การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกลำพันแบบแช่เย็นและแบบแช่แข็ง

Chilled storage and cryopreservation of slender walking catfish (*Clarias nieuhofii*) semen

โดย

แจ่มจันทร์ เพชรศิริ

อัจฉรัตน์ สุวรรณภักดี

สุภฎา คีรีรัฐนิคม

คณะวิทยาศาสตร์ และคณะเทคโนโลยีและการพัฒนาชุมชน

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัย

จากงบประมาณเงินแผ่นดิน ประจำปี 2555

มหาวิทยาลัยทักษิณ

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่เย็นและวิธีการแช่แข็ง สามารถใช้เป็นเครื่องมือในการปรับปรุงพันธุ์ และการผลิตสัตว์น้ำโดยวิธีการผสมเทียมได้ การศึกษาครั้งมีวัตถุประสงค์เพื่อหาชนิดของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (extender) อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกลำพันโดยวิธีแช่เย็นและแช่แข็ง และเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิและเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ของปลาดุกลำพันที่ได้จากการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยแบ่งออกเป็น 5 การทดลองคือ การทดลองที่ 1 และ 2 ศึกษา ผลของน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ 5 ชนิดคือ น้ำมะพร้าว, Calcium Free Hank's balanced salt solution (Ca–F HBSS), ไตรโซเดียม ซิเตรท (trisodium citrate), Modified TSU 1 (น้ำมะพร้าว + Ca-F HBSS) และ Modified TSU 2 (น้ำมะพร้าว + ไตรโซเดียม ซิเตรท) เจือจางน้ำเชื้อในอัตรา 1:9 ที่มีต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ (motility) และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิต (viability) ของปลาดุกลำพันที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นและแช่แข็งตามลำดับ การทดลองที่ 3 และ 4 ศึกษาผลของน้ำยา Modified TSU 1 ในอัตราส่วนต่างๆ 5 อัตราคือ 1:1, 1:3, 1:5, 1:7 และ 1:9 ที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็นและแช่แข็งตามลำดับ และการทดลองที่ 5 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์การฟัก โดยใช้น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่า Modified TSU 1 เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น โดยในชั่วโมงที่ 60 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ (20.0±0.0%) สูงที่สุด ในขณะที่น้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อสูตรอื่นๆ มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิ น้อยกว่า 10% และในชั่วโมงที่ 120 มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตสูงถึง 69.33±8.0% ส่วน Ca–F HBSS เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตหลังการละลายสูงที่สุด (63.0±5.7%) และจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่เย็นพบว่าน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยา Modified TSU 1 ในอัตรา 1:1, 1:3 และ 1:5 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) แต่มีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อที่เจือจางในอัตรา 1:7 และ 1:9 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตามน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาในอัตราส่วนต่างกันและเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตไม่แตกต่างกัน และผลการทดลองพบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งมีอัตราการปฏิสนธิ (91.5±4.1%) ไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด (97.5±0.4%) แต่มีเปอร์เซ็นต์การฟัก (47.1±14.2 %) ต่ำกว่าน้ำเชื้อสด (75.5±4.1%) ส่วนน้ำเชื้อแช่เย็นมีอัตราการปฏิสนธิ (81.8±5.1%) และเปอร์เซ็นต์การฟัก (52.4±11.2) ต่ำกว่าน้ำเชื้อสด จากผลการศึกษาครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงพันธุ์หรืออนุรักษ์พันธุกรรมของปลาดุกลำพันได้

Abstract

The development of chilled and cryopreservation techniques can provide management tools for the artificial reproduction and genetic improvement of aquaculture species. The aim of this work was to find out the suitable extender and suitable extender ratio for chilling and cryopreseved *Clarias nieuhofii* sperm. The fertilization capacity and hatching rate of fresh, refrigerated and post-thaw sperm were compared. Five experiments were designed. In experiment 1 and 2, five extenders, Coconut water, Ca–F HBSS, Trisodium citrate, Modified TSU 1 (coconut water mixed with Ca–F HBSS, 1:1) and Modified TSU 2 (coconut water mixed with trisodium citrate, 1:1) were evaluated for motility and viability of refrigerated and cryopreserved sperm respectively. In experiment 3 and 4, five ratios (1:1, 1:3, 1:5, 1:7 and 1:9) of Modified TSU 1 were evaluated for motility and viability of refrigerated and cryopreserved sperm respectively. The fertilization capacity and hatching rate of fresh, refrigerated and post-thaw sperm were compared in experiment 5. The result showed that highest sperm motility (20.0±0.0%) after 60 hrs of chilling and high sperm viability (69.33 ±8.0%) after 120 hrs of chilling were observed in semen diluted in Modified TSU 1 solution, compared to semen diluted in all the other extenders. The highest post-thaw viability (63.0±5.7%) was obtained when sperm was diluted in Ca–F HBSS solution. There was no significant difference in sperm viability after chilled in different dilution ratios; however, significant differences could be observed in the sperm motility. Significantly lower motility were found with sperm diluted in 1:7 and 1:9. There was no significant difference in post-thaw motility and viability after cryopreservation at different dilution ratios. No difference in fertilization rate was found between fresh and post-thaw sperm, but fertilization was lower with chilled sperm when compared to fresh and cryopreserved sperm. No difference in hatching rate was found between chilled and cryopreserved sperm. The result from these studies can provide management tools for the genetic improvement and the genetic conservation of *Clarias nieuhofii*.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ นายเสิน เพชรทอง ที่ช่วยหาตัวอย่างปลาดุกลำพัน ขอขอบคุณประธานสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพและสิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ที่อำนวยความสะดวกและอนุเคราะห์การใช้สถานที่ อุปกรณ์และเครื่องมือในการทำวิจัยครั้งนี้ โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 มหาวิทยาลัยทักษิณ ผู้วิจัยขอขอบคุณ ไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

แจ่มจันทร์ เพชรศิริและคณะ
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญตาราง	VII
สารบัญภาพ	VIII
บทที่ 1 บทนำ	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
ลักษณะด้านอนุกรมวิธานของปลาดุกลำพัน	3
ชีววิทยาของปลาดุกลำพัน	3
วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา	5
ขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา	5
ปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ	8
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	14
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	17
การเตรียมตัวอย่างปลาทดลอง	17
การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อจากปลาเพศผู้	17
การเตรียมสูตรน้ำยาที่ใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อ	17
การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อก่อนการทดลอง	19
วิธีดำเนินทดลอง	19
การวิเคราะห์ข้อมูล	25
บทที่ 4 ผลการศึกษา	26
เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตรต่างๆ ที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็น	26
เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตของน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตรต่างๆ และเก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็น	28
เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตของน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตรต่างๆ ที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง	30
เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิที่เจือจางด้วยน้ำยาในอัตราส่วนต่างๆ ที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็น	32

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	**หน้า**
บทที่ 4 ผลการศึกษา (ต่อ)	
เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตของน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยา ในอัตราส่วนต่างๆที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่เย็น	33
เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตของน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาในอัตราส่วนต่างๆ ที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง	34
เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ การฟักไข่ของปลาดุกลำพันโดยใช้น้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็นและน้ำเชื้อแช่แข็ง	35
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปและข้อเสนอแนะ	37
สรุปผลการศึกษา	43
ข้อเสนอแนะ	43
เอกสารอ้างอิง	44

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	Chemical composition of coconut water	10
2.2	Composition of the extenders successfully used for refrigerated storage of fish sperm	14
2.3	Composition of the extenders and cryoprotectant successfully used for sperm cryopreservation in fish	15
3.1	Chemical compositions and pH of the five extenders used in this experiment	18
3.2	Score ranking of sperm motility	20
4.1	Motility rate (%) of chilled slender walking catfish sperm diluted in different extenders	27
4.2	Viability rate (%) of chilled slender walking catfish sperm diluted in different extenders	29
4.3	Motility and viability of cryopreserved slender walking catfish sperm diluted in different extenders	31
4.4	Motility (%) of chilled slender walking catfish sperm diluted in different dilution ratios	32
4.5	Viability (%) of chilled slender walking catfish sperm diluted in different dilution ratios	34
4.6	Motility and viability of cryopreserved slender walking catfish sperm diluted in different dilution ratios	35
4.7	Percent fertilization and hatching of slender walking catfish eggs fertilized with fresh, Chilled or cryopreserved sperm	36

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	General characteristics of *Clarias nieuhofii*	4
4.1	Motility of chilled slender walking catfish sperm diluted in different extenders	28
4.2	Viability of chilled slender walking catfish sperm diluted in different extenders	30
4.3	Motility of cryopreserved slender walking catfish sperm diluted in different extenders	31
4.4	Viability of cryopreserved slender walking catfish sperm diluted in different extenders	32
4.5	Motility of chilled slender walking catfish sperm diluted in different dilution ratios	33
4.6	Viability of chilled slender walking catfish sperm diluted in different dilution ratios	34