

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาอีสกเทศเป็นปลาที่ค่อนข้างหาได้ยากในปัจจุบัน เมื่อเปรียบเทียบกับปลาน้ำจืดด้วยกันแล้วนับว่ามีราคาสูง ทั้งนี้สามารถนำส่วนประกอบต่าง ๆ ของปลามาใช้ประโยชน์ได้ อาทิ เนื้อ หนัง เกล็ด เมื่อนำปลาอีสกเทศมาประกอบอาหารพบว่า มีรสชาติอร่อย และนิยมนำมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงาม (อดุลย์ พงศ์สุวรรณ, 2532) ปลาอีสกเทศเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่ง ซึ่งพบในประเทศไทยที่ แม่น้ำโขง แม่น้ำน่าน แม่น้ำแควที่จังหวัดกาญจนบุรี และแม่น้ำแม่กลองที่จังหวัดราชบุรี แต่เดิมนี้อาอีสกเทศตามแหล่งน้ำธรรมชาติมีน้อย (เพ็ญ แซ่โล้ว, มปป).

อย่างไรก็ตามในภาวะการณ์ปัจจุบันสัตว์น้ำโดยเฉพาะปลาหลายชนิดเริ่มสูญพันธุ์จากสภาพแวดล้อม โดยการตื้นเขินของแหล่งน้ำ และแหล่งต้นน้ำลำธารถูกทำลาย อีกทั้งปลาบางชนิดไม่สามารถที่จะเพาะพันธุ์ได้นอกฤดูกาล (เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, 2546) จึงทำให้มีการเพาะเลี้ยงปลากันมากขึ้นเพื่อบริโภคและการอนุรักษ์พันธุ์ปลา ซึ่งในกรณีของปลาอีสกเทศก็เช่นเดียวกัน คือ ต้องมีการเพาะเลี้ยงหรือพัฒนาวิธีการขยายพันธุ์ปลาอีสกเทศให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งเป็นวิธีการหนึ่งที่จะช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ เช่น การที่ปลาอีสกเทศเพศผู้และเพศเมียมีช่วงเวลาสมบูรณเพศไม่พร้อมกัน และพ่อพันธุ์ปลาอีสกเทศมีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพและปริมาณต่ำลงในช่วงฤดูกลาง ซึ่งถ้าได้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาอีสกเทศเหล่านั้นไว้ในขณะที่พ่อพันธุ์มีน้ำเชื้อมากก็สามารถนำมาผสมเทียมกับแม่พันธุ์ปลาเมื่อมีความพร้อม ทำให้การจัดการเพาะพันธุ์ปลาอีสกเทศมีความสะดวกและผลิตลูกพันธุ์ปลาได้ตามที่ต้องการ นอกจากนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งยังมีประโยชน์สามารถนำมาใช้ปรับปรุงสายพันธุ์สัตว์น้ำให้ได้ลูกปลาที่โตเร็ว แข็งแรง ต้านทานโรคได้ดี ช่วยลดการสูญเสียน้ำเชื้อโดยเปล่าประโยชน์ และยังสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่หาได้ยากหรือใกล้สูญพันธุ์ไว้ได้หลายปี

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา มี 2 แบบ คือการเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส และเก็บรักษาในระยะเวลายาวโดยการแช่แข็งน้ำเชื้อไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไว้ได้นานเป็นปี จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการเพาะขยายพันธุ์ และการปรับปรุงพันธุ์โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้ต้องมีการเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์และไครโอโพรเทคแทนท์ ซึ่งบัฟเฟอร์ประกอบด้วยออสโมไลต์ต่าง ๆ ซึ่งเป็นสารอาหารให้แก่เซลล์ องค์ประกอบทางเคมีและค่าออสโมลาลิตีของสารละลายบัฟเฟอร์ควรมี

คุณสมบัติของใกล้เคียงกับของเหลวในเลือดปลา (seminal plasma) และสารไครโอโพรเทคแทนท์ เป็นสารที่มีความสำคัญในการป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (ice crystal) ในระหว่างการแช่แข็ง ซึ่งสารไครโอโพรเทคแทนท์สามารถแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดที่ 1 ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ ซึ่งช่วยลดอันตรายที่จะเกิดกับเซลล์และป้องกันเซลล์ภายในถูกทำลายโดยผลึกน้ำแข็ง ชนิดที่ 2 ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ สามารถช่วยรักษาสภาพของเซลล์ภายนอกให้คงอยู่ได้ภายหลังการแช่แข็ง โดยการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์เหล่านี้ ต้องใช้ในระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเซลล์ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ด้วยเหตุที่การเพาะขยายพันธุ์ปลายี่สกเทศในปัจจุบันยังคงมีปัญหาของการขาดแคลนน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีของพ่อพันธุ์ในบางช่วงของฤดูการเพาะพันธุ์ และยังไม่มียางานการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศในประเทศไทย ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศโดยทำการทดสอบสูตรที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อ และศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ เพื่อสามารถพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศที่เหมาะสม เพื่อประโยชน์ในการอนุรักษ์พันธุ์และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลายี่สกเทศในสารละลายกลุ่มมีประจุ (ionic solution) และในสารละลายกลุ่มไม่มีประจุ (non-ion solution) ที่มีระดับความเข้มข้นของสารละลายที่แตกต่างกัน
2. ศึกษาสูตรที่เหมาะสมของสารละลายบัฟเฟอร์ (extender) ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกเทศแบบแช่แข็ง
3. ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ
4. ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ
5. ศึกษาการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่าย

สมมติฐานของการวิจัย

1. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไข่สกเทศถูกควบคุมด้วยค่าออสโมลาริตี
2. ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไข่สกเทศแบบแช่แข็งมีผลต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไข่สกเทศ
3. ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายแตกต่างกัน
4. อัตราการลดอุณหภูมิในกระบวนการแช่แข็งมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไข่สกเทศหลังการละลายที่แตกต่างกัน
5. การแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่ายในกล่องโฟม สามารถแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างมีคุณภาพได้

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

1. ทราบถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไข่สกเทศ
2. ทราบถึงชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่ใช้ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไข่สกเทศ
3. ทราบถึงอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไข่สกเทศ
4. สามารถนำน้ำเชื้อปลาไข่สกเทศแช่แข็งมาใช้ในการผสมเทียมและสามารถประยุกต์ใช้เป็นแนวทางในการอนุรักษ์และฟื้นฟูสายพันธุ์สัตว์น้ำที่ใกล้สูญพันธุ์ต่อไป
5. สามารถนำเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไข่สกเทศอย่างง่าย ไปถ่ายทอดให้ผู้ประกอบการต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตในงานวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาระดับการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาไข่สกเทศในสารละลายสูตรมีประจุ และในน้ำยาสูตร ไม่มีประจุ ที่มีระดับออสโมลาริตีแตกต่างกัน ศึกษาชนิดของสูตรสารละลายบัฟเฟอร์ ที่เหมาะสมที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไข่สกเทศแบบแช่แข็ง ศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ที่เหมาะสมที่จะใช้ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไข่สกเทศ ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อ และศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไข่สกเทศในกล่องโฟม โดยประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งในรูปแบบของการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) และการมีชีวิตของสเปิร์ม (sperm viability)

ข้อจำกัดของการวิจัย

คุณภาพของน้ำเชื้อปลาที่สภทศในแต่ละครั้งมีความแตกต่างกันไปตามช่วงฤดูผสมพันธุ์ วางไข่ เช่น ช่วง ต้นฤดู กลางฤดู และปลายฤดู ซึ่งเป็นปัจจัยที่ไม่สามารถควบคุมได้ ทำให้ผลการทดลองมีความแปรปรวนไปตามความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามการทดลองนี้จะมีการลดความแปรปรวน โดยการใช้ น้ำเชื้อจากปลาหลายตัวรวมกัน (pooled milt) มาใช้ในการทดลอง

นิยามศัพท์เฉพาะ

1. cryopreservation : การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ได้แก่ การเก็บรักษาเซลล์ไข่ น้ำเชื้อตัวผู้ ตัวอ่อน หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิตโดยผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส
2. cryoprotectant : สารที่ป้องกันมิให้เซลล์เป็นอันตรายในกระบวนการแช่แข็ง
3. extender : สารละลายบัฟเฟอร์เจือจางน้ำเชื้อเพื่อการเก็บรักษาแบบแช่เย็นหรือแช่แข็ง
4. equilibration time : หมายถึง ช่วงระยะเวลาที่ได้ cryoprotectant รวมเข้ากับน้ำเชื้อก่อนจะเริ่มการแช่แข็งเพื่อให้ น้ำเชื้อปรับตัวให้อยู่ในสภาวะสมดุลก่อนเริ่มการลดอุณหภูมิ เพื่อแช่แข็ง
5. freezing : การลดอุณหภูมิในการแช่แข็ง
6. thawing : การเพิ่มอุณหภูมิหรือการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง