บทที่ 1
บทนำ

ปลานวลจันทร์น้ำจืด หรือปลาพอน (*Cirrhinus microlepis*) Sauvage เป็นปลาพื้นเมืองของไทย ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน มีรูปร่างเพรียวยาวลำตัวค่อนข้างกลม ปากเล็ก เกล็ดเล็ก สีของลำตัวมีตั้งแต่สีส้มปนเทา จนถึงสีน้ำตาลปนสีขาวเงิน ท้องสีขาว ครีบหลังและครีบหางสีน้ำตาลปนเทา ปลายครีบสีชมพู เดิมพบมากตามแม่น้ำเจ้าพระยาตั้งแต่จังหวัดอยุธยาขึ้นไปถึงจังหวัดนครสวรรค์ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบมากในแม่น้ำโขง (กรมประมง, 2530) แต่ในปัจจุบันปลานวลจันทร์น้ำจืดในธรรมชาติมีจำนวนลดน้อยลง (Rainboth, 1996) เนื่องจากถิ่นที่อยู่อาศัยถูกทำลาย และสิ่งแวดล้อมเสื่อมโทรม จากการขยายตัวของชุมชน และพื้นที่การเกษตรที่ก่อมลพิษสู่แหล่งน้ำ รวมถึงการทำประมงเกินขนาด และการจับปลาในฤดูผสมพันธุ์ ซึ่งในปัจจุบันจากฐานข้อมูลชนิดพันธุ์ที่ถูกคุมคามในประเทศไทย (Red Data of Thailand, 2005) ของสำนักงานนโยบายและแผนทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ได้จัดให้ปลานวลจันทร์น้ำจืดอยู่ในสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ ต่อมามีหลายหน่วยงานที่เห็นความสำคัญของสถานการณ์ดังกล่าวโดยเฉพาะอย่างยิ่ง จากรายงานของสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดนครพนม มีการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืดจากแม่น้ำโขงในเขตจังหวัดนครพนมและจังหวัดมุกดาหาร มาทำการทดลองเลี้ยงในบ่อดิน และพบว่าปลาชนิดนี้สามารถเจริญเติบโตได้ดี สามารถเลี้ยงเพื่อบริโภคได้ จึงทำการศึกษาเพาะพันธุ์เพื่อผลิตปลาชนิดนี้ปล่อยสู่แหล่งน้ำธรรมชาติเป็นการฟื้นฟูพันธุ์สัตว์น้ำให้คงมีอยู่ต่อไปและสามารถส่งเสริมอาชีพให้แก่เกษตรกรได้ โดยจากการศึกษาพบว่าฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa) ที่อัตราความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม มีความเหมาะสมต่อการกระตุ้นการตกไข่ของแม่ปลานวลจันทร์น้ำจืด (เจริญ อุดมการ อรรณพ อิ่มศิลป์ สมบัติ สิงห์สี มาลัย อิ่มศิลป์ และ พิน พลไชย, 2547) แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศผู้ มีปริมาตรน้ำเชื้อน้อย โดยมีปริมาตรน้ำเชื้อประมาณ 0.2-0.4 มิลลิลิตร/ตัว แต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อถึง $1.65\pm0.25\times10^{10}$ ตัว/มิลลิลิตร (ดวงจันทร์ ดอกพอง, 2553) จากสาเหตุดังกล่าวจึงเป็นอุปสรรคสำหรับการเพาะพันธุ์ปลาชนิดนี้ ด้วยเหตุนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดจึงน่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยในการแก้ปัญหาดังกล่าว ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อมีวิธีการเก็บ 2 วิธี คือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้น จะใช้สาร extender ในการเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาตร เป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิเพื่อใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม อีกทั้งสาร extender ยังช่วยยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ ให้กับตัวอสุจิโดยการเลือกชนิดของสาร extender นั้น ควรมีค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกับ seminal plasma ของน้ำเชื้อปลาที่ทำการศึกษาโดยทั่วไปค่าออสโมลาลิตี้ที่เหมาะสมในปลากลุ่ม carp จะอยู่ในช่วง

ระหว่าง 254-346 mOsmol/kg (Alavi and Cosson, 2006) หากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำ (hypotonic) จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ซึ่งสารละลายที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำกว่า 200 mOsmol/kg จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในปลากลุ่ม carp และต่อมาเซลล์อสุจิจะหยุดการเคลื่อนไหว และเซลล์อาจแตกหรือถูกทำลายเนื่องจากเซลล์บวม (Alavi and Cosson, 2005) และสภาวะที่มีค่าออสโมลาลิตี้สูง (hypertonic) ทำให้เซลล์มีการสูญเสียน้ำเกิดสภาวะเซลล์เหี่ยว ซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุทำให้โครงสร้างของ phospholipids bilayer และเซลล์เมมเบรนของตัวอสุจิถูกทำลาย (Jenking-Keeran and Woods, 2002) ทำให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้ สำหรับผลของ pH พบว่าหากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มี pH ต่ำ จะทำให้อสุจิมีการใช้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น และมีการผลิตกรดแลกติก ส่งผลให้อสุจิมีการเคลื่อนที่ลดลง และหากอสุจิอยู่ในสภาวะที่มี pH สูง จะส่งผลให้อสุจิมีอัตราเมแทบอลิซึมสูงขึ้น ดังนั้นการเลือกสาร extender ให้มีค่า pH และออสโมลาลิตี้ ที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็นสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น เพราะสาร extender นอกจากสามารถยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ให้กับตัวอสุจิแล้ว ยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อได้อีกด้วย จึงน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาและประยุกต์ใช้กับปลานวลจันทร์น้ำจืด ซึ่งพบว่ามีปริมาตรน้ำเชื้อน้อย แต่มีความเข้มข้นของน้ำเชื้อสูง จึงได้มีการศึกษาอัตราการเจือจางระหว่างน้ำเชื้อต่อสาร extender เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อ ให้สามารถนำไปผสมเทียมกับไข่ได้ง่ายขึ้น และในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาวหรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็ง ซึ่งเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่ช่วยดำรงพันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืด เพราะเป็นวิธีที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดไว้ได้นานเป็นระยะเวลาหลายปีโดยการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) ซึ่งอาศัยการทำงานของสาร extender ร่วมกับสาร cryoprotectant โดยสาร cryoprotectant มีหน้าที่ป้องกันอันตรายของเซลล์ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย นอกจากนี้อัตราการลดอุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งที่จะทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาวประสบความสำเร็จ เนื่องจากการลดอุณหภูมิช้าหรือเร็วเกินไปก็จะทำให้เกิดอันตรายต่อตัวอสุจิได้ หากมีการลดอุณหภูมิช้าเกินไปก็จะทำให้มีการสูญเสียน้ำจากภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ในปริมาณที่มาก ส่งผลให้เกิดภาวะเซลล์เหี่ยว และอาจทำให้ความเข้มข้นของตัวทำละลายภายในเซลล์สูงเกินไป เมื่อตัวอสุจิสัมผัสอยู่กับสารละลายที่มีความเข้มข้นสูงเป็นเวลานานก็จะทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์อสุจิได้ และหากมีการลดอุณหภูมิเร็วเกินไปจะทำให้น้ำภายในเซลล์เคลื่อนที่ออกสู่ภายนอกเซลล์ได้น้อย ส่งผลให้เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งอาจทำให้เซลล์และออแกเนลล์ถูกผลึกน้ำแข็งทิ่มแทงได้ (Yang, Carmichael, Varga and Tiersch, 2007) และนอกจากนี้เพื่อให้เกิดการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุด จึงควรทราบอัตราส่วนน้ำเชื้อปลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผสมกับไข่ (sperm: egg ratio) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อไข่ที่มากเกินไปส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง เนื่องจากความหนืดของอสุจิที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้อสุจิไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Silveira,

Foresti, Silveira and Senhorini, 2006; Rurangwa et al., 1998; Tambassen-Cheong, Tan-Fermin, Garcia and Baldevarona, 1995; Rosenthal, Klumpp and Willfuhr, 1998) ในทางตรงกันข้ามพบว่าปริมาณน้ำเชื้อที่ไม่เพียงพอก็ส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเช่นเดียวกัน (Linhart, Rodina, Kocour and Gela, 2006; Rurangwa et al., 1998; Silveira et al., 2006; Bart, Wolfe and Dunham, 1998) อย่างไรก็ตามที่ผ่านมายังมีการศึกษาเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้นน้อยมาก และพบว่ายังไม่มีการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะยาว รวมทั้งยังไม่มีการศึกษาในเรื่องของอัตราส่วนน้ำเชื้อปลาที่เหมาะสมที่ใช้ในการผสมกับไข่ (sperm: egg ratio)

การวิจัยในครั้งนี้จึงมีแนวคิดที่จะศึกษาชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น อัตราการเจือจาง (dilution rate) ระหว่าง sperm: extender เพื่อเป็นการเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้อ และระยะเวลาในการเก็บ (time storage) และมีแนวคิดที่จะศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดนี้แบบระยะยาว โดยหาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง พร้อมทั้งศึกษาอัตราส่วนระหว่าง sperm: egg ratio ทั้งส่วนที่เป็นน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อประโยชน์ในการใช้น้ำเชื้อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

1.2 วัตถุประสงค์ในการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาชนิดของสาร extender และอัตราการเจือจาง (sperm: extender) และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น

1.2.2 เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง (แบบระยะยาว)

1.2.3 เพื่อศึกษาจำนวนอสุจิที่เหมาะสม (sperm: egg ratio) สำหรับการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งของปลานวลจันทร์น้ำจืด

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทำให้ทราบชนิดของสาร extender ทราบอัตราการเจือจางของ sperm: extender และระยะเวลาในการเก็บที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดแบบระยะสั้น ทราบชนิดและความเข้มข้นของสาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์น้ำจืดโดยวิธีการแช่แข็ง อีกทั้งทราบถึงอัตราส่วน sperm: egg ratio ที่เหมาะสมสำหรับน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งของปลานวลจันทร์น้ำจืด เพื่อให้มีการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่

อย่างจำกัดของปลานวลจันทร์น้ำจืดให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งประโยชน์จากการศึกษาดังกล่าวนี้เพื่อนำไปสู่การเพิ่มประสิทธิภาพในการเพิ่มผลผลิต ส่งเสริมการเลี้ยงให้กับเกษตรกร ตลอดจนการอนุรักษ์พันธุ์ปลาต่อไป จัดเป็นองค์ความรู้ใหม่ และเป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป เพราะยังไม่มีการศึกษาและวิจัยการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งในปลานวลจันทร์น้ำจืดมาก่อน และสามารถพัฒนาเทคนิคและวิธีการที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในกลุ่มเดียวกันที่มีปัญหาคล้ายคลึงกัน

สำหรับหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ ได้แก่ สถาบันการศึกษาต่าง ๆ กรมประมง สถานีประมง ผู้ประกอบการธุรกิจสัตว์น้ำ ตลอดจนหน่วยงานของรัฐและเอกชนที่สนใจ