บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) เป็นปลาน้ำจืดพื้นเมืองของไทยที่พบทั่วไปการเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวเริ่มตั้งแต่ก่อนปี พ.ศ. 2503 เป็นต้นมา ปลาตะเพียนขาวนี้เป็นปลาที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนต่อสภาพแวดล้อม กินอาหารได้เกือบทุกชนิด และเจริญเติบโตได้ดีในแหล่งน้ำธรรมชาติ แพร่พันธุ์ง่าย เนื่องจากเป็นปลากินพืชจึงใช้เป็นปลากำจัดวัชพืชในแหล่งน้ำได้อีกด้วย นอกจากนี้ปลาตะเพียนขาวยังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยมี ผลผลิตทั้งหมดรวมจับจากธรรมชาติในปี 2546 มีปริมาณ 88,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 2,735.6 ล้านบาท อย่างไรก็ตามในปี 2550 ผลิตได้ลดลงเหลือ 70,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 2,034.6 ล้านบาท (กรมประมง, 2550) การลดลงของปริมาณการจับนี้สาเหตุเกิดจากแหล่งน้ำธรรมชาติในปัจจุบันได้เปลี่ยนแปลงสภาพไปทั้งคุณภาพน้ำที่ต่ำลง และปัจจัยสภาพแวดล้อมที่มาเกี่ยวข้องเช่น สภาพอากาศที่เปลี่ยนแปลงเร็ว แหล่งอาหารของปลาที่ลดน้อยลง ทำให้ปริมาณปลาตะเพียนขาวในแหล่งน้ำต่างๆในประเทศลดลง และไม่สามารถเพิ่มปริมาณให้มีมากได้เพียงพอแก่ความต้องการของผู้บริโภคเหมือนเช่นอดีตได้ บทบาทของการเพาะเลี้ยงปลาตะเพียนขาวนี้จึงทวีความสำคัญมากขึ้นในเชิงพาณิชย์ ทั้งนี้เพื่อทดแทนผลผลิตจากแหล่งน้ำธรรมชาติที่ลดน้อยลง โดยใช้วิธีการผลิตจากแหล่งต้นน้ำ (ลูกพันธุ์) แต่ในการผลิตลูกพันธุ์นั้นได้ประสบปัญหามากด้วยเช่นกัน (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ปัญหาหนึ่งที่มักเกิดขึ้นอยู่เสมอในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาก็คือ พ่อแม่พันธุ์ปลาที่ใช้เพาะพันธุ์มีความสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในโรงเพาะฟัก ซึ่งในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (spawning season) พ่อพันธุ์มีปริมาณน้ำเชื้อลดลง แม้ว่าจะสามารถกระตุ้นได้โดยการฉีดฮอร์โมนให้ปลาสร้างน้ำเชื้อแต่กลับพบว่าแม่พันธุ์มีไข่แก่น้อยมาก ทำให้การเพาะพันธุ์ไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร เพราะในช่วงระยะเวลาที่พ่อพันธุ์สมบูรณ์เพศมักจะเกิดก่อน แต่เกิดยาวนานกว่าช่วงเวลาที่แม่พันธุ์สมบูรณ์เพศ นอกจากนี้ในบางครั้งช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ (sperm availability) ก็ไม่สัมพันธ์กับช่วงเวลาที่แม่พันธุ์ตกไข่ (egg availability) ซึ่งอาจเกิดจากพ่อพันธุ์ถูกรีดน้ำเชื้อบ่อยครั้งจนไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อได้ทัน อีกทั้งการใช้น้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาใหม่ๆเพื่อการผสมพันธุ์นั้นจะต้องใช้ผสมเทียมทันทีไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นาน เพราะคุณภาพน้ำเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้การผสมพันธุ์ไม่

ประสบผลสำเร็จดังนั้นการเพาะพันธุ์ปลาโดยการผสมเทียมจำเป็นต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อให้มีน้ำเชื้อพร้อมอยู่ตลอดเวลาเพื่อการผสมเทียม และสามารถใช้ได้สะดวกรวดเร็วตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ซึ่งอยู่ในช่วงฤดูฝน (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2548)

การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งเป็นวิธีหนึ่ง ที่จะช่วยพัฒนาและมีบทบาทที่สำคัญต่อการเพาะขยายพันธุ์ โดยการนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาเก็บรักษาไว้ระยะหนึ่งก่อนการเพาะพันธุ์

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาทั่วไปมี 2 แบบคือ

<u>แบบที่ 1.</u> การเก็บรักษาในระยะเวลาสั้นแบบแช่เย็น (chilled storage) ซึ่งเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในอุณหภูมิ 0-4°C แต่การเก็บรักษาแบบนี้เป็นการเก็บรักษาในระยะเวลาที่สั้น ๆ

<u>แบบที่ 2.</u> การเก็บรักษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะยาว (cryopreservation) คือ การแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน (เชาวลิตร สุวรรณมณี, 2548)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งมีวิธีการทำโดยการนำเอาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็ง (cryoprotectant) แล้วจึงนำไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) ภายหลังจากการแช่แข็ง แล้วทำการละลายน้ำเชื้อเพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสามารถทำได้ 4 วิธีคือ 1. ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น 2. การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 3. การย้อมดูตัวเป็นตัวตาย 4. ประเมินความสามารถของน้ำเชื้อในการผสมกับไข่ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งเป็นวิธีที่เหมาะสมสามารถรักษาคุณภาพน้ำเชื้อ นำไปประยุกต์ใช้แทนการใช้น้ำเชื้อสดในการผสมเทียมเพื่อผลิตลูกพันธุ์ปลาและยังช่วยแก้ปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อจาก พ่อพันธุ์ปลาได้ และเป็นแนวทางที่นำมาใช้กับปลาบางชนิดที่ไม่สามารถเพาะขยายพันธุ์ได้ในช่วงนอกฤดูกาลผสมพันธุ์ หรือบางปลาชนิดที่เพาะขยายพันธุ์แล้วจำเป็นต้องฆ่าพ่อพันธุ์ปลาเพื่อนำน้ำเชื้อมาใช้ บางครั้งน้ำเชื้อเหลือ การเก็บน้ำเชื้อแบบแช่แข็งสามารถช่วยแก้ปัญหานี้ได้ อีกทั้งยังเป็นการช่วยอนุรักษ์น้ำเชื้อในสายพันธุ์ปลาที่หายากหรือใกล้สูญพันธุ์ โดยสามารถช่วยเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา (ธนาคารอสุจิ) เพื่อเป็นประโยชน์ในการเพาะขยายพันธุ์ปลา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

อย่างไรก็ตาม ถึงแม้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีการศึกษากันมาก เช่น การประยุกต์ใช้เทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยแบบแช่แข็งเพื่อการเพาะขยายพันธุ์ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และมานพ กาญจนบุรางกรู, 2547) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็ง (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลโดยวิธีการแช่แข็ง (พลชาติ ผิวเณร, คงภพ อำพลศักดิ์, ถาวร จีนหมิก และชมพูนุช มรรคทรัพย์, 2550) ซึ่งงานวิจัยเหล่านี้ สามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวได้ แต่ยังขาดข้อมูลในเรื่องการพัฒนาเพิ่ม

ประสิทธิภาพการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในเชิงพาณิชย์ จึงได้มีความสนใจในการพัฒนางานวิจัยการพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวเพื่อเป็นการต่อยอดงานวิจัยที่ศึกษามาก่อนเหล่านั้นให้เข้าไปสู่ระดับการใช้งานภาค การผลิตเชิงพาณิชย์ เป็นการสร้างมูลค่าให้กับปลาตะเพียนขาวด้านการค้าในประเทศ โดยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อในภาชนะจากเดิมที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลา ขนาด 0.25 ml ซึ่งเป็นขนาดมาตรฐานในการเก็บน้ำเชื้อปลาทั่วไปเปลี่ยนมาเป็นการแช่แข็งในหลอด cryovial ขนาด 1.5 ml เพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีปริมาณที่มากขึ้น

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่
2. เพื่อศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว
3. เพื่อศึกษาผลของชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม เพื่อใช้ในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว
4. เพื่อศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลายที่ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม
5. เพื่อศึกษาผลจากขนาดหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่มีขนาดต่างกันคือ 0.25, 0.5, 1.5 ml ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งให้ได้ปริมาณมากที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม
6. เพื่อศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย โดยเก็บน้ำเชื้อในในโตรเจนเหลว (-196°C) นาน 3 เดือน

สมมติฐานของการศึกษา

1. คุณภาพของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่
2. แรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว
3. ชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้คือ DMSO, Methanol และ Ethylene glycol ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีผลต่อการเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. ขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อต่างกันที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งให้ได้ปริมาณมาก มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่แตกต่างกัน
5. อัตราการลดอุณหภูมิและอัตราการละลายที่แตกต่างกัน มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายต่างกัน
6. ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวโดยเก็บน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลว (-196°C) นาน 3 เดือน ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบข้อมูลพื้นฐานของคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และผลของแรงดันออสโมติกที่ผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม
2. ทราบรูปแบบการแช่แข็งที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว
3. ทำให้ทราบขนาดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อที่มีขนาดตั้งแต่ 0.25, 0.5 และ 1.5 ml ว่าขนาดที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในปริมาณที่มากขึ้น เพื่อเป็นประโยชน์ต่อธุรกิจ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในเชิงพาณิชย์
4. สามารถนำความรู้ที่ได้นี้นำไปใช้ประยุกต์ใช้กับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเศรษฐกิจชนิดอื่น ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

ขอบเขตของการวิจัย

การศึกษาน้ำเชื้อแช่แข็งครั้งนี้จะศึกษาเฉพาะคุณภาพของน้ำเชื้อทางกายภาพ การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และการย้อมสีดูตัวเป็นตัวตาย ซึ่งจะเน้นศึกษาในด้านการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดขนาดใหญ่ ให้ได้ปริมาณที่มากขึ้น เพื่อเป็นประโยชน์ต่อธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในเชิงพาณิชย์

นิยามศัพท์

การแช่แข็ง คือ การลดอุณหภูมิลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของของเหลวที่อยู่รอบเซลล์ และภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำในสภาพที่เป็นของเหลวกลายเป็นเกล็ดน้ำแข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็งหมายถึง การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาซึ่งประกอบด้วยตัวเชื้อหรือสเปิร์มกับน้ำหล่อเลี้ยงตัวเชื้อหรือ Seminal plasma ในระยะยาวไว้ที่สภาพอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งซึ่งจะเก็บแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ซึ่งมีอุณหภูมิ -196°C

Sperm extender คือ สารละลายของเกลือที่ใช้ในการเตรียมน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งซึ่งในบางครั้งมีสารอินทรีย์รวมอยู่ด้วย ช่วยในการเก็บรักษาเซลล์ให้มีชีวิตรอดระหว่างการลดอุณหภูมิ และยังเป็นสารอาหารให้กับเซลล์ ส่วนมาก extender จะมีค่า osmolality ใกล้เคียงกับ seminal fluid ของสัตว์นั้นจึงทำให้สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่ เมื่อผสมอยู่กับ Sperm extender

Cryoprotectant คือ สารเคมีที่ช่วยป้องกันความเสียหายให้กับเซลล์ระหว่างการลดอุณหภูมิ ป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งทั้งภายใน และนอกเซลล์ ป้องกันการเสียหายเกิดจากที่การเสียสมดุลของเกลือแร่ ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดในกระบวนการแช่แข็ง

Cryopreservation คือ การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั้งพืช และสัตว์ ได้แก่ การเก็บรักษาน้ำเชื้อตัวผู้ เซลล์ไข่ ตัวอ่อน หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิตโดยผ่านกระบวนการแช่แข็งแล้วนำไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C

Freezing คือ การลดอุณหภูมิเพื่อทำให้ของเหลวที่อยู่รอบๆ เซลล์และภายในเซลล์ค่อย ๆ แข็งตัว ในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิ อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมจะทำให้ดึงน้ำออกจากเซลล์อย่างต่อเนื่องป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์

Thawing คือ การละลายเซลล์ที่แข็งตัวโดยการเพิ่มอุณหภูมิก่อนนำไปใช้ ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิไม่เหมาะสมอาจทำให้เซลล์ปรับสภาพไม่ทัน ทำให้เซลล์แตกทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อไม่ประสบผลสำเร็จ

Equilibration time คือ ระยะเวลาที่เหมาะสมให้เซลล์ปรับตัวเข้ากับสารละลาย Cryoprotectant ก่อนเริ่มทำการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็ง

หลอดฟาง คือ หลอดที่ใช้เก็บน้ำเชื้อในการแช่แข็ง เริ่มใช้ครั้งแรกประเทศฝรั่งเศส ลักษณะคล้ายหลอดกาแฟ สำหรับใส่สารละลายน้ำเชื้อ ตัวหลอดทำด้วยพลาสติกชนิดทนอุณหภูมิต่ำ

เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Programmable freezer) คือเครื่องมือลดอุณหภูมิในการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ใช้คอมพิวเตอร์หรือโปรเซสเซอร์เป็นตัวควบคุมการจ่ายไอไนโตเจนเหลวจากถังเก็บเข้าสู่ช่องใส่ตัวอย่าง (chamber) สามารถตั้งอัตราลดอุณหภูมิได้จากคอมพิวเตอร์หรือ ส่วนควบคุมการลดอุณหภูมิได้โดยตรง และมีความแม่นยำสูง

Osmolality คือ ปริมาณของตัวถูกละลาย (solute) ที่มีในตัวทำละลาย (solvent)