บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปลานวลจันทร์น้ำจืด หรือปลาพอน, *Cirrhinus microlepis* Sauvage มีชื่อสามัญ คือ Small scale mud carp เป็นปลาน้ำจืดที่อยู่ในวงศ์ปลาตะเพียน มีรูปร่างเพรียวยาวลำตัวค่อนข้างกลม ปากเล็ก สีของลำตัวมีตั้งแต่สีส้มปนเทาจนถึงสีน้ำตาลปนสีขาวเงิน ท้องสีขาว ครีบหลังและครีบหางสีน้ำตาลปนเทา ปลายครีบสีชมพู ปลานวลจันทร์น้ำจืดเดิมพบมากตามแม่น้ำใหญ่ เช่น แม่น้ำเจ้าพระยาตั้งแต่จังหวัดอยุธยาขึ้นไปถึงจังหวัดนครสวรรค์ ทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือพบมากในแม่น้ำโขง (กรมประมง, 2530) ต่อมามีการขยายตัวของชุมชน และพื้นที่การเกษตรที่ก่อมลพิษสู่แหล่งน้ำ อีกทั้งวิธีการจับปลาที่ผิดกฎหมายทำให้ทรัพยากรสัตว์น้ำจืดมีจำนวนลดลงมาก และจากการศึกษาพบว่าประชากรของปลานวลจันทร์น้ำจืดในแต่ละแหล่งมีจำนวนลดลงมาก (Rainboth, 1996) ซึ่งต่อมาเจริญ อุดมการ และคณะ (2547) จึงได้มีการศึกษาการเพาะพันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืด และพบว่าฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRHa) ที่อัตราความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม มีความเหมาะสมต่อการกระตุ้นการตกไข่ของแม่ปลานวลจันทร์น้ำจืด แต่อย่างไรก็ตามพบว่าปลานวลจันทร์น้ำจืดเพศผู้มีน้ำเชื้อน้อย จึงเป็นอุปสรรคสำหรับการเพาะพันธุ์ปลานวลจันทร์น้ำจืด

ด้วยเหตุนี้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นและแบบระยะยาว น่าจะเป็นแนวทางหนึ่งสำหรับการแก้ปัญหาในปลาชนิดนี้ โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นนั้นจำเป็นต้องคัดเลือกสาร extender ให้เหมาะสมสำหรับเจือจางน้ำเชื้อ ก่อนการเก็บรักษาเพื่อไม่ให้น้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป และยังเป็นการเพิ่มปริมาตรของน้ำเชื้ออีกด้วย อีกทั้งมีบทบาทในการยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ และลดการใช้พลังงานของตัวอสุจิ ซึ่งสาร extender ควรมีค่าออสโมลาริตี้ใกล้เคียงกับเลือด หรือ seminal plasma ของน้ำเชื้อปลา เช่น 280-300 mOsm Kg^{-1} สำหรับปลาน้ำจืด และ 200-300 mOsm Kg^{-1} สำหรับปลาทะเล (Wayman and Tiersch, 2000)

ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะยาวมีปัจจัยอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ สาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็ง เก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196°C สาร cryoprotectant เป็นสารป้องกันเซลล์ถูกทำลายในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง ซึ่งสาร cryoprotectant แต่ละชนิดจะต้องมีความเข้มข้นและระยะเวลา (equilibration time) ที่เหมาะสม เพื่อที่จะออกฤทธิ์และป้องกันเซลล์ถูกทำลาย (Rana, 1995 และ Akcay, Bozkurt, Secer and Tekin, 2004) สาร cryoprotectant หลายชนิด เช่น DMSO, DMA, MeOH และ glycerol ได้มีการใช้และให้ผลดีในปลาหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีรายงานว่า DMSO เป็นสารที่นิยมใช้กันแพร่หลายในปลาหลายชนิด แต่อย่างไรก็ตาม พบว่ามีอัตราการปฏิสนธิประมาณ 50% (Horvath and Urbanyi, 2000; Urbanyi et al., 1999; Chereguini,

Banda, Rasines and Fermandez, 2001 and Kwantong and Bart, 2003) และพบว่าสาร cryoprotectant ที่มีความเข้มข้นสูงจะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (Wayman and Tiersch, 2000) อย่างไรก็ตามสารต่าง ๆ เหล่านี้ยังมีการศึกษากันน้อยมากในกลุ่มปลา Carp Babiak, Glogowski, Brzuska, Szumiec and Adamk (1997) พบว่าสาร DMA (10%) เป็นสาร cryoprotectant ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิเท่ากับ 27.5±2.5% และ 72.9±0.8% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามในปลาชนิดเดียวกันนี้ Lahnsteiner, Berger, Horvath, Urbanyi and Weismann (2000) และ Linhart, Rodina and Cosson (2000) พบว่า 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectantที่ให้อัตราการเคลื่อนที่ 35.2±7.1% และ 78.0±18.0% ตามลำดับ

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไม่เพียงแต่ขึ้นอยู่กับความเข้มข้น และระยะเวลาที่เหมาะสมของสาร cryoprotectant และสาร extender เท่านั้นแต่ยังขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในระหว่างขบวนการแช่แข็งด้วย (Mazur, 1977) ในระหว่างขบวนการแช่แข็งและการละลาย (thawing) จะมีการแพร่เข้า-ออก ของน้ำระหว่างเซลล์และตัวกลาง พบว่าถ้าลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ ในระหว่างขบวนการแช่แข็งจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย ในทางกลับกันถ้ามีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเซลล์อาจจะมีการช๊อค (cold shock) (Lueng in Jamieson, 1991) ในขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน โดยใช้น้ำแข็งแห้ง (dry ice, อุณหภูมิ -79°C) พบอัตราการรอด (survival rate) สูงที่สุด 91% เมื่อใช้ Kurokura el al. extender +10% egg yolk และมี 10% DMSO เป็นสาร cryoprotectant (Babiak et al., 1997) นอกจากนี้ Linhart et al. (2000) พบว่าอัตราการฟักของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไนไม่มีความแตกต่างกับน้ำเชื้อสด (52±9% และ 50±18% ตามลำดับ, $p>0.05$) เมื่อใช้การลดอุณหภูมิที่ two-step freezing rates โดยการลดอุณหภูมิ 4°C min^{-1} จาก 4°C ถึง -9°C และลดอุณหภูมิที่ 11 °C min^{-1} จาก -9°C ถึง -80°C นอกจากนี้ Akcay et al. (2004) พบว่าอัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อแช่แข็งปลาไนเพียง 26% เมื่อใช้การลดอุณหภูมิโดยการอังผ่านไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) นาน 10 นาที ก่อนจุ่มในไนโตรเจนเหลว -196°C จากข้อมูลดังกล่าวพบว่าวิธีการลดอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากลุ่ม Carp ยังมีความหลากหลายและผลที่ได้ก็แตกต่างกันออกไป ดังนั้นการหาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจึงจำเป็นสำหรับปลากลุ่มนี้ โดยเฉพาะในปลานวลจันทร์น้ำจืดซึ่งยังไม่มีการศึกษามาก่อน

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่นิยมทำกันมี 2 วิธี คือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะสั้น (Short-term storage) เป็นการเก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิสูงกว่า 0°C เล็กน้อย โดยสารสำคัญที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น คือสาร extender ซึ่งเป็นสารที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษาเพื่อไม่ให้น้ำเชื้อมีความเข้มข้นมากเกินไป อีกทั้งมีบทบาทในการลดการเคลื่อนที่และการใช้พลังงานของตัวอสุจิ และอีกวิธีหนึ่งคือการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบระยะยาว (Long-term storage) ซึ่งต้องอาศัย

สาร extender สาร cryoprotectant และอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rates) ที่เหมาะสม จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ผ่านกระบวนการแช่แข็งเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196°C

Hulata and Rothbard (1979) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนแบบระยะสั้น โดยใช้ rinsing solution ซึ่งประกอบด้วย 0.3% Urea และ 0.4% NaCl เป็นสาร extender เก็บที่อุณหภูมิ 0 ถึง 4°C ได้นานถึง 45 ชั่วโมง โดยมีอัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด และใช้สารเดียวกันนี้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทองพบว่าสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 3 ถึง 5°C ได้นานถึง 30 วัน สำหรับในประเทศไทย อุทัยรัตน์ ณ นคร (2525) ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยเจือจางน้ำเชื้อต่อสาร extender 2 ชนิด คือ rinsing solution และ Ringer's solution ในอัตราส่วน 5: 3 (sperm: extender) พบว่า Ringer's solution เป็นสารละลายที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียน โดยเก็บได้นาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C คือ ให้อัตราการปฏิสนธิเป็น 80.64 และ 38.68% เมื่อเก็บนาน 24 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ ต่างกับน้ำเชื้อที่เก็บเจือจางใน rinsing solution โดยวิธีเดียวกันมีอัตราการปฏิสนธิเป็น 60.17 และ 3.71% เมื่อเก็บนาน 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ จากข้อมูลจะเห็นได้ว่าชนิดของสาร extender ที่เหมาะสมนั้นนอกจากจะสามารถยืดเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นแล้ว ยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อได้อีกด้วย จึงน่าจะเป็นประโยชน์สำหรับการศึกษาและประยุกต์ใช้กับปลานวลจันทร์ ซึ่งพบว่ามีน้ำเชื้อน้อย

นอกจากนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาในปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (Endangered species) หรือใช้ในโปรแกรมการผสมพันธุ์ปลา เช่น androgenesis (Thorgaard, Pual, Wheeler and Robert, 2000) และผลิตปลาข้ามสายพันธุ์ (Hybridize species) ได้ เช่น การใช้น้ำเชื้อแช่แข็งของ blue catfish, *Ictalurus furcatus* ผสมกับไข่ของ Channel catfish, *Ictalurus punctatus* โดย Bart et al. (1998) นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน ลดพื้นที่การเลี้ยง broodstock สามารถขนส่งได้ง่ายเมื่อเทียบกับปลามีชีวิต (Piironen, 1993; Chereguini et al., 2001) และสามารถแก้ปัญหาสำหรับปลาที่ไข่และน้ำเชื้อสุกไม่พร้อมกันเช่นปลาเผาะหรือปลาโมง (*Pangasius bocourti*) อย่างไรก็ตามวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลามีค่าใช้จ่ายในการดำเนินงาน และค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาจึงควรใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด ด้วยเหตุนี้จึงควรทราบอัตราส่วนที่เหมาะสมของน้ำเชื้อแช่แข็ง และน้ำเชื้อสดที่ใช้ผสมกับไข่หนึ่งใบ (sperm: egg ratio)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่ามีการใช้ปริมาณน้ำเชื้อผสมกับไข่เกินความจำเป็น อีกทั้งการศึกษาอัตราส่วนของ sperm: egg ratio ที่เหมาะสมสำหรับปลาแต่ละชนิดมีน้อยมาก (Lahnsteiner and Patzner, 1996) ในปลาดุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*) Steyn and Vuren (1987) พบว่าการใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อแช่แข็ง 4.9×10^4 sperm: egg มีอัตราการฟักเป็นตัว 51% ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด ในปลาชนิดเดียวกันนี้ Viveiros, So and Komen (2000) พบอัตราการฟักเป็นตัว 58% ซึ่งไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด เมื่อใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อแช่แข็ง 1.13×10^4 sperm: egg แต่อย่างไรก็ตามใน blue catfish,

Ictalurus furcatus ต้องใช้อัตราส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งถึง 13.3×10^6 sperm: egg และให้อัตราการปฏิสนธิเพียง 54% ของน้ำเชื้อสด (Bart et al., 1998) สำหรับปลานิล, *Oreochromis* sp. Rana and McAndrew (1989) พบอัตราส่วนน้ำเชื้อแช่แข็ง 0.14×10^6 sperm: egg เป็นสัดส่วนที่เหมาะสม นอกจากนี้พบว่าอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อไข่ที่มากเกินไปส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลง เนื่องจากความหนืดของ sperm ที่เกาะกันแน่นหน้า micropyle ของไข่ทำให้ไม่สามารถเจาะเข้าไปผสมกับไข่ได้ (Rurangwa et al., 1998; Tambassen et al., 1995; Gwo, 2000; Rosenthal et al. 1988) ในทางกลับกันพบว่าปริมาณน้ำเชื้อที่ไม่เพียงพอก็ส่งผลให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเช่นเดียวกัน (Rurangwa et al., 1998; Bart et al., 1998) Kwantong (2003) ศึกษาผลของอัตรา dilution rate ที่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิของน้ำเชื้อสดในปลาสวาย พบว่าอัตรา dilution rate ระหว่าง 1:1 ถึง 1:30 ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิ ซึ่งอัตราการปฏิสนธิอยู่ระหว่าง 33-45% แต่เมื่อเพิ่มอัตรา dilution rate เป็น 1:100 ทำให้อัตราการปฏิสนธิลดลงเพียง 17% เท่านั้น จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าปริมาณน้ำเชื้อที่สูงเกินไปหรือน้อยไป จะมีผลต่อการลดอัตราการปฏิสนธิ อีกทั้งข้อมูลการศึกษาถึงประสิทธิภาพ อัตราส่วนน้ำเชื้อที่เหมาะสมต่อการผสมกับไข่มีน้อยมาก หรือไม่มีเลยสำหรับปลาในกลุ่ม Carp ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการศึกษา dilution rate ของสาร extender ที่เหมาะสม เพื่อใช้เจือจางน้ำเชื้อปลา และเพื่อให้เกิดการใช้น้ำเชื้อที่มีอยู่อย่างจำกัดให้เกิดประโยชน์สูงสุด และควรทราบอัตราส่วนน้ำเชื้อปลาที่ใช้ในการผสมกับไข่ตลอดจนการศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดนี้แบบแช่แข็งเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์และส่งเสริมการเลี้ยงสำหรับเกษตรกรต่อไป