่เหมาะสมต่อการปฏิสนธิโดยใช้ไข่จากปลา channel catfish กับอสุจิปลา blue catfish; *Ictalurus furcatus* เก็บน้ำเชื้อใน DMSO ก่อนทำการแช่แข็ง ความเข้มข้นของอสุจิที่ใช้คือ 3.75x10^8, 1.5x10^9 และ6x10^9 ตัวต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลอด เมื่อผสมกับไข่จำนวน 450 ฟอง พบว่าความเข้มข้นของน้ำเชื้อ $6.00x10^9$ ตัวต่อหลอด ($1.33x10^7$ ตัวต่อฟอง) มีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าความเข้มข้น $3.75x10^8$, $1.5x10^9$ ตัวต่อหลอด และความเข้มข้น $3.75x10^8$ กับ$1.5x10^9$ ตัวต่อหลอด แต่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

2. จำนวนอสุจิที่มีการเคลื่อนไหว (Motility) ใช้เป็นตัววัดความสามารถของอสุจิในการเข้าปฏิสนธิกับไข่ อสุจิที่มีการเคลื่อนไหวเท่านั้นจึงจะสามารถเข้าผสมกับไข่ได้ การประเมินการเคลื่อนไหวของอสุจิคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ เช่น เมื่อประเมินการเคลื่อนไหวได้ค่าเท่ากับ 90 เปอร์เซ็นต์ จากอสุจิ 100 ตัว แสดงว่ามีอสุจิ 90 ตัวที่สามารถเข้าผสมกับไข่ได้ (วิทย์, 2521) โดยปกตินำ้เชื้อสดจะมีจำนวนอสุจิเคลื่อนไหวและอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าน้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็ง Lahnsteiner และคณะ (1992) ทดลองในปลาแซลมอน โดยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บในสารละลายซึ่งมีส่วนประกอบต่างกัน 4 อย่าง (ตารางผนวกที่ 1) และน้ำเชื้อสดผสมกับไข่ด้วยความเข้มข้นของอสุจิ $2.5x10^3$ กับ$1.3x10^4$ ตัวต่อไข่1ฟอง พบว่าองค์ประกอบของสารละลายมีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ เนื่องจากมีคุณสมบัติในการรักษาสภาพอสุจิได้ไม่เท่ากันมีผลทำให้อสุจิที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งบางส่วนตายหรือรูปร่างผิดปกติจึงไม่สามารถเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้ ส่วนอสุจิสดมีอัตราการปฏิสนธิสูง(ตารางผนวกที่ 2)

แต่ Young และคณะ (1992) รายงานว่าอสุจิของปลา *Sillago ciliata* สามารถอยู่ในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อก่อนทำการแช่แข็งที่ใส่สารDMSOหรือglycerol และน้ำเชื้อหลังการแช่แข็ง เป็นเวลา 128 $\pm$ 8, 135 $\pm$ 6 และ135 $\pm$ 5 นาที ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และอัตราการปฏิสนธิระหว่างน้ำเชื้อสดกับน้ำเชื้อแช่แข็งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน ส่วน Ciereszka และคณะ (1999) รายงานว่า ระยะเวลาที่เก็บอสุจิมีผลต่อการเคลื่อนไหวและการปฏิสนธิ โดยพบว่า น้ำเชื้อที่แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง มีคุณภาพดีกว่าน้ำเชื้อที่เก็บไว้ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 ชั่วโมง เนื่องจากมีอสุจิบางส่วนตายไป

3. อายุของอสุจิ Kurokura และคณะ (1984) ทดลองผสมพันธุ์ปลาไน *Cyprinus carpio* โดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็ง 342 วัน ผสมกับไข่ในสัดส่วน ไข่ 5 กรัมต่อน้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร และใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่ 0,1,5 และ 10 นาที ที่เก็บในสารละลาย DMSO เปรียบเทียบกับ DMSO+BSA 5 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 นาทีอัตราการปฏิสนธิลดลงโดยในสารละลาย DMSO อัตราการปฏิสนธิลดลงจาก 80 เปอร์เซ็นต์เหลือเพียง 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสารละลาย DMSO+BSA อัตราการปฏิสนธิลดลงจาก 75 เปอร์เซ็นต์เหลือ 60 เปอร์เซ็นต์ และที่ 8 นาทีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ทั้ง 2 สารละลาย จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า หลังจากละลายน้ำเชื้อแล้วเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นอัตราการปฏิสนธิจะลดลง

2. **คุณภาพของไข่**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คุณภาพของไข่ปลา yellow perch ลดลงเมื่อปล่อยทิ้งไว้ 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง(Glogowski และCiereszko, 1999 อ้างโดย Ciereszko และคณะ, 1993) และไข่ของปลา yellow perchที่อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ 23, 32, 40, 56, 68 และ77 นาที เมื่อนำไปผสมกับอสุจิพบว่าเมื่อเวลาผ่านไปไข่มีการเสื่อมคุณภาพลง (ตารางผนวกที่ 3) และอุณหภูมิที่ 12 องศาเซลเซียสเหมาะสมต่อการเก็บรักษาไข่มากกว่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส (Glogowski และCiereszko, 1999)

3. วิธีที่ใช้ในการผสมเทียม

Dunham และคณะ (1999) ทดลองการผสมไข่กับน้ำเชื้อของปลา Chanel catfish 3 วิธี คือ

1. Drip method นำไข่ที่อยู่ใน Hank's solution มาใส่ในชามแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของฐานยาวประมาณ 10 เซนติเมตร ซึ่งบรรจุน้ำอยู่สูงประมาณ 5-7 เซนติเมตร ให้ไข่เรียงกันเป็นชั้นที่ 1 แล้วหยดน้ำเชื้อลงไปเล็กน้อย จากนั้นจึงเทไข่ลงไปในชามแก้วให้เกิดเป็นไข่ชั้นที่ 2 หยดน้ำเชื้อลงไปเล็กน้อย ทำอย่างนี้ไปเรื่อยๆจนเป็นไปตามความต้องการ หลังจากนั้นจึงนำไข่ไปฟัก

2. Mix method จะใช้ Hank's solution ยืดอายุของไข่และน้ำเชื้อ นอกจากนี้ Hank's solution ยังสามารถป้องกันไม่ให้ไข่ติดกับภาชนะได้อีกด้วย การผสมไข่กับน้ำเชื้อกระทำโดยผสมน้ำเชื้อกับ Hank's solution ส่วนไข่จะรีดลงใน Hank's solution จากนั้นก็เอาน้ำเชื้อผสมกับไข่แล้วเติมน้ำลงไปประมาณ 3-4 เท่าของปริมาณไข่ด้วยการเทน้ำลงไปช้าๆ และตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที โดยไม่มีการเขย่า แต่ถ้าไข่มีปริมาณมากก็ให้เขย่าเบาๆ

3. Decanted method กระทำโดยรีดน้ำเชื้อสดจากอัณฑะผสมลงในไข่ที่อยู่ใน Hank's solution และเติมน้ำลงไปประมาณ 3-4 เท่าของปริมาณไข่

จากการทดลองนี้สรุปว่า Mix method และ Decanted method มีอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกันแต่ดีกว่า Drip method

4. การเจือจางน้ำเชื้อ

ในปลาไนพบว่านอกจากความเข้มข้นของอสุจิและคุณภาพของไข่มีผลต่อการปฏิสนธิแล้วยังมีปัจจัยเรื่องตัวกลางที่ใช้เจือจางน้ำเชื้ออีกด้วย เนื่องจากตัวกลางมีผลต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิคือถ้าตัวกลางมีความเข้มข้นไม่เท่ากับความเข้มข้นของอสุจิ จะเป็นการกระตุ้นให้อสุจิเกิดการเคลื่อนไหวและตายลง (Kurokura และคณะ, 1984) ในการผสมเทียมปลานิล *Oreochromis spp.* โดยใช้ 12.5 เปอร์เซ็นต์ methanol เจือจางน้ำเชื้อโดยใช้อัตราการเจือจางไม่เท่ากันในสัดส่วนการเจือจาง 1ต่อ2 ถึง 1ต่อ20 ให้ค่าอัตราการปฏิสนธิซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Rana และMcAndrew , 1989)

การเจือจางน้ำเชื้อยังส่งผลกระทบต่อคุณสมบัติอื่นๆด้วย เช่นเมื่อเจือจางน้ำเชื้อทำให้ค่า pH ต่างไปจากเดิม เช่น การเจือจางน้ำเชื้อในปลา rainbow trout; *Salmo gairdneri* ทำให้ค่าpH เพิ่มขึ้น จากการศึกษาถึงผลของpHที่เปลี่ยนแปลงเนื่องจากการเจือจางต่ออัตราการปฏิสนธิพบว่าช่วงpH 5.5-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7 อัตราการปฏิสนธิต่ำ และเพิ่มสูงขึ้นเมื่อค่าpHเพิ่มสูงขึ้น ส่วนอัตราการปฏิสนธิที่ค่าpH 7-8 มีการขึ้นลงของอัตราการปฏิสนธิซึ่งไม่สามารถอธิบายถึงสาเหตุที่แท้จริงได้ และที่pH 8.5 มีอัตราการปฏิสนธิต่ำมากก็ไม่สามารถหาสาเหตุมาอธิบายได้เช่นกัน (Stoss และHoltz, 1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ปลาที่ใช้ทดลอง ได้แก่ ปลาดุกอุย ปลาไน และปลาตะเพียนขาว
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการหาความเข้มข้นของอสุจิ และการเคลื่อนไหว
   2.1. dilution pipet
   2.2. hemacytometer
   2.3. กล้องจุลทรรศน์
   2.4. slide และcover slide
3. อุปกรณ์ในการผสมเทียม
   3.1. ชุดผ่าตัด
   3.2. น้ำเกลือ 0.9 %
   3.3. กะละมังเคลือบ
   3.4. เครื่องชั่งไฟฟ้าชนิดชั่งได้อย่างละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
4. อุปกรณ์ในการตรวจสอบการปฏิสนธิ
   4.1. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ ที่สามารถต่อสัญญาณภาพเข้าวงจรโทรทัศน์ได้

วิธีการ

1. **แผนการทดลอง**

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completety Randomized Design) โดยแบ่งเป็น 4 กลุ่มคือ

กลุ่มที่1 ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $12x10^6$ ตัวต่อไข่300 ฟอง หรือ $4x10^4$ ตัวต่อฟอง

กลุ่มที่2 ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $18x10^6$ ตัวต่อไข่300 ฟอง หรือ $6x10^4$ ตัวต่อฟอง

กลุ่มที่3 ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $24x10^6$ ตัวต่อไข่300 ฟอง หรือ $8x10^4$ ตัวต่อฟอง

กลุ่มที่4 ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $30x10^6$ ตัวต่อไข่300 ฟอง หรือ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง

ในปลาตะเพียนขาว และปลาดุกอุย แต่ละกลุ่มให้อสุจิเข้าปฏิสนธิกับไข่จำนวน 300 ฟอง กลุ่มละ 4 ซ้ำ ส่วนในปลาไนกลุ่มละ 3 ซ้ำ

2. **วิธีการทดลอง**

1. **ขั้นตอนการเตรียมพ่อแม่พันธุ์**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17036

1.1. ปลาตะเพียนขาวและปลาไน กระตุ้นแม่ปลาโดยฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ suprefact 15 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม Motilium 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ทิ้งไว้ 8 ชั่วโมงนำมารีดไข่ ส่วนพ่อพันธุ์ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์

1.2. ปลาดุกอุย กระตุ้นแม่ปลาและพ่อปลา โดยกระตุ้นแม่ปลา 2 ครั้ง ครั้งแรกฉีด suprefact 10 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัมพร้อมด้วย motilium 10มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ทิ้งไว้ 6 ชั่วโมงจึงฉีดครั้งที่สองโดยใช้ suprefact 10 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัมพร้อมด้วย motilium 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ทิ้งไว้ 8-11 ชั่วโมงจึงนำมารีดไข่ ส่วนพ่อปลากระตุ้นเพียงครั้งเดียวโดยฉีดพร้อมกับการฉีดแม่ปลาเข็มที่สองในความเข้มข้นเดียวกัน

2. ตรวจหาการเคลื่อนที่ของอสุจิตามวิธีการของ Suquet และคณะ (1992)

3. ตรวจหาความเข้มข้นของอสุจิตามวิธีการของ Liang (1979) และSorensen (1979)

4. ขั้นตอนการเจือจางและหาปริมาณที่ต้องการใช้

4.1. นำค่าที่ได้จากการนับหาความเข้มข้นของอสุจิต่อ 1 มิลลิลิตร

4.2. เมื่อทราบความเข้มข้นแล้วคำนวณปริมาณน้ำเชื้อที่เจือจางในแต่ละความเข้มข้น เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

5. ขั้นตอนการเตรียมไข่ปลา

5.1. ชั่งไข่ประมาณ 1 กรัม แล้วนับจำนวนไข่เพื่อคำนวณหาค่าน้ำหนักเฉลี่ยต่อฟอง ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ

5.2. คำนวณหาน้ำหนักไข่ 300 ฟอง

5.3. ชั่งไข่ปลาตามน้ำหนักที่คำนวณได้

6. ขั้นตอนตรวจสอบการปฏิสนธิ

ปลาตะเพียนขาว ตรวจสอบการปฏิสนธิหลังการผสมประมาณ 20 นาที นำมาตรวจสอบโดยส่องกับแสงจะพบว่าไข่ที่ได้รับการผสมจะโปร่งแสง ส่วนไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะทึบแสง

ปลาไนและปลาดุกอุย ตรวจสอบการปฏิสนธิหลังการผสมประมาณ 22 ชั่วโมง นำมาตรวจสอบโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำแสดงภาพทางจอโทรทัศน์ โดยไข่ที่ได้รับการผสมจะมีการแบ่งเซลล์เพื่อเจริญเป็นตัวอ่อน ส่วนไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะไม่มีการแบ่งเซลล์เพื่อเจริญเป็นตัวอ่อน

3. **การบันทึกข้อมูล**

3.1. น้ำหนักและความยาวตลอดลำตัวของแม่พันธุ์ปลา

3.2. น้ำหนักและความยาวตลอดลำตัวของพ่อพันธุ์ปลา

3.3. การเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ (sperm motility)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

3.4. ความเข้มข้นของเซลล์อสุจิ (sperm concentration)

3.5. อัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate)

4. **การวิเคราะห์ข้อมูล**

วิเคราะห์หาความแปรปรวนของอัตราการปฏิสนธิในปลาตะเพียนขาว ปลาไน และปลาดุกอุย ด้วยวิธี Analysis of Variance และหาลำดับความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วยวิธี Duncan's Multiple Range Test

5. **สถานที่ทำการทดลอง**

โรงเพาะขยายพันธุ์สัตว์น้ำ ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง กรุงเทพฯ

6. **ระยะเวลาการทดลอง**

23 เมษายน – 28 พฤศจิกายน พ.ศ. 2542

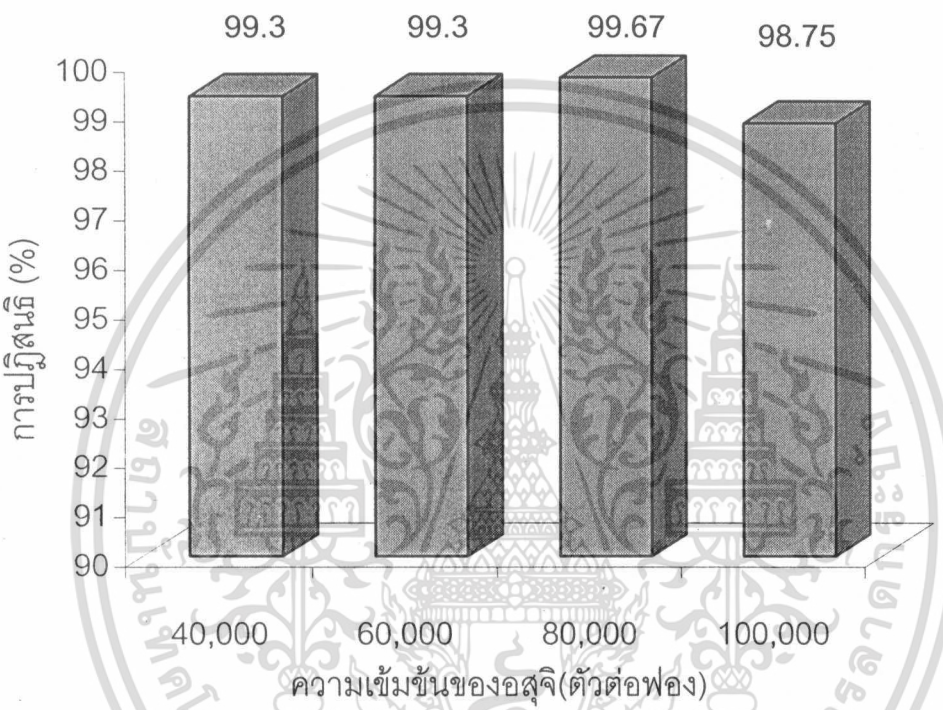
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์

การปฏิสนธิในปลาตะเพียนขาว

จากการทดลองผสมน้ำเชื้อกับไข่ปลาตะเพียนขาว โดยใช้น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหว 90 เปอร์เซ็นต์ ในความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$, $6x10^4$, $8x10^4$และ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิคือ 98.30, 99.30, 99.67 และ98.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ(ภาพที่ 1) ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ($P>0.05$)(ตารางผนวกที่ 6) ผลการทดลองสอดคล้องกับเฉิดฉาย (2538) ที่กล่าวว่าวิธีการเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวโดยการผสมเทียมมีอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไข่ที่สูงคือมีค่าอัตราการปฏิสนธิ 89.33 - 100 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการฟักเป็นตัว 75.64 - 80.00 ที่อุณหภูมิ 26 - 31 องศาเซลเซียส ซึ่งอัตราการปฏิสนธิที่ได้จากการทดลองครั้งนี้มีค่าสูงมากทุกระดับความเข้มข้นของอสุจิ น่าจะขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญคือ ความสมบรูณ์ของไข่กับอสุจิ และความเหมาะสมของความเข้มข้นอสุจิต่อจำนวนไข่ นอกจากนี้คุณสมบัติของไข่ปลาตะเพียนขาวซึ่งเป็นไข่ประเภทครึ่งลอยครึ่งจม ไม่มีสารเหนียวเกาะติดวัตถุทำให้อสุจิเข้าปฏิสนธิกับไข่ได้ง่าย ยังเป็นปัจจัยอันหนึ่งที่ช่วยส่งเสริมให้มีอัตราการปฏิสนธิสูงอีกด้วย ดังนั้นการผสมเทียมปลาตะเพียนขาวควรใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$ ตัวต่อฟอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



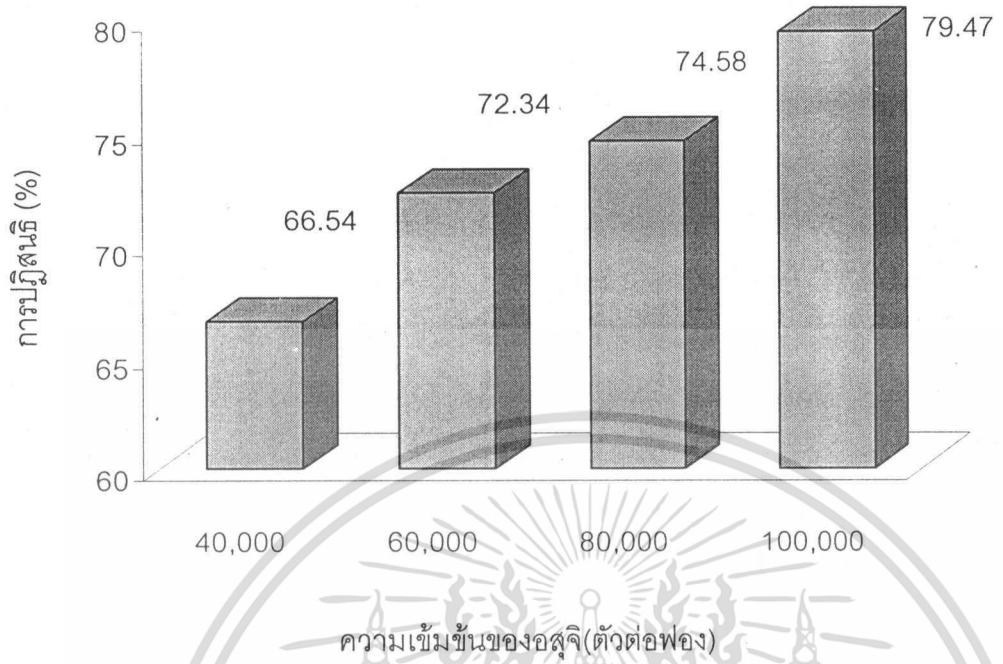
ภาพที่1 อัตราการปฏิสนธิของปลาตะเพียนขาวตามระดับความเข้มข้นของอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปฏิสนธิในปลาไน

จากการทดลองผสมน้ำเชื้อกับไข่ปลาไน โดยใช้น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหว 90 เปอร์เซ็นต์ ในความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$, $6x10^4$, $8x10^4$ และ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิ 66.54, 72.34, 74.58 และ 79.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ(ภาพที่ 2) ซึ่งมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.05$)(ตารางผนวกที่ 9) อัตราการปฏิสนธิมีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$ กับ$8x10^4$, $10x10^4$ ตัวต่อฟอง ส่วนอัตราการปฏิสนธิของกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$ กับ $6x10^4$ ตัวต่อฟอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และอัตราการปฏิสนธิของกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $6x10^4$, $8x10^4$ และ$10x10^4$ ตัวต่อฟองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่1) อัตราการปฏิสนธิของปลาไนที่ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง มีอัตราการปฏิสนธิสูงสุดแต่อย่างไรก็ตามยังคงมีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าการทดลองของ Fauveri และคณะ (1991) พบว่าการผสมเทียมปลาไนยุโรปเมื่อใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $6x10^4$ ตัวต่อฟอง อัตราการปฏิสนธิ 81 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $8x10^3$ ตัวต่อฟอง อัตราการปฏิสนธิ 54 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการปฏิสนธิเป็น 0 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้ความเข้มข้นของอสุจิ 10^3 ตัวต่อฟอง ซึ่งจะเห็นได้ว่าอัตราการปฏิสนธิมีค่าสูงขึ้นตามความเข้มข้นของอสุจิที่เพิ่มขึ้น อัตราการปฏิสนธิเฉลี่ยของปลาไนมีเปอร์เซ็นต์ต่ำกว่าปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุย เป็นเพราะคุณสมบัติของไข่ไม่เอื้ออำนวยต่อการผสมเทียม เนื่องจากไข่ปลาไนเป็นไข่จมประเภทติดวัตถุ โดยเมื่อไข่ถูกน้ำแล้วจะติดแน่นมากกว่าไข่ปลาดุกอุยและไข่ยังติดกันเองเป็นแพอีกด้วย จึงเป็นไปได้ที่ส่วน microphyle ของไข่จะติดกับวัตถุหรือติดกันเองจนอสุจิไม่สามารถเข้าปฏิสนธิได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่2 อัตราการปฏิสนธิของปลาไนตามระดับความเข้มข้นของอสุจิ

ตารางที่1 อัตราการปฏิสนธิที่มีความแตกต่างกันทางสถิติของปลาไน

ความเข้มข้นของอสุจิ (ตัวต่อฟอง)	อัตราการปฏิสนธิ (เปอร์เซ็นต์)
1. $4x10^4$	66.54^a
2. $6x10^4$	72.34^{ab}
3. $8x10^4$	74.58^b
4. $10x10^4$	79.47^b

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรเหมือนกันหมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

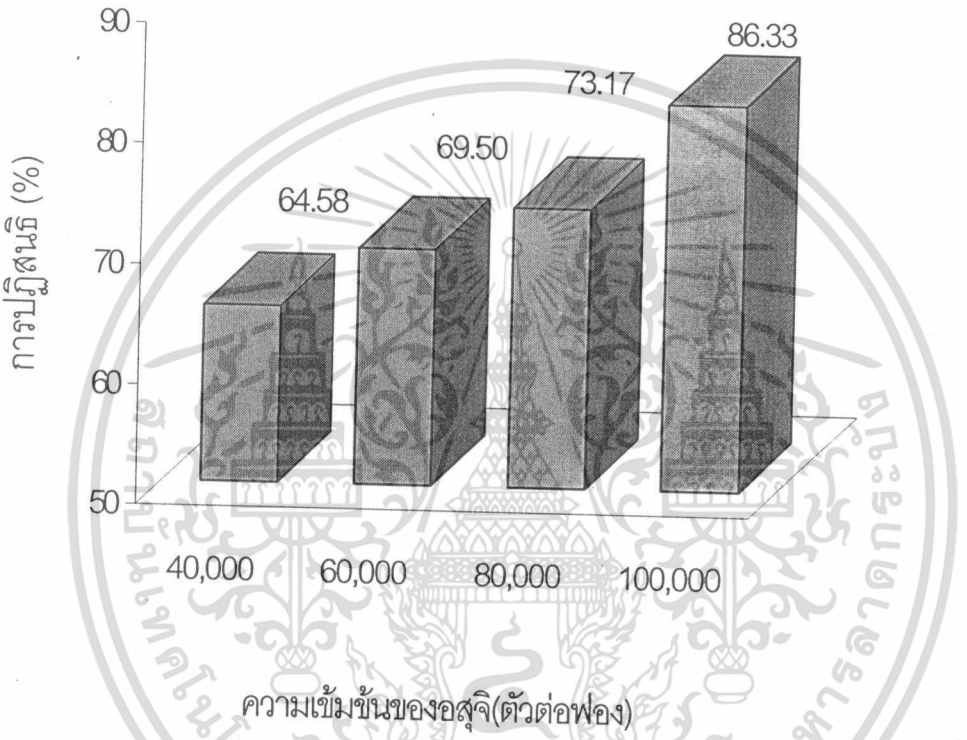
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปฏิสนธิในปลาดุกอุย

จากการทดลองผสมน้ำเชื้อกับไข่ปลาดุกอุย โดยใช้น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหว 80 เปอร์เซ็นต์ ในความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$, $6x10^4$, $8x10^4$และ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิคือ 64.58, 69.50, 73.17 และ86.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ภาพที่ 3) ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางผนวกที่ 12) แต่พบว่าอัตราการปฏิสนธิมีค่าสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของอสุจิ ซึ่งมีค่าอัตราการปฏิสนธิของกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของอสุจิสอดคล้องกับกฤษณ์ (2536)กล่าวว่า อัตราการปฏิสนธิของปลาดุกอุยมีค่าอยู่ในช่วง 68.3 $\pm$ 3.6 เปอร์เซ็นต์ และปลาดุกอุยมีอัตราการฟัก 50 - 70 เปอร์เซ็นต์(Panu และคณะ, 1996)แต่กลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง มีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการทดลองของกฤษณ์ (2536) และเมื่อเปรียบเทียบกับการทดลองของ Bart และคณะ (1999) ที่รายงานว่าการผสมเทียมปลา channel catfish โดยใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $5x10^5$ ตัวต่อฟอง มีอัตราการปฏิสนธิ 100 เปอร์เซ็นต์ จะเห็นได้ว่าจากการทดลองครั้งนี้มีอัตราการปฏิสนธิต่ำอาจเนื่องมาจากการใช้ความเข้มข้นของอสุจิน้อยเกินไป อัตราการปฏิสนธิของปลาดุกอุยมีค่าสูงกว่าปลาไนแต่ต่ำกว่าปลาตะเพียนขาว ซึ่งคาดว่าเกิดจากคุณสมบัติของไข่คือ ไข่ปลาดุกอุยเป็นไข่จมชนิดติดวัตถุ จึงทำให้อสุจิเข้าผสมได้ยากกว่าไข่ครึ่งลอยครึ่งจมอย่างไข่ปลาตะเพียนขาว และเมื่อเปรียบเทียบไข่ปลาไนกับไข่ปลาดุกอุยซึ่งเป็นไข่จมติดวัตถุเหมือนกันแต่ไข่ปลาไนมีสารเหนียวมากกว่าไข่ปลาดุกอุย โดยสังเกตได้จากไข่ปลาไนเมื่อถูกน้ำจะเกาะติดกับภาชนะทันทีทั้งภาชนะที่เป็นจานแก้วหรือกะละมังเคลือบและติดกันเองแน่นเป็นแพ ในขณะที่ไข่ปลาดุกอุยจะไม่ติดกับภาชนะที่เป็นกะละมังเคลือบและไข่ไม่ติดกันเองแน่นมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

99394



ภาพที่3 อัตราการปฏิสนธิของปลาดุกอุยตามระดับความเข้มข้นของอสุจิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. การปฏิสนธิในปลาตะเพียนขาว โดยใช้น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหว 90 เปอร์เซ็นต์ ในความเข้มข้น $4x10^4$, $6x10^4$, $8x10^4$ และ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง อัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 99.3, 99.3, 99.67 และ98.75 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ซึ่งเป็นแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ($P>0.05$) ดังนั้นในการเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวโดยวิธีการผสมเทียมควรใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$ ตัวต่อฟอง และควรมีการศึกษาทดลองการปฏิสนธิปลาตะเพียนขาวโดยใช้ระดับความเข้มข้นของอสุจิต่ำกว่า $4x10^4$ ตัวต่อฟอง

2. การปฏิสนธิในปลาไน โดยใช้น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหว 90 เปอร์เซ็นต์ ในความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$, $6x10^4$, $8x10^4$ และ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง อัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 66.5, 72.34, 74.58 และ 79.47 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.05$)โดยอัตราการปฏิสนธิของกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$กับ $8x10^4$ และ$10x10^4$ ตัวต่อฟองมีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่ไม่แตกต่างกับกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้น $6x10^4$ ตัวต่อฟองและกลุ่มที่ใช้ความเข้มข้นของอสุจิ $6x10^4$, $8x10^4$ และ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ดังนั้นการเพาะขยายพันธุ์ปลาไนโดยวิธีผสมเทียมควรใช้ความเข้มข้นของอสุจิไม่ต่ำกว่า $6x10^4$ ตัวต่อฟอง และควรมีการศึกษาทดลองการปฏิสนธิปลาไนโดยใช้ความเข้มข้นของอสุจิมากกว่า $10x10^4$ ตัวต่อฟอง

3. การปฏิสนธิในปลาดุกอุย โดยใช้น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหว 80 เปอร์เซ็นต์ ในความเข้มข้นของอสุจิ $4x10^4$, $6x10^4$, $8x10^4$ และ $10x10^4$ ตัวต่อฟอง อัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 64.58, 69.50, 73.17 และ86.33 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ($P>0.05$) แต่อัตราการปฏิสนธิมีค่าต่ำจึงควรมีการศึกษาทดลองการปฏิสนธิของปลาดุกอุยโดยใช้ความเข้มข้นของอสุจิมากกว่า $10x10^4$ ตัวต่อฟอง และควรคัดเลือกแม่ปลาให้มีความสมบูรณ์ของไข่สม่ำเสมอกันให้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา และทัศนีย์ ภูพิพัฒน์. 2535. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. วารสารการประมง 45 (6):111-125.

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

กิจจา ใจเย็น, พินิจ สีห์พิทักษ์เกียรติ, ผอบ ใจเย็น และวัฒนะ ลีลาภัทร. 2526. การเพาะพันธุ์ปลาเนื้ออ่อนโดยวิธีการผสมเทียม. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 26 น.

เกียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2540. คุณภาพอสุจิสดและอัตราการผสมของไข่ปลาไนยุโรปโดยน้ำเชื้อแช่แข็ง. วารสารการประมง 50 (1):47-54.

เฉิดฉัน อมาตยกุล. 2538. ปลาดุก. กองประมงน้ำจืด. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 64 น.

เฉิดฉัน อมาตยกุล. 2538. ปลาตะเพียนขาว. กองประมงน้ำจืด. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 141 น.

วิทย์ ธารชลานุกิจ. 2521. การเพาะและขยายพันธุ์ปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตร, กรุงเทพฯ. 300 น.

ศักดิ์ชัย ชูโชติ. 2538. การเพาะและอนุบาลปลาน้ำจืด. ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กรุงเทพฯ. 91 น.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2538. การเพาะพันธุ์และเลี้ยงปลาดุก. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. คณะประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 124 น.

Amrit, N. 1998. Cryopreservation of blue catfish spermatozoa and subsequent fertilization of channel catfish eggs. Transactions of the American-fisheries Society. 127:819-824.

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

Ciereszko A., K. Dabrowski, F. Lin, S.A. Christ and G.P. Toth. 1999. Effects of extenders and time of storage before freezing on motility and fertilization of cryopreserved muskellunge spermatozoa. Transactions of the American-fisheries Society. 128:542-548.

Badiak I., J. Glogowski, R. Kujawa, D. Kucharczyk and A. Mamcarz. 1998. Cryopreservation of sperm from asp *Aspius aspius*. The Progressive Fish-Culturist. 60:146-148.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Glogowski J., A. Ciereszko and K. Dabrowski. 1999. Cryopreservation of muskellunge and yellow perch semen. North American Journal of Aquaculture. 61:258-262.

Kurokura, H., R. Hirano., M. Tomita and M. Iwahashi. 1988. Cryopreservation of carp sperm. Aquaculture. 37:267-273.

Lahnsteiner. F., T. Weismann, and R.A Patzner. 1991. Fine structural changes in spermatozoa of the grayling, *Thymallus thymallus* (Pisces:Teleostei) , during routine cryopreservation. Aquaculture. 103:73-84.

Rana, K.J. and B.J. Mcandrew. 1989. The viability of cryopreserved Tilapia spermatozoa. Aquaculture. 76: 335-345.

Rex A. Dunham., Amrit N. Bart and Huseying kueutas. 1999. Effects of fertilization method and of seletion for body weight and species on fetilization efficiency of channel catfish eggs with blue or channel catfish sperm, North American Journal of Aquaculture. 61:156-161.

Stoss J. and W. Holtz. 1981. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm.II. Effect of pH and presence of a buffer in the diluent. Aquculture. 25:217-222.

_____. 1983. Cryopreservation of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) sperm.III. Effect of proteins in the diluent,sperm from different males and interval between sperm collection and freezing. Aquculture. 31:275-282.

Young, J.A., M.F. Capra, and A.W. Blackshaw. 1992. Cryopreservation of summer whiting (*Sillago ciliata*) spermatozoa. Aquaculture. 102:155-160.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

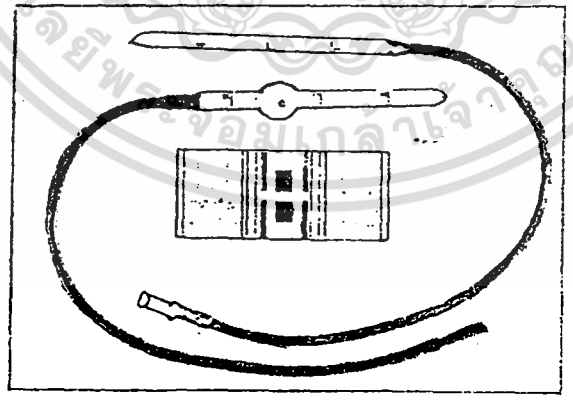
ภาคผนวก

การตรวจหาการเคลื่อนไหวโดยวิธีการของ Suquet และคณะ (1992)

หยดน้ำเชื้อสดลงบนสไลด์แล้วปรับหาภาพ หยดน้ำลงบนสไลด์เช่นเดียวกันแต่ยังไม่ให้ผสมกับน้ำเชื้อ หลังจากนั้นจึงให้มองดูหยดน้ำเชื้อในกล้อง แล้วแตะหยดน้ำเข้ากับตัวอย่างน้ำเชื้อจะทำให้มองเห็นการเคลื่อนไหวของเซลล์อสุจิ และประเมินออกมาได้ทันก่อนที่เซลล์อสุจิจะตาย โดยประเมินการเคลื่อนไหวของอสุจิออกเป็น 10 ระดับ โดยระดับ 1 หมายถึง เซลล์อสุจิที่อ่อนแอมาก ส่วนระดับ 10 หมายถึง เซ่ลล์อสุจิมีการเคลื่อนไหวปราดเปรียวที่สุด

การตรวจหาความเข้มข้นของอสุจิโดยวิธีการของ Liang (1979) และSorensen (1979)

dilution pipette และ hemacytometer มีลักษณะดังภาพผนวกที่1 Fuchs-Rosenthal hemacytometer จะมีช่องนับซึ่งเมื่อปิดแผ่นกระจกบางแล้ว บริเวณช่องนับจะลึกจากผิวด้านล่างของแผ่นกระจกบาง 0.2 มิลลิเมตร บนช่องนับจะมีตารางอยู่ ซึ่งประกอบด้วยสีเหลี่ยมจตุรัสใหญ่ 16 ช่อง แต่ละช่องมีพื้นที่ 1.0 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรน้ำเชื้อระหว่างแผ่นกระจกบางกับสี่เหลี่ยมจัตุรัสแต่ละช่องเท่ากับ 1.0 x 0.2 หรือเท่ากับ 1/5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร วิธีการนับจำนวนเซลล์อสุจิจากการใช้ Fuchs-Rosenthal hemacytometer จะสุ่มนับจำนวนเซลล์อสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่เพียง 1 ช่อง



ภาพผนวกที่1 hemacytometer และ dilution pipette

ที่มา: Bearden และFuguay (1980)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไปเปตเจือจางน้ำเชื้อ เป็นไปเปตสำหรับการตรวจนับเม็ดเลือดแดง โดยมีอัตราการเจือจาง 1/200

การเจือจางและการเตรียมน้ำเชื้อเพื่อตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิมีดังนี้ คือ

1. กลับหลอดน้ำเชื้อไปมาเพื่อให้น้ำเชื้อเข้ากันดี
2. ดูดน้ำเชื้อเข้าไปในไปเปตเจือจางน้ำเชื้อถึงขีด 0.5
3. ดูดไปเปตเจือจางน้ำเชื้อให้มีอากาศเข้ามาตรงปลายเล็กน้อยแล้วเช็ดปลายไปเปตให้สะอาด
4. ดูดสารเจือจางน้ำเชื้อให้ถึงขีด 101 ด้วยไปเปตเจือจางน้ำเชื้อในข้อ2. (สารละลายเจือจางน้ำเชื้อใช้ไกลือ 0.9 %
5. ใช้หัวแม่มือและนิ้วชี้อุดปลายทั้งสองข้างของไปเปต และเขย่าไปเปตเพื่อให้น้ำเชื้อและสารเจือจางน้ำเชื้อเข้ากันดี
6. ปล่อยส่วนผสมทิ้งไป 4 ถึง 5 หยด
7. วางแผ่นกระจกบางเหนือช่องนับของสไลด์
8. หยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วที่ขอบของแผ่นกระจก เพื่อให้น้ำเชื้อเข้าไปเต็มพื้นที่ได้แผ่นกระจก การหยดน้ำเชื้อในขั้นตอนนี้ต้องให้พอดีกับพื้นที่ใต้กระจก ถ้าหยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วมากเกินไปจะทำให้น้ำเชื้อล้นออกจากขอบของแผ่นกระจกบาง ทำให้การตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิเป็นไปได้ยากและไม่เที่ยงตรง
9. ปล่อยน้ำเชื้อที่เจือจางไว้สักครู่เพื่อให้เซลล์อสุจิอยู่คงที่ แล้วจึงเริ่มตรวจนับจำนวนเซลล์อสุจิ (ศักดิ์ชัย,2538)

การเตรียมสาร

1. Hank Solutionประกอบด้วย

NaCl	8.00	กรัม
KCl	0.40	กรัม
CaCl	0.14	กรัม
$MgSO_4\ 9H_2O$	0.20	กรัม
$NaHPO_4\ 7H_2O$	0.06	กรัม
KH_2PO_4	0.03	กรัม
$NaHCO_3$	0.17	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคส 1.00 กรัม

นำสารละลายทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในเท่ากับ 1 ลิตร คน เป็นเวลา 20 นาที โดยสารละลาย Hank's solution ต้องทำการเตรียมใหม่ทุกวัน

2. น้ำเกลือ 0.9 % จำนวน 1 ลิตร
   - เตรียมเกลือ (NaCl) 7 กรัม มาละลายในน้ำกลั่นจนมีปริมาณ 1 ลิตร โดยใช้ volomic flas ในการเตรียม

ตารางผนวกที่ 1 ส่วนประกอบของสารละลายทั้ง 4 ชนิด

สารที่ผสม	วิธีที่1	วิธีที่2	วิธีที่3	วิธีที่4
NaCl	10	10	193	128
KCl	23	23	19	5
CaCl	5	5	2	-
MgSO4	0.6	0.6	0.8	-
NaH2PO4				
NaHCO3	-	-	-	0.4
Tris	24	24	-	-
Glucose	-	-	3	5
Glycine	-	-	66	-
DMSO (%)	10	10	10	10
ไข่แดง (%)	-	-	20	20
BSA (%)	-	0.4	-	-

หมายเหตุ DMSO คือ Dimeth-Sultoxide

BSA คือ Bovine serum albumen

ที่มา: Lahnsteiner และคณะ, (1992)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 2 อัตราการปฏิสนธิของปลาแซลมอนต่อวิธีการทั้ง 4 ชนิด

วิธีการ	อัตราการปฏิสนธิ	
	$2.5x10^3$ ตัวต่อฟอง	$1.2x10^4$ ตัวต่อฟอง
1. Buyukhatipoglu and Holt (1978)	10	35
2. Buyukhatipoglu and Holt (1978)BSA	10	35
3. Borchard and Schmidtc (1979) (V7)	5	80
4. Stein and Bayrle (1985)	5	35
น้ำเชื้อสด	90	-

ที่มา: Lahnsteiner และคณะ, (1992)

ตารางผนวกที่ 3 อัตราการปฏิสนธิของไข่ปลาต่อเวลา

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา (นาที)	อัตราการปฏิสนธิ (เปอร์เซ็นต์)
12	11	91.5
	72	74.5
10	23	61.4
	32	57.2
	40	59.3
	56	64.7
	68	64.9
	77	59.2

ที่มา: Glogowski และCiereszko, (1999)

การประเมินพ่อปลาตะเพียนขาว

1. น้ำหนักรวม	106	กรัม
2. ความยาวตลอดลำตัว	20.6	เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. อัตราการเคลื่อนไหว	90	เปอร์เซ็นต์
4. ความเข้มข้นของอสุจิ	$2.82x10^{10}$	ตัวต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ตารางผนวกที่ 4 ลักษณะทางสันฐานวิทยาของแม่ปลาตะเพียนขาว

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักรวม	ความยาวตลอดลำตัว	ลักษณะไข่
1	240	25.7	เม็ดสีขาวโปร่งแสง
2	210	23.5	เม็ดสีขาวโปร่งแสง
3	180	23.0	เม็ดสีขาวโปร่งแสง
4	170	23.0	เม็ดสีขาวโปร่งแสง

ตารางผนวกที่ 5 อัตราการปฏิสนธิปลาตะเพียนขาว

กลุ่ม/ซ้ำ	กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 3	กลุ่ม 4	ค่าเฉลี่ย
ซ้ำที่ 1	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
ซ้ำที่ 2	100.00	99.67	99.33	95.33	98.58
ซ้ำที่ 3	100.00	98.33	99.33	99.67	99.33
ซ้ำที่ 4	97.33	99.33	100.00	100.00	99.17
ค่าเฉลี่ย	99.33	99.33	99.67	98.75	

ตารางผนวกที่ 6 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการปฏิสนธิปลาตะเพียนขาว

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	1.737	3	0.579	0.302^{NS}	0.824	3.490
Within Groups	23.028	12	1.919			
Total	24.765	15				

NS หมายถึงไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการประเมินพ่อปลาไน

1. น้ำหนักรวม	750	กรัม
2. ความยาวตลอดลำตัว	35.6	เซนติเมตร
3. อัตราการเคลื่อนไหว	90	เปอร์เซ็นต์
4. ความเข้มข้นของอสุจิ	$1.56x10^{10}$	ตัวต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ตารางที่ 7 ลักษณะทางสันฐานวิทยาของแม่ปลาไน

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักรวม(กรัม)	ความยาวตลอดลำตัว (เซนติเมตร)	ลักษณะไข่
1	700	32	น้ำตาลเหลือง
2	600	29.7	น้ำตาลส้ม
3	800	33.8	น้ำตาลเหลือง

ตารางผนวกที่ 8 อัตราการปฏิสนธิของปลาไน

กลุ่ม/ซ้ำ	กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 3	กลุ่ม 4	ค่าเฉลี่ย
ซ้ำ 1	62.91	72.64	74.74	78.92	72.30
ซ้ำ 2	71.25	71.20	78.49	75.67	74.15
ซ้ำ 3	65.47	73.18	70.51	83.82	73.25
ค่าเฉลี่ย	66.54	72.34	74.58	79.47	

ตารางผนวกที่ 9 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของอัตราการปฏิสนธิปลาไน

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	258.791	3	86.264	6.626*	0.015	4.066
Within Groups	104.145	8	13.018			
Total	362.936	11				

***หมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(P<0.05)**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การประเมินพ่อปลาดุกอุย

1. น้ำหนักรวม	104	กรัม
2. ความยาวตลอดลำตัว	25.3	เซนติเมตร
3. อัตราการเคลื่อนไหว	80	เปอร์เซ็นต์
4. ความเข้มข้นของอสุจิ	$1.55x10^7$	ตัวต่อลูกบาศก์เซนติเมตร

ตารางผนวกที่ 10 ลักษณะทางสันฐานวิทยาของแม่ปลาดุกอุย

จำนวนซ้ำ	น้ำหนักรวม (กรัม)	ความยาวตลอดลำตัว(เซนติเมตร)	ลักษณะไข่
1	128	26.6	เม็ดไข่สีเทา
2	308	34.2	เม็ดไข่สีเทา
3	120	25	เม็ดไข่สีเทา
4	217	28.1	เม็ดไข่สีเทา

ตารางผนวกที่ 11 อัตราการปฏิสนธิของปลาดุกอุย

กลุ่ม/ซ้ำ	กลุ่ม 1	กลุ่ม 2	กลุ่ม 3	กลุ่ม 4	ค่าเฉลี่ย
ซ้ำ 1	68.33	71.33	60.00	76.00	68.92
ซ้ำ 2	74.33	67.00	81.33	82.33	76.25
ซ้ำ 3	64.67	69.00	83.00	83.67	75.09
ซ้ำ 4	51.00	70.67	68.33	79.33	67.33
ค่าเฉลี่ย	64.58	69.50	73.17	86.33	

ตารางผนวกที่ 12 ผลการวิเคราะห์สถิติของอัตราการปฏิสนธิปลาดุกอุย

ANOVA

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Between Groups	528.052	3	176.017	3.018^{NS}	0.072	3.490
Within Groups	699.761	12	58.313			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวกที่ 12 (ต่อ)

Source of Variation	*SS*	*df*	*MS*	*F*	*P-value*	*F crit*
Total	1227.813	15				

NSหมายถึงไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้