รายงานการวิจัย

เรื่อง

ศึกษาสูตรน้ำยาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำแบบระยะสั้นในตู้เย็น

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

ณิศา มาชู

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากกองทุนพัฒนาการวิจัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
พ.ศ. 2550

ชื่อโครงการวิจัย ศึกษาสูตรน้ำยาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำแบบระยะสั้นในตู้เย็น

หน่วยงาน คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ชื่อผู้วิจัย ณิศา มาชู

ปี 2550

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำแบบระยะสั้นในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ที่เจือจาง (1:6) ด้วยน้ำยาสูตร 0.85%NaCl, frong Ringer's solution (FRS), Cortland salt solution (CSS), modified Cortland's #1 (MC#1) และ bicarbonate buffer (BCB) ในการทดลองที่ 1 พร้อมทั้งมีการปรับความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำยาทั้ง 5 สูตรให้เป็นกลาง (pH = 7) ในการทดลองที่ 2 และปรับสูตรน้ำยาโดยเพิ่มปริมาณ NaCl ประมาณ 2 เท่าของสูตรเดิม ในน้ำยาสูตรเกลือ, FRS, CSS และ MC#1 ส่วนน้ำยา BCB ปรับลดปริมาณ sucrose ลงครึ่งหนึ่ง ในการทดลองที่ 3 ภายหลังการเก็บรักษาดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในน้ำยาแต่ละสูตร เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดซึ่งเก็บรักษา ที่เวลา 2 ชั่วโมง และทุกวันจนกว่าอสุจิจะตายหมด ผลปรากฏว่าน้ำยา FRS-2 (น้ำยา FRS ปรับเพิ่ม NaCl เป็น 2 เท่า) มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้ดีที่สุด ($p<0.05$) โดยอสุจิมีชีวิตอยู่ได้นาน 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว ในวันที่ 7 เป็น 13.3 % ในขณะที่น้ำยากลุ่ม FRS, CSS และ MC#1 ทั้งที่ไม่ปรับ/ปรับ pH และปรับเพิ่มปริมาณ NaCl ในสูตรน้ำยาก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้ นาน 7 วัน เช่นเดียวกัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในวันที่ 7 เป็น 2.3-8.3 % ซึ่งดีกว่า ($P<0.05$) น้ำเชื้อสดที่เก็บรักษาได้เพียง 3 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในวันที่ 3 ประมาณ 5-13.3 % แต่ทั้งนี้น้ำยา BCB ทั้งที่ไม่ปรับ/ปรับ pH และปรับลดปริมาณ sucrose ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้ เพราะเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิไม่ดีกว่าน้ำเชื้อสดที่เก็บรักษา จากการศึกษาความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำยา พบว่าการปรับความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำยาเพิ่มขึ้นหรือลดลง ช่วง 0.5-1.8 ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ จากการศึกษาในครั้งนี้เป็นที่น่าสังเกตว่าน้ำยากลุ่มเกลือ (NaCl) ซึ่งสามารถเตรียมได้ง่ายและประหยัด สามารถใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้เมื่อใช้ในระดับความเข้มข้น 0.85-2 % อสุจิสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 5-7 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนไหวของอสุจิช่วงวันที่ 5-7 เป็น 2-33 %

คำสำคัญ : สูตรน้ำยา น้ำเชื้อ ปลากระบอกดำ การเก็บรักษา แบบระยะสั้น

106106
6 ก.ค. 59

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

Researcher Nisa Machoo

Institution Faculty of Agricultural Technology Songkhla Rajabhat University

Year 2007

Abstract

The five different extenders; saline solution (0.85%NaCl): frog Ringer's solution (FRS), Cortland salt solution (CSS) , Modified Cotland #1 (MC#1) and bicarbonate buffer (BCB), and fresh semen were tested for prolonging viability of greenback mullet's spermatozoa under short-term chill storage. The semen was diluted in each extender (1:6 = semen : extender), then stored at 4-5^{0}C in refrigerator. The second experiment was subjected to test affect of dilution pH, on spermatozoa viability. In this experiment semen was diluted in the same extender set but adjusted pH of all extenders to pH 7.0 The Third experiment was tested for affect of sodium chloride concentrations in extender mixes. The amount of NaCl salt in extender, FRS, CSS and MC#1 was increased about 100 % while the sucrose concentrat in extender, BCB was decreased 50 % The motility of spermatozoa in each of extender mixes was checked at 2 hours, and everyday after incubation until no more motility of spermatozoa was detected. The results showed that FRS-2 (FRS, which twice amount of NaCl) gave the highest motility of 13.3 % at 7 days after chill storage. In addition, FRS, CSS and MC#1 which pH was adjusted to pH 7 and increase NaCl concentration , were also able to keep motility of greenback mullet spermatozoa after 7 days of chill storage from 2.3-8.3 % It was better than fresh semen. The motility of spermatozoa was 5-13.3 % detected at 3 days after chill storage. Amony 5 extender , BCB with or without pH adjusted and with or without sucrose adjusted was unable to prolong motility of spermatozoa. The same extenders adjusted pH to increased or decreased about 0.5-1.8 non affect of greenback mullet semen. The results from this study suggest that the use of inexpensive, easily to prepare saline solution (0.85-2%) for chilled storage of greenback mullet sperm could result motility of spermatozoa was 2-33% at 5-7 days after chill storage.

Keywords : extender, semen, greenback mullet, chill storage, short-term

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ที่ได้อนุเคราะห์น้ำเค็มในการทำวิจัย ขอขอบคุณอาจารย์พินิจ ดำรงเลาหพันธ์ ที่ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ และ ดร.รัชฎา เศรษฐวงศ์สิน ที่ให้คำปรึกษา แนะนำในการวิเคราะห์ผลการทดลอง และการเขียนบทคัดย่อส่วนภาษาอังกฤษ

ขอขอบคุณนักศึกษา เจ้าหน้าที่ โปรแกรมวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำวิจัย ขอบคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ ของคณะเทคโนโลยีการเกษตรทุกท่าน ที่ช่วยเหลือให้ความสะดวกและให้กำลังใจ ในการทำวิจัยจนสำเร็จ

ขอขอบคุณกองทุนพัฒนาการวิจัย สำนักส่งเสริมวิจัย มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่ได้สนับสนุนทุนสำหรับทำวิจัย รวมทั้งบุคลากรของสำนักส่งเสริมวิจัยทุกท่านที่ได้ช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายขอขอบคุณ มารดา (นางสุนีย์ ไชยรักษ์) คุณปกครอง ด.ช.ณัฐกฤต และ ด.ช.กิตติธัช มาชู ซึ่งเป็นกำลังใจสำคัญจากครอบครัวในการทำวิจัยจนสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

ณิศา มาชู

2550

สารบัญ

เนื้อหา	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	(1)
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	(2)
กิตติกรรมประกาศ	(3)
สารบัญ	(4)
สารบัญตาราง	(6)
สารบัญภาพ	(8)
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย	3
รูปร่างลักษณะ นิเวศวิทยาของปลากระบอกดำ	3
การสืบพันธุ์วางไข่ของปลากระบอกดำ	3
การแพร่กระจายพันธุ์ของปลากระบอกดำ	4
การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากระบอกดำ	5
การเพาะและอนุบาลปลากระบอกดำ	6
อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเพศผู้	7
อสุจิและน้ำเชื้อปลา	7
การเคลื่อนไหวของอสุจิปลา	9
การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ	10
น้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลา	10
วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา	11
องค์ประกอบของน้ำทะเลและความเค็ม	13
บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย	15
อุปกรณ์	15
วิธีการทดลอง	15
การเก็บข้อมูล	23
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	23
สถานที่ทำการทดลอง	23
ระยะเวลาที่ทำการทดลอง	23

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

เนื้อหา	หน้า
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	24
ประสิทธิภาพของน้ำยา 5 สูตร	24
ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำยา	25
การปรับสูตรน้ำยา	27
ระยะเวลาในการเก็บรักษา	29
ค่าความเค็มของน้ำยา	31
ค่าออสโมลาลิตีต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ	32
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	34
บรรณานุกรม	35
ภาคผนวก	38

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เกลือแร่ต่างๆ ที่ละลายในน้ำทะเลอยู่ในรูปของไอออน	13
2	ค่าความเค็มของน้ำในแหล่งต่างๆ	14
3	ส่วนประกอบทางเคมี และ pH ของน้ำยาสูตรต่างๆ ในการทดลองที่ 1 เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส	20
4	ส่วนประกอบทางเคมี และ pH ของน้ำยาสูตรต่างๆ ในการทดลองที่ 2 เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส	21
5	ส่วนประกอบทางเคมี และ pH ของน้ำยาสูตรต่างๆ ในการทดลองที่ 3 เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส	22
6	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 1 ภายหลังเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยาสูตรต่างๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง 1,2,3,4,5,6 และ 7	25
7	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 2 ภายหลังเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยาสูตรต่างๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง 1,2,3,4,5,6 และ 7	26
8	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 3 ภายหลังเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยาสูตรต่างๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง 1,2,3,4,5,6 และ 7	28
9	ความเป็นกรดเป็นด่าง และความเค็มของน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส	32

ตารางผนวกที่		หน้า
1	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำในน้ำยากลุ่มเกลือ (NaCl) ระดับความเข้มข้น 0.85, 1, 2 และ 5% ภายหลังการเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส	39
2	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำในการทดลองที่ 1 ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยาสูตรต่างๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน	39

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
3	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำในการทดลองที่ 2 ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยาสูตรต่างๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน	40
4	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำในการทดลองที่ 3 ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยาสูตรต่างๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน	40
5	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยากลุ่มเกลือ (NaCl) ระดับความเข้มข้น 0.85, 1, 2 และ 5% ของตารางผนวกที่ 1 ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน	41

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ตารางผนวกที่		หน้า
1	กราฟเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 1	29
2	กราฟเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 2	30
3	กราฟเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 3	30

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

ปลากระบอกดำเป็นปลาน้ำกร่อยชนิดหนึ่งมีความชุกชุมในทะเลสาบสงขลาและชายฝั่งทะเลใกล้เคียง นับเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ทำรายได้ให้แก่ผู้ประกอบอาชีพทำการประมงพื้นบ้าน เนื่องจากมีราคาแพง เป็นปลาที่นิยมบริโภคกันทั่วไปเพราะมีรสชาติดี ปลากระบอกดำเป็นปลาที่สามารถอาศัยอยู่ในสภาพแวดล้อมพิสัยกว้าง ในน้ำที่มีความเค็มปรับเปลี่ยนตั้งแต่ 2-32 ppt ความเป็นกรด-ด่าง ตั้งแต่ 4.5-9 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำระหว่าง 4.2-8.1 มิลลิกรัม/ลิตร ความเป็นด่างระหว่าง 10-100 มิลลิกรัม/ลิตร (อังสุนีย์ ชุณหปราณ, 2537) ด้วยคุณสมบัติดังกล่าวควรมีการส่งเสริมสนับสนุนให้มีการเพาะเลี้ยงให้แพร่หลาย เพื่อสร้างรายได้ให้แก่ประเทศ

ปัจจุบันปลากระบอกดำที่บริโภค ได้จากการจับในธรรมชาติ ซึ่งนับว่าจะลดน้อยลงเรื่อย ๆ จึงมีผู้คิดเพาะพันธุ์ปลากระบอกดำ แต่ยังไม่แพร่หลาย เพราะการเพาะพันธุ์จะทำได้ยาก เนื่องจากประสบปัญหาหลายประการ เช่น พ่อแม่พันธุ์ปลาที่สมบูรณ์เพศจะมีน้อย ซึ่งสามารถจับได้เฉพาะบางช่วง หรือเมื่อจับมาแล้วบางครั้งได้เฉพาะปลาเพศเมีย ทั้งนี้เนื่องจากในธรรมชาติปลาเพศผู้มีจำนวนน้อยกว่าเพศเมีย (อังสุนีย์ ชุณหปราณ, 2537) จึงทำให้ขาดแคลนปลาเพศผู้ที่จะนำมาผสมพันธุ์กับปลาเพศเมีย หรือเมื่อได้ปลาเพศผู้มาแล้วคุณภาพน้ำเชื้อไม่ดี จึงไม่สามารถเพาะพันธุ์ปลากระบอกดำได้ตามแผนงานที่วางไว้ ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำ ก็เป็นแนวทางหนึ่งที่จะทำให้การเพาะพันธุ์ปลากระบอกดำประสบความสำเร็จได้ส่วนหนึ่ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อยืดระยะเวลาในการมีชีวิตของอสุจิหรือสเปิร์มปลาให้นานขึ้น หลังจากรีดออกมาจากตัวปลาเพศผู้ สามารถทำได้ 2 แบบ คือ การเก็บรักษาแบบระยะสั้นเป็นการเก็บรักษาในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็งอุณหภูมิสูงกว่า 0 องศาเซลเซียสเล็กน้อย และการเก็บรักษาแบบระยะยาวเป็นการเก็บแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส แต่ทั้งนี้ไม่ว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจะทำโดยวิธีใดก็ตาม ต้องใช้สูตรน้ำยาหรือสารละลายเพื่อเจือจางน้ำเชื้อก่อนการเก็บรักษา โดยสูตรน้ำยาหรือสารละลายที่ใช้ต้องเหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาชนิดนั้น ๆ เพื่อให้ได้จำนวนอสุจิที่มีชีวิตจำนวนมากและนานที่สุด โดยสูตรน้ำยาดังกล่าวจะประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นแหล่งพลังงาน และสารเคมีบางตัวทำหน้าที่ต้าน หรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือประกอบด้วยอิออนต่าง ๆ ใกล้เคียงกับที่ปรากฏในน้ำเลือด หรือน้ำหล่อเลี้ยงเซลล์อสุจิ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

การศึกษาสูตรน้ำยาที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญ และจำเป็นสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำ ซึ่งในครั้งนี้จะเก็บรักษาแบบระยะสั้นในอุณหภูมิตู้เย็น เพื่อเป็นประโยชน์ในการเพาะขยายพันธุ์ สามารถแก้ปัญหาการขาดแคลนปลากระบอกดำเพศผู้ในเบื้องต้นได้ และยังเป็นแนวทางในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำแบบแช่แข็งต่อไป ทำให้การเพาะขยายพันธุ์ปลากระบอกดำประสบความสำเร็จแพร่หลาย

ทั่วไป เป็นการเพิ่มปริมาณลูกพันธุ์ปลาให้แก่เกษตรกรที่อาศัยบริเวณชายฝั่งได้เลี้ยงปลากระบอกดำในรูปแบบต่างๆ เป็นการสร้างอาชีพ เพิ่มรายได้ ให้แก่เกษตรกรได้เป็นอย่างดี

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็น
2. เพื่อศึกษาระยะเวลาในการมีชีวิตของอสุจิปลากระบอกดำในอุณหภูมิตู้เย็น

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

รูปร่างลักษณะ นิเวศวิทยาของปลากระบอกดำ

ปลากระบอกดำมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Liza subviridis* (Valenciennes, 1836) และมีชื่อสามัญว่า Greenback mullet มีลักษณะที่สำคัญ คือ ลำตัวยาว ทรงกระบอก ส่วนหัวค่อนข้างแหลม แผ่นกระดูกระหว่างจอกทั้งสองโค้งนูนเล็กน้อย ริมฝีปากบาง เยื่อไขมันใต้ตากว้าง แนวของลำตัวหน้าครีบหลังเกือบเป็นเส้นตรง เกล็ดตามแนวข้างตัวจำนวน 28-31 เกล็ด ครีบหลังอันแรกอยู่ประมาณกึ่งกลางลำตัวเหนือแนวเกล็ดข้างตัวเกล็ดที่ 9 หรือที่ 10 ครีบหางเว้าเล็กน้อย อันที่สองอยู่ตรงกลางระหว่างครีบหลังอันแรกและครีบหาง ส่วนหลังจะมีสีเทาเข้มหรือเขียวคล้ำ ด้านข้างและท้องสีขาว-เงินแววววาว ครีบท้องสีขาว ครีบอื่น ๆ ใส กระดูกปิดเหงือกสีขาว (ไพโรจน์ สิริมนตราภรณ์ และอังสุนีย์ ชุณหปราณ, 2535) ปลากระบอกดำมีลักษณะ ลำตัวยาว ทรงกระบอก ส่วนท้ายลำตัวแบนด้านข้าง ด้านบนของหัวแบน ครีบหางเว้าเล็กน้อย บริเวณหลังและส่วนบนของลำตัวมีสีเทา ส่วนบริเวณด้านท้องสีขาว ครีบท้องสีขาว ปลากระบอกดำเป็นปลาที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำทะเล อยู่รวมกันเป็นฝูงบริเวณชายฝั่งทะเล แอ่งน้ำ ปากแม่น้ำ ช่วงระยะวัยอ่อนอาศัยอยู่ในบริเวณทุ่งนาที่มีน้ำขัง หรือบริเวณป่าชายเลน หากินอยู่บริเวณพื้นท้องน้ำ อาหารได้แก่ สาหร่ายขนาดเล็ก ไดอะตอม และเศษซากของสิ่งมีชีวิตที่ผสมอยู่ในพื้นทรายหรือโคลน มีการวางไข่ในทะเล (ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนล่าง, 2550)

ปลากระบอกดำเป็นปลาที่สามารถอาศัยในสภาพแวดล้อมพิสัยกว้าง กล่าวคือสามารถอยู่ในน้ำที่มีความเค็มปรับเปลี่ยนระหว่าง 2-32 ppt ความเป็นกรดเป็นด่างระหว่าง 4.5-9.0 ปริมาณออกซิเจนละลายระหว่าง 4.2-8.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าความเป็นด่าง ระหว่าง 10-100 มิลลิกรัมต่อลิตร และสามารถอยู่ได้ในน้ำความลึกหลายระดับ ตั้งแต่ 0.8-2.5 เมตร (www.nicaonline.com)

การสืบพันธุ์วางไข่ของปลากระบอกดำ

ปลากระบอกดำจะมีไข่และน้ำเชื้อแก่ตลอดปี แต่ช่วงสูงสุด (peak) ของการวางไข่ อยู่ระหว่างเดือนกันยายน-ตุลาคม (อังสุนีย์ ชุณหปราณ, 2537) การรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลากระบอกดำ เพื่อนำมาผสมพันธุ์วางไข่ ควรรวบรวมปลาตั้งแต่ขึ้น 11-15 ค่ำในเวลาบ่ายถึงค่ำ จะได้ปลาที่มีไข่แก่และน้ำเชื้อพร้อมมากกว่าการรวบรวมในเวลาอื่น ปลากระบอกดำเป็นปลาที่ว่ายน้ำเร็วตกใจง่าย เมื่อปลาถูกจับจะดิ้นจนเกล็ดหลุดทำให้มีแผลตามตัว ดังนั้นการรวบรวมปลาต้องมีความระมัดระวังมากเพื่อให้ปลาบอบช้าน้อยที่สุด กล่าวคือเมื่อลากอวนเข้าชายฝั่งแล้วรีบจับปลาใส่ถุงพลาสติก ขนาด 20x30 นิ้ว ถุงละ 3-5 ตัว พร้อมดำเนินการอัดออกซิเจนทันที พ่อแม่ปลาที่ได้ควรลำเลียงสู่บ่อวางไข่ ภายใน 1-2 ชั่วโมงหลังการจับได้ วิธีนี้จะช่วยลดการสูญเสีย เนื่องจากปลาบอบช้าได้เป็นอย่างดี ปลาที่สมบูรณ์แข็งแรงจะวางไข่และผสมพันธุ์ในคืนเดียวกับที่ปล่อยลงบ่อ (นิเวศน์ เรืองพานิช และคณะ, 2536)

การศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์ปลากระบอกดำมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวกับน้ำหนักตัว อัตราส่วนขนาดความยาวแรกเริ่มเจริญพันธุ์ ความดกไข่ และฤดูกาลวางไข่ โดยได้ดำเนินการสุ่มชั่งวัด จำแนกเพศ และสุ่มนับไข่ของปลากระบอกดำได้จากการทำประมงในบริเวณอ่าวตราด โดยรวบรวมข้อมูลตั้งแต่เดือนมิถุนายน 2546 – พฤษภาคม 2547 ผลการศึกษาพบว่าความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวกับความยาวตลอดตัวของปลากระบอกดำได้สมการ W = 0.0258L ยกกำลัง 2.710 และความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักตัวกับความยาวตลอดตัวของปลากระบอกดำเพศผู้ W = 0.0303L ยกกำลัง 2.641 และเพศเมีย W = 0.0328L ยกกำลัง 2.633 อัตราส่วนเพศของปลากระบอกดำเท่ากับ 1:2.13 ซึ่งขนาดความยาวแรกเริ่มเจริญพันธุ์ที่ร้อยละ 50 ของเพศเมียเท่ากับ 22.00 เซนติเมตร และความดกของไข่โดยเฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 160,976 ฟอง ในช่วงความยาวตลอดตัว 13.6-23.7 เซนติเมตร และมีความสัมพันธ์ระหว่างความดกของไข่กับความยาวตลอดตัวอยู่ในสมการ Fc = 783.73L ยกกำลัง 1.765 และจากการคาดคะเนฤดูวางไข่ของปลากระบอกดำโดยใช้ดัชนีชี้วัดการสืบพันธุ์ 3 ดัชนี คือ ดัชนีความสมบูรณ์เพศ (GSI) จำนวนร้อยละของเพศเมียที่มีความสมบูรณ์เพศ และจำนวนร้อยละของขั้นเจริญพันธุ์ พบว่าการวางไข่ของปลากระบอกดำจะมีมากในเดือนมกราคม และตุลาคม (www.fisheries.go.th)

การแพร่กระจายพันธุ์ของปลากระบอกดำ

อังสุนีย์ ชุณหปราณ (2537) ได้รวบรวมตัวอย่างปลากระบอกดำที่แพร่การจายพันธุ์ในทะเลสาบสงขลาและบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดสงขลา โดยแบ่งการศึกษาออกเป็น 4 บริเวณ มีผลการศึกษาดังนี้

บริเวณที่ 1 บริเวณชายฝั่งทะเลตลอดแนวของจังหวัดสงขลา มีอุณหภูมิน้ำอยู่ในช่วง 26-32 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่าง(pH) มีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ ระหว่าง 7.6-8.6 ปริมาณความเค็มตลอดปีอยู่ระหว่าง 26-35 ppt ค่าความเป็นด่าง (Alkalinity) อยู่ระหว่าง 109-114 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 5.8-9.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ความลึกโดยเฉลี่ย 3 เมตร ความโปร่งใสของน้ำอยู่ระหว่าง 0.4-2.2 เมตร พบปลากระบอกดำเพศผู้ มีพิสัยของการแพร่กระจายขนาดความยาวเหยียด ระหว่าง 11.5-29.5 เซนติเมตร มีความยาวมาตรฐาน 17.2 เซนติเมตร ปลาเพศเมีย มีขนาดความยาวเหยียด ระหว่าง 10.5-30.5 เซนติเมตร ความยาวมาตรฐาน 19.6 เซนติเมตร จับปลาได้ไม่ตลอดปี เนื่องจากอากาศแปรปรวน คลื่นลมแรง พบอัตราส่วน เพศผู้ : เพศเมีย เท่ากับ 1:1

บริเวณที่ 2 จากปากทะเลสาบสงขลาบริเวณหัวเขาแดงจนถึงช่องแคบบ้านปากรอ อำเภอสิงหนคร มีคุณสมบัติทางกายภาพของน้ำ เช่นเดียวกับบริเวณที่ 1 ความเป็นกรดเป็นด่าง มีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 6.3-8.3 ปริมาณความเค็มตลอดปี อยู่ระหว่าง 22-32 ppt ค่าความเป็นด่าง 60-100 มิลลิกรัมต่อลิตร ออกซิเจนที่ละลายน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 5.7-6.7 มิลลิกรัมต่อลิตร ความลึกโดยเฉลี่ย 1.5 เมตร ความโปร่งใสของน้ำอยู่ระหว่าง 0.3-1.0 เมตร พบปลากระบอกดำเพศผู้มีพิสัยของการแพร่กระจายขนาดความยาวเหยียดระหว่าง 10.5-29.5 เซนติเมตร มีความยาวมาตรฐาน 20.8 เซนติเมตร จับปลาได้ตลอดทั้งปี พบอัตราส่วนเพศผู้ : เพศเมีย เท่ากับ 1:2

บริเวณที่ 3 จากบ้านปากรอขึ้นไปจนถึงช่องแคบของกิ่งอำเภอกระแสสินธุ์ ตำบลเกาะใหญ่กับบ้านแหลม ต.จองถนน อ.เขาชัยสน จ.พัทลุง อุณหภูมิน้ำมีลักษณะเดียวกับบริเวณที่ 1 และ 2 ความเป็นกรดเป็นด่าง มีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 7.1-8.2 ปริมาณความเค็มตลอดปีอยู่ระหว่าง 2-27 ppt ค่าความเป็นด่าง 24-79 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 4.2-7.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ความลึกโดยเฉลี่ย 1.8 เมตร ความโปร่งใสของน้ำอยู่ระหว่าง 0.2-0.85 เมตร พบปลากระบอกดำเพศผู้มีพิสัยของการแพร่กระจายขนาดความยาวเหยียดระหว่าง 10.5-28.5 เซนติเมตร มีความยาวมาตรฐาน 18.8 เซนติเมตร ปลาเพศเมียมีความยาวเหยียด ระหว่าง 11.5-33.5 เซนติเมตร ความยาวมาตรฐาน 21.9 เซนติเมตร จับปลากระบอกได้ตลอดปี การเปลี่ยนแปลงความเค็มของน้ำเป็นตัวบ่งชี้ถึงปริมาณการจับได้มากหรือน้อย ตลอดจนการอพยพย้ายถิ่นของปลากระบอกดำ พบอัตราส่วนเพศผู้: เพศเมีย เท่ากับ 1:5

บริเวณที่ 4 ต่อจากบริเวณที่ 3 ขึ้นไปจนถึงทะเลน้อย อ.ควนขนุน จ.พัทลุง อุณหภูมิน้ำอยู่ในช่วง 26-32 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่าง มีค่าเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 7.2-9.1 ปริมาณความเค็มมีการเปลี่ยนแปลงตลอดปี ระหว่าง 0-5 ppt ความเป็นด่าง 10-29 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 5.5-8.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ความลึกโดยเฉลี่ย 2.2 เมตร ความโปร่งใสของน้ำอยู่ระหว่าง 0.4-0.65 เมตร พบปลากระบอกดำเพศผู้มีพิสัยของการแพร่กระจายขนาดความยาวเหยียดระหว่าง 21.5-23.5 เซนติเมตร มีความยาวมาตรฐาน 22.3 เซนติเมตร บริเวณนี้จะพบปลากระบอกดำเฉพาะเดือนที่น้ำมีความเค็มมากกว่า 2 ppt ปลาเพศเมียมีความยาวเหยียด ระหว่าง 14.5-29.5 เซนติเมตร ความยาวมาตรฐาน 24.3 เซนติเมตร พบอัตราส่วน เพศผู้ : เพศเมีย เท่ากับ 1:8

นอกจากจังหวัดสงขลาแล้วจังหวัดที่พบการแพร่กระจายพันธุ์ของปลากระบอกมากอีกแหล่งคือ บริเวณอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี จากการศึกษาทางชีววิทยาของปลากระบอกดำพบว่าปลากระบอกดำเพศเมียมีจำนวนมากกว่าเพศผู้ โดยมีอัตราส่วนปลาเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1:12.5 เมื่อปี พ.ศ. 2537 และ 1:13 เมื่อปี พ.ศ. 2538 (อนุวัฒน์ รัตนโชติ และคณะ, 2538)

การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากระบอกดำ

พิษณุ นาอนันต์ (2541) ทดลองเลี้ยงปลากระบอกดำ เพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ในบ่อดิน เริ่มทดลองโดยปล่อยลูกปลาขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 0.16±0.052 กรัม ลงในบ่อขนาด 800 ตารางเมตร ความหนาแน่น 7 ตัว/ตรม. ให้อาหารผสมเอง มีโปรตีน 23% ตรวจสอบการเจริญเติบโตทุกเดือน ผลการทดลองพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองปลากระบอกดำมีอัตราการรอดตาย 70.5% เป็นอัตราส่วนเพศผู้ : เมีย = 1:5.5 ปลาเพศผู้มีความยาวเฉลี่ย 15.4 เซนติเมตร. มีน้ำหนักเฉลี่ย 45.3 กรัม และปลาเพศเมียมีความยาวเฉลี่ย 18.4 เซนติเมตร. มีน้ำหนักเฉลี่ย 77.4 กรัม พบว่าปลาเพศเมียมีไข่ในระยะสะสมไข่แดง (vitellogenic oocyte) เมื่ออายุได้ 7 เดือน และพบปลาเพศผู้มีน้ำเชื้อเมื่อสิ้นสุดการทดลองคือ 11 เดือน จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงปลากระบอกดำในบ่อดินต้องใช้เวลาประมาณ 7-11 เดือน จึงจะได้ปลาพ่อแม่พันธุ์ที่พร้อมจะสืบพันธุ์ได้

นิเวศ เรืองพานิช และคณะ (2536) ทดลองเลี้ยงปลากระบอกดำเพื่อให้ผสมพันธุ์วางไข่ในบ่อซิเมนต์ โดยนำพ่อแม่พันธุ์ปลาที่รวบรวมได้จากทะเลสาบสงขลาที่เหลือจากการคัดเลือกไปเพาะพันธุ์ปลาเพศเมียมีไข่อ่อนหรือไม่มีไข่ ปลาเพศผู้ไม่มีน้ำเชื้อหรือมีน้ำเชื้อที่ยังไม่พัฒนา หลังจากรักษาแผลให้หายโดยแช่ปลาในยาเหลืองความเข้มข้น 2 ส่วนต่อล้าน ติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลา 5-7 วัน เมื่อปลาทุกตัวอยู่ในสภาพสมบูรณ์เป็นปกติแล้วทำการเคลื่อนย้ายไปทดลองเลี้ยงในบ่อซีเมนต์กลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เมตร ลึก 2 เมตร ปริมาตร 150 ตัน เพื่อให้ไข่และน้ำเชื้อพัฒนาและผสมพันธุ์วางไข่ในบ่อ โดยปล่อยปลาบ่อละ 210 ตัว จำนวน 3 บ่อ ในอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 1:1, 2:1 และ 3:1 ตามลำดับ ก่อนเคลื่อนย้ายปลาต้องใช้ยาสลบควีนาดีน ความเข้มข้น 5-10 ส่วนต่อล้าน แช่ปลาให้สลบหรือมีอาการเฉื่อยลง เพื่อป้องกันปลาดิ้นและดิ้นมากจะทำให้บอบช้ำได้อีก น้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาเป็นน้ำทะเลสดสูบจากทะเลโดยตรง ความเค็ม 30 ส่วนต่อพัน อัตราการเปลี่ยนน้ำประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ต่อวัน ภายในบ่อให้อากาศอย่างพอเพียง อาหารที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาเป็นอาหารผสมแบบเปียก และอาหารปลากินพืชแบบเม็ดลอยน้ำ ปริมาณอาหารที่ให้ประมาณ 5-7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน ผลการศึกษาพบว่า บ่อที่ 1 อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 1:1 ปลาวางไข่ 2 ครั้ง รวบรวมไข่ได้ 330,000 ฟอง ไข่ฟักออกเป็นตัว 135,000 ตัว อัตราฟักไข่ 40.9 เปอร์เซ็นต์ บ่อที่ 2 อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 2:1 ปลาวางไข่ 1 ครั้ง รวบรวมไข่ได้ 250,000 ฟอง ไข่ฟักออกเป็นตัว 200,000 ตัว อัตราฟักไข่ 80 เปอร์เซ็นต์ บ่อที่ 3 อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมีย 3:1 ปลาวางไข่ 2 ครั้ง รวบรวมไข่ได้ 212,500 ฟอง ลูกปลาฟักออกเป็นตัว 156,500 ตัว อัตราฟักไข่ 73.65 เปอร์เซ็นต์ จำนวนไข่ทั้งหมดที่ได้จากการทดลอง 792,500 ฟอง เป็นลูกปลาทั้งสิ้น 491,500 ตัว อัตราฟักเป็นตัวเฉลี่ย 62.02 เปอร์เซ็นต์ พ่อแม่พันธุ์ปลาที่นำมาทดลองจะผสมพันธุ์วางไข่หลังจากรวบรวมจากทะเลสาบสงขลาและนำมาเลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 เดือนขึ้นไป ลูกปลาที่รวบรวมจากบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ เมื่อนำไปอนุบาลได้ 35 วันเหลือรอด 150,000 ตัว อัตรารอดตาย 30.52 เปอร์เซ็นต์

การเพาะและอนุบาลปลากระบอกดำ

คัดเลือกปลากระบอกเพศผู้ที่มีสภาพสมบูรณ์แข็งแรง จำนวน 20 ตัว และเพศเมียไข่แก่ จำนวน 5 ตัว ปล่อยลงบ่อวางไข่ ขนาดจุน้ำ 25 ตัน ปลาจะผสมพันธุ์วางไข่ในน้ำ ความเค็ม 30 ส่วนต่อพัน เช้าวันรุ่งขึ้นรวบรวมไข่ได้ทั้งสิ้น 2 ล้านฟอง นำไปฟักในถังฟักไข่รูปกรวยขนาดจุน้ำ 500 ลิตร จำนวน 2 ถัง ลูกปลาฟักออกเป็นตัวภายใน 17-21 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26-29^{0}C จำนวน 1,430,000 ตัว อัตราฟักเป็นตัว 71.5 เปอร์เซ็นต์ ย้ายลูกปลาวัยอ่อนอายุ 1 วัน ไป อนุบาลในบ่อขนาดจุน้ำ 25 ตัน บ่อละ 712,500 และ 717,000 ตัว ตามลำดับ อาหารที่ใช้เลี้ยงปลาวัยอ่อนอายุ 1-30 วัน ได้แก่ โรติเฟอร์ (ลูกปลาอายุ 2-15 วัน) อาร์ทีเมีย (ลูกปลาอายุ 12-30 วัน) และอาหารผสม (ลูกปลาอายุ 21-30 วัน) ตามลำดับ ผลผลิตลูกปลาอายุ 30 วัน จากการทดลอง 735,000 ตัว อัตรารอดตาย 51.4 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลาที่เลี้ยงด้วยไรน้ำเค็มรวมกับอาหารผสมจะมีอัตรารอดตายสูงกว่าลูกปลาที่เลี้ยงด้วยไรน้ำเค็มอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

(P<0.05) (87.33% และ 71.0% ตามลำดับ) ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 12-30 วัน สามารถอนุบาลในน้ำที่มีช่วงความเค็มกว้าง 15-30 ส่วนต่อพัน ลูกปลาวัยรุ่นอายุ 30 วันขึ้นไปสามารถอนุบาลได้ในความเค็มต่ำจนถึงน้ำจืด (นิเวศน์ เรืองพานิช และคณะ, 2536)

การทดลองอนุบาลลูกปลากระบอกดำความยาว 5.5-5.7 เซนติเมตร. น้ำหนัก 2.6 กรัม ในกระชังขนาด 1x2x2 เมตร ด้วยความหนาแน่น 500, 1,000 และ 1,500 ตัว/$ม^2$ เป็นเวลา 24 สัปดาห์ คุณสมบัติของน้ำในกระชัง มีค่าพีเอช 7.8-8.3 ความเค็ม 12.0-35.5 ppt. และปริมาณออกซิเจน 6.5-9.1 มิลลิกรัมต่อลิตร และอุณหภูมิ 22.0-29.7 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่ามีการเจริญเติบโต อัตราการรอดตาย และอัตราการแลกเนื้อไม่แตกต่างกันในทางสถิติ โดยพบว่าเมื่อสิ้นสุดการทดลองปลามีน้ำหนักเฉลี่ยระหว่าง 16.1-19.4 กรัม อัตราการรอดตายเฉลี่ยในช่วง 81.2-91.5% และอัตราการแลกเนื้อเท่ากับ 4.6-4.8 ตามลำดับ ส่วนค่าความสมบูรณ์ในรูปความอ้วนของปลา (Fatness) มีค่าระหว่าง 10.0-15.3 (วิชัย วัฒนกุล และคณะ, 2537)

อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเพศผู้

อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาเพศผู้ หรืออัณฑะ (testis) มีลักษณะเป็นพูยาว 2 พู อยู่ภายในช่องท้องติดกับผนังช่องท้องด้านบนโดยมีเยื่อบาง ๆ ยึดไว้ ปลายด้านหนึ่งของทั้ง 2 พูนี้จะมาเชื่อมรวมกันเป็นท่อน้ำเชื้อ (vas deferens) ซึ่งมีขนาดสั้น ๆ และไปเปิดออกสู่ urogenital pore ซึ่งเป็นช่องเปิดร่วมของปัสสาวะและน้ำเชื้อออกสู่ภายนอกตัวปลา ลักษณะอัณฑะของปลาจะแตกต่างกัน เช่น ปลาดุกอุยมีอัณฑะเป็นพูยาว 2 พู และแตกแขนงคล้ายนิ้วมือ อัณฑะของปลาดุกด้านมีลักษณะคล้ายคลึงกันแต่ไม่แตกแขนง ปลาช่อนมีอัณฑะเป็นพูสั้น ๆ และทั้ง 2 พู มีขนาดไม่เท่ากัน (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2535)

กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) กล่าวถึงอัณฑะของปลากระดูกแข็งโดยทั่วไปว่าสามารถจำแนกได้ 2 แบบ ตามขบวนการสร้างอสุจิ คือ 1) แบบทูบูลาร์ (tubular type) จะพบเซลล์ที่ทำให้กำเนิดอสุจิเฉพาะส่วนปลายสุดของท่อ ด้านปลายตัน และภายในท่อไม่มีรูกลางท่อ แต่เต็มไปด้วยถุงที่สร้างตัวอสุจิ ถุงที่เกิดขึ้นใหม่จะดันให้ถุงที่เกิดก่อนเคลื่อนที่จากปลายท่อด้านปลายตันไปสู่ท่อน้ำเชื้อขนาดเล็ก (vas efferens) อัณฑะแบบนี้ได้แก่ ปลากลุ่มไซปินิดส์ เช่น ปลาทอง ปลาไน 2) แบบโลบูลาร์ (lobular type) เซลล์ที่ให้กำเนิดอสุจิกระจายทุกส่วนของผนังท่อ และภายในท่อมีรูกลางท่อ ถุงที่สร้างตัวอสุจิจะปล่อยอสุจิเข้าสู่รูกลางท่อแล้ว จึงเข้าสู่ท่อน้ำเชื้อขนาดเล็ก อัณฑะแบบนี้ ได้แก่ ปลาพวก ซัลมอลนิดส์ สำหรับประเทศไทย ได้แก่ ปลาสวาย ปลาบึก และปลาดุก

อสุจิและน้ำเชื้อปลา

อสุจิของปลาต่างจากของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ ตรงที่ไม่มีส่วนของ acrosome ทั้งนี้เพราะไข่ปลามี micropyle ซึ่งเป็นทางผ่านของอสุจิอยู่แล้ว ตัวอสุจิของปลาแต่ละชนิดจะมีรูปร่างลักษณะต่าง ๆ กัน แต่ทุกชนิดจะมีส่วนประกอบสำคัญ 3 ส่วน คือ 1) ส่วนหัว (head) เป็นที่อยู่ของ nucleus และเป็นส่วนที่สำคัญที่สุด จากการส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าส่วนหัวของอสุจิปลาตะเพียนขาว

ปลาดุก และปลาทอง มีลักษณะกลม ส่วนของปลาไนเป็นรูปไข่ 2) ส่วนลำตัว (mid piece) เป็นส่วนที่อยู่ถัดจากส่วนหัว ประกอบด้วย ส่วน microtubule ซึ่งเป็นแกนกลางของส่วนหาง ล้อมรอบด้วย cytoplasm ภายในมี mitochondria และ centriole 3) ส่วนหาง (flagellum) ประกอบด้วย microtubule ที่เรียงเป็นรอบ ๆ แกนกลาง ซึ่งทำหน้าที่ให้อสุจิเคลื่อนไหวได้ (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2535)

น้ำเชื้อปลา (milt) ที่อยู่ในอัณฑะหรือที่รีดออกมาสดๆ จะมีสีขาวคล้ายน้ำนม แต่ข้นเหนียวและมีกลิ่นคาว ปริมาณของน้ำเชื้อ และความหนาแน่นของตัวอสุจิจะแตกต่างกันตามชนิด ขนาด อายุ ความสมบูรณ์เพศ ฤดูกาล และสิ่งแวดล้อม เช่น ในปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ช่วงเดือนพฤษภาคม – ตุลาคม พบว่ามีค่าดัชนีความสัมพันธ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonado somatic index, GSI) เฉลี่ย 0.25% และมีความหนาแน่นของตัวอสุจิเฉลี่ย $7.1x10^9$ ตัว/น้ำหนักอัณฑะ(กรัม) (Guest et al.,1976) หรือจากการศึกษาของ Suquest *et al.* (1993) ในปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) พบว่าตามธรรมชาติช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ปลาน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 2 กิโลกรัม อายุประมาณ 1 ปี มีปริมาณน้ำเชื้อประมาณ 1.6 มิลลิลิตร มีความหนาแน่นของตัวอสุจิ $38.3x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลาสามารถทำได้ 3 วิธี คือ 1) รีดโดยตรงจากตัวปลาโดยกดเบา ๆ ตรงส่วนท้องของปลาเพศผู้ก็จะมีน้ำเชื้อสีขาวข้นคล้ายน้ำนมไหลออกมา 2) ใช้เข็มฉีดยาดูดจากช่องเปิดของน้ำเชื้อ 3) ผ่าท้องปลาพร้อมกับนำอัณฑะไปเปิดเอาน้ำเชื้อ วิธีนี้นิยมใช้กับปลาที่มีน้ำเชื้อน้อย เช่น ปลาดุก (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2535)

การทดลองกระตุ้นให้ปลากระบอกดำเพศผู้สร้างน้ำเชื้อ โดยกินอาหารผสมฮอร์โมน 17 α methyltestosterone (MT) ระดับความเข้มข้น 0, 30, 60 และ 100 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม ตรวจสอบการสร้างน้ำเชื้อของปลาหลังจากให้กินอาหารผสมฮอร์โมนเป็นระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 เดือน ผลปรากฏว่าที่ระยะเวลา 1 และ 2 เดือน จำนวนปลากระบอกดำที่สร้างน้ำเชื้อทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนที่ระยะเวลา 3, 4 และ 5 เดือน ปลากระบอกดำที่รับอาหารผสมฮอร์โมน 0, 60 และ 100 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม พบว่าจำนวนปลาที่สร้างน้ำเชื้อไม่มีความแตกต่างกัน แต่ปลาที่กินอาหารผสมฮอร์โมน 30 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม มีจำนวนปลาที่สร้างน้ำเชื้อมากกว่าชุดการทดลองอื่นแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (อดุลย์ แมเร๊าะ และคณะ, 2545) การกระตุ้นให้ปลามีการเปลี่ยนเพศเป็นเพศผู้ หรือการที่จะเร่งให้ปลาเพศผู้สร้างน้ำเชื้อในปริมาณมาก หรือเป็นระยะเวลาต่อเนื่องนานๆ นั้นวิธีที่นิยมกันมากวิธีหนึ่งคือการใช้ฮอร์โมน17αmethyltestosterone (MT) ซึ่งมีวิธีการปฏิบัติหลายวิธี เช่น การแช่ลูกปลาในสารละลายฮอร์โมน การผสมในอาหารปลา การฉีด รวมทั้งการบรรจุฮอร์โมนไว้ในหลอดพลาสติกขนาดเล็กแล้วนำไปฝังในตัวปลา (Lee and Tamura, 1988)

การเคลื่อนไหวของอสุจิปลา

การเคลื่อนไหวของอสุจิเกิดจากการทำงานของส่วน flagellum โดยอาศัย adenosine triphosphate (ATP) ถ้า ATP สูงสามารถเคลื่อนไหวได้แรงและเร็วกว่าที่ ATP ต่ำ (Amelar และคณะ, 1980)

ในสภาวะปกติอสุจิที่อยู่ในอัณฑะหรือที่รีดออกมาจะไม่มีการเคลื่อนไหว แต่จะเคลื่อนไหวเมื่อได้รับการกระตุ้น โดยการเจือจางด้วยน้ำ หรือสารละลายที่มีความเข้มข้นต่ำกว่าของเหลวในน้ำเชื้อ (seminal fluid) ซึ่งประกอบด้วยอิออนต่าง ๆ ได้แก่ Na^+, K^+, Ca^{2+}, Mg^{2+}, และ Cl^- เป็นต้น ซึ่งส่วนประกอบต่าง ๆ เหล่านี้จะมีชนิดและปริมาณแตกต่างกันไปตามชนิดหรือกลุ่มของปลา (Suquet และคณะ, 1993 ; Billard และคณะ,.1995) ดังที่ Morisawa (1983) พบว่าอสุจิของปลาน้ำจืดพวก cyprinidae (ปลาทอง, ปลาไน, crucian carp และ dace) ไม่มีการเคลื่อนไหวเมื่อเจือจางในสารละลาย NaCl, KCl, Manitol หรือ glucose ที่มีค่าออสโมลาลิตีสมดุล (iso-osmolar) กับ seminal plasma (~300 mOsm/kg) แต่อสุจิจะเริ่มมีการเคลื่อนไหวเมื่อสารละลายนั้นมีค่าออสโมลาลิตีต่ำกว่า seminal plasma ก็ทำนองเดียวกับที่ Billard และคณะ,.(1995) ได้ศึกษาในปลาไน พบว่า อสุจิจะไม่เคลื่อนไหว เมื่ออยู่ใน genital tract ของเพศผู้ แต่จะเริ่มเคลื่อนไหวเมื่อถูกปล่อยลงสู่น้ำจืด ซึ่ง osmotic presume ลดลง ในการเจือจางด้วยน้ำจืด โครงสร้างของ flagellum จะมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปอย่างรวดเร็ว และการเคลื่อนไหวจะหยุดภายใน 30 วินาที ในขณะที่เจือจางในสารละลาย 50 mM NaCl ซึ่งมี osmotic เพียงพอต่อการเริ่มเคลื่อนไหวของอสุจิ โครงสร้างของ flagellum ซึ่งมีคุณสมบัติคงเดิม และการเคลื่อนไหวจะค่อย ๆ ลดลงภายใน 1 นาที ซึ่งก็สอดคล้องกับที่เมฆ บุญพรมหมณ์ (2525) เรียบเรียงไว้ว่าเชื้อตัวผู้จะอยู่นิ่งไม่เคลื่อนไหวเมื่ออยู่ในอัณฑะ แต่จะเคลื่อนไหวเมื่อถูกน้ำ ระยะเวลาการเคลื่อนไหวของเชื้อตัวผู้ค่อนข้างสั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิน้ำ เชื้อตัวผู้ของปลาเมืองร้อนเคลื่อนไหวคล่องแคล่วโดยใช้แซ่หางได้เป็นเวลานานเพียงครึ่งนาทีถึงหนึ่งนาที เชื้อตัวผู้มีขนาดเล็กมาก น้ำเชื้อ (milt) หนึ่งลูกบาศก์เซนติเมตรจะมีเชื้อตัวผู้ (sperm) อยู่ประมาณ 10,000-20,000 ล้านตัว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของน้ำเชื้อ

การเคลื่อนไหวของอสุจิสามารถตรวจดูได้จากกล้องจุลทรรศน์ โดยนำหยดเล็ก ๆ ของน้ำเชื้อปลาผสมกับหยดน้ำบนแผ่นสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะพบว่าตัวอสุจิถูกระตุ้นให้มีการเคลื่อนไหวอย่างรุนแรง อันเป็นผลเนื่องมาจากการเจือจาง (dilution effect) แต่การเคลื่อนไหวดังกล่าวจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาประมาณไม่เกิน 1 นาที (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) ในทำนองเดียวกัน Billard and Cosson (1992) ศึกษาการเคลื่อนไหว (motility) ของอสุจิปลา trout และ carp โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อ 2 ครั้ง โดยครั้งแรกจะเจือจางน้ำเชื้อในน้ำยา (80 mM NaCl, 60 mM KCl, 25 mM Tris) ที่ไม่กระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิในอัตรา 1:100 ทั้งนี้เนื่องจากน้ำเชื้อปลาจะข้นและเหนียวมาก ครั้งที่ 2 จะเจือจางด้วยน้ำ ใช้อัตราส่วน 1:20 โดยทำภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าอสุจิมี motility สูง โดยจะมีความถี่ประมาณ 60 Hz จะเคลื่อนไหวเป็นวงกว้างเส้นผ่าศูนย์กลาง >400 μm ในอัตราความเร็ว 250 μm/sec ซึ่งจะเกิดขึ้นภายใน 20 วินาที หลังจากเจือจางด้วยน้ำ หลังจากนั้นอสุจิจะเคลื่อนไหวด้วยความถี่ลดลง <10 Hz และจะหยุดเคลื่อนไหวในที่สุด ภายใน 40 วินาที

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) รายงานว่า การตรวจคุณภาพน้ำเชื้ออาจแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ

1. การตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเพื่อเป็นการคาดคะเนความสามารถในการผสมกับไข่ของตัวอย่างน้ำเชื้อนั้น หรือเพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการศึกษาวิจัยผลกระทบจากปัจจัยต่าง ๆ ต่อคุณภาพน้ำเชื้อ หรือเป็นการหาข้อมูลสำหรับกำหนดอัตราการเจือจาง (น้ำเชื้อ : น้ำยาเจือจาง ปริมาตร/ปริมาตร) ที่เหมาะสมให้น้ำเชื้อที่จะใช้ในการผสมเทียมมีจำนวนตัวอสุจิมากพอที่จะไม่กระทบกระเทือนต่ออัตราการผสมติด ทั้งนี้การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์สามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ 1) การนับจำนวนอสุจิต่อหน่วยปริมาตร 2) การประมาณค่าอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิที่รวมกันเป็นกลุ่มก้อน (mass movement) ก่อนที่จะเจือจางด้วยน้ำยา 3) เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีการเคลื่อนไหว (percent motile sperm) และ 4) การย้อมสีเพื่อจำแนกหาเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิต และอสุจิที่มีลักษณะผิดปกติ

2. การตรวจหาอัตราการผสมกับไข่สด เป็นการนำน้ำเชื้อที่เก็บรักษาไปทดสอบความสามารถที่จะผสมกับไข่สดโดยเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

น้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลา

กฤษณ์ มงคลปัญญา (2536) รายงานว่ามีผู้คิดสูตรน้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาไว้มากมายหลายสิบสูตร ซึ่งหากพิจารณาจากส่วนประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยา พบว่ามีคุณสมบัติดังนี้

1. สูตรน้ำยา ประกอบด้วยอิออนต่าง ๆ ใกล้เคียงกับที่ปรากฏในน้ำเลือดและน้ำยานั้นมีแรงดันออสโมติกใกล้เคียงที่สุดกับแรงดันออสโมติกของน้ำเลือด

2. น้ำยาจะประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นแหล่งพลังงาน และสารเคมี บางตัวทำหน้าที่ ต้าน หรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือมีส่วนประกอบที่เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

3. เป็นน้ำยาที่ปรับปรุงและพัฒนามาจากสูตรน้ำยาที่ใช้อาบหรือหล่อเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดปลา บราวน์ เทรา (Cortland salt solution) หรือของกบ (frog Ringer's solution) ทั้งนี้การปรับปรุงน้ำยาบางสูตร/บางครั้ง ไม่ได้อาศัยทฤษฎีหรือการทดลองใด ๆ เป็นการชี้นำการปรับปรุงนั้นแต่เป็นการกระทำจากผลการลองผิดลองถูกเป็นเกณฑ์

4. สูตรน้ำยายังประกอบด้วย สารไครโอโพรเทคแทนท์ ชนิดใดชนิดหนึ่งหรือหลายชนิดรวมกัน ในกรณีที่ต้องการเจือจางเพื่อการเก็บรักษาแบบแช่แข็ง

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา มี 2 แบบ คือ

1. การเก็บรักษาแบบระยะสั้น เป็นการเก็บรักษาในตู้เย็น หรือถังน้ำแข็งอุณหภูมิ สูงกว่า 0 องศาเซลเซียสเล็กน้อย ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้ สามารถเก็บได้ทั้งสภาพเข้มข้น หรือเจือจางด้วยสารละลายที่มีความเหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาชนิดต่างๆ เช่น อุทัยรัตน์ ณ นคร(2526) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในอุณหภูมิตู้เย็น โดยเก็บในสภาพเข้มข้น และเจือจางด้วยน้ำยา Ringer's solution และ rinsing solution อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 5 ต่อ 3 เก็บรักษาน้ำเชื้อเป็นเวลานาน 24 และ 72 ชั่วโมง จึงนำมาผสมกับไข่สด พบว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในสภาพเข้มข้นมีเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 73.14 และ 18.25% ตามลำดับเวลาการเก็บรักษา ส่วนน้ำเชื้อที่เก็บรักษาใน Ringer's solution มีอัตราการปฏิสนธิเป็น 80.64 และ 38.68% ตามลำดับเวลาการเก็บรักษาซึ่งสูงกว่าใน rinsing solution ที่ให้อัตราการปฏิสนธิเป็น 60.17 และ 3.71% ตามลำดับของระยะเวลาที่เก็บรักษา ในปีต่อมา นลินี มาคแมน (2527) ก็ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวเช่นเดียวกัน โดยศึกษาในน้ำยา 16 สูตร อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 1 ต่อ 3 เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 5-10 องศาเซลเซียส นาน 24, 28 และ 72 ชั่วโมง ผลจากการศึกษา พบว่าน้ำยาสูตรที่ 16 ซึ่งประกอบด้วย $KHCO_3$ 125 mM, sucrose 250 mM และ reduced glutathione 9.75 mM ให้ผลดีกว่าน้ำยาสูตรอื่น ๆ คือ มีเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิเคลื่อนไหวเป็น 76, 71 และ 67% ตามลำดับของระยะเวลาที่เก็บรักษา และในน้ำยาสูตรเดียวกันนี้ (สูตรที่ 16) ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์ และคณะ (2529) ก็นำมาใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแพพา (*Pangasius sanithwongsei*) ในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง แล้วนำมาผสมกับไข่สด ให้อัตราการฟักเป็นตัวถึง 92%

นิศา ไชยรักษ์ และกฤษณ์ มงคลปัญญา (2538) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-6^{0}C นาน 72 ชั่วโมง ในน้ำยา 8 สูตร คือ MC#1, FRS, 0.8% NaCl และ HCO_3 ส่วนสูตรที่ 5-8 เป็นสูตรที่ได้จากการปรับแรงดันออสโมติกสูตรน้ำยา สูตรที่ 1-4 ให้ได้ค่าประมาณ 300 mOsm แล้วนำน้ำเชื้อที่เก็บรักษามาตรวจคุณภาพ โดยดูเปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนไหวและอัตราการปฏิสนธิ พบว่าในน้ำยาสูตรที่ 1-4 สูตร 0.8% NaCl สามารถเก็บน้ำเชื้อได้สูงสุด คือ มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนไหว 6.22±1.56 อัตราการปฏิสนธิ 22.96±11.13 (~ 34% ของน้ำเชื้อสด) ส่วนสูตรน้ำยาที่ปรับความดันออสโมติก (สูตรที่ 5-8) พบว่าทุกสูตรมีความสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีกว่าสูตรที่ 1-4 แต่สูตร 0.85% NaCl (281 mOsm) สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยได้ดีที่สุด คือ มีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่เคลื่อนไหว 8.89±1.11 และเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ 45.17±13.3 (~ 56% ของน้ำเชื้อสด) ผลการทดลองทำนองเดียวกัน จากการศึกษาของ อนงคณ์ หัมพานนท์ และ กฤษณ์ มงคลปัญญา (2539) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในตู้เย็น 0-6^{0}C ในน้ำยากลุ่ม bicarbonate หรือ modified bicarbonate buffer, น้ำเกลือ (0.8 และ 0.85% NaCl), frog Ringers's solution (FRS) และ calcium-free Hank's balanced salt solution (C-FHBSS) พบว่า 0.85% NaCl (282 mOsm/kg pH 7.0) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้ดีที่สุดคือ เมื่อเก็บนาน 78 และ 150 ชั่วโมง มีอสุจิเคลื่อนไหว 70±0 และ 36.7±3.3% และมีอัตราการปฏิสนธิ 59.1±4.5 และ 45.7±5.1% ตามลำดับ

Hulata and Rothbard (1979) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*) ในสภาพเข้มข้นและเจือจางในน้ำยา rinsing solution (0.3% urea, 0.4% NaCl) อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเป็น 5 ต่อ 3 เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส นาน 45 ชั่วโมง เมื่อนำมาผสมกับไข่สดพบว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในสภาพเข้มข้นและเจือจางด้วยน้ำยาให้อัตราการผสมติดไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด ในปีต่อมา Withler (1980) ก็ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อในสภาพเข้มข้นเช่นเดียวกัน โดยศึกษาในปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*), ปลาไน (*Cyprinus carpio*), ปลาตะเพียนขาว (*Pantius gonionotus*) และปลาสวาย (*Pangasuis sutchi*) โดยบรรจุน้ำเชื้อในหลอดฉีดยาพลาสติก เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 2-9 องศาเซลเซียส ผลจากการศึกาพบว่าน้ำเชื้อปลายี่สกเทศหลังจากเก็บรักษานาน 23 นาที นำมาผสมกับไข่ ได้อัตราการปฏิสนธิ 92% ปลาไนหลังจากเก็บรักษานาน 75, 100 และ 210 นาที มีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว 100% แต่เมื่อเก็บรักษานาน 24 ชั่วโมง มีอสุจิเคลื่อนไหวเพียง 2% ในปลาตะเพียนขาวเก็บนาน 5 ½ ชั่วโมง มีอสุจิเคลื่อนไหว 15% และปลาสวายหลังจากเก็บรักษานาน 10, 50 และ 80 นาที มีเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนไหว 100% แต่เมื่อเก็บรักษานาน 18 ชั่วโมง และ 3-5 วัน มีอสุจิเคลื่อนไหว 10 และ 0% ตามลำดับ ในทำนองเดียวกัน Saad *et al.* (1988) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาไนในระยะสั้นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าอัตราการเคลื่อนไหวของอสุจิและอัตราการผสมกับไข่จะสูงในวันที่ 1 และ 2 และจะลดลงเรื่อย ๆ จนเป็น 0 หลังจากเก็บรักษา 6-8 วัน แต่เมื่อเติมสารปฏิชีวนะ (50 μg/ml streptomycin + 50 IU bipenicillin) ในน้ำยา พบว่าในการเก็บรักษา 8 วัน อสุจิยังมีการเคลื่อนไหว 100% เมื่อเก็บรักษานานถึง 16 วันก็ยังมีอัตราการผสมกับไข่ถึง 20%

2. การเก็บรักษาแบบระยะยาว เป็นการเก็บแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้ถ้ามีการเลือกใช้สูตรน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (สารที่ช่วยป้องกันความเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง) ระยะ equilibration time (ช่วงเวลาหลังจากผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนทำการแช่แข็ง) และอัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง รวมทั้งระดับไนโตรเจนเหลวในถังที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ถ้ามีการปฏิบัติและเลือกใช้อย่างถูกต้อง เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิด สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้นานหลายสิบปี เมื่อจะใช้ก็นำออกมาละลายด้วยวิธีการและอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำให้ได้ผลการเพาะฟักผสมเทียมที่มีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด

จากเอกสารงานวิจัยดังกล่าวในเบื้องต้นจะเห็นได้ว่าน้ำเชื้อปลาแต่ละชนิดสามารถเก็บรักษาในน้ำยาแต่ละสูตร ให้อสุจิปลามีชีวิตยืนยาวได้แตกต่างกัน งานวิจัยในครั้งนี้ จึงต้องการที่จะศึกษาสูตรน้ำยาเพื่อยืดระยะการมีชีวิตของอสุจิปลากระบอกดำในการเก็บรักษาในตู้เย็น เพื่อเป็นประโยชน์ในการเพาะขยายพันธุ์ปลากระบอกดำ สามารถแก้ปัญหาการขาดแคลนปลากระบอกดำเพศผู้ในเบื้องต้นได้ และผลจากการศึกษาในครั้งนี้ สามารถนำไปเป็นแนวทางในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำแช่แข็งได้ ซึ่งจะทำการวิจัยต่อไป ทั้งนี้เพื่อเป็นการพัฒนาการเพาะพันธุ์ปลากระบอกดำ และเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ปลากระบอกดำ หรือปลาชนิดอื่น ๆ ต่อไป

องค์ประกอบของน้ำทะเลและความเค็ม

สุมาลี พิตรากูล (2532) รายงานไว้ว่า แร่ธาตุและสารประกอบต่าง ๆ ในน้ำทะเล มักแตกตัวในรูปของไอออน ส่วนใหญ่ คือ ไอออนของโซเดียม และคลอไรด์ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 เกลือแร่ต่าง ๆ ที่ละลายในน้ำทะเลอยู่ในรูปของไอออน

เกลือแร่	ปริมาณ กรัมต่อกิโลกรัมของน้ำทะเล
โซเดียม (Na^+)	10.770
แมกนีเซียม (Mg^{++})	1.300
แคลเซียม (Ca^+)	0.412
โปตัสเซียม (K^+)	0.399
สตรอนเดียม (Sr^{++})	0.008
คลอไรด์ (Cl^-)	19.34
ซัลเฟต (SO_4^-)	2.71
โบรไมด์ (Br^-)	0.067
คาร์บอเนต (CO_3^-)	0.007

องค์ประกอบดังกล่าวทำให้เกิดความเค็มขึ้น หรือกล่าวได้ว่า ความเค็ม (salinity) ของน้ำทะเลเกิดจากเกลือแร่ที่ละลายอยู่ ความเค็ม 1 ซาลินิตี้ (1 ‰) หมายถึง ปริมาณเกลือแร่หนึ่งส่วนในน้ำทะเลหนึ่งพันส่วน ความเค็มของน้ำทะเลมีค่าระหว่าง 34-36 ‰ แต่อาจแปรผันได้ตามฤดูกาล อัตราการระเหยของน้ำ การแข็งตัวของน้ำ ปริมาณการตกของน้ำฝน การผสมของน้ำจืดจากแผ่นดิน การตกตะกอนของเกลือแร่ เป็นต้น

น้ำในแหล่งต่าง ๆ มีค่าความเค็มแตกต่างกัน นับตั้งแต่น้ำจืดซึ่งมีค่าความเค็มต่ำกว่า 0.5 ‰ จนถึงความเค็มจัด 38 ‰ ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าความเค็มของน้ำในแหล่งต่าง ๆ

ค่าความเค็ม ‰	ชนิดของน้ำ
0-0.5	น้ำจืด
0.5-3	น้ำกร่อยน้อย
3-10	น้ำกร่อยปานกลาง
10-17	น้ำกร่อยมาก
17-30	น้ำเค็มน้อย
30-34	น้ำเค็มปานกลาง
34-38	น้ำเค็มมาก
> 38	น้ำเค็มจัด

ค่าความเค็มของน้ำในแต่ละแห่งมีความผันแปรแตกต่างกันตามปัจจัยที่กล่าวข้างต้น บริเวณที่มีความผันแปรมากที่สุด คือ ปากอ่าวและปากแม่น้ำ สิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแถบนี้จะต้องมีความทนทานสูงต่อการเปลี่ยนแปลงค่าความเค็ม โดยปกติแล้ว สิ่งมีชีวิตส่วนใหญ่ในทะเลมีความเข้มข้นของเกลือแร่ภายในร่างกายพอ ๆ กับน้ำทะเล (isotonic) จึงไม่มีปัญหาการควบคุมการออสโมซิส ยกเว้นแต่จะมีการเปลี่ยนแปลงค่าความเค็มอย่างฉับพลัน ซึ่งอาจทำให้ถึงตายได้ ปลาที่ร่างกายมีความเข้มข้นของเกลือแร่ต่ำกว่าภายนอก (hypotonic) จะปรับตัวด้วยการเพิ่มประสิทธิภาพการขับเกลือออกให้ได้มาก ขณะเดียวกันก็พยายามรักษาน้ำที่ได้รับเอาไว้ในร่างกาย

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

อุปกรณ์

1. พ่อแม่พันธุ์ปลากระบอกดำ
2. หลอดทดลองที่มีปริมาตรบอกความจุ (graduated centrifuge tube)
3. หลอดเก็บตัวอย่าง (microcentrifuge tube) ขนาด 2 มิลลิลิตร
4. ที่วางหลอด
5. สไลด์
6. เทอร์โมมิเตอร์
7. กล้องจุลทรรศน์
8. เครื่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง (pH meter)
9. เครื่องวัดความเค็ม (salinometer)
10. ตู้เย็นปรับอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส
11. เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง
12. อุปกรณ์เครื่องแก้วในการเตรียมน้ำยา
13. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมน้ำยา (ตารางที่ 3-5)
14. ยาปฏิชีวนะ (penocep)
15. ชุดอุปกรณ์เครื่องมือผ่าตัด

วิธีการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง

การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยา 5 สูตร

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสปลิทพลอทใน RCBD (split plot design in randomized complete block design) โดยศึกษาน้ำยา 5 สูตร ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำ ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5องศาเซลเซียส ดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในน้ำยาแต่ละสูตร เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดเข้มข้นภายหลังการเก็บรักษา 2 ชั่วโมง และทุกวัน จนกว่าอสุจิจะตายหมด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ปลาเพศผู้ 5-7 ตัว มี 6 ทรีทเมนท์ ดังนี้

ทรีทเมนท์ที่ 1 น้ำเชื้อสด(control)
ทรีทเมนท์ที่ 2 น้ำยา 0.85%NaCl
ทรีทเมนท์ที่ 3 น้ำยา FRS (frog Ringer's solution)
ทรีทเมนท์ที่ 4 น้ำยา CSS (Cortland salt solution)

ทรีทเมนท์ที่ 5 น้ำยา MC#1 (modified cortland's # 1)

ทรีทเมนท์ที่ 6 น้ำยา BCB (bicarbonate buffer)

การเตรียมน้ำยา

ชั่งสารเคมีตามส่วนประกอบของน้ำยาแต่ละสูตร ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 ละลายในน้ำกลั่นและเติมสารปฏิชีวนะ ซึ่งจะใช้ Penosep (ประกอบด้วย penicillin และ streptomycin) 1 กรัม ต่อปริมาตรน้ำยา 1,000 มิลลิลิตร นำน้ำยาที่เตรียมเสร็จแล้วใส่ขวดแก้วที่มีฝาปิดเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ4-5 องศาเซลเซียส

การเตรียมน้ำเชื้อ

เลือกพ่อพันธุ์ปลากระบอกดำที่แข็งแรงสมบูรณ์ ไม่เป็นโรค ไม่บอบช้ำ ซึ่งได้จากการยกบามของชาวประมงบริเวณทะเลสาบสงขลา มีความยาวเหยียด (total length) ประมาณ 16-20 เซนติเมตร น้ำหนัก 60-90 กรัม ตามปกติปลากระบอกดำเป็นปลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อโดยการกดบริเวณท้องปลาได้ แต่ในการทดลองครั้งนี้ปลาไม่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ ถึงแม้จะฉีดฮอร์โมนกระตุ้น หรือออกเพียงนิดหน่อย ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่กักขังปลาไม่เหมาะสมเท่าที่ควร ทำให้ปลามีความเครียดมาก และบอบช้ำ จึงใช้วิธีการผ่าท้องปลาดึงอัณฑะออกมาซับเลือดที่ติดมาให้หมด นำไปชั่งน้ำหนักเพื่อคำนวณหาอัตราส่วนของสารละลายที่จะใช้เจือจางน้ำเชื้อในขั้นต่อไปเพื่อให้สะดวกในการเรียกน้ำเชื้อในการทดลอง จึงได้กำหนดนิยามน้ำเชื้อไว้ดังนี้

น้ำเชื้อสด (undiluted fresh milt) หมายถึง น้ำเชื้อที่ได้จากการบีบน้ำเชื้อจากพูอัณฑะ ทำโดยตัดพูอัณฑะให้แตกแล้วใช้มือบีบให้น้ำเชื้อหยดใส่ microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร ซึ่งใช้ในชุดควบคุม(control) เพื่อใช้เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อเจือจางในน้ำยาแต่ละสูตรเท่านั้น

น้ำเชื้อเจือจาง (diluted milt) หมายถึง น้ำเชื้อที่ได้จากการนำอัณฑะมาบดบี้ในน้ำยาสูตรต่าง ๆ อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยาเท่ากับ 1:6 (อัณฑะ 1 กรัมต่อน้ำยา 6 มิลลิลิตร) โดยนำพูอัณฑะมาตัดแบ่งส่วนให้เท่า ๆ กันสำหรับน้ำยาแต่ละสูตร นำอัณฑะที่ตัดแบ่งแล้วใส่ถุงพลาสติกหนาขนาด 3x5 นิ้ว (ติดฉลากของน้ำยาแต่ละสูตร) ซึ่งในขั้นแรกนี้จะเจือจางอัณฑะต่อน้ำยาในอัตราส่วน 1:1 บดนี้อัณฑะให้แตกในน้ำยาแล้วดูดเอาส่วนที่เป็นของเหลวใส่ใน graduated centrifuge tube (หลอดทดลองที่มีปริมาตรบอกความจุ) หลังจากนั้นจึงใส่น้ำยา ทำการเจือจางต่อให้ครบอัตราส่วน 1 ต่อ 6

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

1. การตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ (motile sperm) ด้วยกล้องจุลทรรศน์ (100x) ซึ่งเป็นการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิทั้งในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อสดเจือจาง หรือน้ำเชื้อเจือจางก่อนหรือหลังการเก็บรักษา โดยหยดน้ำกลั่น (20 ไมโครลิตร) บนสไลด์ ใช้เข็มเขี่ยหรือปลายไม้จิ้มฟันพลาสติกแตะตัวอย่างน้ำเชื้อดังกล่าว (~1 ไมโครลิตร) ลงบนสไลด์ใกล้หยดน้ำ แล้วลากน้ำมาสัมผัสกับน้ำเชื้อในขณะมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ ประเมินอสุจิที่เคลื่อนไหวเป็นเปอร์เซ็นต์ โดยให้ 100% สำหรับอสุจิที่เคลื่อนไหวทั้งหมดภายใน field ที่มองผ่านกล้อง ให้ 50% สำหรับอสุจิที่เคลื่อนไหว

เพียงครึ่งหนึ่งของ field และให้เปอร์เซ็นต์ลดหลั่นกันตามการเคลื่อนไหวที่มองผ่านกล้อง และให้ 0 % สำหรับอสุจิที่ไม่มีการเคลื่อนไหวเลย

2. การตรวจเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ (fertilization) เป็นการตรวจความสามารถของอสุจิในน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในการเข้าผสมกับไข่สด และอัตราฟักออกเป็นตัวของไข่ที่ได้รับการผสม เปรียบเทียบน้ำเชื้อสด แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิได้ เพราะแม่ปลามีความเครียดบอบช้ำ ไข่จึงมีคุณภาพไม่ดี

การปฏิบัติในการทดลองที่ 1

ทดสอบสูตร น้ำยา 5 สูตร คือ น้ำเกลือ (0.85%NaCl) , frog Ringer's solution (FRS) , Cortland salt solution (CSS) , modified Corland's # 1 (MC#1) และ bicarbonate buffer (BCB) (ดังตารางที่ 3) เพื่อใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในอุณหภูมิตู้เย็น 4-5 องศาเซลเซียส ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (ใช้ปลาเพศผู้ 5-7 ตัว/ซ้ำ) ทั้งนี้น้ำหนักอัณฑะจะประมาณ 0.3-0.6 กรัม/ตัว นำมาตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิก่อนนำมาทดลอง เมื่อได้อัณฑะมาแล้วดำเนินการเจือจางน้ำเชื้อตามวิธีการเตรียมน้ำเชื้อเจือจาง และนำน้ำเชื้อเจือจางในน้ำยาแต่ละสูตรมาดูดใส่หลอด microcentrifuge tube ขนาด 2 มิลลิลิตร โดยจะใช้น้ำยาสูตรละ 3 หลอด ใส่ในที่วางหลอด นำไปเก็บรักษาในอุณหภูมิตู้เย็น 4-5 องศาเซลเซียส ทำการเขย่าหลอดน้ำเชื้อวันละ 3 ครั้ง เพื่อให้อสุจิที่ตกตะกอนได้กระจายตัวในน้ำยาอย่างสม่ำเสมอ หรือได้รับออกซิเจน ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อนาน 2 ชั่วโมง และทุกวันจนกว่าอสุจิจะตายหมด ซึ่งการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ ทำโดยดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตามวิธีการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ เพื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในน้ำยาสูตรต่างๆ กับน้ำเชื้อสดที่เก็บรักษาไว้ ทั้งนี้ขณะที่นำน้ำเชื้อออกจากตู้เย็นเพื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อจะใส่ไว้ในกระติกน้ำแข็ง อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส และเมื่อทำการตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเสร็จ ก็นำเข้าเก็บรักษาในตู้เย็นตามเดิม

การทดลองที่ 2 ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบเดียวกับการทดลองที่ 1 ศึกษาน้ำยา10 สูตร (น้ำยาสูตรเดิม5สูตร และน้ำยาสูตรเดิมที่มีการปรับpHเป็น7 อีก 5 สูตร) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำ ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในน้ำยาที่ไม่ปรับ pH เปรียบเทียบกับที่ปรับ pH และน้ำเชื้อสด ภายหลังการเก็บรักษา 2 ชั่วโมง และทุกวัน จนกว่าอสุจิจะตายหมด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ปลาเพศผู้ 8-10 ตัว มี 11 ทรีทเมนท์ ดังนี้

ทรีทเมนท์ที่ 1 น้ำเชื้อสด (control)
ทรีทเมนท์ที่ 2 น้ำยา 0.85%NaCl
ทรีทเมนท์ที่ 3 น้ำยา 0.85%NaCl-1 (first modified 0.85% NaCl)
ทรีทเมนท์ที่ 4 น้ำยา FRS (frog Ringer's solution)

ทรีทเมนท์ที่ 5 น้ำยา FRS-1 (first modified frog Ringer's solution)

ทรีทเมนท์ที่ 6 น้ำยา CSS (Cortland salt solution)

ทรีทเมนท์ที่ 7 น้ำยา CSS-1 (first modified Cortland salt solution)

ทรีทเมนท์ที่ 8 น้ำยา MC#1 (modified Cortland's # 1)

ทรีทเมนท์ที่ 9 น้ำยา MC#1-1 (first modified Cortland's # 1)

ทรีทเมนท์ที่ 10 น้ำยา BCB (bicarbonate buffer)

ทรีทเมนท์ที่ 11 น้ำยา BCB-1 (first modified bicarbonate buffer)

การปฏิบัติในการทดลองที่ 2

ทำการปรับความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำยาจากการทดลองที่ 1 ให้เป็นกลาง (pH=7) โดยแบ่งน้ำยาจากการทดลองที่ 1 มาวัด pH ด้วยเครื่อง pH meter และปรับ pH ของน้ำยาให้เป็นกลาง ถ้าเป็นกรด (pH<7) ปรับโดยเติม 1 N NaOH ถ้าเป็นด่าง (pH>7) ปรับโดยเติม 1 N HCl

และเรียกชื่อใหม่เป็นน้ำเกลือ 1 (0.85% NaCl-1), first modified frog Ringer's solution (FRS-1), first modified Cortland salt solution (CSS-1), first modified Cortland's # 1 (MC#1-1) และ First modified bicarbonate buffer (BCB-1) ดังตารางที่ 4 ส่วนวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ และการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

การทดลองที่ 3 ปรับสูตรน้ำยา

การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบเดียวกับการทดลองที่ 1 ศึกษาน้ำยา10 สูตร (น้ำยาสูตรเดิม5สูตร.ในการทดลองที่1 และน้ำยาสูตรใหม่ที่มีการปรับปริมาณสารเคมี อีก5สูตร) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำ ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในน้ำยาสูตรเดิมเปรียบเทียบกับน้ำยาที่ปรับสูตรใหม่ และน้ำเชื้อสด ภายหลังการเก็บรักษา 2 ชั่วโมง และทุกวัน จนกว่าอสุจิจะตายหมด ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำใช้ปลาเพศผู้ 8-10 ตัว มี 11 ทรีทเมนท์ ดังนี้

ทรีทเมนท์ที่ 1 น้ำเชื้อสด (control)

ทรีทเมนท์ที่ 2 น้ำยา 0.85%NaCl

ทรีทเมนท์ที่ 3 น้ำยา 2%NaCl

ทรีทเมนท์ที่ 4 น้ำยา FRS (frog Ringer's solution)

ทรีทเมนท์ที่ 5 น้ำยา FRS-2 (second modified frog Ringer's solution)

ทรีทเมนท์ที่ 6 น้ำยา CSS (Cortland salt solution)

ทรีทเมนท์ที่ 7 น้ำยา CSS-2 (second modified Cortland salt solution)

ทรีทเมนท์ที่ 8 น้ำยา MC#1 (modified Cortland's # 1)

ทรีทเมนท์ที่ 9 น้ำยา MC#1-2 (second modified Cortland's # 1)

ทรีทเมนท์ที่ 10 น้ำยา BCB (bicarbonate buffer)

ทรีทเมนท์ที่ 11 น้ำยา BCB-2 (second modified bicarbonate buffer)

การปฏิบัติในการทดลองที่ 3

เตรียมน้ำยาใหม่โดยปรับสูตรน้ำยา จากการทดลองที่ 1 ให้มีปริมาณสารเคมีในสูตรน้ำยาเพิ่มขึ้น หรือลดลงจากเดิม ทั้งนี้เนื่องจากสูตรน้ำยาทุกสูตร เมื่อใช้เจือจางน้ำเชื้อแล้ว พบว่าอสุจิมีการเคลื่อนไหว (20-4 %) และจากการดูองค์ประกองของน้ำทะเล จึงเห็นได้ว่าแร่ธาตุและสารประกอบต่าง ๆ ในน้ำทะเล มักแตกตัวในรูปของไอออนส่วนใหญ่ คือ ไอออนของโซเดียม (Na^+) และคลอไรด์ (Cl^-) โดยมีโซเดียม 10 กรัม/กิโลกรัมของน้ำทะเล และคลอไรด์ 19.34 กรัม/กิโลกรัมน้ำทะเล ซึ่งปลากระบอกจัดเป็นปลาน้ำกร่อย (ความเค็มน้ำ 0.5-17 ppt) แต่ก็สามารถอยู่ในน้ำที่มีความเค็มน้อย – เค็มมาก (17-38 ppt) ได้ จึงปรับสูตรน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อโดยเพิ่มปริมาณ NaCl ประมาณ 2 เท่าของสูตรเดิม ในน้ำยาที่มี NaCl เป็นส่วนประกอบ คือ สูตร 0.85%NaCl ปรับเป็น 2%NaCl สูตร FRS เพิ่มปริมาณ NaCl เป็น 13 กรัม/ลิตร เรียกชื่อใหม่เป็น second modified frog Ringer's solution (FRS-2) สูตร CSS เพิ่มปริมาณ NaCl เป็น 14.5 กรัม/ลิตร เรียกชื่อใหม่เป็น second modified Cortland salt solution (CSS-2) สูตร MC#1 เพิ่มปริมาณ NaCl เป็น 3.76 กรัม/ลิตร เรียกชื่อใหม่เป็น second modified Cortland's #1 (MC#1-2) และ BCB ลดปริมาณ sucrose ลงครึ่งหนึ่งเป็น 42.75 กรัม/ลิตร เรียกชื่อใหม่เป็น second bicarbonate buffer (BCB-2) ดังตารางที่ 5 ส่วนวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ และการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 และ 2

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 3 ส่วนประกอบทางเคมี และ pH ของน้ำยาสูตรต่างๆ ในการทดลองที่ 1 เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ	สูตรน้ำยา				
(กรัม)	0.85%NaCl	FRS	CSS	MC # 1	BCB
NaCl	8.5	6.5	7.25	1.88	-
KCl	-	0.14	0.38	7.20	-
$CaCl_2.2H_2O$	-	0.16	0.23	0.17	-
NaH_2PO_4	-	-	-	0.36	-
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	-	0.41	-	-
$NaHCO_3$	-	0.2	1	-	-
$MgSO_4.7H_2O$	-	0.39	0.23	0.23	-
glucose	-	-	1	1	-
$KHCO_3$	-	-	-	-	12.5
sucrose	-	-	-	-	85.5
reduced glutathione	-	-	-	-	3
น้ำกลั่น	เติมจนครบ 1,000 มิลลิลิตร				
pH	6.2	7.5	7.6	5.5	8.8

หมายเหตุ น้ำยาแต่ละสูตรประกอบด้วย penicillin 500 IU และ streptomycin 1 มิลลิกรัมในน้ำยา 1 มิลลิลิตร

FRS คือ frong Ringer's solution

CSS คือ Cortland salt solution

MC#1 คือ modified Cortland's # 1

BCB คือ bicarbonate buffer

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบทางเคมี และ pH ของน้ำยาสูตรต่างๆ ในการทดลองที่ 2 เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

ส่วนประกอบ (กรัม)	สูตรน้ำยา									
	0.85% NaCl	0.85% NaCl-1	FRS	FRS-1	CSS	CSS-1	MC#1	MC#1-1	BCB	BCB-1
NaCl	8.5	8.5	6.5	6.5	7.25	7.25	1.88	1.88	-	-
KCl	-	-	0.14	0.14	0.38	0.38	7.2	7.2	-	-
$CaCl_2.2H_2O$	-	-	0.16	0.16	0.23	0.23	0.17	0.17	-	-
NaH_2PO_4	-	-	-	-	-	-	0.36	0.36	-	-
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	-	-	-	0.41	0.41	-	-	-	-
$NaHCO_3$	-	-	0.2	0.2	1	1	-	-	-	-
$MgSO4.7H_2O$	-	-	0.39	0.39	0.23	0.23	0.23	0.23	-	-
glucose	-	-	-	-	1	1	1	1	-	-
$KHCO_3$	-	-	-	-	-	-	-	-	12.5	12.5
sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	85.5	85.5
reduced glutathione	-	-	-	-	-	-	-	-	3.0	3
น้ำกลั่น	เติมจนครบ 1,000 มิลลิลิตร									
pH	6.2	7	7.5	7	7.6	7	5.5	7	8.8	7

หมายเหตุ น้ำยาแต่ละสูตรประกอบด้วย penicillin 500 IU และ streptomycin 1 มิลลิกรัมในน้ำยา 1 มิลลิลิตร

FRS คือ frong Ringer's solution

FRS-1 คือ first modified frong Ringer's solution

CSS คือ Cortland salt solution

CSS-1 คือ first modified Cortland salt solution

MC#1 คือ modified Cortland's # 1

MC#1-1 คือ first modified Cortland's # 1

BCB คือ bicarbonate buffer

BCB-1 คือ first modified bicarbonate buffer

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 5 ส่วนประกอบทางเคมี และ pH ของน้ำยาสูตรต่างๆ ในการทดลองที่ 3 เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

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

หมายเหตุ น้ำยาแต่ละสูตรประกอบด้วย penicillin 500 IU และ streptomycin 1 มิลลิกรัมในน้ำยา 1 มิลลิลิตร

FRS คือ frong Ringer's solution

FRS-2 คือ second modified frong Ringer's solution

CSS คือ Cortland salt solution

CSS-2 คือ second modified Cortland salt solution

MC#1 คือ modified Cortland's # 1

MC#1-2 คือ second modified Cortland's # 1

BCB คือ bicarbonate buffer

BCB-2 คือ second modified bicarbonate buffer

การเก็บข้อมูล

1. น้ำหนัก และความยาวของปลากระบอกดำที่ใช้ในการทดลอง
2. เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำที่ใช้ทำการทดลอง
3. เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำที่เก็บรักษาในน้ำยา และน้ำเชื้อสดในวันแรก (2 ชั่วโมง) และทุกวันจนกว่าอสุจิจนตายหมด
4. ระยะเวลาในการมีชีวิตของอสุจิปลาในน้ำยาแต่ละสูตร และน้ำเชื้อสดที่เก็บรักษา
5. คุณสมบัติทางเคมีของน้ำยา เช่น ความเป็นกรดเป็นด่าง ความเค็ม

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในน้ำยาแต่ละสูตร และน้ำเชื้อสด ที่เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง และทุกวันจนกว่าอสุจิจะตายหมด โดยใช้วิธีวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ซึ่งวางแผนการทดลองแบบสปลิทพลอทใน RCBD (split plot design inrandomized complete block design) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของทรีทเมนท์ ตามวิธี Duncan's new multiple range test โดยใช้คอมพิวเตอร์โปรแกรม spss version 11.0

สถานที่ทำการทดลอง

อาคารปฏิบัติการโปรแกรมวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ระยะเวลาที่ทำการทดลอง

เริ่มการทดลอง เดือน กันยายน พ.ศ. 2549

สิ้นสุดการทดลอง เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2550

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยา 5 สูตร การทดลองที่ 2 ปรับความเป็นกรดเป็นด่าง(pH) ของน้ำยาในการทดลองที่ 1 และการทดลองที่ 3 ปรับสูตรน้ำยาในการทดลองที่ 1 มีผลการศึกษาดังนี้

ประสิทธิภาพของน้ำยา 5 สูตร

จากการทดลองที่ 1 เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำด้วยน้ำยา 5 สูตร คือ 0.85%NaCl, FRS, CSS, MC#1 และ BCB ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส และทำการตรวจดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ ภายหลังการเก็บรักษา 2 ชั่วโมง และทุกวันจนกว่าอสุจิจะตายหมด ผลการทดลองดังตารางที่ 6 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าสูตรน้ำยา และระยะเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางผนวกที่ 2) จากการทดลองพบว่าน้ำยาสูตร 0.85%NaCl, FRS, CSS และ MC#1 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานถึง 7 วัน (วันที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเป็น 0% ทุกสูตร) โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ยรวมเป็น 48, 57.9, 58.9, 55.4% ตามลำดับ ส่วนน้ำยา BCB และน้ำเชื้อสด สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เพียง 3 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ยรวมเป็น 15.8 และ 17.5% ตามลำดับ

อสุจิมีการเคลื่อนไหวสูงสุดเมื่อเก็บรักษาในน้ำยา CSS ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กับน้ำยา FRS และ MC#1 ที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิรองลงมาตามลำดับ แต่ทั้งนี้น้ำยาสูตร CSS, FRS และ MC#1 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิสูงกว่าแตกต่างทางสถิติ($P<0.05$) กับน้ำยา 0.85%NaCl, BCB และน้ำเชื้อสด ส่วนน้ำยา BCB มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อต่ำสุด ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) กับน้ำเชื้อสด

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 1 ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยาสูตรต่าง ๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ,1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน

สูตรน้ำยา	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ								
	2 ชั่วโมง	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน	เฉลี่ยรวม
0.85%NaCl	90	76.7	66.7	56.7	43.3	33.3	11.7	5.3	48 [b]
FRS	90	86.7	86.7	73.3	60	43.3	16.7	6.7	57.9 [a]
CSS	90	86.7	80	70	60	53.3	23.3	8.3	58.9 [a]
MC#1	90	83.3	80	70	56.7	40	16.7	6.7	55.4 [a]
BCB	83.3	23.3	15	5	0	0	0	0	15.8 [c]
น้ำเชื้อสด	90	33.3	11.7	5	0	0	0	0	17.5 [c]

หมายเหตุ อักษร a, b, และ c แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ของสูตรน้ำยา และน้ำเชื้อสด(control)

ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำยา

จากการทดลองที่ 2 ทำการปรับความเป็นกรดเป็นด่าง ของน้ำยาในการทดลองที่ 1 ให้เป็นกลาง (pH=7) จากสูตรเดิม 5 สูตร คือ 0.85%NaCl, FRS, CSS, MC#1 และ BCB มี pH เป็น 6.2, 7.5, 7.6, 5.5 และ 8.8 ตามลำดับ ภายหลังปรับ pH เป็น 7 เรียกชื่อใหม่เป็น 0.85%NaCl-1, FRS-1, CSS-1, MC#1-1 และ BCB-1 นำน้ำยาทั้ง 10 สูตร มาเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ตรวจดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิภายหลังการเก็บรักษา 2 ชั่วโมง และทุกวันจนกว่าอสุจิจะตายหมด ผลการทดลองดังตารางที่ 7 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าสูตรน้ำยา และระยะเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางผนวกที่ 3) พบว่าผลการทดลองเป็นไปทำนองเดียวกันกับการทดลองที่ 1 คือน้ำยาสูตร 0.85%NaCl, 0.85%NaCl-1, FRS. FRS-1, CSS, CSS-1, MC#1 และ MC#1-1 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 7 วัน (วันที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเป็น 0% ทุกสูตร) โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ยรวมเป็น 49.8, 50, 55, 57.1, 58.6, 58.2, 55 และ 55.6% ตามลำดับ ส่วนน้ำยา BCB, BCB-1 และน้ำเชื้อสดเข้มข้นสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เพียง 3 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ยรวมเป็น 16.9, 16.5 และ 22.3% ตามลำดับ

น้ำยาสูตรเดียวกันที่ไม่ปรับ pH และปรับ pHเป็น 7 มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยอสุจิมีการเคลื่อนไหวสูงสุดเมื่อเก็บรักษาในน้ำยา CSS ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) กับน้ำยา CSS-1, FRS-1, MC#1-1, MC#1, และ FRS ที่มีเปอร์เซ็นต์การ

เคลื่อนไหวของอสุจิรองลงมาตามลำดับ แต่ทั้งนี้น้ำยาสูตร CSS, CSS-1, FRS, FRS-1, MC#1 และ MC#1-1 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิสูงกว่าแตกต่างทางสถิติ($P<0.05$) กับน้ำยา 0.85%NaCl, 0.85%NaCl-1, BCB, BCB-1 และน้ำเชื้อสด

ความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำยา 0.85%NaCl, FRS, CSS, MC#1 และ BCB มีค่าเป็น6.2, 7.5, 7.6, 5.5, และ 8.8 ตามลำดับ และเมื่อปรับความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำยาดังกล่าวให้มีค่าเป็นกลาง(pH =7) (สูตร0.85%NaCl-1, FRS-1, CSS-1, MC#1-1 และ BCB-1 ตามลำดับ) ดังตารางที่ 9 ซึ่งจะเห็นได้ว่าค่าความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำยาทั้ง 10 สูตรมีผลต่างเป็น 0.8, 0.5, 0.6, 1.5, และ 1.8 ตามลำดับสูตรน้ำยา และเมื่อนำคู่น้ำยาที่ปรับpH เป็น 7 และไม่ปรับ pH มาเก็บรักษาน้ำเชื้อมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ดังนั้นการเพิ่มหรือลดความเป็นกรดเป็นด่างช่วง 0.5-1.8 ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ อังสุนีย์ ชุณหปราณ (2537) ที่พบว่าปลากระบอกเป็นปลาที่สามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีสภาพแวดล้อมพิสัยกว้าง ความเป็นกรดเป็นด่าง ตั้งแต่ 4.5-9

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 2 ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยาสูตรต่าง ๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน

สูตรน้ำยา	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ								
	2 ชั่วโมง	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน	เฉลี่ยรวม
0.85% NaCl	90	80	76.7	70	46.7	20	13.3	2	49.8 [b]
0.85% NaCl-1	90	80	76.7	66.7	46.7	20	16.7	3.7	50 [b]
FRS	90	83.3	83.3	73.3	63.3	30	13.3	3.7	55 [a]
FRS-1	90	80	80	76.7	70	33.3	20	6.7	57.1 [a]
CSS	90	86.7	80	73.3	63.3	53.3	16.7	5.3	58.6 [a]
CSS-1	90	83.3	80	73.3	63.3	56.7	13.3	5.3	58.2 [a]
MC#1	90	83.3	83.3	73.3	56.7	33.3	16.7	3.7	55 [a]
MC#1-1	90	86.7	86.7	76.7	53.3	33.3	13.3	5	55.6 [a]
BCB	86.7	23.3	16.7	8.3	0	0	0	0	16.9 [d]
BCB-1	83.3	23.3	16.7	8.3	0	0	0	0	16.5 [d]
น้ำเชื้อสด	90	53.3	26.7	8.3	0	0	0	0	22.3 [c]

หมายเหตุ อักษร a, b, c, และ d แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ของสูตรน้ำยา และน้ำเชื้อสด (control)

การปรับสูตรน้ำยา

จากการทดลองที่ 3 ปรับสูตรน้ำยาทั้งหมดจากการทดลองที่ 1 โดยเพิ่มปริมาณ NaCl ประมาณ 2 เท่าของสูตรเดิมในน้ำยาที่มี NaCl เป็นส่วนประกอบ ทั้งนี้เพราะอสุจิมีการเคลื่อนไหวในน้ำยาก่อนการเก็บรักษา เรียกชื่อใหม่เป็น 2%NaCl, FRS-2, CSS-2 และ MC#1-2 ส่วนสูตร BCB ซึ่งไม่มี NaCl เป็นส่วนประกอบจะปรับโดยลดปริมาณ sucrose ลงครึ่งหนึ่ง เรียกชื่อใหม่เป็น BCB-2 นำน้ำยาก่อนปรับสูตรและหลังปรับสูตรแล้วรวม 10 สูตร มาเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำ ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ตรวจดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิภายหลังการเก็บรักษา 2 ชั่วโมงและทุกวันจนกว่าอสุจิจะตายหมด ผลการทดลองดังตารางที่ 8 จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าสูตรน้ำยา และระยะเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อ มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางผนวกที่ 4) พบว่าผลการทดลองเป็นไปทำนองเดียวกันกับการทดลองที่ 1 และ 2 คือน้ำยาสูตร 0.85% NaCl, FRS, FRS-2, CSS, CSS-2, MC#1 และ MC#1-2 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 7 วัน (วันที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเป็น 0% ทุกสูตร) โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ยรวมเป็น 49.4, 55.1, 60.8, 56.3, 43, 55.7, และ 53.4% ตามลำดับ ส่วนสูตร 2%NaCl สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 5 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ยรวมเป็น 38.3% ในขณะที่น้ำยาสูตร BCB, BCB-1 และน้ำเชื้อสดเข้มข้นสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เพียง 3 วัน โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ยรวมเป็น 17.5, 19 และ 23.8% ตามลำดับ

จากการปรับสูตรน้ำยาโดยเพิ่มปริมาณ NaCl ประมาณ 2 เท่าของสูตรเดิม สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีขึ้นในสูตร FRS-2 โดยมีผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ยรวมสูงสุด60.8% แตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับน้ำยาสูตรอื่นๆ และน้ำเชื้อสด สาเหตุที่สูตร FRS-2 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ดีขึ้น น่าจะเป็นเพราะเมื่อเพิ่มปริมาณ NaCl จาก 6.5 กรัม/ลิตร เป็น 13 กรัม/ลิตร ทำให้น้ำยามีความเหมาะสมที่จะเก็บรักษาเซลล์อสุจิปลากระบอกดำซึ่งเป็นปลาน้ำกร่อยได้ดีขึ้น เป็นที่น่าสังเกตว่าน้ำยา สูตร FRS-2 มีชนิดและปริมาณของสารเคมีที่ประกอบในสูตรใกล้เคียงกับน้ำยา MFR (Marine Fish Ringer) ซึ่งเป็นน้ำยาริงเกอร์สำหรับปลาทะเล ที่เรณู ยาชิโร และคณะ (2542) ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาหมอทะเล (*Epinephelus lanceolatus*) โดยวิธีแช่เย็น พบว่าน้ำยาสูตร MFR สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาหมอทะเลได้ดีเช่นเดียวกัน มีผลเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตสูง 98.21% ส่วนน้ำยากลุ่ม CSS และกลุ่มเกลือผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อไม่ดีขึ้นจากเดิม โดยน้ำยาสูตร 2%NaCl มีผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ยน้อยกว่า($P<0.05$) สูตร 0.85%NaCl ส่วนน้ำยากลุ่ม MC#1 และ BCB มีผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อไม่แตกต่างจากเดิม($P>0.05$) ทั้งนี้น้ำยาสูตร BCB, BCB-2 มีผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิต่ำสุด ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับน้ำยาสูตรอื่นๆ และน้ำเชื้อสด

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อภายหลังการเก็บรักษาในการทดลองครั้งนี้ ทำโดยการตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิซึ่งเป็นการคาดคะเนอสุจิที่มีชีวิตก่อนที่จะไปตรวจหาอัตราการผสมกับไข่สด แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจหาอัตราการผสมกับไข่สดได้เพราะแม่ปลามีความเครียด เนื่องจากการกักขัง ทำให้คุณภาพไม่ดี แต่ทั้งนี้โดยส่วนใหญ่อัตราการผสมกับไข่สดจะ

มีจำนวนเปอร์เซ็นต์สูงกว่าจำนวนเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิจากการคาดคะเน หรือแม้บางครั้งการเคลื่อนไหวเป็น 0% แต่ยังมีอัตราการผสมติด 2-3% ดังเช่นการทดลองของอนงคณ์ หัมพานนท์ และกฤษณ์ มงคลปัญญา (2539) ทำการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในตู้เย็น ในน้ำยาสูตรต่าง ๆ พบว่าสูตร BCB-1, BCB-3, และ BCB-5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเป็น 0% แต่ให้เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิประมาณ 2-2.4% และการทดลองของนิศา ไชยรักษ์ และกฤษณ์ มงคลปัญญา(2538) ซึ่งทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย โดยใช้น้ำยาสูตรต่าง ๆ พบว่าสูตร MC#1 การเคลื่อนไหวของอสุจิ 0% ให้อัตราการผสมติด 2% เช่นกัน

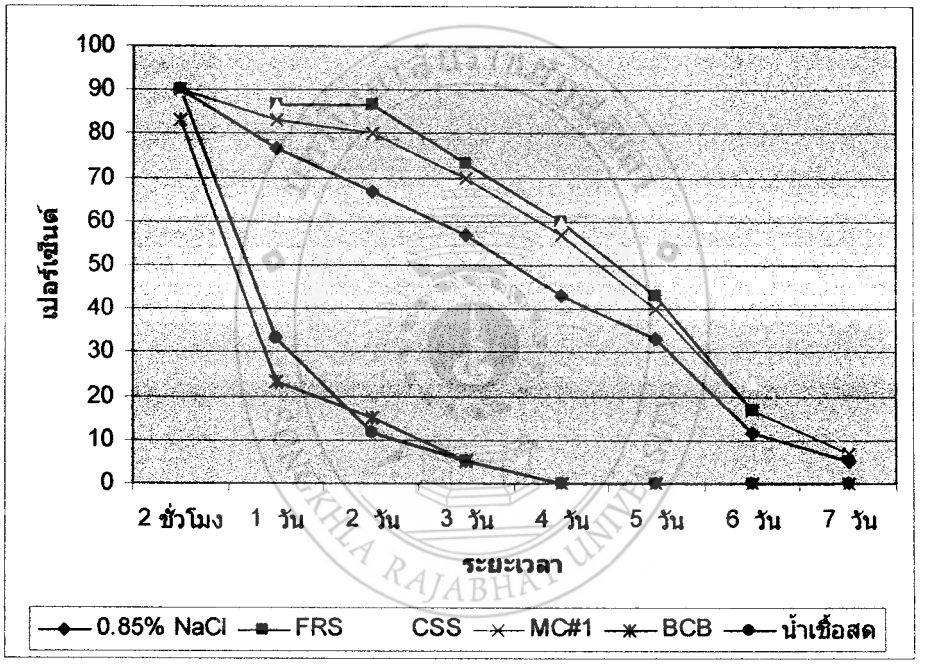
ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 3 ภายหลังการเก็บรักษาน้ำเชื้อในน้ำยาสูตรต่าง ๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน

สูตรน้ำยา	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ								
	2 ชั่วโมง	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน	เฉลี่ยรวม
0.85% NaCl	90	83.3	80	63.3	43.3	23.3	8.3	3.7	49.4 [d]
2% NaCl	90	73.3	73.3	46.7	16.7	6.7	0	0	38.3 [f]
FRS	90	83.3	76.7	73.3	60	36.7	16.7	3.7	55.1 [bc]
FRS-2	90	86.7	86.7	80	63.3	46.7	20	13.3	60.8 [a]
CSS	90	86.7	86.7	76.7	56.7	36.7	13.3	3.7	56.3 [b]
CSS-2	90	76.7	63.3	56.7	36.7	13.3	5	2.3	43 [e]
MC#1	90	86.7	86.7	76.7	53.3	30	16.7	5.3	55.7 [bc]
MC#1-2	90	83.3	83.3	76.7	50	26.7	11.7	5.3	53.4 [c]
BCB	83.3	26.7	20	10	0	0	0	0	17.5 [h]
BCB-2	83.3	36.7	23.3	8.3	0	0	0	0	19 [h]
น้ำเชื้อสด	90	50	36.7	13.3	0	0	0	0	23.8 [g]

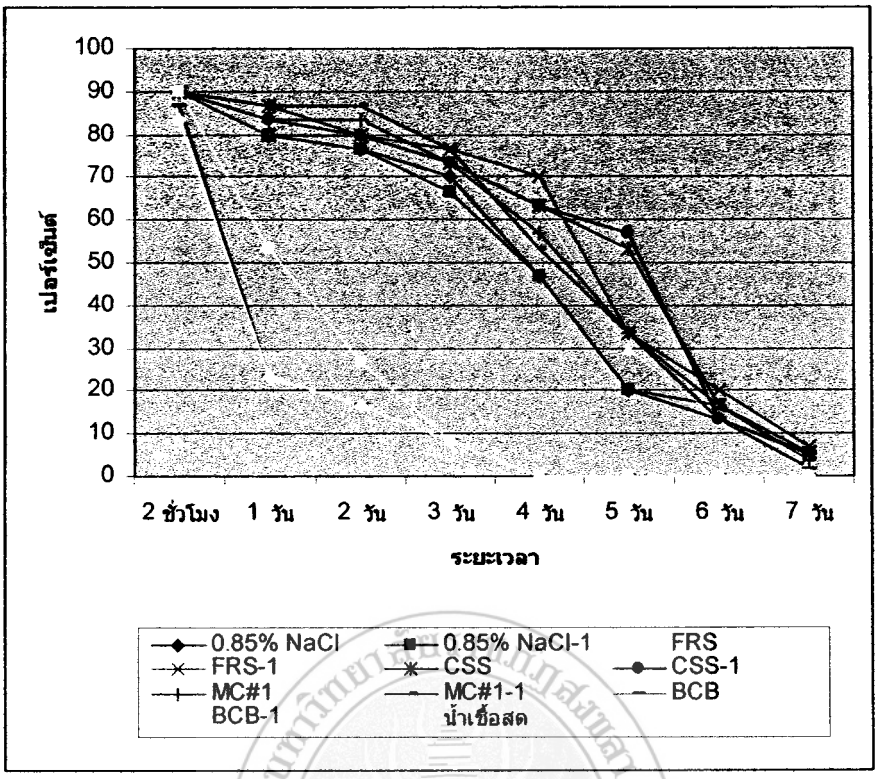
หมายเหตุ อักษร a, b, c, d, e และ f แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ของ สูตรน้ำยาและน้ำเชื้อสด (control)

ระยะเวลาในการเก็บรักษา

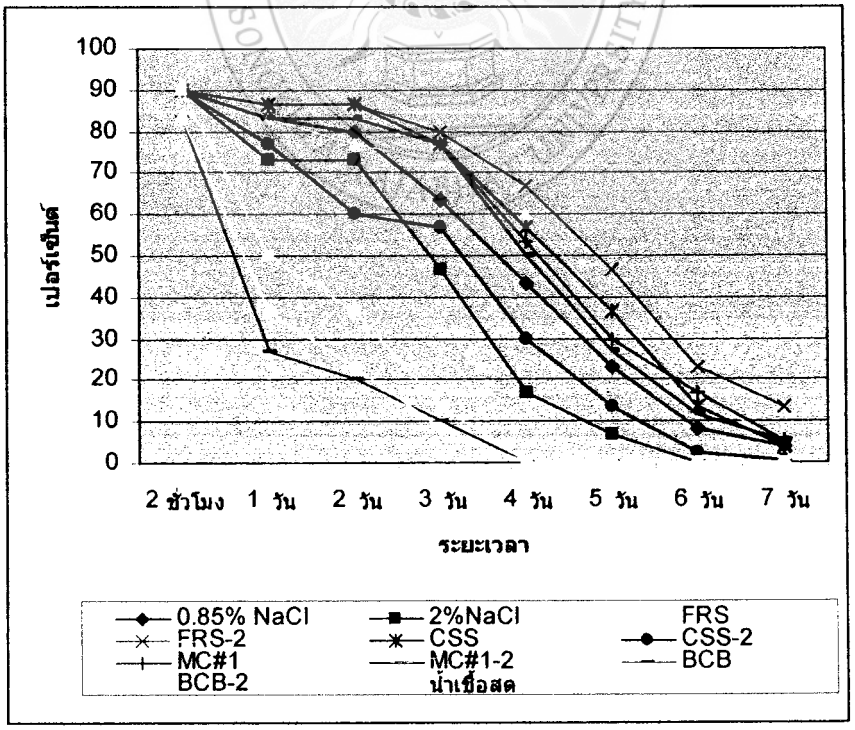
ระยะเวลามีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำในการเก็บรักษา ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส โดยน้ำยากลุ่ม NaCl, FRS, CSS และ MC#1 ในการทดลองที่ 1, 2 และ 3 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 5-7 วัน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในวันที่ 7 ประมาณ 2-13 % จากภาพที่ 1, 2 และ 3 ลักษณะของเส้นกราฟไปในทำนองเดียวกัน ความชันของกราฟในวันที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิประมาณ 46-80 % แตกต่างจากน้ำยากลุ่ม BCB และน้ำเชื้อสดที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ประมาณ 3 วัน ลักษณะกราฟในภาพที่ 1, 2 และ 3 ก็ไปในทำนองเดียวกันโดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในวันที่ 3 ประมาณ 5-13% ซึ่งเท่ากับน้ำยากลุ่มNaCl, FRS, CSS, และ MC#1 เก็บรักษาน้ำเชื้อนาน 5-7 วัน



ภาพที่ 1 กราฟเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 1



ภาพที่ 2 กราฟเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 2



ภาพที่ 3 กราฟเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ในการทดลองที่ 3

ค่าความเค็มของน้ำยา

จากการนำน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ ในการทดลองที่ 1, 2 และ 3 มาวัดค่าความเค็มหรือวัดปริมาณเกลือแร่ที่ละลาย ด้วยเครื่อง salinometer มีผลดังตารางที่ 9 จากผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อในการทดลองที่ 3 น้ำยาสูตร FRS-2 ซึ่งเพิ่มปริมาณ NaCl ในสูตรน้ำยา FRS จาก 6.5 กรัม เป็น 13 กรัม (ตารางที่ 5) สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้ดี โดยสูตร FRS-2 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิสูงกว่า ($P<0.05$) สูตร FRS ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากเมื่อเพิ่มปริมาณ NaCl ก็ทำให้ค่าความเค็มของสูตรน้ำยาเพิ่มขึ้น จากเดิม 10 ppt เป็น 17 ppt จึงน่าจะเหมาะสมกับเซลล์อสุจิปลากระบอกดำมากกว่า เพราะปลากระบอกดำเป็นปลาที่อาศัยได้ทั้งน้ำกร่อย (ความเค็มน้ำ 0.5-17 ppt) และน้ำเค็มน้อย-เค็มมาก (ความเค็มน้ำ 17-38 ppt) อีกทั้งสูตร FRS-2 ก็มีอิออน Na^+ และ Cl^- ใกล้เคียงกับน้ำทะเลซึ่งสอดคล้องกับสมสุข มัจฉาชีพ (2524) ที่รายงานว่าค่าเฉลี่ยความเค็มของน้ำทะเลมีซาลินีทีเท่ากับ 35 ซึ่งหมายถึงในน้ำทะเล 1 ลิตร มีเกลือแร่ต่าง ๆ รวมกันอยู่ 35 กรัม และเกลือแร่ต่าง ๆ ที่ละลายอยู่ในน้ำทะเลจะแตกตัวอยู่ในรูปอิออน ซึ่งส่วนใหญ่เป็นอิออนของ Na^+ (10.7 กรัม) และ Cl^- (19.3 กรัม) ซึ่งผลในทำนองเดียวกัน น้ำยาสูตร MC#1, CSS, FRS, MC#1-2, และ 0.85% NaCl ก็สามารถใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้ดีรองลงมาตามลำดับ ทั้งนี้สูตรน้ำยาเหล่านี้ต่างก็มีค่าความเค็มอยู่ในช่วง 10-18 ppt แตกต่างจากน้ำยาในกลุ่ม BCB ซึ่งเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกได้ไม่ดี มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในวันที่ 3 ประมาณ 5-10% และจะตายหมดในวันที่ 4 ของการเก็บรักษา ทั้งนี้น่าจะมากจากสาเหตุที่น้ำยามีความเข้มข้นหรือมีปริมาณเกลือแร่ที่ละลายสูงเกินไป เพราะน้ำยาสูตร BCB มีปริมาณ sucrose 85.5 มิลลิลิตร วัดค่าความเค็มได้ 70 ppt และเมื่อปรับสูตรโดยลดปริมาณ sucrose ลงครึ่งหนึ่งเหลือ 42.75 กรัม/ลิตร วัดค่าความเค็มได้ 25 ppt ซึ่งปริมาณเกลือแร่ที่ละลายก็ยังสูงเกินไป อสุจิปลากระบอกดำจึงไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ประกอบกับ sucrose จัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ซึ่งทำหน้าที่ป้องกันอันตราย หรือช่วยรักษาความเสียหายแก่เซลล์ในการแช่แข็ง (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) แต่การเก็บรักษาน้ำเชื้อในครั้งนี้ทำการเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส ยังมิใช่การแช่แข็ง sucrose จึงอาจจะเป็นอันตรายต่อเซลล์ เมื่อใช้ในปริมาณมาก

ทำการทดลองเพิ่มเติมในน้ำยากลุ่มเกลือ(NaCl) ซึ่งประกอบด้วยสูตรที่มีความเข้ม 0.85, 1, 2, และ 5%NaCl นำมาเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็นดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิภายหลังการเก็บรักษามีผลการทดลองดังตารางผนวกที่ 1 น้ำยากลุ่มเกลือระดับความเข้มข้นดังกล่าวมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิเฉลี่ยรวมเป็น 47.8, 46.1, 35.4 และ 0% ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบทางสถิติจะเห็นได้ว่า น้ำยาสูตร 0.85 และ 1%NaCl มีค่าความเค็ม 10 และ 12 ppt มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิไม่แตกต่างกัน($P>0.05$) และสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 7 วัน ส่วนสูตร 2%NaCl มีค่าความเค็ม 20 ppt มีผลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิต่ำกว่า($P<0.05$) และสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 5 วัน ในขณะที่ระดับความเข้มข้น 5%NaCl มีค่าความเค็ม 45 ppt ไม่สามารถสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้ เพราะอสุจิจะตายภายหลังการเก็บรักษาเพียง 2 ชั่วโมง ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากค่าความเค็มที่สูงเกินอาจจะทำลายเซลล์อสุจิปลากระบอกดำ

ตารางที่ 9 ความเป็นกรดเป็นด่าง และความเค็มของน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในตู้เย็น อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

สูตรน้ำยา	ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH)	ความเค็ม (ppt)
0.85%NaCl	6.2	10
0.85%NaCl-1	7.0	10
1%NaCl	6.3	12
2%NaCl	6.9	20
5%NaCl	7.7	45
FRS	7.5	10
FRS-1	7	10
FRS-2	7.8	17
CSS	7.6	13
CSS-1	7	13
CSS-2	7.8	18
MC#1	5.5	12
MC#1-1	7	12
MC#1-2	6.0	13
BCB	8.8	70
BCB-1	7	70
BCB-2	8.5	25

ค่าออสโมลาลิตีต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ

ออสโมลาลิตี (osmolality) หรือ แรงดันออสโมติกมีความสำคัญในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา โดยสูตรน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อควรมีค่าออสโมลาลิตีใกล้เคียงกับออสโมลาลิตีของน้ำเลือด (blood serum) ของเหลวในน้ำเชื้อ (seminal fluid) ทั้งนี้เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนไหว หรือใช้พลังงานของตัวอสุจิ ตลอดจนการรักษาให้ตัวอสุจิคงรูป และมีชีวิตอยู่รอดตลอดเวลาที่เก็บรักษา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้วัดค่าออสโมลาลิตีของน้ำยา น้ำเลือด หรือของเหลวในน้ำเชื้อปลากระบอกดำ เพราะไม่สามารถหาเครื่องวัดออสโมลาลิตีได้ (เครื่อง vapor pressure osmometer) แต่ทั้งนี้ได้เปรียบเทียบกับการทดลองของ นิศา ไชยรักษ์ (2539) ซึ่งใช้น้ำยาสูตร 0.85%NaCl, FRS, MC#1 และ BCB เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย โดยสูตรดังกล่าวมีค่าออสโมลาลิตีเป็น 281, 255, 270 และ 627

mOsm/kg ตามลำดับ ซึ่งสูตรน้ำยาดังกล่าวนี้เมื่อนำมาเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำในการทดลองที่ 1 อสุจิจะมีการเคลื่อนไหวในน้ำยาประมาณ 20-40% ก่อนการเก็บรักษา แต่ก็สามารถใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้โดยที่อสุจิก็ยังมีชีวิตอยู่ได้ประมาณ 3-7 วัน แสดงว่าการลดออสโมลาลิตีน่าจะไม่ใช่ปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นการเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ สอดคล้องกับการศึกษาของ Moisawa *et al.* (1983) ที่กล่าวว่าอสุจิปลากลุ่มไซปรินิดส์น้ำจืด และกลุ่มซัลโมนิดส์ มีความทนทานต่อน้ำยาไฮโปโทนิคต่างกัน (hypotonic solution) กล่าวคืออสุจิปลาไซปรินิดส์น้ำจืด เช่น ปลาไน จะมีการเคลื่อนไหวเพราะการเจือจางด้วยน้ำหรือน้ำยาไฮโปโทนิค และต่อมาเซลล์อสุจิจะหยุดการเคลื่อนไหวและเซลล์อาจแตกเสียหาย ซึ่งตรงกันข้ามกับตัวอสุจิปลาซัลโมนิดส์ คือ น้ำยาไฮโปโทนิค หรือการลดออสโมลาลิตีโดยการเจือจาง ไม่ใช่ปัจจัยสำคัญในการกระตุ้นการเคลื่อนไหว และเซลล์อสุจิจะยังคงรูปร่างอยู่ได้แม้เจือจางด้วยน้ำตัวอสุจิจะเคลื่อนไหวได้นานเท่ากัน ทั้งในน้ำหรือน้ำยาไอโซโทนิค (isotonic solution) ทั้งนี้น่าจะเนื่องจากปลากลุ่มซัลโมนิดส์อาจเป็นกลุ่มปลากระดูกแข็ง ที่ยังไม่พัฒนามีการเคลื่อนย้ายไปอยู่ในน้ำเค็ม และกลับเข้ามาสู่น้ำจืดเพื่อการผสมพันธุ์ ส่วนปลากลุ่มไซปรินิดส์น้ำจืดนั้นอาศัยอยู่ในน้ำจืดตลอดเวลา ซึ่งทำนองเดียวกันปลากระบอกดำเป็นปลาที่สามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีระดับความเค็มแตกต่างกันได้ 2-32 ppt หรือแม้แต่ในน้ำจืด (อังสุนีย์ ชุณหปราณ, 2537) ดังนั้นปลาจึงมีการปรับตัวหรือปรับสมดุลภายในร่างกายได้ดี แต่ทั้งนี้และทั้งนั้นนอกจากค่าออสโมลาลิตีของน้ำยาแล้วยังมีชนิดหรือความเข้มข้นของอิออนที่เป็นองค์ประกอบในน้ำยาอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเคลื่อนไหวของอสุจิของปลาด้วย

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย

สูตรน้ำยา และระยะเวลา มีผลต่อเปอร์เซนต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำที่เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส โดยน้ำยาที่มีประสิทธิภาพเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้ดีที่สุด คือ สูตร FRS-2 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ ในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา เป็น 13.3 % แต่ทั้งนี้ สูตรน้ำยากลุ่ม FRS, CSS และ MC#1 ก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้นาน 7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในวันที่ 7 เป็น 2.3-13.3 % ซึ่งดีกว่าน้ำเชื้อสดที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เพียง 3 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิในวันที่ 3 อยู่ในช่วง 5-13.3 % แต่ทั้งนี้สูตรน้ำยากลุ่ม BCB ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้เพราะเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสดที่เก็บรักษา

น้ำยากลุ่มน้ำเกลือ (NaCl) ซึ่งสามารถเตรียมได้ง่าย และประหยัด สามารถใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระบอกดำได้ จากการทดลองใช้เกลือระดับความเข้มข้น 0.85-2 % สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 5-7 วัน มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ ช่วงวันที่ 5-7 เป็น 2-33 % แต่ทั้งนี้การใช้ความเข้มข้นของเกลือไม่ควรเกิน 5 % เพราะจะทำให้อสุจิตายภายใน 2 ชั่วโมงที่เก็บรักษา

การปรับความเป็นกรดเป็นด่างของน้ำยาเพิ่มขึ้นหรือลดลง ช่วง 0.5-1.8 ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำที่เก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บรรณานุกรม

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลังการ / วิธีการ / ประโยชน์.** ฝ่ายโรงพิมพ์สำนักส่งเสริมและฝึกอบรม, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน, กรุงเทพฯ. 128 น.

เมฆ บุญพรมหมณ์. 2525. **การเพาะขยายพันธุ์ปลาและการอนุบาลลูกปลา.** ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 110 น.

ทัศนีย์ ภูพิพัฒน์, ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2529. **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาและปลาบึก.** วารสารสัตววิทยา 2(2) : 24-32.

นลินี มารคแมน. 2527. **การศึกษาเบื้องต้นกรรมวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

นิเวศน์ เรืองพานิช, เรณู ยาชิโร และวิชัย วัฒนกุล. 2536. **การเพาะและอนุบาลลูกปลากระบอกดำ** เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 18/2536. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 13 น.

นิศา ไชยรักษ์ และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2538. **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย.** การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33, หน้า 94-100

นิศา ไชยรักษ์. 2539. **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยโดยวิธีแช่แข็ง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 142 น.

ปลากระบอกดำ. [Online-Aviable] http://www.micaonline. com/ articles8/ site/ view_artiele.asp_? i darticle=96_17K_,8/2/2550

พิษณุ นาอนันต์. 2541. **การเลี้ยงปลากระบอกดำ (*Liza subviridis*) ในบ่อดินเพื่อเป็นพ่อ-แม่พันธุ์.** วารสารการประมง 51 (4) : 325-330.

ไพโรจน์ สิริมนตาภรณ์ และอังสุนีย์ ชุณหปราณ. 2535. **การจำแนกชนิดปลากระบอกในทะเลสาบสงขลา และบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดสงขลา.** เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 13/2535 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 14 น.

เรณู ยาชิโร, วิชัย วัฒนกุล, เจนจิตต์ คงกำเนิด และสรณัฏฐ์ ศิริสวย. 2542. **การเก็บน้ำเชื้อปลาหมอทะเล *Epinephelus lanceolatus* โดยวิธีแช่แข็ง** เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 12/2542 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 13 น.

วิชัย วัฒนกุล, เรณู ยาชิโร, นิเวศน์ เรืองพานิช และประมวล อ่อนละมัย. 2537. **การทดลองอนุบาลและเลี้ยงปลากระบอกดำ (Liza subviridis)** เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 16/2537 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 22 น.

ศูนย์วิจัยทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยตอนล่าง. 2550. **คู่มือภาพจำแนกชนิดพืชและสัตว์น้ำที่สำคัญในทะเลสาบสงขลาและพื้นที่ใกล้เคียง** กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. 315 น.

สุชาดา บุญภักดี และสุวิมล เสนาลักษณ์. 2547.**ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปลากระบอกดำ *Liza subviridis* (valenciennes, 1836) ในบริเวณอ่าวตราด.** [Online-Aviable] http://www. Fisheries. go.th/chan/paper/fish/10-2547-repro-bio-mullet-page.htm, 8/2/2550

สุมาลี พิตรากูล. 2532. **นิเวศวิทยา.** ภาคพัฒนาตำราและเอกสารวิชาการ, หน่วยศึกษานิเทศก์, กรมฝึกหัดครู. 343 น.

สมสุข มัจฉาชีพ. 2524. **นิเวศวิทยา ภาควิชาชีววิทยา** คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน. 212 น.

อดุลย์ แมเร๊าะ พัชรา แมเร๊าะ วาลุกา กฤตรัชตนันต์ และอรุณ จันทร์แดง. 2545. **ผลของฮอร์โมน 17α-Methyltestosterone ที่มีต่อการสร้างน้ำเชื้อของปลากระบอกดำ *(Liza subviridis* Valenciennes)** เอกสารวิชาการฉบับที่ 12/2545. ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสตูล 10 น.

อนงคณ์ หัมพานนท์ และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2539. **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายในตู้เย็น** การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34, หน้า 329-338.

อนุวัฒน์ รัตนโชติ, มณีย์ กรรณรงค์, สุวิทย์ ชูช่วย และสมพร เกื้อสกุล. 2538. **ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของปลากระบอกดำ (*Liza subviridis* Valenciennes) ในอ่าวบ้านดอน** เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 52/2538 ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสุราษฎร์ธานี กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง 19 น.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2526. **การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว *Puntius gonionotus* Bleeker ในช่วงเวลาสั้น.** วารสารเกษตรศาสตร์ 17 (2) : 53-57.

_____. 2535. **การเพาะขยายพันธุ์ปลา.** ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 239 น.

อังสุนีย์ ชุณหปราณ. 2537. **ชีววิทยาปลากระบอกดำในทะเลสาบสงขลาและบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดสงขลา.** เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 11/2537. สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง กรมประมง. 21 น.

Amelar, R.D., L. Dubin and C-Schoenfeld. 1980. Sperm motility. Fertil. Steril. 34(3) : 198-215.

Billard, R. and M.P. Cosson. 1992. Some problems related to the assessment of sperm motility in fresh water fish. J. Exp. Zool. 261 : 122-131.

Billard, R., J. Cosson, G. Perchec and O. Linhart. 1995. Biology of sperm and artificaila reproduction in carp. Aquaculture 129 : 95-112.

Guest, W.C., J.w. Avault and J.D. Roussel. 1976. A Spermatology study of channel catfish *letalurus punctatus.* Transactions of the American Fisheries Society 105 : 463-468.

Hulata, G. and S. Rothbard. 1979. Gold storage of carp semen for short periods. Aquaculture 16:267-269.

Lee, C.S. and Tamura, C.S., 1988. Advances and future prospects of controlled maturation and spawing of grey mullet (*Mutil cephalus* L.) in captivity. *Aquaculture*, 74 : 63-73.

Linhart, O., V. Slechta and T. Slavik, 1991. Fish sperm composition and biochemistry. Monograph 16:285-311.

Morisawa, M., K. Suzuki, H. Shimizu. S. Morisawa and K. Yasuda. 1983. Effects of osmolality and potassium an motiliy of spermatozoa from freshwater cyprinid fishers. J. Exp. Biol. 107 : 95-103.

Saad, A., R. Billard, M.C. Theron and M.G. Hollebeeq 1988. Short-term preservation of carp (*Cyprinus carpio*) sperm. Aquaculture 71:133-150.

Suquet, M., G. Dorange, M.H. Omnes, Y. Normant, A. Le Roux and C. Fauvel. 1993. Composition of the seminal fiuid and ultrastru cturre of the spermatozoa of turbot (*socphthalmus maximus*). J. of Fish Biol. 42: 509-516.

Withler, F.C. 1980. Chilled and cryogenic storage of gametes of Thai Carp and catfishes. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences No. 948.

Wolf, K. 1963. Physiological salines for Fresh water teleosts. Prog. Fish Cult. 25:131 140.

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำในน้ำยากลุ่มเกลือ (NaCl) ระดับความเข้มข้น 0.85, 1, 2 และ 5 % ภายหลังการเก็บรักษาในตู้เย็น อุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส

สูตรน้ำยา	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ								เฉลี่ยรวม
	2 ชั่วโมง	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	5 วัน	6 วัน	7 วัน	
0.85 % NaCl	90	80	73.3	63.3	43.3	20	8.3	3.7	47.8 [a]
1 % NaCl	90	83.3	73.3	60	40	13.3	6.7	2	46.1 [a]
2 % NaCl	90	76.7	56.7	40	16.7	6.7	0	0	35.4 [b]
5 % NaCl	0	0	0	0	0	0	0	0	0 [c]

ตารางผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ของการทดลองที่ 1 ภายหลังการเก็บรักษาในน้ำยาสูตรต่าง ๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน

Source of variation	df	SS	MS	F
Main plots :				
Blocks	2	300.014	150.007	0.801 [ns]
Extender (A)	5	48983.056	9796.611	52.328 [*] ($p<0.05$)
Error (a)	10	1872.153	187.215	
Subplots :				
Time (B)	7	99403.417	14200.488	415.839 [*] ($p<0.05$)
Extender x Time (AB)	35	19330.833	552.310	16.174 [*] ($p<0.05$)
Error (b)	84	2868.500	34.149	
Total	143	172757.973		

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางผนวกที่ 3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ของการทดลองที่ 2 ภายหลังการเก็บรักษาในน้ำยาสูตรต่าง ๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน

Source of variation	df	SS	MS	F
Main plots :				
Blocks	2	912.280	456.140	6.283 * (p<0.05)
Extender (A)	10	71724.621	7172.462	98.797 * (p<0.05)
Error (a)	20	1451.970	72.598	
Subplots :				
Time (B)	7	207690.633	29670.090	1152.953 * (p<0.05)
Extender x Time (AB)	70	35898.409	512.834	19.928 * (p<0.05)
Error (b)	154	3963.083	25.734	
Total	263	321640.996		

ตารางผนวกที่ 4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกดำ ของการทดลองที่ 3 ภายหลังการเก็บรักษาในน้ำยาสูตรต่าง ๆ และน้ำเชื้อสด ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน

Source of variation	df	SS	MS	F
Main plots :				
Blocks	2	1843.871	921.936	24.104 * (p<0.05)
Extender (A)	10	61667.652	6166.765	161.231 * (p<0.05)
Error (a)	20	764.962	38.248	
Subplots :				
Time (B)	7	224436.848	32062.407	1628.608 * (p<0.05)
Extender x Time (AB)	70	28819.318	411.705	20.912 * (p<0.05)
Error (b)	154	3031.833	19.687	
Total	263	320564.484		

ตารางผนวกที่ 5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิปลากระบอกคำ ภายหลังการเก็บรักษาในน้ำยากลุ่มเกลือ(NaCl) ระดับความเข้มข้น 0.85, 1, 2 และ 5 % ของตารางผนวกที่ 1ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4-5 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง, 1, 2, 3, 4, 5, 6 และ 7 วัน

Source of variation	df	SS	MS	F
Main plots :				
Blocks	2	538.396	269.198	5.389 ^{ns}
Extender (A)	3	35588.031	11862.677	237.501 * ($p<0.05$)
Error (a)	6	299.687	49.948	
Subplots :				
Time (B)	7	56297.740	8042.534	711.225 * ($p<0.05$)
Extender x Time (AB)	21	19947.885	949.899	84.002 * ($p<0.05$)
Error (b)	56	633.250	11.308	
Total	95	113304.989		

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY