ศึกษาสูตรน้ำยาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำแบบระยะสั้นในตู้เย็น

Study of Different Extenders for Short-term Chill Storage of Greenback Mullet (*Liza subviridis* Valenciennes, 1836) Semen

ณิศา มาชู
โปรแกรมวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ปลากระบอกดำเป็นปลาน้ำกร่อยชนิดหนึ่งมีความชุกชุมในทะเลสาบสงขลา นับเป็นปลาที่ทำรายได้ให้แก่ผู้ประกอบอาชีพทำการประมงพื้นบ้าน เนื่องจากมีรสชาติดี นิยมบริโภคกันทั่วไป มีราคาแพง ปัจจุบันปลาที่บริโภคได้จากการจับในธรรมชาติ ซึ่งนับว่าจะลดน้อยลงเรื่อยๆ จึงมีการเพาะขยายพันธุ์ปลากระบอกดำ แต่ยังไม่แพร่หลาย เพราะการเพาะพันธุ์จะทำได้ยาก เนื่องจากประสบปัญหาหลายประการ เช่น พ่อแม่พันธุ์ปลาที่สมบูรณ์เพศจมีน้อย จับได้เฉพาะบางช่วง หรือเมื่อจับมาแล้วบางครั้งได้เฉพาะปลาเพศเมีย ทั้งนี้เนื่องจากในธรรมชาติปลาเพศผู้มีจำนวนน้อยกว่าเพศเมีย (อังสุนีย์, 2537) อีกทั้งปลาที่รวบรวมได้จากแหล่งน้ำธรรมชาติส่วนใหญ่ปลาเพศผู้มีน้ำเชื้อน้อย (นิเวศน์ และคณะ, 2536) จึงมีการกระตุ้นให้ปลากระบอกดำเพศผู้สร้างน้ำเชื้อ โดยกินอาหารผสมฮอร์โมน17αmethyltestosterone (MT) (อดุลย์ และคณะ, 2545) ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำที่ได้มาจากธรรมชาติ ช่วยให้อสุจิปลามีชีวิตยาวนานขึ้นจึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้การเพาะพันธุ์ปลากระบอกดำประสบความสำเร็จได้

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อยืดระยะเวลาในการมีชีวิตของอสุจิปลาให้นานขึ้นหลังรีดออกมาจากตัวปลาเพศผู้ สามารถทำได้ 2 แบบ คือ การเก็บรักษาแบบระยะสั้นเป็นการเก็บรักษาในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็งอุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียส เล็กน้อย และการเก็บรักษาแบบระยะยาวเป็นการเก็บแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส แต่ทั้งนี้ไม่ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจะทำโดยวิธีใดก็ตามต้องใช้สูตรน้ำยาเพื่อเจือจางน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษา โดยสูตรน้ำยาที่ใช้ต้องเหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาชนิดนั้นๆ เพื่อให้อสุจิมีชีวิตได้นานที่สุด โดยสูตรน้ำยาดังกล่าวจะประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นแหล่งพลังงาน และสารเคมีบางตัวทำหน้าที่ต้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือประกอบด้วยอิออนต่าง ๆ ใกล้เคียงกับในน้ำเลือด หรือน้ำหล่อเลี้ยงเซลล์อสุจิ (กฤษณ์, 2536)

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็น
2. เพื่อศึกษาระยะเวลาในการมีชีวิตของอสุจิปลา กระบอกดำในอุณหภูมิตู้เย็น

วิธีการทดลอง

การเตรียมน้ำยา

ชั่งสารเคมีตามส่วนประกอบของน้ำยาแต่ละสูตรในตารางที่ 1

↓

ละลายในน้ำกลั่นซึ่งเติมจนครบ 1,000 มิลลิลิตร

↓

เติมสารปฏิชีวนะ penosep (ประกอบด้วย penicillin และ streptomycin) 1 กรัม

↓

เก็บน้ำยาในขวดแก้ว

↓

เก็บรักษาในตู้เย็น

การเก็บรักษาน้ำเชื้อ

พ่อพันธุ์ปลากระบอกดำ ฉีดฮอร์โมนสุพรีแฟ็กท์ (suprefact) 5 ไมโครกรัม/ปลา 1 กิโลกรัม

↓

พักปลาไว้ 10 ชั่วโมง

↓

รีดน้ำเชื้อ ถ้ารีดไม่ได้ใช้วิธีการผ่าท้องเอาอัณฑะ

↓

เจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาอัตราส่วน 1:6

(น้ำเชื้อ 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำยา 6 มิลลิลิตร หรือ อัณฑะ 1 กรัม ต่อน้ำยา 6 มิลลิลิตร)

↓

นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วเก็บรักษาในอุณหภูมิตู้เย็น(4-5 องศาเซลเซียส)

↓

ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ โดยดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ (100x)
(หยดน้ำบนสไลด์หนึ่งหยด แล้วใช้ปลายไม้จิ้มฟันแตะน้ำเชื้อลงบนสไลด์ใกล้หยดน้ำ แล้วลากน้ำมาสัมผัสกับน้ำเชื้อในขณะมองผ่านกล้องแล้วประเมินอสุจิที่เคลื่อนไหวเป็นเปอร์เซ็นต์)

↓

ตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ โดยการตรวจหาอัตราการผสมกับไข่สด เป็นการนำน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไปทดสอบความสามารถที่จะผสมกับไข่สดโดยเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

ขั้นตอนการทดลอง

การทดลองครั้งที่ 1ใช้น้ำยา 5 สูตร คือ 0.85%NaCl, FRS, CSS, MC#1 และ BCB

↓

การทดลองครั้งที่ 2 ปรับความเป็นกรด-ด่างของน้ำยาทั้ง 5 สูตรให้เป็นกลาง (pH = 7) เรียกชื่อน้ำยาเป็น 0.85%NaCl-1, FRS-1,CSS-1, MC#1-1 และ BCB-1

↓

การทดลองครั้งที่ 3 ปรับสูตรน้ำยาทั้ง 5 สูตรโดยเพิ่มปริมาณ NaCl ประมาณ 2 เท่าของสูตรเดิมในน้ำยาที่มี NaCl เป็นส่วนประกอบ ส่วนสูตร BCB ลดปริมาณ sucrose ลงครึ่งหนึ่ง เรียกชื่อน้ำยาเป็น 2%NaCl, FRS-2, CSS-2, MC#1-2 และ BCB-2

สรุปองค์ความรู้จากวิจัย

1. สูตรน้ำยา และระยะเวลา มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำที่เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส
2. น้ำยาที่มีประสิทธิภาพเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีที่สุดคือ สูตร FRS-2 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา เป็น 13.3 เปอร์เซ็นต์
3. สูตรน้ำยากลุ่ม FRS, CSS และ MC#1 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในวันที่ 7 เป็น 2.3-13.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งดีกว่าน้ำเชื้อสดที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เพียง 3 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในวันที่ 3 อยู่ในช่วง 5-13.3 เปอร์เซ็นต์
4. สูตรน้ำยากลุ่ม BCB ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้
5. น้ำยากลุ่มน้ำเกลือ(NaCl) ซึ่งเตรียมได้ง่าย และประหยัด สามารถใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้ เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.85-2 เปอร์เซ็นต์
6. และการปรับความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำยาเพิ่มขึ้น หรือลดลง ช่วง 0.5-1.8 ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำที่เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางเคมี และความเป็นกรด-ด่าง(pH) ของน้ำยาสูตรต่างๆ

ส่วนประกอบ (กรัม)	สูตรน้ำยา														
	0.85% NaCl	**0.85% NaCl**	**2% NaCl**	**FRS**	**FRS-1**	**FRS-2**	**CSS**	**CSS-1**	**CSS-2**	**MC#1**	**MC#1-1**	**MC#1-2**	**BCB**	**BCB-1**	**BCB-2**
NaCl	8.5	8.5	**20**	6.5	6.5	**13**	7.25	7.25	**14.5**	1.88	1.88	**3.76**	-	-	
KCl	-	-	-	0.14	0.14	0.14	0.38	0.38	0.38	7.2	7.2	7.2	-	-	-
$CaCl_2.2H_2O$	-	-	-	0.16	0.16	0.16	0.23	0.23	0.23	0.17	0.17	0.17	-	-	-
NaH_2PO_4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.36	0.36	0.36	-	-	-
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	-	-	-	-	-	0.41	0.41	0.41	-	-	-	-	-	-
$NaHCO_3$	-	-	-	0.2	0.2	0.2	1	1	1	-	-	-	-	-	-
$MgSO4.7H_2O$	-	-	-	0.39	0.39	0.39	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	0.23	-	-	-
glucose	-	-	-	-	-	-	1	1	1	1	1	1	-	-	-
$KHCO_3$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	12.5	12.5	12.5
sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	85.5	85.5	**42.75**
reduced glutathione	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	3	3
น้ำกลั่น	เติมจนครบ 1,000 มิลลิลิตร														
pH	6.2	**7**	6.9	7.5	**7**	7.8	7.6	**7**	7.8	5.5	**7**	6.0	8.8	**7**	8.5

หมายเหตุ สูตรน้ำยา FRS (frog Ringer's solution)
สูตรน้ำยา CSS (Cortland salt solution)
สูตรน้ำยา MC#1 (modified cortland's #1)
สูตรน้ำยา BCB (bicarbonate buffer)

ภาพการทดลอง