เอกสารวิชาการฉบับที่ ๔/๒๕๕๕ Technical Paper No. 4/2012

ศึกษาผลของฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพา และการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทพา

Effects of Sustainable Releasing Hormone to Chao–Phraya Giant Catfish (*Pangasius sanitwongsei*) Egg and Sperm Development, and the Spermatozoa Cryopreservation Study

พลชาติ ผิวเณร Ponlachart Pewnane
พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข Panom K. Sodsuk
วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์ Wisanuporn Ratanatrivong
ถาวร จีนหมิก Thaworn Jienmeek

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute
กรมประมง Department of Fisheries
กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ Ministry of Agriculture and Cooperatives

เอกสารวิชาการฉบับที่ ๔/๒๕๕๕ Technical Paper no. 4/20012

ศึกษาผลของฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพา และการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทพา

Effects of Sustainable Releasing Hormone to Chao–Phraya Giant Catfish (*Pangasius sanitwongsei*) Egg and Sperm Development, and the Spermatozoa Cryopreservation Study

พลชาติ ผิวเณร Ponlachart Pewnane
พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข Panom K. Sodsuk
วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์ Wisanuporn Ratanatrivong
ถาวร จีนหมิก Thaworn Jienmeek

กลุ่มวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมโมเลกุลสัตว์น้ำ Molecular Aquaculture Genetics Research and Development Group
สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute
กรมประมง Department of Fisheries
๒๕๕๕ 2012

รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 53–0600–53007

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
Abstract	3
คำนำ	5
วัตถุประสงค์	6
วิธีดำเนินการ	6
1. ศึกษาผลของฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพา	6
2. ศึกษาน้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาโดยวิธีแช่แข็ง	7
3. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาเทพาโดยวิธีผสมเทียม	8
ผลการศึกษา	8
1. ผลของฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพา	8
2. น้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาโดยวิธีแช่แข็ง	12
3. ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาเทพาในการผสมเทียม	14
วิจารณ์ผลการศึกษา	14
ข้อเสนอแนะ	17
คำขอบคุณ	17
เอกสารอ้างอิง	18
ภาคผนวก	20

สารบาญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กลุ่มไข่ปลาเทพาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางช่วงต่างๆ แบ่งตามระยะพัฒนาการจากระยะต้นถึงระยะ ปลาย	9
2	ปริมาณไข่ปลา 4 กลุ่ม ที่แบ่งตามขนาด ในช่วงก่อนฝังฮอร์โมน (มีนาคม)	9
3	ปริมาณไข่ปลา 4 กลุ่ม ที่แบ่งตามขนาด ในช่วงหลังจากฝังฮอร์โมนนาน 30 วัน (เมษายน)	10
4	คุณภาพน้ำเชื้อโดยค่าความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ระหว่างปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน และปลาชุดควบคุม ตั้งแต่เดือนมีนาคม–กรกฎาคม	12
5	ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) เฉลี่ยในน้ำเชื้อปลาเทพาที่ละลาย จากการใช้ยา 0.9% NaCl, CF–HBSS และ 5% glucose ที่อัตราลดอุณหภูมิ 1, 5 และ 10 °C/นาที	13
6	อัตราปฏิสนธิของไข่ที่ได้รับการผสมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาละลายของปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและชุดควบคุม และน้ำเชื้อสด	14

ศึกษาผลของฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพา และการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทพา

พลชาติ ผิวเณร* พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์ และ ถาวร จีนหมิก
สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ

บทคัดย่อ

การศึกษาครั้งนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมน $LHRH_a$ แบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพา (*Pangasius sanitwongsei*) และเพื่อศึกษาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทพาโดยเปรียบเทียบน้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็ง ดำเนินการศึกษา ณ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ ศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพิษณุโลก ตั้งแต่เดือนตุลาคม พ.ศ. 2552 ถึงเดือนกันยายน พ.ศ. 2554 ด้วยประเด็นศึกษาพร้อมผลที่ได้ดังต่อไปนี้ (1) ผลของฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์หลังจากฝังฮอร์โมนนาน 30 วัน ในปลาเพศเมีย ปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและปลาชุดควบคุมมีปริมาณไข่ขนาดเล็ก (0.4–0.6 มม.) และไข่ขนาดกลาง (0.7–1.1 มม.) ลดลง ในขณะที่มีปริมาณไข่ขนาดใหญ่ (1.2–1.6 มม.) เพิ่มขึ้น และพบว่าเริ่มมีไข่ขนาดใหญ่มาก (≥1.7 มม.) โดยปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานมีปริมาณไข่ขนาดใหญ่ (1.2–1.6 มม.) 65.51% สูงกว่าปลาชุดควบคุม (34.28%) ในขณะที่ปริมาณไข่ขนาดอื่นๆ ไม่มีความแตกต่างกัน ผลที่ได้สัณนิษฐานว่าเกิดจากฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน ไปกระตุ้นพัฒนาการของไข่ อย่างไรก็ตาม ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานไม่มีผลต่อพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ของปลาเพศผู้ โดยปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและชุดควบคุมมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณ และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวไม่แตกต่างกัน (2) น้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาโดยวิธีแช่แข็ง เปรียบเทียบสูตรน้ำยา 3 สูตร คือ 0.9% NaCl, CF–HBSS และ 5% glucose และเปรียบเทียบอัตราลดอุณหภูมิ 3 อัตรา คือ 1, 5 และ 10 °C/นาที เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งนาน 150 วัน นำน้ำเชื้อมาละลายแล้ววัดคุณภาพน้ำเชื้อ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า น้ำยา 5% glucose และอัตราลดอุณหภูมิที่ 5 และ 10 °C/นาที มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวเฉลี่ย 57.73% และ 61.20% ตามลำดับ มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 23.67 วินาทีและ 24.33 วินาที ตามลำดับ โดยมีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อที่ผสมน้ำยา 0.9% NaCl และ CF–HBSS ที่มีปริมาณสเปิร์มเคลื่อนไหว

*ผู้รับผิดชอบ: 39 หมู่ 1 ต. คลองห้า อ. คลองหลวง จ. ปทุมธานี 12120 โทร. 0 2904 7604
e–mail: ponlachart@gmail.com

26.32–32.41% และ 28.67–35.73% ตามลำดับ และมีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 21.67–24.33 และ 19.33–22.00 วินาที ตามลำดับ ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่า น้ำยา 5% glucose ภายใต้อัตราลดอุณหภูมิ 5 และ 10 °C/นาที เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาโดยวิธีแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลว (3) ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งในการผสมเทียม นำน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน และชุดควบคุมไปละลาย แล้วนำไปผสมกับไข่เทียบกับน้ำเชื้อสด พบว่าน้ำเชื้อทั้ง 2 ชุดการทดลองและน้ำเชื้อสด มีอัตราปฏิสนธิ 71.21–82.13% และไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

คำสำคัญ: ปลาเทพา พัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ การเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง

Effects of Sustainable Releasing Hormone to Chao–Phraya Giant Catfish (*Pangasius sanitwongsei*) Egg and Sperm Development, and the Spermatozoa Cryopreservation Study

Ponlachart Pewnane* **Panom K. Sodsuk Wisanuporn Rattanatriwong and Taworn Jienmuek**

Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute

Abstract

The objective of this study was to determine effects of sustainable releasing hormone ($LHRH_a$) to egg and sperm development and to study the cryopreservation of spermatozoa in Chao–Phraya giant catfish (*Pangasius sanitwongsei*) broodstocks. The study was carried out at Aquatic Animal Genetics Research and Development Institute, Uttaradit Aquaculture Genetics Research and Development Center and Pitsanulok Inland Fisheries Research and Development Center from October 2009 to September 2011 with a number of cases. (1) The effects of sustainable releasing hormone to egg and sperm development: treatment and control brood–fish were implanted with 100 µg/kg sustainable releasing $LHRH_a$ hormone and normal saline solution respectively. Egg and sperm development was measured by the percentage of egg–diameter and sperm quality after 30 days of post implantation. Percentage of small (0.4–0.6 mm), medium (0.7–1.1 mm) and the biggest eggs (≥1.7 mm) in treatment and control groups were not different. However, sustainable releasing hormone might affect egg development since the treatment group had percentage of the relatively big eggs (1.2–1.6 mm) greater than the control group had. In male fish, sustainable releasing hormone did not affect sperm development since the sperm density, motility and duration between the treatment and control were not different. (2) The optimal extender and freezing rate used for spermatozoa cryopreservation: three extenders (0.9% NaCl, CF–HBSS and 5% glucose) and three freezing rates (1, 5 and 10 °C/min) were compared simultaneously. After storage for 150 days, cryopreserved semen were thawed and sperm quality was measured. The cryopreserved sperm based on 5% glucose and the freezing rates at 5 and 10 °C/min showed

* Corresponding author: 39 Moo 1, Khlong–5, Khlong Luang, Pathum Thani, 12120,

Tel. 0 2904 7604, e–mail: ponlachart@gmail.com

sperm motility and duration higher than those of the 0.9% normal saline and CF–HBSS at 1 °C/min. (3) The efficiency of cryopreserved sperm for artificial insemination: cryopreserved sperm from the treatment and control and the fresh semen were compared. The fertilization rate among the three groups (71.21–82.13%) were not different.

Keywords: Chao–Phraya Giant Catfish, *Pangasius sanitwongsei*, egg and sperm development, cryopreservation

คำนำ

ปลาเทพา (*Pangasius sanitwongsei* Smith, 1931) เป็นปลาพื้นเมืองของประเทศไทย ปลาเทพามีลักษณะเด่นคือเป็นปลาขนาดใหญ่ที่ส่วนปลายของครีบหลัง ครีบอก และครีบท้องยื่นเป็นเส้นยาว ทำให้ดูสง่างามเมื่อว่ายน้ำ จัดเป็นปลาที่มีขนาดใหญ่ที่สุดในแม่น้ำเจ้าพระยาจึงมีชื่อสามัญว่า Chao–Phraya Giant Catfish ปัจจุบันมีการเพาะพันธุ์ปลาเทพาเพื่อขายในรูปปลาสวยงามและมีราคาแพง ปลาเทพาจึงจัดเป็นปลาน้ำจืดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งในแง่ของปลาสวยงาม อย่างไรก็ตาม สถานภาพและแหล่งพันธุกรรมของปลาเทพานั้นอยู่ในสภาพวิกฤติ ปลาเทพาได้สูญหายไปจากลุ่มน้ำแม่น้ำเจ้าพระยาและพบน้อยมากในแม่น้ำโขง (Mekong River Commission, 2011) เนื่องจากสภาพแวดล้อมและถิ่นที่อยู่อาศัยเสื่อมโทรมลงและการสร้างเขื่อนขัดขวางการอพยพไปผสมพันธุ์วางไข่ นอกจากนี้สายพันธุ์ปลาเทพามีแนวโน้มที่จะเสื่อมโทรมลงเพราะมีการผลิตลูกปลาพิการที่มีลักษณะลำตัวสั้น (short body) ขายเป็นปลาสวยงาม ซึ่งเกิดจากการสร้างค่านิยมให้ปลาลักษณะดังกล่าวเป็นปลาสวยงามและมีราคาแพง การกระทำในลักษณะดังกล่าวถือเป็นการคัดพันธุ์ในทางลบ (negative selection) ซึ่งในทางหลักพันธุศาสตร์จะส่งผลเสียต่อสายพันธุ์ปลาเทพาในระยะยาว ดังนั้น องค์กรสากล Internation Union for Conservation of Nature (IUCN) จึงได้จัดให้ปลาเทพาอยู่ในสถานะใกล้สูญพันธุ์ระดับวิกฤติ (critically endangered) (Jenkins *et al*., 2009) กรมประมงจึงได้ดำเนินการอนุรักษ์พันธุ์ปลาโดยดำเนินโครงการอนุรักษ์และฟื้นฟูทรัพยากรสัตว์น้ำจืด โดยเพาะพันธุ์ปลาเทพาแล้วปล่อยลูกปลาเทพาคืนสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ณ ปัจจุบันแม้ว่าปลาเทพาสามารถเพาะพันธุ์โดยวิธีผสมเทียมจากพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อ (ยงยุทธ และคณะ, 2541) แต่มักมีปัญหาเนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ส่วนหนึ่งมีความบกพร่องของระบบสืบพันธุ์ (reproductive dysfunction) ทำให้ไม่สามารถพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์จนถึงระยะสุดท้าย จนไม่สามารถผสมเทียมได้โดยมีสาเหตุมาจากพ่อแม่พันธุ์ถูกเลี้ยงในที่กักขังซึ่งมีสภาพแวดล้อมแตกต่างจากสภาพแวดล้อมในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ตามปกติในธรรมชาติ ส่งผลให้ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์บกพร่องจนเซลล์สืบพันธุ์มีพัฒนาการต่ำและไม่สามารถนำไปเพาะพันธุ์ได้ แนวทางในการพัฒนาการเพาะพันธุ์และการรักษาแหล่งพันธุกรรมของปลาเทพานั้น ควรที่จะนำองค์ความรู้ 2 ประเด็นมาประยุกต์ใช้ คือ

1) การกระตุ้นให้เซลล์สืบพันธุ์พัฒนาจนถึงระยะสุดท้าย (final maturation) ด้วยฮอร์โมนที่ควบคุมพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ โดยใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน (sustainable release hormone) ที่ทำให้ฮอร์โมนค่อยๆ ถูกปลดปล่อยเข้าสู่กระแสโลหิตทีละน้อยๆ เป็นระยะเวลานาน ซึ่งการศึกษาฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานนั้น ได้มีการศึกษามาบ้างแล้วในปลากดแก้ว (วิศณุพร, 2550, 2551; พลชาติ และคณะ, 2552) ซึ่งหากได้นำมาประยุกต์ใช้ในปลาเทพา อาจจะเพิ่มประสิทธิภาพพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาการเพาะพันธุ์ปลาเทพา

2) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาแบบระยะยาวโดยวิธีแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว (cryopreservation) เพื่อเป็นการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาเทพาและเพื่อเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ปลาเทพาไว้ใช้ประโยชน์แบบระยะยาว อนึ่ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่แข็งให้ประสบผลสำเร็จนั้น จะต้องมีการศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสม 2 ประเด็นหลักคือ 1) น้ำยาสำหรับผสมน้ำเชื้อ (cryodiluent) ซึ่งประกอบด้วยน้ำยาเจือจาง (extender) ซึ่งเป็นน้ำยาที่ทำให้สเปิร์มหยุดนิ่งและสามารถคงสภาพสเปิร์มให้มีชีวิตยาวนานขึ้น และสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยปกป้องสเปิร์มระหว่างกระบวนการแช่แข็ง และ 2) อัตราลดอุณหภูมิ การแช่แข็งน้ำเชื้อจำเป็นต้องลดอุณหภูมิด้วยอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสม หากใช้อัตราที่ต่ำหรือสูงเกินไปจะมีผลให้เซลล์สเปิร์มเสียหายจาก 2 สาเหตุหลักคือ การสูญเสียน้ำออกจากเซลล์ และผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นทั้งภายในและภายนอกเซลล์ที่ทำลายเซลล์ทางกายภาพโดยตรง (Leung, 1991) สองปัจจัยดังกล่าวมีความเฉพาะเจาะจงกับน้ำเชื้อของปลาแต่ละชนิด ดังนั้นเพื่อให้การอนุรักษ์พันธุ์ปลาเทพาด้วยวิธีนี้มีประสิทธิภาพ จึงควรมีการศึกษาเปรียบเทียบน้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นการเบื้องต้น และจาก 2 ประเด็นดังที่กล่าวมานี้ จึงควรมีการศึกษาทั้ง 2 เรื่องควบคู่กันไป ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาการเพาะพันธุ์และการอนุรักษ์ปลาเทพาต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพา
2. เพื่อศึกษาน้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาโดยวิธีแช่แข็ง
3. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาเทพาโดยวิธีผสมเทียม

วิธีดำเนินการ

ดำเนินการทดลองในช่วงก่อนถึงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ของปลาเทพาในเขตภาคเหนือ โดยใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อดินของศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพิษณุโลก และเตรียมฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาโดยวิธีแช่แข็ง ณ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ จ.ปทุมธานี เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาเทพาโดยให้อาหารผสมในอัตรา 3% ของน้ำหนักตัวต่อวัน และให้อาหารเสริมในช่วงก่อนถึงฤดูเพาะพันธุ์ นำพ่อแม่พันธุ์ปลาเทพาไปดำเนินการทดลองตามวัตถุประสงค์ดังนี้

1. <u>ศึกษาผลของฮอร์โมน LHRHa แบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพา</u>

เตรียมฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน ใช้ฮอร์โมน $LHRH_a$ บรรจุลงในหลอด silicone ตามที่รายงานไว้ใน Okada *et al.* (2005) แล้วนำไปฝัง (implant) ในกล้ามเนื้อปลาเทพาเพศเมียและเพศผู้ที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ เพศละ 5 ตัว ในอัตราฮอร์โมน 100 ไมโครกรัม/นน.ตัว 1 กก. โดยเปรียบเทียบกับปลากลุ่มควบคุมจำนวนเพศละ 5 ตัว ซึ่งฝังหลอด silicone ที่บรรจุสารละลาย normal saline ฝังฮอร์โมนในช่วงเริ่มฤดูผสมพันธุ์

วางไข่ในเดือนมีนาคม เก็บข้อมูลปลา 2 ชุดการทดลอง ทั้งก่อนและหลังจากฝังฮอร์โมนนาน 30 วันเป็นต้นไป นำปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองมาเก็บข้อมูลดังต่อไปนี้

1.1 พัฒนาการของไข่โดยเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ โดยใช้สายพลาสติกดูดไข่จากรังไข่ปลาเพศเมีย นำไปเก็บรักษาในน้ำยา Gilson's solution (17% (v/v) nitric acid, 4% (v/v) acetic acid, 2% (w/v) mercuric chloride, 95% (v/v), 6.65% (v/v) ethanol) นำไปวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง หน่วยเป็นมิลลิเมตร เพื่อตรวจสอบพัฒนาการของเซลล์ไข่ ตามวิธีการของ Rottmann *et al.* (1991)

1.2 พัฒนาการของสเปิร์มโดยคุณภาพน้ำเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อสดจากปลาเพศผู้ ไปวัดคุณภาพน้ำเชื้อ คือ ความหนาแน่นสเปิร์ม (เซลล์/มล.), ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) ตามวิธีการของ กฤษณ์ (2536)

นำข้อมูลจำนวนไข่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดต่างๆ ความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ข้อมูลที่เป็นสัดส่วนหรือเปอร์เซ็นต์จะแปลงเป็นค่า arcsine นำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี t–test และแสดงผลค่าเฉลี่ย (mean±standard error of mean) (อนันต์ชัย, 2539)

2. <u>ศึกษาน้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาโดยวิธีแช่แข็ง</u>

เก็บน้ำเชื้อปลาเทพาโดยวิธีรีดด้วยมือ รีดน้ำเชื้อใส่ในหลอดพลาสติกแล้วแช่ในน้ำแข็ง ทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บตามวิธีการที่รายงานใน พลชาติ และคณะ (2551) นำน้ำเชื้อที่ทดสอบแล้วว่ามีคุณภาพดีซึ่งมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวตั้งแต่ 70% ขึ้นไป ในปริมาตรเท่ากันมารวมกันเป็นน้ำเชื้อรวม (pooled sperm) เพื่อลดอิทธิพลจากปลาแต่ละตัว ทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อโดยใช้ไอไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen vapor) ตามวิธีการที่รายงานไว้ใน พลชาติ และคณะ (2551) โดยนำน้ำเชื้อไปผสมกับน้ำยาแตกต่างกัน 3 สูตร ดังนี้

– น้ำยา C–F HBSS (152 mM NaCl, 5.9 mM KCl, 4.6 mM $NaHCO_3$, 0.9 mM $MgSO_4.7H_2O$, 0.5 mM KH_2PO_4, 0.5 mM $Na_2HPO_4.7H_2O$, 6.16 mM glucose, pH 7.5) เป็นน้ำยาที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) (Mongkonpunya *et al*., 2000) ซึ่งเป็นปลาที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปลาเทพา

– น้ำยา 0.9% NaCl เป็นน้ำยาที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) (อนงคณ์, 2539) ซึ่งเป็นปลาที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับปลาเทพา

– น้ำยา 5% Glucose เป็นน้ำยาที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาบึก (พลชาติ และคณะ, 2551)

ผสมน้ำเชื้อและน้ำยาในอัตราน้ำเชื้อ 1 ส่วนต่อน้ำยา 4 ส่วน และผสมสารไครโอโพรเทคเทคแทนท์ (cryoprotectant) ซึ่งเป็นสารที่ปกป้องเซลล์สเปิร์มระหว่างกระบวนการแช่แข็ง คือ เมธานอล ผสมลงในสารละลายน้ำเชื้อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10% (v/v) แล้วจึงดูดสารละลายน้ำเชื้อปริมาตร 0.5 มล. ใส่ในหลอดแช่แข็ง (straws) ปิดผนึกที่ปลายหลอด ปล่อยให้เซลล์สเปิร์มปรับตัวกับสารละลาย ที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 20 นาที จากนั้นนำหลอดบรรจุสารละลายน้ำเชื้อไปลดอุณหภูมิตามกระบวนการแช่แข็ง ที่อัตราลดอุณหภูมิหน่วยเป็น

°C/นาที จำนวน 3 อัตรา คือ 1, 5 และ 10 °C/นาที ลดอุณหภูมิจนสารละลายน้ำเชื้อมีอุณหภูมิ –80 °C แล้วนำไปเก็บรักษาโดยแช่ลงในไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ –196 °C ในถังเก็บตัวอย่าง

เก็บข้อมูลโดยนำน้ำเชื้อที่เก็บแช่แข็งนาน 150 วันมาละลายในน้ำอุณหภูมิ 37 °C นาน 8 วินาที นำน้ำเชื้อที่ละลายไปตรวจสอบคุณภาพโดยประเมินปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว หน่วยเป็น % และวินาที ตามลำดับ ตามวิธีที่รายงานไว้ใน พลชาติ และคณะ (2551) วางแผนการทดลองแบบ 3×3 แฟคทอเรียลในการทดลองแบบสุ่มตลอด (3×3 factorial in completely randomized design) แบ่งเป็น 9 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองแบ่งเป็น 3 ซ้ำ กำหนดให้มี 2 ปัจจัยคือ 1) น้ำยาที่แตกต่างกัน 3 สูตร และ 2) อัตราลดอุณหภูมิที่แตกต่างกัน 3 อัตรา วิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี two–ways analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Student–Newman–Keuls (SNK) และแสดงผลค่าเฉลี่ย (mean±standard error of mean) (อนันต์ชัย, 2539)

3. <u>ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาเทพาโดยวิธีผสมเทียม</u>

ทำการผสมเทียมปลาเทพา ฉีดฮอร์โมนกระตุ้นปลาเทพาเพศเมียจำนวน 3 ตัว ทำการรีดไข่แล้วนำไข่จากแม่ปลา 3 ตัวมาผสมในปริมาณเท่ากัน นำไปผสมกับน้ำเชื้อแตกต่างกัน 3 แหล่งคือ (1) น้ำเชื้อแช่แข็งของปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน (2) น้ำเชื้อแช่แข็งของปลาชุดควบคุม และ (3) น้ำเชื้อสด ผสมน้ำเชื้อและไข่ในอัตราน้ำเชื้อ 0.2 มิลลิลิตร ต่อปริมาณไข่น้ำหนัก 1 กรัม นำไข่ที่ได้รับการผสมไปฟัก เก็บข้อมูลโดยตรวจสอบอัตราปฏิสนธิหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์ นำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยวิธี one–ways analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) และแสดงผลค่าเฉลี่ย (mean±standard error of mean) (อนันต์ชัย, 2539)

ผลการศึกษา

1. <u>ผลของฮอร์โมน LHRHa แบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพา</u>

เก็บตัวอย่างไข่และน้ำเชื้อจากพ่อแม่พันธุ์ปลาเทพาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและปลาชุดควบคุม หลังจากฝังฮอร์โมนในปลาทดลองนาน 30 วัน พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ในปลาเพศเมียและเพศผู้ได้ผลการศึกษาดังต่อไปนี้

1.1 พัฒนาการของไข่โดยเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ จากการเก็บตัวอย่างไข่ปลามาวัดเส้นผ่าศูนย์กลางในช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน พบว่าไข่ปลามีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ น้อยกว่า 0.4 ถึงมากกว่า 2.0 มม. ไข่เหล่านี้แบ่งกลุ่มตามขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางได้เป็น 4 กลุ่มตามระยะพัฒนาการคือ (1) กลุ่มไข่ขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 0.4–0.6 มม. (2) กลุ่มไข่ขนาดกลาง เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7–1.1 มม. (3) กลุ่มไข่ขนาดใหญ่

เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2–1.6 มม.และ (4) กลุ่มไข่ขนาดใหญ่มาก เส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1.7 มม. ขึ้นไป โดยแสดงตาม ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 กลุ่มไข่ปลาเทพาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางช่วงต่างๆ แบ่งตามระยะพัฒนาการจากระยะต้นถึงระยะปลาย

ขนาดของไข่	เส้นผ่าศูนย์กลาง (มม.)
เล็ก	น้อยกว่า 0.4–0.6
ปานกลาง	0.7–1.1
ใหญ่	1.2–1.6
ใหญ่มาก	ตั้งแต่ 1.7 ขึ้นไป

ผลการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ปลาในช่วงก่อนฝังฮอร์โมน (มีนาคม) แสดงตาม ตารางที่ 2 ในปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานมีปริมาณไข่ขนาดเล็ก 54.38±33.80% ไข่ขนาดปานกลาง 44.69±32.52% ไข่ขนาดใหญ่ 0.93±1.85% โดยไม่มีไข่ขนาดใหญ่มาก (0.00±0.00%) และปลาชุดควบคุมมีปริมาณไข่ขนาดเล็ก 13.03±10.06% ไข่ขนาดปานกลาง 79.00±5.67% ไข่ขนาดใหญ่ 7.97±13.81% แต่ไม่มีไข่ขนาดใหญ่มาก (0.00±0.00%) เช่นเดียวกัน เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีไข่ขนาดเล็ก ขนาดปานกลาง ขนาดใหญ่ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) ส่วนไข่ขนาดใหญ่มากไม่สามารถวิเคราะห์สถิติได้เนื่องจากปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองไม่มีไข่ขนาดดังกล่าว

ตารางที่ 2 ปริมาณไข่ปลา 4 กลุ่ม ที่แบ่งตามขนาด ในช่วงก่อนฝังฮอร์โมน (มีนาคม)

	ปริมาณไข่ (เปอร์เซ็นต์)			
	เล็ก	ปานกลาง	ใหญ่	ใหญ่มาก
ปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน	54.38±33.80^{A}	44.69±32.52^{A}	0.93±1.85^{A}	0.00±0.00
ปลาชุดควบคุม	13.03±10.06^{A}	79.00±5.67^{A}	7.97±13.81^{A}	0.00±0.00

* อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่เหมือนกันในคอลัมน์เดียวกันของไข่ปลาแต่ละกลุ่ม ไม่แสดงนัยสำคัญในความไม่แตกต่างทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและปลาชุดควบคุม

ผลการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ปลาหลังจากฝังฮอร์โมนนาน 1 เดือน (เมษายน) แสดงตาม ตารางที่ 3 พบว่าไข่ปลาในปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีพัฒนาการเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณไข่ขนาดเล็กและขนาดปานกลางลดลง มีปริมาณไข่ขนาดใหญ่เพิ่มขึ้น และเริ่มมีกลุ่มไข่ขนาดใหญ่มากปรากฏขึ้น โดยในปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานมีปริมาณไข่ขนาดเล็ก 1.07±1.52% ไข่ขนาดปานกลาง 21.70±8.79% ไข่ขนาดใหญ่ 65.51±5.41%

และไข่ขนาดใหญ่มาก 11.71±8.67% และปลาชุดควบคุมมีปริมาณไข่ขนาดเล็ก 2.96±3.14% ไข่ขนาดปานกลาง 34.28±24.98% ไข่ขนาดใหญ่ 36.22±12.09% และไข่ขนาดใหญ่มาก 26.54±35.69% เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและชุดควบคุมมีปริมาณไข่ขนาดเล็ก ไข่ขนาดปานกลาง และไข่ขนาดใหญ่มาก ไม่แตกต่างกัน (P>0.05) แต่มีไข่ขนาดใหญ่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) โดยปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานมีปริมาณไข่ขนาดใหญ่สูงกว่าปลาชุดควบคุม

ตารางที่ 3 ปริมาณไข่ปลา 4 กลุ่ม ที่แบ่งตามขนาด ในช่วงหลังจากฝังฮอร์โมนนาน 30 วัน (เมษายน)

	ปริมาณไข่ (เปอร์เซ็นต์)			
	เล็ก	ปานกลาง	ใหญ่	ใหญ่มาก
ปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน	1.07±1.52^{A}	21.70±8.79^{A}	65.51±5.41^{A}	11.71±8.67^{A}
ปลาชุดควบคุม	2.96±3.14^{A}	34.28±24.98^{A}	36.22±12.09^{B}	26.54±35.69^{A}

* อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันของไข่ปลาแต่ละกลุ่ม แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) ระหว่างปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและปลาชุดควบคุม

1.2 พัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ในปลาเทพาเพศผู้โดยค่าปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อ

เก็บน้ำเชื้อปลาเทพาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและชุดควบคุมที่ 5 ช่วงเวลา คือ ก่อนฝังฮอร์โมน ณ เดือนมีนาคม และเก็บน้ำเชื้อหลังจากฝังฮอร์โมนนานทุก 1 เดือน (เมษายน–กรกฎาคม) คุณภาพน้ำเชื้อโดยค่าความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ระหว่างปลา 2 ชุดการทดลองในแต่ละเดือน แสดงตาม ตารางที่ 4 ผลการศึกษาแบ่งตามเดือนต่างๆ ดังต่อไปนี้

1.2.1 ก่อนฝังฮอร์โมน (มีนาคม) ปลาสองชุดการทดลองมีความหนาแน่นสเปิร์ม 5.95±0.48×10^{9} และ 6.53±2.17×10^{9} เซลล์/มล. มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว 78.50±2.12 และ 53.33±25.66% และมีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 30.00±1.41 และ 29.67±2.89 วินาที เมื่อวิเคราะห์สถิติพบว่าปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

1.2.2 หลังฝังฮอร์โมนนาน 1 เดือน (เมษายน) ปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 2.62±0.44×10^{9} เซลล์/มล. 53.33±21.28% และ 27.33±4.63 วินาที ตามลำดับ ปลาชุดควบคุมมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 2.72±0.64×10^{9} เซลล์/มล. 50.67±31.10% และ 33.00±3.29 วินาที ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สถิติพบว่าปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว

ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แต่มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยปลาชุดควบคุมมีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูงกว่าปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน

1.2.3 หลังฝังฮอร์โมนนาน 2 เดือน (พฤษภาคม) ปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 7.93±3.98×10^9 เซลล์/มล. 36.40±35.17% และ 26.00±3.81 วินาที ตามลำดับ ปลาชุดควบคุมมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 7.90±2.52×10^9 เซลล์/มล. 64.40±35.17% และ 28.40±3.21 วินาที ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สถิติพบว่าปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

1.2.4 หลังฝังฮอร์โมนนาน 3 เดือน (มิถุนายน) ปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 7.89±3.22×10^9 เซลล์/มล. 75.50±13.70% และ 24.50±3.11 วินาที ตามลำดับ ปลาชุดควบคุมมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 3.95±2.31×10^9 เซลล์/มล. 86.67±14.43% และ 27.00±5.20 วินาที ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สถิติพบว่าปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

1.2.5 หลังฝังฮอร์โมนนาน 4 เดือน (กรกฎาคม) ปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 6.19±4.83×10^9 เซลล์/มล. 28.50±8.81% และ 13.25±1.50 วินาที ตามลำดับ ปลาชุดควบคุมมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 3.51±1.00×10^9 เซลล์/มล. 21.50±7.78% และ 13.50±0.71 วินาที ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์สถิติพบว่าปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4 คุณภาพน้ำเชื้อโดยค่าความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวระหว่างปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมน $LHRH_a$ แบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและปลาชุดควบคุม ตั้งแต่เดือนมีนาคม–กรกฎาคม

เดือน	ชุดการทดลอง	คุณภาพน้ำเชื้อ		
		ความหนาแน่นสเปิร์ม (เซลล์/มล.)	ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (เปอร์เซ็นต์)	ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที)
มีนาคม	ชุดที่ใช้ฮอร์โมนฯ	$5.95\pm0.48\times10^{9A}$	78.50 ± 2.12^{A}	30.00 ± 1.41^{A}
	ชุดควบคุม	$6.53\pm2.17\times10^{9A}$	53.33 ± 25.66^{A}	29.67 ± 2.89^{A}
เมษายน	ชุดที่ใช้ฮอร์โมนฯ	$2.62\pm0.44\times10^{9A}$	53.33 ± 21.28^{A}	27.33 ± 4.63^{B}
	ชุดควบคุม	$2.72\pm0.64\times10^{9A}$	50.67 ± 31.10^{A}	33.00 ± 3.29^{A}
พฤษภาคม	ชุดที่ใช้ฮอร์โมนฯ	$7.93\pm3.98\times10^{9A}$	36.40 ± 35.17^{A}	26.00 ± 3.81^{A}
	ชุดควบคุม	$7.90\pm2.52\times10^{9A}$	64.40 ± 35.17^{A}	28.40 ± 3.21^{A}
มิถุนายน	ชุดที่ใช้ฮอร์โมนฯ	$7.89\pm3.22\times10^{9A}$	75.50 ± 13.70^{A}	24.50 ± 3.11^{A}
	ชุดควบคุม	$3.95\pm2.31\times10^{9A}$	86.67 ± 14.43^{A}	27.00 ± 5.20^{A}
กรกฎาคม	ชุดที่ใช้ฮอร์โมนฯ	$6.19\pm4.83\times10^{9A}$	28.50 ± 8.81^{A}	13.25 ± 1.50^{A}
	ชุดควบคุม	$3.51\pm1.00\times10^{9A}$	21.50 ± 7.78^{A}	13.50 ± 0.71^{A}

* อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันในแต่ละเดือนของคุณภาพน้ำเชื้อแต่ละค่า แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและปลาชุดควบคุม

2. น้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาโดยวิธีแช่แข็ง

เก็บน้ำเชื้อจากปลาเทพา จำนวน 12 ตัว ได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีจากปลาจำนวน 8 ตัว มีปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวเฉลี่ย 86.17±7.35% และ 22.75±1.28 วินาที ตามลำดับ นำน้ำเชื้อรวมไปทดลองแช่แข็งโดยเปรียบเทียบน้ำยา 3 สูตร และอัตราลดอุณหภูมิ 3 อัตรา เก็บรักษาไว้นาน 150 วัน นำออกมาละลายแล้วตรวจสอบปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ได้ผลการทดลองตาม ตารางที่ 5 น้ำเชื้อที่ละลายมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว 26.32±5.23–61.20±3.35% มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 19.33±0.58–24.67±2.08 วินาที

ตารางที่ 5 ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%) และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที) เฉลี่ย ในน้ำเชื้อปลาเทพาที่ละลาย จากการใช้น้ำยา 0.9% NaCl, CF–HBSS และ 5% glucose ที่อัตราลดอุณหภูมิ 1, 5 และ 10 °C/นาที

น้ำยา	อัตราลดอุณหภูมิ (°C/นาที)	ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว (%)	ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว (วินาที)
0.9% NaCl	1	26.32±5.23^{Bb}	22.00±1.73^{Ba}
	5	31.82±3.83^{Ba}	20.00±2.00^{Ba}
	10	32.41±3.53^{Ba}	19.33±0.58^{Ba}
CF–HBSS	1	28.67±7.51^{Bb}	24.33±2.52^{Aa}
	5	30.73±2.23^{Ba}	22.33±1.15^{Aa}
	10	35.73±1.30^{Ba}	21.67±1.15^{Aa}
5% Glucose	1	50.59±5.04^{Ab}	24.67±2.08^{Aa}
	5	57.73±5.68^{Aa}	23.67±1.53^{Aa}
	10	61.20±3.35^{Aa}	24.33±1.53^{Aa}

* อักษรตัวพิมพ์ใหญ่ และเล็ก ที่ต่างกันในแนวตั้งของค่าปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว แสดงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ระหว่างสูตรน้ำยาที่ต่างกัน และอัตราลดอุณหภูมิที่ต่างกัน ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลไปวิเคราะห์ทางสถิติ แยกผลการวิเคราะห์ตามค่าปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ดังต่อไปนี้

ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว

ผลการทดลองแสดงตามตารางที่ 5 จากการวิเคราะห์สถิติพบว่า อิทธิพลจากน้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิที่แตกต่างกัน มีผลต่อปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) แต่อิทธิพลจากปัจจัยร่วมไม่มีผลต่อปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว ($P>0.05$) โดยเฉลี่ยน้ำเชื้อที่ผสมน้ำยา 5% glucose และใช้อัตราลดอุณหภูมิ 5 และ 10 °C/นาที มีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหว 57.73±5.68 และ 61.20±3.35% ตามลำดับ มีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อที่ผสมน้ำยา 0.9% NaCl (26.32–32.41%) และ CF–HBSS (28.67–35.73%)

ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว

ผลการทดลองแสดงตามตารางที่ 5 จากการวิเคราะห์สถิติพบว่า อิทธิพลจากน้ำยาที่แตกต่างกัน มีผลต่อระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) แต่อิทธิพลจากอัตราลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันและจากปัจจัยร่วมไม่มีผลต่อระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว ($P>0.05$) โดยเฉลี่ยน้ำเชื้อที่ผสมน้ำยา CF–HBSS

และ 5% glucose มีระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว 21.67–24.33 และ 23.67–24.67 วินาที ตามลำดับ มีค่าสูงกว่าน้ำยา 0.9% NaCl (19.33–22.00 วินาที)

3. ประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาเทพาโดยวิธีผสมเทียม

เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและชุดควบคุมโดยวิธีแช่แข็ง โดยใช้สูตรน้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิที่ส่งผลให้น้ำเชื้อที่ละลายมีคุณภาพสูงสุด จากการศึกษาในข้อ 2 คือใช้น้ำยา 5% Glucose และอัตราลดอุณหภูมิ 10 °C/นาที เก็บรักษาไว้นาน 365 วัน นำมาละลายแล้วนำไปผสมเทียมกับไข่โดยเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดที่เจือจางด้วยน้ำยาสูตรและอัตราเจือจางเดียวกัน วัดอัตราปฏิสนธิได้ผลการศึกษาตามตารางที่ 6 น้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายของปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานมีอัตราปฏิสนธิ 71.97±11.39% น้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายของปลาชุดควบคุมมีอัตราปฏิสนธิ 71.21±7.10% และน้ำเชื้อสดมีอัตราปฏิสนธิ 82.13±7.05% เมื่อวิเคราะห์สถิติพบว่าปลาทั้ง 3 ชุดการทดลองมีอัตราปฏิสนธิไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 6 อัตราปฏิสนธิของไข่ที่ได้รับการผสมด้วยน้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาละลายของปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและชุดควบคุมและน้ำเชื้อสด

ชุดการทดลอง	อัตราปฏิสนธิ (เปอร์เซ็นต์)
ปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนระบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน	71.97±11.39^{A}
ปลาชุดควบคุม	71.21±7.10^{A}
น้ำเชื้อสด	82.13±7.05^{A}

* อักษรพิมพ์ใหญ่กำกับในแนวตั้งของค่าอัตราปฏิสนธิที่เหมือนกัน ไม่แสดงนัยสำคัญในความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) ระหว่างปลา 3 ชุดการทดลอง

วิจารณ์ผลการศึกษา

1. ศึกษาฮอร์โมน LHRHa แบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ปลาเทพา

ในปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมน $LHRH_a$ แบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน ฮอร์โมนจะค่อยๆ ซึมแพร่ออกผ่านผนังหลอด silicone เข้าสู่กระแสโลหิตทีละน้อยๆ เป็นระยะเวลานาน ส่งผลให้ฮอร์โมนมีการออกฤทธิ์เนิ่นนาน (Okada *et al*., 2005) โดยฮอร์โมน $LHRH_a$ จะไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองสร้างฮอร์โมน gonadotropin ไปกระตุ้นให้รังไข่และอัณฑะพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ จากไข่ในระยะก่อนสะสมไข่แดง (pre–vitellogenic) พัฒนาจนถึงระยะ final maturation ซึ่งไข่จะมีขนาดใหญ่ขึ้น และจากสเปิร์มระยะ spermatogonia จะพัฒนาเข้าสู่ระยะ spermatocyte (คณะทำงานจัดการความรู้สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, 2554) เมื่อเก็บและวิเคราะห์ข้อมูล

พัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ในปลาเทพาที่ระยะเวลาหลังจากฝังฮอร์โมนนาน 30 วัน วิจารณ์ผลการศึกษาโดยแยกเป็นปลาเพศเมียและเพศผู้ดังต่อไปนี้

1.1 ปลาเพศเมีย แม่พันธุ์ปลาเทพาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีพัฒนาการของไข่ ปลาในชุดที่ใช้ฮอร์โมน $LHRH_a$ แบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน และปลาชุดควบคุมมีปริมาณไข่ขนาดเล็กและขนาดปานกลาง (<0.4–0.6 มม. และ 0.7–1.1 มม. ตามลำดับ) ลดลง ขณะที่ไข่ขนาดใหญ่ (1.2–1.6 มม.) มีปริมาณเพิ่มขึ้น และเริ่มมีปริมาณไข่ขนาดใหญ่มาก (≥1.7มม.) ซึ่งเป็นไข่ในระยะปลายที่พร้อมจะนำไปฉีดกระตุ้นฮอร์โมนเพื่อผสมเทียม (ยงยุทธ และคณะ, 2541) โดยรวมแล้วพัฒนาการของไข่ระหว่างปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน และชุดควบคุมไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานมีปริมาณไข่ขนาดใหญ่เฉลี่ย 65.51% ซึ่งสูงกว่าปลาชุดควบคุม (36.22%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สิ่งนี้อาจสะท้อนให้เห็นการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน $LHRH_a$ ที่ออกฤทธิ์แบบเนิ่นนานโดยการแพร่ออกจากหลอดซิลิโคนเข้าสู่กระแสโลหิต ไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองสร้างฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (GtH) ไปกระตุ้นไข่ให้พัฒนาจากระยะต้นซึ่งมีขนาดเล็ก พัฒนาเข้าสู่ระยะสะสมไข่แดง (คณะทำงานจัดการความรู้สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, 2554) ส่งผลให้ไข่เพิ่มขนาดจากขนาดเล็กและปานกลาง พัฒนาเป็นไข่ขนาดใหญ่และขนาดใหญ่มาก ผลที่ได้สอดคล้องกับรายงานของ Morehead *et al.* (1998) ที่ศึกษาผลของฮอร์โมน $LHRH_a$ ในปลา Striped trumpeter (*Latris lineata*) รายงานว่าปลากลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยฮอร์โมน $LHRH_a$ ออกฤทธิ์แบบเนิ่นนาน มีปริมาณไข่ขนาดใหญ่เพิ่มขึ้นมากกว่าปลาชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.2 ปลาเพศผู้ พ่อพันธุ์ปลาเทพาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีพัฒนาการของสเปิร์มโดยความหนาแน่นสเปิร์ม ปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหว หลังจากฝังฮอร์โมนที่ 5 ระยะเวลา โดยรวมแล้วมีค่าปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวในเดือนเมษายน ที่ปลาชุดควบคุมมีค่าสูงกว่าปลาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน ปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองมีความหนาแน่นสเปิร์ม 5.95×10^9–6.53×10^9 เซลล์/มล. ในเดือนมีนาคม และมีค่าลดลง (2.62×10^9–2.72×10^9 เซลล์/มล.) ในเดือนเมษายน และเพิ่มขึ้นเป็น 7.90×10^9–7.93×10^9 เซลล์/มล. ในเดือนพฤษภาคม ซึ่งเป็นช่วงเดือนที่มีการผสมเทียมปลาเทพาจำนวนมากที่สุดของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพิษณุโลก (ยงยุทธ, ติดต่อส่วนตัว) และศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์ (วิศณุพร, ติดต่อส่วนตัว) ผลของฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อพัฒนาการของสเปิร์มจึงไม่เห็นเด่นชัดนักในปลาเทพา สัณนิษฐานว่า เป็นเพราะปลาเทพาเพศผู้เหล่านี้ปรับตัวให้เข้ากับสภาพการเลี้ยงในบ่อซีเมนต์หรืออยู่ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่อยู่แล้ว ส่งผลให้ปลาไม่มีความบกพร่องจากการขาดหรือพร่องของฮอร์โมนที่ควบคุมพัฒนาการของสเปิร์ม จึงทำให้พ่อปลามีน้ำเชื้อเมื่อเข้าฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ข้อสัณนิษฐานนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของ ยงยุทธ และคณะ (2554) ที่รายงานว่าพ่อพันธุ์ปลาเทพาของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพิษณุโลกที่เลี้ยงไว้ในบ่อซีเมนต์ขนาด 70 ตารางเมตร สามารถรีดน้ำเชื้อได้จำนวนร้อยละ 91–100 ในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และในการศึกษาครั้งนี้ก็สามารถรีดน้ำเชื้อจากปลาเพศผู้ทั้ง 2 ชุดการทดลองได้หมดทุกตัวในช่วงเดือนพฤษภาคมและมิถุนายน (ภาพผนวก)

นอกจากนี้ ฮอร์โมน $LHRH_a$ ที่ใช้อาจไม่ส่งผลต่อพัฒนาการของสเปิร์มโดยตรง ฮอร์โมนที่กระตุ้นพัฒนาการของสเปิร์มโดยตรงควรจะเป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์เช่น testosterone เป็นต้น (คณะทำงานจัดการความรู้สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, 2554)

2. น้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาโดยวิธีแช่แข็ง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า น้ำเชื้อปลาเทพาที่ผสมน้ำยา 5% glucose และใช้อัตราลดอุณหภูมิ 5 และ 10 °C/นาที มีผลให้น้ำเชื้อที่ละลายมีปริมาณและระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนไหวสูงกว่าน้ำยา 0.9% NaCl และ CF–HBSS ผลที่ได้สอดคล้องกับปลาในกลุ่มเดียวกันคือปลาบึก (*Pangasianodon gigas*) ที่แช่แข็งน้ำเชื้อโดยใช้น้ำยา 5% glucose และใช้อัตราลดอุณหภูมิ 4.62–12.06 °C/นาที (พลชาติ และคณะ, 2551) ซึ่งเป็นน้ำยาสูตรเดียวกันและใช้อัตราลดอุณหภูมิที่อยู่ในช่วงใกล้เคียงกับการทดลองครั้งนี้ ซึ่งพบว่าให้ผลดีกว่าน้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิสูตรและอัตราอื่นๆ ที่เปรียบเทียบ อย่างไรก็ตาม ผลที่ได้แตกต่างจากรายงานของ Monkonpunya *et al*. (2000) ที่ทดลองในปลาบึก และ อนงคณ์ (2539) ที่ทำในปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ซึ่งใช้น้ำยา 0.85% NaCl และ CF–HBSS และใช้ DMSO เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้งนี้สันนิษฐานว่าองค์ประกอบที่ใช้แช่แข็งน้ำเชื้อเช่นการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (programmable freezer) และหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่แตกต่างไปจากการทดลองครั้งนี้ ซึ่งใช้เมธานอลเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ ใช้วิธีลดอุณหภูมิด้วยไอไนโตรเจนเหลว และใช้หลอดแบบ straw บรรจุสารละลายน้ำเชื้อ ปัจจัยเหล่านี้จะมีผลอย่างยิ่งต่อการเลือกใช้น้ำยาและอัตราลดอุณหภูมิ และการแช่แข็งน้ำเชื้อให้ประสบผลสำเร็จ (Leibo, 2000) จะเห็นได้ว่าน้ำยา 5% glucose มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบเพียงอย่างเดียว เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 5% จะมีระดับออสโมลาริตี อยู่ในระดับที่สูงกว่าระดับออสโมลาริตีของ seminal plasma ของปลาเทพา จึงทำให้สเปิร์มปลาเทพาอยู่ในสถานะไม่เคลื่อนไหว นอกจากนี้ ในการแช่แข็งน้ำเชื้อนั้น glucose ถือเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์แบบออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Leung, 1991) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่า glucose จะไปช่วยเสริมฤทธิ์ปกป้องสเปิร์มร่วมกับเมธานอล (cryoprotectant synergism) ที่เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์แบบออกฤทธิ์ภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำเชื้อที่ละลายมีปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวมากกว่าน้ำยา 0.9% NaCl และ CF–HBSS การเสริมฤทธิ์ระหว่างโครโอโพรเทคแทนท์ 2 ประเภทนั้น มีรายงานไว้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากลุ่มปลานิล (*Sarotherodon mossambicus*) (Harvey, 1983) ด้วยเช่นกัน นอกจากนี้ น้ำยา 5% glucose และการใช้อัตราลดอุณหภูมิ 5 และ 10 °C/นาที นั้นมีรายงานว่าเป็นองค์ประกอบที่เหมาะสมสำหรับแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกยักษ์ (*Clarias gariepinus*) (Steyn *et al*., 1985) ผลจากการทดลองครั้งนี้สรุปได้ว่า องค์ประกอบที่เหมาะสมสำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเทพาโดยวิธีใช้ไอไนโตรเจนเหลวคือ ใช้น้ำยา 5% glucose เป็นน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ ใช้เมธานอลเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ผสมลงในสารละลายน้ำเชื้อให้มีความเข้มข้น 10% และลดอุณหภูมิในอัตรา 5 และ 10 °C/นาที

3. ทดสอบประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งในการผสมเทียม

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อปลาเทพาชุดที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน และปลาชุดควบคุม ที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งนาน 365 วัน ให้อัตราปฏิสนธิ 71.97% และ 71.21% ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ และยังไม่แตกต่างไปจากน้ำเชื้อสดที่มีอัตราปฏิสนธิ 82.13% น้ำเชื้อปลาเทพาที่เก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งเป็นระยะเวลา 365 วัน เมื่อนำมาละลาย แม้ว่าจะมีคุณภาพน้ำเชื้อโดยค่าปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวอยู่ในช่วง 80–90 % ลดลงเหลือประมาณ 60% แต่เมื่อนำมาผสมเทียม พบว่าน้ำเชื้อแช่แข็งทั้งจากปลากลุ่มที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและปลาชุดควบคุม ให้อัตราปฏิสนธิไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด ผลที่ได้บ่งบอกว่าฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานไม่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาเทพา ซึ่งเป็นผลมาจากพ่อพันธุ์ปลาเทพาเหล่านี้จะมีพัฒนาการของสเปิร์มเมื่อเข้าฤดูผสมพันธุ์วางไข่โดยไม่ต้องกระตุ้นด้วยฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานอยู่แล้ว ตามที่วิจารณ์ไว้ในข้อ 1.2 คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งจากปลาทั้ง 2 ชุดการทดลองที่ไม่แตกต่างกันนี้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาของ พลชาติ และคณะ (2552) ที่ใช้ฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานในปลากดแก้ว (*Hemibagrus wyckioides*) ซึ่งรายงานว่าน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาชุดที่ฝังฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานและปลาชุดควบคุม ให้อัตราปฏิสนธิไม่แตกต่างกัน

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาฮอร์โมนชนิดอื่นๆ ที่กระตุ้นพัฒนาการของไข่และสเปิร์มโดยตรง ได้แก่ ฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน และฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ชนิดต่างๆ ทำเป็นฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนาน ซึ่งอาจทำให้เซลล์สืบพันธุ์มีพัฒนาการสูงขึ้นกว่าเดิม

2. ควรมีการศึกษาอัตราส่วนระหว่างสเปิร์มและไข่ของน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็งที่เหมาะสมสำหรับผสมเทียมปลาเทพา

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ดำเนินการภายใต้งบประมาณของกรมประมง ในส่วนกิจกรรมพัฒนาการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ รหัสทะเบียนวิจัยเลขที่ 53–0600–53007 และขอขอบคุณผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำอุตรดิตถ์ สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดพิษณุโลก ที่อนุญาตให้ใช้พ่อแม่พันธุ์ปลาเทพาในการวิจัย สุดท้ายขอขอบคุณคณะกรรมการวิชาการของสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ ที่กรุณาตรวจแก้ไขต้นฉบับ

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 127 หน้า.

คณะทำงานจัดการความรู้สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ. 2554. ระบบสืบพันธุ์และเทคนิคการใช้ฮอร์โมนในการเพาะพันธุ์ปลา **ใน** การจัดการความรู้ เรื่อง "การพัฒนาโครงการวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ" ประจำปีงบประมาณ 2554. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง. น. 37–51.

พลชาติ ผิวเณร, พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข และศรีรัตน์ สอดศุข. 2551. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกโดยวิธีแช่แข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2551. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง. 34 น.

พลชาติ ผิวเณร, พนม กระจ่างพจน์ สอดศุข, วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์ และทองอยู่ อุดเลิศ. 2552. ผลของฮอร์โมนแบบออกฤทธิ์เนิ่นนานต่อปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อปลากดแก้วทั้งในรูปน้ำเชื้อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 5/2552. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง. 11 น.

ยงยุทธ อุนากรสวัสดิ์, ประชิด ตรีพลอักษร และเพ็ญสุดา ยศแผ่น.2541. การเพาะและอนุบาลปลาเทพา. เอกสารวิชาการฉบับที่ 9/2541. สถานีประมงน้ำจืดพะเยา, กองประมงน้ำจืด, กรมประมง. 46 น.

ยงยุทธ อุนากรสวัสดิ์, สุภาพร มหันต์กิจ และเมธา คชาภิชาติ. 2554. การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาเทพาในบ่อซีเมนต์ด้วยความหนาแน่นต่างกัน **ใน** รายงานการประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2554, กรมประมง. น. 114–128.

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์. 2550. การเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน. **ใน** บทคัดย่อรายงานการประชุมวิชาการประมง ครั้งที่ 2 เพื่อความมั่นคงด้านการประมงและทรัพยากรน้ำ. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ, มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์. 2551. ผลของฮอร์โมนและสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินต่อพัฒนาการของรังไข่ปลากดแก้ว. **ใน** บทคัดย่อรายงานการประชุมวิชาการประมง ครั้งที่ 3 เพื่อความมั่นคงด้านการประมงและทรัพยากรน้ำ. คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ, มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.

อนงคณ์ หัมพานนท์. 2539. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีแช่แข็ง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 251 หน้า.

อนันต์ชัย เชื่อนธรรม. 2539. หลักการวางแผนการทดลอง. ภาควิชาสถิติ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 348 หน้า.

Harvey, B. 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon mossambicus* spermatozoa. Aquaculture 32: 313–320.

Jenkins, A., F. F. Kullander and H. H. Tan. 2009. *Pangasius sanitwongsei*. In: IUCN 2012. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2012.2.

Leibo, S.P. 2000. Sources of variation in cryopreservation. **In:** Tiersch, T.R. and P.M. Mazik (eds.). Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisianna, U.S.A. p. 75–83.

Leung, L. K. P. 1991. Principles of biological cryopreservation. **In:** Jamieson (ed.). Fish Evolution and Systematic : Evidence from Spermatozoa. Cambridge Univ. Press, Cambridge. p. 231–244.

Mekong River Commission. 2011. Key Mekong fish species – migration paths. http://www.mrcmekong.org/programmes/fisheries/mig_pangasius_s.htm.

Mongkonpunya, K., T. Pupipat and T. R. Tiersch. 2000. Cryopreservation of sperm of Asian Catfishes including the endangered Mekong giant catfish. **In**: Tiersch, T. R. and P. M. Mazik (eds.) Cryopreservation in Aquatic Species. World Aquaculture Society. Baton Rouge, Louisianna, U.S.A. p.108–116.

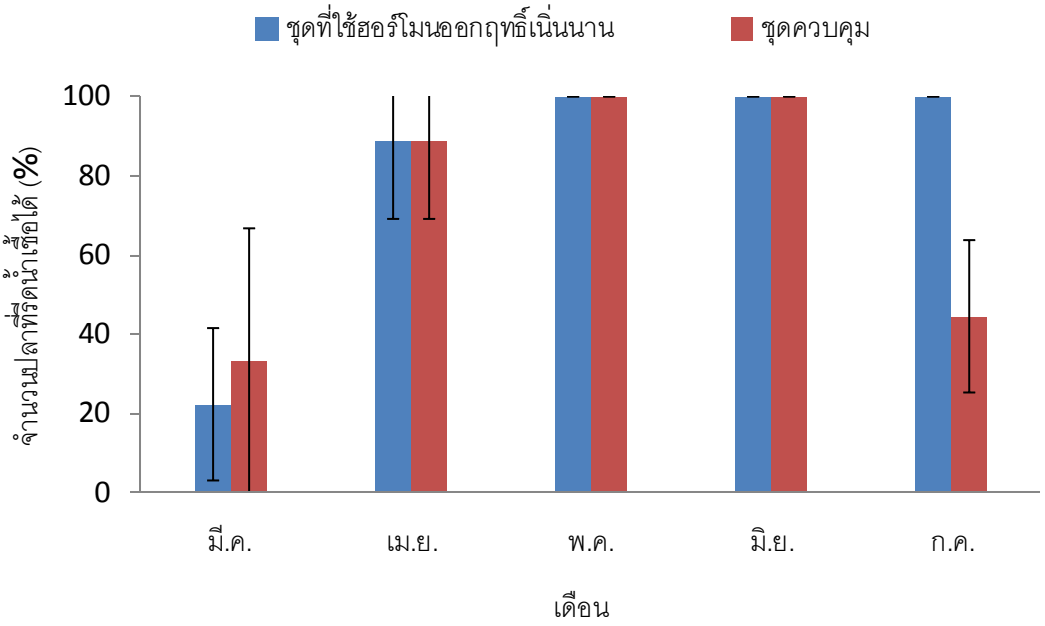
Morehead, D. T., N. W. Pankhurst and A. J. Ritar. 1998. Effect of treatment with LHRH analogue on oocyte maturation, plasma sex steroid levels and egg production in female striped trumpeter *Latris lineata* (Latrididae). Aquaculture 169: 315–331.

Okada, A., Y. Niwa, T. Katase and O. Kai. 2005. Controlled release of estradiol–17β and bisphenol A from a silicone tube for long–term administration in mice. Anim. Sci. 76: 535–539.

Rottmann, R. W., J. V. Shireman and F. A. Chapman. 1991. Determining sexual maturity of brood stock for induced spawning of fish. SRAC Publication 423: 1–4.

Steyn, G. J., J. H. J. Van Vuren, H. J. Schoonbee and N. H. Chao. 1985. Preliminary investigations on the cryopreservation of *Clarias gariepinus* (Clariidae: pisces) sperm. Water S.A. 11: 15–18.

ภาคผนวก



<u>ภาพผนวก 1</u> จำนวนปลาเทพาที่รีดน้ำเชื้อได้ (%) เดือนมีนาคม–กรกฎาคม