วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2562 : 37 (1) : 135-143

ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารปลาดุกอุยต่อคุณภาพน้ำเชื้อ

Effects of the Different Levels of Dietary Vitamin E on Semen Quality of *Clarias macrocephalus Günther*, 1864

เถลิงเกียรติ สมนึก[1]* ณัฏฐวรรณ สมนึก[2] สำเนาว์ เสาวกูล[1] และกฤติมา เสาวกูล[1]
Talerngkiat Somnuek[1]*, Nutthawan Somnuek[2], Samnao Saowakoon[1] and Krittima Saowakoon[1]

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้เป็นการหาปริมาณวิตามินอีและระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อเพื่อผลิตลูกปลาดุกอุยจากการเพาะฟัก วางแผนการทดลองแบบบล็อกสมบูรณ์ ใช้ปลาดุกอุยเพศผู้ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 80±1.03 กรัม และความยาวเฉลี่ย 18±1.90 เซนติเมตร โดยเสริมวิตามินอีในอาหารเป็น 3 ระดับ คือ 0 600 และ 1,000 มก./กก. ให้ปลากลุ่มทดลองจำนวน 3 กลุ่มการทดลองๆ ละ 200 ตัว จำนวน 3 ซ้ำ โดยสุ่มปลาทุกๆ 15 วัน กลุ่มละ 20 ตัว ทดลองนาน 90 วัน โดยแบ่งปลา 10 ตัวผ่าเก็บถุงน้ำเชื้อแล้วนำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ และนำปลาอีก 10 ตัว มากระตุ้นอสุจิที่เวลาต่างกัน 5 เวลา คือ 0 1 2 3 และ 4 นาที ก่อนนำไปผสมเทียมกับปลาดุกอุยเพศเมีย ผลการศึกษาพบว่า การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิทุกกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยกลุ่มที่เสริมวิตามินอีในอาหารระดับ 1,000 มก./กก.มีค่าการเคลื่อนไหวสูงที่สุดเฉลี่ย คือ 66.16±4.41% กลุ่มที่เสริมวิตามินอีในอาหารระดับ 600 มก./กก.ค่าสัดส่วนของอสุจิมีชีวิตและความเข้มข้นตัวอสุจิ มีค่าเฉลี่ยสูงที่สุด 68.28±3.42% และ 51.02±3.58 x 10^6 เซลล์/มล. ตามลำดับ เมื่อพิจารณาอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักกลุ่มที่เสริมวิตามินอีในอาหารที่ระดับ 600 มก./กก. ร่วมกับกระตุ้นเป็นเวลา 2 นาที มีค่าเฉลี่ย 92.50±3.35% และ 79.50±0.70 % ตามลำดับ ดังนั้นการเสริมวิตามินอีในอาหารปลาดุกอุยที่ระดับ 600 มก./กก.ร่วมกับกระตุ้นอสุจิด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลา 2 นาที ก่อนผสมเทียมช่วยเพิ่มอัตราการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุยได้

คำสำคัญ: ปลาดุกอุย วิตามินอี กระตุ้นอสุจิ คุณภาพน้ำเชื้อ อัตราการฟักไข่

Abstract

This research aimed at determining the amount of vitamin E and sperm stimulate time to increase semen quality of broad head catfish to hatchery. Randomize complete block design was designed for the experiment, using male catfish with the average weight of 80 ± 1.03 g and the average length of 18 ± 1.90 cm Fish raised with three different levels of vitamin E (0, 600 and 1,000 mg kg^{-1}) was divided into 3 groups (200 fish each) with 3 replicates. Twenty of fish per group was randomly collected every 15 days for 90 days. Subsequently, first 10 fish was collected sperm sac and evaluated for sperm quality and other ten fish was used to stimulate sperm before artificial breeding method with 5 different time courses (0 1 2 3 and 4 min). The study indicated that sperm motility was statistically different ($p <0.05$). It was found that vitamin E supplement at the level of 1,000 mg had the highest average motion (85.00 ± 6.24%). Vitamin E supplement at the level of 600 mg kg^{-1} contributed the highest viability and sperm concentration at 68.28±3.42% and 51.02±3.58 x 10^6 cells/ml, respectively. Fertilization rate and hatching rate obtained from 600 mg kg^{-1} vitamin E and 2-min stimulation were 92.50 ± 3.35% and 79.50 ± 0.70%, respectively.

[1]สาขาวิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสุรินทร์ อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000
[2]สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสุรินทร์ อ.เมือง จ.สุรินทร์ 32000
*Corresponding author, Email: um305@hotmail.com

Therefore, supplementation of vitamin E in diet at 600 mg kg^{-1} with 2-min sperm stimulation with freshwater before the artificial breeding of catfish, could enhance the hatching rate of broad head catfish.0.3

Keywords: *Clarias macrocephalus*, Vitamin E, Sperm stimulate, Sperm quality, Hatching rate

คำนำ

ปลาดุกเป็นปลาน้ำจืดที่นิยมรับประทานและเลี้ยงกันแพร่หลายในหมู่เกษตรกรทุกระดับทั้งในประเทศไทยและทั่วโลก เนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่ายเจริญเติบโตไว เป็นปลาเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศ ผลผลิตปลาดุกของประเทศไทยในช่วง ปี 2555-2557 ผลิตได้ 137,000-122,200 ตัน ซึ่งเป็นอันดับสองรองจากปลานิล (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) ปลาดุกส่วนใหญ่ใช้บริโภคในประเทศเป็นปลาดุกลูกผสม เมื่อพิจารณาการเลี้ยงปลาดุกลูกผสมกำลังเผชิญกับภาวะวิกฤตขาดแคลนลูกปลาเนื่องจากขาดแคลนพ่อปลาที่พร้อมผสมพันธุ์ การแก้ปัญหาการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ เนื่องจากมีผู้เลี้ยงปลาดุกอุยน้อยลงทำให้ราคาแม่พันธุ์ปลาดุกอุยเพิ่มสูงขึ้นถึงกิโลกรัม 200-300 บาท (นิพนธ์ และคณะ, 2556) ดังนั้นการพัฒนาด้านการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุย ด้วยการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อของปลาเพศผู้และนำมาผสมกับไข่ปลาดุกอุยที่มีคุณภาพและพัฒนาอัตราการผสมติดให้ดีขึ้น เพื่อเพิ่มผลผลิตปลานอกฤดูกาลด้วยการใช้สารเสริมในอาหารเป็นอีกแนวทางหนึ่ง ซึ่งสารเสริมประเภทวิตามินที่จำเป็นต่อร่างกายสัตว์น้ำ เช่น การใช้วิตามินเอ ซี และอี (Gao *et al.,* 2014) โดยการศึกษาส่วนใหญ่จะศึกษาการใช้วิตามินซีส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์ (Nguyen *et al.,* 1993) มีรายงานการเสริมวิตามินซีในอาหารปลาดุกแอฟริกันที่ระดับ 1,500 มก./กก.อาหาร มีผลต่อการเพิ่มสมรรถนะการเจริญเติบโตของปลาดุกแอฟริกัน (Adewolu and Aro, 2009) ในปลา channel catfish (El Naggar and Lovell, 1991) และการใช้วิตามินอีชนิด **α**-tocopherol (Shadia *et al.,* 2012) ในปลาอายุ (*Plecoglossus altivelis*) (Takeuchi *et al.,* 1981) ปลาทอง (Kashani *et al.,* 2012) ปลาไน ปลานิล (Gammanpila *et al.*, 2007) ปลาหางนกยูง (Mehrad and Sudagar, 2010) และปลาม้าลาย (Mehrad et al., 2012) แต่ยังขาดข้อมูลและผลของวิตามินอีต่อระบบสืบพันธุ์ปลาดุกอุยเพศผู้ เนื่องจากปลาส่วนมากไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินอีได้ต้องได้รับจากอาหารที่กินเข้าไป (Stacey, 2006) การเสริมวิตามินอีในอาหารเพื่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ และช่วยป้องกันการถูกทำลายของผนังเซลล์อสุจิจากอนุมูลอิสระทำลายเซลล์ส่งผลต่อการเคลื่อนที่อสุจิและความสามารถในการปฏิสนธิของไข่โดยลดการทำลายจากกระบวนการดังกล่าวได้ด้วยการให้อาหารที่ผสมวิตามินซีและอีจะส่งผลต่อความเข้มข้นและการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิโดยทดลองในห้องปฏิบัติการได้ (Leesa *et al.,* 2017) สามารถช่วยเพิ่มการเคลื่อนที่ การปฏิสนธิ และการผ่านทะลุเซลล์ไข่ นอกจากนี้ยังเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดีที่สุดสามารถเพิ่มสมรรถนะระบบสืบพันธุ์ในเพศผู้ ในภาวะที่ขาดวิตามินทำให้เกิดการเสื่อมถอยของเยื่อบุผิว และเลย์ดิกเซลล์ในท่อสร้างน้ำเชื้อ (seminiferous tubules) (Muhammad, 2017)

การเสริมวิตามินอีในอาหารจะถูกออกซิไดซ์ได้ง่ายโดยการดูดซึมที่ผนังกระเพาะอาหารผ่านกระแสโลหิตเพื่อลำเลียงไปยังเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Asli and Tamer, 2017) มีความสำคัญต่อการทำงานของระบบสืบพันธุ์สัตว์น้ำให้ปกติ (Azzi and Stocker, 2000) ส่งผลต่อปลาดุกอุยเพศผู้ในกระบวนการสร้างน้ำเชื้อ (spermatogenesis) ได้มากขึ้น (Wachirachaikarn *et al.,* 2017) นอกจากนี้การเสริมวิตามินอีในอาหารส่งผลให้อัณฑะมีขนาดและน้ำหนักเพิ่มขึ้นอีกทั้งเพิ่มประสิทธิภาพน้ำเชื้อสดซึ่งยังไม่มีการเคลื่อนที่ (immotile) ให้สามารถเคลื่อนที่ได้มากขึ้น (Canyurt and Akhan, 2008) หลังการกระตุ้นอสุจิกระตุ้นด้วยน้ำที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่เหมาะสม (กฤษณ์, 2536; Alavi and Cosson, 2006) โดยอสุจิของปลาทะเลจะสามารถเคลื่อนที่ได้นานกว่าปลาน้ำจืด ตั้งแต่ 1-10 นาที (Cosson, 2008; Cosson *et al.,* 2008) จากการศึกษางานวิจัยทั้งในและต่างประเทศในปลาน้ำจืดและน้ำเค็ม พบว่า การเสริมวิตามินอีสามารถปรับปรุงการสืบพันธุ์ รวมทั้งเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อ อัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟัก ดังนั้น การศึกษาถึงปริมาณวิตามินอีที่เหมาะสมในอาหารต่อคุณภาพน้ำเชื้อและอัตราการฟัก จึงน่าจะเป็นแนวทางเพิ่มผลผลิต

ปลาดุกอุยโดยการเพาะเลี้ยงนอกฤดูกาลได้อีกทางหนึ่ง

วิธีการศึกษา

วัสดุและอุปกรณ์

ปลาดุกอุยเพศผู้อายุ 12 เดือน ที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 80±1.03 กรัม และความยาวเฉลี่ย 18±1.90 เซนติเมตร เลี้ยงในบ่อขนาด 10 ลูกบาศก์เมตร อัตราปล่อย 20 ตัว/ตารางเมตร ปรับอาหารด้วยอาหารปลาดุกใหญ่โปรตีน 25% ปริมาณ 3 % ของน้ำหนักตัว/วัน จำนวน 2 มื้อ เป็นเวลา 1 เดือน

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบบล็อคสมบูรณ์ประกอบด้วยการเสริมวิตามินอีชนิด α-tocopherol ($C_{29}H_{50}O_2$) 3 ระดับในอาหาร คือ 0 600 และ 1,000 มก./กก. เป็นเวลา 90 วัน ทุกๆ 15 วันจะทำการสุ่มปลาแต่ละกลุ่มการทดลอง จำนวน 20 ตัว แบ่งเป็นผ่าเก็บถุงน้ำเชื้อเพื่อหาค่าดัชนีความสมบูรณ์ของอัณฑะ (Testis somatic index; TSI) และทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อจำนวน 10 ตัวจากนั้นนำไปกระตุ้นอสุจิที่เวลาต่างกัน 5 เวลา คือ 0 1 2 3 และ 4 นาที จำนวน 10 ตัว แต่ละกลุ่มทดลองมีจำนวน 3 ซ้ำ จากนั้นนำน้ำเชื้อมาผสมเทียมกับแม่ปลาดุกอุย เพื่อเปรียบเทียบอัตราการผสมติดและอัตราการฟักไข่

การทดลองที่ 1 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารปลาดุกอุยต่อคุณภาพน้ำเชื้อ

สุ่มตัวอย่างปลาดุกอุยเพศผู้ กลุ่มละ 10 ตัว ทำการวางยาสลบด้วยสาร MS222 อัตรา 100 มก./ล โดยฉีดฝอยบริเวณเหงือกปลาทดลองก่อนผ่าท้อง ดึงอัณฑะออกซับเลือดที่ติดออกให้หมด นำไปชั่งน้ำหนักบันทึกข้อมูล นำน้ำเชื้อไปประเมินคุณภาพตามวิธี Shamspour and Khara (2016) โดยตรวจวัดลักษณะที่มองเห็นด้วยตา และการตรวจแบบละเอียดด้วยกล้องจุลทรรศน์ ได้แก่

1.1 การตรวจความเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ (%motility sperm; MS) โดยการตรวจการเคลื่อนไหวแบบหมู่ (wave motion characteristic) โดยปกติแล้วน้ำเชื้อสดจากกลุ่มทดลอง วิธีการจะประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ 6 ระดับ คือ น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิเท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% โดยนำน้ำเชื้อสด 1 ไมโครลิตร วางบนกระจกสไลด์ เติม 0.4% NaCl 50 ไมโครลิตร โดยไม่ต้องปิดด้วยกระจก coverslip แล้วใช้เข็มเขี่ยแตะน้ำเชื้อสดลงบนใกล้หยดน้ำ แล้วลากมาสัมผัสน้ำเชื้อ ประเมินการเคลื่อนที่ของอสุจิภายในเวลาไม่เกิน 30 วินาที โดยดูจากกล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 40-100 เท่า สามารถประเมินการเคลื่อนไหวเป็นเปอร์เซ็นต์ (Vuthiphandchai and Zohar, 1999)

1.2 สัดส่วนของอสุจิที่ยังมีชีวิต (% viability; VA) โดยการย้อมสีเพื่อแยกอสุจิมีชีวิต และไม่มีชีวิต ด้วยสี nigrosin-eosin อสุจิที่ตายแล้วจะย้อมติดสีชมพูของ eosin ในการย้อมสีนอกจากใช้ 1% eosin แล้วยังใช้สีพื้นเพื่อให้มองเห็นชัดเจน ได้แก่ 2% aniline blue หรือ 5% nigrosin เป็นต้น ทำให้พื้นมีสีดำของสีนิโกรซิน (nigrosin) ในการย้อมสีจะใส่สีลงใน 2.9 % sodium citrate อุ่นและคนให้เข้ากัน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแบบกรองละเอียดปานกลาง เก็บรักษาในตู้เย็น (Björndahl *et al*., 2003)

1.3 ตรวจนับความเข้มข้นของตัวอสุจิ (concentration; C) โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำเกลือที่เข้มข้น 0.9 % ในอัตรา 100 เท่า ดูดสารละลายน้ำเชื้อปริมาตร 20 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์นับเม็ดโลหิต (Haemacytometer) ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ที่ออกแบบมาใช้กับสไลด์นับเม็ดโลหิต กดกระจกปิดสไลด์เลื่อนไปมาเบาๆตามวิธี Hajirezaee *et al*. (2010) คำนวณความเข้มข้นของอสุจิ ดังนี้

ความเข้มข้น = C x 2 x10^6 spermatozoa/ml

เมื่อ C = จำนวนตัวอสุจิที่นับ 25 ช่อง

การทดลองที่ 2 ผลของการเสริมวิตามินอีและระยะการเวลากระตุ้น ต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟัก

2.1 สุ่มปลาดุกอุยเพศผู้จำนวน 10 ตัวเพื่อเตรียมน้ำเชื้อผสมเทียมกับแม่พันธุ์ปลาดุกอุยที่ปรับด้วยอาหารปลาดุกใหญ่โปรตีน 25% (ไม่มีการเสริมวิตามินอี)

2.2 นำแม่ปลาดุกอุยที่มีไข่แก่ (ระยะ post vitellogenin) ได้จากฟาร์มเอกชนในจังหวัดสุรินทร์โดยฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHA) กระตุ้นให้เพศเมียวางไข่ร่วมกับสารเสริมฤทธิ์ domperidone (motilium M) อัตราเพศเมีย 20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม เพศผู้ 10 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ทิ้งไว้นาน 12-14 ชั่วโมง (Na-Nakorn *et al*., 2004) สังเกตอาการแม่ปลา

2.3 ทำการรีดไข่ปลาพร้อมทั้งผ่าท้องเก็บอัณฑะในเพศผู้ชั่งน้ำหนักและบดอัณฑะเพื่อนำน้ำเชื้อมากระตุ้นด้วยน้ำกลั่นโดยกระตุ้นอสุจิเป็นระยะเวลา 0 1 2 3 และ 4 นาที นำมาตรวจสอบคุณภาพและอัตราการปฏิสนธิ

2.4 นำน้ำเชื้อแต่ละที่กลุ่มการทดลองที่ผ่านการกระตุ้นผสมกับไข่โดยสัดส่วนการผสม คือ 1:1 คนให้เข้ากัน แบ่งไข่ที่ผสมแล้วใส่ภาชนะจำนวน 300 ฟอง ต่อหนึ่งหน่วยการทดลอง คนให้เข้ากันแล้วเติมน้ำเพื่อกระตุ้นให้อสุจิเคลื่อนไหวและผสมกับไข่ ล้างด้วยน้ำสะอาดนำไปโรยในตะแกรง (ผ้าเขียว)

2.5 ตรวจนับจำนวนไข่ที่เจริญถึงขั้นแกสทรูลาซึ่งใช้ระยะเวลา ประมาณ 9 ชั่วโมง หลังจากไข่ผสมกับน้ำเชื้อ (วิศณุพร และคณะ, 2537) โดยสุ่มไข่ในแต่ละซ้ำของแต่ละชุดทดลอง ครั้งละ 300 ฟอง จำนวน 3 ซ้ำ เพื่อหาอัตราการปฏิสนธิและอัตราปฏิสนธิที่เวลา 14 ชั่วโมง (Zonneveld, 1990)

การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

เปรียบเทียบผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารแต่ละระดับต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาดุกอุยแต่ละกลุ่มทดลองโดยใช้ One-way ANOVA และอิทธิพลร่วมของระดับวิตามินในอาหารและระยะเวลาการกระตุ้นอสุจิต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไข่โดยใช้ Two-way ANOVA ข้อมูลที่มีค่าเป็นเปอร์เซ็นต์ ก่อนวิเคราะห์ทำการแปลงข้อมูลด้วยวิธี arcsine transformationและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Games-Howell ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป จากนั้นวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (SAS, 1996)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 ผลของการเสริมวิตามินอีในอาหารปลาดุกอุยต่อคุณภาพน้ำเชื้อ

ผลการทดลองการเสริมวิตามินอีระดับต่าง ๆ (Table1) พบว่า ค่าTSI กลุ่มปลาดุกอุยที่เสริมวิตามินในอาหารที่ระดับ 0 มก./กก. สูงที่สุด คือ 1.76±0.47 % รองลงมาได้แก่ กลุ่มที่เสริมวิตามินในอาหารที่ระดับ 600 มก./กก.และ 1,000 มก./กก. โดยมีค่าเท่ากับ 1.32±0.25 % 1.28±0.22 %ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเสริมวิตามินระดับต่างกันส่งผลให้ค่าTSI แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การได้รับวิตามินอีในระดับที่เหมาะสมซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระช่วยเพิ่มสมรรถนะระบบสืบพันธุ์ลดการเสื่อมถอยของการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) โดยลดเอนไซม์กลูตามิล ทรานเปปไทด์เดส ที่ย่อยสลายและลดจำนวนเลย์ดิกเซลล์ (leydig cell count) ในท่อสร้างน้ำเชื้อรวมทั้งเยื่อบุ (germinal epithelium) (Sood *et al.,* 1992) ส่งผลต่อการสร้างน้ำเชื้อ ปริมาณและน้ำหนักอัณฑะของปลา (Muhammad, 2017)

การเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ (MS) พบว่า ค่า MS ของปลาดุกอุยที่เสริมวิตามินอีที่ระดับ 1,000 มก./กก. มีค่าเฉลี่ยสูงสุด คือ 66.16±4.41% ซึ่งไม่แตกต่างจากการเสริมวิตามินที่ระดับ 600 มก./กก. มีค่า 64.14±4.43% และแตกต่างจากกลุ่มที่เสริมวิตามินที่ระดับ 0 มก./กก. ซึ่งมี MS เท่ากับ 38.26±5.11 (Table 1) สอดคล้องกับการเพิ่มประสิทธิภาพการเคลื่อนไหวของน้ำเชื้อในปลาลิ้นหมา (*Scophthalmus maximus*) ซึ่งเสริมวิตามินอีชนิด

D-α-tocopherol acetate ที่ระดับ 721.60 มก./กก.ในอาหารให้ผลแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่เสริมวิตามินในระดับ 65.14 มก./กก. (Houguo *et al*., 2015) ในปลาเรนโบว์เทราต์ ที่ระดับ 0.03 % และ 0.05 % (Canyurt and Akhan, 2008) ในปลา walleye (Leesa *et al*., 2017) โดยการให้อาหารจำพวกวิตามินอี ช่วยในการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านสรีรวิทยาในร่างกายสัตว์น้ำเมื่ออยู่ในสภาวะเครียดอันส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ (Wedemeyer, 1996) โดยเพิ่มการเคลื่อนไหวของอสุจิประมาณ 40% จากภาวะปกติ ช่วยให้ค่าอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าน้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนไหวของอสุจิต่ำกว่าเมื่อใช้จำนวนอสุจิเท่ากัน (Casselman et al., 2006) ในการทดลองนี้การเสริมวิตามินอีที่ระดับ 600 มก./กก. ทำให้อัตราการมีชีวิตของอสุจิดีที่สุดทั้งนี้การเคลื่อนที่ของอสุจิต้องอาศัยพลังงาน (ATP) ในเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับสารประกอบครีเอทินฟอสเฟต (creatine phosphate) (Dzyuba *et al.,* 2015; Legendre *et al.,* 2016) ในไมโตคอนเดรีย (Fedorov *et al.,* 2015; Cosson, 2013) อีกทั้งปัจจัยความถี่ในการเคลื่อนไหวของหางและแรงดันออสโมติกของสารละลายในและนอกตัวปลาอีกด้วย (Perchec *et al.,* 1997) โดยนอกจากวิตามินอีแล้ววิตามินซียังมีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันโรค (Obikoya, 2009) ระบบสืบพันธุ์ (Harlioglu and Barim, 2004; Barim, 2009) และมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อนำไปช่วยในระบบภูมิคุ้มกันโรคให้ทำงานได้ดีขึ้น (Kruse and Sorum,1994)

สัดส่วนของอสุจิที่ยังมีชีวิต (%VA) พบว่า ค่า %VA ของปลาดุกอุยที่เสริมวิตามินอีในอาหารระดับ 600 มก./กก. มีค่าเฉลี่ยสูงสุด คือ 68.28±3.42 % ซึ่งแตกต่างกับการเสริมวิตามินอีในอาหารระดับ 1,000 มก./กก.และ 0 มก./กก. มี เฉลี่ย คือ 63.74 ±3.41 % และ 60.47±2.61% (P<0.05) (Table 1) ซึ่งจำนวนอสุจิมีชีวิตมีความสัมพันธ์กับการย้อมติดสีของสีย้อมจากการศึกษาในปลาสอดและปลาหางนกยูงที่มีอายุน้อยกว่าจะสามารถพบอัตราการมีชีวิตของอสุจิได้ดีกว่าปลาตัวเต็มวัยในระยะหลังการเจริญพันธุ์ (Smith and Ryan, 2010; Evans, 2010) ทั้งนี้ควรพิจารณาถึงแหล่งที่มาของพ่อแม่พันธุ์และความสมบูรณ์ระหว่างและหลังการสืบพันธุ์ซึ่งอายุของอสุจิจะมีความแปรปรวนตามสภาพแวดล้อม แต่สามารถเพิ่มการปฏิสนธิได้โดยการเพิ่มความถี่การผสมให้มากขึ้น (Pizzari *et al.* 2008) เช่น การใช้น้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสดเพาะพันธุ์ปลาบึก แม้การแช่แข็งน้ำเชื้อจะทำให้อัตราส่วนอสุจิที่มีชีวิตต่อไข่น้อยกว่าน้ำเชื้อสด แต่ประสิทธิภาพในการปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน (วีรพงศ์ และสุบัณฑิต, 2558)

ความเข้มข้นของอสุจิ(C) พบว่า ค่า C ของปลาดุกอุยที่เสริมวิตามินอีในอาหารระดับ 600 มก./กก. มีความเข้มข้นเฉลี่ยของอสุจิสูงที่สุด คือ 50.38±3.14 x 10^6 เซลล์ /มล. โดยกลุ่มที่ให้อาหารทดลองไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (P>0.05) (Table 1) แสดงให้เห็นว่าค่าTSI ของปลาดุกอุยที่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลองไม่ส่งผลต่อความเข้มข้นของอสุจิ โดยพบว่าการเสริมวิตามินอีสามารถเพิ่มการเคลื่อนไหว ความเข้มข้น ขนาดของตัวอสุจิ ทั้งนี้ขึ้นกับปริมาณวิตามินที่สัตว์น้ำได้รับและชนิดของสัตว์น้ำด้วย (Gammanpila *et al.,* 2007; Kashani *et al.,* 2012)

Table 1 Sperm quality of male broad head catfish fed diets supplemented with different vitamin E levels (mg kg^{-1}).

Treatment		Sperm quality		
Vit. E (mg kg^{-1})	TSI (%)	Motility (%)	Viability (%)	Concentration (10^6)
0	1.76±0.47[a]	38.26±5.11[b]	60.47±2.61[b]	50.38±3.14[a]
600	1.30±0.25[b]	66.14±4.43[a]	68.28±3.42[a]	51.02±3.58[a]
1,000	1.28±0.22[b]	66.16±4.41[a]	63.74±3.41[b]	51.01±3.83[a]

* Note a b letters in the same row, the average is statistically different (P <0.05)

การทดลองที่ 2 ผลการเสริมวิตามินอีและระยะเวลาการกระตุ้น ต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟัก

การกระตุ้นอสุจิด้วยน้ำกลั่นที่ระยะเวลาต่าง ๆ พบว่า กลุ่มเสริมวิตามินอีที่ระดับ 600 มก./กก. และได้รับการกระตุ้นอสุจิเป็นเวลา 2 นาที ก่อนนำไปผสมกับไข่ทำให้อัตราการปฏิสนธิเฉลี่ยสูงที่สุด คือ 92.50±3.35% มีอัตราการปฏิสนธิเฉลี่ยแตกต่างจากกลุ่มทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่กระตุ้น (0นาที) พบอัตราปฏิสนธิและอัตราการฟักมีค่า 55.00±7.07%และ 42.00±1.34% ตามลำดับ โดยพบว่า การเสริมวิตามินอีในอาหารร่วมกับการกระตุ้นน้ำเชื้อในระยะเวลาที่เหมาะสมย่อมส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไข่ปลาดุกอุยได้ (P<0.05) โดยอัตราการฟักไข่ที่ผสมกับน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่ได้รับวิตามินอีที่ระดับ 600 มก./กก. ร่วมกับการกระตุ้นอสุจิด้วยน้ำกลั่นที่ระยะเวลา 2 นาที ทำให้อัตราการฟักไข่เฉลี่ยสูงสุด คือ 79.50±0.70% โดยแตกต่างกันกับกลุ่มทดลองอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (Table 2) สอดคล้องกับการทดลองของ Cosson *et al*.(2008) อสุจิของปลาน้ำจืดเคลื่อนที่ได้เป็นระยะเวลา 1-10 นาที โดยอสุจิปลานิลสามารถเคลื่อนที่ได้ 1 ชั่วโมง ในสภาวะที่เหมาะสม (Cosson, 2008) ในสภาพแวดล้อมที่มีค่าออสโมลาลิตี้ที่เหมาะสม เช่นน้ำจืดต่ำกว่า 300 m osmol kg^{-1} (Legendre *et al.,* 2016; Krasznai *et al.,* 2000; Takai and Morisawa, 1995) ซึ่งอสุจิปลาน้ำจืดจะถูกเก็บสะสมไว้ในอัณฑะ (Alavi and Cosson, 2006) นอกจากนี้การเสริมวิตามินอีในอาหารปลาดุกที่ระดับ 125 มก./กก. ยังส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโรคภายใต้สภาวะความเครียดจากอุณหภูมิต่ำ(Patra *et al*., 2007) และส่งผลต่อคุณภาพซากได้อีกด้วย (Yildiz, 2004)

Table 2 Sperm activation time (min) of treatment in broad head catfish, fertilization rate, hatching rate in each dietary.

Group	Treatment		Reproductive performance	
	Vit. E (mg kg^{-1})	Incubation time time (min)	Fertilization rate (%)	Hatching rate (%)
1	0	0	43.50±3.36^{d}	24.50±6.23^{d}
2	0	1	64.50±2.92^{c}	47.64±5.93^{c}
3	0	2	69.32±1.47^{c}	65.12±1.65^{b}
4	0	3	57.19±4.04^{c}	48.73 ±2.72^{c}
5	0	4	39.06±2.94^{d}	23.65 ±3.18^{d}
6	600	0	55.00±7.07^{c}	42.00±1.34^{d}
7	600	1	57.50±5.41^{c}	51.00±9.89^{c}
8	600	2	92.50±3.35^{a}	79.50±0.70^{a}
9	600	3	87.50±3.53^{a}	55.50±6.33^{c}
10	600	4	75.00±7.071^{b}	52.50±10.06^{c}
11	1,000	0	54.00±4.53^{d}	49.00±5.68^{c}
12	1,000	1	75.00±7.07^{b}	72.00±1.75^{a}
13	1,000	2	75.00±7.07^{b}	61.00±12.72^{b}
14	1,000	3	72.50±3.53^{b}	65.00±7.07^{b}
15	1,000	4	77.50±2.04^{b}	56±4.25^{c}
Two-way analysis of variance				
Vit. E (mg kg^{1})			0.036	0.010
Incubation time (min)			0.000	0.001
Vit. E x Incubation time			0.026	0.042

* Note a b letters in the same column, the average is statistically different (P <0.05)

s = significant interaction (p<0.05) ns = not significant interaction (p>0.05)

สรุปผลการศึกษา

การเสริมวิตามินอีในอาหารเลี้ยงปลาดุกอุยเพศผู้ในอัตรา 600 มก./กก. ร่วมกับการกระตุ้นน้ำเชื้อด้วยน้ำสะอาดเป็นเวลา 2 นาที ก่อนการผสมเทียมส่งผลต่อการเพิ่มคุณภาพน้ำเชื้อในการเพาะพันธุ์ปลาดุกอุย โดยส่งผลต่ออัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไข่ที่ดีที่สุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ทุนสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน ปีงบประมาณ 2559

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 127 หน้า.

นิพนธ์ อุปการัตน์ สมพร โกศล, นิภา กาลศรี และวรัณยู ขุนเจริญรักษ์. 2556. การเลี้ยงปลาดุกอุยในกระชังโดยการให้อาหารในเวลาที่ต่างกัน. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดแพร่ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง.

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์ ยงยุทธ ทักษิญ และสุภาพ แก้วละเอียด. 2537. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2537. กองประมงน้ำจืด, กรมประมง. 31 หน้า

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. 2558. การพัฒนาศักยภาพในการจัดเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทยเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์. รายงานการวิจัยประจำปีงบประมาณ 2557. มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี.

สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. สถิติการเกษตรของประเทศไทย ปี 2559. แหล่งข้อมูล :https: //www.oae.go.th/download/download_journal/2560/yearbook59.pdf. 29 กันยายน 2560.

Adewolu, M.A. and O.O. Aro. 2009. Growth, feed utilization and haematology of *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) fingerlings fed diets containing different levels if vitamin C. American Journal of Applied Sciences. 6:1675-1681.

Alavi, S.M.H. and J. Cosson. 2006. Sperm motility in fishes. (II) Effects of ions and osmolality: A review. Cell Biol. Int. 30, 1–14.

Asli, C. and U. Tamer. 2017. Antioxidant vitamin E/Cyclodextrin inclusion complex electrospun nanofibers: enhanced water solubility, prolonged shelf life and photostability of vitamin E. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 65(26).DOI10.1021/acs.jafc.7b01562.

Azzi, A. and A. Stocker. 2000. Vitamin E: non-oxidant roles. Progress in Lipid Research 39: 231-255.

Barim, O. 2009. The effects of dietary vitamin E on the oxidative stress and antioxidant enzyme activities in their tissues and ovarian egg numbers of freshwater crayfish *Astacus leptodactylus* (Eschscholtz, 1823). Journal of Animal and Veterinary Advances.8:1190-1197.

Björndahl, L., I. Söderlund and U. Kvist. 2003. Evaluation of the one-step eosin-nigrosin staining technique for human sperm vitality assessment. Human Reproduction.18(4): 813-816.

Canyurt, M A. and S. Akhan. 2008. Effect of dietary vitamin E on the sperm quality of rainbow trout (*Onchorynchus mykiss*). Aquaculture Research. 39: 1014-1018.

Casselman, S.J., A.I. Schulte-Hostedde and R. Montgomerie. 2006. Sperm quality influences male fertilization success in walleye (*Sander vitreus*). Can. J. Fish. Aquat. Sci. 63: 2119-2125.

Cosson, J. 2008. The motility apparatus of fish spermatozoa. In: Alavi SMH, Cosson J, Coward K, Rafiee G, editors. Fish Spermatology. Oxford: Alpha Science International Ltd; p. 281–316.

Cosson, J. 2013. ATP: The sperm movement energizer. In: Kuester E, Traugott G, editors. Adenosine triphosphate: chemical properties, biosynthesis and functions in cells. New York: Nova Publisher Inc;. p. 46.

Cosson, J. A.L. Groison, M. Suquet, C. Fauvel, C. Dreanno and R. Billard. 2008. Studying sperm motility in marine fish: an overview on the state of the art. J. Appl. Ichthyol. 24:460–486.

Dzyuba, V. B. Dzyuba, J. Cosson and M. Rodina. 2015. Enzyme activity in energy supply of spermatozoon motility in two taxonomically distant fish species (sterlet *Acipenser ruthenus*, Acipenseriformes and common carp *Cyprinus carpio*, Cypriniformes). Theriogenology. 85:567–574.

EL Naggar, G.O. and R.T. Lovell. 1991. L-ascorbyl-2-monophosphate has equal antiscorbutic activity as L-ascorbic acid but L-ascorbyl-2-sulfate is inferior to L-ascorbic acid for channel catfish. Journal of Nutrition and Health, 1622-1626.

Evans, JP. 2010. Quantitative genetic evidence that males trade attractiveness for ejaculate quality in guppies. Proc R Soc B. 277:3195–3201.

Fedorov, P, B. Dzyuba, G. Fedorova, R. Grabic, J. Cosson and M. Rodina. 2015. Quantification of adenosine triphosphate, adenosine diphosphate, and creatine phosphate in sterlet spermatozoa during maturation. J. Anim. Sci. 93:5214. doi:10.2527/jas.2015-9144.

Gammanpila, M., A. Yakupitiyage and A. N. Bart. 2007. Evaluation of the effects of dietary vitamin C, E and zinc supplementation on reproductive performance of nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). Sri lanka. Journal of Aquatic Sciences,12: 39-60.

Gao, J., K. Shunsuke, M. Ishikawa, S. Yokoyama and R.E. Mamauag. 2014. Interactive effects of vitamin C and E supplementation on growth performance, fatty acid composition and reduction of oxidative stress in juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* fed dietary oxidized fish oil. Aquaculture. 20: 84-90.

Hajirezaee, S., B. Mojazi, A.R. Mirvaghefi and A. Sheikh 2010. Evaluation of semen quality of endangered caspian brown trout (*Salmo trutta caspius*) in different times of spermiation during a spawning season. Czech Journal of Animal Science. 55: 445-455.

Harlioglu, M.M. and Barim O. 2004. The effect of dietary vitamin E on the pheopodal egg and stage 1 juvenile numbers of freshwater crayfish (*Astacus leptodactylus*). Aquaculture; 236: 267-276.

Houguo, Xu, L. Huang, M. Liang, K. Zheng and X. Wang. 2015. Effect of dietary vitamin E on the sperm quality of turbot (*Scophthalmus maximus*). J Ocean Univ China (Oceanic and Coastal Sea Research) 2015; 14 (4): 695- 702.

Kashani Z. H., M. R. Imanpoor, A. Shabani and S. Gorgin. 2012. Effects of dietary vitamin C and E and highly unsaturated fatty acid on biological characteristic of gonad, hatching rate and fertilization success in goldfish (*Carassius auratus Gibelio*). World Journal of Fish and Marine Sciences, 4 (2):131-135.

Krasznai, Z., T. Marian, H. Izumi, S. Damjanovich, L. Balkay, L. Tron and M. Morisawa. 2000. Membrane hyperpolarization removes inactivation of Ca^{2+} channels leading to Ca^{2+} in Lux and initiation of sperm motility in the common carp. Biophysics. 97: 2052–2067.

Kruse, H. and H. Sorum. 1994. Transfer of multiple drug resistance plasmids between bacteria of diverse origins in natural microenvironments. Applied Environmental Microbiology; 60: 4015-4021.

Leesa, K, B. Phillip and A.J. Silla. 2017. The effect of antioxidants on sperm motility activation in the Booroolong frog. Animal reproduction science. 183:DOI10.1016/j.anireprosci.2017.05.008

Legendre, M, S.M.H. Alavi, B. Dzyuba, O. Linhart, G. Prokopchuk, C. Cochet, R. Dugué and J. Cosson 2016. Adaptations of semen characteristics and sperm motility to harsh salinity: extreme situations encountered by the euryhaline tilapia *Sarotherodon melanotheron heudelotii* (Dumeril, 1859). Theriogenology. doi:10.1016/j.theriogenology.2016.04.066 14.

Mehrad, B., H. Jafaryan, and M.M. Taati. 2012. Assessment of the effects of dietary vitamin E on growth performance and reproduction of zebrafish, *Danio rerio* (Pisces, Cyprinidae). Journal of Oceanography and Marine Science, 3 (1): 1-7.

Mehrad, B. and M. Sudagar. 2010. Dietary vitamin E requirement, fish performance and reproduction of guppy (*Poecilia reticulata*). Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation, 3 (3): 239-246.

Muhammad, Z. 2017. Effects of dietary vitamin E on male reproductive system. Asian Pacific Journal of Reproduction. 6(4): 145-150.

Na-Nakorn,U., W. Rangsin and J. Boon-ngam 2004. Allotriploidy increases sterility in the hybrid between *Clarias macrocephalus* and *Clarias gariepinus*. Aquaculture. 237:73–88.

Nguyen, T., S. Charles, L. Daniel, H. Gasser, H. Redl, G. Schlag and N. David 1993. Free radical activity and loss of plasma antioxidants, vitamin E, and sulfhydryl groups in patients with burns: The 1993 moyer award. Journal of Burn Care & Rehabilitation .14(6):602-9.

Obikoya, G. 2009. Vitamin E (alpha-tocopherol). Available on (http://shapfit.com/vitamin E information.html), pp: 302.

Patra R.W., J.C. Chapman, R.P. Lim and Gehrke P.C. 2007. The effects of three organic chemicals on the upper thermal tolerances of four freshwater fishes. Environ. Toxicol. Chem ; 26: 1454-1459.

Perchec, G., J.L. Gatti, J. Cosson, C. Jeulin, F. Fierville and R. Billard. 1997. Effects of extracellular environment on the osmotic signal transduction involved in activation of motility of carp spermatozoa. J. Reprod. Fertil ; 110:315–327.

Pizzari, T., Dean R., A. Pacey, H. Moore and M.B. Bonsall. 2008. The evolutionary ecology of pre- and post-meiotic sperm senescence. Trends Ecol Evol. 23: 131–140.

SAS. 1996. SAS User's Guide: Statics, Version 6.12th Edition. SAS Institute Inc. Cary, NC

Shadia, M., S. Mohamed, M. Afnan, I. Magdy, H. Amal and S. Heba. 2012. Vitamin E as antioxidant in female african catfish (*Clarias gariepinus*) exposed to chronic toxicity of atrazine. Egypt. J. Aquat. Biol. Fish., Vol. 16, No. 2: 83 - 98.

Shamspour, S and H. Khara. 2016. Effect of age on reproductive efficiency of adult rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* Walbaum, 1972. Iranian Journal of Fisheries Sciences. 15(3): 945- 956.

Sood, S., R. K. Marya, R. Reghunandanan, G.P. Singh, T. S. Jaswal and K. Gopinathan. 1992. Effect of vitamin D deficiency on testicular function in the rat. Annals of Nutrition and Metabolism. 36: 203-208.

Stacey, R. 2006. Nutrition Support of Fish. Journal of Exotic Pet Medicine. 15(4): 264-268.

Smith, C.C. and M.J. Ryan. 2010. Evolution of sperm quality but not quantity in the internally fertilized fish *Xiphophorus nigrensis*. J Evol Biol. 17:1759–1771.

Takai, H. and M. Moriwasa. 1995. Change in intracellular K^+concentration caused by external osmolality change regulates sperm motility of marine and freshwater teleosts.J. Cell Sci. 108: 1175–1181.

Takeuchi, M., S. Ishii, and T. Ogino. 1981. Effect of dietary vitamin E on growth, vitamin E distribution, and mortalities of fertilized eggs and fry in ayu, *Plecoglossus altivelis*. Bulletin of the Tokai Regional Fisheries Research Laboratory. 104:111-122.

Vuthiphandchai, V. and Y. Zohar. 1999. Age-related sperm quality of captive striped bass, *Morone saxatilis*. Journal of the World Aquaculture Society. 30: 65-72.

Wachirachaikarn, A., W. Rungsin, P. Srisapoome, S. Klinbunga and U. Na-Nakorn. 2017. Molecular characterization and expression analysis of cyclin B and cell division cycle 2 in gonads of diploid and triploid bighead catfish, *Clarias macrocephalus* Günther, 1864. Agriculture and Natural Resources, DOI: 10.1016/j.anres.2016.05.004.

Wedemeyer, G.A. 1996. Physiology of fish in intensive culture systems. New York: Chapman $ Hall.

Yildiz, M. 2004. The study of fillet quality and the growth performance of Rainbow trout (*Oncorchynchu mykiss*) fed with diets containing different amounts of Vitamin E. Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences. 4: 81-86.

Zonneveld, N. 1990. Hatchery manual for grass carp culture. In: workshop held at Lam Pao .Fisheries. 29-31 August 1990. Thailand. pp. 31-34.

วันรับบทความ (Received date) 28 ก.ย. 2560
วันแก้ไขบทความ (Revised date) 14 ก.พ. 2561
วันตอบรับบทความ(Accepted date) 5 มิ.ย. 2561