การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกโดยการแช่เย็นและแช่แข็ง

The Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*)From the Refrigerated and Cryopreservation Sperm

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน[1] **และ** Amarit N Bart[2]

[1]**คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้**

[2]School of Environment Resources and Development, Asian Institute of Technology (AIT)

บทคัดย่อ

การศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ การผสม และอัตราการมีชีวิตของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึกที่เก็บในปริมาตร อัตราส่วนและระยะเวลาที่ต่างกัน ผลการศึกษาพบว่าเก็บรักษาในตู้เย็นนาน 48 ชั่วโมง น้ำเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด 65.67±1.76 % ส่วนเก็บในสารละลาย HBSS ที่ปริมาตร 1 ml น้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็ง นาน 2 เดือน ในอัตราส่วน 1:3 (น้ำเชื้อ: สารละลาย) อัตราการผสมเฉลี่ย (%) เก็บในปริมาตร 1 ml มีอัตราการผสมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 25.65 ± 9.64 % ส่วนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาบึกหลังจากการแช่แข็งนาน 2 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดคือ 45.26±5.99 % น้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึก ที่เก็บไว้นาน 1 ปี ที่อัตรา 1:6 ในปริมาตร 1 ml ผสมกับไข่ปลาสวาย สามารถให้อัตราการผสมระยะจุดตา อัตราการผสมเฉลี่ย 30.9 $\pm$ 4.1% และมีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับการเก็บในอัตราส่วน 1:1 ส่วนน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการผสมสูงสุดเฉลี่ย 76.6$\pm$ 3.5% ผลการทดลองจะทำไปประยุกต์ใช้กับการผลิตกับฟาร์มเกษตรกรเอกชนเพื่อประโยชน์เชิงพาณิชย์ต่อไป

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the motility rate, fertilization rate, and percent live and dead cells of refrigerated and cryopreserved Mekong giant catfish sperm at different volumes. The study found that; the sperm kept for 48 hours at 1 ml volume in HBSS in the refrigerator had the highest motility rate of 65.67±1.76 %. The cryopreserved sperm kept for 2 months in HBSS at 1:3 ratio had the highest fertilization rate of 25.65 ± 9.64 % moreover, the percent live cell from this sample was 45.26±5.99 %. On the other hand, the cryopreserved sperm for a 1 year period in HBSS at 1:6 ratio had a higher fertilization rate of 30.9 $\pm$ 4.1% which was significantly different ($p<0.05$) with sperm kept in 1;1 ratio.The fresh sperm had 76.6$\pm$ 3.5% fertilization rate. The result of this study will be applied with commercial farms for commercial purpose in near future.

คำนำ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง เป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยพัฒนาการเพาะขยายพันธุ์และการปรับปรุงพันธุ์ การอนุรักษ์ปลาที่หายากในธรรมชาติหรือใกล้สูญพันธุ์จากแม่น้ำโขง เช่นปลาบึก และสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับปลาที่สำคัญ เช่น ปลาเผาะ ปลาเทโพ และ ปลาเทพา นอกจากนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาจะเป็นประโยชน์มาก หากสามารถพัฒนาจนมีเปอร์เซ็นต์การผสมใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด และสามารถผลิตได้ลูกปลาจำนวนมากคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากจะสามารถส่งเสริมเป็นอาชีพได้มากขึ้น และยังสามารถรักษาสายพันธุ์ที่ดีเพื่อเป็นประโยชน์ในอนาคตได้ เมื่อมีความจำเป็น ตลอดจนสามารถประยุกต์ใช้ในการพัฒนาสายพันธุ์ใหม่เช่นลูกผสม ส่งผลดีด้านเศรษฐกิจของประเทศ เนื่องจากปลาบึกมีลักษณะเฉพาะ ที่โตดี

รสชาติอร่อยเป็นที่ต้องการของผู้บริโภค วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อ ทดลองผลของปริมาตรอัตราส่วนที่ใช้เก็บน้ำเชื้อปลาระยะสั้นและระยะยาวต่อการเคลื่อนที่ การมีชีวิต และอัตราการผสมของน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บนาน 2 เดือนและ 1 ปี เพื่อที่จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตและปรับปรุงพันธุ์ปลาเชิงพาณิชย์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้องในเชิงวิชาการ อาชีพ และเศรษฐกิจของประเทศต่อไป

ได้มีการศึกษาอัตราส่วนปริมาตรของน้ำเชื้อสดต่อไข่ปลาไน โดยใช้น้ำเชื้อสด 1 ml กับไข่ปลา 1 กรัม ให้อัตราการผสม 70 % เมื่อเพิ่มไข่เป็น 100 กรัม อัตราการผสมลดลง ส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บไว้นานประมาณ 1 ปี ในปริมาตร 1 ml ผสมกับไข่ 5 กรัม ให้อัตราการผสม 31 % เมื่อใช้ไข่ 10 กรัม อัตราการผสม 25 % (Kurokura และคณะ 1984) ส่วนศึกษาอัตราการผสมของน้ำเชื้อปลาบึกหลังจากแช่แข็งเก็บนาน 7 วัน ในสารละลาย ที่ประกอบด้วย glucose 540 mg และ methanol 8 % ในอัตราระหว่างน้ำเชื้อกับสารละลาย 1:1 ให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยมากที่สุด มีอัตราการผสมเฉลี่ยสูงสุด 37.62 % และมีค่าความเข้มข้น osmolarity (286 mOSM/Kg) ซึ่งใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสดมากที่สุดซึ่งมีค่าความเข้มข้น osmolarity (206 mOSM/Kg) ส่วนในสารละลายสูตรอื่น ๆ มีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อสดค่อนข้างมาก เกรียงศักดิ์ และคณะ (2545) สารละลายที่ ใช้เก็บน้ำเชื้อแช่แข็งมีความสำคัญ โดยป้องกันไม่ให้อสุจิเคลื่อนที่หรือลดการใช้พลังงานของอสุจิ ทำให้มีชีวิตยาวนานและปริมาณมากในระหว่างแช่แข็ง ดังนั้นการเลือกสารละลายใช้ในการแช่แข็งควรมีค่า ออสมลาลิตี้ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา ในปลาน้ำจืดมีค่า 280-300 mOsm/kg ปลาทะเลมีค่า 200-300 mOsm/kg (Wayman and Tierch, 2000) สำหรับในปลากลุ่ม *Pangasius*, Mongkonpunya et al. (1992) ใช้สารละลาย BCB และ C-F HBSS ผสมกับ DMSO 8 % เก็บน้ำเชื้อปลาบึกนาน 3 ปี สามารถให้อัตราการผสม 53-57 % ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ส่วน เกรียงศักดิ์ และ คณะ (2549) ศึกษาชนิดของสารละลาย สารป้องกันเซลล์ (DMSO) ระยะเวลาในการเก็บ และปริมาตรที่เก็บ ต่ออัตราการเคลื่อนที่และอัตราการผสมของน้ำเชื้อปลาบึกที่เก็บระยะสั้นและระยะยาว (แช่แข็ง) พบว่าเก็บน้ำเชื้อปลาบึกระยะสั้นที่อุณหภูมิ 15 °C ในสารละลาย HBSS ที่ปริมาตร 1 และ 2 ml และการเติมสารป้องกันเซลล์ (DMSO) ที่ 5-10 % เก็บนาน 120 ชม. สามารถให้น้ำเชื้อที่เคลื่อนที่ได้ดีที่สุด นอกจากนี้การเก็บน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็งที่ ปริมาตร 2 ml. ในอัตราน้ำเชื้อ : HBSS 1:6 ให้อัตราการผสม 36.2 ± 9.88 %

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองที่ 1 ทดสอบการเคลื่อนที่การมีชีวิตและอัตราการผสมของน้ำเชื้อแช่แข็งนาน 2 เดือน

1.1 การตรวจสอบการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อในสารละลาย HBSS ในอัตราส่วน 1:3 หลังเก็บนาน 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด โดยหยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ แล้วนำน้ำเชื้อไปแตะลงบนหยดน้ำเพื่อตรวจสอบอัตราการเคลื่อนที่โดยส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 X โดยแบ่งระดับการเคลื่อนที่เป็น 4 ระดับ ตามวิธีของ Billard and Cosson,1989

1.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึก เตรียมสารละลาย HBSS ที่มีสารป้องกันเซลล์ได้แก่ DMSO 10 % นำไปผสมกับน้ำเชื้อปลาบึกที่มีอัตราการเคลื่อนที่มากกว่า 75% ในอัตราส่วน 1 :3 นำน้ำเชื้อที่ผสมเข้ากันแล้วมาใส่ในหลอด cryotude ที่มีปริมาตร 1 ml และ 2 ml จากนั้นนำไปปรับลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็งโดยเครื่อง Freezer control (รุ่น CL863) ประเทศออสเตรเลีย ร่วมกับ Cryogenesis version 4 for windows ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 ˚C /min จาก 25 ˚C ถึง -80 ˚C จากนั้นนำเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อใส่ลงใน ถังไนโตเจนเหลว

1.3 การทดสอบอัตราการผสมของน้ำเชื้อปลาบึกที่ได้จากแม่ปลาน้ำหนัก 25 กก. ที่เลี้ยงในบ่อดิน อายุ 12 ปี ที่พร้อมผสมเทียมมาพักในบ่อดิน ตรวจสอบใช้สายยางขนาดเล็กดูดไข่ที่มีลักษณะเหลืองใส ขนาดประมาณ 1.3 มม. หลังที่ฉีด

ด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRH, Suprefact) 2 เข็ม เข็มแรกกระตุ้นการพัฒนาของไข่ โดยใช้ Suprefact 25 ug/kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/kg หลังจากนั้น 8 ชั่วโมงฉีดเข็มที่ 2 Suprefact 12 ug/kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/kg และฉีดพ่อปลาน้ำหนัก 21 กก. หลังจากนั้น 8-10 ชม. สามารถรีดไข่และน้ำเชื้อ เพื่อทดสอบการผสมกับน้ำเชื้อสดและแช่แข็ง นับอัตราการผสมระยะจุดตาหลังจากผสม 14 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลโดย Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan ' s Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ ($P < 0.05$) วางแผนการทดลองแบบ CRD (Complete Random Design) แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ทรีตเมนต์ ทรีตเมนต์ละ 3 ซ้ำ (Replication) ได้แก่

หน่วยทดลองที่ 1 น้ำเชื้อสดปลาบึก 0.5 ml ผสมกับไข่ปลาบึก 200 ฟอง

หน่วยทดลองที่ 2 น้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึกในปริมาตร 1 ml ผสมกับไข่ปลาบึก 200 ฟอง

หน่วยทดลองที่ 3 น้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึกในปริมาตร 2 ml ผสมกับไข่ปลาบึก 200 ฟอง

1.4 น้ำเชื้ออีกส่วนจากข้อ 1.2 และ 1.3 ไปตรวจสอบการมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาบึกหลังเก็บในแช่แข็งนาน 2 เดือน โดยการย้อมสี Dye-eosin นับอสุจิตัวเป็นตัวตาย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 100 X อสุจิตัวเป็นจะไม่ติดสี ส่วนอสุจิตัวตายจะติดสีชมพูหรือสีม่วงของสีย้อม ตามวิธีของ Billard and Cosson,1989

การทดลองที่ 2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึกนาน 1 ปี

พ่อปลาบึกขนาด 20 กก. อายุ 11 ปี ที่เลี้ยงในบ่อดินทำการฉีดฮอร์โมนตามความเข้มในข้อ 1.3 นำน้ำเชื้อสดผสมกับและสารละลาย HBSS ที่มีสารป้องกันเซลล์ได้แก่ DMSO 10 % ในอัตราส่วน 1:1 และ 1:6 ใส่ในหลอด cryotude ปริมาตร 1 ml แล้วนำไปแช่แข็งตามวิธีการเก็บในการทดลองที่ 1.2 แล้วนำไปผสมกับปลาสวายที่ได้จากแม่ปลาที่เลี้ยงในบ่อดิน ขนาด 2 กก. อายุ 3 ปี โดยฉีดฮอร์โมน Suprefact 20 ug/kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/kg หลังจากนั้น 6 ชั่วโมง ฉีดเข็มที่ 2 .ใช้ Suprefact 10 ug/kg ร่วมกับ Motilium 5 mg/kg พร้อมพ่อปลาสวาย น้ำหนัก 1.9 กก. หลังจาก 8 ชม. จึงสามารถรีดไข่และน้ำเชื้อปลาสวายได้ จึงผสมกับน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็งมาละลายน้ำอุ่น 38 ˚C นาน 5 วินาที แบ่งการทดลองแบบสุ่มอย่างสมบูรณ์เป็น 3 หน่วยการทดลอง ได้แก่

หน่วยทดลองที่ 1 ใช้น้ำเชื้อสด 0.5 ml ผสมกับไข่ปลาสวาย 200 ฟอง

หน่วยทดลองที่ 2 ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเก็บใน HBSS อัตรา 1:1 ปริมาตร 1 ml 200 ฟอง

หน่วยทดลองที่ 3 ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเก็บใน HBSS อัตรา 1:6 ปริมาตร 1 ml 200 ฟอง

หลังจากผสมนาน 18 ชม. (ระยะจุดตา) เพื่อนับอัตราการผสมในแต่ละซ้ำนำค่าไปวิเคราะห์อัตราการผสม ตามวิธีการ Analysis of variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วย Duncan' s Multiple – Range Test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ผลและวิจารณ์การทดลอง

จากตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาบึกที่มีสาร DMSO 10 % ที่เก็บรักษาในตู้เย็นนาน 48 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงซึ่งเก็บในสารละลาย HBSS ที่ปริมาตร 1ml และ 2 ml โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ 65.67±1.76 และ 62.33±1.45 % ซึ่งสูงกว่าน้ำเชื้อสดที่มีอัตราการเคลื่อนที่ 36.67±1.20 และ 20.00±0.57 % ตามลำดับ ซึ่งมีความเข้มข้น 233 mOsm/kg และในชุดควบคุม (น้ำเชื้อสด) มีความเข้มข้น 206 mOsm/kg จากการศึกษาของ เกรียงศักดิ์ และ คณะ (2549) ระดับการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อที่เก็บในสารละลายและปริมาตรต่างกัน หลังจากที่เก็บนาน 12 ชม. ระดับการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อยังไม่มีความแตกต่างกันจากแต่ละปริมาตรและสารประกอบ หลังจากเก็บนานถึง 72 ชม. (3 วัน) พบว่าระดับการเคลื่อนที่ของ

น้ำเชื้อสดจะมีค่าเกือบศูนย์ ส่วนที่เก็บใน HBSS มีระดับการเคลื่อนที่ดีที่สุด ทั้งนี้จากการสังเกตน้ำเชื้อสดที่เก็บในตู้เย็นนาน 48 ชั่วโมง จะมีลักษณะแห้งจับกับเป็นก้อนเนื่องจากการสูญเสียน้ำ ทำให้เสียความสมดุลระหว่างของเหลวในน้ำเชื้อกับตัวอสุจิ ส่วนระดับการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อที่ดีได้จากการเก็บในสารละลาย HBSS ส่วน Mongkonpunya *et al*., (1991) ได้การศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิปลาบึกในสภาพ osmotic pressure แต่ละช่วงค่า osmotic pressure ที่กระตุ้นให้อสุจิปลาบึกเคลื่อนที่ 25% มีค่า 240±10 mOsm/kg osmotic pressure ที่สามารถกระตุ้นให้อสุจิปลาบึกเคลื่อนที่สูงสุด 186±9 mOsm/kg.

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ ค่าเฉลี่ย±SEM. ของน้ำเชื้อปลาบึกที่เก็บรักษาในตู้เย็น 48 ชั่วโมง

ปริมาตร / สารละลาย	% การเคลื่อนที่	
	1ml	2ml
น้ำเชื้อสด (206 mOsm/kg)	36.67±1.20	20.00±0.57
HBSS (233 mOsm/kg)	65.67±1.76	62.33±1.45

2. จากตารางที่ 2 แสดงอัตราการผสมของน้ำเชื้อแช่แข็งกับไข่ปลาบึก พบว่า อัตราการผสมโดยใช้น้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็งในปริมาตร 1 ml และ 2 ml มีอัตราการผสมติดของไข่ 25.65 ± 9.64 % และ8.47 ± 4.33 ตามลำดับ ขณะที่น้ำเชื้อสดมีอัตราการผสม 90.00 ± 5.77 % ซึ่งต่างกับการศึกษาอัตราการผสมของน้ำเชื้อแช่แข็งที่เจือจางและเก็บใน HBSS ในปริมาตร 2 ml มีอัตราการผสมสูงสุด 36.2 % รองลงมาได้แก่ 1, 4 และ 0.5 ml ส่วนปริมาตรน้ำเชื้อที่ผสมใน HBSS 1 และ 2 ml มีอัตราการผสมต่างจากที่เก็บใน 0.5 และ 4 ml (เกรียงศักดิ์ และ คณะ ,2549) จากการศึกษาของ Horvath et al.(2005) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา sturgeon (*Acipenser breviroustrum*) ใน mHBSS และ MT ที่มีสารป้องกันเซลล์ DMSO และ methanol ในอัตรา 5 10 และ15 % สามารถให้อัตราการผสมสูงสุดในระยะ 4 cells ที่ 40 % และ อัตราการฟัก 32 % จากการใช้ methanol 5 %

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการผสมของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึกกับไข่ปลาบึก (%)

ทรีตเมนต์	ซ้ำ			เฉลี่ย ± SEM.
	1	2	3	
T_1 : ผสมกับน้ำเชื้อสดปลาบึก	100.0.	80.00	90.00	90.00 ± 5.77 [c]
T_2 : ผสมกับน้ำเชื้อแช่แข็งในปริมาตร 1 ml	12.50	44.44	20.00	25.65 ± 9.64 [b]
T_3: ผสมกับน้ำเชื้อแช่แข็งในปริมาตร 2 ml	0.00	14.29	11.11	8.47 ± 4.33 [a]

3. จากตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาบึกหลังจากการแช่แข็งนาน 2 เดือน ในปริมาตร 1 ml ในสารละลาย HBSS เท่ากับ 45.26±5.99 % จะเห็นว่าจำนวนน้ำเชื้อที่มีชีวิตหลังการแช่แข็งจะมีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็นนาน 48 ชม. จากรายงานของ เกรียงศักดิ์ และ คณะ ,2549 น้ำเชื้อที่เก็บในตู้เย็นนาน 48 ชม. มีระดับการเคลื่อนที่ระหว่าง 40-50 % หลังจากการเก็บนาน 72 ชม. ระดับการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อลดลงเหลือ 0-25 %

ตารางที่ 3 แสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อ ค่าเฉลี่ย ± SEM. ปลาบึกหลังการแช่แข็งนาน 2 เดือน

ซ้ำที่	% เป็น	% ตาย
1	45.45	54.54
2	55.56	44.44
3	34.78	65.22
% เฉลี่ย	45.26±5.99	54.74±5.99

4. จากตารางที่ 4 การผสมเทียมจากน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึก ที่เก็บไว้นาน 1 ปี ในสารละลาย HBSS ที่อัตรา 1:6 (น้ำเชื้อ: สารละลาย) ในปริมาตร 1 ml ผสมกับไข่ปลาสวาย สามารถให้อัตราการผสมเฉลี่ย 30.9 $\pm$ 4.1% จากหน่วยทดลองที่ 3 ส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บในอัตราส่วน 1:1 จากหน่วยทดลองที่ 2 ให้อัตราการผสมต่ำสุด 6.8 $\pm$ 6.8 % เป็นที่น่าสังเกตว่าในบางซ้ำของหน่วยการทดลองนี้ไม่มีอัตราการผสม ทั้งนี้เนื่องจากเป็นน้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้มาจากหลอดเก็บคนละหลอดและขณะผสมกับไข่พบลักษณะของเหลวเป็นวุ้นในน้ำเชื้อแข็ง ขณะที่จากน้ำเชื้อสดหน่วยการทดลองที่ 1 ให้อัตราการผสมสูงสุดเฉลี่ย 76.6$\pm$ 3.5% ซึ่งมีความแตกต่างทางสถิติของค่าเฉลี่ยจากแต่ละหน่วยการทดลอง เช่นเดียวกับการศึกษาของ Kurokura และคณะ (1984) ได้ศึกษาอัตราส่วนปริมาตรของน้ำเชื้อสดต่อไข่ปลาไน โดยใช้น้ำเชื้อสด 1 ml กับไข่ปลา 1 กรัม ให้อัตราการผสม 70 % เมื่อเพิ่มไข่เป็น 100 กรัม อัตราการผสมลดลง ส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บไว้นาน 342 วัน ใช้ปริมาตร 1 ml ผสมกับไข่ 5 กรัม ให้อัตราการผสม 31 % ส่วน Samorn and Bart.(2003) ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาสวายแช่แข็ง ในอัตราการลดอุณหภูมิที่ 10°C /นาที ถึง -80 $^{\circ}$C ที่ พบว่าอัตราการผสมกับไข่ปลาสวายที่สูงสุด 41% (81% เทียบกับ control) ได้จากการเก็บน้ำเชื้อใน HBSS-CF ซึ่งสูงกว่าในการทดลองนี้ทั้งนี้เนื่องจากการใช้สารละลาย (extender) และการใช้ไข่ปลาที่ต่างกัน อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ น้ำเชื้อปลาบึกที่เก็บในปริมาตร 2 ml นาน 1 ปี อัตราน้ำเชื้อ :extender 1:6 ให้อัตราการผสม 35% มากกว่าน้ำเชื้อที่เก็บนาน 2 เดือน ในอัตรา 1:3 ซึ่งให้อัตราการผสม 25 %

ตารางที่ 4 อัตราการผสมของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึกนาน 1 ปี กับไข่ปลาสวาย

หน่วยทดลอง	ซ้ำ			เฉลี่ย (%$\pm$ SEM.)
	1	2	3	
T_1(น้ำเชื้อสด)	82.14	77.60	70.17	76.60 $\pm$ 3.50^{c}
T_2(1:1)	0.00	0.00	20.50	6.80 $\pm$ 6.80^{a} (8.88%)
T_3:(1:6)	34.30	26.30	32.10	30.90 $\pm$ 4.10^{b} (39.16%)

หมายเหตุ : ค่าในวงเล็บเป็นอัตราการผสมที่เทียบจากอัตราการผสมจากชุดควบคุม

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาบึกเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง มีอสุจิเคลื่อนที่เฉลี่ยมากที่สุดเท่ากับ 65.67±1.76 %

2 จากการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็ง นาน 2 เดือน ในสารละลาย HBSS ในอัตราส่วน 1:3 อัตราการผสมเฉลี่ย (%) พบว่า ในปริมาตร 1 ml มีอัตราการผสมเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 25.65 ± 9.64 % และในปริมาตร 2 ml ให้อัตราการผสมติดเฉลี่ยรองลงมามีค่าเท่ากับ 8.47 ± 4.33 % ซึ่งทั้งสองปริมาตรให้อัตราการผสมติดเฉลี่ยมีความแตกต่างทางสถิติ ($p< 0.05$) กับชุดควบคุมที่ใช้น้ำเชื้อสดปลาบึกกับไข่ปลาบึกในการทำการผสม

3. เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของน้ำเชื้อปลาบึกหลังจากการแช่แข็งนาน 2 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูงสุดคือ 45.26±5.99 %

4. น้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึก ที่เก็บไว้นาน 1 ปี ในสารละลาย HBSS ที่อัตรา 1:6 (น้ำเชื้อ: สารละลาย) ในปริมาตร 1 ml ผสมกับไข่ปลาสวาย สามารถให้อัตราการผสมระยะจุดตาได้ดีกว่าที่อัตรา 1:1 (น้ำเชื้อ: สารละลาย) ซึ่งมีอัตราการผสมเฉลี่ย 30.90 $\pm$ 4.10% ขณะที่น้ำเชื้อสดมีอัตราการผสมสูงสุดเฉลี่ย 76.60$\pm$ 3.50%

คำนิยม

ขอบคุณโครงการวิจัยร่วมเพื่อพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชียและสถาบันการศึกษาและสถาบันวิจัยของรัฐ(RTG-AIT) ที่ช่วยสนับสนุนทุนในการทำวิจัย คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกสถานที่ในการทำวิจัย และบุคลากรของโครงการฯ ที่ช่วยเตรียมและเก็บข้อมูล ได้แก่ นายจีระศักดิ์ โต๊ะหลาง Mr. Rogelio Carandang และนางสาวจิราพร มอญเลิศ

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, จงกล พรมยะ, จีรเดช มโนสร้อย และ อรัญญา มโนสร้อย. 2545. การศึกษา พ่อ-แม่ พันธุ์ปลาบึกจากการเลี้ยงเพื่อการอนุรักษ์และพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชิงพาณิชย์. 160 หน้า.

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน ชนกันต์ จิตมนัส และ Amarit Bart. 2549. ปัจจัยบางประการในการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึก. การประชุมวิชาการครั้งที่ 44 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 575 .

Billard, R., Cosson M.P. 1989. Mearement of sperm motility in trout and carp. In: Aquaculture biotechnology in progress, N .De Pauw, E. Jaspers, H. Ackefors and N. Wilkins (Eds). European Aquaculture Society, Bredene, Belgium: 449-503.

Horvath, A., Wayman W. R., Urbanyi, B., Ware, K.M. Dean, J.C., Tiersch, T.R., 2005.The relationship of the cryopreservatants methanol and dimethyl sulfoxide and hyperosmotic extenders on sperm cryopreservation of two North- American sturgeon species. Aquaculture 247, 243-251.

Mongkonpanya, K., Pupipa.t, T., Pholprasit, S., Chantrasutva, M., Ritraporn, R., Pimonbutra, S., Watcharakoset, S., and Chaengkit, M. 1992. Cryopreservation of sperm of the Mekong Giant Catfish, *Pangasinodon gigas* Chevy. Aquaculture and Schistosomiasis. Proceeding of a network meeting held in Manila, Philippines August 6-10. p 56-60.

Kurokura, H., Hirono, R., Tomita, M., 1984. Cryopreservation of Carp sperm. Aquaculture.

Samorn Kwantong and Amarit N Bart. 2003. Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rate of fronzen Striped Catfish, *Pangasius hypophthamus* (Sauvage) Sperm. Aquaculture Research 34, 887-893.

Wayman, W.R., and Tiersch, T.R. 2000. Research methods for cropreservation of sperm In: cryopreservation in aquatic species. Tiersch, T.R., and P.M. (Eds.). World aquaculture society. Baton Rouge. Lousiana.264-275