

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคะเพียนขาว *Puntius Gonionotus* (Bleeker) ในช่วงเวลาสั้น

A Short Period Preservation of Sperm of Tawes, *Puntius gonionotus* (Bleeker)

อุทัยรัตน์ ณ นคร¹
Uthairat Na Nakorn



ABSTRACT

An experiment on a short period preservation of sperm of tawes (*Puntius gonionotus*) was conducted at Department of Aquaculture, Kasetsart University to find out the most suitable diluent using for sperm preservation.

Tawes dry milt was divided into 3 parts, the first part was kept as dry milt; second was diluted with rinsing solution, and the rest was diluted with Ringer's solution, in a ratio of 5 parts of dry milt to 3 parts of diluent. All solutions plus dry milt were kept separately in small glass bottles with caps, placed in refrigerator, 4°C. After 24 and 72 hours each of sperm solution was mixed with freshly stripped eggs and fertility was estimated. A number of stripped eggs was also mixed with fresh milt stripped from alive male fish and used as control treatment. Fertilizing rates were 80.64% and 38.68% for milt diluted in Ringer's solution ; 60.17% and 3.71% for milt diluted in rinsing solution; 73.14% and 18.25% for undiluted dry milt; and 89.93% and 81.45% for fresh milt respectively.

From statistical analysis, it appeared that tawes's milt can be preserved within 24 hours in Ringer's solution by keeping in refrigerator, 4°C. But for longer period the better diluent must be looked for.

บทคัดย่อ

การทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*) ในช่วงเวลาสั้นนี้ ดำเนินการทดลองที่ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ การทดลองนี้มีจุดประสงค์ที่จะหาสารละลายที่เหมาะสมที่สุดที่จะใช้เจือจางน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษา

ทำการแบ่งน้ำเชื้อสดของปลาคะเพียนขาวออกเป็น 3 ส่วน ส่วนหนึ่งเก็บรักษาไว้ในสภาพน้ำเชื้อเข้มข้น ส่วนหนึ่งเจือจางด้วยสารละลาย rinsing solution อีกส่วนหนึ่งเจือจางด้วย Ringer's solution ในอัตราส่วน น้ำเชื้อ 5 ส่วนต่อสารละลาย 3 ส่วน เก็บสารละลายพร้อมกับน้ำเชื้อแต่ละชนิด

ไว้ในขวดแก้วขนาดเล็กปิดฝา แช่ไว้ในตู้เย็นซึ่งมีอุณหภูมิ 4°C หลังจากนั้นเป็นเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง นำสารละลายในแต่ละขวดไปผสมกับไข่ของปลาคะเพียนที่เพิ่งรัดจากแม่ปลาตัวเดียวกัน แบ่งไข่ปลาส่วนหนึ่งไปผสมกับน้ำเชื้อสดจากปลาคะเพียนตัวผู้เพื่อใช้เป็นชุดเปรียบเทียบ อัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่เจือจางใน Ringer's solution เท่ากับ 80.64% และ 38.68% ; น้ำเชื้อเจือจางใน rinsing solution เท่ากับ 60.17% และ 3.71% ; น้ำเชื้อที่เก็บในสภาพเข้มข้นเท่ากับ 73.14% และ 18.25% และน้ำเชื้อสดเท่ากับ 89.93% และ 81.45% ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลาคะเพียนขาวไว้ได้ภายในเวลา

¹ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

24 ชั่วโมง ในตู้เย็น โดยการเจือจางน้ำเชื้อใน Ringer's solution หากจะเก็บรักษาเป็นระยะเวลายาวนานกว่านี้ จะต้องหาสารละลายชนิดอื่นที่เหมาะสมกว่านี้ ในการเจือจางน้ำเชื้อ

คำนำ

การศึกษาหาวิธีเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลา มีผู้สนใจมากในต่างประเทศ โดยเฉพาะการศึกษาเกี่ยวกับน้ำเชื้อปลาซัลมอน ในประเทศไทยนั้นก็มีผู้สนใจในเรื่องนี้น้อย อาจจะเป็นเพราะเห็นว่าไม่จำเป็น เนื่องจากปลาที่เลี้ยงในประเทศไทยส่วนมากมีน้ำเชื้อเจริญดีเกือบตลอดฤดูกาลวางไข่ แต่ทว่าเมื่อเริ่มมีการปรับปรุงพันธุ์กรรมของปลา ความจำเป็นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อจะต้องเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในกรณีที่จะทำการผสมพันธุ์โดยใช้ปลาตัวผู้จากแหล่งอื่น การขนย้ายน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นสะดวกกว่าการขนย้ายปลาตัวผู้เป็น ๆ และยังคงลดโอกาสการแพร่กระจายของโรคพยาธิ อันอาจเป็นผลจากการเคลื่อนย้ายด้วย ปลาบางชนิดที่เปลี่ยนแปลงเพศได้ โดยเฉพาะช่วงที่มีไข่หรืออัมพาตทำหน้าที่อยู่ เมื่อเจริญไปจนถึงระยะหนึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศตรงข้าม เช่น ปลากระรัง (*Epinephelus tauvina*) ซึ่งในตอนต้นของช่วงชีวิตจะเป็นปลาเพศเมีย แต่ภายหลังจะเปลี่ยนไปเป็นเพศผู้ การผสมเทียมปลาจำพวกนี้ก็จะเกิดปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อในช่วงที่ต้องการ การเก็บรักษาน้ำเชื้อจะช่วยแก้ปัญหานี้ได้ นอกจากนี้ การเก็บรักษาน้ำเชื้อช่วยให้ขั้นตอนการผสมเทียมง่ายขึ้น จะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อกิจการเพาะพันธุ์ปลาขนาดใหญ่ ซึ่งได้มีผู้นำวิธีการนี้ไปใช้ในการผสมเทียมได้ผลดีมาแล้ว (Büyükatıpoğlu and Holtz, 1978) สำหรับในประเทศไทยนั้น การเพาะปลากะเพียนโดยการฉีดฮอร์โมนผสมเทียม เป็นวิธีการที่ใช้กันแพร่หลาย การเก็บน้ำเชื้อปลากะเพียนไว้ในตู้เย็นก่อนการฉีดไข่ปลา จะช่วยให้การผสมเทียมสะดวกขึ้นมาก

ปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันว่า น้ำเชื้อปลาที่เก็บในสภาพเข้มข้น ที่อุณหภูมิ 0°C หรือ 4°C จะมีชีวิตอยู่ได้ 1 วัน หรือนานกว่านั้น (Hiroi, 1978 อ้างถึงโดย

Billard, 1981) สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ ได้ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลากะเพียน ปลาไน ปลาสวาย และปลาโรฮู่ไว้ในตู้เย็นเป็นเวลา 5 $\frac{1}{2}$, 25, 18 และ 22 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วนำเชื้อเหล่านี้ไปผสมกับไข่ของปลาชนิดเดียวกันที่เพิ่งรีดออกมาใหม่ ๆ ผลปรากฏว่าน้ำเชื้อปลาสวายชนิดเดียวเท่านั้นที่เข้าผสมกับไข่ Hulata and Rothbard (1978) ได้ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาไนโดยเจือจางน้ำเชื้อใน rinsing solution เปรียบเทียบกับที่เก็บในสภาพน้ำเชื้อเข้มข้น แช่น้ำเชื้อเหล่านี้ไว้ในตู้เย็นซึ่งมีอุณหภูมิ 0° ถึง 5°C พบว่าเก็บไว้ได้นานถึง 45 ชั่วโมง โดยที่อัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด Billard (1981) ได้ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลา rainbow trout ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 วัน เมื่อนำมาผสมกับไข่ปลาชนิดเดียวกัน พบว่า อัตราการปฏิสนธิของไข่กับน้ำเชื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิลดลงไม่แตกต่างจากการปฏิสนธิของไข่กับน้ำเชื้อสด ส่วนน้ำเชื้อที่เก็บไว้ในตู้เย็นบรรจุอากาศธรรมดาให้อัตราการปฏิสนธิต่ำกว่า Büyükatıpoğlu and Holtz (1978) พบว่า การเก็บน้ำเชื้อปลา rainbow trout ในอุณหภูมิ 4°C จะได้ผลดีที่สุด เมื่อเก็บในสภาพน้ำเชื้อเข้มข้น ในภาชนะบรรจุแก๊สออกซิเจน การทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะเพียนในครั้งนี้ ก็เพื่อหาสารละลายที่เตรียมง่ายและเหมาะสมที่จะช่วยให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อในตู้เย็นได้ในช่วงสั้น ๆ

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองครั้งนี้เริ่มทำเมื่อวันที่ 3 สิงหาคม พ.ศ. 2525 โดยรีดน้ำเชื้อจากปลากะเพียนขาว, *Puntius gonionotus* (Bleeker) ตัวผู้ อายุประมาณ 1 ปี จำนวน 27 ตัว รีดน้ำเชื้อจากปลาทั้งหมดลงในจานแก้ว ก่อนรีด เช็ดมือผู้รีดและตัวปลาให้แห้ง เพื่อป้องกันไม่ให้มีน้ำหยดลงในน้ำเชื้อ การรีดทำอย่างระมัดระวัง ไม่ให้มีเลือดหรืออูจจะออกมาผสมกับน้ำเชื้อ เมื่อรีดเสร็จแล้ว คนน้ำเชื้อด้วยขนไก่ให้เข้ากัน แล้วจึงใช้หลอดฉีดยาดูดน้ำเชื้อใส่ในขวดแก้วจุประมาณ 3 มล. 6 ขวด โดยแบ่งออกเป็น 3 ชุด ชุดที่ 1 บรรจุน้ำเชื้อเข้มข้นขวดละ 1 มล. จำนวน 2 ขวด ชุดที่สองเจือจาง

น้ำเชื้อ 2 มล. ในสารละลาย rinsing solution ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ 5 ส่วนต่อสารละลาย 3 ส่วน แล้วแบ่งใส่ขวด 2 ขวด ขวดละ 1.6 มล. ชุดที่สามทำเช่นเดียวกับชุดที่สอง แต่ใช้สารละลาย Ringer's

solution แทน ปิดขวดด้วยฝาเกลียวหลวม ๆ เก็บน้ำเชื้อเหล่านี้ไว้ในตู้เย็น อุณหภูมิประมาณ 4°C ส่วนประกอบของ rinsing และ Ringer's solution แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบของสารละลาย rinsing solution และ Ringer's solution

	ส่วนประกอบ	น้ำหนัก
rinsing solution	NaCl	0.4 gm.
	urea	0.3 gm.
	distilled water	100 ml.
Ringer's solution	NaCl	8 gm.
	NaHCO ₃	0.2 gm.
	KCl	0.2 gm.
	CaCl ₂	0.2 gm.
	distilled water	1,000 ml.

การทดสอบคุณภาพของน้ำเชื้อ ทำหลังจากเก็บน้ำเชื้อไว้ 24 และ 72 ชั่วโมง โดยผสมกับไข่ที่เพิ่งรีดจากปลาตะเพียนขาวตัวเมีย

การทดสอบครั้งที่หนึ่ง วันที่ 4 สิงหาคม 2525 ทำการฉีดฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองปลาชุกเทศแก่ปลาตะเพียนขาวตัวเมียซึ่งมีไข่แก่ 1 ตัว ในอัตรา 1.1 โดส เมื่อเวลา 10.00 น. และ เวลา 16.00 น. รีดไข่จากปลาตัวเมียดังกล่าว ตกไข่ออกมา 12 ส่วน ส่วนละประมาณ 500 ฟอง ผสมไข่เหล่านี้กับน้ำเชื้อที่เก็บโดยไม่เจือจาง เจือจางด้วย rinsing solution เจือจางด้วย Ringer's solution อย่างละ 1 ขวด และน้ำเชื้อสดที่เพิ่งรีดจากตัวปลา โดยกะประมาณให้น้ำเชื้อที่ผสมมีมากเกินไป การผสมทำ 2 ชั่วโมง ทำการฟักไข่ในโถแก้วทรงกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 17 ซม. ให้น้ำไหลเข้าด้วยวิธีกลักน้ำตามสายยางขนาดเล็ก เพื่อให้ไข่ลอยตลอดเวลา เมื่อน้ำเต็มโถจึงค่อย ๆ รินน้ำออก ภายหลังการผสม $4\frac{1}{2}$ ชั่วโมง นับอัตราการปฏิสนธิ ซึ่งเป็นระยะที่ไข่เจริญพัฒนาถึงขั้น late gastrula ทำการสุ่มตัวอย่างไข่มานับโกละ 2 ครั้ง ครั้งละไม่ต่ำกว่า 200 ฟอง

การทดสอบครั้งที่สอง วันที่ 6 สิงหาคม

พ.ศ. 2525 ทำโดยวิธีเดียวกัน ทำการผสมเมื่อเวลา 16.00 น. ซึ่งเป็นเวลาที่เก็บน้ำเชื้อไว้นาน 72 ชั่วโมง ผลการทดลองที่ได้ทำการวิเคราะห์ Variance ตามวิธีการวางแผนแบบ Completely Randomized (CRD) ทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Student's t test (Snedecor and Cochran, 1967)

ผลและวิจารณ์

อัตราการปฏิสนธิของไข่กับน้ำเชื้อที่เก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ 24 ชั่วโมงในสภาพต่าง ๆ กันแสดงไว้ในตารางที่ 2 อัตราการปฏิสนธิของไข่กับน้ำเชื้อสดคิดเป็นร้อยละ 89.93 ส่วนไข่ที่ไม่เกิดการปฏิสนธิ อาจเป็นผลมาจากไข่หรือน้ำเชื้อบางส่วนเสีย แต่ก็ยังจัดว่าเป็นอัตราที่ค่อนข้างปกติ ซึ่ง Boonbrahm *et al.* (1968) รายงานว่า ในการผสมเทียมโดยการฉีดฮอร์โมนปลาตะเพียนขาว มีอัตราการปฏิสนธิร้อยละ 89.32-100 ไข่ที่ผสมกับน้ำเชื้อที่เก็บโดยเจือจางใน Ringer's solution มีการปฏิสนธิร้อยละ 80.64 ซึ่งค่าเฉลี่ยนี้ไม่แตกต่างจากอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดเมื่อทดสอบโดยวิธี Student's t test น้ำเชื้อที่เก็บในสภาพเข้มข้น มีอัตราการปฏิสนธิเฉลี่ยร้อยละ 73.14 ซึ่งแตกต่างจาก

ตารางที่ 2 อัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเจือจางใน Ringer's solution, rinsing solution และเก็บในสภาพเข้มข้น เปรียบเทียบกับอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด เมื่อผสมกับไข่ที่เพิ่งรีดจากปลาตัวเมีย

สภาพของน้ำเชื้อ	อัตราการปฏิสนธิ (ร้อยละ)			เฉลี่ย
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	ซ้ำที่ 3	
น้ำเชื้อสด	84.86	92.89	92.05	89.93
เจือจางด้วย Ringer's solution	85.06	84.40	72.46	80.64
เจือจางด้วย rinsing solution	69.91	51.25	60.07	60.17
เก็บในสภาพเข้มข้น	73.35	73.98	72.09	73.14

LSD .05 = 11.83%

LSD .01 = 17.21%

น้ำเชื้อสดที่ระดับความเป็นไปได้ .05 น้ำเชื้อที่เจือจางใน rinsing solution ให้อัตราการปฏิสนธิต่ำสุด (ร้อยละ 60.17) แตกต่างจากอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด ที่ระดับความเป็นไปได้ .01

อัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาโดยเจือจางใน rinsing solution ต่ำกว่าที่เก็บรักษาไว้ในสภาพเข้มข้น แตกต่างจากผลการทดลองของ Hulata and Rothbard (1978) ซึ่งพบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาใน โดยเจือจางใน rinsing solution และเก็บในสภาพเข้มข้น เกิดการปฏิสนธิกับไข่ได้ดีพอ ๆ กับน้ำเชื้อสด แม้จะเก็บไว้นานถึง 45 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 0°-5°C ความแตกต่างนี้อาจเป็นผลจากความแตกต่างของคุณสมบัติบางประการของน้ำเชื้อปลาสองชนิดนี้

อัตราการปฏิสนธิของไข่กับน้ำเชื้อที่เก็บรักษาโดยวิธีเดียวกันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แสดงไว้ในตารางที่ 3 การปฏิสนธิของไข่กับน้ำเชื้อที่ผ่านการเก็บรักษา 72 ชั่วโมง และน้ำเชื้อสดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง น้ำเชื้อที่เจือจางใน Ringer's solution, rinsing solution และน้ำเชื้อเข้มข้น มีอัตราการปฏิสนธิร้อยละ 38.68, 3.71 และ 18.25 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด (ร้อยละ 81.45) ที่ระดับความเป็นไปได้ .01 อนึ่ง น้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้นาน 72 ชั่วโมงนี้เกิดการตกตะกอนเห็นได้ชัดเจน

สรุป

จากผลการทดลองพอจะสรุปได้ว่า Ringer's solution เป็นสารละลายที่เหมาะสม จะใช้เจือจางน้ำเชื้อเพื่อเก็บรักษาในช่วงสั้น ๆ ประมาณ 24 ชั่วโมง โดยเก็บไว้ในตู้เย็นเพราะให้อัตราการปฏิสนธิกับไข่ไม่แตกต่างในทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด การเก็บน้ำเชื้อในสภาพเข้มข้นก็อาจทำได้ แต่อัตราการปฏิสนธิต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม ยังต้องพิจารณาถึงภาวะที่บรรจุด้วย ซึ่ง Truscott *et al.* (1968) พบว่า หากเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยบรรจุในภาชนะที่มีอากาศเพียงพอ หรือปิดฝาเพียงหลวม ๆ เพื่อให้มีอากาศถ่ายเทได้ จะช่วยให้น้ำเชื้อมีชีวิตอยู่ได้นาน แต่หากมีอากาศมากเกินไป จะไม่เป็นผลดีต่อน้ำเชื้อภายหลังเก็บรักษาไว้นานเกิน 24 ชั่วโมง (Foerster, 1965 อ้างถึงโดย Billard, 1981) ถ้าต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนนานถึง 72 ชั่วโมง จะต้องทดลองหาสารละลายชนิดอื่นที่เหมาะสมกว่าสารละลาย 2 ชนิดนี้ มาใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อ

คำนิยาม

ผู้เขียนขอขอบคุณ คุณสุนทรภรณ์ ลิมสกุล คุณดวงรัตน์ มีแก้ว และคุณสุบรรณ เสถียรจิตร ที่ช่วยให้การทดลองครั้งนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ตารางที่ 3 อัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยเจือจางใน Ringer's solution, rinsing solution และเก็บในสภาพแช่แข็ง เปรียบเทียบกับอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด เมื่อผสมกับไข่ที่เพิ่งรีดจากปลาตัวเมีย

สภาพของน้ำเชื้อ	อัตราการปฏิสนธิ (ร้อยละ)			เฉลี่ย
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
น้ำเชื้อสด	90.24	81.77	72.34	81.45
เจือจางด้วย Ringer's solution	40.93	38.03	37.05	38.68
เจือจางด้วย rinsing solution	3.11	5.30	2.72	3.71
เก็บในสภาพแช่แข็ง	19.86	16.80	18.10	18.25

LSD .05 = 8.76%

LSD .01 = 12.75%

เอกสารอ้างอิง

- สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ. 2519. การเก็บรักษาไข่และน้ำเชื้อปลา. รายงานประจำปี สถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ, กรมประมง. หน้า 402-409.
- Billard, R. 1981. Short-term preservation of sperm under oxygen atmosphere in rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Aquaculture*. 23 : 287-293.
- Boonbrahm, M., W. Tarnchalanukit and W. Chuapoehek. 1968. Induced spawning by pituitary hormones injection of pond-reared fishes. *Proc. Indo-Pacific Fish. Coun.* 13 (II) : 162-170.
- Büyükatipoglu, S. and W. Holtz. 1978. Preservation of trout sperm in liquid or frozen state. *Aquaculture*. 14 : 49-56.
- Hulata, G. and S. Rothbard. 1979. Cold storage of carp semen for short periods. *Aquaculture*. 16 : 267-269.
- Mounib, M.S. 1978. Cryogenic preservation of fish and mammalian spermatozoa. *Jour. Reprod. Fert.* 53 : 13-18.
- Snedecor, G.W. and W.G. Cochran. 1967. Statistical methods. 6th ed. Iowa : Iowa State University Press. 593 pp.
- Truscott, B., D.R. Idler, R.J. Hoyle and H.C. Freeman. 1968. Sub-zero preservation of Atlantic salmon sperm. *Jour. Fish. Res. Board Can.* 25(2) : 363-372.