บทความวิจัย

เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ปลาดุกลำพันจากการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็ง

Fertilization and Hatching Percentage of Slender Walking Catfish (*Clarias nieuhofii*) Eggs Artificially Inseminated with Fresh, Chilled and Cryopreserved Sperm

แจ่มจันทร์ เพชรศิริ[1*] อัจฉรัตน์ สุวรรณภักดี[2] และสุภฎา คีรีรัฐนิคม[1]

Jamjun Pechsiri[1*], Adcharat Suwanpugdee[2] and Suphada Kiriratnikom[1]

บทคัดย่อ

ความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามีความสำคัญสำหรับการอนุรักษ์พันธุกรรมและการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ การศึกษาครั้งนี้จึงเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟัก ของไข่ปลาดุกลำพันจากการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่าการผสมเทียมปลาดุกลำพันโดยใช้น้ำเชื้อแช่เย็นมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเท่ากับ 81.8±5.1 % ซึ่งมีค่าต่ำกว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของน้ำเชื้อสด (97.5±0.4%) และน้ำเชื้อแช่แข็ง (91.5±4.1 %) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) และพบว่าไข่ที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การฟักไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าเท่ากับ 52.4±11.2 และ 47.1 ± 14.2 % ตามลำดับ แต่มีค่าต่ำกว่าไข่ที่ผสมเทียมด้วยน้ำเชื้อสด (75.5±4.1%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) ผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็งประสบความสำเร็จในการผสมเทียมปลาดุกลำพัน แต่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าน้ำเชื้อสด ข้อมูลดังกล่าวเป็นประโยชน์ต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อการผลิตลูกพันธุ์หรือเพื่อการอนุรักษ์

คำสำคัญ: ปลาดุกลำพัน น้ำเชื้อแช่เย็น น้ำเชื้อแช่แข็ง เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การฟัก

[1] Aquacultural Biotechnology Research Unit, Faculty of Science, Thaksin University, Pa-Phayom, Phattalung 93110

[2] Faculty of Technology and Community Development, Thaksin University, Pa-Phayom, Phattalung 93110

[*] Corresponding author: e-mail: jamjun2508@yahoo.com Tel. 074-609600 ext. 2269

จากงานประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 23 ปี 2556

Abstract

Successful preservation of fish spermatozoa provided important implications for genomic conservation and for aquaculture. The present paper assessed the fertilization and hatching percentage of slender walking catfish eggs fertilized with fresh, chilled or cryopreserved sperm. The result showed that there was no significant difference ($P>0.05$) in the percentage of fertilization between fresh and cryopreserved sperm, but the percentage of fertilization using chilled sperm (81.8±5.1 %) was significantly lower ($P<0.05$) than using fresh (97.5±0.4%) and cryopreserved sperm (91.5±4.1 %). Mean hatching percentage of egg artificially inseminated with chilled and cryopreserved sperm were 52.4±11.2 and 47.1 ± 14.2 %, respectively. They were significantly lower ($P<0.05$) than using fresh sperm (75.5±4.1%). The results of this study indicated that chilled and cryopreserved sperm can be used for artificial breeding in *Clarias nieuhofii*, but had lower efficiency than fresh sperm. This provides important information for making decision to preserve sperm for seed production and/or conservation purposes.

Keywords: *Clarias nieuhofii*, chilled sperm, cryopreserved sperm, fertilization percentage, hatching percentage

บทนำ

ปลาดุกลำพันมีจำนวนลดลงมากจนถูกจัดเป็นปลาที่มีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (vulnerable) [1] สาขาวิทยาศาสตร์การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ประสบความสำเร็จในการเพาะพันธุ์ปลาดุกลำพันโดยวิธีการผสมเทียม และเล็งเห็นว่าปลาดุกลำพัน เป็นปลาอีกชนิดหนึ่งที่สามารถเพาะพันธุ์และส่งเสริมให้เกษตรกรเลี้ยงเชิงพาณิชย์ได้ แต่ปัญหาอย่างหนึ่งในการเพาะพันธุ์ปลาดุกลำพันคือ ปริมาณพ่อแม่พันธุ์ในธรรมชาติมีอยู่อย่างจำกัด การจับพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติบางครั้งเพศผู้และเพศเมียมีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ไม่พร้อมกัน จึงไม่สามารถนำมาผสมเทียมได้ อีกทั้งการผสมเทียมปลาดุกลำพัน ต้องฆ่าปลาตัวผู้เนื่องจากไม่สามารถรีดน้ำเชื้อออกมาได้เหมือนปลาชนิดอื่น การผสมเทียมปลาดุกลำพันแต่ละครั้งเมื่อฆ่าปลาเพศผู้แล้ว หากมีน้ำเชื้อเหลือก็ต้องทิ้งหรือมีการใช้น้ำเชื้อเกินความจำเป็น จากข้อจำกัดดังกล่าว หากไม่มีวิธีการจัดการการเพาะพันธุ์ที่เหมาะสมหรือมีการใช้ประโยชน์จากพ่อแม่พันธุ์ไม่คุ้มค่า อาจส่งผลให้ปลาดุกลำพันสูญพันธุ์ได้ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเป็นวิธีการหนึ่งที่ สามารถแก้ปัญหาดังกล่าวได้ ทำให้การเพาะพันธุ์ปลามีความสะดวกและมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น สามารถนำน้ำเชื้อมาใช้เพาะพันธุ์ได้ทันทีเมื่อปลาเพศเมียมีไข่แก่ ลดการตายของปลาเพศผู้จากการเพาะพันธุ์ในแต่ละครั้งและใช้น้ำเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ประหยัดค่าขนส่งลำเลียงปลาเพศผู้จากแหล่งธรรมชาติ ประหยัดพื้นที่ แรงงานและค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงปลาเพศผู้ และสามารถนำน้ำเชื้อมาใช้ในการผสมข้ามสายพันธุ์ และแก้ปัญหาในปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ได้ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสามารถทำได้โดย วิธีการแช่เย็น (chilled storage) ที่อุณหภูมิ 0 - 4 ^{o}C หรือวิธีการแช่แข็ง (cryopreservation) ใน

ไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 ^{o}C การศึกษาครั้งนี้จึงเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ปลาดุกลำพันที่เกิดจากการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อเพิ่มผลผลิตลูกพันธุ์ปลาดุกลำพันในการเลี้ยงเชิงพาณิชย์ และอนุรักษ์ปลาดุกลำพันไม่ให้สูญพันธุ์ไปในอนาคต

วิธีการวิจัย

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบลอก (Randomize Completely Block Design, RCBD) มี 3 ชุดการทดลองคือ น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

2. การเตรียมน้ำเชื้อปลา

1) การเตรียมน้ำเชื้อสด

นำปลาเพศผู้น้ำหนักประมาณ 300 กรัม ความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร มากระตุ้นการพัฒนาของน้ำเชื้อตามวิธีการของ Kiriratnikom *et al.* [2] โดยฉีด Buserelin 10 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับ Domperidone 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม โดยฉีดฮอร์โมนดังกล่าวในเวลาเดียวกันกับที่ฉีดฮอร์โมนเพศเมียในเข็มที่ 2 หลังจากฉีดฮอร์โมนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำปลามาผ่าท้องเพื่อเอาถุงน้ำเชื้อ และนำถุงน้ำเชื้อมาแช่ในน้ำเกลือ 0.85 % ที่เย็น (4 ^{0}C) เป็นระยะเวลาประมาณ 30 วินาที เพื่อล้างเลือดและเมือกที่ติดมาออก ใช้กรรไกรที่สะอาดตัดบริเวณปลายถุงน้ำเชื้อและรีดเอาน้ำเชื้อออกจากถุง ใส่ในจานแก้ว (petri dish) ใช้น้ำเชื้อ 30 ไมโครลิตรเจือจางด้วยน้ำกลั่นจำนวน 120 ไมโครลิตร

2) การเตรียมน้ำเชื้อแช่เย็น

นำปลาเพศผู้ มากระตุ้นการพัฒนาของน้ำเชื้อและเก็บน้ำเชื้อวิธีการเดียวกับการเตรียมน้ำเชื้อสด นำน้ำเชื้อมาตรวจคุณภาพโดยประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:50 และนำไปส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำน้ำเชื้อที่ผ่าการประเมินซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ไม่น้อยกว่า 75 % มาเจือจางด้วยน้ำยาที่ช่วยคงสภาพการมีชีวิต (extender) ซึ่งประกอบด้วยน้ำมะพร้าวสุกต้มที่อุณหภูมิ 90 ^{o}C เป็นเวลา 10 นาทีผสมกับ Calcium-free Hanks' balanced salt solution (Ca–F HBSS) (NaCl 0.8890, KCl 0.0440, $Na_2HPO_4{\cdot}2H_2O$ 0.0130, $NaHCO_3$ 0.0390, $KH_2PO_4$0.0070, $MgSO_4{\cdot}7H_2O$ 0.0220, glucose 0.1110 กรัม และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) ในอัตรา 1:1 และนำมาเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:4 (น้ำเชื้อ 60 ไมโครลิตร : extender 240 ไมโครลิตร) นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้ว 150 ไมโครลิตรใส่ในหลอดทดลองขนาดเล็ก (eppendorf tube) ขนาด 1 มิลลิลิตร และนำไปแช่เย็นในตู้เย็น เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ผสมกับไข่ นำน้ำเชื้อที่แช่เย็นมาปรับอุณหภูมิที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที

3) การเตรียมน้ำเชื้อแช่แข็ง

นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วจากการเตรียมเพื่อแช่เย็นจำนวน 150 ไมโครลิตร เติมไดเมธิลซัลฟอกไซด์ (dimethyle sulphoxide, DMSO) จำนวน 12 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที และบรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร นำไปลดอุณหภูมิโดยใส่ในกล่องโฟม ขนาด 25 X 30 X 30 เซนติเมตร ที่มีไนโตรเจนเหลวสูง 2 เซนติเมตร วางหลอดฟางในแนวนอนบนตะแกรงเหนือไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตรเป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 ^{o}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ผสมเทียม นำน้ำเชื้อมาละลาย (thawing) ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C เป็นเวลา 1 นาที

3. การเตรียมแม่พันธุ์ปลาดุกลำพัน

นำปลาดุกลำพันเพศเมีย น้ำหนักประมาณ 300 กรัม ความยาวประมาณ 30 เซนติเมตร มากระตุ้นการตกไข่ ตามวิธีการของ Kiriratnikom *et al.*[2] โดยการฉีดฮอร์โมน Buserelin 5 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับ Domperidone 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม หลังจากฉีดเข็มแรก 6 ชั่วโมง ฉีดเข็มที่ 2 ด้วย Buserelin 30 ไมโครกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับ Domperidone 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม

4. การผสมเทียมไข่กับน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง

หลังจากฉีดฮอร์โมนปลาเพศเมีย เข็มที่ 2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง นำปลามารีดไข่ลงในจานแก้วใช้กระบอกฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดไข่ปลาใส่จานแก้วจำนวน 3 ใบๆ ละ 1 มิลลิลิตร (ประมาณ 900 ฟอง) ดูดน้ำเชื้อสดที่เจือจางแล้ว น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง อย่างละ 150 ไมโครลิตรผสมกับไข่ในจานแก้วใบที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ใช้ขนไก่คนไข่และน้ำเชื้อให้เข้ากัน หลังจากนั้นค่อยๆ เติมน้ำสำหรับการเพาะฟักลงไป ประมาณ 25 มิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นให้อสุจิเคลื่อนไหวเข้าไปผสมกับไข่ ทิ้งไว้ประมาณ 3 นาทีแล้วล้างน้ำเชื้อส่วนเกินและเมือกออก นำไข่ที่ผสมแล้วไปฟักโดยโรยไข่บนผ้ามุ้งเขียวเบอร์ 20 ขนาด 30 X 50 เซนติเมตรที่แบ่งเป็นช่อง ขนาด 10 X 10 เซนติเมตร จำนวน 3 ช่อง ที่ขึงตึง ในกระบะเพาะฟัก ขนาด 35 X 60 X 30 เซนติเมตร ที่ระดับต่ำกว่าผิวน้ำประมาณ 5-10 เซนติเมตร จำนวน 3 กระบะ (3 ซ้ำ) ให้ออกซิเจนและให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา

5. การเก็บข้อมูล

นับจำนวนไข่ที่ปฏิสนธิซึ่งมีลักษณะสีน้ำตาลโปร่งแสงและจำนวนไข่ที่ไม่ปฏิสนธิซึ่งมีลักษณะสีขาวขุ่น หลังจากผสมไข่กับน้ำเชื้อที่ระยะเวลา 12 และ 48 ชั่วโมง เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักตามลำดับ โดยคำนวณจากสูตรตามวิธีของ Omitogun *et al.* [3] ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมดเมื่อเริ่มทดลอง}} \times 100$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การฟัก} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ} - \text{จำนวนไข่ปฏิสนธิที่ไม่ฟัก}}{\text{จำนวนไข่ที่ปฏิสนธิ}} \times 100$$

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ เปอร์เซ็นต์การฟัก โดยวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One way ANOVA และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของทรีตเมนต์โดยวิธี Least significance difference (LSD) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 โดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ

จากการผสมเทียมปลาดุกลำพันโดยใช้น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่าไข่ที่ผสมโดยใช้น้ำเชื้อทั้ง 3 แบบมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิที่สูงคือมีค่าเท่ากับ 97.5±0.4, 81.8±5.1 และ91.5±4.1 % ตามลำดับ แสดงว่าไข่ที่ใช้ในการผสมเทียมมีคุณภาพดีและปริมาณของน้ำเชื้อสดเพียงพอสำหรับการผสมกับไข่ ใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Vuthiphandchai *et al.* [4] ที่พบว่าการผสมเทียมปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) โดยใช้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Calcium-free Hanks' balanced salt solution (Ca–F HBSS) ในอัตรา 1:4 และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 ^{0}C เป็นเวลา 2 วันมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 80.1±3.6% และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของไข่ที่ผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งมีค่าใกล้เคียงกับผลการทดลองในปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*) [5] และปลากดเหลือง (*Pelteobagrus fulvidraco*) [6] ที่พบว่าไข่ที่ผสมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเท่ากับ 86.8 ± 3.1% และ 90.47±3.67% ตามลำดับ และผลการทดลองครั้งนี้พบว่าไข่ที่ผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิที่สูงและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แสดงว่าน้ำเชื้อแช่แข็งมีปริมาณอสุจิเพียงพอสำหรับการปฏิสนธิ แต่ไข่ที่ผสมโดยน้ำเชื้อแช่เย็นมี

เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Table 1) สาเหตุอาจเนื่องมาจากน้ำเชื้อแช่เย็นมีการตายของอสุจิมากกว่าน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำให้จำนวนอสุจิของน้ำเชื้อแช่เย็นมีน้อยกว่าน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งและมีปริมาณไม่เพียงพอสำหรับการปฏิสนธิส่งผลทำให้ไข่ที่ผสมโดยน้ำเชื้อแช่เย็นมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำกว่าน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง ต่างจากผลการทดลองของ Vuthiphandchai *et al.* [4] ที่พบว่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิของไข่ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ที่ผสมกับน้ำเชื้อที่เก็บรักษาแบบแช่เย็นเป็นเวลา 2 วัน มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ ไม่ต่างกับการใช้น้ำเชื้อสดและต่างจากผลการทดลองของ Omitogun *et al.* [7] ; Omitogun *et al.* [3] ที่พบว่าไข่ปลาดุกอัฟริกันที่ผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด เนื่องจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อทั้งแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็งมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการคงสภาพการมีชีวิตของอสุจิ เช่นสูตรน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยา และส่วนประกอบของน้ำเชื้อ เป็นต้น ปัจจัยดังกล่าวอาจเหมาะสมกับปลาชนิดหนึ่งแต่อาจไม่เหมาะสมกับปลาอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ผลการทดลองครั้งนี้ต่างจากผลการทดลองในปลาดุกอุยและปลาดุกอัฟริกัน อย่างไรก็ตามแม้ว่าผลการทดลองครั้งนี้ไข่ที่ผสมโดยใช้น้ำเชื้อแช่เย็นมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิต่ำกว่าน้ำเชื้อแช่แข็งและน้ำเชื้อสดแต่มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิที่สูงและใกล้เคียงกับผลการทดลองในปลาดุกอุย (80.1±3.6%) [4]

เปอร์เซ็นต์การฟัก

เปอร์เซ็นต์การฟักของไข่ที่ผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็งมีค่าเท่ากับ 75.5±4.1, 52.4±11.2 และ47.1 ± 14.2 % ตามลำดับ ผลของการใช้น้ำเชื้อสดมีค่าต่ำกว่าปลาดุกด้าน (*Clarias batrachus*) (90%) [8] แต่ใกล้เคียงกับปลาดุกอุย (72.8±3.1) [4] ส่วนน้ำเชื้อแช่เย็นมีเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำกว่าปลาดุกอุยทีใช้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Ca–F HBSS ในอัตรา 1:4 และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 ^{o}C เป็นเวลา 2 วัน (71.6±3.4%) [4] และการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำกว่าปลาดุกด้านที่ผสมโดยใช้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย HBSS และเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 ^{o}C เป็นเวลา 2 วัน มีเปอร์เซ็นต์การฟักเท่ากับ 62.1 % [8] สาเหตุที่เปอร์เซ็นต์การฟักต่างกันอาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมในการฟัก เช่นอุณหภูมิของน้ำ ระบบการฟักของแต่ละการทดลองต่างกันจึงทำให้เปอร์เซ็นต์การฟักต่างกัน และจากผลการทดลองพบว่าไข่ที่ผสมโดยน้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การฟักไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) แต่มีเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำกว่าน้ำเชื้อสดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P< 0.05$) (Table 1) ต่างจากผลการทดลองของ Oteme *et al.* [9] ที่พบว่าเปอร์เซ็นต์ฟักของปลาดุกอัฟริกันที่ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด โดยมีเปอร์เซ็นต์การฟัก 78.9% และ 82.25% ตามลำดับ แต่ผลการทดลองครั้งนี้สอดคล้องกับผลการทดลองในปลาดุกด้าน [8] ปลาดุกอัฟริกัน [3] (และปลา Atlantic Cod, *Gadus morhua* L.[10] ที่พบว่าการผสมโดยใช้น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดเนื่องมาจากน้ำเชื้อแช่แข็งต้องผ่านขั้นตอนต่างๆ ในการเก็บรักษา เช่นขั้นตอนการลดความเย็น ขั้นตอนการละลาย ซึ่งขั้นตอนต่างๆ เหล่านี้มีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของอสุจิ [3] อสุจิส่วนใหญ่เปลี่ยนแปลงรูปร่างและไม่มีไมโตคอนเดรีย [10] ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การ

ปฏิสนธิที่สูงและไม่ต่างกับน้ำเชื้อสดแต่มีเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำกว่าน้ำเชื้อสด สาเหตุอาจเนื่องมาจากน้ำเชื้อแช่แข็งมีอสุจิบางตัวที่ยังมีชีวิตแต่โครงสร้างผิดปกติ สามารถปฏิสนธิได้ จึงทำให้ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิกับอสุจิที่มีโครงสร้างผิดปกติไม่สามารถฟักออกเป็นตัวได้เนื่องจากมีการตายระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อนจึงมีผลทำให้มีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิสูงแต่เปอร์เซ็นต์การฟักต่ำ

Table 1 Percent fertilization and hatching of slender walking catfish eggs fertilized with fresh, chilled or cryopreserved sperm

Sperm	Percent fertilization	Percent hatching
Fresh sperm	97.5±0.4[a]	75.5±4.1[a]
Chilled sperm	81.8±5.1[b]	52.4±11.2[b]
Cryopreserved sperm	91.5±4.1[a]	47.1±14.2[b]

Means within the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$)

สรุปผลการวิจัย

1. จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าประสบความสำเร็จในการผสมเทียมปลาดุกลำพันโดยใช้น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 81.8 และ 91.5 % ตามลำดับ และมีเปอร์เซ็นต์การฟักเท่ากับ 52.4 และ 47.1 % ตามลำดับ ส่วนน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักเท่ากับ 97.5 และ 75.5 % ตามลำดับ

2. การผสมเทียมปลาดุกลำพันโดยใช้น้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็งมีประสิทธิภาพต่ำการใช้น้ำเชื้อสด เนื่องจากการใช้น้ำเชื้อแช่เย็นมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด ส่วนการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การฟักต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสด

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน มหาวิทยาลัยทักษิณ ประจำปี 2555 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

[1] สำนักนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม. (2540). **รายงานการประชุมเพื่อจัดสถานภาพทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทย**. กรุงเทพฯ. กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อม. 52 หน้า.

[2] Kiriratnikom, S., Ruangklay, K., Choksawatdikorn, P., Anuchart, P. and Kiriratnikom, A. (2007**). Effect of various forms of diet on growth performance and survival of nieuhofii catfish larvae (*Clarias nieuhofii*).** 33rd Congress on Science and Technology of Thailand, 18-20 October 2007, Walailak University, Nakorn Si Thamarat, Thailand.

[3] Omitogun, O.G., Ilori, O., Olaniyan, O., Amupitan, P., Oresanya, T., Aladele, S. and Odofin, W. (2012). **Cryopreservation of the Sperm of the African Catfish for the Thriving Aquaculture Industry in Nigeria.** *In*: Current Frontiers in Cryopreservation (Katkov, I. (ed.) pp. 303-330. Shanghai, China. InTech, Published.

[4] Vuthiphandchai, V., Thadsri, I. and Nimrat, S. (2009). Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. **Aquaculture. 296**, 58-64.

[5] Horvath, A. and Urbanyi, B. (2000). The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. **Aquaculture Research. 31**, 317-324.

[6] Pan, J., Ding, H., Ge, J., Yan, W., Hao, C., Chen, J. and Huang, Y. (2008). Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. **Aquaculture. 279**, 173–176.

[7] Omitogun, O. G., Olaniyan, O. F., Oyeleye, O.O., Ojiokpota, C., Aladele, S.E. and Odofin, W. T. (2010). Potentials of short term and long term cryopreserved sperm of the African giant catfish (*Clarias gariepinus* Burchell, 1822) for aquaculture. **African Journal of Biotechnology. 9(41),** 6973-6982.

[8] Lal, K.K., Barman, A.S., Punia, P., Khare, P., Mohindra, V., Lal, B. Gopalakrishnan, A. Sah, R,S. and Lakra, W.S. (2009). Effect of extender composition on sperm cryopreservation of Asian catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch) and *Clarias batrachus* (Linnaeus). **Asian Fisheries Science. 22**, 137-142.

[9] Oteme, Z.J., Nunez-Rodriguez, J., Kouassi, C.K., Hem, S. and Agnese, J.F. (1996). Testicular structure, spermatogenesis and sperm cryopreservation in the African clariid catfish *Heterobranchus longifilis* (Valenciennes, 1840). **Aquaculture Research. 27,** 805-813.

[10] Ottesen, O.H., Marschhauser, V. and Babiak, I. (2012). Effects of cryopreservation on morphology and viability of sperm and larvae of Atlantic Cod, *Gadus morhua* L**. Journal of the World Aquaculture Society. 43**, 375-386.