

ความตกไข่ คุณภาพของไข่ และการถดถอยของเนื้อเยื่อรังไข่ของปลาหมอสีอย่างต่อเนื่อง ในช่วงเวลาที่มีการวางไข่อย่างต่อเนื่อง

Fecundity, Egg Quality and Ovarian Regression of Female Zebrafish in the Continuous Spawning Period

สุทธิรัตน์ ปัญจักษ์¹ มณฑกานต์ ฉัตรชฤทธิมงคล¹ และวัลย์ลดา กลางนุรักษ์^{1*}
Sutthiratt Panchakhan¹, Monthakarn Chatcharitmongkol¹ and Wanlada Klangnurak^{1*}

บทคัดย่อ

ปลาหมอสันนิษฐานว่าเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอย่างหนึ่ง ซึ่งนิยมนำมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม ทำให้เกษตรกรต้องผสมปลาหมอสันนิษฐานเป็นจำนวนมากเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการของตลาด การผสมพันธุ์ปลาอย่างต่อเนื่องอาจทำให้แม่พันธุ์มีความเสื่อมโทรม นำไปสู่การผลิตลูกปลาที่มีคุณภาพและปริมาณที่ลดลงได้ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ตรวจสอบความถดถอยของรังไข่จากแม่พันธุ์ปลาหมอสันนิษฐานที่มีการปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง โดยเปรียบเทียบความตกไข่ อัตราการผสมติด อัตราการฟักตัวออกจากไข่ของตัวอ่อน และความผิดปกติของตัวอ่อน รวมถึงตรวจสอบลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อรังไข่ ระหว่างปลาหมอสันนิษฐานเพศเมียที่ปล่อยไข่ครั้งแรก (กลุ่มควบคุม) กับปลาหมอสันนิษฐานเพศเมียที่ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องเป็นจำนวน 5 ครั้ง ผลการศึกษาพบว่าเมื่อปลาแม่พันธุ์ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องจะทำให้ความตกไข่ อัตราการผสมติด และอัตราการฟักตัวของไข่ที่ผลิตได้มีแนวโน้มลดลง จำนวนตัวอ่อนที่ผิดปกติจะมีปริมาณเพิ่มขึ้น อีกทั้งผลการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพ ยังพบว่าเซลล์ไข่ในรังไข่มีการพัฒนาช้าลง ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบว่าเมื่อแม่พันธุ์ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง จะทำให้เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อรังไข่ ส่งผลต่อคุณภาพและปริมาณของไข่และตัวอ่อนที่ผลิตได้ ดังนั้นหลังการผสมพันธุ์แต่ละครั้งควรมีการพักปลาแม่พันธุ์ในระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อให้รังไข่ได้มีการฟื้นฟูสภาพก่อนการผสมพันธุ์ในครั้งต่อไป

คำสำคัญ: อัตราการผสมติด ความผิดปกติของตัวอ่อนปลา อัตราการฟักตัวออกจากไข่ เนื้อเยื่อรังไข่

Abstract

The zebrafish is one of the most important fish species in economic terms as it is an extremely popular aquarium fish. Farmers produce zebrafish stock continuously in order to supply the huge demand for the fish in the ornamental fish market. However, continuous breeding can lead to the deterioration in quality of the female fish. In this study, we focus on the regression of ovary after continuously spawning several times. Fecundity, fertilization rate, hatchability rate, number of abnormal larvae, and histology of the ovarian tissue were compared between females that spawn for the first time (control group) and females that had spawned continuously five times. The results showed that fecundity, fertilization rate and hatchability rate of eggs produced from female zebrafish that spawned continuously decreased, whereas the number of abnormal larvae produced increased. Moreover, histological studies of ovarian tissue revealed that female fish that had spawned continuously showed delayed development of oocytes in their ovarian tissues. Therefore, it can be concluded that continuous spawning of females potentially causes abnormalities of ovarian tissue and affects the quality and quantity of zebrafish eggs and larvae. Farmers should set an inter-spawning interval for female zebrafish that allows for good recovery of ovarian structure and function between spawning.

Keywords: fertilization rate, abnormal fish larvae, hatchability rate, ovarian tissue

¹ คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ 10520

¹ Faculty of Agricultural Technology, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Ladkrabang, Bangkok 10520

*Corresponding author, Email: wanlada.kl@kmitl.ac.th

คำนำ

ปลาม้าลายเป็นปลาน้ำจืดขนาดเล็ก จัดอยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน (Cyprinidae) มีถิ่นกำเนิดในแถบเอเชียใต้ ซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ นิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม เนื่องจากมีสีสันสวยงาม และเลี้ยงดูได้ง่าย อีกทั้งยังมีความได้เปรียบทางด้านชีววิทยา เช่น มีความคงทนสูง และมีการพัฒนาตัวอ่อนอย่างสมบูรณ์ภายใน 48-72 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ ซึ่งจัดว่าเป็นข้อดีสำหรับการลงทุนลงแรงของผู้เพาะเลี้ยงปลาม้าลายเป็นอย่างมาก อีกทั้งในปัจจุบันมีการนำปลาม้าลายมาใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบในงานทางด้านวิทยาศาสตร์อย่างกว้างขวาง เพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับสัตว์ทดลองตามแผนกลยุทธ์ว่าด้วยการพัฒนางานเลี้ยงและใช้สัตว์น้ำเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (Briggs, 2002) โดยปกติปลาม้าลายสามารถออกไข่ได้ประมาณ 200 ฟองต่อครั้ง (Silva et al., 2012) อีกทั้งในการเพาะพันธุ์ปลาเพื่อการส่งออกนั้นจะต้องเน้นทั้งคุณภาพและปริมาณของลูกปลาเพื่อให้คุ้มกับการลงทุนและเป็นที่ยอมรับของลูกค้านในเชิงธุรกิจระยะยาว ทำให้ต้องมีการใช้พ่อแม่พันธุ์ซ้ำ ทำให้ปลาม้าลายเพศเมียต้องมีการปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพและปริมาณของไข่ที่ได้รับในแต่ละครอก โดยปกติปลาม้าลายจะวางไข่ก่อนฤดูมรสุม แต่ภายใต้สภาวะที่มีการควบคุมแสงและอุณหภูมิในห้องปฏิบัติการ ปลาม้าลายจะสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปีทุก 1-6 วันเมื่อเลี้ยงในสภาพที่มีจำนวนตัวผู้มากกว่าในถังเลี้ยงเดียวกัน หรือทุก 4-7 วันเมื่อเลี้ยงในสภาพปกติที่มีจำนวนทั้งสองเพศไม่แตกต่างกัน (Clelland and Peng, 2009) ระยะห่างระหว่างการปล่อยไข่ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการฟื้นฟูเนื้อเยื่อรังไข่ของตัวเมียหลังจากการปล่อยไข่ในแต่ละครั้ง ลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อรังไข่ในปลาม้าลายจากการศึกษาของ Koç et al. (2008) ทำให้ทราบลักษณะของเซลล์ไข่ใน 4 ระยะตั้งแต่กระบวนการสร้างเซลล์ไข่ (oogenesis) ไปจนถึงช่วงที่ไข่สมบูรณ์ (mature stage) ในสภาวะปกติ แต่ยังไม่มียารายงานถึงปริมาณ คุณภาพของไข่ หรือลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อรังไข่จากแม่พันธุ์ที่มีการเว้นระยะสืบพันธุ์เป็นช่วงเวลาหนึ่งแล้วถูกนำมาผสมพันธุ์อย่างต่อเนื่อง

โดยการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาการถดถอยของระบบสืบพันธุ์ในปลาม้าลาย หลังผ่านการผสมพันธุ์เป็นจำนวนหลายครั้งติดต่อกัน โดยประเมินจาก ความคงทน อัตราการผสมติด ความผิดปกติของตัวอ่อน และอัตราการฟักตัวออกจากไข่ของตัวอ่อน รวมถึงตรวจสอบระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่ในเนื้อเยื่อรังไข่ด้วยการศึกษาลักษณะทางพยาธิสภาพ เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาระบบฟาร์มที่มีการเพาะเลี้ยงปลาม้าลาย

วิธีการศึกษา

การเลี้ยงดูสัตว์ทดลองและการผสมปลาม้าลาย

เลี้ยงปลาม้าลาย (*Danio rerio*) ตามวิธีการของ Westerfield (1995) โดยมีการกำหนดให้มีช่วงสว่าง 14 ชั่วโมงสลับกับช่วงมืด 10 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียสในระบบเลี้ยงปลาม้าลาย และให้อาหารแผ่นบดในช่วงเช้า (9:00 นาฬิกา) และช่วงเย็น (16:00 นาฬิกา)

การจับคู่ผสมพันธุ์ปลาม้าลายจะเริ่ม ณ เวลา 17:00 นาฬิกา โดยนำปลาม้าลายเพศผู้และเพศเมีย ใส่ในกล่องจับคู่ผสมพันธุ์อัตราส่วนเพศ 1:1 ซึ่งก่อนการจับคู่ปลาจะอยู่ในสภาวะอดอาหาร โดยจะไม่มีการให้อาหารในช่วงเย็นวันนั้น เมื่อถึงเวลา 8:00 นาฬิกาของวันถัดไป เป็นช่วงเวลาที่ปลาม้าลายเริ่มมีการตกไข่ โดยจะสังเกตได้จากการบวมบริเวณช่องท้องของปลาเพศเมีย ซึ่งบ่งบอกถึงความพร้อมในการวางไข่ หลังจากนั้นจะปล่อยเพศผู้และเพศเมียให้เกิดการเกี้ยวพาราสีเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที เพื่อให้ตัวเมียปล่อยไข่ จากนั้นบันทึกข้อมูลเพื่อหาความผิดปกติในช่วงตกไข่ดังกล่าวต่อไป เว้นระยะห่าง 5 วันก่อนทำการผสมพันธุ์ครั้งใหม่ ทำการผสมพันธุ์โดยใช้ปลาม้าลายตัวเดิม 5 ครั้ง เป็นจำนวน 10 ตัว

การประเมินความผิดปกติในช่วงตกไข่

ทำการประเมินความผิดปกติในช่วงตกไข่ โดยตรวจสอบจากความคงทน อัตราการผสมติด อัตราการฟักตัว และความผิดปกติของตัวอ่อน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งหลังจากปลาม้าลายวางไข่ในทุก ๆ ครั้ง ทำการเก็บไข่ทั้งหมดใส่ในจานเพาะเชื้อ แล้วนับจำนวน จากนั้นหาความคงทน โดยนำจำนวนไข่ที่นับได้ ไปหาลำยละตามสมการที่ (1) โดยกำหนดให้จำนวนไข่ทั้งหมดที่ปลาตัวเมียปล่อยในการผสมครั้งแรกเป็น 100 เปอร์เซนต์

$$\text{ความคงทน (\%)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ได้รับ}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100 \dots\dots\dots (1)$$

เมื่อเวลาผ่านไป 2 ชั่วโมงทำการนับจำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ ซึ่งสังเกตได้จากเซลล์ไข่จะพัฒนาเข้าสู่ระยะ cleavage โดยมีจำนวนเซลล์ไข่มากกว่า 4 เซลล์ (Figure 1a) แล้วนำไปหาร้อยละของอัตราการผสมติด ตามสมการที่ (2)

$$\text{อัตราการผสมติด (\%)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100 \dots\dots\dots (2)$$

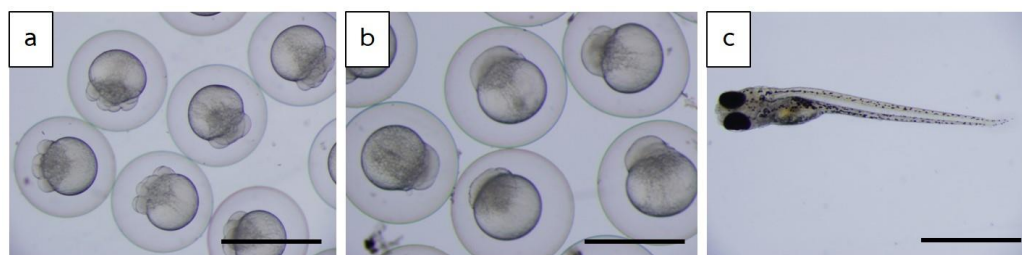


Figure 1 External morphology of eggs and an abnormal larva, (a) fertilized eggs possess characteristic of over the 4 cell stages, (b) unfertilized eggs remaining in the 1st cell stage at 2 hours post fertilization and (c) a morphological abnormality of larva displaying the dorsal curvature (scale bar represents 1 mm).

เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 3-4 วัน ตัวอ่อนจะเริ่มมีการฟักตัวออกจากไข่ ซึ่งจะทำการนับจำนวนลูกปลาทั้งหมดที่สามารถฟักตัวออกมา แล้วหาร้อยละของอัตราการฟักตัวตามสมการที่ (3) ในขณะเดียวกันจะทำการบันทึกจำนวนของตัวอ่อนที่มีลักษณะผิดปกติ แล้วทำการหาร้อยละความผิดปกติของตัวอ่อน ตามสมการที่ (4)

$$\text{อัตราการฟักตัว (\%)} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่สามารถฟักตัวได้}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100 \dots\dots\dots (3)$$

$$\text{ความผิดปกติของตัวอ่อน (\%)} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนที่ผิดปกติ}}{\text{จำนวนตัวอ่อนที่สามารถฟักตัวได้ทั้งหมด}} \times 100 \dots\dots\dots (4)$$

ความผิดปกติของเนื้อเยื่อรังไข่ที่มีการสืบพันธุ์อย่างต่อเนื่อง

เพื่อศึกษาความผิดปกติของระยะการพัฒนาของเซลล์ไข่ ทำการตรวจสอบเนื้อเยื่อรังไข่ของปลาม้าลายเพศเมียด้วยวิธีการทางพยาธิสภาพ โดยจะแบ่งเป็น 2 กลุ่มการทดลอง คือ กลุ่มตัวเมียที่มีการปล่อยไข่ครั้งเดียว (the 1st spawning group) จำนวน 5 ตัว และกลุ่มตัวเมียที่ปล่อยไข่ติดต่อกันมาทั้งหมด 5 ครั้ง (the 5th spawning group) จำนวน 5 ตัว หลังจากทำการทดลองจับคู่ปลาครบจำนวนครั้งที่กำหนดไว้ เก็บรวบรวมผลในช่วง 8:00 นาฬิกา ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ปลาพร้อมปล่อยไข่ ทำการุณยฆาตโดยการตัด spinal cord จากนั้นใช้เครื่องมือผ่าตัดเปิดช่องท้องและเก็บตัวอย่างใน buffer formalin ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลาอย่างน้อย 48 ชั่วโมง

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อประกอบไปด้วย การตัดแต่งชิ้นเนื้อก่อนนำไปผ่านกระบวนการดิ่งน้ำด้วย Tissue processing (Microtome รุ่น HM 335E) จากนั้นนำไปฝังในพาราฟิน โดยจะตัดเนื้อเยื่อความหนา 5 ไมโครเมตร ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Rotary microtome) และตรึงให้เนื้อเยื่อติดกับสไลด์ด้วยความร้อน 55 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องอุ่นสไลด์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (H&E) จากนั้นนำไปสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พร้อมบันทึกสัดส่วนของระยะเซลล์ไข่ในเนื้อเยื่อรังไข่ทั้งหมด แบ่งการพัฒนาของไข่ออกเป็น 4 กลุ่มคือ immature (ระยะไข่ไม่สุก), maturation (ระยะไข่ที่สมบูรณ์แล้ว), ovulation (ระยะตกไข่) และ regression (ระยะที่มีการเสื่อมสภาพของรังไข่) ดัดแปลงจาก Brown-Peterson et al. (2011) โดยลักษณะของไข่ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ immature ได้แก่ oogonia (OO) และ primary growth (PG) ซึ่งเซลล์ไข่ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้จะไม่มีการฝ่อของเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ (Figure 2) ระยะ maturation ในระยะนี้เซลล์ไข่จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับระยะ immature โดยระยะของเซลล์ไข่ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ maturation คือ cortical alveolar (CA) และ vitellogenin (VTG) ส่วนระยะ ovulation เซลล์ไข่จะมีขนาดใหญ่ขึ้นซึ่งในระยะนี้เซลล์ไข่จะพร้อมปล่อยออกมาภายนอกตัวปลาเพื่อรับการปฏิสนธิ ซึ่งลักษณะของเซลล์ไข่จะเกิดการเคลื่อนตัวของ

germinal vesicle หรือ germinal vesical movement (GVM) และการแตกออกของเยื่อหุ้ม germinal (germinal vesicle breakdown, GVBD) และระยะ regression ในระยะนี้จะเกิด postovulatory follicle complex (POF) ขึ้น ซึ่งเป็นลักษณะที่บ่งชี้ถึงการเสื่อมสภาพของรังไข่ จากนั้นประเมนร้อยละของเซลล์ไข่ในแต่ละระยะ ตามสมการที่ (5)

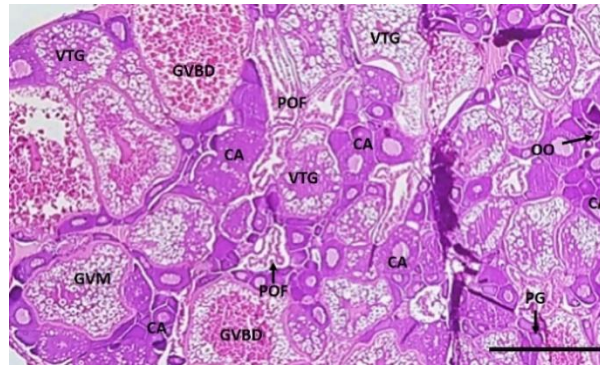


Figure 2 Histological assessment of ovarian tissue indicating 4 developmental stages including immature stage represented by oogonia (OO) and primary growth (PG), maturation stage represented by cortical alveolar (CA) and vitellogenin (VTG), ovulation stage represented by germinal vesical movement (GVM) and germinal vesicle breakdown (GVBD), and regression stage represented by postovulatory follicle complex (POF) (scale bar represents 1 mm).

$$\text{ร้อยละของเซลล์ไข่แต่ละระยะ} = \frac{\text{จำนวนของเซลล์ไข่ในระยะนั้น ๆ ที่พบในรังไข่} \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \dots (5)$$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การนำเสนอข้อมูลทั้งหมดแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของร้อยละ $\pm$ SE แล้วหาความแตกต่างทางสถิติ ของความตกของไข่ ร้อยละของอัตราการผสมติด ร้อยละอัตราการฟักออกจากไข่ และร้อยละจำนวนตัวอ่อนที่ผิดปกติ ที่ผลิตได้จากม้ามลายเพศเมีย ซึ่งปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องเป็นจำนวน 5 ครั้ง โดยใช้ One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แล้ว และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองโดยวิธี Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนการเปรียบเทียบสัดส่วนของระยะเซลล์ไข่ ในกลุ่มตัวอย่าง ระหว่างปลาแม่ลายเพศเมียที่ปล่อยไข่ครั้งแรก (กลุ่มควบคุม) กับปลาแม่ลายเพศเมียที่ปล่อยไข่เป็นครั้งที่ 5 จะเปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติในแต่ละระยะด้วย T-test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความผิดปกติในช่วงการตกไข่

จากการศึกษาความตกไข่ อัตราการผสมติด อัตราการฟัก และร้อยละความผิดปกติของตัวอ่อน ในปลาแม่ลายที่ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง พบว่าเมื่อปลาปล่อยไข่ติดต่อกันหลายครั้งจะทำให้ความตกไข่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) โดยมีความตกไข่ลดลงถึง 63.71 เปอร์เซ็นต์ในการปล่อยไข่ครั้งที่ 5 เมื่อเทียบกับครั้งแรก (Figure 3a) ร้อยละของไข่ที่ผสมติดมีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละครั้งของการปล่อยไข่ ($P < 0.001$) โดยลดลงจาก 97.90 ± 0.96 เปอร์เซ็นต์ในการปล่อยไข่ครั้งแรกจนเหลือ 87.83 ± 3.30 เปอร์เซ็นต์ในการปล่อยไข่ครั้งที่ 3 เมื่อปลาปล่อยไข่ต่อไปในครั้งที่ 4 และ 5 พบว่าร้อยละของการผสมติดจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการผสมในครั้งแรก และครั้งที่ 2 (Figure 3b) อัตราการฟักของไข่ปลาที่ปล่อยออกมาแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.001$) โดยพบว่าเมื่อปลาแม่ลายปล่อยไข่ต่อเนื่องกัน จะทำให้จำนวนตัวอ่อนที่ฟักตัวออกจากไข่มีแนวโน้มลดลง ในครั้งแรกตัวอ่อนสามารถฟักตัวออกจากไข่ได้มากถึง 97.82 ± 13.94 เปอร์เซ็นต์ และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับไข่ที่ถูกปล่อยมาในครั้งที่ 4 และ 5 ($P \leq 0.05$) ซึ่งมีอัตราการฟักตัวออกจากไข่เหลือเพียง 86.56 ± 24.58 และ 75.16 ± 10.44 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Figure 3c) นอกจากนี้เมื่อพิจารณาถึงความผิดปกติของตัวอ่อนที่ได้จากปลาแม่ลายเพศเมียซึ่งได้ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องพบว่า ในการปล่อยไข่ครั้งแรกมีความผิดปกติของตัวอ่อนน้อยมากเพียง 0.23 ± 0.22 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทำการผสมต่อไปในครั้งที่ 4 และ 5 พบว่าความผิดปกติของตัวอ่อนที่ได้จะเพิ่มขึ้นอย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยเพิ่มเป็น 3.76 ± 2.91 และ 5.57 ± 2.50 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (Figure 3d) ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้ให้เห็นได้อย่างชัดเจนว่า เมื่อใช้ปลาเพศเมียที่ปล่อยไข่ติดต่อกันหลายครั้งจะทำให้ปริมาณและคุณภาพของไข่และตัวอ่อนที่ได้มีแนวโน้มลดลงอย่างเห็นได้ชัด

ปริมาณและคุณภาพไข่และตัวอ่อนที่ลดลง อาจแสดงถึงความผิดปกติของกระบวนการตกไข่หรือ ovulation ซึ่งกระบวนการนี้เป็นขั้นตอนทางชีววิทยาที่สำคัญในการเตรียมไข่ให้พร้อมสำหรับกระบวนการปฏิสนธิ (Clelland and Peng, 2009) การมีอัตราการผสมติดที่ลดลงเมื่อปลาปล่อยไข่แล้วหลายครั้ง แสดงว่ามีสัดส่วนของไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิเป็นจำนวนมาก สังเกตได้จากเซลล์ในระยะ Cleavage ไม่สามารถแบ่งตัวเป็น 4 เซลล์ เซลล์ไข่ส่วนใหญ่จะหยุดพัฒนาตั้งแต่เซลล์แรก (Figure 1b) แล้วไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิจะตายในระยะเวลาต่อมา (Klangnurak et al., 2018) ซึ่งเป็นตัวชี้วัดของการผิดปกติในช่วงกระบวนการตกไข่ได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่จะมีความผิดปกติสูงขึ้นเรื่อย ๆ โดยตัวอ่อนจะมีลำตัวโค้งงอ (Figure 1c) และเมื่อพิจารณาความดกไข่ที่ลดลง ชี้ให้เห็นว่ามีความถดถอยของวัฏจักรการสืบพันธุ์อย่างชัดเจนในปลาตัวเมียที่ปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องกันตั้งแต่ครั้งที่ 4 ขึ้นไป

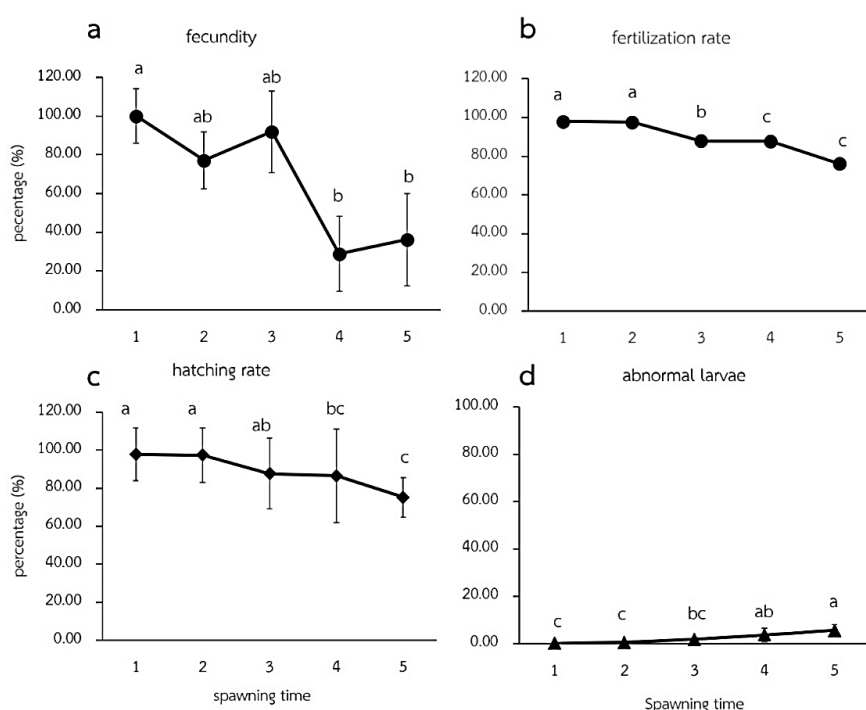


Figure 3 Fecundity (a), fertilization rate (b), hatching rate (c) and number of abnormal larvae (d) produced continuously by zebrafish females from the first to the 5th of spawning times. Different letters represent significant differences among the data ($P \leq 0.05$). Values are mean $\pm$ SE.

การพัฒนาของระยะในรังไข่ปลาแม่ลายเพศเมีย

การตรวจสอบลักษณะทางพยาธิสภาพบริเวณรังไข่ด้วยการย้อมด้วยสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน โดยทำการวิเคราะห์ระยะการพัฒนาของไข่ ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มได้แก่ immature, maturation, ovulation และ regression พบว่าเซลล์ไข่ในระยะ immature, ovulation และ regression ในกลุ่มปลาเพศเมียที่มีการปล่อยไข่ครั้งแรก และกลุ่มที่มีการปล่อยไข่ไปแล้วจำนวน 5 ครั้ง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ปลาแม่ลายที่ผ่านการปล่อยไข่แล้ว 5 ครั้ง จะมีเซลล์ไข่ในระยะ maturation มากกว่าปลาแม่ลายที่มีการปล่อยไข่เป็นครั้งแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยคิดเป็น 19.17 เปอร์เซ็นต์ (Figure 4) ทั้งนี้ตามการทดลองของ Klangnurak and Tokumoto (2017) ได้ระบุไว้ว่าเวลา 08:00 นาฬิกา ไข่จะมีการพัฒนาสู่ระยะ ovulation แต่ในปลาเพศเมียที่มีการปล่อยไข่ติดต่อกัน 5 ครั้ง ยังพบเซลล์ไข่ในระยะ maturation เป็นจำนวนมาก แสดงให้เห็นถึงการพัฒนาที่ช้าลงของเซลล์ไข่ภายในรังไข่เมื่อปลาแม่ลายมีการปล่อยไข่อย่างต่อเนื่อง ซึ่งสอดคล้องกับความดกไข่ที่ลดลงในการปล่อยครั้งที่ 5 เนื่องจากเซลล์ไข่ที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ ovulation ซึ่งเป็นระยะก่อนปล่อยไข่มีจำนวนน้อย จึงส่งผลให้มีจำนวนไข่ที่ถูกปล่อยออกมาหลังการจับคู่ผสมพันธุ์ หรือความดกไข่ลดลงด้วยเช่นกัน

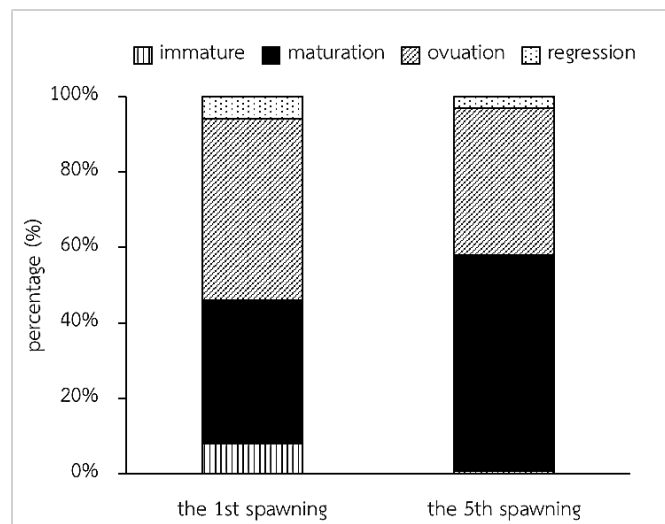


Figure 4 Percentage of oocytes stages in the ovarian tissue in average (n=10) from the first spawning females and the 5th spawning females.

ความผิดปกติของปริมาณ และคุณภาพไข่และตัวอ่อนที่เกิดขึ้นจากปลาหมอเทศเมื่อยที่ปล่อยไข่ติดต่อกันหลายครั้ง แสดงให้เห็นว่า แม้จะมีช่วงพักระหว่างรอบสืบพันธุ์ถึง 5 วัน ซึ่งเป็นระยะเวลาพักที่เพียงพอแล้วในการปล่อยไข่รอบใหม่ ตามการศึกษาของอนันต์ (Clelland and Peng, 2009) แต่ระยะเวลาพักดังกล่าวนั้นยังไม่เพียงพอหากต้องผสมพันธุ์ปลาตัวเดิม ต่อเนื่องกันเป็นจำนวนหลายครั้ง การผสมพันธุ์ปลาอย่างต่อเนื่องอาจทำให้ปลาเกิดสภาวะเครียด ซึ่งมักจะส่งผลกระทบต่อความดกไข่ และการผสมติดได้ (Wafer et al., 2016) ระยะเวลาในการฟื้นฟูของกระบวนการพัฒนารังไข่ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม (Agarwal et al., 2014; Kucharczyk et al., 2018) และเงื่อนไขทางสรีระ ซึ่งปลาหมอเทศจะมีการทำงานของระบบสืบพันธุ์ที่แตกต่างกันไปตามขนาด อายุ รวมถึงสายพันธุ์ของปลาหมอเทศ (Agarwal et al., 2014) นอกจากนี้ยังต้องการพักช่วงของระยะการปล่อยไข่ที่เหมาะสมแล้ว ยังจำเป็นต้องมีการเลี้ยงดูในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม เช่น การให้อาหาร ให้แสง และ ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วงที่เหมาะสม นั่นคือ 28.5 องศาเซลเซียส (Westerfield, 1995) เป็นต้น เพื่อให้ปลาหมอเทศสามารถผลิตไข่ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาพบว่าปลาหมอเทศเมื่อยที่ปล่อยไข่หลายครั้งอย่างต่อเนื่องจะผลิตไข่ที่มีความดกไข่ อัตราการผสมติด และอัตราการฟักตัวลดลง 63.71, 10.07 และ 22.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีความผิดปกติของตัวอ่อนหลังจากฟักตัวแล้ว เพิ่มขึ้น 5.34 เปอร์เซ็นต์ อีกทั้งยังมีการพัฒนาของเซลล์ไข่ในรังไข่ช้าลงเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่ปล่อยไข่ครั้งแรก แสดงให้เห็นถึงความถดถอยของรังไข่ ดังนั้นเพื่อให้ได้ไข่ปลาที่มีจำนวนมาก คุณภาพดี และได้ตัวอ่อนที่เป็นปกติ ควรเว้นระยะเวลาระหว่างการปล่อยไข่ให้มากกว่า 5 วันสำหรับตัวเมียที่ต้องปล่อยไข่อย่างต่อเนื่องเพื่อให้รังไข่ของปลาเทศเมื่อยได้มีการฟื้นฟู

เอกสารอ้างอิง

- Agarwal, A., Damayanthi, D., and Stefan, S. P. 2014. Utility of antioxidants during assisted reproductive techniques: an evidence based review. *Reproductive Biology and Endocrinology* 12(112): 1-9.
- Briggs, J. P. 2002. The zebrafish: A new model organism for integrative physiology. *American Journal of Physiology-Regulatory Integrative and Comparative Physiology* 282(1): 3-9.
- Brown-Peterson, N. J., Wyanski, D. M., Saborido-Rey, F., Macewicz, B. F., and Lowerre-Barbieri, S. K. 2011. A Standardized terminology for describing reproductive development in fishes. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science* 3: 52-70.
- Clelland, E., and Peng, C. 2009. Endocrine/paracrine control of zebrafish ovarian development. *Molecular and Cellular Endocrinology* 312(1-2): 42-52.
- Klangnurak, W., Fukuyo, T., Rezanujjaman, M. D., Seki, M., Sugano, S., Suzuki, Y., and Tokumoto, T. 2018. Candidate gene identification of ovulation-inducing genes by RNA sequencing with an in vivo assay in zebrafish. *Plos One* 13(5): 1-19.

- Klangnurak, W., and Tokumoto, T. 2017. Fine selection of up-regulated genes during ovulation by in vivo induction of oocyte maturation and ovulation in zebrafish. *Zoological Letters* 3: 1-10.
- Koç, N. C., Aytekin, Y., and Yüce, R. 2008. Ovary maturation stages and histological investigation of ovary of the Zebrafish (*Danio rerio*). *Brazilian Archives of Biology and Technology an International Journal* 51: 512-522.
- Kucharczyk, D., Stępień, P., Nowosad, J., Kupren, K., Targońska, K., and Kujawa, R. 2018. The optimization of wide-type zebrafish, *Danio rerio* (Hamilton, 1822) reproduction in low temperatures under controlled conditions. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 18: 49-55.
- Silva, P, Rocha, M. J., Cruzeiro, C., Malhãoa, F., Reis, B., Urbatzka, R., Monteiro, R. A. F., and Rocha, E. 2012. Testing the effects of ethinylestradiol and of an environmentally relevant mixture of xenoestrogens as found in the Douro River (Portugal) on the maturation of fish gonads — A stereological study using the zebrafish (*Danio rerio*) as model. *Aquatic Toxicology* 124-125: 1-10.
- Wafer, L. N., Jensen, B., Whitney, J. C., Gomez, B. H., Flores, R., and Goodwin, B. S. 2016. Effects of environmental enrichment on the fertility and fecundity of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science* 55(3): 291-294.
- Westerfield, M. 1995. *The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (Brachydanio rerio)*. Eugene: University of Oregon press.

วันรับบทความ (Received date) : 15 พ.ย. 62

วันแก้ไขบทความ (Revised date) : 15 ม.ค. 63

วันตอบรับบทความ (Accepted date) : 17 ก.ค. 63