

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*)

รัชดาภรณ์ อินทเกษร

๗๕๐๐๒๑๐๖๕

24 ก.ค. 2557

340280

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาค้นคว้าตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์

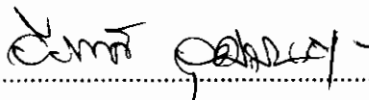
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

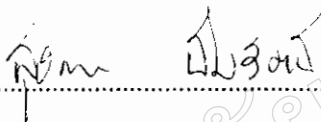
มิถุนายน 2557

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

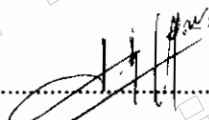
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ รัชดาภรณ์ อินทเกษร ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

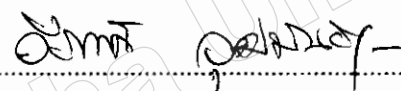
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

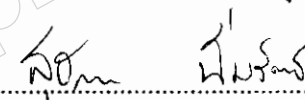
.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

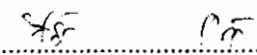
.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุบันจิต นิมรัตน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

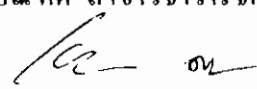
.....ประธาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชงโค แซ่ตั้ง)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุบันจิต นิมรัตน์)

.....กรรมการ
(ดร. นรินทร์รัตน์ คงจันทร์ตรี)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพา

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 11 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความเมตตาช่วยเหลือจาก รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร.สุบัตินิต นิ่มรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ เคี่ยวเข็ญ ให้ความรู้ และข้อเสนอแนะในการแก้ไข ปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนถูกต้อง และสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชงโค แซ่ตั้ง (ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก วิทยาเขตบางพระ) และผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่าน ที่กรุณาให้ความรู้ให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไขและวิจารณ์ผลงาน ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่านที่ได้ประสาทวิชาความรู้ให้แก่ข้าพเจ้า ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อประทีป คุณแม่ประนอม อินทเกษร และสมาชิกทุกคนในครอบครัว ที่ได้อบรมเลี้ยงดูข้าพเจ้า คอยให้กำลังใจ และสนับสนุนในทุกๆ ด้านอย่างดีเสมอมา ขอขอบคุณ นายปริญญา อันขวัญเมือง หัวหน้าด้านตรวจสอบตัวจังหวัดชลบุรีและเพื่อนร่วมงานทุกท่านสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์นี้จนสำเร็จ

คุณค่าและประโยชน์จากวิทยานิพนธ์ ขอมอบเป็นกตัญญูคุณบิดาแม่ บุพการี บุรพจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนครบเท่าทุกวันนี้

รัชดาภรณ์ อินทเกษร

52910145: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; วท.ม. (วาริชศาสตร์)

คำสำคัญ: ปลาดะเพียนขาว/ คุณภาพสเปิร์ม/ ออสโมลาริตี/ การแช่แข็ง/ การลดอุณหภูมิ/ การละลาย

รัชดาภรณ์ อินทเกษร: การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดะเพียนขาว(DEVELOPMENT OF CRYOPRESERVATION TECHNIQUE FOR SILVER BARB (*BARBODES GONIONOTUS*) SPERM.

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วีรพงษ์ วุฒิพันธุ์ชัย, Ph.D., สุบัณฑิต นิมรัตน์ Ph.D. 89 หน้า. ปี. พ.ศ. 2557.

การพัฒนาเทคนิคน้ำเชื้อแช่แข็งปลาดะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดะเพียนขาว แบ่งการทดลองเป็น 5 ตอน คือ ตอนที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาดะเพียนขาวในช่วงฤดูผสมพันธุ์ พบว่า เดือนสิงหาคม (ช่วงฤดูฝน) เป็นช่วงที่น้ำเชื้อปลาดะเพียนขาว มีความสมบูรณ์ที่สุดมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงเท่ากับ 100% ตอนที่ 2 ศึกษาแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ในสารละลาย CaCl_2 , KCl , NaCl , Sucrose และ Mannitol ที่ระดับความเข้มข้น 0-500 mM โดยความเข้มข้นเพิ่มขึ้นทีละ 50 mM พบว่าเมื่อระดับค่าออสโมลาริตีเพิ่มมากขึ้น การเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลง และสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อมีค่าออสโมลาริตีมากกว่า 300 mOsm/kg ขึ้นไป ตอนที่ 3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ ด้วยสารโคริโอโพรเทกแทนท์ DMSO, Methanol, Ethylene Glycol (EG) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15%, 20% ผสมสรีละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$, $-5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ และ $-8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ พบว่า การแช่แข็งที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-8^{\circ}\text{C}/\text{min}$ และ ใช้ 10% DMSO มีความเป็นพิษน้อยที่สุด ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่สูงถึง $91.85 \pm 2.20\%$ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยหลอด cryovial 1.5 ml พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิ $-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ และอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อ 70°C นาน 70 วินาที ทำให้มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ $87.40 \pm 3.22\%$ ตอนที่ 4 การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดะเพียนขาวภายในกล่องโฟม โดยใช้หลอด cryovial 1.5ml วางสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนในระดับที่ต่าง ๆ กัน (2.4 และ 6 cm) และระยะเวลาการลดอุณหภูมิที่ต่าง ๆ กัน (10 และ 15 min) พบว่า ที่ความสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลว 6 cm ด้วยระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 min มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุดเท่ากับ $62.96 \pm 2.54\%$ มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับความสูงเหนือผิวหน้าในโตรเจนเหลว 2 และ 4 cm ที่ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 min ตอนที่ 5 ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นเวลา 3 เดือน พบว่า มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

52910145: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.Sc. (AQUATIC SCIENCE)

KEYWORDS: *BARBODES GONIONOTUS*/ SPERM QUALITY/ OSMOLALITY/

CRYOPRESERVATION/ FREEZING RATE/ THAWING

RATCHADAPORN INTAKASRON: DEVELOPMENT OF CRYOPRESERVATION
TECHNIQUE FOR SILVER BARB (*BARBODES GONIONOTUS*) SPERM. ADVISORY
COMMITTEE: VERAPONG VUTHIPHANDCHAL, Ph.D., SUBUNTITH NIMRAT, Ph.D. 89 P. 2014.

Semen cryopreservation technique for silver barb (*Barbodes gonionotus*) was aimed to develop the freezing technique by dividing into 5 experiments. First experiment evaluated change in sperm quality during the spawning season and found sperm with high motility (100%) in August (rainy season). Second experiment studied the effect of osmotic pressure on sperm motility using CaCl_2 , KCL, NaCl, sucrose and mannitol at concentrations from 0-500 mM with 50 mM increment. Low osmotic pressure resulted in high sperm motility while high osmotic pressure suppressed sperm motility. Third experiment related with semen cryopreservation using the programmable freezer using Ca-F HBSS in dimethylsulfoxide (DMSO), methanol and ethylene Glycol (EG) at final concentrations of 5, 10, 15 and 20%. The use of freezing rate $-8^\circ\text{C}/\text{min}$ and 10% DMSO resulted in high post-thawed sperm motility ($91.85 \pm 2.20\%$). Freezing of semen in cryotube 1.5 mL at $-1^\circ\text{C}/\text{min}$ and thawing at 70°C for 70 s had motility about $87.40 \pm 3.22\%$. Fourth experiment was accomplished by freezing semen in the Styrofoam box using 1.5 mL cryotube at 2, 4 and 6 cm above liquid nitrogen surface for 10 and 15 minutes. Highest post-thawed motility ($62.96 \pm 2.54\%$) was observed from treatment with 6 cm above liquid nitrogen surface for 10 minutes, significantly higher ($P < 0.05$) than those at 2 and 4 cm above liquid nitrogen surface for 10 and 15 minutes. The last experiment evaluated the effect of storage time in liquid nitrogen tank (-196°C) on post-thawed sperm motility and found a decline of sperm motility after 3 months of cryostorage.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	จ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
สมมติฐานของการศึกษา.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
ขอบเขตของการวิจัย.....	4
นิยามศัพท์.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	6
ปลาตะเพียนขาว.....	6
การเก็บน้ำเชื้อปลา.....	9
ระบบสืบพันธุ์และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในปลา	11
การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา.....	21
3 วิธีดำเนินการวิจัย.	35
ดำเนินงาน.	35
สถานที่ทำการวิจัย.....	35
สัตว์ทดลอง.....	35
อุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา....	35

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม.....	36
อุปกรณ์ที่ใช้ในการตรวจสอบสเปิร์มที่มีชีวิต.....	36
สารเคมี.....	36
วิธีดำเนินการวิจัย.....	37
4 ผลการวิจัย.....	53
การทดลองที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงฤดูผสมพันธุ์ วางไข่.....	53
การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของ สเปิร์ม.....	54
การทดลองที่ 3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมือ อัดไนโตรเจน.....	60
การทดลองที่ 4 การแช่แข็งน้ำปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟม.....	64
การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถัง ไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นเวลานาน 3 เดือน.....	65
5 อภิปรายและสรุปผล.....	68
การทดลองที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงฤดูผสมพันธุ์ วางไข่.....	68
การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม.....	69
การทดลองที่ 3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมือ อัดไนโตรเจน.....	72

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
การทดลองที่ 4 การแช่แข็งน้ำปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟม.....	75
การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลานาน 3 เดือน.....	76
สรุปและข้อเสนอแนะ.....	77
บรรณานุกรม.....	78
ภาคผนวก.....	87
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	89

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่.....	53
2 เพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและระดับออสโมลาริตีในสารละลายกลุ่มที่มีประจุ CaCl_2 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....	55
3 เพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและระดับออสโมลาริตีในสารละลายกลุ่มที่มีประจุ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....	56
4 เพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและระดับออสโมลาริตีในสารละลายกลุ่มที่มีประจุ KCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....	57
5 เพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและระดับออสโมลาริตีในสารละลายกลุ่มที่ไม่มีประจุ Mannitol ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....	58
6 เพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและระดับออสโมลาริตีในสารละลายกลุ่มที่ไม่มีประจุ Sucrose ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน.....	59
7 เพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว เจือจางใน DMSO, Methanol และ Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ $-1^\circ\text{C}/\text{min}$	60
8 เพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว เจือจางใน DMSO, Methanol และ Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ $-5^\circ\text{C}/\text{min}$	61
9 เพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว เจือจางใน DMSO, Methanol และ Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ $-8^\circ\text{C}/\text{min}$	62
10 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ $-1^\circ\text{C}/\text{min}$, $-5^\circ\text{C}/\text{min}$ และ $-8^\circ\text{C}/\text{min}$	62
11 เพอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวในการบ่มแข็งด้วยสารละลาย 10 % DMSO ด้วยหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 1.5 ml โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กัน หลังการแช่แข็ง นำมาละลายที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่าง ๆ (30°C , 50°C , 70°C และ 90°C)	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
12	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวในการแข่งวิ่งด้วยสารละลาย 10 % DMSO ด้วยหลอดบรรจุน้ำเชื้อ 3 ขนาด โดยใช้เทคนิคการแข่งวิ่ง ในกล้องโฟม ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนระดับต่าง ๆ กัน อัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กัน..... 65
13	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแข่งวิ่งสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 10% DMSO เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยเปรียบเทียบระหว่างเครื่องมืออัตโนมัติ และกล้องโฟม..... 66
14	ระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (min) หลังการแข่งวิ่งสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 10% DMSO เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) เป็นระยะเวลา 3 เดือนโดยเปรียบเทียบระหว่างเครื่องมืออัตโนมัติ และกล้องโฟม 67

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 ลักษณะของปลาตะเพียนขาว.....	6
2 เปรียบเทียบลักษณะปลาตัวผู้และตัวเมียที่สมบูรณ์เพศ.....	8
3 เปรียบเทียบลักษณะเพศปลาตัวผู้และตัวเมีย.....	9
4 การรีดน้ำเชื้อปลา.....	18
5 อุปกรณ์สำหรับเก็บน้ำเชื้อ (หลอดฟาง หลอดชนิดยา และหลอดโครีโอ).....	26
6 การบรรจุสารละลายน้ำเชื้อลงในหลอดฟางใช้ไมโครปิเปต.....	26
7 เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ.....	28
8 อุปกรณ์สำหรับการลดอุณหภูมิแบบกล่องโฟม.....	29
9 ถังเก็บไนโตรเจนเหลว.....	30
10 ถังเก็บตัวอย่างในไนโตรเจนเหลว.....	30
11 การละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง.....	32
12 วิธีปฏิบัติในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง.....	34
13 วิธีการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่.....	38
14 การศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม.....	41
15 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ.....	43
16 วิธีการศึกษาผลของขนาดหลอดที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อและอัตรา การเพิ่มอุณหภูมิ ในการ ละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง.....	45
17 วิธีการแช่แข็งน้ำปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟม (เครื่องมืออย่างง่าย)	47

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
18 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคะพงขาวในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลานาน 3 เดือนแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ.....	49
19 วิธีการศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคะพงขาวในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลานาน 3 เดือนแช่แข็งด้วยเครื่องมืออย่างง่าย.....	51