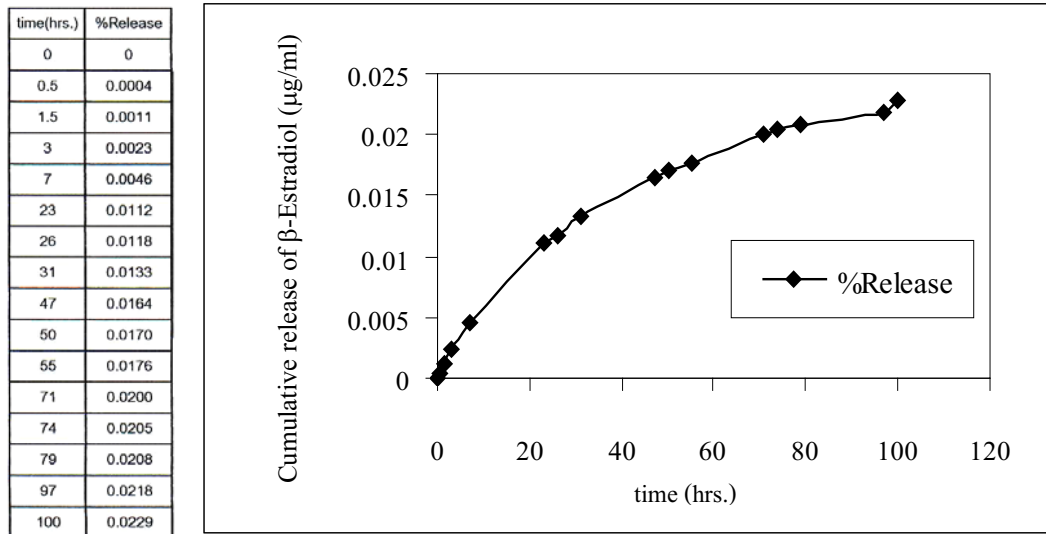
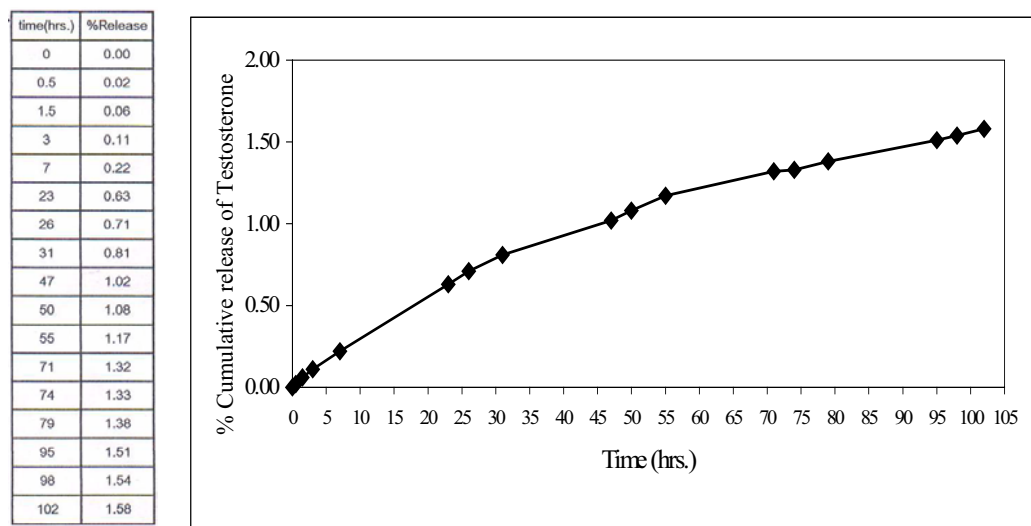


2. การปลดปล่อยของฮอร์โมนแวนลอยในน้ำมันถั่วเหลือง

รูปที่ 4.7-4.10 แสดงผลการปลดปล่อยฮอร์โมน estradiol, testosterone, domperidone และ buserelin ออกจากน้ำมันถั่วเหลืองในรูปแบบยาออกฤทธิ์เน้นตามลำดับ พบว่าฮอร์โมน estradiol, testosterone, domperidone และ buserelin เริ่มพบปริมาณคงที่ (plateau) ในเวลาที่ 71, 95, 23 และ 80 ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นว่าฮอร์โมนทั้ง 3 ตัว คือ estradiol, testosterone และ buserelin ให้ความเข้มข้นใน receiver คงที่หลัง 71 ชั่วโมง โดย testosterone จะถึงค่าคงที่ช้าที่สุดคือ 95 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การปลดปล่อยของฮอร์โมน 3 ตัวนี้ estradiol มีเปอร์เซ็นต์ปลดปล่อยน้อยมาก คือพบเพียง 0.2% และ testosterone มี 1.5% ในขณะที่ buserelin พบมากกว่าถึง 65% ส่วน domperidone พบน้อยเช่นกัน คือ 1.6% อย่างไรก็ตามปริมาณ domperidone ที่พบ ก็ยังเพียงพอในการออกฤทธิ์ เพราะมีปริมาณ ถึง 10 mg ในรูปแบบยาดังต้น ในกรณีของตัวอย่างยาเตรียมฮอร์โมน buserelin และ domperidone ปริมาณที่สะสมจากการปลดปล่อยยังคงเพิ่มขึ้นหลัง 50 ชั่วโมง แสดงว่ารูปแบบยาเตรียมฮอร์โมนที่พัฒนาได้มีผลออกฤทธิ์เน้น และมีการปลดปล่อยปริมาณสารออกมาจาก dose ของ 200 µg ของ buserelin ผสมกับ 10 mg ของ domperidone ใน soybean oil 1 ml ในปริมาณที่เหมาะสมคือ ที่ 50 ชั่วโมง มี buserelin ปล่อยออกมา ประมาณ 11,000 ng/ml หรือ 11 µg และ domperidone ในปริมาณ 14.90 µg/mg ส่วน estradiol และ testosterone มีการปลดปล่อยออกมาน้อยมาก ซึ่งอาจเนื่องจากคุณสมบัติการละลายของฮอร์โมน 2 ตัวนี้ (Gerald and Pharm 1996; สุมนา 2541) ที่สามารถละลายใน soybean oil ได้น้อยกว่าใน PBS รวมทั้งมีน้ำหนักโมเลกุลที่ใหญ่ จึงผ่าน membrane ได้ไม่ดี ในขณะที่ buserelin ซึ่งเป็น peptide ที่มีคุณสมบัติในการละลายได้ดีกว่า (Donaldson and Hunter 1983; วีรพงษ์ 2536) จากผลการปลดปล่อยฮอร์โมน estradiol และ testosterone ที่ช้าและน้อยจึงอาจคาดคะเนได้ว่า เมื่อนำไปฉีดในปลาอาจได้ผลน้อยกว่าการฉีดด้วย buserelin ที่ผสมด้วย domperidone ก็ได้

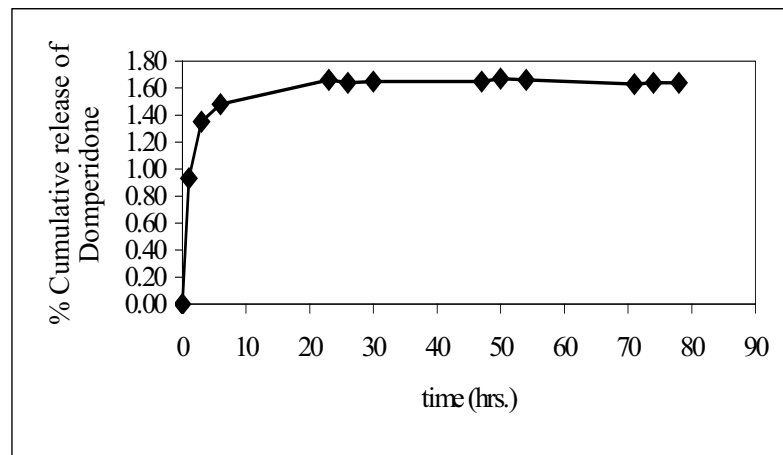


รูปที่ 4.7 ผลการศึกษาการปลดปล่อย estradiol (20 mg/ml) ออกจากน้ำมันถั่วเหลืองผ่าน membrane ใน Franz Diffusion Cell ที่ตรวจพบใน PBS Buffer pH 7.4 ใน receiver chamber ที่อุณหภูมิ 37 °C ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ



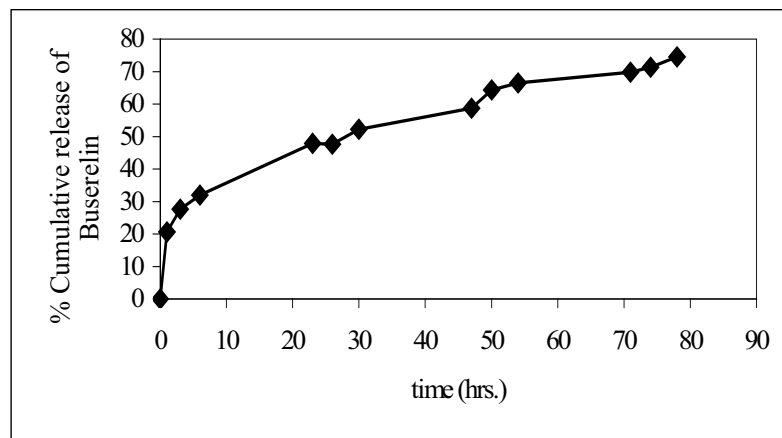
รูปที่ 4.8 ผลการศึกษาการปลดปล่อย testosterone (20 mg/ml) ออกจากน้ำมันถั่วเหลืองผ่าน membrane ใน Franz Diffusion Cell ที่ตรวจพบใน PBS Buffer pH 7.4 ใน receiver chamber ที่อุณหภูมิ 37 °C ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ

time	%Release
0	0.00
1	0.93
3	1.35
6	1.48
23	1.66
26	1.84
30	1.85
47	1.85
50	1.67
54	1.66
71	1.63
74	1.64
78	1.64



รูปที่ 4.9 ผลการศึกษาการปลดปล่อย domperidone ออกจากน้ำมันถั่วเหลืองของตัวอย่างสอร์โมน ออกฤทธิ์เนิ่น (buserelin 200 μ g ผสม domperidone 10 mg ใน 1 ml soybean oil) ผ่าน membrane ใน Franz Diffusion Cell ที่ตรวจพบใน PBS Buffer pH 7.4 ใน receiver chamber ที่อุณหภูมิ 37 °C ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ

time	%Release
0	0
1	20.63
3	27.66
6	32.03
23	47.96
26	47.58
30	52.25
47	58.70
50	64.31
54	66.45
71	69.84
74	71.31
78	74.58



รูปที่ 4.10 ผลการศึกษาการปลดปล่อย buserelin ออกจากน้ำมันถั่วเหลืองของตัวอย่างสอร์โมน ออกฤทธิ์เนิ่น (buserelin 200 μ g ผสม domperidone 10 mg ใน 1 ml soybean oil) ผ่าน membrane ใน Franz Diffusion Cell ที่ตรวจพบใน PBS Buffer pH 7.4 ใน receiver chamber ที่อุณหภูมิ 37 °C ณ ช่วงเวลาต่าง ๆ

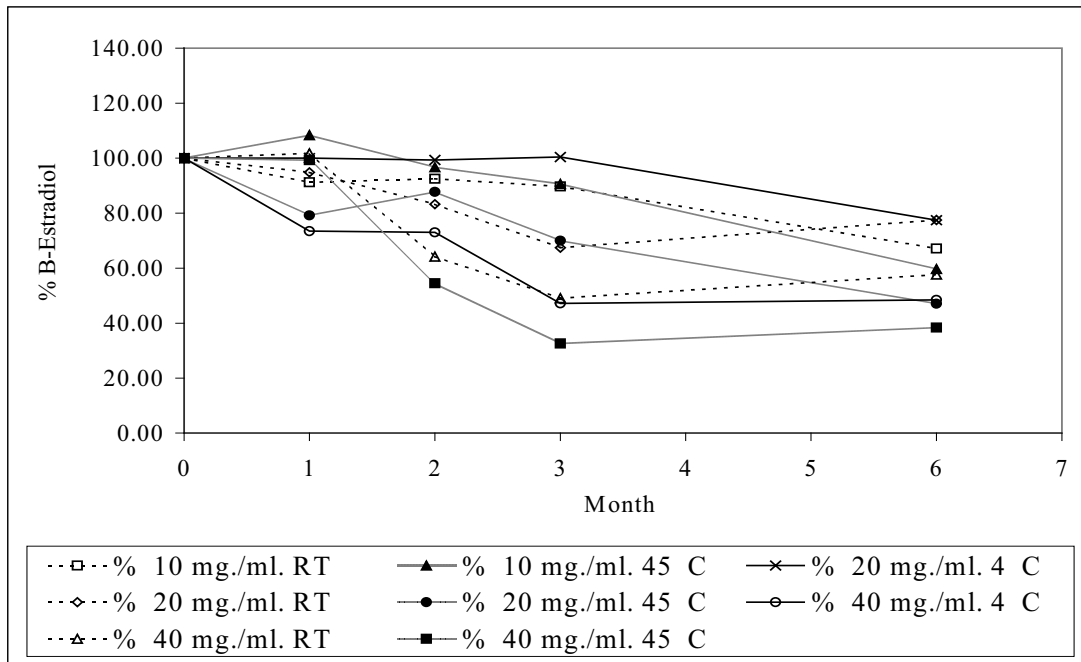
3. การศึกษาความคงตัว (stability) ของฮอร์โมนแวนลอยในน้ำมันถั่วเหลือง

จากรูปที่ 4.11 ความคงตัวของ estradiol ใน soybean oil ในความเข้มข้นต่าง ๆ (10, 20 และ 40 mg/ml) ที่เวลา 1 และ 3 เดือน ตามลำดับ พบว่า เมื่อความเข้มข้นของฮอร์โมนเพิ่มขึ้น ความคงตัวของฮอร์โมนจะลดลง ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่ฮอร์โมนที่ไม่ละลายในน้ำมันมีเพิ่มมากขึ้น ฮอร์โมนที่ละลายในน้ำมันจะมีความคงตัวมากกว่าฮอร์โมนในรูปแขวนตะกอน เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นความคงตัวของฮอร์โมนจะลดลงเช่นกัน จะคงตัวมากที่สุดที่ 4 °C โดยตำรับ 10 mg/ml จะคงตัวที่ 4 °C ได้มากกว่า 6 เดือน และที่ RT และ 45 °C ได้ 3 เดือน

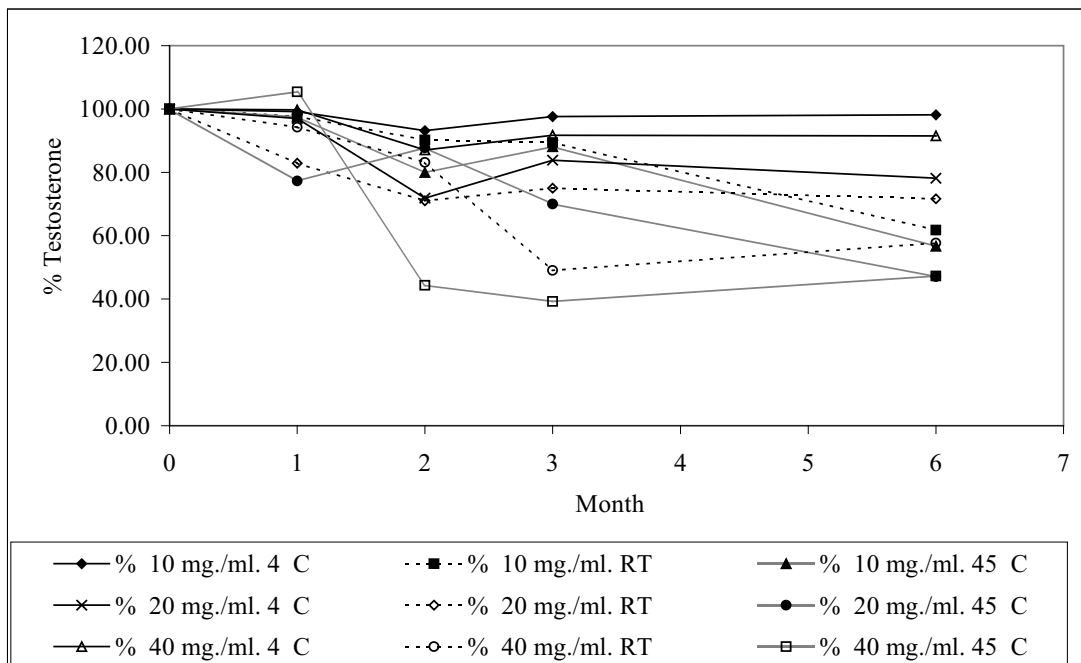
จากรูปที่ 4.12 ความคงตัวของ testosterone ใน soybean oil ความเข้มข้นต่าง ๆ (10, 20 และ 40 mg/ml) ที่เวลา 1 และ 3 เดือน ตามลำดับ ผลการทดลองสามารถอธิบายได้ เช่นเดียวกับกรณีของ estradiol ข้างต้น แต่ดูเหมือนว่าจะมีความคงตัวต่ำกว่า estradiol เล็กน้อย และผลของความเข้มข้นของ testosterone ต่อความคงตัวของฮอร์โมนไม่ชัดเจนเท่ากับกรณีของ estradiol ตำรับ 10 mg/ml ของ testosterone มีความคงตัวที่ 4 °C เป็นเวลา 6 เดือน ที่ RT เป็นเวลา 2 เดือน และที่ 45 °C เป็นเวลา 1 เดือน เท่านั้น

จากรูปที่ 4.13 ความคงตัวของ domperidone ในตำรับที่มี domperidone ผสมกับ buserelin ใน soybean oil ในความเข้มข้น 10 mg + 200 µg ใน 1 ml soybean oil ที่เวลา 1 และ 3 เดือน ตามลำดับ พบว่ามีความคงตัวต่ำมากเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ตัวยาจะมีการสลายตัวเพิ่มมากขึ้น ตำรับดังกล่าวจะคงตัวเพียง 1 เดือน เมื่อเก็บไว้ที่ 4 °C

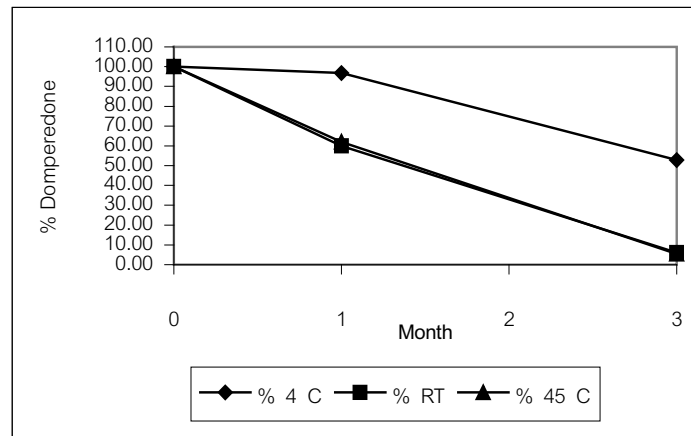
จากรูปที่ 4.14 ความคงตัวของ buserelin ในตำรับที่มี domperidone ผสมกับ buserelin ใน soybean oil ในความเข้มข้น 10 mg + 200 µg ใน 1 ml soybean oil ที่เวลา 1 และ 3 เดือน ตามลำดับ พบว่า ตัวยามีความคงตัวต่ำมาก ต่ำกว่า domperidone เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ตัวยาจะมีการสลายตัวเพิ่มมากขึ้น แม้ตำรับดังกล่าว เก็บไว้ที่ 4 °C ตัวยา buserelin มีความคงตัวน้อยกว่า 1 เดือน พบว่าที่ 1 เดือน มีตัวยาเหลือเพียง 83 % ซึ่งโดยทั่วไป จะถือว่าตัวยา มีความคงตัวต่อเมื่อมีตัวยาเหลือเท่ากับหรือมากกว่า 90 % ขึ้นไป



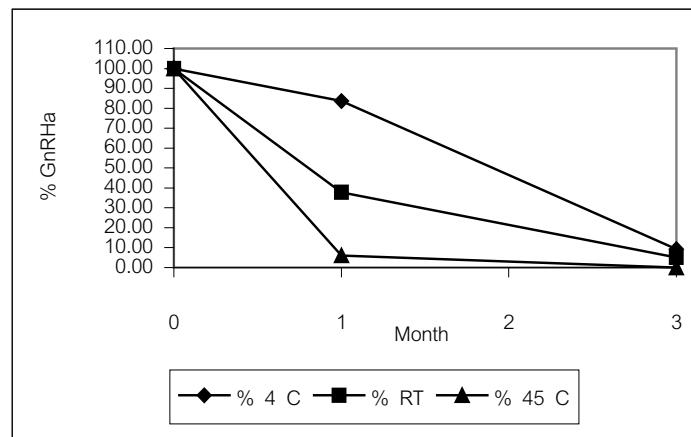
รูปที่ 4.11 ความคงตัวของ estradiol สูตรต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ที่ 4, RT และ 45 °C



รูปที่ 4.12 ความคงตัวของ testosterone สูตรต่าง ๆ เมื่อเก็บไว้ที่ 4, RT และ 45 °C



รูปที่ 4.13 ความคงตัวของ domperidone ใน soybean oil เมื่อเก็บไว้ที่ 4, RT และ 45 °C



รูปที่ 4.14 ความคงตัวของ buserelin ใน soybean oil เมื่อเก็บไว้ที่ 4, RT และ 45 °C

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

1. สามารถใช้เทคนิค HPLC ด้วยสภาวะที่ศึกษาวิจัยได้ในการตรวจสอบวิเคราะห์หาปริมาณของฮอร์โมนที่ศึกษา ซึ่งแม้ในปริมาณน้อยได้อย่างถูกต้อง โดยฮอร์โมนหรือสารที่ศึกษาแม้เตรียมในน้ำมันถั่วเหลือง ก็ยังสามารถตรวจสอบวิเคราะห์ได้ สำหรับค่า retention time (RT) ของสารแต่ละตัวที่วิเคราะห์ด้วย HPLC มีค่าต่างกันดังนี้ estradiol 4.8 นาที, testosterone 5.21 นาที, domperidone 11.60 นาที, buserelin 15.50 นาที สามารถเตรียมฮอร์โมนใน soybean oil เพื่อให้อยู่ในรูปแบบของยาออกฤทธิ์แน่นอนได้ โดยอาจอยู่ในรูปสารละลายใสหรือขุ่นขาวในรูป suspension
2. การปลดปล่อยฮอร์โมนออกจากน้ำมันถั่วเหลืองในตำรับฮอร์โมนที่เตรียม พบว่า estradiol ปลดปล่อยผ่าน membrane น้อยมาก เมื่อเทียบกับ testosterone, buserelin ซึ่งสามารถปลดปล่อยได้ประมาณ 60% ที่เวลาประมาณ 50 ชั่วโมง ในขณะที่ domperidone และ testosterone

ปลดปล่อยได้ ประมาณ 1% ส่วน estradiol ได้ประมาณ 0.01% ปริมาณ buserelin ที่ปลดปล่อยออกมา และช่วงเวลาที่ปลดปล่อยอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม ของการออกฤทธิ์เน้นและคาดว่าจะมีผลในการออกฤทธิ์ได้ดีเพื่อนำไปใช้ฉีดในปลา สอร์โมน estradiol และ testosterone ใน soybean oil มีความคงตัวมากกว่า buserelin โดย buserelin มีความคงตัวต่ำมาก และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C มีความคงตัวมากกว่าที่อุณหภูมิห้องและ 45 °C และไม่ควรเตรียมทิ้งไว้นานหากมีความจำเป็นก็ไม่ควรเก็บไว้นานเกิน 1 เดือน

เอกสารอ้างอิง

- ณรงค์ สารสุด. (2535). การผลิตยาออกฤทธิ์เน้น และระบบนำส่งยาแบบต่าง ๆ. กรุงเทพฯ : หจก. ไทยมิตรการพิมพ์. 85 หน้า.
- วีระพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2536). การเพาะพันธุ์ปลา. ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี. 194 หน้า.
- สุนนา ชมพูทวีป. (2541). เกสัชวิทยาของสอร์โมน. ภาควิชาเภสัชวิทยา, คณะแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 125 หน้า.
- Donaldson, E.M. and Hunter, G.A. (1983) Induced Final Maturation, Ovulation and Spermiation. In: Fish physiology. (ed. by W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson), 351-403. Fish physiology Vol. IX B. academic Press, Inc., New York.
- Gerald, K.M. and Pharm, D. (1996) AHFS Drug information. The American Society of Health-System Pharmacist. Inc, U.S.A.

บทที่ 5

การใช้ฮอร์โมนแขวนลอยในน้ำมันถั่วเหลือง ต่อระดับฮอร์โมนเพศและการเจริญพันธุ์ปลาสาวย

บทนำ

ปลาสาวย (*Pangasius hypophthalmus*) ที่เลี้ยงในบ่อดินปกติจะสามารถเจริญพันธุ์และวางไข่ได้ต้องใช้เวลาประมาณ 2-3 ปี ในการผลิตลูกปลาจำนวนมากจำเป็นต้องใช้ฮอร์โมนกระตุ้นก่อนถึงวัยเจริญพันธุ์ ฮอร์โมนในรูปแบบปกติเมื่อนำมาฉีดปลา จะอยู่ได้ประมาณ 6-12 ชั่วโมง (Van der Kraak *et al.*, 1983) บางครั้งจำเป็นต้องฉีดฮอร์โมนมากกว่า 2 ครั้งเพื่อกระตุ้นการวางไข่ ผลอาจทำให้ปลาช้ำหรือเครียดได้และยากต่อการจัดการ เดิมฮอร์โมนที่นิยมฉีดกระตุ้นการวางไข่นิยมใช้จากต่อมใต้สมอง แต่เนื่องจากวิธีใช้ไม่สะดวก และมีต้นทุนค่อนข้างแพงกว่าการใช้ ฮอร์โมนสังเคราะห์ เช่น analogue ของ gonadotropin releasing hormone (GnRH_a หรือ buserelin; suprefact[®]) ที่มีความคงทนกว่าในรูปแบบปกติและการย่อยของเอนไซม์ (Van der Kraak *et al.*, 1983; Zohar *et al.*, 1989b, 1990 1995a,b; Goren *et al.*, 1990) โดยมากมักใช้ร่วมกับ domperidone (DOM) เพื่อช่วยยับยั้ง dopamine ที่มีผลต่อการสร้าง GnRH (Peter *et al.*, 1993) GnRH เป็นฮอร์โมนที่ช่วยควบคุมฮอร์โมน gonadotropin (GtH) มีฮอร์โมนที่สำคัญได้แก่ luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของรังไข่และอัณฑะ การออกฤทธิ์ของฮอร์โมน GtH ในกระแสเลือดจะจับกับ G โปรตีนรีเซปเตอร์ (สมนา 2541) ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนมีบทบาทสำคัญต่อ การสร้างอสุจิและเป็นสารตั้งต้น ของฮอร์โมนเอสตราไดออล ซึ่งกระตุ้นการสร้างไข่แดงก่อนที่ไข่จะสุก (Scott *et al.*, 1980)

ผลของการใช้ฮอร์โมนในรูปแบบแขวนลอยในน้ำมันถั่วเหลืองออกฤทธิ์เน้น จะช่วยลดอายุการเจริญพันธุ์ของปลาสาวย เป็นรูปแบบพื้นฐานที่อาจนำไปใช้ในปลาบึกและสามารถที่จะประยุกต์ใช้ในการผสมเทียมปลาบึกต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ปลาสาวยอายุ 1.5 ปี เพศเมียน้ำหนักเฉลี่ย 485.75 กรัม เพศผู้ น้ำหนักเฉลี่ย 662.12 กรัม จำนวน 50 ตัว ทำเครื่องหมายโดยฉีด alcian blue ในแต่ละตัว แบ่งการทดลองเป็น 6 หน่วยทดลอง มีเพศผู้และเพศเมียอย่างละ 5 ตัว ได้แก่ หน่วยทดลองที่ 1 (T1) หน่วยควบคุม; หน่วยทดลองที่ 2 (T2) GnRH_a 100 µg/kg ผสม DOM 5 mg/kg; หน่วยทดลองที่ 3 (T3) GnRH_a 200 µg/kg ผสม

DOM 10 mg/kg; หน่วยทดลองที่ 4 (T4) GnRHa 300 µg/kg ผสม DOM 20 mg/kg; หน่วยทดลองที่ 5 (T5) E2 20 mg/kg และหน่วยทดลองที่ 6 (T6) T 20 mg/kg

2. การเตรียมฮอร์โมนผสมน้ำมันถั่วเหลืองสำหรับฉีด นำ buserelin มา centrivap นาน 30 นาที เพื่อเอาส่วนที่เป็นน้ำออกที่เหลือเป็นผลึกขาวของ buserelin ส่วน domperidone, testosterone และ estradiol บดให้ละเอียดแล้วนำไปละลายใน ethanol แล้วกรองเอาแข็งออก จากนั้นนำสารละลายไประเหยเอา solvent ออกใน rotavap จนแห้ง ส่วนน้ำมันถั่วเหลืองของ sigma หลังจากนั้นฆ่าเชื้อ 170 °C นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปผสมกับผงของฮอร์โมนดังกล่าว ในปริมาณที่ใช้ 1 ซีซี/ปลา 5 กก. ก่อนฉีดปลาต้องเข้าขวด แล้วฉีดตามความเข้มข้นตามหน่วยทดลอง ตามข้อที่ 6

3. ให้อาหารผสมโปรตีน 20 % ประกอบด้วยปลาป่น 8.1% กากถั่วเหลือง 4.9 % รำ 4 % และปลายข้าว 3 % เสริมด้วยอาหารเบต้าแคโรทีน 2 % ผสมน้ำมันปลาทูน่า 3 ซีซี/อาหาร 1 กก. ให้อัตราวันละ 1.5 % ของน้ำหนักตัวปลา

4. การเตรียมรูปแบบฮอร์โมนออกฤทธิ์เน้นเพื่อใช้ฉีดในปลาสวย
เตรียมหน่วยทดลอง (T) ต่าง ๆ ของรูปแบบฮอร์โมนออกฤทธิ์เน้น สำหรับฉีดในปลาสวย ดังนี้

- (ก) หน่วยทดลองที่ 1 (T1) ควบคุม ใช้ soybean oil ที่ฆ่าเชื้อแล้ว 15 ml ใส่ขวดสีชา
- (ข) หน่วยทดลองที่ 2 (T2) ฉีด GnRHa 100 µg/kg ผสม DOM 5 mg/kg
 - ใช้ buserelin 1500 µg/kg และ DOM 75 mg/kg ละลายใน soybean oil ที่อบฆ่าเชื้อ (ที่เย็นแล้ว) 15 ml
 - ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ได้เป็น suspension เก็บในขวดสีชา
- (ค) หน่วยทดลองที่ 3 (T3) ฉีด GnRHa 200 µg/kg ผสม DOM 10 mg/kg
 - ใช้ buserelin 3000 µg/kg และ DOM 150 mg/kg ละลายใน soybean oil ที่อบฆ่าเชื้อ (ที่เย็นแล้ว) 15 ml
 - ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ได้เป็น suspension เก็บในขวดสีชา
- (ง) หน่วยทดลองที่ 4 (T4) ฉีด GnRHa 300 µg/kg ผสม DOM 20 mg/kg
 - ใช้ buserelin 4500 µg/kg และ DOM 300 mg/kg ละลายใน soybean oil ที่อบฆ่าเชื้อ (ที่เย็นแล้ว) 15 ml
 - ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ได้เป็น suspension เก็บในขวดสีชา
- (จ) หน่วยทดลองที่ 5 (T5) ฉีด E2 20 mg/kg
 - ใช้ estradiol 140 mg/kg ละลายใน soybean oil ที่อบฆ่าเชื้อ (ที่เย็นแล้ว) 7 ml
 - ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ได้เป็น suspension เก็บในขวดสีชา

(ฉ) หน่วยทดลองที่ 6 (T6) ฉีด T 20 mg/ kg

- ใช้ T 140 mg/mg ละลายใน soybean oil ที่อบฆ่าเชื้อ (ที่เย็นแล้ว) 7 ml
- ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex ได้เป็น suspension เก็บในขวดสีชา

ตารางที่ 5.1 ปริมาณและความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ผสมกับ domperidone (DOM), testosterone (T) และ estradiol (E2) แขนงลอยในน้ำมันถั่วเหลือง

หน่วยทดลอง	เพศ	จำนวน	น้ำหนักเฉลี่ย (กก.)	ความเข้มข้น	ปริมาตรฉีด (ml/kg)
T1	เมีย	5	0.7 ± 0.22	Soybean oil only	0.7
	ผู้	5	0.5 ± 0.25		0.5
T2	เมีย	5	0.7 ± 0.27	100 µg/kg GnRHa in combination with 5 mg/kg DOM in soybean oil	0.7
	ผู้	5	0.8 ± 0.30		0.8
T3	เมีย	5	0.7 ± 0.32	200 µg/kg GnRHa in combination with 20 mg/kg DOM in soybean oil	0.7
	ผู้	5	0.6 ± 0.19		0.6
T4	เมีย	5	0.5 ± 0.16	300 µg/kg GnRHa in combination with 20 mg/kg DOM in soybean oil	0.6
	ผู้	5	0.6 ± 0.27		0.5
T5	เมีย	5	0.4 ± 0.32	20 mg/kg Estradiol (E2) in soybean oil	0.8
T6	ผู้	5	0.8 ± 0.23	20 mg/kg Testosterone (T) in soybean oil	0.4

5. ชั่งน้ำหนักปลา และการศึกษาผลการใช้ฮอร์โมนต่อ gonadal development โดยการวิเคราะห์ฮอร์โมน T และ E2 ก่อนและหลังการฉีดฮอร์โมนออกฤทธิ์เน้น โดยดูดเลือดปลา 0.5 มล. จากบริเวณโคนครีบกาง เก็บตัวอย่างก่อนและหลังจากการฉีดฮอร์โมนนาน 30, 150, 240 และ 300 วัน ครั้งละ 1 ตัวในเพศผู้และเพศเมีย บริเวณโคนหาง ตัวละ 1 ซีซี ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที นาน 5 นาที แยก serum 50 µl เก็บในอุณหภูมิ -18 °C มาวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน testosterone และ estradiol โดยวิธี Electrochemiluminescence immuno assay (Elecsys รุ่น 1010)

การวิเคราะห์ estradiol (E2) และ testosterone (T): competition principle immunocomplex ระหว่าง E2 ที่อยู่ใน serum กับ estradiol-specific biotinylated polyclonal antibody ของกระต่าย และ testosterone ที่อยู่ใน serum กับ testosterone-specific biotinylated monoclonal antibody ของหนู จะจับกับ streptavidin-coated microparticle โดยใช้ส่วนที่ติดฉลากด้วย biotin จับกับ streptavidin บน microparticle ส่วนของ estradiol-specific biotinylated antibody ที่เหลืออยู่จะจับกับ estradiol derivative ที่ติดฉลากด้วย ruthenium กลายเป็น antibody-hapten complex ที่เกาะอยู่

บน microparticles แล้ววัดใน measuring cell โดย photomultiplier ค่า sensitivity ของ T จะอ่านค่าต่ำสุด 0.02 ng/ml ส่วน E2 อ่านค่าต่ำสุด 0.01 ng/ml

5. ศึกษาผลการฉีดฮอร์โมนฯ ต่อ gonadal maturation โดยการผ่าตัดนำรังไข่และอัมชะมาทำเนื้อเยื่อวิทยา วัดดัชนีความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonado Somatic Index , GSI) ก่อนระหว่างและหลังฤดูวางไข่ หาค่า GSI (Nikolsky 1963)

$$\text{Gonado Somatic Index (GSI)} = \frac{\text{น้ำหนักอวัยวะเพศ} \times 100}{\text{น้ำหนักตัวปลา}}$$

(ก) ชิ้นเนื้อรังไข่ตรงกลางขนาด 1-2 มิลลิเมตร ที่แช่ฟอร์มาลิน 10 % ล้างแล้วใส่ลงไป ในเครื่อง automatic tissue processing นั้น จะผ่านการ fixation และ washing ชิ้นเนื้อจะถูกนำออกใส่ในถัง paraffin หลอมเหลวแล้ว นำไปทำ embedding blocking

(ข) การตัดตัวอย่าง (section) ชิ้นเนื้อหรือ tissue block ใน paraffin พร้อมนำไปตัดตัวอย่างชิ้นเนื้อให้เป็นแผ่นบาง ๆ ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ microtome ชิ้นเนื้อแผ่นบาง ๆ นำไปแนบติดกับสไลด์แล้วย้อมสี

(ค) การย้อมสี (staining) เป็นการย้อมสีโดยวิธีธรรมดา ในการเตรียมชิ้นเนื้อเพื่อศึกษา ลักษณะทั่วไปของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยเฉพาะเพื่อแยกความแตกต่างของ nucleus และ cytoplasm ของเซลล์ที่นิยมใช้กันมากที่สุด คือ haematoxylin และ eosin stain

(ง) การเมาส์ไลด์ (mounting) ใช้ permount ซึ่งเป็นของเหลวเหนียว (syrupey fluid) ใส่ลงใน tissue sections บนสไลด์และปิดด้วย cover slip เพื่อช่วยยึดให้ cover slip ติดอยู่กับสไลด์ที่ย้อมเสร็จเรียบร้อยแล้วไม่ให้เกิดความเสียหายและสามารถเก็บไว้ได้นาน นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า สำหรับเซลล์รังไข่โดยไข่แบ่งเป็น 5 ระยะ (Prat *et al.*, 2001) ได้แก่

Stage 1 Previtelloginin (PV)

Stage 2 Central germinal vesicle (CGV)

Stage 3 Migrating germinal vesicle (MGV)

Stage 4 Peripheral germinal vesicle (PGV)

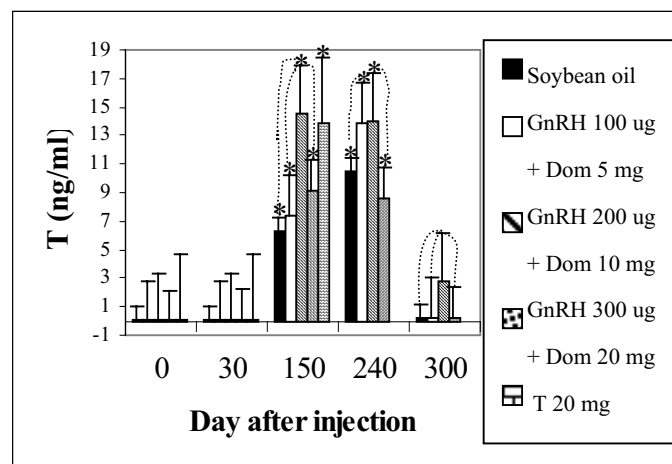
Stage 5 Maturation (germinal vesicle breakdown, GVBD)

6. ปลาที่พร้อมจะวางไข่ในเดือนกรกฎาคม ฉีดฮอร์โมน GnRHa 2 เข็ม ห่างกัน 6 ชั่วโมง ในปลาเพศเมีย อัตรา 7 และ 15 µg/kg ผสม domperidone 5 mg/kg ส่วนเพศผู้ฉีด 1 เข็ม 7 µg/kg ผสม domperidone 5 mg/kg

7. นำค่าข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละหน่วยทดลอง สรุปในรูปกราฟ ตาราง และวิเคราะห์ผลทางสถิติค่าเฉลี่ยของปริมาณฮอร์โมนเพศ โดยความแปรปรวน (ANOVA) ของค่าเฉลี่ย และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละหน่วยทดลองโดย Least Significant Differences (LSD) แต่ละหน่วยทดลอง โดยโปรแกรม Statistic Package Social Science (SPSS)

ผลและวิจารณ์ผล

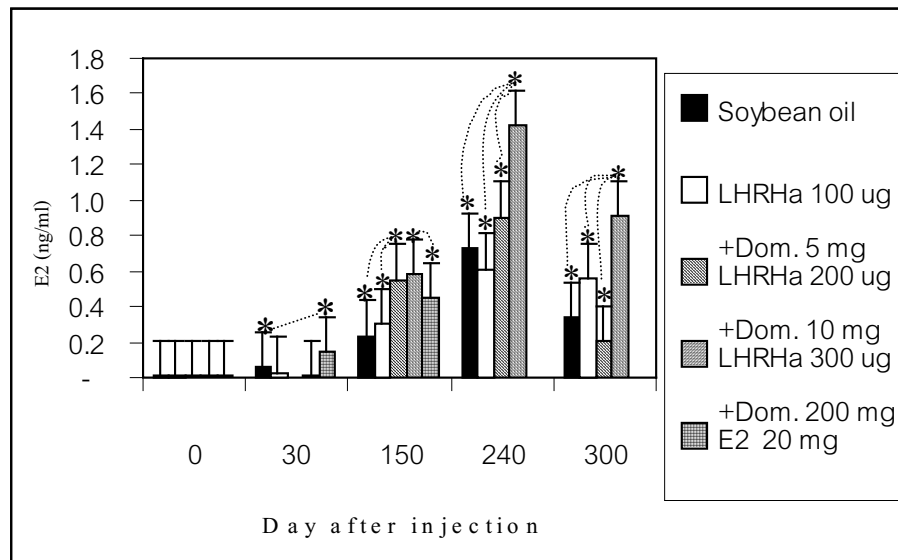
ผลการใช้ฮอร์โมนต่อ gonadal development โดยการวิเคราะห์ฮอร์โมน T และ E2 ก่อน และหลังการฉีดฮอร์โมนออกฤทธิ์เนิ่นนาน 30 วัน ในเดือนกุมภาพันธ์ส่วนใหญ่มีค่าน้อยและไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) ในแต่ละหน่วยทดลองกับก่อนฉีดฮอร์โมนและหน่วยควบคุม ในเดือนมิถุนายนซึ่งเป็นช่วงเริ่มฤดูการวางไข่ หลังจากการฉีดฮอร์โมนนาน 150 วัน ปริมาณฮอร์โมน T และ E2 เพศผู้และเพศเมียมีค่าเพิ่มขึ้น และมีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) กับปริมาณฮอร์โมนก่อนฉีดฮอร์โมนกับหน่วยควบคุม ปริมาณ T เพิ่มขึ้นสูงสุดหลังจากฉีดฮอร์โมน 240 วัน ในเดือนกันยายน จากหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย GnRHa 100 $\mu\text{g/kg}$ ผสม DOM 5 mg/kg และ GnRHa 200 $\mu\text{g/kg}$ ผสม DOM 10 mg/kg ส่วนฮอร์โมน E2 ในเพศเมียสูงสุดเดือนกันยายน จากหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย 300 $\mu\text{g/kg}$ ผสม DOM 20 mg/kg และ 200 $\mu\text{g/kg}$ ผสม DOM 10 mg/kg ซึ่งแตกต่างทางสถิติกับก่อนฉีดฮอร์โมน ($P<0.05$) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับชุดที่ฉีดด้วยน้ำมันถั่วเหลืองอย่างเดียว ($P>0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากปลาสดวัยดังกล่าวมีอายุเกือบ 2 ปี การเลี้ยงปลาสดวัยปกติจะสามารถเจริญพันธุ์ได้เมื่อมีอายุ 2 ปี หลังจากการฉีดฮอร์โมน 300 วัน ในเดือนพฤศจิกายน ปริมาณฮอร์โมนลดลงในทุกหน่วยทดลอง (รูปที่ 5.1-5.2)



รีดน้ำเชื้อ 22 กรกฎาคม 2544

รูปที่ 5.1 ผลของฮอร์โมน testosterone (T) ของปลาสดเพศผู้หลังจากฉีดฮอร์โมน

* แตกต่างทางสถิติกับก่อนฉีด ($P<0.05$), แตกต่างกันของค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยทดลอง

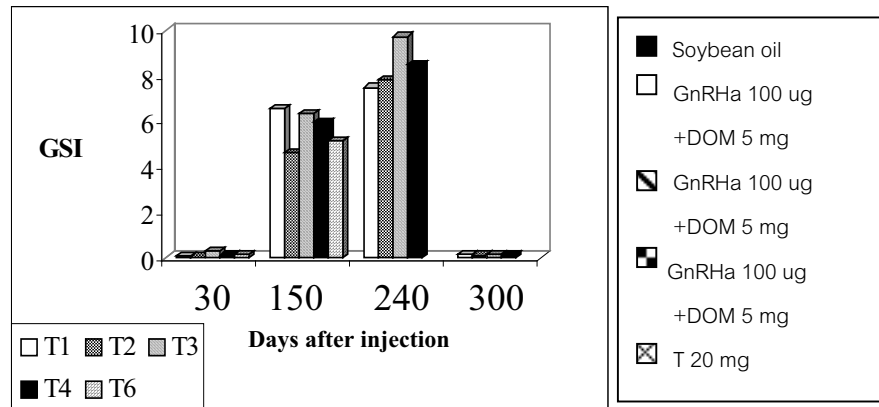


รีดไข่ 22 กรกฎาคม 2544

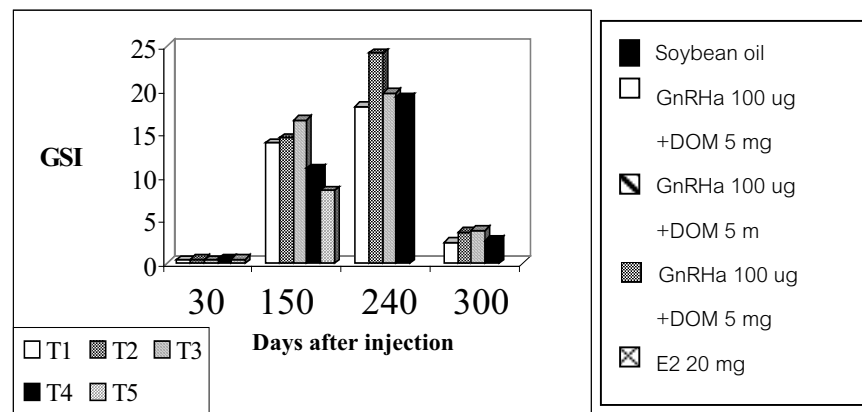
รูปที่ 5.2 ผลของฮอร์โมน estradiol (E2) ของปลาทรายเพศเมียหลังจากฉีดฮอร์โมน

* แตกต่างทางสถิติกับก่อนฉีด ($P < 0.05$), แตกต่างกันของค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยทดลอง

ผลการฉีดฮอร์โมนฯ ต่อ gonadal maturation หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 30 วัน ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศในแต่ละหน่วยทดลองมีค่าระหว่าง 0.27-0.55 % ในเพศเมียและ 0.05-0.32 % ในเพศผู้ หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 150 วัน ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศเพิ่มมากขึ้นระหว่าง 8- 16.52 % ในเพศเมียและ 4-6.54 % ในเพศผู้ ในทุกหน่วยทดลอง แต่ในเพศเมียหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย E2 20 mg/kg มีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศต่ำที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากการทดลองการปลดปล่อยของฮอร์โมนในน้ำมันถั่วเหลือง E2 ปลดปล่อยผ่านผนังเมมเบรนได้น้อยมากเมื่อเทียบกับ GnRHa และ domperidone ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศเพิ่มขึ้นสูงสุด 18-24.26 % ในเพศเมียและ 7-9.7 % ในเพศผู้ หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 240 วัน (15 กันยายน 2544) อัตราการผสมหลังจากการฉีดฮอร์โมน นาน 187 วัน ในเดือนกรกฎาคม เพื่อการรีดไข่และน้ำเชื้อด้วย GnRHa 2 เข็ม ห่างกัน 6 ชั่วโมง ในปลาเพศเมีย อัตรา 7 และ 15 $\mu\text{g/kg}$ ผสม domperidone 5 mg/kg ส่วนเพศผู้ฉีด 1 เข็ม 7 $\mu\text{g/kg}$ ผสม domperidone 5 mg/kg ในปลาจากทุกหน่วยการทดลองเพศผู้และเพศเมียอย่างละตัว สามารถรีดไข่และน้ำเชื้อได้หลังจากฉีดเข็มที่ 2 นาน 6-8 ชั่วโมง และมีอัตราผสมอยู่ระหว่าง 55-74.35 % การใช้ฮอร์โมน GnRH ผสม DOM ในรูปผสมน้ำมันถั่วเหลืองหรือน้ำมันถั่วเหลืองอย่างเดียวสามารถกระตุ้นให้ปลาทรายอายุ 1.5 ปี วางไข่และผสมเทียมได้เมื่ออายุครบ 2 ปี



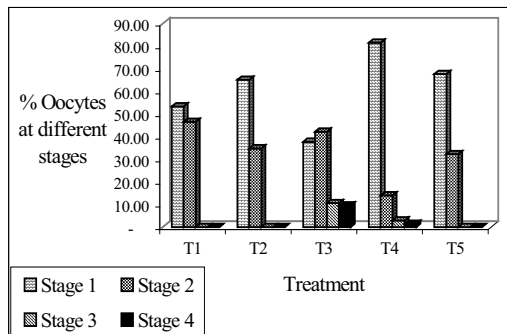
(A)



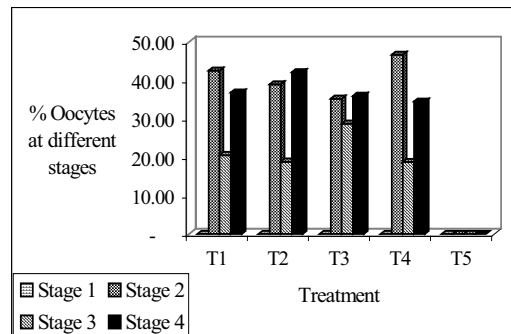
(B)

รูปที่ 5.3 ค่า GSI ปลาสร้อยหลังจากฉีดฮอร์โมน 30, 140, 240 และ 300 วัน ในแต่ละหน่วยทดลอง จากเพศผู้ (A) และเพศเมีย (B) อายุ 1.5 ปี ระหว่างเดือนกุมภาพันธ์ถึงพฤศจิกายน 2544

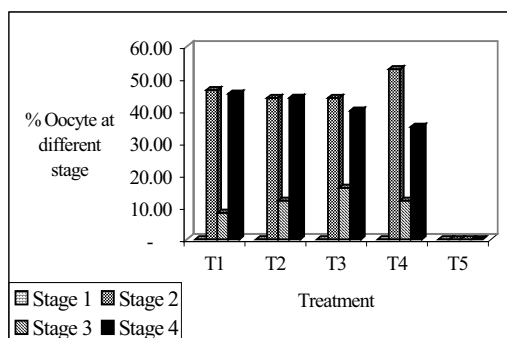
การพัฒนาของ oocyte ในปลาสร้อยอายุ 1.5 ปี ได้ผลดีหลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 150 วันในเดือนมิถุนายน ก่อนการฉีดไข่ในเดือนกรกฎาคมพบเซลล์ไข่ส่วนใหญ่อยู่ในระยะที่ 3 peripheral germinal vesicle (PGV) และระยะที่ 4 maturation (germinal vesicle breakdown, GVBD) มากขึ้น และพบมากในหน่วยทดลองที่ฉีดด้วยฮอร์โมน GnRHa ผสม DOM และน้ำมันถั่วเหลืองในธรรมชาติเซลล์ไข่เริ่มมีการพัฒนาได้ดีในช่วงฤดูกลางไข่ และดีกว่าช่วงก่อนและหลังฤดูวางไข่ สัดส่วนการพัฒนาของเซลล์ (ระยะที่ 3 และ 4) ยังคงเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย GnRHa ผสม DOM และน้ำมันถั่วเหลือง หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 240 วัน แต่หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 300 วัน การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ลดลงทั้งนี้เนื่องจากเป็นช่วงหลังฤดูวางไข่ (รูปที่ 5.4-5.10)



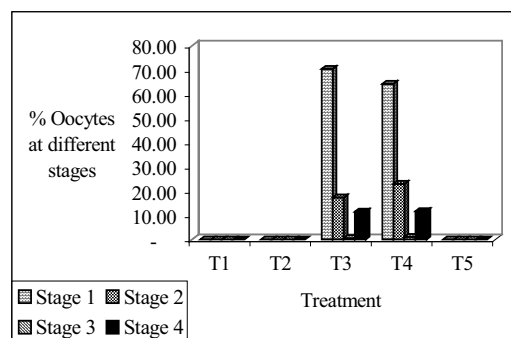
A



B



C



D

รูปที่ 5.4 ระยะการพัฒนาของ oocytes หลังจากการฉีดฮอร์โมน 30 วัน (A) 150 วัน (B) 240 วัน (C) และ 300 วัน (D) ในปลาซวาย

T1 Soybean oil

T2 GnRHa 100 µg ผสม DOM 5 mg

T3 GnRHa 200 µg ผสม DOM 10 mg

T4 GnRHa 300 µg ผสม DOM 20 mg

T5 E2 20 mg

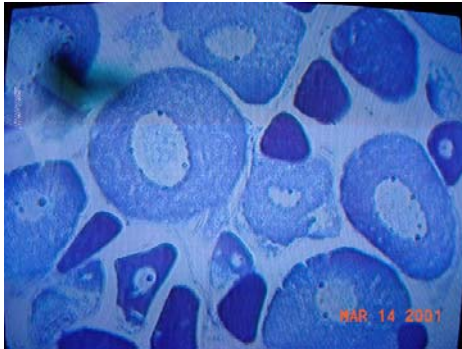
Stage 1 Previteloginin (PV)

Stage 1 Central germinal vesicle (CGV)

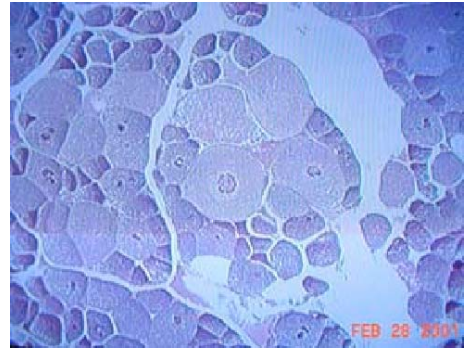
Stage 2 Migrating germinal vesicle (MGV)

Stage 3 Peripheral germinal vesicle (PGV)

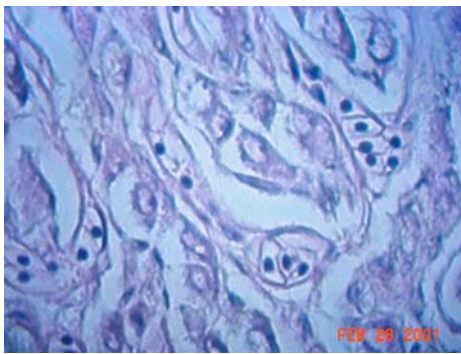
Stage 4 Maturation (germinal vesicle
breakdown, GVBD)



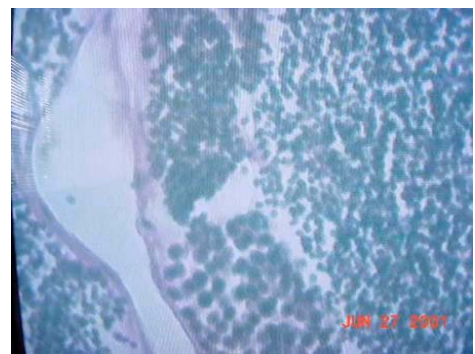
รูปที่ 5.5 ไข่ปลาสาวยระยะ MGIV เดือนกุมภาพันธ์ 2544 หลังจากฉีดด้วย GnRHa 200 μ g/kg ผสม DOM 10 mg/kg 30 วัน



รูปที่ 5.6 ไข่ปลาสาวยระยะ CGV เดือนกุมภาพันธ์ 2544 หลังจากฉีดด้วย E2 20 mg/kg 30 วัน



รูปที่ 5.7 Spermatogocyte ปลาสาวย เดือนกุมภาพันธ์ 2544 หลังจากฉีดด้วยน้ำมันถั่วเหลือง 30 วัน



รูปที่ 5.8 Spermatogocyte และ spermatozoa ปลาสาวย เดือนมิถุนายน 2544 หลังจากฉีดด้วยน้ำมันถั่วเหลือง 150 วัน



รูปที่ 5.9 Spermatid และ Spermatozoa ปลาสาวย เดือนมิถุนายน 2544 หลังจากฉีดด้วย GnRHa 200 μ g/kg ผสม DOM 10 mg/kg 150 วัน



รูปที่ 5.10 รังไข่ปลาสาวย เดือนมิถุนายน 2544 หลังจากฉีดด้วย GnRHa 200 μ g/kg ผสม DOM 10 mg/kg 150 วัน

สรุปผลและเสนอแนะ

ปลาซวายอายุ 1.5 ปี น้ำหนัก 0.6 กก. หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 30 วัน (กุมภาพันธ์ 2544) ปริมาณ T ในแต่ละหน่วยทดลอง ระหว่าง 0.02-0.18 ng/ml ส่วน E2 ระหว่าง 0.03-0.15 ng/ml ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศในแต่ละหน่วยทดลองมีค่าระหว่าง 0.27-0.55 % ในเพศเมียและ 0.05-0.32 % ในเพศผู้ หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 150 วัน ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศเพิ่มมากขึ้นระหว่าง 8- 16.52 % ในเพศเมียและ 4-6.54 % ในเพศผู้ ในทุกหน่วยทดลอง ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศเพิ่มขึ้นสูงสุด 18-24.26 % ในเพศเมียและ 7-9.7 % ในเพศผู้ หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 240 วัน (15 กันยายน 2544) อัตราการผสมหลังจากการฉีดฮอร์โมนนาน 187 วัน ในเดือนกรกฎาคม ของทุกหน่วยทดลองมีอัตราผสมระหว่าง 55-74.35 % หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 240 วัน (กันยายน 2544) มีค่าระหว่าง 18-24 % และ 7-9 % ในเพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ และมี T ระหว่าง 6-14 ng/ml ส่วน E2 มีค่าระหว่าง 0.61-1.42 ng/ml ส่วนปริมาณฮอร์โมนเพศ และค่า GSI ลดลงในทุกหน่วยการทดลองหลังฉีดฮอร์โมนนาน 300 วัน (พฤศจิกายน 2544) ผลการทดลองดังกล่าวจะเป็นรูปแบบที่จะนำไปประยุกต์ใช้ฉีดในพ่อแม่พันธุ์ปลาบึกเพื่อศึกษาระดับการเปลี่ยนแปลงของ T, E2 และการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ เพื่อกระตุ้นเจริญพันธุ์ของปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อดินต่อไป อย่างไรก็ตามปกติการเลี้ยงปลาซวายในบ่อดินจะเริ่มเจริญพันธุ์ได้เมื่ออายุ 2 ปี ซึ่งเป็นช่วงอายุที่ใกล้เคียงกับปลาที่ทดลองทำให้เห็นผลของการใช้ฮอร์โมนไม่ชัดเจนควรเริ่มทดลองในปลาที่มีอายุ 6 เดือน และใช้จำนวนปลาทดลองมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

- สุมนา ชมพูนวิปล. (2541). เกษษวิทยาของฮอร์โมน. ภาควิชาเกษษวิทยา, คณะแพทยศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 125 หน้า.
- Dence, J.B. (1980) Steroids and peptides : Selected chemical aspects for biology, biochemistry and medicine. Canada : John Wiley and Sons, Inc.
- Goren, A., Zohar, Y., Fridkin, M., Elhanati, E. and Koch, Y. (1990) Degradation of gonadotropin releasing hormone in the gilthead seabream, Sparus aurata; I. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 291-305.
- Nikolsky, G.V. (1963) The ecology of fisher. Academic Press, London. 352 p.
- Peter, R.E., Lin, H.R., Van der kraak, G. and Little, M. (1993) Releasing hormones, dompermine

- antagonists and induced spawning. In: Recent Advances in Aquaculture Muir. (ed. by J.F. Muir and R.J. Roberts), 25-30. Blackwell Scientific, Oxford.
- Prat, F., Zanuy, S. and Carrillo, M. (2001). Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozone on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Aquaculture* 198, 325-338.
- Scott, A.P., Bye, V.J., Baynes, S.M. and Springate, J.R.C. (1980) Seasonal variations in plasma concentration of 11-ketotestosterone and testosterone in male rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *J.Fish Biol.* 17, 495-505.
- Van der Kraak, G., Lin, H.R., Donalson, E.M., Dye, H.M. and Hunter, G.A., 1983. Effects of LH-RH and des-Gly10 -[D-Ala6]-LH-RH ethylamide on plasma gonadotropin levels and oocyte maturation in adult female coho salmon (*Hypophthalmichthys molitrix*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* 78, 81-86.
- Zohar, Y., Tosky, M., Pagelson, G. and Finkelman, Y. (1989b) Induction of spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, using [D-Ala6-Pro9Net]-LHRH: comparison with the use of HCG. *Israeli J. Aquaculture-Bamidgeh* 41, 105-113.
- Zohar, Y., Goren, A., Fridkin, M., Elhanati, E. and Koch, Y. (1990) Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream *Sparus aurata*: II. Cleavage of native salmonid GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary, kidney and liver. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 306-331.
- Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S. and Tandler, A. (1995a) Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In: *Broodstock management and Egg and Larval Quality*. (ed. by N.R. Bromage and R.J. Roberts), 94-117. Blackwell, Oxford.
- Zohar, Y., Elizur, A., Sherwood, N.M., Rivier, J.F. and Zmora, N. (1995b) Gonadotropin releasing potencies of the three native forms of gonadotropin releasing hormones present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97, 289-299.

บทที่ 6

ระดับฮอร์โมนเพศ อวัยวะสืบพันธุ์ในรอบปี และผลการใช้ฮอร์โมนชนิดและรูปแบบต่าง ๆ ต่อการเจริญพันธุ์ปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อดิน

บทนำ

ปลาบึกเป็นปลาน้ำจืดไม่มีเกล็ดที่มีขนาดใหญ่และเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในโลก ตามอนุสัญญาว่าด้วยการอนุรักษ์พันธุ์พืชและสัตว์ป่า CONVENTIONAL ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES OF WILD FAUNA AND FLORA (CITES) กำหนดให้ปลาบึกเป็นปลาที่กำลังใกล้สูญพันธุ์ (Endangered Species) พ.ศ. 2524 มีการจับปลาบึกมากขึ้นเรื่อย ๆ ในประเทศไทยที่บ้านหาดไคร้ อ.เชียงของ จ.เชียงราย บริเวณดังกล่าวกรมประมงกำหนดให้เป็นบริเวณที่จับปลาบึกเพื่อผสมเทียม ซึ่งปี พ.ศ. 2533 สามารถจับปลาบึกได้มากที่สุด จำนวน 69 ตัว หลังจากปริมาณการจับลดลงเรื่อย ๆ ปี พ.ศ. 2541 จับเพศผู้ได้เพียง 1 ตัว, ปี พ.ศ. 2543 จับได้ 2 ตัว ล่าสุดปี พ.ศ. 2544 และปี 2545 จับไม่ได้ อย่างไรก็ตามสถานีประมงน้ำจืด จ.พะเยา สามารถผสมเทียมโดยใช้ฮอร์โมน GnRHa ฉีดสองเข็มความเข้มข้น 10 และ 20 $\mu\text{g/kg}$ ร่วมกับ domperidone 10 mg/kg สำเร็จครั้งแรกจากพ่อแม่พันธุ์อายุ 16 ปี น้ำหนักประมาณ 60 กก. ได้ลูกปลาบึกขนาด 2-4 นิ้ว ประมาณ 100,000 ตัว แต่ปี 2545 ได้ลูกปลาบึกน้อยมาก 2,000 ตัว (กรมประมง 2545) เนื่องจากมีปัญหาไม่มีน้ำเชื้อเพศผู้ที่ดีและมีปลาเพศผู้อยู่จำนวนน้อย จึงต้องอาศัยน้ำเชื้อปลาบึกจากโครงการฯ บางส่วน

ระบบสืบพันธุ์ของปลาบึกเพศเมียอายุ 3.5 ปี ภายในรังไข่ใน lamellae พบไข่ 2 ระยะ คือ ระยะ oogonia อยู่เป็นกลุ่มหรืออยู่เดี่ยวฝังอยู่เป็นเซลล์ขนาดเล็ก มีนิวเคลียสใหญ่อยู่กลางเซลล์ ส่วนไข่ระยะ primary growth phase มีขนาดใหญ่ขึ้น อวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ ส่วนรังไข่ของปลาบึกจากแม่น้ำโขงวัยเจริญพันธุ์มีขนาดใหญ่มาก มีไข่ระยะต่าง ๆ บรรจุอยู่ การเจริญของไข่แบ่งได้ 5 ระยะ สองระยะแรก คือ oogonia และ primary growth phase ระยะที่ 3 ได้แก่ระยะ early-vitellogenesis ขนาดของไข่และนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นไซโตพลาสซึมเริ่มใส และมีการเพิ่มจำนวนนิวคลีโอตัส ระยะที่ 4 ได้แก่ mid-vitellogenesis ระยะที่ 5 ได้แก่ maturation egg stage ไข่ระยะนี้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5 มิลลิเมตร yolk granules เชื่อมติดกัน ไข่มีลักษณะใสและนิวเคลียสมีตำแหน่งชิดขอบเซลล์

ระบบสืบพันธุ์ของปลาบึกเพศผู้อายุ 3 ปีครึ่ง ประกอบด้วยอวัยวะ 1 คู่ห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อประสานชนิดเส้นใยเรียก tunica albuginea อวัยวะมีลักษณะเป็นท่อพู่เล็ก ๆ ภายในพบ germ cells

เพียงระยะเดียว คือ spermatogonia ขณะที่อวัยวะของปลาบึกวัยเจริญพันธุ์มีขนาดใหญ่คล้ายนิ้วมือในแต่ละพูประกอบด้วย seminiferous tubules ซึ่งเป็นแหล่งสร้างตัวอสุจิ ภายใน lumen ของท่อและมี spermatogenic cells ระยะ ต่าง ๆ อยู่หนาแน่น โดยเซลล์ระยะเดียวกันจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ได้แก่ spermatogonia, primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatids และ spermatozoa (นวลอนงค์ 2537) ฤกษ์ 2536 ได้ศึกษาค่าดัชนีความสมบูรณ์ของรังไข่และอวัยวะ gonadosomatic index (GSI) ปลาบึกเพศเมียและเพศผู้ที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์จากแม่น้ำโขงขนาด 190 และ 142 กก. มีค่า GSI 8.7 % และ 6.3 % ตามลำดับ ปลาบึกที่ยังไม่เจริญพันธุ์จากการเลี้ยงในกระชังเพศเมียขนาด 6.67 กก. เพศผู้ในบ่อดินขนาด 5.25 กก. มีค่า GSI 0.1 % และ 0.02 % ตามลำดับ

ระบบการเจริญพันธุ์ของปลาในบ่อเลี้ยงจะพบว่าในเพศเมียมีปัญหามากกว่าในเพศผู้ ปัญหาที่พบส่วนมากมี 3 ระยะ ได้แก่ 1). รังไข่ไม่สามารถสร้างไข่แดง 2). ไข่ไม่สามารถพัฒนาถึงระยะไข่สุก 3). ไม่สามารถวางไข่ ทั้งนี้อาจเนื่องจากความไม่สมบูรณ์ของตัวปลา หรือสภาพแวดล้อมภายนอก (Zohar and Mylonas 2001) นฤพลและวัณนะ (2537) ศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ในรอบปี ของแม่ปลาตะเพียนขาวพบไข่ในระยะการสร้างไข่แดงเกิดขึ้นตลอดทั้งปี ในแม่ปลาตะเพียนขาวพบว่า T จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญในเดือนมกราคม แล้วจะค่อย ๆ ลดลงส่วนระดับความเข้มข้น ของ E2 ก่อนข้างสูง ในฤดูวางไข่เดือนพฤษภาคม T จะมีค่าประมาณ 1 ng/ml ขณะที่ E2 มีค่าประมาณ 2.3 ng/ml การเปลี่ยนแปลงระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนของแม่ปลาตะเพียนขาวกับการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์อื่นได้แก่ค่า GSI ไม่ชัดเจนเหมือนกับพบในปลาเขตนาว สโตรโมนเพศในกลุ่มของ steroid hormone ในปลาเพศเมียในระหว่างการพัฒนาของไข่ระยะ oocyte estradiol - 17 β (E2) มีบทบาทสำคัญในขบวนการสร้างไข่แดงในไข่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับค่า GSI ขณะที่ 17 β -20 β -dihydroxy- 4 pregnen - 3 - on (DHP) จะกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง gonadotropin hormone (GtH) และเกิดการสุกของไข่ ส่วน testosterone (T) ซึ่งเป็นสารชักนำให้เกิดการสร้าง E2 (Scott *et al.*, 1980) ในปลาทอง T จำเป็นต่อการสร้าง GtH (Kobayashi *et al.*, 1986) ในปลาดุก *Clarias macrocephalus* (Gunther) อายุ 2-3 ปีระดับสโตรโมน T สูงสุดในเดือนกรกฎาคม ถึง กันยายน (54 และ 56 ng/ml) ขณะที่ระดับ E2 สูงสุดในเดือนธันวาคม (20 ng/ml; Tan-Fermin *et al.*, 1997) ขณะที่ฤดูกลาวางไข่ของปลา salmonid ในเดือนมิถุนายน ถึง กันยายน เนื่องจาก E2 มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วช่วงก่อนฤดูวางไข่ แสดงว่าระดับ E2 สัมพันธ์กับปริมาณของ vitellogenin แสดงว่า E2 กระตุ้นการสังเคราะห์ vitellogenin หลังจากนั้นระดับ E2 จะลดลงอย่างรวดเร็วในฤดูวางไข่ (Ueda and Yamauchi 1995). ในการผลิตลูกปลาจำนวนมากจำเป็นต้องใช้สโตรโมนกระตุ้นก่อนการรัดไข่และน้ำเชื้อ สโตรโมนในรูปแบบปกติเมื่อฉีดปลาจะอยู่ได้ประมาณ 6-12 ชั่วโมง (Van der Kraak *et al.*, 1983) บางครั้งจำเป็นต้องฉีดสโตรโมนมากกว่า 2 ครั้งเพื่อกระตุ้นการวางไข่ ซึ่งอาจทำให้ปลาช้ำหรือเครียดได้และยากต่อ

การจัดการ เคมีฮอร์โมนที่นิยมฉีดกระตุ้นการวางไข่ นิยมใช้จากต่อมใต้สมอง แต่เนื่องจากวิธีใช้ไม่สะดวก และมีต้นทุนค่อนข้างแพงกว่าการใช้ ฮอร์โมนสังเคราะห์ เช่น analogue ของ gonadotropin releasing hormone (GnRH_a หรือ busserelin; suprefact[®]) ซึ่งมีความคงทนกว่าในรูปปกติต่อการย่อยของเอนไซม์ (Van der Kraak *et al.*, 1983; Zohar *et al.*, 1989b, 1990, 1995a,b; Goren *et al.*, 1990) และมักใช้ร่วมกับ domperidone (DOM) เพื่อช่วยยับยั้ง dopamine (Peter *et al.*, 1993) ผลของการใช้ GnRH_a รูปแบบแขวนลอยในน้ำมันถั่วเหลืองออกฤทธิ์เนิ่น หรือแบบกระตุ้นในช่วงจังหวะที่เหมาะสม จะมีผลต่อระดับฮอร์โมนและการเจริญพันธุ์ของปลาบึก และจะช่วยให้การผสมเทียมประสบความสำเร็จ

วิธีการดำเนินการวิจัย

การทดลองที่ 1. ระดับฮอร์โมนเพศและการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ปลาบึกในรอบปี 2543

1.1 ณ จรัลฟาร์ม อ.พาน จ.เชียงราย (ปลาอายุ 6 ปี ขนาด 12 กก.) เก็บข้อมูล ฮอร์โมน น้ำหนักและการเจริญเติบโตทุกปลายเดือน ปลาบึกขนาด 13 กก. อายุ 8 ปี ณ บ่อภาควิชาเทคโนโลยีการประมง เก็บข้อมูล ฮอร์โมน น้ำหนักและการเจริญเติบโตทุกกลางเดือน ปลาบึกแต่ละแหล่งมีจำนวน 12 ตัว ทำเครื่องหมายโดยฉีด Alcian Blue เลี้ยงในบ่อขนาด 1,892 ตารางเมตร ลึก 1.5 เมตร

1.2 ให้อาหารผสมโปรตีน 20 % ประกอบด้วยปลาป่น 8.1 % กากถั่วเหลือง 4.9 % รำ 4 % และปลายข้าว 3 % เสริมด้วยอาหารเบต้าแคโรทีน 2 % ผสมน้ำมันปลาทูน่า 3 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กก. ให้อัตราวันละ 1.5 % ของน้ำหนักตัวปลา

1.3 ชั่งน้ำหนักและเก็บเลือดจาก caudal vein บริเวณโคนหาง ตัวละ 1 มิลลิกรัม ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาทีแยก serum 50 µl มาวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน testosterone และ estradiol โดยวิธี Electrochemiluminescence immuno assay (Elecsys รุ่น 1010, Roche Germany)

การวิเคราะห์ estradiol (E2) และ testosterone (T) Competition principle Immunocomplex ระหว่าง E2 ที่อยู่ใน serum กับ estradiol-specific biotinylated polyclonal antibody ของกระต่าย และ Testosterone ที่อยู่ใน serum กับ testosterone-specific biotinylated monoclonal antibody ของหนู จะจับกับ streptavidin-coated microparticle โดยใช้ส่วนที่ติดฉลากด้วย biotin จับกับ streptavidin บน microparticle ส่วนของ estradiol-specific biotinylated antibody ที่เหลืออยู่จะจับกับ estradiol derivative ที่ติดฉลากด้วย ruthenium กลายเป็น antibody-hapten complex ที่เกาะอยู่บน microparticles แล้ววัดใน measuring cell โดย photomultiplier ค่า sensitivity ของ T จะอ่านค่าต่ำสุด 0.02 ng/ml ส่วน E2 ที่ 0.01 ng/ml

1.4 นำค่าข้อมูลฮอร์โมนเพศที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยของแต่ละเดือน สรุปในรูปกราฟและตาราง

การทดลองที่ 2. การเจริญพันธุ์ของปลาบึกโดยฉีดด้วยฮอร์โมน GnRHa หรือ buserelin กับ domperidone (DOM), testosterone (T) และ estradiol (E2) ในน้ำมันถั่วเหลืองในปี 2544

2.1 ปลาบึก ณ จรัลฟาร์ม อ.พาน จ.เชียงราย น้ำหนัก 14 กก. อายุ 7 ปี เพศผู้และเพศเมีย อย่างละ 6 ตัว 1,600 ตารางเมตร ลึก 1.5 เมตร ปลาบึก ณ บ่อภาควิชาเทคโนโลยีการประมง น้ำหนัก 14 กก. อายุ 9 ปี เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 16 ตัว ซึ่งเลี้ยงในบ่อดินขนาด 1,892 ตารางเมตร ลึก 1.5 เมตร เก็บข้อมูลทุกกลางเดือน

2.2 ฉีด Alcian Blue บริเวณโคนครีบตำแหน่งต่าง ๆ ในปลาแต่ละตัว เพื่อศึกษาข้อมูลในปลายเดือนของทุกเดือน

2.3 ให้อาหารผสมโปรตีน 20 % ประกอบด้วยปลาป่น 8.1 % กากถั่วเหลือง 4.9 % รำ 4 % และปลายข้าว 3 % เสริมด้วยอาหารเบต้าแคโรทีนอีก 2 % ผสมน้ำมันปลา 3 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กก. ให้อัตราวันละ 1.5 % ของน้ำหนักตัวปลา

2.4 ชั่งน้ำหนัก และเก็บเลือดจาก caudal vein บริเวณโคนหาง ตัวละ 1 มิลลิกรัม ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที แยก serum 50 µl มาวิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน testosterone และ estradiol โดยวิธี Electrochemiluminescence immuno assay (Elecsys รุ่น 1010) วิธีการวิเคราะห์เหมือนปี 2543

2.5 ผ่าตัดนำอวัยวะเพศมาทำเนื้อเยื่อวิทยา และวัดดัชนีความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonadosomatic Index; GSI) ก่อนฤดูวางไข่ โดยคำนวณค่า Gonadosomatic Index ตามวิธี Nikolsky (1963)

$$GSI = \frac{\text{น้ำหนัก อวัยวะเพศ} \times 100}{\text{น้ำหนัก ตัวปลา}}$$

การศึกษาการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ปลาบึก ย้อมเซลล์ด้วยสี Haematoxylin และ Eosin โดยมีขั้นตอนต่าง ๆ เช่นเดียวกับในปลาซิว นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า สำหรับเซลล์อณฑะ และ 100 เท่า สำหรับเซลล์รังไข่ แยกเป็น 4 ระยะการพัฒนา ตามวิธีของ Billard (1986) และ (Prat *et al.*, 2001) ตามลำดับ

2.6 การเตรียม Dose ต่าง ๆ ของรูปแบบฮอร์โมนออกฤทธิ์เน้นสำหรับฉีดปลาบึก

ปลาบึกบ่อภาควิชาประมง แม่โจ้ แบ่งเป็น 5 หน่วยทดลอง

ก. หน่วยทดลองที่ 1 (T1) Control ฉีดด้วย Soybean Dose 1 ml/ 5 กก. เตรียม soybean oil ปริมาตร 20 ml

- ข. หน่วยทดลองที่ 2 (T2) Dose (GnRHa 200 μ g+DOM 10 mg)/ kg ฉีด 1 ml/5 kg
 5 kg น้ำหนักปลา คิดเป็น Buserelin 1000 μ g ผสม DOM = 50 mg เตรียม 1 ml soybean oil มีตัวยา Buserelin 1,000 μ g + DOM = 50 mg เตรียม 20 ml โดยนำ Buserelin 20 mg + DOM 1 g มาละลายใน soybean oil 20 ml
- ค. หน่วยทดลองที่ 3 (T3) Dose (GnRHa 300 μ g+DOM 20 mg)/ kg ฉีด 1 ml/ 5 kg
 ถ้าปลาหนัก 5 kg ฉีด Buserelin 1,500 μ g + DOM 100 mg ต้องเตรียม 1 ml มีตัวยา Buserelin 1,500 μ g + DOM 100 mg เตรียม 20 ml โดยนำ Buserelin 30 mg + DOM 2 g มาละลายใน soybean oil 20 ml
- ง. หน่วยทดลองที่ 4 (T4) Dose E2 20 mg/kg ฉีด 1 ml /5 kg
 ปลาหนัก 5 kg ฉีด 100 mg ต้องเตรียม 1 ml มีตัวยา 100 mg เตรียม 10 ml โดยนำ E2 1 g มาละลายใน soybean oil 10 ml
- จ. หน่วยทดลองที่ 5 (T5) Dose T 20 mg/kg ฉีด 1 ml/5 kg
 ปลาน้ำหนัก 5 kg ฉีด 100 mg
 เตรียม 1 ml มีตัวยา 100 mg เตรียม 10 ml โดยนำ T 1 g มาละลายใน soybean oil 10 ml

ตารางที่ 6.1 ปริมาณและความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ผสมกับ domperidone (DOM), testosterone (T) และ estradiol (E2) แขนงลอยในน้ำมันถั่วเหลือง ณ บ่อภาควิชาเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้

หน่วยทดลอง	เพศ	จำนวน	น้ำหนักเฉลี่ย	ความเข้มข้น	ปริมาตรฉีด (ml/BW)
T1	ผู้	4	14.50±1.80	Soybean oil only	2.90
	เมีย	4	14.35±3.09		2.87
T2	ผู้	4	14.03±3.75	200 µg/kg GnRHa and 10 mg/kg DOM in soybean oil	2.80
	เมีย	4	14.33±4.19		2.87
T3	ผู้	4	14.28±1.80	300 µg/kg GnRHa and 20 mg/kg DOM in soybean oil	2.86
	เมีย	4	14.80±3.50		2.96
T4	ผู้	4	14.13±2.56	20 mg/kg Testosterone (T) in soybean oil for male	2.83
T5	เมีย	4	14.40±1.58	20 mg/kg Estradiol (E2) in soybean oil for female	2.88

ปลาบึกบ่อจรัลฟาร์ม อ.พาน จ.เชียงราย แบ่งเป็น 2 หน่วยทดลอง

ก. หน่วยทดลองที่ 1 (T1) Control ฉีดด้วย soybean oil 1 ml/ 5 kg

*เตรียม 20 ml soybean oil

ข. หน่วยทดลองที่ 2 (T2) Dose (GnRHa 300 µg + DOM 20 mg)

/ kg 1 ml / 5 kg

5 kg น้ำหนักปลา คิดเป็น Buserelin 1500 µg + DOM 100 mg

เตรียม 1 ml มีตัวยา Buserelin 1500 µg + DOM 100 mg เตรียม

20 ml โดยนำ Buserelin 30 mg + DOM 2 g มาละลายใน

soybean oil 10 ml

ตารางที่ 6.2 ปริมาณและความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ผสมกับ domperidone (DOM), testosterone (T) และ estradiol (E2) แขนงลอยในน้ำมันถั่วเหลือง ณ บ่อจรัลฟาร์ม อ.พาน จ.เชียงราย

หน่วยทดลอง	เพศ	จำนวน	น้ำหนักเฉลี่ย	ความเข้มข้น	ปริมาตรฉีด (ml/BW)
T1	ผู้	3	12.83±1.26	Soybean oil	2.56
	เมีย	3	14.33±0.29		2.86
T2	ผู้	3	13.83±1.04	300 µg/kg GnRHa and DOM 20 mg/kg in soybean oil	2.76
	เมีย	3	14.33±1.15		2.86

2.7 นำค่าข้อมูลที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละหน่วยทดลองของแต่ละเดือน และสรุปในรูปกราฟและตาราง วิเคราะห์ความแปรปรวนของค่า T และ E2 โดยโปรแกรม SPSS และความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละหน่วยทดลอง โดย Least Significance Different Test (LSD)

การทดลองที่ 3. ผลการพัฒนาวงศ์ของปลาน้ำจืดจากสารสกัดฮอร์โมน GnRHa หรือ Buserelin รูปแบบปกติ และออกฤทธิ์ในน้ำ ในปี 2545

3.1 ปลาน้ำจืด ณ จรัลฟาร์ม อ.พาน จ.เชียงราย น้ำหนักเฉลี่ย 15 กก. อายุ 8 ปี เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 6 ตัว ในบ่อขนาด 1,600 ตารางเมตร ลึก 1.5 เมตร ปลาน้ำจืด ณ บ่อภาควิชาเทคโนโลยีการประมง น้ำหนักเฉลี่ย 15 กก. อายุ 10 ปี เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 9 ตัว กลุ่มที่ 1 ในบ่อขนาด 1,800 ตารางเมตร ลึก 1.5 เมตร กลุ่มที่ 2 น้ำหนักเฉลี่ย 10 กก. อายุ 10 ปี เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 9 ตัว ในบ่อขนาด 1,200 ตารางเมตร ลึก 1.5 เมตร ทำเครื่องหมายโดยฉีดยา Alcian Blue บริเวณโคนครีป

3.2 ให้อาหารผสมโปรตีน 30 % ประกอบด้วยปลาป่น 46 กก., กากถั่วเหลือง 23 กก., รำ 12 กก. และปลายข้าว 15 กก. เสริมด้วยอาหารเบต้าแคโรทีน 1 % ผสมน้ำมันปลา 3 ซีซี/อาหาร 1 กก. ให้อัตราวันละ 1.5 % ของน้ำหนักตัวปลา ใช้ใบพัดและเครื่องสูบน้ำเพื่อให้กระแสน้ำไหลเวียนทุกวันช่วงเช้า

3.3 ชั่งน้ำหนัก และเก็บเลือดบริเวณโคนหาง ตัวละ 1 ซีซี ปั่นที่ความเร็ว 10,000 รอบ/นาที แยกซีรัม 50 µl วิเคราะห์ปริมาณฮอร์โมน testosterone และ estradiol โดยวิธี Electrochemiluminescence immuno assay (Elecsys รุ่น 1010) วิธีการวิเคราะห์เหมือนปี 2543

3.4 ตรวจการพัฒนาวงศ์ของไข่และอสุจิหลังจากฉีดฮอร์โมน 4 สัปดาห์ โดยใช้สายยางขนาด 3-4 มิลลิเมตร สอดเข้าในช่องเพศลึกลับ 5-8 นิ้ว ดูไข่และน้ำเชื้อมาตรวจสอบ หากไข่และน้ำเชื้อเริ่ม

เจริญพันธุ์ คุ้ได้จากขนาดที่สม่ำเสมอ 1.2-1.5 มิลลิเมตร มีสีเหลืองใส ฉีดฮอร์โมนเข็มที่หนึ่ง GnRHa 10 µg/kg ผสม domperidone 5 mg/kg ในเพศเมียและเพศผู้ ห่างกัน 6-9 ชั่วโมง ฉีดเข็มที่สอง 20 µg/kg ผสม domperidone 10 mg/kg ฉีดเฉพาะเพศเมีย ตรวจสอบการพัฒนาของไข่และและอสุจิ หลังจากฉีด 9-24 ชั่วโมง

3.5 เมื่อรีดไข่และน้ำเชื้อได้ ทดสอบปริมาณของไข่และน้ำเชื้อ โดยการชั่งน้ำหนักไข่ และนับจำนวนไข่ และความหนาแน่นของอสุจิ โดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด

3.6 นำค่าข้อมูลปริมาณเซลล์สืบพันธุ์ ปริมาณฮอร์โมน ที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละหน่วยทดลองในแต่ละเพศ แสดงในรูปกราฟหรือตาราง ความแปรปรวนของค่าเฉลี่ยทางสถิติ Analysis of Variance (ANOVA) ที่ระดับ $P^* < 0.05$ และความแตกต่างของค่าเฉลี่ย Least Significant Difference Test (LSD) โดยใช้โปรแกรม Statistic Package for Social Science (SPSS)

3.7 การเตรียม Dose ต่าง ๆ ของฮอร์โมน แบบผสมน้ำมันถั่วเหลืองสำหรับฉีดปลาปัก

ตารางที่ 6.3 ปริมาณและความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ผสมกับ domperidone (DOM), หน่วยทดลองชุดที่ 1 ณ บ่อภาควิชาเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้

หน่วยทดลอง	เพศ	จำนวน	น้ำหนักเฉลี่ย	ความเข้มข้น	ปริมาตรฉีด (ml/BW)
T1	ผู้	3	14.53±0.89	0.9 % NaCL	2.07
	เมีย	3	16.77±0.33		2.39
T2	ผู้	3	16.40±0.20	50 µg/kg GnRHa	2.34
	เมีย	3	16.67±0.04		2.38
T3	ผู้	3	16.00±0.12	100 µg/kg GnRHa	2.28
	เมีย	3	16.83±0.65		2.40

หมายเหตุ T₁ Control ฉีดน้ำเกลือ 0.9% ต่อสัปดาห์
 T₂ ฉีด GnRHa 50 µg / 1 กก. ต่อสัปดาห์
 T₃ ฉีด GnRHa 100 µg / 1 กก. ต่อสัปดาห์

ตารางที่ 6.4 ปริมาณและความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ผสมกับ domperidone (DOM),
แขวนลอยในน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้ในแต่ละหน่วยทดลอง ชุดที่ 2 ณ บ่อภาควิชา
เทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้

หน่วย ทดลอง	เพศ	จำนวน	น้ำหนักเฉลี่ย	ความเข้มข้น	ปริมาตรฉีด (ml/BW)
T1	ผู้	3	10.60±0.20	Soybean oil	1.51
	เมีย	3	10.00±0.34		1.43
T2	ผู้	3	10.50±0.20	50 µg/kg GnRHa	1.50
	เมีย	3	10.30±0.50		1.47
T3	ผู้	3	10.70±0.20	100 µg/kg GnRHa	1.53
	เมีย	3	10.90±0.60		1.56

หมายเหตุ T₁ Control ฉีด Soybean oil (SO) ทุกสัปดาห์
T₂ ฉีด GnRHa 50 µg / 1 กก. ใน SO ทุกสัปดาห์
T₃ ฉีด GnRHa 100 µg / 1 กก. ใน SO ทุกสัปดาห์
1. เริ่มฉีดฮอร์โมน 6 พฤษภาคม 2545 เป็นเวลา 1 เดือน โดยลดปริมาณลงครึ่ง
หนึ่ง/สัปดาห์
2. ปริมาตรใช้ฉีด คือ 1 ซีซี / ปลา 7 กก.

ตารางที่ 6.5 ปริมาณและความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ผสมกับ domperidone (DOM),
แขวนลอยในน้ำมันถั่วเหลืองที่ใช้ในแต่ละหน่วยทดลอง ณ บ่อจรัลฟาร์ม อ.พาน
จ.เชียงราย

หน่วย ทดลอง	เพศ	จำนวน	น้ำหนักเฉลี่ย	ความเข้มข้น	ปริมาตรฉีด (ml/BW)
T1	ผู้	3	14.83±1.04	Soybean oil	2.11
	เมีย	3	14.67±0.29		2.10
T2	ผู้	3	13.83±1.26	300 µg/kg GnRHa in soybean oil	1.97
	เมีย	3	14.00±1.00		2.00

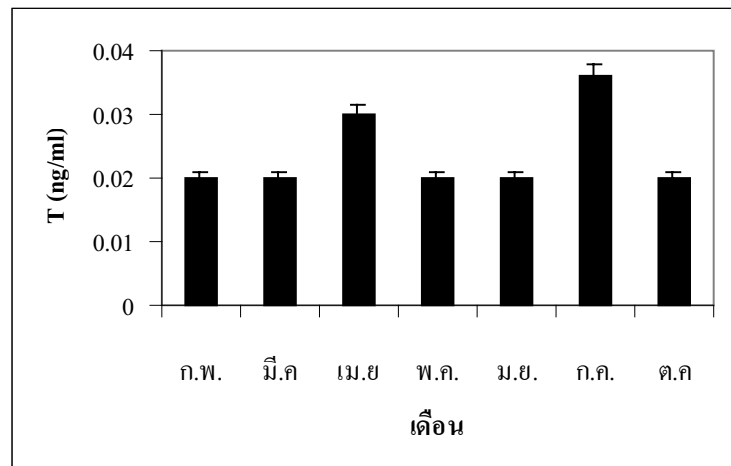
หมายเหตุ T₁ Control ฉีด Soybean oil ทุกเดือน
T₂ ฉีด GnRHa 100 µg / กก. ทุกเดือน

ผลและวิจารณ์ผล

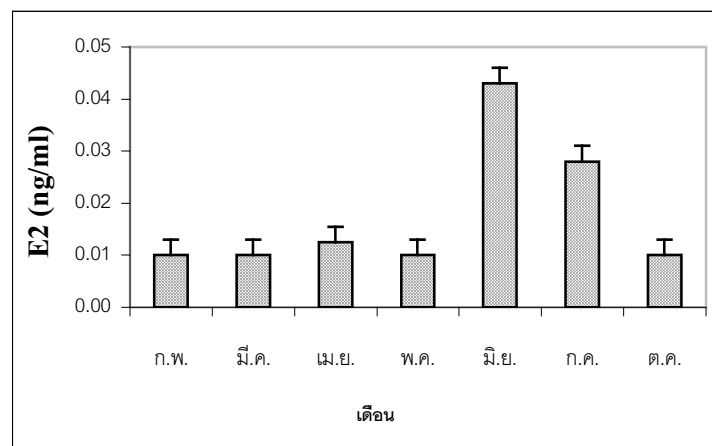
การทดลองที่ 1. ระดับฮอร์โมนเพศและการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ปลาบึกในรอบปี 2543

การทดลองที่ 1.1 ปลาบึก อายุ 6 ปี (ปี 2543) ณ จรัลฟาร์ม อ.พาน จ.เชียงราย

การเจริญเติบโตของปลาบึกจาก 12 กก. เป็น 14.4 กก. อายุ 6 ปี น้ำหนักเพิ่มขึ้นประมาณ 2.4 กก. / ปี ปริมาณฮอร์โมน T ในเพศผู้วัดได้สูงสุดช่วงเดือนกรกฎาคม 0.04 ng/ml หลังจากนั้นปริมาณฮอร์โมนมีค่าลดลง ช่วงที่วัดได้ส่วนใหญ่เป็นช่วงฤดูวางไข่ สำหรับฮอร์โมน E2 ในเพศเมียวัดได้สูงสุดเดือนมิถุนายนและกรกฎาคม มีค่า 0.04 และ 0.02 ng/ml ตามลำดับ เมื่อเทียบกับปลาบึกอายุ 8 ปี ที่ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง พบว่าระดับของฮอร์โมน T และ E2 ในรอบปีมีการเปลี่ยนแปลงที่ใกล้เคียงกันแต่ปริมาณฮอร์โมน T ในปลาบึกอายุ 8 ปี ในช่วงเวลาเดียวกันมีค่ามากกว่า (รูปที่ 6.1-6.4) แต่ยังไม่พบการพัฒนาของไข่และอสุจิ เป็นไปได้ว่าปริมาณฮอร์โมนที่วัดได้ช่วงก่อนและฤดูการวางไข่ เกิดจากขบวนการสร้างฮอร์โมนเพศโดย ธรรมชาติที่ส่วนใหญ่จะสร้างจากรังไข่และอวัยวะที่เริ่มตอบสนองต่อฮอร์โมนจากต่อมใต้สมอง เช่น โกลาโดโรโทรปินที่มี gonadotropin I และ gonadotropin II เป็นตัวควบคุมก่อนที่จะมีการสร้างฮอร์โมนเพศ และมีความสัมพันธ์กับปริมาณ GnRH หรือ LHRH (Chun *et al.*, 1994; Colin 1993) จะเห็นได้ว่าปริมาณฮอร์โมน E2 เพศเมียจะสูงกว่าเพศผู้ในช่วงเวลาดังกล่าว เนื่องจาก estradiol เป็นฮอร์โมนที่สำคัญและมีฤทธิ์แรงที่สุดที่สร้างจากรังไข่ส่วนใหญ่และจะถูกแปรสภาพที่ตับเป็น estrone ส่วน testosterone เป็นฮอร์โมนเพศที่เด่นในเพศผู้ (สุมนา 2541)



รูปที่ 6.1 ระดับฮอร์โมน T ของปลาน้ำจืดเพศผู้ อายุ 6 ปี ในรอบปี 2543

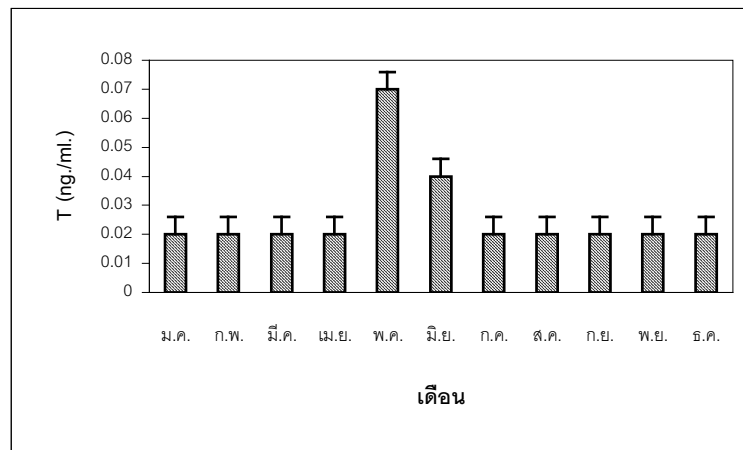


รูปที่ 6.2 ระดับฮอร์โมน E2 ของปลาน้ำจืดเพศเมีย อายุ 6 ปี ในรอบปี 2543

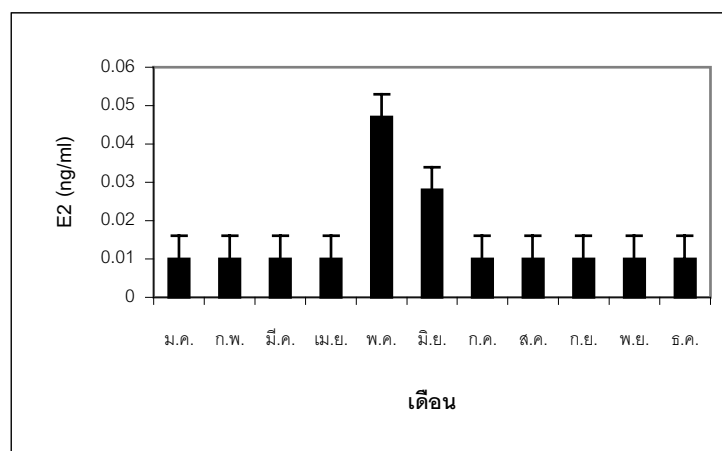
การทดลองที่ 1.2 ปลาน้ำจืดอายุ 8 ปี (ปี 2543) ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปลาน้ำจืดเพศผู้ปริมาณฮอร์โมน T ช่วงก่อนฤดูวางไข่ มกราคม - มีนาคม วัดได้น้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.02 ng/ml และเพิ่มขึ้นเดือนพฤษภาคม - มิถุนายน มีค่าระหว่าง 0.06 - 0.04 ng/ml แล้วลดลงน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.02 ng/ml หลังเดือนกรกฎาคม-ธันวาคม ส่วนเพศเมียฮอร์โมน E2 ในช่วงก่อนฤดูวางไข่ยังมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 0.01 ng/ml แล้วเพิ่มขึ้นในเดือนพฤษภาคม - มิถุนายน และมีค่าสูงสุดในเดือนพฤษภาคม 0.05 ng/ml หลังจากนั้นก็มีปริมาณลดลง ในเดือนสิงหาคม - ธันวาคม

(รูปที่ 6.3-6.4) เห็นได้ว่าปริมาณ E2 ในเพศเมียช่วงเดือนเดียวกันจะมีค่าสูงกว่า สอรัมอน T ในเพศผู้เล็กน้อยซึ่ง T จะเป็น precursor ของ E2 และถูกเปลี่ยนสภาพได้ง่ายกว่า E2 ทำให้การตรวจวัดได้ค่อนข้างน้อย (Scott *et al.*, 1980) อย่างไรก็ตามปริมาณของ T และ E2 ในช่วงฤดูวางไข่ยังมีค่าน้อยมาก เมื่อเทียบกับการเจริญพันธุ์และสอรัมอนเพศปลาคูกด้านเพศเมียที่เลี้ยงในบ่อในรอบปีมีการพัฒนาของไข่เป็นแบบ group synchronous เนื่องจากในช่วงการเจริญพันธุ์ได้พบการพัฒนาของ oocytes ทุกระยะในรอบปี เดือนกรกฎาคม-กันยายน มีค่าสอรัมอน T 50-55 ng/ml ส่วน E2 มีค่าระหว่าง 0.01-0.015 ng/ml ค่าดังกล่าวจะเริ่มลดลงหลังเดือนตุลาคม-ธันวาคม (หลังฤดูวางไข่), มกราคม-มีนาคม (ช่วงเตรียมการ) และเมษายน-มิถุนายน (ก่อนฤดูวางไข่) (Tan-Fermin *et al.*, 1997)



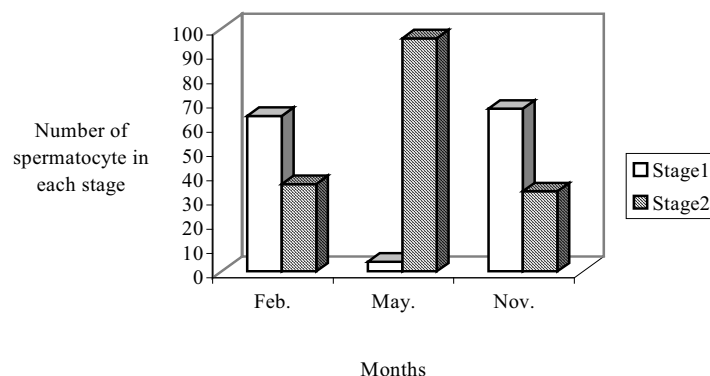
รูปที่ 6.3 ระดับสอรัมอน T ของปลาบีกเพศผู้ อายุ 8 ปี ในรอบปี 2543



รูปที่ 6.4 ระดับสอรัมอน E2 ของปลาบีกเพศเมีย อายุ 8 ปี ในรอบปี 2543

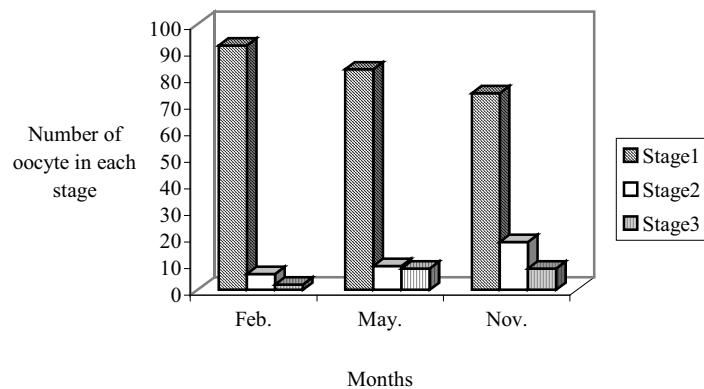
จากการศึกษาของ เกรียงศักดิ์และคณะ 2544 พบว่าปลาบึกจากแม่น้ำโขงและจากการเลี้ยงก่อนฤดูวางไข่ ระหว่างฤดูวางไข่ และหลังฤดูวางไข่ ของปลาบึกวัยเจริญพันธุ์จากแม่น้ำโขงในช่วงฤดูวางไข่เดือนพฤษภาคม ในปลาบึกเพศผู้ขนาด 145 กก. อายุประมาณ 19 ปี เพศเมียขนาด 226 กก. อายุประมาณ 23 ปี มีปริมาณฮอร์โมน T = 0.07 ng/ml, E2 = 0.12 ng/ml ปริมาณฮอร์โมนที่วัดได้หลังจากการจับไว้นาน 5 วัน มีผลทำให้ค่าฮอร์โมนลดลง ทั้งนี้ฮอร์โมนดังกล่าวจะลดลงหลังจากปลาถูกจับเป็นเวลานานกว่า 1 วัน ในสภาวะที่ไม่ปกติ และค่า T และ E2 จะสัมพันธ์กัน (Haddy and Pankhurst 2000) ส่วนปลาบึกเพศผู้และเพศเมียจากการเลี้ยงในบ่อดิน ในช่วงฤดูวางไข่เดือนพฤษภาคม มีปริมาณฮอร์โมนเพศ T และ E2 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย มีค่า 0.04 ng/ml และ 0.01 ng/ml ตามลำดับ ในขณะที่ปลา Chum Salmon (*Oncorhynchus keta*) เพศผู้มีค่า T และ E2 เท่ากับ 25 และ 4 ng/ml (Ueda and Yamauchi 1995)

การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ (รูปที่ 6.5 และ 6.6) พบว่าเซลล์ของอวัยวะระยะเริ่มต้นเป็นส่วนใหญ่ โดยพบระยะ spermatogonia และ spermatocyte ในช่วงระหว่างฤดูวางไข่ จะมีมากกว่าช่วงก่อนและหลังจากฤดูวางไข่ แต่ช่วงก่อนและหลังฤดูวางไข่ไม่ค่อยแตกต่างกัน โดยช่วงฤดูวางไข่จะมีจำนวนมากที่สุด ส่วนเซลล์ของไข่ในการพัฒนาของไข่และจำนวนไข่นั้นพบว่า oocyte ส่วนใหญ่เป็นระยะที่ 1 Previtellogenin (PV) และระยะที่ 2 Central germinal vesicle (CGV) จะเห็นได้ว่าการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะเริ่มต้น ทั้งนี้เนื่องจากปลาบึกยังมีอายุน้อย (8 ปี) ยังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์ และมีค่าดัชนีความสมบูรณ์น้อย แต่มีแนวโน้มว่าในเดือนพฤษภาคม จะมีการพัฒนาได้ดีกว่าในเดือนกุมภาพันธ์ และ พฤศจิกายน



รูปที่ 6.5 การพัฒนาของอสุจิระยะต่างๆของปลาบึกในบ่อดินในเดือนกุมภาพันธ์, พฤษภาคม และ พฤศจิกายน 2543

Stage 1 = spermatogonia, Stage 2 = spermatocyte



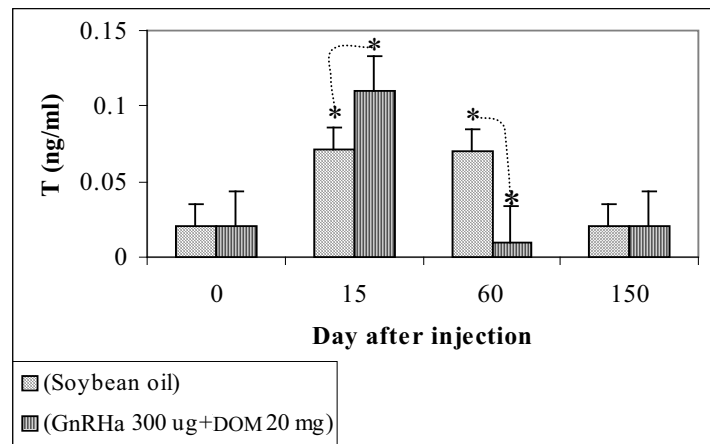
รูปที่ 6.6 การพัฒนาของไข่ระยะต่างๆของปลาบึกในบ่อดินในเดือนกุมภาพันธ์, พฤษภาคม และ พฤศจิกายน 2543

Stage 1 Previtelogenin (PV), Stage 2 Central germinal vesicle (CGV), Stage 3 Migrating germinal vesicle (MGV)

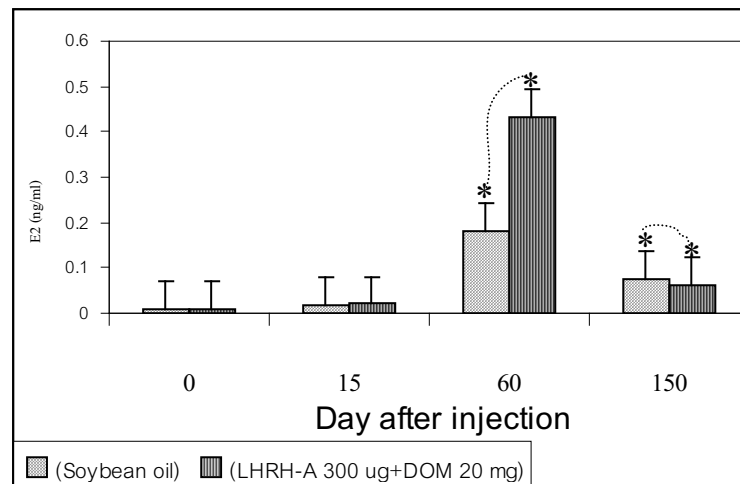
การทดลองที่ 2. การเจริญพันธุ์ของปลาบึกโดยฉีดด้วยฮอร์โมน GnRH α หรือ busserelin กับ domperidone (DOM), testosterone (T) และ estradiol (E2) ในน้ำมันถั่วเหลืองในปี 2544

การทดลองที่ 2.1 ปลาบึก อายุ 7 ปี (ปี 2544) ณ จรัลฟาร์ม อ.พาน จ.เชียงราย

หลังฉีดฮอร์โมนออกฤทธิ์เนิ่น 15 วัน (28 เมษายน 2544) ปริมาณฮอร์โมน T เหลือในปลาบึกที่ฉีดด้วยฮอร์โมน GnRH α 300 μ g/kg ผสม DOM 20 mg/kg ให้ปริมาณ T เพิ่มขึ้นกว่าหน่วยควบคุม แต่เริ่มลดลงหลังจากการฉีดได้ 60 (28 มิถุนายน 2544) และ 150 วัน (28 กันยายน 2544) ส่วนปริมาณ estradiol (E2) มีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างกับก่อนการฉีดฮอร์โมน และที่ฉีดด้วยน้ำมันถั่วเหลืองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) หลังจากการฉีด 150 วัน ปริมาณฮอร์โมนเพศจากทั้งสองหน่วยทดลองไม่ค่อยแตกต่างกัน และมีแนวโน้มลดลงในช่วงหลังฤดูการวางไข่ ทั้งนี้เนื่องจากปลาบึกมีอายุยังไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์ การให้ฮอร์โมนปริมาณที่สูงหรือก่อนกำหนดจะมีผลในทางยับยั้ง (สุมนา 2541) และเป็นไปได้ว่าเป็นช่วงนอกฤดูการวางไข่ (รูปที่ 6.7-6.8) และปริมาณที่วัดได้เพิ่มขึ้นส่วนหนึ่ง อาจเกิดจากการสร้างขึ้นเองตามธรรมชาติ จากอวัยวะสืบพันธุ์ อย่างไรก็ตามยังไม่พบการพัฒนาของน้ำเชื้อและไข่ แสดงว่าปลาบึกที่เลี้ยงยังไม่เข้าสู่ระยะวัยเจริญพันธุ์ และ T เป็นสารชักนำให้เกิดการสร้าง E2 แต่ก็มีแนวโน้มว่า T และถูกเปลี่ยนสภาพให้ยากกว่า E2 ทำให้การตรวจวัดได้ค่อนข้างน้อย (Scott *et al.*, 1980)



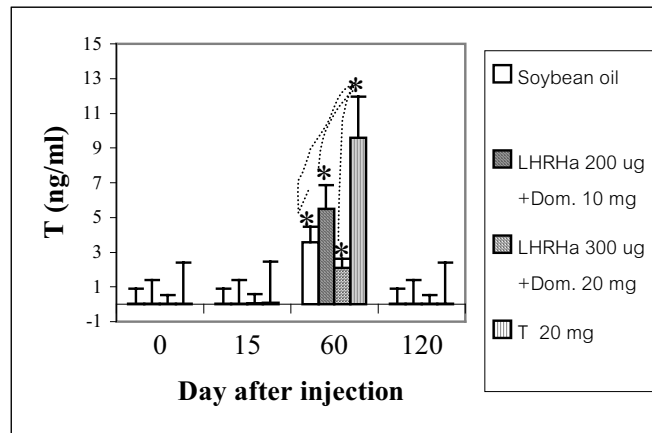
รูปที่ 6.7 ผลการฉีดฮอร์โมนก่อนและหลังต่อระดับ T ของปลาบีกเพชผู้ อายุ 7 ปี
 * แตกต่างทางสถิติกับก่อนฉีด ($P<0.05$), แตกต่างกันของค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยทดลอง



รูปที่ 6.8 ผลการฉีดฮอร์โมนก่อนและหลังต่อระดับ E2 ของปลาบีกเพชเมีย อายุ 7 ปี
 * แตกต่างทางสถิติกับก่อนฉีด ($P<0.05$), แตกต่างกันของค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยทดลอง

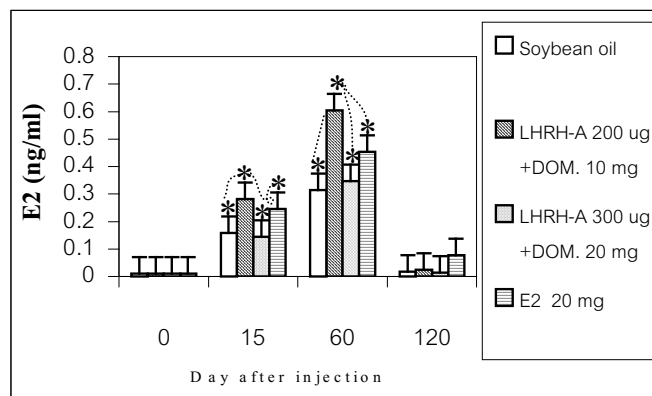
การทดลองที่ 2.2 ปลาบึกอายุ 9 ปี (ปี 2544) ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้

รูป 6.9-6.10 แสดงฮอร์โมนเพศปลาบึกอายุ 9 ปี หลังการฉีดฮอร์โมน 15 วัน (15 เมษายน 2544) ในทุกหน่วยการทดลองที่ฉีดฮอร์โมน ระดับฮอร์โมน T มีปริมาณน้อย โดยอยู่ระหว่าง 0.02-0.07 ng/ml ส่วน E2 มีค่าอยู่ระหว่าง 0.12-0.26 ng/ml ขณะที่หน่วยควบคุมมีค่า 0.02 ng/ml และ 0.15 ng/ml ในเพศผู้และเพศเมียตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากช่วงเวลาดังกล่าว (เม.ย.) เป็นช่วงก่อนฤดูกาลวางไข่การฉีดฮอร์โมนยังไม่มีผลชัดเจน จากการทดลองที่ 1.1 และ 1.2 กับในธรรมชาติฮอร์โมน T และ E2 จะเริ่มมีมากขึ้นและสามารถตรวจวัดได้ช่วงเดือน มิ.ย.-ก.ค. หลังฉีดฮอร์โมนนาน 60 วัน (15 มิถุนายน 2544) ปริมาณฮอร์โมนเพศ T และ E2 เพิ่มขึ้นในทุกหน่วยการทดลองแต่มีค่าสูงสุดจากหน่วยทดลองในเพศผู้ที่ฉีดด้วย T 20 mg/kg ในเพศเมียที่ฉีดด้วย LHRHa 200 ug+Dom 10 mg/kg มีค่าเท่ากับ 9 ng/ml และ 0.60 ng/ml ตามลำดับ หลังจากการฉีดนาน 120 วัน (15 สิงหาคม 2544) ปริมาณฮอร์โมน T ลดลงทุกหน่วยการทดลอง โดยมีค่า ≤ 0.02 ng/ml ส่วนค่า E2 ลดลง โดยมีค่าระหว่าง 0.012-0.076 ng/ml ปริมาณ T หลังจากฉีด 15 และ 120 วันไม่แตกต่างทางสถิติกับที่ฉีดด้วยน้ำมันถั่วเหลืองอย่างเดียว ทั้งนี้เนื่องจากในน้ำมันถั่วเหลืองมีองค์ประกอบของคลอเลสเตอรอลที่เป็นสารตั้งต้น ในการสร้างฮอร์โมนเพศ ประกอบกับในธรรมชาติ ไข่จะสืบพันธุ์สามารถสร้างฮอร์โมนเพศได้เอง (Dence, 1980) อย่างไรก็ตามหลังการฉีด 60 วันปริมาณ T และ E2 เพิ่มขึ้นจากชุดที่ฉีดฮอร์โมนมีความแตกต่างทางสถิติกับหน่วยควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เช่นเดียวกับการศึกษาในปลา Sea Bass ที่ฉีดด้วย GnRHa อย่างเดียวหรือร่วมกับ DOM สามารถกระตุ้นระดับฮอร์โมน E2 เพิ่มขึ้น (Prat *et al.*, 1999) Sower *et al.*, (1984) พบว่าความเข้มข้นของ E2 เพิ่มขึ้นมากในระยะ vitellogenic ในเพศเมียหลังฉีดด้วย GnRHa กว่าในเพศเมียระยะ postvitellogenic จากการศึกษาของคณะนักวิจัยพบว่า ในปลาบึกอายุ 7 ปี ที่ฉีดฮอร์โมน GnRHa 300 µg/kg กับ domperidone 20 mg/kg และไม่ฉีดฮอร์โมนที่จรัลฟาร์ม มีระดับฮอร์โมนเพศหลังฉีด 15 วัน ในเดือนเมษายน 2543 ในเพศผู้มีปริมาณ T มีค่าใกล้เคียงกับปลาบึกอายุ 9 ปีที่ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง ส่วนในเพศเมียปริมาณ E2 มีแนวโน้มน้อยกว่าปลาบึกอายุ 9 ปี หลังการฉีด 60 วัน เดือนมิถุนายน 2543 มีปริมาณ T และปริมาณ E2 ในเพศผู้และเพศเมียปลาบึกอายุ 7 ปีที่จรัลฟาร์มมีค่าน้อยกว่าปลาบึกอายุ 9 ปี ในปลาบึกอายุ 7 ปี หลังการฉีด 150 วัน ในเดือนตุลาคม และ 120 วัน ในเดือนสิงหาคม ในปลาบึกอายุ 9 ปี ปริมาณ T และมี E2 มีค่าลดลงจากทั้งสองแหล่ง ทั้งนี้เนื่องจากเป็นช่วงหลังฤดูวางไข่ เช่นเดียวกับการศึกษาโดย Haddy and Pankhurst, 2000



รูปที่ 6.9 ผลการฉีดฮอร์โมนก่อนและหลังต่อระดับ T ของปลาบีกเพสผู้ อายุ 9 ปี

* แตกต่างทางสถิติกับก่อนฉีด ($P < 0.05$), แตกต่างกันของค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยทดลอง

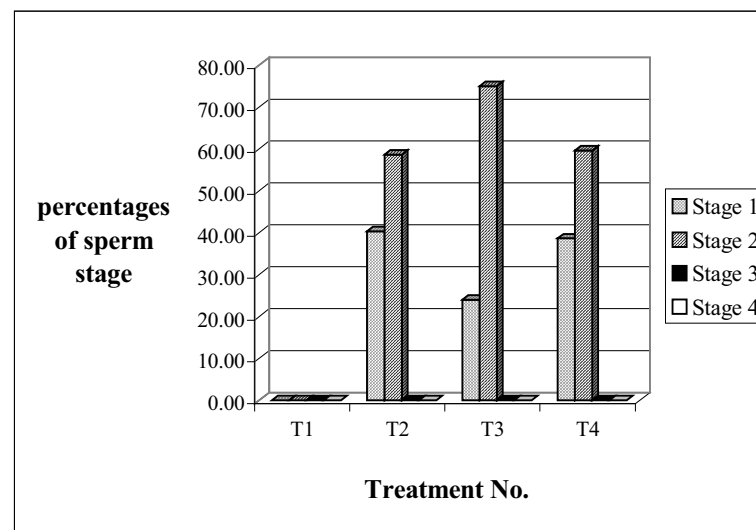


รูปที่ 6.10 ผลการฉีดฮอร์โมนก่อนและหลังต่อระดับ E2 ของปลาบีกเพสเมีย อายุ 9 ปี

* แตกต่างทางสถิติกับก่อนฉีด ($P < 0.05$), แตกต่างกันของค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยทดลอง

การพัฒนาเซลล์ และอวัยวะสืบพันธุ์หลังการฉีดฮอร์โมนออกฤทธิ์เนิ่นนาน 15 วัน (15 เมษายน 2544) พบว่าแนวโน้มของดัชนีการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ (GSI) มีปริมาณน้อยในทุกหน่วยทดลองโดยในเพศเมียมีค่า 1.2 % ส่วนในเพศผู้มีค่าใกล้เคียงกัน เซลล์อสุจิมีการพัฒนาดีและมีจำนวนมากในหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย GnRH α 200 และ 300 μ g /kg ร่วมกับ domperidone 10 และ 20 mg/kg และที่ฉีดด้วย Testosterone 20 mg/kg แต่ไม่พบอณูจากปลาชุดที่ฉีดด้วยน้ำมันถั่วเหลืองใดๆ เปอร์เซ็นต์การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้และเพศเมียส่วนมากยังอยู่ในระยะเริ่มต้น Spermatogenesis และ Previtellogenin (PV) ใกล้เคียงกันในทุกหน่วยทดลอง และพบไข่เริ่มสุกบ้างในระยะ migrating germinal vesicle (MGV) (รูปที่ 6.11-6.12) จากหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย

GnRHa 200 $\mu\text{g/kg}$ ร่วมกับ domperidone 10 mg/kg จากข้อมูลดังกล่าวแสดงว่าปลาบึกในเดือนเมษายน ยังไม่เจริญพันธุ์ ในเดือน มิถุนายน หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 60 วัน ค่าดัชนีการพัฒนาของรังไข่ และอัตรามีค่าเพิ่มขึ้นทุกหน่วยการทดลอง โดยมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นจากหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย GnRHa 200 และ 300 $\mu\text{g/kg}$ ร่วมกับ domperidone 10 และ 20 mg/kg โดยมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 9 % และ 2.9 % ในเพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ และต่ำสุดในหน่วยควบคุม คือ 2.75 % ส่วนเพศเมียที่ฉีดด้วย E2 มีค่า GSI เท่ากับ 1.46 % เพศผู้พบเซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatid และ spermatozoa ในเพศผู้ทุกหน่วยการทดลอง ส่วนเซลล์ไข่พบบ้างเล็กน้อยในระยะ peripheral germinal vesicle (PGV) และพบมากในหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย GnRHa ผสม domperidone ส่วนปลาที่ฉีดด้วย E2 นั้น รังไข่มีขนาดเล็ก ทั้งนี้อาจเนื่องจาก E2 ในน้ำมันถั่วเหลืองไม่สามารถซึมผ่านผนังเมมเบรนได้ดีเท่ากับ GnRHa และ domperidone



รูปที่ 6.11 ระยะการพัฒนาของเซลล์สุจิหลังฉีดฮอร์โมน 15 วัน ในปลาบึกอายุ 9 ปี

T1 Soybean oil

T2 GnRHa 200 μg +DOM 10 mg

T3 GnRHa 300 μg +DOM 20 mg

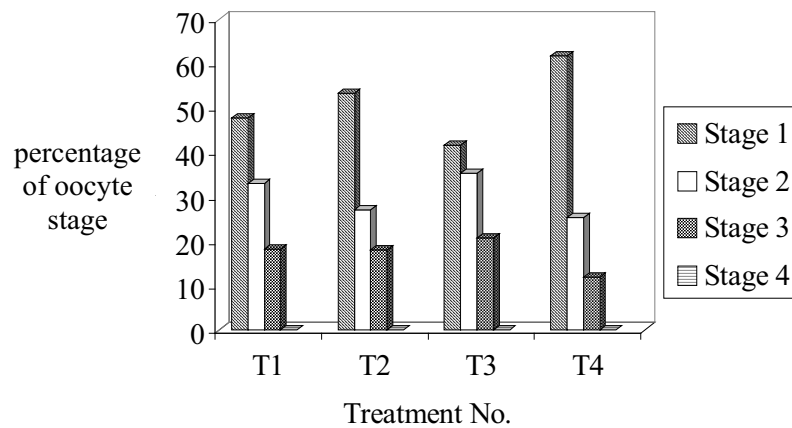
T4 T 20 mg

Stage 1 Spermatogonia (cell diameter 0.01-0.02 mm., blue color)

Stage 2 Spermatocyte (Spermatocyte : less than 0.01-0.02 mm)

Stage 3 Spermatid (small cell in group, no tail)

Stage 4 Spermatozoa (small cell with tail in vas deferens)



รูปที่ 6.12 ระยะการพัฒนของเซลล์ไข่หลังฉีดฮอร์โมน 15 วัน ในปลาบึกอายุ 9 ปี

T1 Soybean oil

T2 GnRHa 200 μ g +DOM 10 mg

T3 GnRHa 300 μ g +DOM 20 mg

T4 E2 20 mg

Stage 1 Previtelogenin (PV)

Stage 2 Central germinal vesicle (CGV)

Stage 3 Migrating germinal vesicle (MGV)

Stage 4 Peripheral germinal vesicle (PGV)

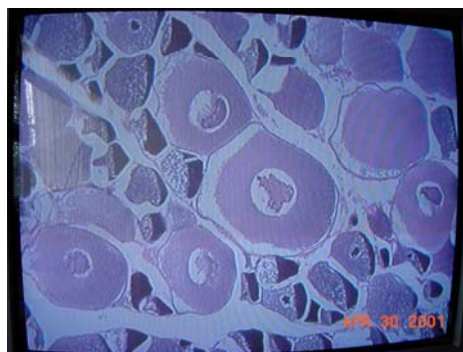
Stage 5 Maturation germinal vesicle breakdown (GVBD)

วันที่ 7 กรกฎาคม 2544 ได้ทดลองดูคุณภาพไข่และไข่ ก่อนการฉีดฮอร์โมนเพื่อผสมเทียม มีจำนวนตัวปลาที่มีน้ำเชื้อและไข่อย่างละ 2 ตัว (50%) ในทุกหน่วยทดลอง ยกเว้นหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย E2 พบว่ารังไข่มีขนาดเล็กกว่าปลากลุ่มอื่น หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 82 วัน (8 กรกฎาคม 2544) สามารถฉีดไข่ได้ 125 กรัม และรีดน้ำเชื้อได้ 20 ซีซี น้ำเชื้อมีคุณภาพดี ในปลาที่ฉีดด้วยฮอร์โมน 300 μ g/kg กับ domperidone 20 mg/kg แต่ผสมไม่ติดเนื่องจากไข่ยังสุกไม่สมบูรณ์ โดยสังเกตได้จากไข่มีลักษณะสีเหลืองอมส้มไม่โปร่งแสง ขนาดเล็กมากมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ไม่สม่ำเสมอ และไม่ติดภาชนะเมื่อถูกน้ำ ปัญหาการพัฒนของไข่พบในปลาเพศเมียที่เลี้ยงในบ่อดินมีมากกว่าปลาเพศผู้ (Zohar and Mylonas, 2001) ความไม่สมบูรณ์ของไข่อาจเนื่องมาจากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนในขณะที่ไข่ไม่เสร็จสิ้นกระบวนการสร้างไข่แดง (Lee *et al.*, 1986) หรือการกระตุ้นแม่ปลาที่ยังไม่เจริญพันธุ์ทำให้ไข่มีคุณภาพไม่ดี (Crim and Glebe, 1984) หรือเนื่องจากปลาเกิดสภาวะเครียด (Campbell

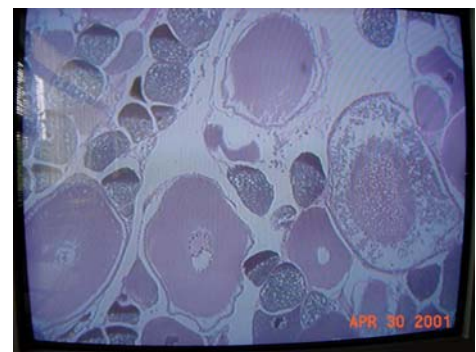
et al, 1992) ส่วนปลาบึกที่ผสมได้จากแม่พันธุ์ในแม่น้ำโขงและสถานีประมงน้ำจืด จ.พะเยา ไข่จะมีสารเหนียวและมีขนาด 1.5-2 มิลลิเมตร (กรัมประมง 2545) ส่วนน้ำเชื้อมีคุณภาพดีจากปลาทุกหน่วยการทดลอง (ตารางที่ 6.6)

ตารางที่ 6.6 ค่า GSI การมีไข่และน้ำเชื้อ และการรัดไข่ ในแต่ละหน่วยทดลองของปลาบึก หลังจากฉีดฮอร์โมน

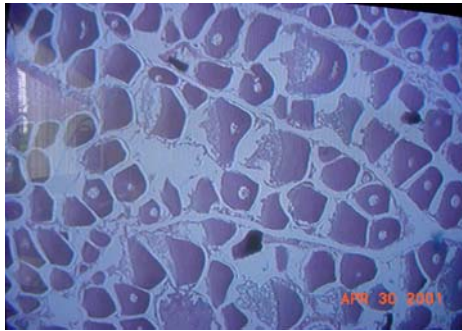
หน่วยทดลอง	เพศ	น้ำหนัก (กก.)	วันวันหลังฉีดฮอร์โมน		รัดไข่และ น้ำเชื้อ;	ปริมาณไข่ (กรัม) ความหนาแน่นน้ำเชื้อ	
			15 วัน(15 เมษายน 2544)	60 วัน(15 มิถุนายน 2544)	N=2 (%)	ซีซี/กก. กรกฎาคม 2544)	(เซลล์/มม ³) (เซลล์/มม ³)
Con.	เมีย	13.5	0.85	7.95	-	-	-
	ผู้	14	-	2.75	50	1.0	2,575,000±169,272
GnRHa 200 µg +	เมีย	17.2	1.23	8.91	50	125	-
Domperidone 10 mg	ผู้	16	0.25	2.87	100	1.06	2,716,670±659,267
GnRHa 300 µg +	เมีย	16.5	0.64	9.01	-	-	-
Domperidone 20 mg	ผู้	15	0.27	3.05	50	1.33	2,735,000±515,678
E2 20 mg	เมีย	10	0.28	1.46	-	-	-
T 20 mg	ผู้	12	0.17	2.77	50	1.28	2,635,000±985,771



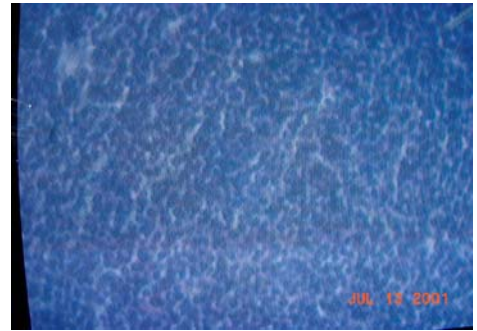
รูปที่ 6.13 ลักษณะไข่ปลาบึกระยะ CGV และ MGV ในเดือนเมษายน 2544 หลังจากฉีดด้วยน้ำมันถั่วเหลือง 15 วัน



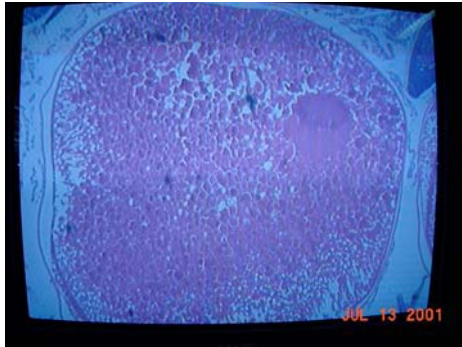
รูปที่ 6.14 ไข่ปลาบึกระยะ PGV ในเดือนเมษายน 2544 หลังจากฉีดด้วย GnRHa 200 µg/kg ผสม DOM 10 mg/kg 15 วัน



รูปที่ 6.15 ลักษณะไข่ปลาบึกระยะ PV เดือน
เมษายน 2544 หลังจากฉีดด้วย E2
20 mg/kg 15 วัน



รูปที่ 6.16 อสุจิปลาบึก เดือนกรกฎาคม 2544
หลังจากฉีดด้วย GnRHa 300 µg/kg
ผสม DOM 20 mg/kg 90 วัน

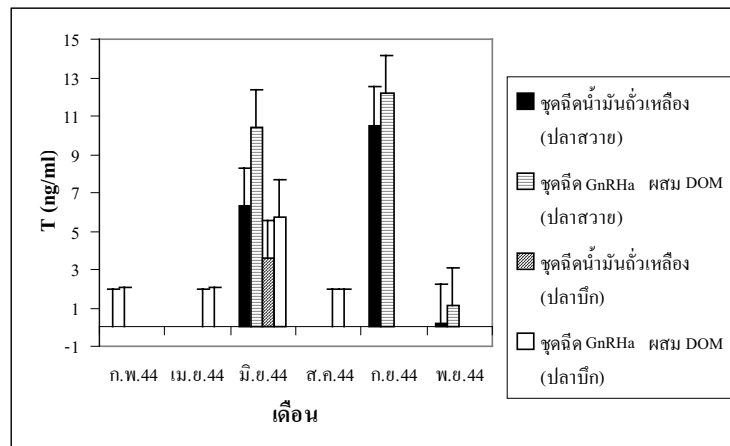


รูปที่ 6.17 ไข่ปลาบึกระยะ PGV เดือนกรกฎาคม
2544 หลังจากฉีดด้วย GnRHa 300 µg
/ kg ผสม DOM 20 mg/kg 90 วัน

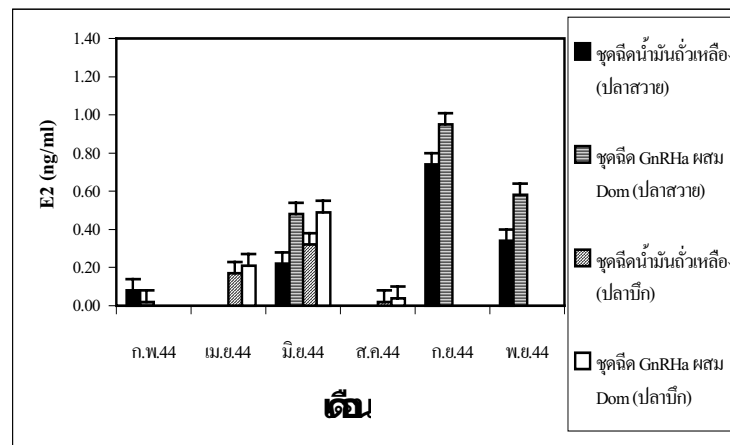


รูปที่ 6.18 รังไข่ปลาบึกหลังฉีดด้วย E2 20
mg/kg 60 วัน เดือนมิถุนายน 2544

การเปรียบเทียบผลของฮอร์โมนต่อระดับฮอร์โมน T และ E2 ปลาบึก และปลาซวาย ระดับฮอร์โมนเพศปลาซวายและปลาบึกที่ฉีดฮอร์โมนมีแนวโน้มสูงกว่าหน่วยควบคุม แต่ปลาบึกจะสูงสุดในเดือนมิถุนายน ส่วนปลาซวายจะสูงสุดในเดือนกันยายน ในปลาบึกระดับฮอร์โมนเพศ T ในเพศผู้มีค่า 6 ng/ml ส่วน E2 ของปลาบึกเพศเมียก่อนการรีดไข่มีค่า 0.45 ng/ml และวันที่ 8 กรกฎาคม 2544 สามารถรีดไข่และน้ำเชื้อได้จากหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย GnRHa 300 µg/kg ผสม DOM 20 mg/kg แต่ผสมไม่ติด หลังจากนั้นระดับฮอร์โมนเพศในเดือนสิงหาคมมีค่าลดลง ส่วนปลาซวายก่อนการวางไข่ (มิถุนายน 2544) เพศผู้มีค่า T เท่ากับ 11 ng/ml เพศเมียมีค่า E2 เท่ากับ 0.47 ng/ml สามารถรีดไข่และน้ำเชื้อได้ในวันที่ 22 กรกฎาคม ผสมเทียมได้จากทุกหน่วยการทดลอง ในเดือนกันยายนมีฮอร์โมนเพศเพิ่มขึ้น โดยเพศผู้มีค่า T เท่ากับ 13.9 ng/ml และในเพศเมียมีค่า E2 เท่ากับ 0.98 ng/ml แสดงว่าปลาซวายมีช่วงฤดูการวางไข่ยาวนานกว่าปลาบึก คือ ถึงเดือนกันยายน ส่วนเดือนพฤศจิกายน ปริมาณฮอร์โมนลดลง (รูปที่ 6.21-6.22)



รูปที่ 6.19 ปริมาณ testosterone ของปลาซวายและปลาบึกเพศผู้ หลังจากฉีดด้วยฮอร์โมน



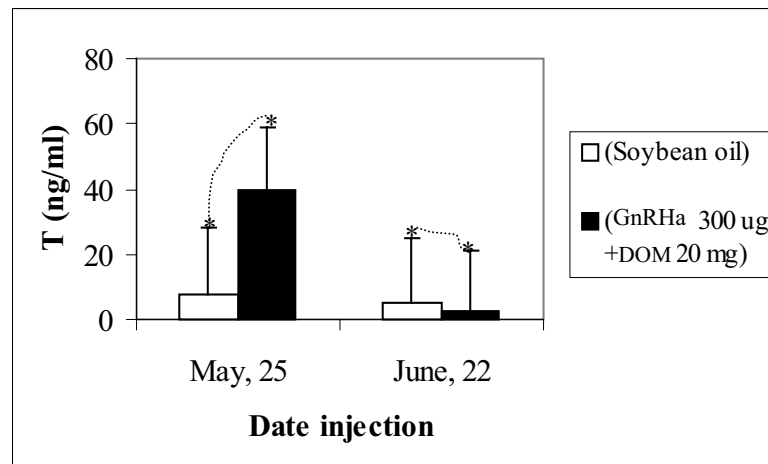
รูปที่ 6.20 ปริมาณ estradiol ของปลาซวายและปลาบึกเพศเมีย หลังจากฉีดด้วยฮอร์โมน

การทดลองที่ 3. ผลการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาบึก จากการฉีดด้วยฮอร์โมน GnRH หรือ Buserelin รูปแบบปกติ และออกฤทธิ์เน้น ในปี 2545

การทดลองที่ 3.1 ปลาบึก อายุ 8 ปี (ปี 2545) ณ จรัลฟาร์ม อ.พาน จ.เชียงราย

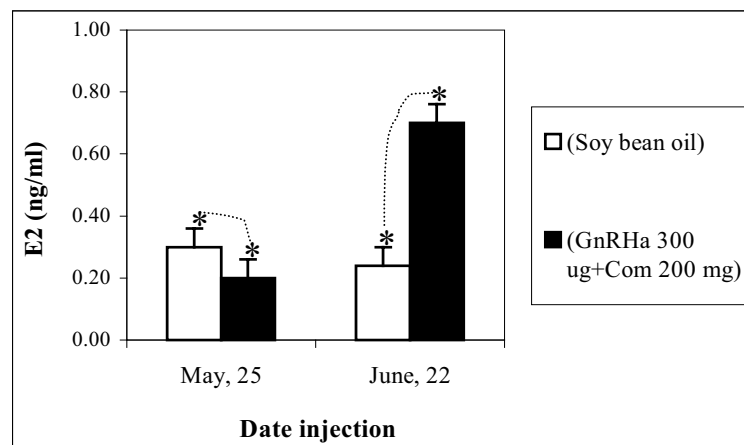
ระดับ testosterone (T) และ estradiol (E2) ก่อนการฉีดฮอร์โมนในวันที่ 25 พฤษภาคม 2545 มีปริมาณ T ในเพศผู้ 8-40 ng/ml ส่วน E2 ในเพศเมีย 0.19-0.3 ng/ml ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นมากจากปลาอายุ 6 ปี ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าปลาที่มีอายุมากขึ้นมีการพัฒนาระดับฮอร์โมนเพศได้ดีกว่า และเป็นเริ่มที่จะเข้าสู่ฤดูวางไข่ของปลาบึก ปกติปลาจะมีระดับฮอร์โมน T เพิ่มขึ้นก่อน E2 และก่อนการวางไข่ (Scott and Sumpter 1988) หลังจากฉีดฮอร์โมน 30 วัน (22 มิถุนายน 2545) ปริมาณ T และ E2 มีแนวโน้มลดลง คือ T ในเพศผู้มีค่า 2.25-5.23 ng/ml ส่วน E2 ในเพศเมียมีค่าเพิ่มขึ้น 0.23 – 0.7 ng/ml ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากฮอร์โมนที่อยู่ในน้ำมันถั่วเหลืองสามารถคงสภาพได้ช่วงประมาณ 7-10 วัน ประกอบกับปลา

ที่ทำการทดลองยังมีอายุไม่ถึงวัยเจริญพันธุ์ คือมีอายุเพียง 8 ปี มีข้อสังเกตว่าปริมาณฮอร์โมนเพศทั้งสองของปลาบึกอายุ 8 ปี ในเดือนพฤษภาคมในปลาและเวลาเดียวกัน ที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมนและที่ฉีดฮอร์โมนมีค่ามากกว่าปลาบึกอายุ 6 และ 7 ปี อย่างไรก็ตามระหว่างการศึกษปลาบึกอายุ 8 ปี สามารถคุมไข่ได้ขนาดเล็กมากจำนวน 2 ฟองแต่รีดน้ำเชื้อไม่ได้ (รูปที่ 6.21-6.22)



รูปที่ 6.21 ผลการฉีดฮอร์โมนก่อนและหลังต่อระดับ T ของปลาบึกเพศผู้ อายุ 8 ปี

* แตกต่างทางสถิติกับก่อนฉีด ($P < 0.05$), แตกต่างกันของค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยทดลอง



รูปที่ 6.22 ผลการฉีดฮอร์โมนก่อนและหลังต่อระดับ E2 ของปลาบึกเพศเมีย อายุ 8 ปี

* แตกต่างทางสถิติกับก่อนฉีด ($P < 0.05$), แตกต่างกันของค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วย

ทดลอง

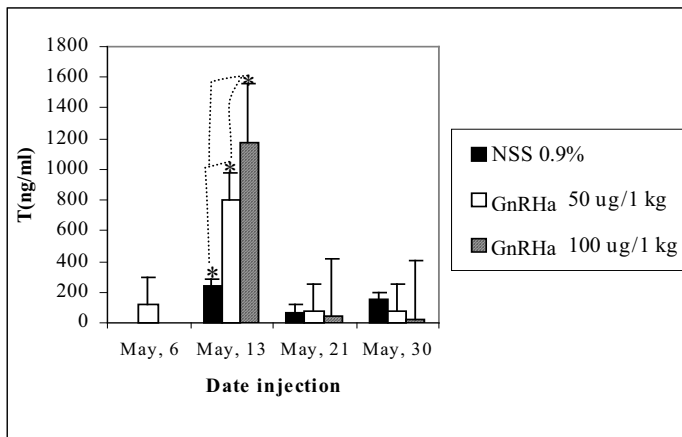
การทดลองที่ 3.2 ปลาบึกอายุ 10 ปี (ปี 2545) ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการประมงมหาวิทยาลัยแม่โจ้

- ปลาบึก ชุดที่ 1

รูปที่ 6.23-6.24 ปริมาณฮอร์โมน T และ E2 ก่อนการฉีดฮอร์โมน มีปริมาณน้อยหลังจากฉีดฮอร์โมนครั้งที่หนึ่ง (6 พฤษภาคม 2545) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในทุกหน่วยทดลอง และเพิ่มมากที่สุด ปลาที่ฉีดด้วย GnRHa 50 µg/kg โดยเพศผู้มีค่า 800 ng/ml ส่วนเพศเมียมีค่า 3.18 ng/ml ตามลำดับ หลังจากการฉีดฮอร์โมนครั้งที่สอง (13 พฤษภาคม 2545) สามารถดูไข่ปลาบึกได้ ในวันที่ 14 พฤษภาคม 2544 จากปลาบึกเพศเมียน้ำหนัก 17 กก. และน้ำเชื้อจากปลาบึกเพศผู้ น้ำหนัก 16.6 กก. ทำการผสมเทียมโดยฉีดฮอร์โมน GnRHa เข็มแรก 6 µg/kg ผสม domperidone 5 mg /kg ในเพศเมีย และเพศผู้ หลังจาก 6 ชั่วโมง ฉีดเข็มที่สองด้วย GnRHa 12 µg/kg ผสม domperidone 5 mg/kg เฉพาะเพศเมีย นาน 9 ชั่วโมง สามารถรีดไข่ จากเพศเมียได้ 11 กรัม และรีดน้ำเชื้อจากเพศผู้ได้ 4 ซีซี แต่ผสมไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากอสุจิไม่เคลื่อนที่ และไข่ยังไม่สุก

หลังการฉีดฮอร์โมนครั้งที่สาม (21 พฤษภาคม 2545) ค่า T มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยในเพศผู้ โดยมีค่าระหว่าง 41- 74 ng/ml ส่วนค่า E2 เพศเมียเพิ่มขึ้น มีค่าระหว่าง 1.80-17.20 ng/ml วันที่ 23 พฤษภาคม 2544 ฉีดฮอร์โมนเพื่อผสมเทียมปลาบึกจากปลาที่ฉีด GnRHa 50 µg/kg ในเพศเมียน้ำหนัก 17 กก. เพศผู้ น้ำหนัก 16.4 กก. ฉีดฮอร์โมน GnRHa เข็มแรก 10 µg/kg ผสม domperidone 5 mg /kg ในเพศเมียและเพศผู้ ห่างกัน 7 ชั่วโมง ฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง 20 µg/kg ผสม domperidone 5 mg/kg เฉพาะเพศเมีย หลังจาก 9 ชั่วโมง สามารถรีดไข่ได้ 80 กรัม และรีดน้ำเชื้อได้ 2.3 ซีซี แต่ผสมไม่ประสบความสำเร็จเนื่องจากปลาบึกเพศเมียมีน้ำเข้าช่องท้อง หลังจากฉีดฮอร์โมนครั้งที่สี่ (30 พฤษภาคม 2545) ค่า T ในเพศผู้มีค่าระหว่าง 25- 104 ng/ml ส่วนค่า E2 ในเพศเมียลดลง มีค่าระหว่าง 0.49-0.78 ng/ml หลังจากฉีดฮอร์โมนครั้งที่สี่นาน 7 วัน (7 มิถุนายน 2545) ปริมาณฮอร์โมนเพศเพิ่มขึ้น ขณะที่หน่วยควบคุมมีแนวโน้มลดลง ค่า T ในเพศผู้มีค่าระหว่าง 12-150 ng/ml ส่วนค่า E2 ในเพศเมียมีค่าระหว่าง 0.97-1.46 ng/ml จากการศึกษาปลาบึกอายุ 9 ปี ที่ฉีดฮอร์โมนผสมน้ำมันถั่วเหลืองครั้งเดียวในช่วงเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน 2544 มีปริมาณฮอร์โมนเพศน้อยกว่าปลาบึกอายุ 10 ปีที่ฉีดฮอร์โมนปกติทุกสัปดาห์ในปี 2545 ทั้งนี้เนื่องจากอายุปลาบึกมีอายุมากกว่าและใกล้เคียงกับปลาที่เริ่มถึงวัยเจริญพันธุ์ ประกอบกับการฉีดฮอร์โมนอย่างต่อเนื่องช่วยให้ปลามีความพร้อมที่จะสร้างไข่และอสุจิได้ดีขึ้น ในวันที่ 15 มิถุนายน 2545 ทดสอบการพัฒนาของไข่และอสุจิพบว่าในแต่ละหน่วยทดลอง มีการพัฒนาของน้ำเชื้อ โดยอสุจิมีการเคลื่อนที่ดี และจำนวนตัวสวามที่รีดน้ำเชื้อและไข่ได้มากในปลาที่ฉีดฮอร์โมน แต่ความหนาแน่นของอสุจิไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 6.8) เช่นเดียวกับการกระตุ้นให้พ่อแม่ปลา salmon (*Oncorhynchus*

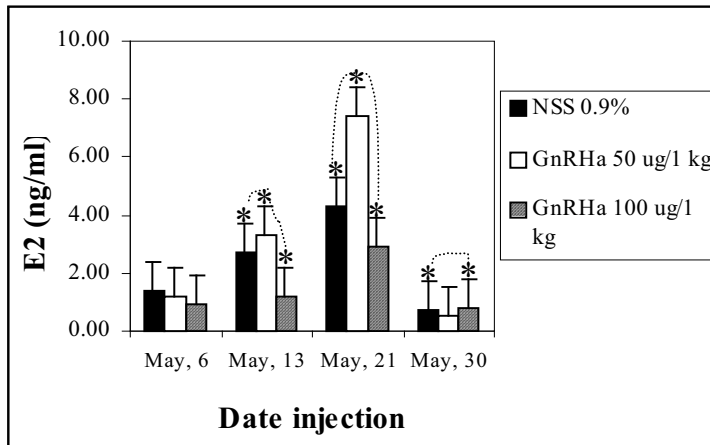
tshawytscha) ซึ่งปกติจะฉีด GnRH 250 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ในสารละลายและ GnRH ในรูปออกฤทธิ์เน้นรูปแบบ polymer โดยใช้เพียงครั้งเดียวจะให้เปอร์เซ็นต์การวางไข่สะสมสูง และเร็วกว่าหน่วยควบคุมในระยะเวลา 14 วันหลังจากฉีดและฝังฮอร์โมน (Solar *et al.*, 1995) และจากการฉีดฮอร์โมน salmon gonadotropin (sGTH) และ 17α -hydroxyprogesterone ($17\alpha\text{P}$) ในรูป lipophilized gelatin (LG emulsion) ในการกระตุ้นการพัฒนาการสุกของไข่ โดยฉีดทุกสัปดาห์ในอัตรา 2 mg/kg และทุกสองสัปดาห์ในอัตรา 4 mg/kg ในปลาไหลญี่ปุ่น 2 ชนิด ที่เลี้ยงและจากการจับ (Silver Eel) ปลาที่ฉีดด้วย sGTH II ทุกสองสัปดาห์ ปริมาณฮอร์โมน testosterone, estradiol- 17β และ sGTH II ตอบสนองต่อการใช้ฮอร์โมนแต่ใช้เวลานานกว่าการฉีดทุกสัปดาห์ในการที่จะเสร็จขบวนการ vitellogenesis และสามารถกระตุ้นให้มีการวางไข่ได้หลังจากการฉีดด้วย sGTH II และ $17\alpha\text{P}$ (Sato *et al.*, 2000) เช่นเดียวกับการศึกษาผลของการใช้ฮอร์โมนในปลา reeves shad ของประเทศจีนที่กำลังจะสูญพันธุ์ พบว่าในเพศเมียอายุ 4, 5 และ 6 ปี น้ำหนัก 1.2 – 1.6 กก. ผลของการฝังฮอร์โมน testosterone (T) ในรูป silastic uppolymerized elastomer 50 mg/kg ที่ละลายใน lacquer butter ฝัง 2 ครั้ง ทุก ๆ 2 สัปดาห์ หลังจากนั้นฉีดด้วย GnRH 10-20 $\mu\text{g}/\text{kg}$. ผสมกับ domperidone 3 mg/kg จำนวน 3 ครั้ง เปรียบเทียบกับหน่วยควบคุม พบว่า oocyte สามารถพัฒนาดีขึ้นและเข้าสู่ระยะ yolk vesicle stage และปลาอายุ 5 และ 6 ปี ที่ให้ฮอร์โมนสามารถมีไข่สุก 87.5 % และ 100 % ตามลำดับ ขณะที่ปลาหน่วยควบคุมนั้น ไข่ยังอยู่ในระยะ previtellogenic oocyte (Wang *et al.*, 1998)



รีดน้ำเชื้อ วันที่ 14 พฤษภาคม, 24
พฤษภาคม, 15 มิถุนายน และ 27
กรกฎาคม 2545

รูปที่ 6.23 ผลการฉีดฮอร์โมนก่อนและหลังต่อระดับ T ของปลาบิกเพสผู้ อายุ 10 ปี ชุดที่ 1

* แตกต่างทางสถิติกับก่อนฉีด ($P < 0.05$), แตกต่างกันของค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยทดลอง



รีดไข่ วันที่ 14 พฤษภาคม, 24
พฤษภาคม, 15 มิถุนายน และ
27 กรกฎาคม 2545

รูปที่ 6.24 ผลการฉีดฮอร์โมนก่อนและหลังต่อระดับ E2 ของปลาบึกเพศเมีย อายุ 10 ปี ชุดที่ 1
* แตกต่างทางสถิติกับก่อนฉีด ($P < 0.05$), แตกต่างกันของค่าเฉลี่ยระหว่างหน่วยทดลอง

ตารางที่ 6.7 ความหนาแน่นของอสุจิ ความคกของไข่และจำนวนปลาบึกที่สามารถรีดไข่และน้ำเชื้อ
ได้

หน่วยทดลอง	เพศ/ตัว ที่	21 พฤษภาคม 2545		13 มิถุนายน 2545		24 กรกฎาคม 2545
		จำนวนที่มีไข่และน้ำเชื้อ		ความหนาแน่นของอสุจิ / ไข่ (ตัว/มม ³) / (ฟอง/กรัม)		จำนวนอสุจิ/ไข่ที่ รีดได้สะสม N=3
		N=3		น้ำหนัก ปริมาตร		(ตัว)
		(ตัว)		(กก.) (ซีซี/กก.)	$\bar{X}$	
T ₁ (ฉีด NSS 0.9% 1 cc./ 4 กก. ทุกสัปดาห์)	ผู้เมีย	2	14.1	1.41	3,567,000 ± 171,208	2
T ₂ (ฉีด Suprefact 50 µg/ 1 กก. ทุกสัปดาห์)	ผู้เมีย	3	16.6	1.38	5,418,833 ± 485,743	3
T ₃ (ฉีด Suprefact 100 µg/ 1 กก. ทุกสัปดาห์)	ผู้เมีย	3	14	2.13	5,084,000 ± 226,042	3
	ผู้เมีย	2	17	-	-	2

หลังฉีดฮอร์โมนครั้งที่สี่นาน 14 วัน (14 มิถุนายน 2545) เวลา 03:00 น. นำน้ำเชื้อ (รูปที่ 6.25-6.27) ผสมกับปลาบึกเพศเมีย ณ สถานีประมงน้ำจืด จ. พะเยา น้ำหนัก 54 กก. ฉีด GnRHa 10 µg/kg ผสมกับ domperidone 5mg/kg เวลา 22.00 น. ฉีด GnRHa 20 µg/kg ผสมกับ domperidone 5 mg/kg เวลา 07.00 น./ 0.5 โคส เวลา 24.00 น. วันที่ 15 มิถุนายน 2545 เวลา 12:00 น. ผลการผสมอสุจิจากปลาบึกของโครงการฯ กับไข่ปลาบึกของสถานีประมงน้ำจืด จ.พะเยา สามารถผสมออก

เป็นตัวปลาบึก ขนาด 2 เซนติเมตร จำนวน 300 ตัว (วันที่ 25 มิถุนายน 2545) คิดเป็น 3.33 % จากไข่ทั้งหมดประมาณ 6,000 ฟอง และได้ตรวจสอบการมีไข่ปลาบึก พบว่าเพศเมียตัวที่ 1 ที่ฉีดด้วย GnRHa 50 µg/kg น้ำหนัก 17 กก. ไข่มีการพัฒนาโดนมีสีเหลืองใส ขนาด 1.2-1.4 มิลลิเมตร จึงฉีดฮอร์โมน GnRHa เข็มแรก 10 µg/kg ผสม domperidone 5 mg/kg ในเพศเมียและเพศผู้ ห่างกัน 6 ชั่วโมง ฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง GnRHa 10 µg/kg ผสม domperidone 5 mg/kg เฉพาะเพศเมีย ผสมกับน้ำเชื้อที่แช่เย็นไว้นาน 2 วัน ปริมาตร 23 ซีซี จากเพศผู้ในหน่วยทดลองเดียวกัน หลังฉีดเข็มที่สองนาน 10 ชั่วโมง สามารถรีดไข่ได้ 23 กรัม แต่ผสมไม่ประสบความสำเร็จโดยหลังการผสม สังเกตจากการใส่น้ำแล้วไข่ไม่ติดภาชนะ รีดครั้งที่สอง หลังจากฉีดเข็มที่สองเป็นเวลา 20 ชั่วโมง ได้ไข่ 387 กรัม ผสมกับน้ำเชื้อผสมไม่ประสบความสำเร็จ เนื่องจากไข่ไหลและน้ำเข้าท้องปลาบึกเพศเมียสามารถรีดไข่ได้ 401 กรัม จากปลาบึกเพศเมียตัวที่ 2 แสดงว่าปริมาณฮอร์โมนที่ฉีดที่สามารถกระตุ้นให้มีการวางไข่และอสุจิ ได้จากหน่วยทดลองที่ฉีดฮอร์โมนเริ่มต้น 50 µg/kg ทั้งนี้อาจเป็นผลของระดับฮอร์โมน T และ E2 โดยเฉลี่ยปานกลางและเหมาะสมกว่าหน่วยควบคุมและกลุ่มปลาที่ฉีดฮอร์โมนเริ่มต้น 100 µg/kg ความสมบูรณ์ของอสุจิหลังการเจือจางด้วยน้ำเกลือ 0.9 % เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 5 °C อสุจิสามารถอยู่ได้นาน 7 วัน มีอัตราการเคลื่อนที่ลดลง 50 % และสามารถนำไปผสมกับไข่ปลาบึกครั้งที่ 2 ณ สถานีประมงน้ำจืด จ. พะเยา ได้ลูกปลาประมาณ 300 ตัว

หลังจากฉีดฮอร์โมนครั้งที่ 75 วัน (26 กรกฎาคม 2545) ปลาบึกเพศเมียตัวที่ 2 จากหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย GnRHa 50 µg/kg น้ำหนัก 17 กก. เมื่อปลาเริ่มไข่พร้อมที่จะรีด จึงฉีดฮอร์โมน 4 เข็มที่ละลายในน้ำกลั่น เข็มที่ 1 เวลา 16.00 น. GnRHa 5 µg/kg ผสมกับ domperidone 2.5 mg/kg และฉีดฮอร์โมนเพศ ปลาบึกเพศผู้ น้ำหนัก 16 กก. เข็มที่ 2 เวลา 22.00 น. GnRHa 10 µg/kg ผสมกับ domperidone 2.5 mg/kg วันที่ 27 กรกฎาคม 2545 ฉีดฮอร์โมนเพศปลาบึกเพศเมียน้ำหนัก 17 กก. เข็มที่ 3 เวลา 08.30 น. GnRHa 15 µg/kg ผสมกับ domperidone 2.5 mg/kg เข็มที่ 4 เวลา 11.00 น. GnRHa 5 µg/kg ผสมกับ domperidone 0.5 mg/kg วันที่ 27 กรกฎาคม 2545 เวลา 16.00 น. หลังจากฉีดเข็มที่ 1 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถรีดไข่ และน้ำเชื้อปลาบึกหนัก 17 กก. ได้ไข่น้ำหนัก 650 กรัม และประสบความสำเร็จในการผสมเทียมปลาบึก วันที่ 28 กรกฎาคม 2545 อัตราผสมระยะบลาสตูลา ประมาณ 10 % ออกเป็นตัวเพียง 11 ตัว (รูปที่ 6.28) ทั้งนี้เนื่องจากการประเมินอัตราผสมระยะบลาสตูลา ซึ่งไข่ที่ไม่ผสมจะมีลักษณะใกล้เคียงกับไข่ระยะบลาสตูลา ทั้งนี้การประเมินอัตราผสมควรประเมินระยะที่เห็นจุดตา และอาจเนื่องจากช่วงฟักไข่น้ำมีความขุ่นมากทำให้อัตราการฟักเป็นตัวน้อย ประกอบกับปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อดินยังมีอายุน้อยเมื่อเทียบกับปลาบึกที่สามารถผสมเทียมและฟักออกเป็นตัวได้ประมาณ 60-70 % มีอายุ 16 ปี น้ำหนัก 60 กก. (กรมประมง 2545) ระดับของฮอร์โมน GnRHa ที่ใช้กระตุ้นการรีดน้ำเชื้อและไข่ที่ระดับ 50 µg/kg อย่างเดียวสามารถ

ให้จำนวนปลาที่รัดไข่และน้ำเชื้อได้สูงสุด และน่าจะเป็นระดับที่เหมาะสม ดีกว่าการใช้มากเกินไป อาจจะมีผลในการยับยั้งหรือทำให้ไข่ไหลก่อนกำหนด ดังเช่นการศึกษาในปลา sea bass (*Dicentrarchus labrax* L; Prat et al., 2001)



รูปที่ 6.25 ไข่ปลาบิก ติดด้วย GnRHα 50 µg/ 1 กก.
จากบ่อภาควิชาเทคโนโลยีการประมง
วันที่ 24 พฤษภาคม 2545



รูปที่ 6.26 ไข่ปลาบิก ที่สุกพร้อมจะผสม 10
มิถุนายน 2545 จากสถานี
ประมงน้ำจืด จ.พะเยา



รูปที่ 6.27 น้ำเชื้อปลาบิก หลังจากเจือจางด้วย
น้ำเกลือ 0.9% นำไปผสมกับไข่ปลา
บิก ณ สถานีประมงน้ำจืด จ.พะเยา

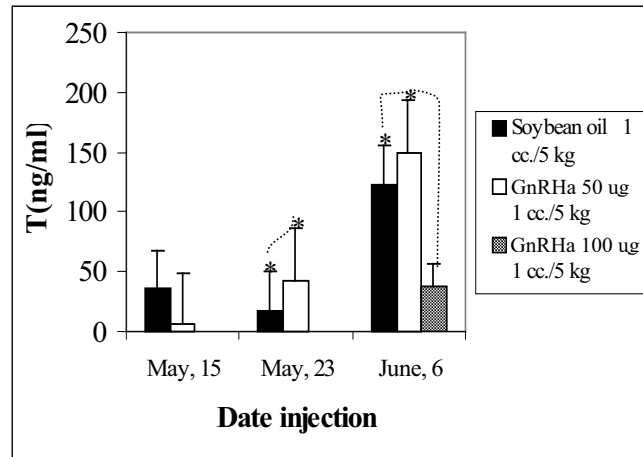


รูปที่ 6.28 ประสบความสำเร็จจากการผสมเทียม
ได้ลูกปลาบิกแท้ อายุ 5 เดือน

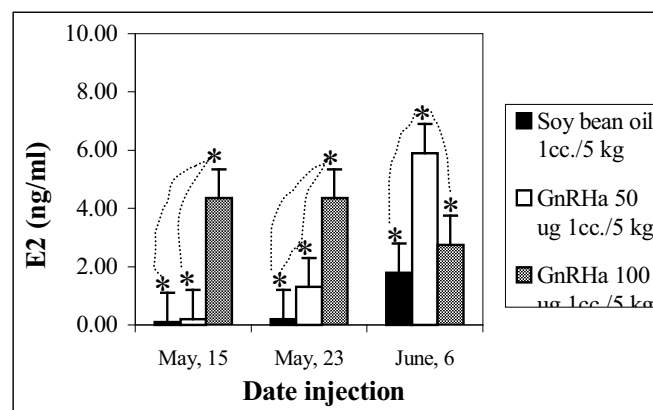
- ปลาบิก ชุดที่ 2

จากรูปที่ 6.29 และ 6.30 แสดงปริมาณฮอร์โมน Testosterone (T) และ Estradiol (E2) ก่อนการฉีดฮอร์โมน ปริมาณ T และ E2 มีปริมาณน้อยกว่าหลังจากการฉีดฮอร์โมนผสมน้ำมันถั่วเหลือง ครั้งที่ 1 (23 พฤษภาคม 2545) มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในหน่วยทดลองที่ฉีดฮอร์โมน 100 µg/kg โดยเพศผู้มีค่า T เท่ากับ 43 ng/ml ส่วนเพศเมียมีค่า E2 เท่ากับ 10.98 ng/ml ฉีดครั้งที่ 2 (30 พฤษภาคม 2545) ได้ตรวจสอบการพัฒนาของไข่ และอสุจิโดยใช้สายยางสอดที่ช่องเพศแล้วดูพบว่ามีไข่นขนาดเล็กสีขุ่นจากปลา 2 ตัวที่ฉีดฮอร์โมน 100 µg/kg แต่ไม่สามารถรัดไข่ได้ทั้งนี้เนื่องจากไข่ยังไม่สมบูรณ์ซึ่งเป็นผลจากการที่ปลามีขนาดเล็กและเพิ่งทำการย้ายปลามาใหม่หรือจากการที่ระดับฮอร์โมนยังไม่พอ และไม่พบไข่ในหน่วยควบคุม ฉีดครั้งที่สาม (6 มิถุนายน 2545) ปริมาณฮอร์โมน

T มีค่าเพิ่มขึ้นในทุกหน่วยทดลอง และ E2 เพิ่มขึ้นในปลาที่ฉีดด้วยฮอร์โมน 50 $\mu\text{g/kg}$ มีค่า T และ E2 เท่ากับ 11,330 ng/ml และ 5.76 ng/ml ในเพศผู้ และเพศเมียตามลำดับ



รูปที่ 6.29 ปริมาณเฉลี่ยฮอร์โมน Testosterone (T) ของปลาบึกเพศผู้หลังฉีดด้วยฮอร์โมน



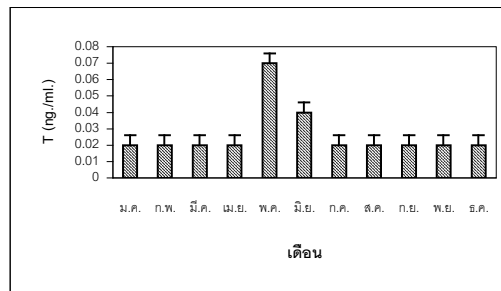
รูปที่ 6.30 ปริมาณเฉลี่ยฮอร์โมน Estradiol (E2) ของปลาบึกเพศเมียหลังฉีดด้วยฮอร์โมน

- เปรียบเทียบฮอร์โมนเพศปลาบึกอายุ 8-10 ปี (2543-2545)

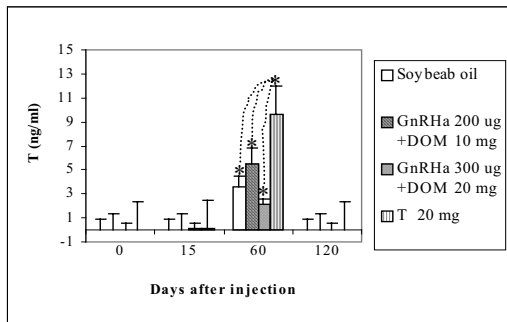
ปริมาณฮอร์โมน Testosterone (T) และ Estradiol (E2) ของปลาบึกในช่วงก่อนฤดูวางไข่ (มกราคม-เมษายน) มีปริมาณ T และ E2 น้อยและจะเพิ่มสูงขึ้นในฤดูวางไข่ (พฤษภาคม-สิงหาคม) และลดลงหลังฤดูวางไข่ (กันยายน-ธันวาคม) และปริมาณ T ในเพศผู้ และ E2 ในเพศเมีย ในปี 2545 มีแนวโน้มมากกว่าปี 2544 และ 2543 แสดงว่าปลาที่มีอายุเพิ่มขึ้นจะมีการพัฒนาของฮอร์โมนเพศ และการเจริญพันธุ์ที่ดีกว่าปลาที่มีอายุน้อยกว่า เช่นเดียวกับปลาบึกที่ฉีดฮอร์โมนมีระดับฮอร์โมนเพศที่สูงหลังจากการฉีด 60 วัน และ 7 วัน ในปี 2544 และ 2545 ตามลำดับ และสูงกว่าหน่วยควบคุม การผสมเทียมสามารถทำได้สำเร็จจากปลาที่ฉีดฮอร์โมนในปี 2545 ในปลาเพศผู้มีน้ำเชื้อที่ผสมกับ

ปลาเพศเมียมีไข่ได้แต่อัตราฟักออกเป็นตัวน้อย มีปริมาณ T ประมาณมากกว่า 25 ng/ml ส่วนเพศเมียมีค่า E2 ประมาณมากกว่า 2.50 ng/ml (รูปที่ 6.31-6.32)

ปี 2543

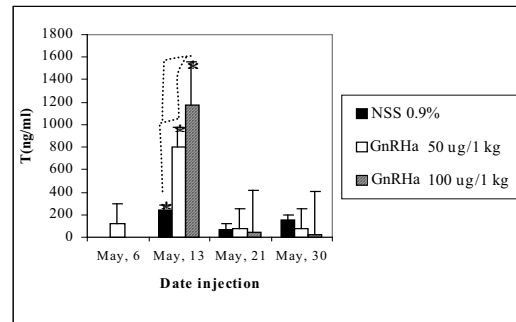


ปี 2544



รีดน้ำเชื้อ 7 กรกฎาคม 2544

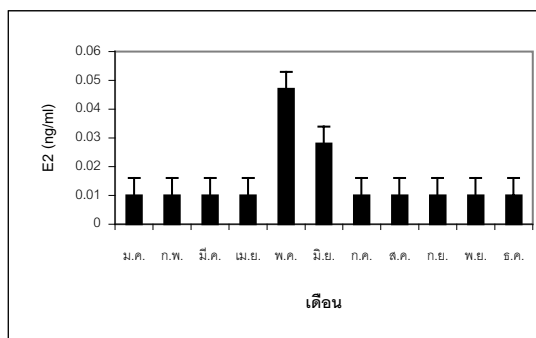
ปี 2545

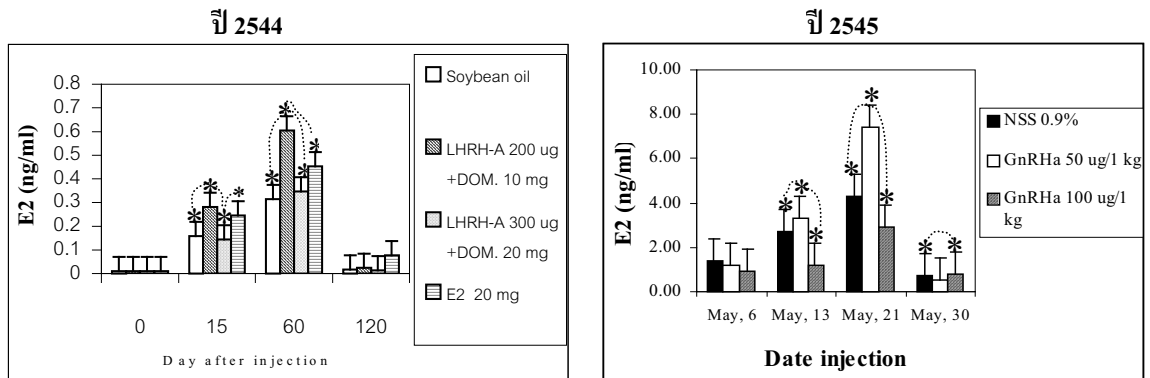


รีดน้ำเชื้อ วันที่ 14 พฤษภาคม 2545, 24 พฤษภาคม 2545 และ 15 มิถุนายน 2545

รูปที่ 6.31 ปริมาณเฉลี่ยฮอร์โมน Testosterone (T) ของปลาบึกเพศผู้ในปี 2543-2545

ปี 2543





ริตไข่กลางเดือน กรกฎาคม

ริตไข่ วันที่ 14 พฤษภาคม 2545, 24 พฤษภาคม 2545 และ 15 มิถุนายน 2545

รูปที่ 6.32 ปริมาณเฉลี่ยฮอร์โมน Estradiol (E2) ของปลาบึกเพศเมียในปี 2543-2545

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

1. ปลาบึกอายุ 6 ปี ณ จรัลฟาร์ม ปริมาณฮอร์โมนเพศในรอบปี ส่วนใหญ่ยังมีปริมาณน้อยมาก T วัดได้ก่อน E2 และวัดได้เล็กน้อยในช่วงก่อนและระหว่างฤดูวางไข่ เดือนพฤษภาคม – มิถุนายน เช่นเดียวกับปลาบึกอายุ 8 ปี ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง ส่วนดัชนีความสมบูรณ์เพศเพศเมียมีค่ามากกว่าเพศผู้ และมีค่ามากในเดือน พฤษภาคม แต่ยังมีค่าน้อยกว่าปลาบึกจากแม่น้ำโขง ที่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์มาก

ปลาบึกอายุ 7 ปี ณ จรัลฟาร์ม ที่ฉีดน้ำมันถั่วเหลืองอย่างเดียวและฉีดฮอร์โมนหลังจากการฉีด 15 และ 60 วัน ซึ่งเป็นเดือนที่เริ่มเข้าสู่ฤดูวางไข่ สามารถวัดปริมาณ T และ E2 ได้มากขึ้น เช่นเดียวกับปลาบึกอายุ 9 ปี ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง น้ำหนัก 14 กก. ในเดือนมิถุนายน และมีดัชนีการพัฒนาวัยวะสืบพันธุ์พัฒนาดีขึ้น และสามารถริตไข่และน้ำเชื้อที่สมบูรณ์ได้หลังจากฉีดฮอร์โมน 82 วัน แต่การผสมไม่ประสบผลสำเร็จ T และ E2 ลดลงหลังจากฉีด 150 และ 120 วัน ตามลำดับ ปลาบึกอายุ 9 ปี มีการพัฒนาของฮอร์โมนและการเจริญพันธุ์ดีกว่าปลาบึกอายุ 7 ปี และยังไม่พบการพัฒนาของน้ำเชื้อและไข่

3. วิเคราะห์ผลและแนวโน้มเปรียบเทียบผลของฮอร์โมนต่อระดับฮอร์โมน T และ E2 ปลาบึกอายุ 9 ปี ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง และปลาซวยอายุ 1.5 ปี ระดับฮอร์โมนเพศปลาซวยและปลาบึกที่ฉีดฮอร์โมนมีแนวโน้มสูงกว่าหน่วยควบคุม ในปลาบึกระดับฮอร์โมนเริ่มสูงในเดือน มิถุนายน – เดือน กรกฎาคม (T ในเพศผู้มีค่า 6 ng/ml ส่วน E2 ของปลาบึกเพศเมียบก่อนการริตไข่มีค่า 0.45 ng/ml) แล้วลดลงในเดือน สิงหาคม ส่วนปลาซวยเริ่มสูงในเดือนมิถุนายน – กันยายน แล้วลดลงในเดือน พฤศจิกายน (เพศผู้มีค่า T เท่ากับ 11 ng/ml เพศเมียมีค่า E2 เท่ากับ 0.47 ng/ml)

4. ในปลาบึกอายุ 9 ปี น.น. 15 กก. ในเพศผู้การฉีดน้ำมันถั่วเหลืองอย่างเดียว ฮอร์โมน GnRH-a ผสม DOM และ T น้ำมันถั่วเหลืองสามารถกระตุ้นและริตน้ำเชื้อได้สมบูรณ์เร็วขึ้นเนื่อง

จากปกติการเลี้ยงปลาบึกในบ่อดินจะเจริญพันธุ์และผสมเทียมได้ใช้เวลาประมาณ 15 ปี ส่วนเพศเมียสามารถไข่ได้แต่ยังไม่สามารถผสมเทียมได้จากการฉีดด้วย GnRHa ผสม DOM ส่วนน้ำมันถั่วเหลือง และ E2 ไม่สามารถไข่ได้ ทั้งนี้ควรพิจารณาปรับความเข้มข้นให้เหมาะสม ประกอบกับต้องพิจารณาปัจจัยอื่นเช่นความสมบูรณ์ของพ่อแม่พันธุ์ อายุ น้ำหนัก ปริมาณและการใช้ฮอร์โมน การให้อาหาร และคุณภาพน้ำ ที่เหมาะสม เป็นต้น

5. ปลาบึกจากจรัลฟาร์มอายุ 8 ปี เฉลี่ย น.น. 16 กก. หลังจากฉีด Soybean oil อย่างเดียวและที่ผสมฮอร์โมนในช่วงฤดูการวางไข่ ระดับฮอร์โมนเพศมีแนวโน้มมากขึ้นกว่าปลาอายุ 6 และ 7 ปี ในช่วงเวลาเดียวกัน และสามารถดูไข่ขนาดเล็กมากได้แค่ 3 ฟองจากปลาที่ฉีดฮอร์โมน ส่วนปลาบึกอายุ 10 ปี (17 กก.) ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง หน่วยทดลองที่ฉีดด้วย GnRHa 50 μ g/kg ทุกสัปดาห์โดยลดปริมาณลงครึ่งหนึ่งในช่วงฤดูการวางไข่ หลังการฉีดครั้งที่หนึ่งนานหนึ่งสัปดาห์ (13 พฤษภาคม 2545) ค่า T และ E2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในเพศผู้ T มีค่า 800 ng/ml และในเพศเมีย E2 มีค่า 3.20 ng/ml หลังจากการฉีดครั้งที่สองหนึ่งสัปดาห์ (21 พฤษภาคม 2545) T มีแนวโน้มลดลงในเพศผู้ ส่วนค่า E2 เพิ่มขึ้นในเพศเมียมีค่า 7.27 ng/ml หลังจากการฉีดฮอร์โมนครั้งที่สามหนึ่งสัปดาห์ (30 พฤษภาคม 2545) ค่า T และ E2 เปลี่ยนแปลงไม่มาก และสามารถไข่และน้ำเชื้อได้จำนวนตัวมากที่สุด ความคอกของไข่ปลาบึก/1 กรัม มีค่าเฉลี่ย 784 ฟอง มีขนาด 1 มิลลิเมตร อสุจิที่เจือจางด้วย 0.9% NaCl (1: 5) เก็บที่อุณหภูมิ 5 °C สามารถอยู่ได้นาน 7 วัน **ประสบความสำเร็จในการผสมเทียมกับไข่ปลาบึกอายุ 16 ปี (หนัก 54 กก.)** ที่สถานีประมงน้ำจืด จ. พะเยา ได้ลูกปลาประมาณ 600 ตัว และ**ประสบความสำเร็จในการผสมเทียมที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้** หลังจากการฉีดด้วยฮอร์โมนครั้งที่สี่ นาน 75 วัน (26 กรกฎาคม 2545) โดยใช้ไข่เชื้อสดและไข่จากปลาบึกอายุ 10 ปี น้ำหนัก 17 กก. ได้ไข่หนัก 650 กรัม อัตราผสมระยะ แกสตุลา 10% ได้เป็นตัว 11 ตัว

6. ปริมาณ T ในเพศผู้ และ E2 ในเพศเมีย ในปี 2545 มีแนวโน้มมากกว่าปี 2544 และ 2543 แสดงว่าปลาที่มีอายุเพิ่มขึ้นในช่วงฤดูการวางไข่ จะมีการพัฒนาของฮอร์โมนเพศและการเจริญพันธุ์ที่ดีกว่าปลาที่มีอายุน้อยกว่า

เอกสารอ้างอิง

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน, เทพรัตน์ อิงเศรษฐพันธ์, ทิพสุคนธ์ พิมพ์พิมล, อาณาพ วรรณคณาพล และ เขมชาติ จิวประเสริฐ. 2544. การศึกษาข้อมูลเบื้องต้นการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ระดับฮอร์โมนเพศและอายุของปลาบึกในแหล่งน้ำธรรมชาติ. วารสารการประมง. 54 (3):249-256.

- กรมประมง. (2545). ประสบผลสำเร็จครั้งแรกจากการผสมเทียมพ่อแม่พันธุ์ปลาบึกที่เลี้ยงจากบ่อ
ดิน ณ สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดพะเยา. กรมประมง. 57 หน้า
- กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะ
วิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 128 หน้า
- นฤพล สุขุมาสวิน และวัฒนะ ลีลาภัทร. (2537). วงจรการสืบพันธุ์ในรอบปีของแม่ปลาตะเพียน
ขาว. วารสารการประมง 47(1), 21-30.
- นวลอนงค์ นาคคง. (2537). ลักษณะทางกายวิภาคของปลาบึก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
(ชีววิทยา), มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 124 หน้า.
- สุนนา ชมพูทวีป. (2541). เกสัชวิทยาของฮอร์โมน. ภาควิชาเภสัชวิทยา, คณะแพทยศาสตร์, จุฬาลง
กรณ์มหาวิทยาลัย. 125 หน้า.
- Billard, R. (1986) Spermatogenesis and spermatology of some teleost fish species. *Reprod. Nutr
Develop* 26(4), 877-920.
- Campbell, P.M., Pottinger, T.G. and Sumpter, J.P. (1992) Stress reduces the quality of gametes
produced by rainbow trout. *Biol. Reprod* 47, 1140-1150.
- Chun, P., Richard, E.P., and John P. C. (1994) Neurendocrine control of gonadotropin secretion
and ovulation in teleosts. In: *High Performance Fish*. (ed. by D.D. Mackinlay), 125-130.
Proceedings of an International Fish Physiology Symposium held. University of British
Columbia Vancouver, Canada.
- Colin, E.P. (1993) Genetics and Fish Breeding. Ministry of Agriculture Fisheries and Food. Fish
laboratory, Lowestoft, Suffolk. 277 p.
- Crim, L.W. and Glebe, B.D. (1984) Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon
with pelleted LHRH analog. *Aquaculture* 43, 47-56.
- Dence, J.B. (1980) Steroids and peptides : Selected chemical aspects for biology, biochemistry
and medicine. Canada : John Wiley and Sons, Inc.
- Goren, A., Zohar, Y., Fridkin, M., Elhanati, E. and Koch, Y. (1990) Degradation of gonadotropin
releasing hormone in the gilthead seabream, *Sparus aurata*; I. Cleavage of native salmon
GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79,
291-305.
- Haddy, J.A, and Pankhurst, N.W. (2000) The efficacy of exogenous hormones in stimulating
changes in plasma steroids and ovulation in wild black bream *Acanthopagrus butcheri* is

- improved by treatment at capture. *Aquaculture* 191, 351-366.
- Kobayashi, M., Aida, K. and Hanyu, I. (1986) Annual changes in plasma levels of gonadotropin and steroid hormones in goldfish. *Bull. Japan. Soc. Sci.* 52(7), 1153-1158.
- Lee, C.S., Tamaru, C.S., Kelley, C.D. and Banno, J.E. (1986) Induce spawning of milkfish, *Chanos chanos*, by a single injection of LHRH-analogue. *Aquaculture* 58, 87-98.
- Nikolsky, G.V. (1963) The ecology of fisher. Academic Press, London. 352 p.
- Peter, R.E., Lin, H.R., Van der kraak, G. and Little, M. (1993) Releasing hormones, dompermine antagonists and induced spawning. In: *Recent Advances in Aquaculture Muir*. (ed. by J.F. Muir and R.J. Roberts), 25-30. Blackwell Scientific, Oxford.
- Prat, F., Carrillo, M., Zanuy, S. and Bromage, N.R. (1999) Effects of constant short and long photoperiod regimes the spawning performance and sex steroid levels of female and male sea bass (*Dicentrarchus labrax*). *Journal Fish Biology* 54, 125-137.
- Prat, F., Zanuy, S. and Carrillo, M. (2001). Effect of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozone on plasma levels of sex steroids and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax* L). *Aquaculture* 198, 325-338.
- Sato, N., Kawazoe, I., Suzuki, Y. and Aida, K. (2000) Adequate interval of sGTH administration to induce vitellogenesis, and induction of ovulation by simultaneous administration of sGTH and 17 α -hydroxyprogesterone in the Japanese eel. *Fisheries Science* 66, 644-654.
- Scott, A.P. and Sumpter, R.A. (1988) A comparison of the female reproductive cycles of autumn-spawning and winter-spawning strains of rainbow trout (*Salmo gairdneri*, Richardson). *Gen. Comp. Endocrinol* 49, 128-134.
- Scott, A.P., Bye, V.J., Baynes, S.M. and Springate, J.R.C. (1980) Seasonal variations in plasma concentration of 11-ketotestosterone and testosterone in male rainbow trout, *Salmo gairdneri*, Richardson. *J. Fish Biol.* 17, 495-505.
- Solar, I.I., Smith, J., Dye, H.M., McKinley, D., Zohar, Y. and Donaldson, E.M. (1995) Induced ovulation of chinook salmon using a GnRHa implant: effect on spawning, egg viability and hormone levels. 5th International Symposium on Reproductive Physiology of Fish, Austin, TX, 76 pp.
- Sower, S.A., Iwamoto, R.N., Dickhoff, W.W. and Gorbman, A. (1984) Ovulatory and steroidal responses in coho salmon and steelhead trout following administration of salmon

- gonadotropin and D-Ala⁶, des Gly¹⁰ gonadotropin-releasing hormone ethylamide (GnRHa). *Aquaculture* 43, 35-46.
- Tan-Fermin, J. D., Ijiri, S., Ueda, H., Adachi, S. and Yamauchi, K. (1997). Ovarian development and serum steroid hormone profiles in hatchery-bred female catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther) during an annual reproductive cycle. *Fisheries Science* 63(6), 867-872.
- Ueda, H. and Yamauchi, K. (1995) Biochemistry of fish migration. In: *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*. (ed. by P.W. Hochachka and T.P. Mommsen), 265-279. *Molecular Biology Frontiers* 5, Elsevier, Amsterdam.
- Van der Kraak, G., Lin, H.R., Donalson, E.M., Dye, H.M. and Hunter, G.A., 1983. Effects of LH-RH and des-Gly¹⁰ -[D-Ala⁶]-LH-RH ethylamide on plasma gonadotropin levels and oocyte maturation in adult female coho salmon (*Hypophthalmichthys molitrix*) and goldfish (*Carassius auratus*). *Aquaculture* 78, 81-86.
- Wang, H.P., Wei, K.J., Yao, H., Lin, J.J. and Mai, J.B. (1998) Induced Ovarian Development, Maturation and Ovulation of domestic Reeves Shad by Hormone Implantation and Injection. *Asian Fisheries Science* 11(1), 43-50.
- Zohar, Y., Tosky, M., Pagelson, G. and Finkelman, Y. (1989b) Induction of spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, using [D-Ala⁶-Pro⁹Net]-LHRH: comparison with the use of HCG. *Israeli J. Aquaculture-Bamidgeh* 41, 105-113.
- Zohar, Y., Goren, A., Fridkin, M., Elhanati, E. and Koch, Y. (1990a) Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead seabream *Sparus aurata*: II. Cleavage of native salmonid GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary, kidney and liver. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 306-331.
- Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S. and Tandler, A. (1995a) Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). In: *Broodstock management and Egg and Larval Quality*. (ed. by N.R. Bromage & R.J. Roberts), 94-117. Blackwell, Oxford.
- Zohar, Y., Elizur, A., Sherwood, N.M., Rivier, J.F. and Zmora, N. (1995b) Gonadotropin releasing potencies of the three native forms of gonadotropin releasing hormones present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 97, 289-299.
- Zohar, Y. and Mylonas C.C. (2001). Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormone to genes. *Aquaculture* 197, 99-136.

บทที่ 7

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็งแบบเม็ดเพื่อการอนุรักษ์และการเพาะขยายพันธุ์

บทนำ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง คือ การลดอุณหภูมิลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็งของของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์ ทำให้น้ำในสภาพที่เป็นของเหลวกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง ในปัจจุบันได้มีการศึกษาและทำการทดลองในปลาหลายชนิด และได้มีการพัฒนาวิธีการเก็บจนประสบความสำเร็จ ซึ่งสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้เป็นเวลานาน โดยมีอัตราการผสมไข่และอัตราการรอดไข่เกี่ยวกับน้ำเชื้อสด โดยในการศึกษาเพื่อตรวจสอบคุณภาพของน้ำเชื้อเพื่อยืนยันความสำเร็จ มีวิธีการตรวจสอบหลายวิธีคือการศึกษ้อัตราการเคลื่อนที่ ปริมาณและจำนวนของตัวอสุจิ เปอร์เซ็นต์การผสมระหว่างไข่กับน้ำเชื้อแช่แข็ง นอกจากนี้ในการเก็บรักษายังมีปัจจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัย เช่น อุณหภูมิในการเก็บรักษาระดับต่าง ๆ สูตรน้ำยาที่ใช้ในการเก็บ และอุปกรณ์ที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อในขณะแช่แข็ง เป็นต้น

ทัศนีย์ และคณะ (2529) ได้ทดสอบน้ำยา จำนวน 5 สูตร ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพา และปลาบึกในหลอดฟาง (Straw) ดังนี้ สูตร 1 125 mM KHCO_3 , 250 mM Sucrose, 9.75 mM Glutathione 8 % DMSO, สูตร 2 5 % milk powder, 5 % methanol, สูตร 3 10 % milk powder, 10 % methanol, สูตร 4 15 % milk powder, 5 % methanol, สูตร 5 15 % milk powder, 10 % methanol หลังจากเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาแช่แข็งนาน 5 วัน จึงนำมาตรวจคุณภาพของน้ำเชื้อพบว่า น้ำเชื้อที่ผสมกับน้ำยาสูตรที่ 1 ให้น้ำเชื้อคุณภาพดีที่สุด เมื่อละลายแล้วพบว่า มีอสุจิที่มีชีวิตเคลื่อนไหวได้ถึง 70 % ส่วนน้ำยาสูตรที่ 2 และ 3 มีลักษณะเป็นเมือกเหนียวคล้ายวุ้น ไม่สามารถตรวจคุณภาพได้ และน้ำยาสูตรที่ 4 และ 5 เมื่อนำมาละลายแล้วจะมีลักษณะเป็นวุ้น แต่ยังประเมินคุณภาพได้ และมีอสุจิเคลื่อนที่ได้ 30-50 % เท่านั้น สงศรี (2533) ค่าออสโมลาลิตี (Osmolality) คือสารละลายที่มีตัวถูกละลาย 1 ออสโมล ละลายในน้ำ 1 กก. หน่วยเป็นออสโมลต่อกิโลกรัม ออสโมเรกูเลชัน (Osmoregulation) หมายถึงความสามารถของสารละลายที่สามารถแพร่ผ่านผนังเซลล์เนื่องจากความเข้มข้นต่าง ๆ การทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาบึก ด้วยการแช่แข็ง (-196°C) ในสูตรน้ำยาที่ประกอบด้วยชูโครส 250 มิลลิโมล ร่วมกับไดเมทิลซัลโฟไซด์ (DMSO) สามารถทำให้อัตราการเคลื่อนไหวและผสมกับไข่ดีที่สุดหากสามารถเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งได้ถูกวิธีใช้สารประกอบและสารป้องกันเซลล์ได้ดีตลอดจนการรักษาน้ำเชื้อได้คงที่สามารถได้นานเป็นหมื่นปี (กฤษณ์, 2535; กฤษณ์และทัศนีย์, 2535) การเตรียมน้ำยาที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อปลาแต่ละกลุ่มต้องใช้สารเคมีที่เมื่อละลายน้ำ

เชื้อแล้วให้อ่อนชนิดที่เหมาะสม และน้ำยานั้นควรจะมีค่าออสโมลาลิตี (Osmolality) ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลา ทั้งนี้เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนไหวหรือการใช้พลังงานของตัวอสุจิ ตลอดจนการรักษาให้ตัวอสุจิคงรูปและมีอัตราการรอดอยู่ตลอดเวลาที่เก็บรักษาไว้ เพื่อการเพาะขยายพันธุ์ (กฤษณ์, 2536) ได้มีศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็ง พบว่าสูตรที่ประกอบด้วย 125, 250 และ 9.75 mM ของ KHCO_3 Sucrose Glutathione และ 8 % DMSO ตามลำดับ เก็บนาน 5 วันให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิแช่แข็งดีที่สุดที่ 70 % ให้อัตราการฟักเฉลี่ย 31 % ขณะที่อสุจิสด 51 % ระยะเวลาการเก็บนาน 28 และ 120 วัน ให้อัตราการรอดของอสุจิแช่แข็งไม่ต่างกันโดยมีอัตราการเฉลี่ย 60 % ส่วนภาชนะที่เก็บในหลอดปลอดเชื้อ 1 ซีซี ให้อัตราการผสมเฉลี่ยสูงสุด 67 % ดีกว่าหลอดแก้ว (เสนห์, 2536) เกรียงศักดิ์ (2537) ได้ศึกษาสูตรเคมีที่เหมาะสมเพื่อการเก็บน้ำเชื้อปลาโดยเก็บในหลอดพลาสติกและเม็ด จำนวน 4 สูตร ดังนี้ สูตร 1 (NaCl 750 mg KCL 38 mg NaHCO_3 200 mg Glucose 100 mg ไข่แดง 20 % DMSO 12 %) สูตร 2 (NaCl 750 mg KCL 38 mg NaHCO_3 200 mg Glucose 100 mg DMSO 10%) สูตร 3 (Glucose 5400 mg dmsol 10 %) และ สูตร 4 (Glucose 5400 mg ไข่แดง 20 % DMSO 12 %) พบว่า สูตรที่มีแนวโน้มให้อัตราการผสมดีมากที่สุด ได้แก่ สูตรที่ 1, 4 และ 2 ตามลำดับ ส่วนสูตรที่ 3 ให้อัตราการผสมต่ำสุด การเก็บอสุจิแช่แข็งในรูปเม็ดทำได้สะดวกกว่า และมีแนวโน้มให้อัตราการผสมดีกว่า นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบจำนวนครั้งที่ให้ NaCl 0.8 % เพื่อกระตุ้นน้ำเชื้อแช่แข็งในสูตรที่ 1 เพื่อการผสมพันธุ์กับไข่ พบว่าการใช้ NaCl 0.8 % ช่วยให้อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจินานและทำให้โอกาสในการผสมกับไข่ดีขึ้นจำนวนครั้งที่ให้เหมาะสม 1-2 ครั้ง (กฤษณ์, 2536) ได้ทดลองเก็บน้ำเชื้อปลาสาวยแช่แข็ง โดยน้ำเชื้อปลาสาวยเจือจาง (1 : 3, น้ำเชื้อ : น้ำยา) ในน้ำเกลือ (0.85 % NaCl) หรือ Calcium-free Hanks' balanced salt Solution (C- FHBSS) ซึ่งมี DMSO 8, 10 หรือ 12 % และเก็บไว้ในตู้เย็นนาน 20 นาที ก่อนมีการลดอุณหภูมิ (-10, -20 หรือ -30 °C ต่อ นาที) ถึง -80 °C แล้วเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลว (-196 °C) เป็นเวลา 7 วัน เมื่อน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาละลายที่ 50 หรือ 70 °C เมื่อตรวจเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่ และอัตราการปฏิสนธิกับไข่ปลาอุกอยู่ พบว่าเปอร์เซ็นต์อสุจิเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างกันระหว่างการใช้น้ำยา 0.85 % NaCl หรือ C-F HBSS Stoss and Holt (1987) ความสำเร็จของการเก็บอสุจิแช่แข็งของปลา rainbow trout แบบเม็ด โดยหยดบนน้ำแข็งแห้ง แล้วเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว จากการทดลองผลปรากฏว่าน้ำเชื้อที่เก็บไว้ในของเหลวที่ปนมากับไข่ 119 มิลลิโมลผสมกับ NaHCO_3 และ 120 มิลลิโมลของ NaCl ได้ผลดีที่สุดโดยมีอัตราการผสมเป็น 78.9 %, 75.3 % และ 69.1 % ตามลำดับ เปรียบเทียบกับ 97.1 % ของหน่วยควบคุม เสนห์ และภาณุ (2541) ได้ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึก สำหรับใช้ในการผสมเทียมสามารถกระทำได้โดยการเจือจางด้วย extenders ซึ่งประกอบด้วย KHCO_3 125 mM, Sucrose

250 mM, Glutathione 9.75 mM และ DMSO 8 % แล้วนำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วคัดบรรจุในหลอดที่
 คัดแปลงจากหลอดปลอดเชื้อ AI ความจุ 1 มิลลิลิตร บรรจุน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย extender ในอัตรา
 1 : 3 ลดอุณหภูมิโดยการสัมผัสกับไอของไนโตรเจน เป็นเวลา 15 นาที ก่อนแช่แข็งในไนโตรเจน
 เหลว สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกได้ในคุณภาพที่น้ำพอใจ นอกจากนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา
 บึกแบบแช่แข็งสูตรนี้ พบว่า สามารถเก็บรักษาได้ไม่ต่ำกว่า 120 วัน โดยที่อัตราการเหลือรอดของ
 อสุจิ (sperm) ก่อนข้างสูง คือ พบ motile sperm ที่มี motile rate ระดับ 5 อยู่ถึงร้อยละ 60

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง ถือว่าเป็นวิธีการที่เป็นประโยชน์และมีความสำคัญต่อ
 เศรษฐกิจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นวิธีที่ช่วยในการอนุรักษ์พันธุ์ปลาที่ใกล้สูญพันธุ์ เพิ่มผลผลิต
 สัตว์น้ำให้มีจำนวนมากขึ้น ในยามที่ขาดแคลนพ่อพันธุ์ที่จะใช้ในการผสม นอกจากนี้ยังสามารถใช้
 ในการศึกษาพันธุ์ปลาชนิดต่างๆ เพื่อการผสมข้ามชนิด ตลอดจนการตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลา สำหรับ
 การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งได้มีการทำในปลาหลายชนิด เช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio*) ปลา
 ตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) ปลาสวาย (*Pangasianodon nypphthalmus*) ปลาบึก
 (*Pangasianodon gigas*) และปลาเทพา (*Pangasius sanitwongsei*) แต่รูปแบบการเก็บส่วนใหญ่จะเก็บ
 ในรูปหลอดฟางและปัญหาที่พบในการเก็บในรูปนี้คือหลอดจะหักก่อน ที่จะนำมาใช้หากมีการเก็บ
 เป็นเวลานาน และราคาหลอดค่อนข้างแพงนอกจากการเก็บในรูปหลอดฟางแล้ว อีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจ
 ก็คือการเก็บในรูปเม็ด การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งไว้ใช้ประโยชน์ในอนาคตนั้น หาก
 เป็นการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C และมีการดูแล คอยเติมไนโตรเจนเหลว
 อย่างสม่ำเสมอ จะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ได้นานหลายสิบปี ด้วยเหตุนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อ
 แบบแช่แข็งไว้จึงได้ชื่อว่าเป็น ธนาคารอสุจิที่จะเป็นประโยชน์ต่อการอนุรักษ์ และนำไปใช้ได้ต่อไป
 ในอนาคต

วิธีดำเนินการวิจัย

1. ทดสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิสดของปลาบึกก่อนทำการเก็บรักษา โดยหยดน้ำลงบนอสุจิที่
 อยู่บนสไลด์ แล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 คู่อัตราการเคลื่อนที่และระยะเวลา โดย
 แบ่งระดับการเคลื่อนที่ของอสุจิต่อปริมาณทั้งหมด 3 ระดับ ตามวิธีของ เกรียงศักดิ์ (2544) ดังนี้ คือ

เคลื่อนที่น้อย	ปริมาณอสุจิที่เคลื่อนที่	$0 > 30\%$
เคลื่อนที่ปานกลาง	ปริมาณอสุจิที่เคลื่อนที่	$30 > 60\%$
เคลื่อนที่ดี	ปริมาณอสุจิที่เคลื่อนที่	$60 > 100\%$

2. นับจำนวนอสุจิปลาบึกโดยใช้สไลด์นับเม็ดเลือด (Haemocytometer slide) โดยดูดน้ำเชื้อ
 มา 0.5 มิลลิลิตร เจือจางอสุจิโดยน้ำเกลือ 0.9% ให้ได้อัตรา 1:200 ในสไลด์นับเม็ดเลือด 1 ช่องเล็กมี

ปริมาตร เท่ากับ 0.0025×0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร นับ โดยนับในช่องเล็กทีละช่องจนครบ 16 ช่อง รวมเป็นอสุจิใน 1 ช่องใหญ่ และเมื่อนับจนครบ 5 ช่องใหญ่จึงนำไปคำนวณหาความเข้มข้นได้ดังนี้ (Aas *et al.*, 1991)

$$\text{จำนวนอสุจิ/ลูกบาศก์มิลลิเมตร} = \frac{\text{จำนวนที่นับได้} \times \text{อัตราเจือจาง}}$$

ปริมาตร

$$\text{ปริมาตร} = \text{พื้นที่} \times \text{ความลึก} \times \text{จำนวนช่องใหญ่ที่นับ}$$

$$= (0.2 \times 0.2) \times 0.1 \times 5$$

$$= 0.02 \text{ ลูกบาศก์มิลลิเมตร}$$

กำหนดให้ N = จำนวนอสุจิที่นับได้จาก 5 ช่องใหญ่

$$\text{จำนวนอสุจิ/ลูกบาศก์มิลลิเมตร} = \frac{N \times 200}{0.02}$$

$$= N \times 10,000$$

3. วัดความเข้มข้น (osmolality) ของน้ำเชื้อ extender และน้ำเชื้อกับ Extender ด้วยเครื่อง Osmometer (OSMOMAT 030, Gonotec Gm6H, Germany) ค่า osmolality มีหน่วยเป็น mOSM/Kg

4. การเก็บรักษาอสุจิแช่แข็งปลาบึก

ผสมอสุจิตปลาบึก กับ สารประกอบทั้ง 3 สูตร ในปริมาณ 2 ระดับคือ 1:1 และ 1:3 หลังจากนั้นนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เพื่อศึกษาอัตราการเคลื่อนที่ก่อนการแช่แข็งในรูปเม็ดโดยหยดลงบนน้ำแข็งแห้งที่เจาะหลุม หลุมละ 0.25 ซีซี นาน 5 นาที แล้วเก็บในถังไนโตรเจนเหลว 7 วัน (ตารางที่ 7.1)

ตารางที่ 7.1 สูตรสารประกอบ extender ที่ใช้เก็บรักษาอสุจิแช่แข็ง/น้ำกลั่น 100 ซีซี

	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
Glucose (mg)	540	540	540
Methanol (%)	-	-	8
DMSO (%)	10	8	-
ไข่แดง (%)	20	-	-

5. การผสม ทำการทดลองโดยวางแผนการทดลองแบบ Complete Random Design (CRD) ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 10 หน่วยทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ (replication) แล้วทำการผสมอสุจิแช่แข็งปลาบึก (รูปเม็ด) กับไข่ปลาสด (เนื่องจากช่วงที่ทำการทดลองมีปริมาณไข่ปลาบึกไม่เพียงพอ

สำหรับการทดลอง) โดยละลายอสุจิแช่แข็งปลาบึกรูปเม็ด ใน NaHCO_3 1%อุณหภูมิ 35°C ก่อนนำมาผสมกับไข่ โดยใช้อสุจิแช่แข็ง 3 เม็ด ต่อไข่ 1 กรัม การแบ่งหน่วยการทดลองมีดังนี้

หน่วยทดลองที่ 1 ใช้อสุจิสดปลาสด ผสมกับ ไข่ปลาสด

หน่วยทดลองที่ 2 ใช้อสุจิสดปลาบึก ผสมกับ ไข่ปลาสด

หน่วยทดลองที่ 3 สูตรที่ 1 (อสุจิ:extender 1:1) ผสมกับไข่ปลาสด

หน่วยทดลองที่ 4 สูตรที่ 1 (อสุจิ:extender 1:3) ผสมกับไข่ปลาสด

หน่วยทดลองที่ 5 สูตรที่ 2 (อสุจิ:extender 1:1) ผสมกับไข่ปลาสด

หน่วยทดลองที่ 6 สูตรที่ 2 (อสุจิ:extender 1:3) ผสมกับไข่ปลาสด

หน่วยทดลองที่ 7 สูตรที่ 3 (อสุจิ:extender 1:1) ผสมกับไข่ปลาสด

หน่วยทดลองที่ 8 สูตรที่ 3 (อสุจิ:extender 1:3) ผสมกับไข่ปลาสด

6. หาค่าอัตราการผสมซึ่งจะทำการนับไข่ดีไข่เสีย เมื่อไข่มีการพัฒนาถึงขั้นระยะที่เห็นจุดตา (eye stage) ซึ่งจะเห็นจุดตาสีดำด้วยตาเปล่าชัดเจน (เกรียงศักดิ์ 2537)

7. การตรวจการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแช่แข็ง และหาค่าจำนวนอสุจิใช้วิธีเดียวกันกับการทำในน้ำเชื้อสด

8. วิเคราะห์ความแปรปรวนอัตราการผสมตามวิธีการ Analysis of Variance (ANOVA) ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยที่ระดับ $P < 0.01$ และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของอัตราการผสมโดยใช้วิธีผลต่างน้อยที่สุด (Least Significant Difference : LSD)

ผลและวิจารณ์ผล

ระดับการเคลื่อนที่ (motility) ของอสุจิสดอยู่ในระดับค่อนข้างดี ส่วนน้ำเชื้อสดหลังจากผสมกับ extender ก่อนทำการแช่แข็งโดยเฉลี่ยอยู่ในระดับค่อนข้างปานกลางไปจนถึงดี อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิปลาบึกแช่แข็ง (รูปเม็ด) โดยในสูตรที่ 3 (1:1) มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิมากที่สุด (43.71 %) ส่วนในสูตรอื่นๆ มีอัตราการเคลื่อนที่ใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 7.2)

ตารางที่ 7.2 อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิปลาบึกแช่แข็ง (%)

อัตราเจือจาง	extender		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
1:1	31.95	41.56	43.71
1:3	37.19	36.29	37.83

จากตารางที่ 7.3 ปริมาณของอสุจิในแต่ละสูตร พบว่าอสุจิที่เก็บในสารละลายที่มีอัตราส่วน 1:1 มีปริมาณสูงกว่าในอัตรา 1:3 โดยในสูตรที่ 1 (1:1) และ ในสูตรที่ 2 (1:1) มีปริมาณอสุจิสูงเท่ากันคือ 2.38×10^6 และในอัตรา 1:3 สูตรที่ 1 มีปริมาณสูงกว่าสูตรอื่น คือ 7.00×10^5 ปริมาณของอสุจิสดปลาบึกมีค่าเท่ากับ 378.66×10^5 ตัว/ตารางมิลลิเมตร

ตารางที่ 7.3 ปริมาณของอสุจิแช่แข็งปลาบึก (ตัว/ลูกบาศก์มิลลิเมตร)

อัตราเจือจาง	extender		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
1:1	2.38×10^6	2.38×10^6	1.12×10^6
1:3	7.00×10^5	6.40×10^5	3.80×10^5

จากตารางที่ 7.4 ค่า osmolality พบว่าสารละลายสูตรที่ 3 ในอัตราระหว่างน้ำเชื่อมกับสารละลาย 1:3 มีค่า osmolality ใกล้เคียงกับน้ำเชื่อมสดปลาบึกมากที่สุด ส่วนในสารละลายสูตรอื่นๆ มีค่า osmolality โดยเมื่อเทียบกับน้ำเชื่อมสดปลาบึกแล้วยังมีค่าที่ค่อนข้างสูง ค่า osmolality ของอสุจิสดมีค่าเท่ากับ 216 mOSM/Kg ค่า osmolality ของ NaHCO_3 1 % และ น้ำเกลือ 0.9 % มีค่าเท่ากับ 157 mOSM/Kg และ 201 mOSM/Kg ตามลำดับ ส่วนของ extender และ ของสเปิร์มหลังจากผสมกับ Extender มีค่าดังตาราง

ตารางที่ 7.4 ค่า osmolality ของ extender และแต่ละอัตราส่วนก่อนแช่แข็ง (mOSM/Kg)

อัตราเจือจาง	Extender		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
Extender	1158	1299	286
1:1	891	806	246
1:3	1152	1015	304

จากตารางที่ 7.5 พบว่าในสารละลายสูตรที่ 1 และในสารละลายสูตรที่ 2 ในอัตรา 1:1 มีจำนวนตัวอสุจิน้อยมากที่สุด โดยเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื่อมสดมีจำนวนใกล้เคียงกัน ส่วนในสูตรอื่น ๆ และในอัตรา 1:3 มีจำนวนตัวอสุจิน้อยค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับน้ำเชื่อมสด

ตารางที่ 7.5 แสดงการนับจำนวนสเปิร์มหลังการแช่แข็ง

ซ้ำที่	น้ำเชื้อสดปลาบึก	จำนวนสเปิร์มที่นับได้ (ตัว) x 20,000 / mm ³					
		น้ำเชื้อ + extender 1		น้ำเชื้อ + extender 2		น้ำเชื้อ + extender 3	
		1:1	1:3	1:1	1:3	1:1	1:3
1	192	110	27	113	32	65	15
2	179	135	45	146	35	43	29
3	197	111	33	98	29	59	13
เฉลี่ย	189.33	118.66	35	119	32	56	19

จากตารางที่ 7.6 อัตราการผสมของอสุจิแช่แข็งรูปเม็ด กับไข่ปลาสวาย การผสมโดยใช้สารละลายในสูตรที่ 3 ในอัตรา 1:1 ให้อัตราการผสมสูงที่สุด 37.62 % รองลงมาคือสารละลายสูตรที่ 1 ในอัตรา 1:1 ให้อัตราการผสม 34.87 % ส่วนการใช้สารละลายสูตรอื่นๆ ได้อัตราการผสมค่อนข้างต่ำ

ตารางที่ 7.6 อัตราการผสมของอสุจิแช่แข็งปลาบึกรูปเม็ด กับไข่ปลาสวาย

ซ้ำที่	อัตราการผสม (ตัว)							
	ควบคุม		น้ำเชื้อ + extender 1		น้ำเชื้อ + extender 2		น้ำเชื้อ + extender 3	
	สวาย	บึก	1:1	1:3	1:1	1:3	1:1	1:3
	(tr 1)	(tr 2)	(tr 3)	(tr 4)	(tr 5)	(tr 6)	(tr 7)	(tr 8)
1	46	45	89	0	0	1	95	4
2	55	33	45	2	0	0	32	2
3	51	45	93	0	0	0	31	4
เฉลี่ย (ตัว)	50.67	40.67	75.66	0.67	0	0.33	52.67	3.33
อัตราผสม (%)	25.59	26.93	34.87	0.30	0	0.15	37.62	3.66

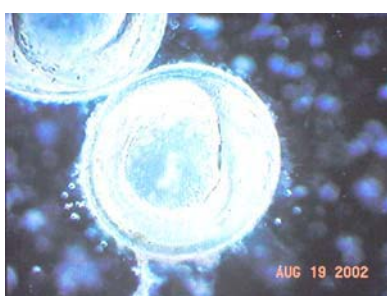
จากการที่อัตราการผสมของหน่วยทดลองในสูตรที่ 1 และสูตรที่ 3 ที่มี เมทานอลและไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เป็นสารป้องกันเซลล์ ในอัตราระหว่าง อสุจิ : extender เท่ากับ 1:1 ให้อัตราการผสมดีที่สุด มีค่าสูงกว่าหน่วยควบคุมซึ่งใช้น้ำเชื้อปลาบึกสด และน้ำเชื้อปลาสวายสด โดยอาจเนื่องจากคุณภาพของไข่ขณะรอทำการผสม การทดลองครั้งนี้ได้สุ่มทำการผสมในหน่วยทดลองก่อนหน่วยควบคุม ในการผสมในหน่วยทดลองที่ทดสอบอสุจิแช่แข็งต้องใช้เวลาค่อนข้าง

นานจึงจะเสร็จ อาจทำให้คุณภาพของไข่ที่รอผสมกับอสุจิสดมีคุณภาพลดลง ทำให้ในหน่วยควบคุมมีอัตราการผสมต่ำกว่าในหน่วยทดลองที่ใช้อสุจิแช่แข็ง จากการทดลองผสมเทียมระหว่างน้ำเชื้อปลาน้ำจืดแช่แข็ง กับไข่สดปลาทรายจากแม่น้ำโขงมีอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าหน่วยควบคุม ที่ใช้น้ำเชื้อสดผสมกับไข่ปลาทรายแต่ไม่แตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) (นิศาและกฤษณ์, 2538) จากตารางที่ 7.2 หลังจากการแช่แข็งอสุจิที่เก็บในสูตรที่ 1 อัตรา 1:1 ให้จำนวนอสุจิเคลื่อนที่สูงที่สุด ซึ่งตรงกับรายงานวุ้นน้ำยาที่มีส่วนผสมที่หาได้ง่ายเช่น นมผงหรือไข่แดง 15 % ผสมเมทานอล 5 % เทียบกับ DMSO หรือ กลีเซอรอล หลังจากการแช่แข็งพบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิตีกว่า (Harvey,1983) จากการรายงานของ Stoss and Holtz (1987) ศึกษาผลของ DMSO และระยะเวลา equilibration time ต่ออัตราการรอดของน้ำเชื้อแช่แข็งปลา rainbow trout (*Salmo gairdneri*) โดยใช้ระดับความเข้มข้นของ DMSO ที่ 5, 10, 15, 13.8, 15 และ 20 % equilibration time ที่ 0, 1, 2, 5 และ 60 นาที แล้วนำมาละลายทดสอบอัตราการผสมติด ที่ 10 % DMSO ให้อัตราการผสมติด เฉลี่ยสูงสุด (71 %) ในขณะที่ความเข้มข้นอื่น ๆ มีอัตราการผสมติดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 51.1 - 66.9 % ซึ่งจากเหตุผลนี้สอดคล้องกับการทดลอง คือที่ ระดับความเข้มข้น ของ DMSO 10 % มีอัตราการผสมสูงกว่าที่ DMSO 5 % และ 8 % จากการทดลองยังพบว่าน้ำเชื้อที่เก็บในสารละลายสูตรต่าง ๆ ในอัตรา 1:3 เมื่อนำไปทำการผสมแล้วได้อัตราการผสมต่ำในทุกสูตรการทดลอง ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากค่าความเข้มข้นที่มีค่าค่อนข้างสูงมากกว่าน้ำเชื้อสดและอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิหลังจากแช่แข็งและจำนวนที่ลดลง ในทุกสูตร (ตารางที่ 7.3-7.4)

อย่างไรก็ตามในสูตรที่ 2 ให้อัตราการผสมต่ำมากในทั้งสองอัตราส่วนทั้งนี้อาจเนื่องจากสูตรน้ำยาที่เหมาะสมกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปลาแต่ละชนิด ความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อและไข่ ความแปรปรวนเนื่องจากวิธีการ การรักษา ความเย็นขณะแช่แข็ง และการละลายอสุจิแช่แข็งขณะผสม เพราะสูตรน้ำยาแต่ละสูตรเหมาะสมกับปลาชนิดหนึ่งแต่อาจไม่เหมาะสมกับปลาอีกชนิดหนึ่ง (Species specificity) เช่น การศึกษาใช้สูตร Calcium free Hank's balanced salt Solution ซึ่งใช้ได้ดีในปลาน้ำจืด และ ปลาทราย แต่เมื่อนำมาใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคูกลอย พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็นศูนย์หลังจากเก็บรักษา 2-3 ชั่วโมง (นิศาและกฤษณ์, 2538)



รูปที่ 7.2 เก็บน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึก
ในถังไนโตรเจนเหลว



รูปที่ 7.3 ไข่ปลาระยะจุดตาจากน้ำเชื้อแช่แข็งปลาบึก

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. อัตราการเคลื่อนที่ (%) ของอสุจิหลังจากแช่แข็งในสารละลายสูตรที่ 3 ที่ประกอบด้วย glucose 540 mg และ methanol 8 % ในอัตราส่วนน้ำเชื้อกับสารละลาย 1:1 ให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยมากที่สุด และค่าความเข้มข้น osmolality (mOSMO/Kg) ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสดมากที่สุด ส่วนในสารละลายสูตรอื่นๆ มีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อสดค่อนข้างมาก
2. อัตราการผสมเฉลี่ย (%) ในสารละลายสูตรที่ 3 ในอัตรา 1:1 มีอัตราการผสมเฉลี่ยสูงสุด 37.62 % และในสารละลายสูตรที่ 1 ในอัตรา 1:1 ให้อัตราการผสม 34.87 % สูตรที่ 2 ที่มีอัตราการผสมต่ำสุด
3. ในการทดลองนี้การเก็บอสุจิแช่แข็งที่อัตรา 1:3 ให้ผลไม่ดีต่ออัตราการผสมในทุกสูตร

เอกสารอ้างอิง

- กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2535). ชีวิตวิทยาการแช่แข็ง. วารสารวิทยาศาสตร์ 10(2), 41-48.
- กฤษณ์ มงคลปัญญา และ ทศนีย์ ภูมิพัฒน์. (2535). การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. วารสารการประมง 45(6), 1111-1123.
- กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 128 หน้า
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. (2537). การเพาะขยายพันธุ์ปลาจากน้ำเชื้อแช่แข็งในสูตรต่าง ๆ กัน. วารสารการประมง 47(6), 509-516.
- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. (2544). การเพาะขยายและปรับปรุงพันธุ์ปลา. ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง, คณะผลิตกรรมการเกษตร, มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 169 หน้า.
- ทศนีย์ ภูมิพัฒน์และคณะ. (2529). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทพาและปลาบึก. เอกสารวิชาการ. กรมประมง ฉบับที่ 66.
- นิตา ไชยรักษ์ และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2538). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุย. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 33. 365 หน้า.
- ส่งศรี มหาสวัสดิ์. (2533). สรีรวิทยาของสัตว์น้ำ. ภาควิชาชีววิทยาประมง, คณะประมง, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 143 หน้า.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์. (2536). การพัฒนาการเพาะ-ขยายพันธุ์ปลาบึก. วารสารการประมง 46(5) 399-415.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์ และภาณุ เทวรัตน์มณีกุล. (2541). ชีวิตวิทยาการเพาะเลี้ยงปลาบึก. วารสารการประมง 51(11) 11-25.
- Aas, G.H., Rafstic, T. and Gjarde, B. (1991) Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. Aquaculture 95, 125-132.
- Harvey, B., 1983. Cryopreservation of *Sarotherodon masambicus* spermatozoa. Aquaculture. 32: 313-320.
- Stoss, J. and Holtz, W. (1987) Cryopreservation of Rainbow trout (*Salmo gairdneri*) Sperm. Effect of thawing solution, sperm density and interval between thawing and insemination. Aquaculture 22, 97-104.

ตารางสรุปผลการวิจัยทั้งหมด

ชื่อเรื่อง	สรุปผลการวิจัย
1. การศึกษาเบื้องต้นลักษณะโครโมโซมและโครโมโซมเพศจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของปลาบึก	ลักษณะโครโมโซมปลาบึกจากเซลล์เม็ดเลือดขาว ลักษณะโครโมโซมปลาบึกเป็นแบบเมตาเซนตริก 5 คู่, สับเมตาเซนตริก 13 คู่, สับทีโลเซนตริก 7 คู่ และอะโครเซนตริก 5 คู่ มีจำนวนโครโมโซม $2n=60$ ลักษณะโครโมโซมปลาบึกเหมือนกันทั้ง 3 กลุ่ม มีความเป็นไปได้ที่โครโมโซมเพศเมียเป็นแบบ XX ส่วนเพศผู้มีโครโมโซมแบบ XY
2. การวิเคราะห์อายุจากวงปีในกระดูกครีบทูปลาบึก	อายุปลาบึกจากกระดูกครีบทู ผลการศึกษาปลาบึกจากแม่น้ำโขงมีอายุประมาณ 22 ปี ปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อดินภาควิชาเทคโนโลยีการประมงจำนวน 6 ตัว เพื่อบำบัดสมบูรณ์เพศจำนวน 7 ตัวและแม่กวางอุดมธาราจำนวน 5 ตัว มีอายุ 8, 13 และ 6 ปี ตามลำดับ
3. การศึกษาความเข้มข้น การปลดปล่อยและความคงตัวของฮอร์โมนในน้ำมันถั่วเหลือง	ความเข้มข้นของฮอร์โมนโดยการวิเคราะห์ค่า retention time (RT) ของฮอร์โมนในน้ำมันถั่วเหลืองวัดด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) มีค่าดังนี้ estradiol 4.8 นาที testosterone 5.21 นาที domperidone 11.60 นาที buserelin หรือ GnRHa 15.50 นาที GnRHa สามารถปลดปล่อยได้ประมาณ 60% ที่เวลา 50 ชั่วโมง ในขณะที่ domperidone และ testosterone ปลดปล่อยได้ 1% ส่วน estradiol ได้ 0.01% ค่าความคงตัวของ GnRHa มีค่าต่ำที่สุด ฮอร์โมนที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C มีความคงตัวมากกว่าที่อุณหภูมิห้องและที่ 45°C
4. การใช้ฮอร์โมนแวนาลอยในน้ำมันถั่วเหลือง ต่อระดับฮอร์โมนเพศและการเจริญ	ระดับฮอร์โมนเพศและการเจริญพันธุ์ปลาสวายอายุ 1.5 ปี หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 150 วัน ใน

พันธุ์ปลาสวาย	ช่วงฤดูวางไข่ (มิถุนายน) ค่า GSI เพิ่มขึ้นจากหน่วยทดลองที่ฉีดด้วยน้ำมันถั่วเหลืองและฮอร์โมน GnRHa 100-300 µg/kg ผสม DOM 5-20 mg/kg มีค่า 13.9-14.5 และ 4.6-6.3% ในเพศเมีย และเพศผู้ตามลำดับ ปริมาณ T ระหว่าง 0.8-14.6 ng/ml และ E2 ระหว่าง 0.013-0.582 ng/ml ระดับฮอร์โมนดังกล่าวแตกต่างกับก่อนการฉีดฮอร์โมน เซลล์สืบพันธุ์ส่วนใหญ่พบระยะ spermatozoa เซลล์ไข่พบระยะไข่สุก หลังจากฉีดฮอร์โมน 187 วัน (กรกฎาคม) สามารถผสมเทียมปลาสวายได้จากทุกหน่วยทดลอง
5. ระดับฮอร์โมนเพศในรอบปี และผลการใช้ฮอร์โมนชนิดและรูปแบบต่างๆ ต่อการเจริญพันธุ์ปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อดิน	5.1 ฮอร์โมนเพศและการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ในรอบปี ปลาบึก ณ จรัลฟาร์ม อ.พาน จ. เชียงราย ปลาบึกอายุ 6 ปี (12 กก.) มีปริมาณน้อยมากในรอบปีวัด testosterone (T) ได้ 0.02 –0.04 ng/ml และ estradiol (E2) 0.01-0.04 ng/ml ในช่วงฤดูวางไข่ เดือน พ.ค.-ก.ค. ซึ่งแนวโน้มคล้ายกับปลาบึกอายุ 8 ปี (12 กก.) ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ซึ่งมีดัชนีความสมบูรณ์เพศเดือนพฤษภาคมสูงกว่าช่วงอื่น โดยเพศเมียมีค่า 0.36 % ส่วนเพศผู้มีค่า 0.05 % 5.2 การใช้ฮอร์โมนในน้ำมันถั่วเหลืองต่อการเจริญพันธุ์ ปลาบึกอายุ 7 ปี (14 กก.) ณ จรัลฟาร์ม หลังการฉีดน้ำมันถั่วเหลืองและฮอร์โมน GnRHa ผสม DOM นาน 60 วัน (มิถุนายน) วัดปริมาณฮอร์โมนเพศได้มากขึ้น เช่นเดียวกับปลาบึกอายุ 9 ปี (14 กก.) ณ ภาควิชาประมง และมีดัชนีการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์พัฒนาดีกว่าปลาที่ฉีดด้วย E2 หลังจากฉีดฮอร์โมน 82 วัน สามารถรัดไข่ได้แต่ไม่สมบูรณ์ ส่วนน้ำเชื้อสมบูรณ์ดี หลังจากฉีด 150 วัน

	และ 120 วัน ที่จรัลฟาร์มและที่ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง ปริมาณฮอร์โมนและ GSI ลดลง 5.3 การฉีดฮอร์โมนในน้ำมันถั่วเหลืองและแบบปกติต่อการเจริญพันธุ์ ปลาบิกจากจรัลฟาร์มอายุ 8 ปี น.น. 16 กก. หลังจากฉีด Soybean oil อย่างเดียว และที่ผสมฮอร์โมนในช่วงฤดูกาลวางไข่ ระดับฮอร์โมนเพศมีแนวโน้มมากขึ้นกว่าปลาอายุ 6 และ 7 ปี ในช่วงเวลาเดียวกัน และสามารถดูไข่ขนาดเล็กมากได้เล็กน้อยจากปลาที่ฉีดฮอร์โมน ส่วนปลาบิกอายุ 10 ปี (17 กก.) ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง หน่วยทดลองที่ฉีดด้วย GnRHa 50 $\mu\text{g/kg}$ ทุกสัปดาห์โดยลดปริมาณลงครึ่งหนึ่งในช่วงฤดูการวางไข่ หลังการฉีดครั้งที่หนึ่งนานหนึ่งสัปดาห์ (13 พฤษภาคม) ค่า T และ E2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในเพศผู้ T มีค่า 800 ng/ml และในเพศเมีย E2 มีค่า 3.20 ng/ml หลังจากการฉีดครั้งที่สองหนึ่งสัปดาห์ (21 พฤษภาคม) T มีแนวโน้มลดลงในเพศผู้ ส่วนค่า E2 เพิ่มขึ้นในเพศเมียมีค่า 7.27 ng/ml หลังจากฉีดฮอร์โมนครั้งที่สามหนึ่งสัปดาห์ (30 พฤษภาคม) ค่า T และ E2 เปลี่ยนแปลงไม่มาก และสามารถฉีดไข่และน้ำเชื้อได้จำนวนตัวมากที่สุด ความดกของไข่ปลาบิก/1 กรัม มีค่าเฉลี่ย 784 ฟอง อสุจิที่เจือจางด้วย 0.9% NaCl (1: 5) เก็บที่อุณหภูมิ 5 °C สามารถประสบความสำเร็จในการผสมเทียมกับไข่ปลาบิกอายุ 16 ปี (หนัก 54 กก.) ที่สถานีประมงน้ำจืด จ. พะเยา ได้ลูกปลา 600 ตัว และประสบความสำเร็จในการผสมเทียมที่มหาวิทยาลัยแม่โจ้ หลังจากฉีดด้วยฮอร์โมนครั้งที่สี่ นาน 75 วัน (26 กรกฎาคม) โดยใช้น้ำเชื้อสด
--	--

	และไข่จากปลาบึกอายุ 10 ปี น้ำหนัก 17 กก. ได้ไข่ หนัก 650 กรัม อัตราผสมระยะ แกสตุลา 10 % ได้เป็นตัว 11 ตัว
6. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบึกแช่แข็งแบบเม็ด	อัตราการเคลื่อนที่ (%) ของอสุจิหลังจากแช่แข็งใน สารละลายสูตรที่ 3 ที่ประกอบด้วย glucose 540 mg และ methanol 8 % ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ กับสารละลาย 1:1 ให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ เฉลี่ยมากที่สุด และค่าความเข้มข้น osmolality (mOSMO/Kg) ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสดมากที่สุด ส่วนในสารละลายสูตรอื่นๆ มีค่าสูงกว่าน้ำเชื้อสด ค่อนข้างมาก ในอัตรา 1:1 มีอัตราการผสมเฉลี่ย สูงสุด 37.62 % และในสารละลายสูตรที่ 1 อัตรา การผสม 34.87 % สูตรที่ 2 ที่มีอัตราการผสมต่ำสุด ในการทดลองนี้การเก็บอสุจิแช่แข็งที่อัตรา 1:3 ให้ ผลไม่ดีต่ออัตราการผสมในทุกสูตร

งานที่ควรพิจารณาทำต่อเนื่องจากโครงการ

1. การศึกษาอายุปลาบึกจากวงปีในกระดูกครีบทูปลาบึกในบ่อเลี้ยงที่มีอายุต่าง ๆ กัน หรือปลาบึกจากแหล่งน้ำ
2. การศึกษาลักษณะโครโมโซมเพศจากเซลล์เม็ดเลือดขาว ในปลาบึกจากบ่อเลี้ยงโดยใช้วิธีที่มีความละเอียดมากขึ้น
3. การทำเครื่องหมายทางพันธุกรรมจากพ่อแม่พันธุ์ปลาบึก อายุ และแหล่งเลี้ยงต่างๆ เพื่อการปรับปรุงพันธุ์และอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาบึกแท้และป้องกันการปนเปื้อนทางพันธุกรรม
4. ทิศทางงานวิจัยมุ่งสู่การสร้างแม่พันธุ์ปลาบึกโดยใช้ฮอร์โมนในรูปแบบ หรือชนิดที่เหมาะสมเพื่อเร่งการพัฒนาวัยวุฒิพันธุ์ (ฮอร์โมนสังเคราะห์หรือจากพืชสมุนไพร เช่น กวาวเครือขาว เป็นต้น) และเวลาที่เหมาะสมเพื่อการผลิตลูกปลาบึกเชิงพาณิชย์ ประกอบกับการให้อาหารตามธรรมชาติ เช่น สาหร่ายไค และสาหร่ายไฟ หรืออาหารสมทบ เช่น ระเบิดโปรตีน วิตามิน หรือกรดไขมัน
5. การศึกษาต้นทุนในการผลิตลูกปลาบึก และระบบการเลี้ยงเชิงพาณิชย์โดยรวมมือกับภาคเอกชน
6. การพัฒนาวิธีการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งและการตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลาบึก เพื่อการรักษาสายพันธุ์ปลาบึก การปรับปรุงพันธุ์ และความเป็นไปได้ในเชิงพาณิชย์ร่วมกับภาคเอกชน
7. ปลาบึกที่จะสามารถเป็นแม่พันธุ์ จากการเลี้ยงในบ่อดินยังต้องใช้เวลามากกว่า 11 ปี ในเชิงพาณิชย์และการอนุรักษ์ยังคงมีปัญหา ทำอย่างไรจึงลดเวลาให้น้อยลงพร้อมทั้งรักษาคุณภาพที่ดีของปลาบึกไว้ โดยการคัดเลือกพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ และความเป็นไปได้ด้านเชิงพาณิชย์
8. รักษาพ่อแม่พันธุ์ปลาบึกจากแหล่งน้ำธรรมชาติ ตลอดจนการศึกษาชีววิทยาของปลาบึก โดยเฉพาะจากแม่น้ำโขงไว้ เพื่อคุณภาพที่ดีของสายพันธุ์เดิมของปลาบึกให้คงอยู่ต่อไป

ภาคผนวก

1. เอกสารเผยแพร่

1.1 พิมพ์เอกสารเผยแพร่ และประชาสัมพันธ์ โครงการวิจัยปลาบึกฯ (สกว.) ในรูปแบบ
พับ จำนวน 1,100 ฉบับ

การศึกษาพ่อแม่พันธุ์ปลาบึกจากการเลี้ยงเพื่อการอนุรักษ์และพัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเชิง
พาณิชย์

A Study of the Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey) Brood Stocks Production
for Conservation and Commercial Aquaculture

เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน¹, อรัญญา มโนสร้อย², จิรเดช มโนสร้อย² และ จงกล พรหมยะ¹

1. ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ อ.สันทราย จ.

เชียงใหม่ โทร. 053-498178 e-mail : mengumpa@mju.ac.th

2. ภาควิชาเทคโนโลยีเกษตรกรรม คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

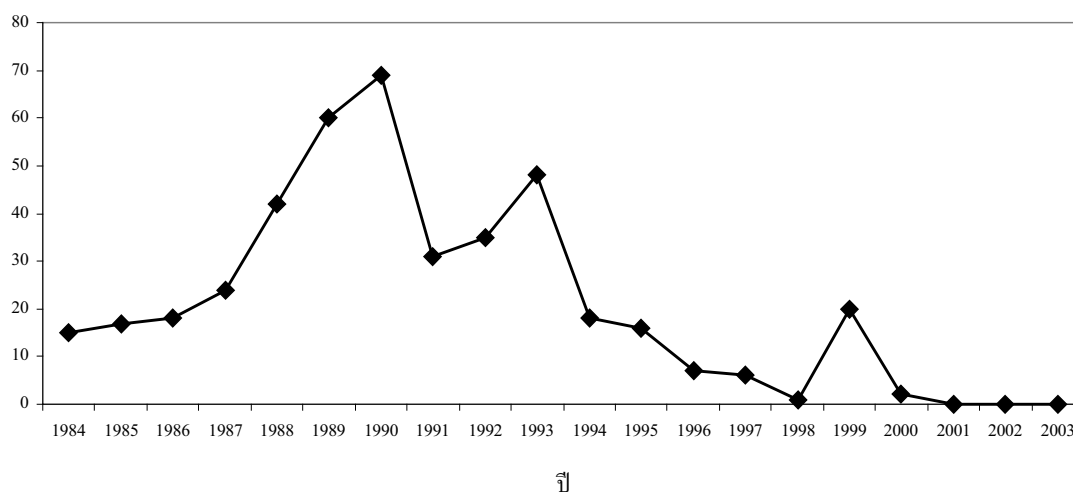
หลักการและเหตุผล

ปลาบึกเป็นปลาน้ำจืดไม่มีเกล็ดที่มีขนาดใหญ่และเจริญเติบโตได้ดีที่สุดในโลก ปลาบึกเป็นปลาที่มีความสำคัญต่อวิถีชีวิต และวัฒนธรรมของราษฎรลุ่มแม่น้ำโขง ตามอนุสัญญาว่าด้วยการอนุรักษ์พันธุ์พืชและสัตว์ป่า CONVENTIONAL ON INTERNATIONAL TRADE IN ENDANGERED SPECIES (CITES) OF WILD FAUNA AND FLORA กำหนดให้ปลาบึกเป็นปลาที่กำลังสูญพันธุ์ (Endanger Species) พ.ศ. 2530 มีการจับปลาบึกมากขึ้นเรื่อย ๆ ในประเทศไทยที่บ้านหาดไคร้ อ.เชียงของ จ.เชียงราย บริเวณดังกล่าวกรมประมงกำหนดให้เป็นบริเวณที่จับปลาบึกเพื่อผสมเทียม ซึ่งปี พ.ศ. 2533 สามารถจับปลาบึกได้มากที่สุด จำนวน 69 ตัว หลังจากทีปริมาณการจับลดลงเรื่อย ๆ ปี 2541 จับตัวผู้ได้เพียง 1 ตัว ล่าสุดปี 2544-2545 จับไม่ได้เลย (รูปที่ 1) และเพาะขยายพันธุ์ไม่ได้ ในอนาคตปลาบึกจะสูญพันธุ์ไปจากแม่น้ำโขงหากไม่มีการอนุรักษ์ไว้ ปลาบึกที่เพาะได้จากแม่น้ำโขงอีกส่วนหนึ่งนำไปปล่อยลงแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วประเทศ รวมทั้งแม่น้ำโขง และจำหน่ายให้เกษตรกรที่สนใจนำไปเลี้ยง สามารถเจริญเติบโตได้ดีในบ่อเลี้ยงและแหล่งน้ำธรรมชาติ แต่จะต้องใช้เวลากว่า 16 ปี จึงเจริญเป็นพ่อแม่พันธุ์ได้

โครงการวิจัยที่เสนอมานี้จะช่วยให้ทราบถึงระบบชีววิทยา การเจริญเติบโต อายุ ลักษณะเพศและโครโมโซม การพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ ระบบฮอร์โมนเพศตลอดจนการกระตุ้นให้ปลาบึกเข้าสู่ภาวะเจริญพันธุ์ ซึ่งผลการวิจัยดังกล่าวจะเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สำคัญต่อการอนุรักษ์

และการพัฒนาปลาบึกให้เป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจตลอดจนความเป็นไปได้ในการจัดตั้งศูนย์ศึกษาปลาบึกต่อไปในอนาคต

จำนวนปลาบึกที่จับได้ (ตัว)



รูปที่ 1 การจับปลาบึกขนาดพ่อแม่พันธุ์ที่ลดลงจากแม่น้ำโขง อ. เชียงของ จ. เชียงราย (ภยณัฏ, 2536 และ เกรียงศักดิ์, 2543)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ปลาบึก
2. เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยา เช่น การเจริญเติบโต อายุ โครโมโซม ระดับฮอร์โมนเพศ และการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในรอบปี
3. ศึกษาวิธีการเตรียมฮอร์โมนคุณสมบัติ รูปแบบ และการใช้ฮอร์โมนต่อการเจริญพันธุ์ปลาบึก

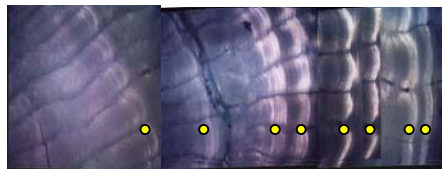
ผลที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบ hormonal profiles การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตในบ่อเลี้ยงหรือจากแหล่งน้ำ ผลการใช้ฮอร์โมนออกฤทธิ์เน้นในรูปแบบต่าง ๆ ต่อการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์
2. พัฒนาฮอร์โมนในรูปแบบยาเตรียมออกฤทธิ์เน้น วิธีการใช้การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์หรือเซลล์สืบพันธุ์ของปลาบึกในบ่อเลี้ยง หรือจากแหล่งน้ำ

- อธิบายความสัมพันธ์ของปริมาณฮอร์โมนต่อการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาบึก พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อหรือจากการจับจากธรรมชาติ
- ได้พ่อแม่พันธุ์จากการเลี้ยงที่สามารถผสมเทียมได้ เพื่อแก้ปัญหา การสูญเสียพันธุ์ และการขาดแคลนพันธุ์ปลาเพื่อการเพาะเลี้ยง ตลอดจนตั้งเป็นศูนย์วิชาการ เพื่อเผยแพร่ความรู้ และการเสนอผลงานวิจัยในวารสารและการประชุมวิชาการ

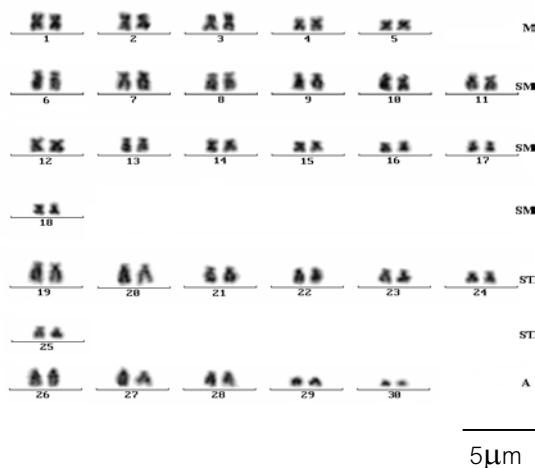
สรุปผลงานที่ได้

- สามารถศึกษาอายุ และการเจริญเติบโตจากกระดูกครีปลาบึกจากวงปี



รูปที่ 2 วงปีจากกระดูกครีปลาบึกจากบ่อเลี้ยงภาควิชา อายุ 8 ปี

- สามารถแยกลักษณะเพศภายนอกดูรูปร่างของส่วนหัว ลักษณะครีและอวัยวะเพศได้ เบื้องต้น และโครโมโซมปลาบึกแต่ละแหล่งได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาว



รูปที่ 3 ลักษณะโครโมโซมคาร์ิโอไทป์ ปลาบึกตัว $2n=60$

- การปลดปล่อยฮอร์โมนออกจาก soybean ในตัวรับฮอร์โมนที่เตรียม พบว่า estradiol และ testosterone มีการปลดปล่อยผ่าน membrane น้อยมาก เมื่อเทียบกับ buserelin ซึ่งสามารถปลดปล่อยได้ประมาณ 60% ที่เวลาประมาณ 50 ชั่วโมง และช่วงเวลาที่ปลดปล่อยอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม

- เปรียบเทียบผล hormone profiles ปลาบึก จากบ่อเลี้ยง ณ จรัลฟาร์ม อ.พาน จ.เชียงราย

ปริมาณฮอร์โมนเพศปลาบึกอายุ 6 ปี ส่วนใหญ่ยังมีปริมาณน้อยมาก ปริมาณ Testosterone (T) และ Estradiol (E_2) วัดได้เล็กน้อยในช่วงฤดูวางไข่ พ.ค- มิ.ย. ปลาบึกอายุ 7 ปี มิ.ย. หลังการฉีดตัวเหลืองและฮอร์โมน 2 เดือน ซึ่งเป็นเดือนที่เริ่มเข้าสู่ฤดูวางไข่ สามารถวัดปริมาณ E_2 ได้มากขึ้น ปลาบึกจากอายุ 8 ปี เฉลี่ย 16 กก. ปริมาณฮอร์โมนเพศมีแนวโน้มมากขึ้นกว่าปลาอายุ 7 ปี แต่ยังไม่พบการพัฒนาของไข่ และน้ำเชื้อ

5. ฮอร์โมนเพศปลาบึกอายุ 8-10 ปี (2543-2545)

ปริมาณฮอร์โมน Testosterone (T) และ Estradiol (E_2) ปลาบึกในช่วงก่อนฤดูวางไข่ (ม.ค.-เม.ย.) มีปริมาณ T และ E_2 น้อย และจะเพิ่มสูงขึ้น ฤดูวางไข่ (พ.ค - ก.ค.) และลดลงหลังฤดูวางไข่ (ส.ค.-ธ.ค.) ส่วนเพศผู้สามารถมีน้ำเชื้อได้ในปลาอายุ 9 ปี ปริมาณฮอร์โมน T และ E_2 ปลาบึก ที่มีอายุมากกว่าในช่วงเวลาที่ศึกษา (2543-2545) มีการพัฒนาการเจริญพันธุ์ และฮอร์โมนเพศดีกว่าปลาบึกที่อายุน้อยกว่า ปลาที่ฉีดน้ำมันตัวเหลืองในช่วงฤดูกลางวางไข่ มีแนวโน้มการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ และฮอร์โมนเพศดี และประสบความสำเร็จในการผสมเทียม จากปลาบึก อายุ 10 ปี น้ำหนัก 16 กก. ที่ฉีดด้วยฮอร์โมน



รูปที่ 4 รังไข่ปลาบึก



รูปที่ 5 ไข่



รูปที่ 6 การรีดน้ำเชื้อปลาบึก



รูปที่ 7 การผสมเทียมปลา



รูปที่ 8 ลูกปลาบึก



รูปที่ 9 ลูกปลาบึก อายุ 5 เดือน

1.2 เผยแพร่ข้อมูลงานวิจัยปลาบึก (สกว.) ด้วยระบบ E-learning/เกรียงศักดิ์ ใน

www.mju.ac.th

1.3 ออก TV รายการโลกสีน้ำเงิน ช่อง ITV รายการคนไทยวันนี้ ช่อง 3 และรายการคลื่นอนาคต ช่อง 5, รายการคนหวงแผ่นดิน ช่อง 11

1.4 ออกอากาศรายการวิทยุ แห่งประเทศไทย จส. 100 มก.เชียงใหม่ เสียงสามยอด และ อสมท. เชียงใหม่และห้องทุ่งท่าเลทอง AM 1143

1.5 ออกรายการทางสถานีวิทยุโทรทัศน์กองทัพบกช่อง 5 และ THAI GLOBAL NETWORK (TGN)

2. กิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการนำผลจากโครงการไปใช้ประโยชน์

2.1 การเพาะผสมเทียมปลาบึก ร่วมกับสถานีประมงน้ำจืด จ.พะเยา โดยนำน้ำเชื้อปลาบึกจากบ่อเลี้ยงภาควิชาเทคโนโลยีการประมง ไปผสมกับไข่ปลาบึก 2 ครั้ง ได้ลูกปลาบึก ประมาณ 600 ตัว เนื่องจากไข่ไม่สมบูรณ์

2.2 จัดนิทรรศการเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับโครงการฯ ในงานวันเกษตรแห่งชาติ ณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และงานวันเกษตรแม่โจ้ 23-26 ม.ค. 2546 มีผู้ให้ความสนใจจำนวนมาก

2.3 ผลิตภัณฑ์ระดับปริญญาตรี จากการทำปัญหาพิเศษ รวม 12 คน

2.4 แหล่งสาริตให้ความรู้การดูงานแก่ผู้สนใจ

2.5 ฝึกอบรมนักวิจัยจากประเทศเวียดนาม เรื่องการเพาะเลี้ยงและอนุรักษ์ปลาบึกในวันที่ 9-25 ม.ค. 2546

2.6 ให้ความร่วมมือโครงการวิจัยกับ Dr. Bart เรื่อง Cryogenic preservation of sperm from threatened Pangasiid catfishes in Thailand

2.7 ต้อนรับคณะบดึกณะ Bioresources มหาวิทยาลัย Mie ประเทศญี่ปุ่น มาดูงานปลาบึก

2.8 จัดฐานการเรียนรู้และถ่ายทอดเทคโนโลยีปลาบึก

2.9 ให้บริการวิเคราะห์ห้วงปีจากกระดูกครีบนูปลาบึก จากสถานีประมงน้ำจืดจังหวัดพะเยา และศูนย์ประมงน้ำจืดจังหวัดพิษณุโลก

2.10 บรรยายให้ความรู้และปฏิบัติการให้นักศึกษาปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และนักศึกษาปริญญาตรี สาขาการประมง วิทยาเขตสาร สนเทศพะเยา มหาวิทยาลัยนเรศวร

3. ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ กิจกรรมที่วางแผนไว้ และผลการดำเนินงานที่ได้รับ

วัตถุประสงค์	ผลที่คาดว่าจะได้รับ (ตามแผน)	สรุปผลการวิจัยที่ได้รับ
1. เพื่อศึกษาข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยา การเจริญเติบโต hormonal profiles และการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ ของพ่อแม่พันธุ์ปลาบึกในรอบปีในบ่อดิน	1. สามารถทราบ hormonal profiles การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ และการเจริญเติบโตในบ่อเลี้ยง	1. ลักษณะโครโมโซมปลาบึกจากเซลล์เม็ดเลือดขาว ลักษณะโครโมโซมปลาบึกเป็นแบบเมตาเซนตริก 5 คู่, สับเมตาเซนตริก 13 คู่, สับทีโลเซนตริก 7 คู่ และอะโครเซนตริก 5 คู่ มีจำนวนโครโมโซม 2n=60 ลักษณะโครโมโซมปลาบึกเหมือนกันทั้ง 3 กลุ่ม มีความเป็นไปได้อันที่โครโมโซมเพศมีเป็นแบบ XX ส่วนเพศผู้มีโครโมโซมแบบ XY
2. เพื่อศึกษาวิธีการเตรียม และคุณสมบัติของฮอร์โมนในในรูปแบบที่เหมาะสม เพื่อใช้กระตุ้นปลาบึกให้เจริญเติบโตและเข้าสู่ภาวะเจริญพันธุ์	2. สามารถพัฒนาฮอร์โมนในรูปแบบเตรียมออกฤทธิ์เน้น วิธืการใช้ต่อการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ หรือเซลล์สืบพันธุ์ของปลาบึกในบ่อเลี้ยง และจากแหล่งน้ำ	2. อายุปลาบึกจากกระดูกครีบหู ผลการศึกษาปลาบึกจากแม่น้ำโขงมีอายุประมาณ 22 ปี ปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อดินภาคอีสานได้มีการประมาณจำนวน 6 ตัว เพื่อบันทึกสมมูลจำนวน 7 ตัวและแม่กวางอุดมธารจำนวน 5 ตัว มีอายุ 8, 13 และ 6 ปี ตามลำดับ
3. เพื่อศึกษาผลของการใช้ฮอร์โมนในรูปแบบยาเตรียมต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต ฮอร์โมน และภาวะเจริญพันธุ์ของปลาบึก	3. สามารถอธิบายความสัมพันธ์ของปริมาณฮอร์โมนต่อการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาบึก พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในบ่อหรือจาก การจับจากธรรมชาติ การตีพิมพ์งานวิจัยในวารสารวิชาการ	3. ความเข้มข้นของฮอร์โมนโดยการวิเคราะห์ค่า retention time (RT) ของฮอร์โมน ในน้ำมันถั่วเหลืองวัดด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) มีค่าดังนี้ estradiol 4.8 นาที testosterone 5.21 นาที domperidone 11.60 นาที busserelin หรือ GnRHα 15.50 นาที GnRHα สามารถปลดปล่อยได้ประมาณ 60% ที่เวลา 50 ชั่วโมง ในขณะที่ domperidone และ testosterone ปลดปล่อยได้ 1% ส่วน estradiol 1 ได้ 0.01% ค่าความคงตัวของ GnRHα มีค่าต่ำที่สุด
	4. ได้พ่อแม่พันธุ์จากการเลี้ยงและสามารถผสมเทียมได้เพื่อการอนุรักษ์ ตลอดจนจัดตั้งศูนย์วิชาการเพื่อเผยแพร่องค์ความรู้	ฮอร์โมนที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C มีความคงตัวมากกว่าที่อุณหภูมิห้องและที่ 45 °C

		4. ระดับฮอร์โมนเพศและการเจริญพันธุ์ปลาอายุ 1.5 ปี หลังจากฉีดฮอร์โมน 150 วัน (มิถุนายน) ค่า GSI สูงสุดจากหน่วยทดลองที่ฉีดด้วย GnRH_a 100-300 $\mu\text{g/kg}$ ผสม DOM 5-20 mg/kg มีค่า 13.9-14.5 และ 4.6-6.3% ในเพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ ปริมาณ T ระหว่าง 0.8-14.6 ng/ml และ E2 ระหว่าง 0.01-0.58 ng/ml ระดับฮอร์โมนดังกล่าวแตกต่างกับการฉีดฮอร์โมนและหน่วยควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เซลล์สืบพันธุ์ส่วนใหญ่พบระยะ spermatozoa เซลล์ไข่พบระยะไข่สุก หลังจากฉีดฮอร์โมน 187 วัน (22 กรกฎาคม) ผสมเทียมปลาอายุได้ 1 ปี 1 เดือน ไนโตรเจนสูงสูงกว่าปลาที่ฉีดด้วยน้ำน้้นเกลืออย่างเดียว 5. ระดับฮอร์โมนเพศในรอบปี และผลการใช้ฮอร์โมนชนิดและรูปแบบต่างๆ ต่อการเจริญพันธุ์ปลาที่เลี้ยงในบ่อดิน 5.1 ณ จรัลฟาร์ม อ.พาน จ.เชียงราย ปริมาณฮอร์โมนเพศในรอบปี ปลาบึกอายุ 6 ปี (12 กก.) มีปริมาณน้อยมาก วัด testosterone (T) ได้ 0.02 ng/ml และ estradiol (E2) 0.04 ng/ml ช่วงก่อนฤดูวางไข่ เดือนมิถุนายน ปลาบึกอายุ 7 ปี (14 กก.) หลังการฉีด นาน 60 วัน (มิถุนายน 2544) วัด E2 ได้ 0.45 ng/ml มากกว่าที่ฉีดด้วยฮอร์โมน GnRH_a 300 $\mu\text{g/kg}$ ผสม DOM 20 mg/kg แต่ T มีแนวโน้มลดลง ปลาบึกอายุ 8 ปี (16 กก.) ที่ฉีดด้วยน้ำน้้นเกลืออย่างเดียว(หน่วยควบคุม)และที่ฉีดด้วยฮอร์โมน GnRH_a 300 $\mu\text{g/kg}$ ผสม DOM 20 mg/kg นาน 27 วัน (มิถุนายน 2545) ระดับฮอร์โมนเพศมีแนวโน้มมากขึ้นกว่าปลาอายุ 6 ปี และ 7 ปี แต่ยังไม่สามารถฉีดไข่และนำเชื้อได้
--	--	--

		5.2 ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ปลายบิกอายุ 8 ปี (12 กก.) T และ E2 มีปริมาณน้อยในรอบปี เริ่มวัดได้มากขึ้นในช่วงก่อนฤดูวางไข่ (พฤษภาคม-มิถุนายน) มีค่า T เท่ากับ 0.04-0.06 ng/ml และ E2 เท่ากับ 0.03-0.05 ng/ml ดัชนีความสัมพันธ์เพศเดือนพฤษภาคม เพศเมียมีค่า 0.36 % ส่วนเพศผู้มีค่า 0.05 % ในปลายบิกอายุ 9 ปี (14 กก.) หลังจากฉีดฮอร์โมน 60 วัน (มิถุนายน 2544) ก่อนการฉีดไข่และน้ำเชื้อ พบว่าปลาที่ฉีดด้วย GnRHa 300 µg/kg ผสม DOM 20 mg/kg มีระดับฮอร์โมนเพิ่มขึ้น โดย T มีค่า 210 ng/ml และ E2 มีค่า 0.35 ng/ml แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) กับก่อนฉีดฮอร์โมนและหน่วยควบคุม ค่าดัชนีการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ 9.01 % และ 2.05 % ในเพศเมียและเพศผู้ตามลำดับ และมีการพัฒนาดีกว่าหน่วยควบคุม ปลาที่ฉีดด้วย E2 ฉีดไข่และน้ำเชื้อที่สมบูรณ์ได้หลังจากฉีดฮอร์โมน 82 วัน แต่ไม่ประสบผลสำเร็จ ในการผสม ในปลายบิกอายุ 10 ปี ปลาที่ฉีดด้วย GnRHa 50 µg/kg ทุกสัปดาห์โดยลดปริมาณลงครึ่งหนึ่ง หลังการฉีดครั้งที่หนึ่งนานหนึ่งสัปดาห์ (13 พฤษภาคม 2545) ค่า T และ E2 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในเพศผู้ T มีค่า 800 ng/ml และในเพศเมีย E2 มีค่า 3.18 ng/ml และแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) กับก่อนฉีดฮอร์โมนและหน่วยควบคุม หลังจากการฉีดครั้งที่สองหนึ่งสัปดาห์ (21 พฤษภาคม 2545) T ลดลงในเพศผู้ ส่วนค่า E2 เพิ่มขึ้นในเพศเมียมีค่า 7.27 ng/ml หลังจากฉีดฮอร์โมนครั้งที่สามหนึ่งสัปดาห์ (30 พฤษภาคม 2545) ค่า T และ E2 เปลี่ยนแปลงไม่มาก สามารถฉีดไข่และน้ำเชื้อได้ และประสบ
--	--	--

		ความล้มเหลวในการผสมเทียมโดยใช้น้ำเชื้อปลาบึกอายุ 10 ปี ผสมกับไข่ปลาบึกอายุ 16 ปี (น้ำหนัก 54 กก.) ณ สถานีประมงน้ำจืด จ. พะเยา ได้ลูกปลาบึกประมาณ 600 ตัว และสามารถเจริญได้ทั้งหมด 650 กรัมจากปลาบึกอายุ 10 ปี น้ำหนัก 17 กก. ณ ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และผสมกันน้ำเชื้อปลาบึกหนัก 16 กก. ได้ลูกปลาบึกเป็นตัว 11 ตัว 6. อัตราการเคลื่อนไหว (%) ในหน่วยทดลองที่ประกอบด้วย glucose 540 mg และ methanol 8 % อัตราระหว่างน้ำเชื้อกับสารละลาย 1:1 อสุจิมีการเคลื่อนที่เฉลี่ยมากที่สุด 43.71 % มีค่าความเข้มข้น 280 mOSM/kg มีค่าใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด และมีอัตราการผสม (%) เฉลี่ยสูงสุด 37.62 % 7. สร้างศูนย์เพาะขยายพันธุ์พร้อมระบบน้ำบ่อและห้องปฏิบัติการ ฟันที่ ประมาณ 70 ม² 8. เสนอผลงานตีพิมพ์วารสารต่างประเทศ 4 เรื่อง 8.1 เรื่อง “Annual Sex Hormonal Profiles, Gonad Development and Age Determination of the Mekong Giant Catfish (<i>Pangasianodon gigas</i>, Chevey)” ตีพิมพ์ในวารสาร Aquaculture Research 8.2 เรื่อง “Chromosomal Karyotyping from Peripheral Blood Lymphocytes of the Mekong Giant Catfish (<i>Pangasianodon gigas</i>, Chevey)” ตีพิมพ์ในวารสาร Asian Fisheries Science 8.3 เรื่อง “Maturation Induction of <i>Pangasius hypophthalmus</i> Using
--	--	---

		Gonadotropin Releasing Hormone Analog (GnRHa) in Combination with Domperidone in Oil Suspension Dosage Forms” ตีพิมพ์ในวารสาร Asian Fisheries Science 8.4 เรื่อง “Effects of select Hormones in Oil Suspension on the Gonadal Development of the Mekong Giant Catfish (<i>Pangasianodon gigas</i>, Chevey)” ตีพิมพ์ในวารสาร Thai Journal of Agricultural Science 9. เสนอผลงานในประเทศไทย 4 เรื่อง 9.1 เรื่อง “ลักษณะโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาว ของปลาบึกจากแหล่งน้ำต่าง ๆ” ในการสัมมนาวิชาการเทคโนโลยีชีวภาพเภสัชกรรม ระหว่างวันที่ 27-29 มิ.ย 2544 9.2 เรื่อง Annual Development of Gonads, Sex Hormone Profiles and Age Determination of the Mekong Giant Catfish (<i>Pangasianodon gigas</i>, Chevey) in Ponds ในการสัมมนาวิชาการเทคโนโลยีชีวภาพเภสัชกรรม ระหว่างวันที่ 10-12 ก.ย 2545 9.3 เรื่อง “ปริมาณฮอร์โมนเพศ การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในรอบปี และอายุของปลาบึกในบ่อดิน ” ในการประชุมวิชาการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อมทางน้ำ เรื่อง การจัดการและการใช้ประโยชน์อย่างบูรณาการ ณ โรงแรมโกลด์สปางสวนแก้ว จ. เชียงใหม่ ระหว่างวันที่ 6-8 ธ.ค. 2544 9.4 เรื่อง “Effects of select Hormones in Oil Suspension on the
--	--	--

		Gonadal Development of the Mekong Giant Catfish (<i>Pangasianodon gigas</i>, Chevey)" ในการสัมมนาวิชาการ เทคโนโลยีชีวภาพเกษตรกรรม 10-13 ก.ย. 2546 10. เสนอผลงานวิชาการนานาชาติ 3 เรื่อง 10.1 เรื่อง "An annual development of gonads, sex hormone profile and age determination of the Mekong giant catfish (<i>Pangasianodon gigas</i>, Chevey) in ponds" ในการประชุม นานาชาติ The 6th Asian Fisheries Forum ณ เมือง Kaohsiung ประเทศไต้หวัน ระหว่างวันที่ 25-30 พ.ย. 2544 10.2 เรื่อง "Aquaculture Management in Thailand" ใน โครงการ SEM-22-01: Seminar on Aquaculture Management ขององค์การเพิ่มผลผลิตแห่งเอเชีย (Asian Productivity Organization - APO) ณ เมือง Kaohsiung ประเทศไต้หวัน ระหว่างวันที่ 3-8 ธ.ค. 2544 10.3 เรื่อง "Effects of Gonadotropin Releasing Hormone Analog (GnRHa) in Oil Suspension on Sexual Development of the Mekong Giant Catfish (<i>Pangasianodon gigas</i>, Chevey)" ในการประชุมสัมมนาวิชาการ Bio Thailand 2003 ณ ศูนย์พืช พักยา จ.ชลบุรี ระหว่างวันที่ 17-20 ก.ค. 2546
--	--	---

4. ผลพลอยได้และปัญหาอุปสรรค

ผลพลอยได้	ปัญหาและอุปสรรค
1. สามารถวิเคราะห์ห่วงโซาการกระตุกคริบพู 2. การศึกษาลักษณะโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาว 3. การเจริญพันธุ์และระดับฮอร์โมนเพศลาสาวยในบ่อดิน 4. วิธีการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งตลอดจนแนวทางในการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลาบึก 5. น้ำเชื้อไปผสมกับแม่พันธุ์จากสถานีประมง จ.พะเยา และศูนย์วิจัยประมงน้ำจืด จ.เชียงใหม่ และสามารถได้ลูกปลาบึกประมาณ 600 ตัว 6. เผยแพร่ข้อมูลงานวิจัยปลาบึก (สกว.) ด้วยระบบ E-learning/กรีนนิ่งศักดิ์ใน www.mju.ac.th 7. ออกอากาศทางโทรทัศน์รายการโลกสีน้ำเงิน ช่อง 3, รายการคลื่นอนาคต ช่อง 5, และรายการคนหวงแผ่นดิน ช่อง 11 8. ออกอากาศรายการวิทยุแห่งประเทศไทย, จส. 100, มก.เชียงใหม่, เสียงสามยอด และ อสมท. เชียงใหม่ และท้องทุ่งท่าเลทอง AM 1143 9. จัดนิทรรศการเผยแพร่ข้อมูลเกี่ยวกับโครงการฯ ในงานวันเกษตรแห่งชาติ ณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ และงานวันเกษตรแม่โจ้ ณ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ 10. คืออบรมนักวิจัยจากประเทศเวียดนาม เรื่องการเพาะเลี้ยงและอนุรักษปลาบึก ระหว่าง วันที่ 9-25 ม.ค. 2546 11. ผลิตุคณูญ์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ ณ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 1 คน; บัณฑิตระดับปริญญาตรี จากการทำปัญหาพิเศษ จำนวน 12 คน 12. สร้างศูนย์ปฏิบัติการเรียนการสอน ด้านการเพาะเลี้ยงและปรับปรุงพันธุ์ ปฏิบัติงานฟาร์ม และคณะสัตวแพทย์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ 13. ให้ความอนุเคราะห์ไปปลาบึกแก่นักศึกษาปริญญาโท สาขาการประมงในการวิจัยเรื่องการเลี้ยงไปปลาบึกให้สมบูรณ์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ของ ดร.จิราพร โรจนทินกร 14. สามารถเพาะผสมเทียมปลาบึก อายุ 12 ปี ได้ลูกปลาบึก ขนาด 1 นิ้ว จำนวน 2,500 ตัว ตั้งเพิ่มจากปี 2546 15. มีเอกชนอย่างน้อย 2 ราย สนใจที่จะเพาะเลี้ยงปลาบึกอย่างเป็นระบบ	11. ปลาบึกจากแหล่งธรรมชาติในช่วง 2-3 ปีที่ผ่านมา จับไม่ได้เลย และต้องใช้เวลานานในการที่จะสามารถสร้างให้เจริญพันธุ์เนื่องจากสภาพแวดล้อมใหม่ 1. ปริมาณงานที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากทำการศึกษาในเรื่องของปลาสาวยโครโมโซมจากเม็ดเลือดขาว และการวิเคราะห์ห่วงโซาการกระตุกคริบพู เพิ่มเติมจากแผนการวิจัยเดิม 2. ไปปลาที่ผสมเทียมได้จากแม่พันธุ์ปลาบึกที่เลี้ยงในบ่อ ยังไม่สมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องจากอายุยังน้อย 3. จำนวนปลาที่เป็นพ่อแม่พันธุ์ใช้ทดลองมีจำนวนจำกัด ทำให้การวิเคราะห์ผลทางสถิติทำได้ไม่สมบูรณ์

5. บทความวิจัยตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

5.1 Aquaculture Research

Annual Sex Hormonal Profiles, Gonad Development and Age Determination of the Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey)

A. Manosroi^{1*}, K. Meng-Umphan² and J. Manosroi¹

¹Faculty of Pharmacy / Pharmaceutical Cosmetic Raw Materials and Natural Products Research and Development Center (PCRNC), Institute for Science and Technology Research and Development (IST), Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand; Tel. 66-53-944338; Fax. 66-53-894169; E-mail: pmpti005@chiangmai.ac.th

²Department of Fisheries Technology, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Chiang Mai 50290, Thailand; Tel./Fax. 66-53-498178; E-mail: mengumpa@mju.ac.th

***Correspondence:** Faculty of Pharmacy / Pharmaceutical Cosmetic Raw Materials and Natural Products Research and Development Center (PCRNC), Institute for Science and Technology Research and Development (IST), Chiang Mai University. Chiang Mai 50200, Thailand; Tel. 66-53-944338; Fax. 66-53-894169; E-mail: pmpti005@chiangmai.ac.th

Running title : Reproductive study of the Mekong giant catfish

Keywords: Mekong giant catfish, gonad development, sex hormonal profile, age determination

Abstract

Annual sex hormonal profiles, gonad development and age determination of 18 (13-14 kg BW) and 3 (145-226 kg BW) Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey) reared in earthen ponds in Chiang Mai and from the Mekong River in Chiang Rai, Thailand, respectively, were investigated. The hormonal profiles were determined from blood samples of the fish by electrochemiluminescence immunoassay during May to August in 2000. The highest testosterone (T) levels of 0.06 ngml⁻¹ in both sex and the highest estradiol (E₂) of 47.8 and 14.23 pgml⁻¹ in females and males, respectively, were observed in May. The gonadosomatic index was found to be 0.07 for males and 0.38 for females from ponds in comparing to 2.27 for males and 8.29, 11.09 for females from the Mekong River. Higher development stages of spermatocytes and oocytes of the cultured fish in May than in February and November was demonstrated. No mature germ cells were obtained from either the males or females indicating no sexual maturity. The average age of fish was determined from the annual rings of the cross section of the pectoral fins by a stereomicroscope. The average age of fish in earthen pond determined from the annual ring was 8 years old, which agreed with the actual culture records, while those from the Mekong River were 21 years old. This information will be beneficial for the breeding programs and conservation of the Mekong giant catfish.

Introduction

The Mekong giant catfish (*Pangasianodon gigas*, MGC), the largest and fastest growing fresh water catfish in the world (Phonprasit & Thevarat 1998), is an endangered species according to the Convention on International Trade in Endangered Species (CITES) of Wild Fauna and Flora. Referring to the annual catch numbers of this fish in the Mekong River at Chiang Kong District in Chiang Rai Province during 1986 to 2001, the maximum catch of 65 fish was reported in 1990. In 2000 and 2001, the annual catch declined to 2 and 0. These figures indicated the endangered situation of this fish. MGC can be cultivated both in earthen ponds and reservoirs. Its growth rate can reach 3 to 10 kg per year both in ponds and reservoirs. However, it takes between 10 to 16 years for the fish to reach sexual maturity in captivity (Meng-Umphun 2000).

In order to conserve this fish, several approaches have been attempted including the induction of maturation by hormone injection. To understand the endocrine control of reproduction in fish, the gonadosomatic index (GSI) is commonly used to assess the seasonal development of gonads (Vlaming, Grossman & Chapman 1982). Some steroid hormones have been known to be involved in the regulation of fish development. 17 β - Estradiol (E₂) has been implicated in vitellogenic growth, while 17 α , 20 β -dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) was used to stimulate gonadotropin secretion (Stacey, Cardwell, Lile, Scott & Sorenson 1994). Testosterone (T) was reported to provide the substrate pool for E₂ production in chum salmon, *Oncorhynchus keta* (Nagahama 1987). In goldfish (*Carassius auratus*, Linn),

T is required for the release of pituitary gonadotropin (Kobayashi & Stacey 1990). During oocyte development, estradiol plays an important role in vitellogenesis of females which is directly related to GSI (Aida, Korse, Yokote & Hibiya 1973; Sundararaj & Nath 1981; Tyler, Sumpter, Kawauchi & Swanson 1991). Seasonal profiles of the gonadal steroid testosterone and 17β - estradiol reflect the annual changes in sexual activity of female *Heterobranchus longifilis* in tropical pond culture, exhibiting maximum values during the breeding seasons of each group and being lowest during resting periods (Freund, Horstgen-Schwark & Hoitz 1990).

The age and growth rate of MGC, can be determined from the annual ring of the cross sections of scales, otoliths, vertebrae, and spines. The age of the 133 kg fish in the Mekong River was reported to be 26 years old, determined from otoliths (Mackay, Ash & Norris 1990). The annual sex hormonal profile, gonad development and age determination from pectoral fin have never been performed.

This present study investigated the annual hormonal profiles, the gonadosomatic index (GSI), germ cell development and seasonal changes on sex hormonal profiles by measuring GSI, germ cell development as well as the ages and growth rate of the male and female MGC from both those fish reared in earthen ponds and those caught from the Mekong River. This information is necessary to determine the onset of spawning activity for an induction of maturation by synthetic hormones and for age determination of the MGC.

Materials and Methods

Fish samples

The study was conducted during the period of January to December 2000. Two groups of *P. gigas* were used. The first group consisted of nine males and nine females (8 years old and with an average weight of 13.33 kg and 14.25 kg, respectively). They were marked by injecting Alcian blue dye solution on different parts of the fish and reared in a 1,400 m² pond at the Department of Fisheries Technology, Maejo University in Chiang Mai province, Thailand. Sex determination was done by physical examination and confirmed by biopsy of ovary and testis. Feed prepared at Maejo University containing 20 % protein (8.15 % fishmeal, 4.9 % soybean, 4 % rice bran and 3 % broken rice) was given at the rate of 2 % of body weight per day. Every month, all fish were weighed to determine growth rate and blood samples were withdrawn for hormonal profile analysis.

The second group was comprised of three mature fish with an average age of 22 years old (one male weighed 145 kg and two female weighed 205 and 247 kg) caught from the Mekong River in Chiang Rai, Thailand.

Hormone analysis

Six male and six female fish from ponds during January to December 2000, and one male and two female captured from the Mekong River in 2000 were used. One milliliter of blood was taken from the caudal vein of each fish. Fifty microliters of the blood serum were used to determine estradiol (E₂) and testosterone (T) concentration using an electrochemiluminescence immunoassay analyzer (Elecsys1010, Roche, Germany). Polyclonal and monoclonal antibodies from rabbit and mouse, specifically directed against 17 β - estradiol and testosterone, were used for estradiol and testosterone assay.

Gonadosomatic index (GSI)

Three male and three female fish, aged 8 years were reared in ponds and captured in February, May and November 2000, and three mature fish, aged 23 years from the Mekong River, were used to determine the average gonadosomatic index (GSI) of ovaries and testis according to the following equation:

$$\text{GSI} = \frac{\text{gonads weight (kg)} \times 100}{\text{body weight (kg)}}$$

Gonad histology

In February, May and November, ovary and testis samples taken from three females and three males reared in a pond, were fixed in 10% formalin, hydrated and embedded in parafin. The 6 μ m thick sections were stained with haematoxylin and eosin. The stages of oocytes and spermatocytes from the middle part of ovary and testis were determined and counted under a microscope at the magnification of 100X and 400X, respectively. Spermatocytes were examined and evaluated according to the 4 stages modified from Bilard (1986) as follows:

- Stage 1 Spermatogonia (cell diameter 0.01-0.02 mm.)
- Stage 2 Spermatocyte (cell diameter less than 0.01-0.02 mm)
- Stage 3 Spermatid (small cell in group, no tail)
- Stage 4 Spermatozoa (small cell with tail in vas deference)

Oocytes were examined and evaluated according to the 4 stages from Prat, Zanuy, Carrillo, De Mones & Fostier (1990) as follow:

- Stage 1 Central germinal vesicle
- Stage 2 Migrating germinal vesicle
- Stage 3 Peripheral germinal vesicle
- Stage 4 Maturation (germinal vesicle breakdown)

Age determination

Annual rings were counted from cross sections on both sides of the pectoral spines from three males and three females reared in an earthen pond and three fish from the Mekong River using a stereomicroscope.

Data and statistical analysis

Body weight, estradiol and testosterone blood concentrations, GSI and age of the fish are presented as mean $\pm$ standard error. Numbers of oocytes and spermatocytes in each stage on pre-spawning (February), spawning (May) and post spawning (November) were compared.

Results

Growth and hormonal profiles

A final average weight of 15.30 ± 0.28 kg and 15.78 ± 0.35 kg was recorded for males and females reared in earthen ponds, respectively. The growth of the fish decreased during winter (November to January). The growth of both male and female fish appeared to have the same profile as shown in Fig. 1. Serum concentrations of testosterone (T) and estradiol (E_2) of male and female fish were detectable from April to June. Male and female fish had the highest T level in May of 0.06 ± 0.05 and 0.06 ± 0.04 ngml⁻¹, respectively. Similarly, the highest E_2 levels in male and female fish were also observed in May at 14.23 ± 4.23 and 47.23 ± 37.28 pgml⁻¹, respectively (Fig. 2 and 3). During January to March, and August to December 2000, T and E_2 levels were below detectable limits (≤ 0.02 ngml⁻¹ and ≤ 10 pgml⁻¹, respectively).

Gonadosomatic index (GSI), age determination and gonad histology.

Table 1 and 2 demonstrated GSI, age and gonad histology of MGC caught from the Mekong River and reared in ponds. In Table 1, the GSI of a 145 kg MGC male from the Mekong River was 2.21, while 8.29 and 11.09 were observed in 205 and 247 kg female fish. Testosterone and estradiol in blood of female fish weighing 247 kg 4 day after capture were 0.07 ngml⁻¹ and 123 pgml⁻¹. The ages of one MGC male and two females from the Mekong River were 19, 24 and 22 year olds, respectively. In Table 2, the average age of three male and three females MGC from ponds was 8 years. Fig. 4 shows the age determination from pectoral fins of a fish from the Mekong River (a) and a fish from pond (b). In the case of fish reared in earthen ponds, the age is correlated to the actual recorded age. The average GSI of

MGC in earthen pond was 0.05 and 0.36 ± 0.05 in male and female fish, respectively. In May, the highest GSI of 0.08 and 0.48 in male and female fish were detected. Testosterone and estradiol could not be detected in February and November. The number of spermatocyte and oocyte in May were higher than in February and November. Two stages of spermatocytes were observed (Fig 5), while three stages were seen in oocytes (Fig6). More developed stages of spermatocyte and oocyte were found in May.

Discussion

In determining the hormonal profiles of six male and six female MGC, 8 years old, reared in ponds during January and December in 2000, the highest T and E₂ level was found in May for both sexes. T and E₂ levels observed in the serum of MGC reared in pond in this study were very low since the fish were still immature (only 8 years old). In comparing to the natural mature fish, such as *Pangasius Hytopthamus* (only 2 years old), their T and E₂ levels in serum in September were found to be 8.6 to 14 ngml⁻¹ and 30.6 to 43.2 pgml⁻¹ in males 5.3 to 10.9 ngml⁻¹ and 611 to 1,423 pgml⁻¹ in females. For a 2-3 years old *Clarias macrocephalus* (Gunther), the T level had the highest level from July to September (54 and 56 ngml⁻¹), whereas the E₂ level had the highest level on December of 20 ngml⁻¹ (Tan-Fermin, Ijiri, Ueda, Adachi & Yamauchi 1997). Moreover, the spawning season of salmonid fishes was found to be in June to September due to E₂ levels that increased sharply during the pre-spawning season. The E₂ level coincided with the serum vitellogenin levels. This provided strong evidence that E₂ is responsible for the synthesis of vitellogenin. But, they are followed by a sharp drop during the spawning season (Ueda & Yamauchi, 1995). In our study, the T and E₂ levels of a 247 kg female MGC 4 days after it was caught from the Mekong river were 0.07 ngml⁻¹ and 123 pgml⁻¹, respectively. The lower T and E₂ level of MGC may have been due to stress. Normally, the T levels in fish plasma were almost the same as the E₂ level (Haddy & Pankhurst 2000).

The GSI of the one male (149 kg) and the two mature female (205 and 145 kg) MGC from the Mekong River and of the three males and three females MGC of eight year old reared in earthen pond were observed in May. These GSI values were similar to GSI values of the previous studies on 190 kg male and female MGC from the Mekong river in May which were 2.21 and 8.7, respectively. For an immature male (6.67 kg) and female (5.27 kg) MGC reared in earthen pond, their GSI values were only 0.02 and 0.1 %, respectively (Mongkhonpunya 1993). GSI values during the spawning season (September) of a two year old *P. hytopthamus* were 9 and 29 in males and females, respectively.

More development of spermatocytes and oocytes of the eight year old MGC reared in earthen pond was observed in May (spawning season). In fact, information may be of limited value of sample at each month and it appeared to be no valid way of determining if the difference that are presented are due to the variation among animals or due to seasonal effects. However, these fish were from the same broodstock and were reared in the same conditions at the same locations and same period. Therefore,

the effects obtained from this study may be concluded to be due to the seasoning effects more than the variation of the animals themselves. Our result was similar to the previous study that the ovaries of MGC at three years old have oviparous lamellae composing of oogonia and oocytes (Narkong 1994). But, ovaries of these mature female MGC from the Mekong River in May were composed of oogonia, oocytes, vitellogenesis and egg maturation stage. The testis of these mature male MGC in May contained spermatogonia, spermatocytes, spermatids, and spermatozoa. Another study demonstrated that the two year old female *Clarias macrocephalus* in captive had a group synchronous pattern of ovarian development, as indicated by the presence of oocytes at all stages of development throughout the annual cycle and more oocytes development was found between May to June (Tan-Fermin *et al.* 1997)

The average age of the MGC reared in earthen ponds was 8 years compared to the mature catfish from the Mekong River which had the ages of 19, 24 and 22 years for one male and two females, respectively. The width between the annual ring of the pectoral fin can be used to estimate the growth rate of MGC. The annual ring of the MGC reared in earthen ponds during the period of the first to the third year was wider than the annual ring during the period of the fourth to the eighth year, indicating that the MGC during the first three years grew faster than during the next four years. Determination of the age of the fish from the annual ring is more advantageous than from the otolith because the former is a non invasive method. In comparing the hormonal profile and GSI of the MGC caught from the Mekong River with those reared in earthen ponds, MGC reared in ponds were still immature.

From the data of reproductive parameters and hormone levels of the MGC from earthen pond during January to April, May to August and September to December, they corresponded to the preparatory, spawning and post-spawning period, respectively. This study provided basic information on the annual sex hormonal profiles, gonad and germ cell development and age determination of MGC. This information will be beneficial for the conservation and breeding program of this fish.

Acknowledgements

The authors thank the Thailand Research Fund (TRF) and the National Science and Technology Development Agency (NSTDA) of Thailand for the financial support, Assoc. Prof. Dr. P. Jarayabhand, Dr. A. Termvidchakorn, Dr. S. Ngamwongchon and Mr. R. Khattiya for their valuable suggestions and help.

References

- Aida, K., Korose K., Yokote M., and Hibiya J. (1973) Physiological studies on gonadal maturation of fishes II. Histological changes in the liver cells following gonadal maturation and estrogen administration. *Bulletin Japan Society Science Fish* **39**, 1109-1115.

- Billard, R. (1986) Spermatogenesis and spermatology of some teleostfish species. *Reproductive Natural Development* **26**(4), 877-920.
- Freund, F., Horstgen-Schwark G., & Holtz W. (1990) Seasonality of the reproductive cycle of female *Heterobranchus longigilis* in tropical pond culture. Institute of animal husbandry and genetics, University of Gottingen, Gottingen. 17 p.
- Haddy, J.A, & Pankhurst N.W. (2000) The efficacy of exogenous hormones in stimulating changes in plasma steroids and ovulation in wild black bream *Acanthopagrus butcheri* is improved by treatment at capture. *Aquaculture* **191**, 351-366.
- Kobayashi, M., & Stacey N. (1990) Effects of ovariectomy and steroid hormone implantation on serum gonadotropin levels in female goldfish. *Zoology Science* **7**, 715-721.
- Mackay, W. C., Ash, G.R., & Norris H.J. (1990) Fish Aging Methods for Alberta. In Association. with Alberta Fish and Wildlife Division. and University of Alberta, Environmental Services Ltd., Edmonton. 113 p.
- Meng-Umphun, K. (2000) Plabuk (Thai). Department of Fisheries Technology, Maejo University, Chiang Mai. 125 p.
- Mongkhonpunya, K. (1993) Cryogenic Preservation of Fish Semen. Department of Science, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok. 128 p .
- Nagahama, Y. (1987). Gonadotropin action on gametogenesis and steroidogenesis in teleost gonads. *Zoology Science* **4**, 209-222.
- Narkong, N. (1994) The Anatomy of Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey). Master Thesis, Kasetsart University, Bangkok. 124 p.
- Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., De Mones, A., & Fostier, A. (1990) Seasonal changes in plasma levels of gonadal steroids of sea bass, *Dicentrarchus labrax* L. *General Comparative Endocrinology* **78**, 361-373.
- Phonprasit S., & Thevarat P. (1998) The Mekong giant catfish biology and breeding. *Thai Fisheries Gazette* **51**(2): 107-115.
- Stacey, N., Cardwell J.R., Liley N.R., . Scott A.P., & Sorenson P.W. (1994) Hormones as sex pheromones in fish in Perspectives in Comparative Endocrinology (ed. by K.G Davey., R.E., Peter & S.S Tobe), 438-448. National Research Council of Canada, Ottawa.
- Sundararaj, B.I., & Nath P. (1981) Steroid-induced synthesis of vitellogenin in the catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *General Comparative Endocrinology* **43**, 201-210.
- Tan-Fermin, J. D., Ijiri S, Ueda H., Adachi S., & Yamauchi K. (1997) Ovarian development and serum steroid hormone profiles in hatchery-bred female catfish *Clarias macrocephalus* (Gunther) during an annual reproductive cycle. *Fisheries Science* **63**:6, 867-872.
- Tyler, C.R., Sumpter J.P., Kawauchi H., & Swanson P. (1991) Involvement of gonadotropin in the uptake of vitellogenin into vitellogenic oocytes of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General Comparative Endocrinology* **84**, 291-299.
- Vlaming, V. de, Grossman G., & Chapman F. (1982) On the use of the gonadosomatic index. *Comparative Biochemistry Physiology* **73 A**, 31-39.

Ueda, H., Yamauchi, K. (1995) Biochemistry of fish migration. In: Biochemistry and Molecular Biology of Fishes (ed. by P.W. Hochachka & T.P. Mommsen), 265-279. Molecular Biology Frontiers 5, Elsevier, Amsterdam.

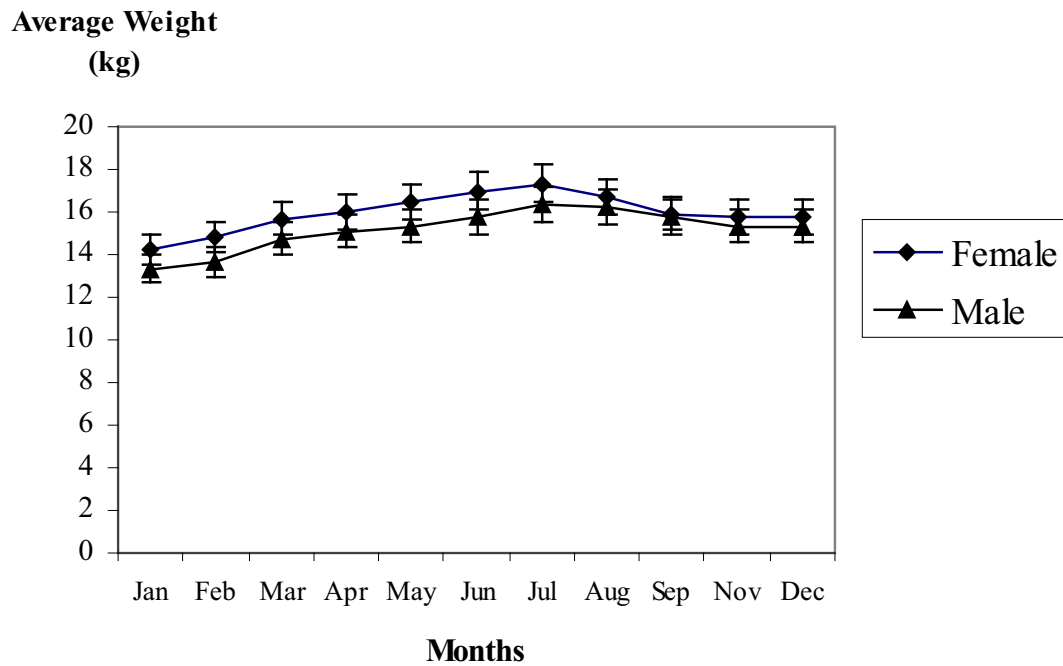


Figure 1 Comparison of growth curve of female and male MGC (aged 8 years old) reared in ponds during January to December 2000.

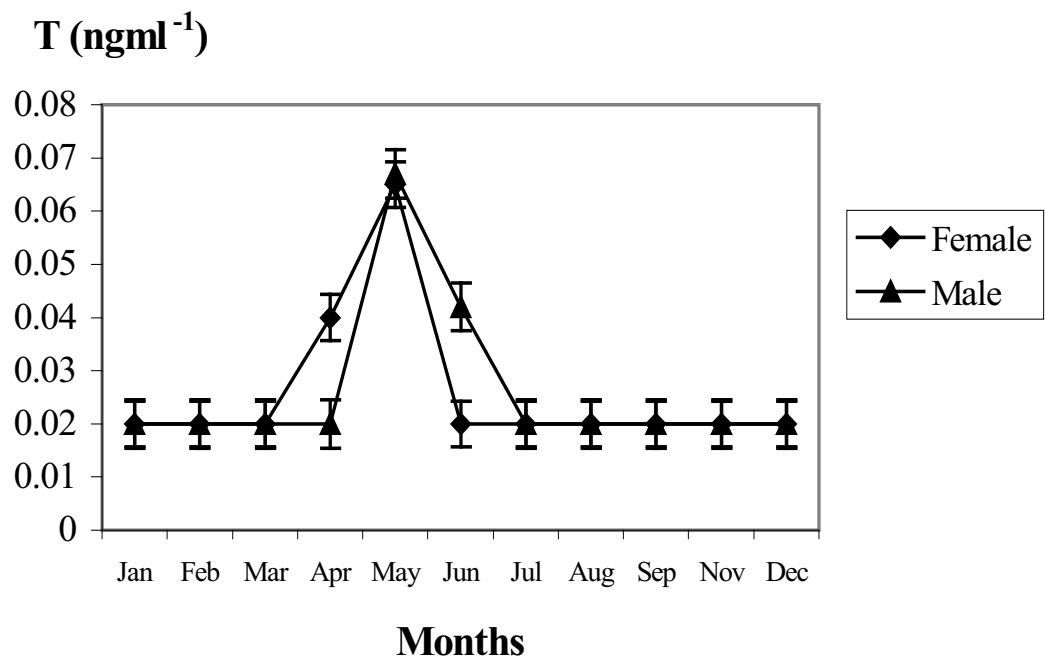


Figure 2 Comparison of testosterone (T) profiles of six female and six male MGC (aged 8 years old) reared in ponds during January to December 2000.

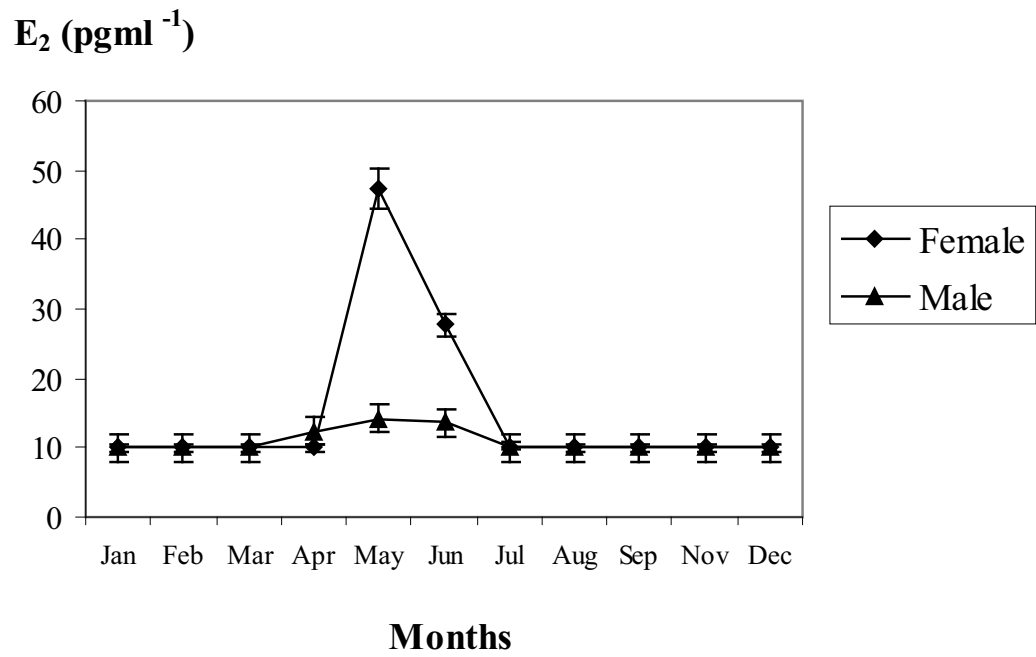


Figure 3 Comparison of estradiol (E_2) profiles of six female and six male MGC (aged 8 years old) reared in ponds during January to December 2000.

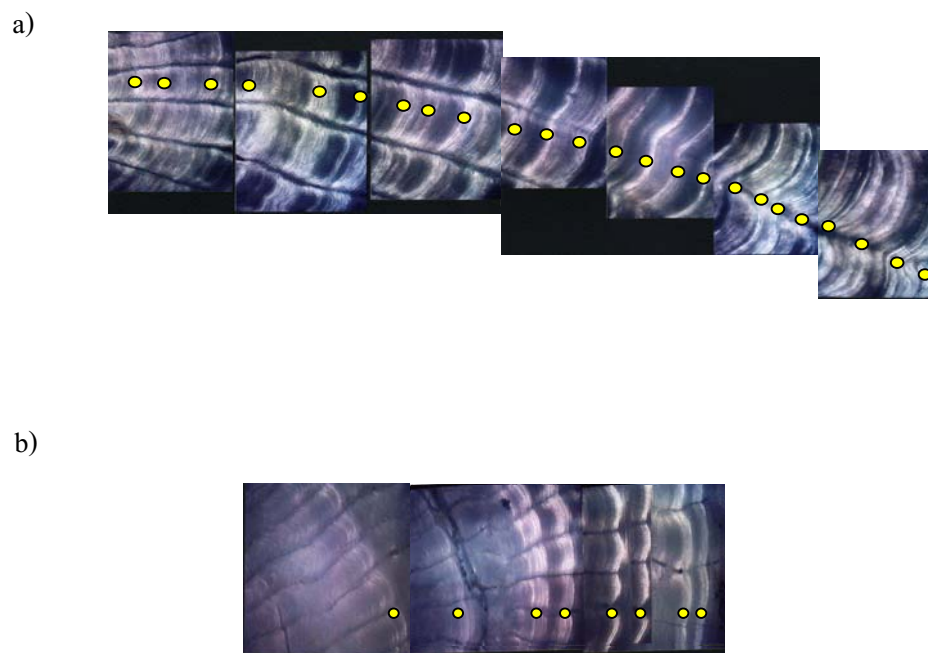


Figure 4 Annual rings from the pectoral fin of
(a) a 24-year old female MGC from the Mekong river.
(b) a 8-year old female MGC reared in earthen ponds.
Note: A dot was marked for each year of the age.

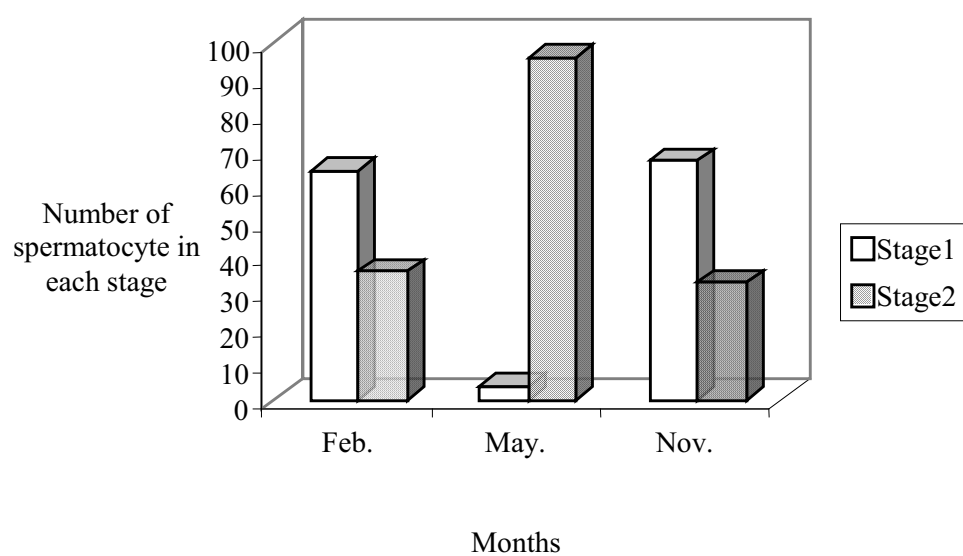


Figure 5 Comparison of sperm counts in the stage of gonad development of testis of three male MGC reared in earthen ponds in February, May and November 2000.

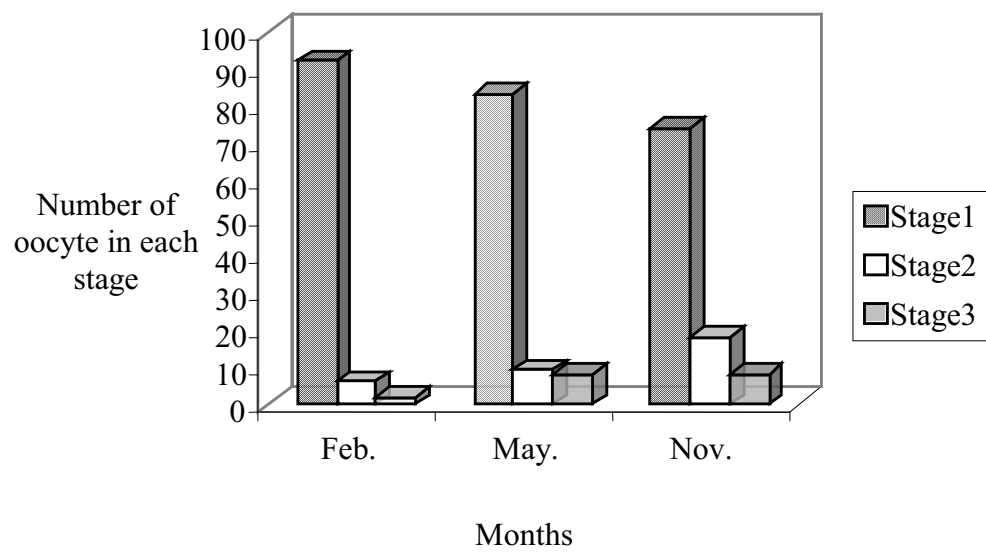


Figure 6 Comparison of oocyte counts in the stage of gonad development of ovary of three female MGC reared in earthen ponds in February, May and November 2000.

Table 1. Gonadosomatic index (GSI), age and serum testosterone (T) and estradiol (E₂) concentrations of three MGC from the Mekong River

Fish No.	Date captured	Age (years)	Body weight (kg)	Sex	Gonad weight (kg)	GSI	Serum sex hormone concentration	
							T (ngml ⁻¹)	E ₂ (pgml ⁻¹)
1	5 May 2000	19	145	Male	3.3	2.27	-	-
2	7 May 1999	24	205	Female	17	8.29	-	-
3	17 May 2000	22	247	Female	27.4	11.09	0.07*	123*

Note: *4 days after it was captured

Table 2. Gonadosomatic index (GSI), age and serum testosterone (T) and estradiol (E₂) concentrations of six MGC reared in earthen ponds

Fish No.	Date captured	Age	Body	Gonad weight	GSI	Serum sex hormone concentration	
		(years)	Weight (kg)	(kg)		T(ngml ⁻¹)	E ₂ (pgml ⁻¹)
Male							
1	10 Feb 2000	8	15.00	0.01	0.06	≤0.02	≤10
2	10 May 2000	8	13.00	0.01	0.08	0.04	13.00
3	22 Nov 2000	9	12.00	0.01	0.08	≤0.02	≤10
	$\bar{X} \pm SE$	8.33±0.33	13.33±0.88	0.01	0.07±0.01	0.03±0.06	11.00±1.00
Female							
4	10 Feb 2000	8	16.00	0.06	0.375	≤0.02	≤10
5	10 May 2000	8	12.50	0.06	0.48	0.04	28.00
6	7 Nov 2000	8	14.30	0.04	0.28	≤0.02	≤10
	$\bar{X} \pm SE$	8	14.27±1.01	0.05±0.01	0.38±0.10	0.027±0.01	16.00±6.00

5.2 Thai J.Agric.Sci.

Effects of select Hormones in Oil Suspension on the Gonadal Development of the Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey)

Kriangsak Meng-umphan¹, Jongkol Promya¹, Jiradej Manosroi² and Aranya Manosroi^{2*}

¹Department of Fisheries Technology, Faculty of Agricultural Production, Maejo University, Sansai, Chiang Mai 50290, Thailand; Tel./Fax. 66-53-498178;
E-mail:mengumpa@mju.ac.th

²Faculty of Pharmacy / Pharmaceutical Cosmetic Raw Materials and Natural Products Research and Development Center (PCRNC), Institute for Science and Technology Research and Development (IST), Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand; Tel. 66-53-944338; Fax. 66-53-894169;
E-mail:pmpti005@chiangmai.ac.th

Abstract

The Mekong Giant Catfish (MGC, *Pangasianodon gigas*) is an endangered species. It takes approximately sixteen years for this fish to reach maturity in earthen ponds. Thirty-two of the nine years old fish (16 males and 16 females; 14 kg) at the Department of Fisheries Technology, Maejo University in Chiang Mai and twelve of seven years old fish (6 males and 6 females; 13 kg) at Charan Farm in Chiang Rai were injected with various concentrations of GnRH α suspended in soybean oil and in combination with domperidone (DOM) or with estradiol (E2) in females and testosterone (T) in males. Serum levels of E2 and T were determined by electrochemiluminescence immunoassay at 0, 15, 60 and 120 days post injection. In the nine years old fish injected with 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRH α in combination with 10 mg kg^{-1} of DOM after 60 days (June 15, 2001), the highest T and E2 blood levels in male and female respectively were higher than before injection and the control. The highest stripped egg and sperm volumes were obtained from the nine years old fish after 82 days (July 8, 2001), post injection with 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRH α in combination with 20 mg kg^{-1} of DOM. However, sex hormone levels in all groups dropped with no egg or sperm production after 120 days (August 15, 2001) of the treatment. This study indicated that MGC has the potential to be a breeding stock and showed the period of pre spawning to be January – April; the period of spawning to be May-July and the period of post spawning to be August – December. This information will be beneficial for breeding of the domesticated MGC which can be an alternative source of broodstock.

keywords: gonadosomatic index, sex hormone, broodstock, GnRHa, domperidone

Introduction

The Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, MGC), the largest fresh water catfish in the world, is considered to be an endangered species according to CITES (Phonprasit and Thevarat, 1998). The number of fish caught reached a peak of 69 in 1990. There was no record of any wild MGC captured from the Mekong River in the 2001, 2002 and 2003 (Meng-Umphun, 2003). This giant catfish might become extinct in the near future. Moreover, domesticated fish from artificial breeding in ponds need 16-17 years to reach maturity. Fish spawning can be induced by environmental manipulation and exogenous hormone administration. Hormone induction of MGC is necessary for conservation and production (Prat et al., 2001). However, the effects of exogenous hormones on ovulation are short. Two to four injections are needed. One injection may last for only 6-12 hr (Van der Kraak et al., 1983).

Frequent injections can make the fish suffer from stress. There are also various problems of hatchery management, especially repetitive handling of brood stock which requires substantial labor, time and monitoring. A dopamine antagonist, domperidone (DOM), has been successfully used together with a gonadotropin releasing hormone analog (GnRH-a) or Suprefact[®] (buserelin) to induce spawning and reduce stress (Lin et al., 1988). Buserelin or GnRHa can regulate gonadotropin hormone (GTH). GTH is composed of a luteinizing hormone (LH) and a follicle stimulating hormone (FSH) that affect the development of ovary, testis and essential hormones for ovulation. The Gonadotropin releasing hormone (GnRH), together with GnRH receptors, are located on the gonadotropic membrane in the pituitary gland that stimulates the production of gonadotropin, and GnRH will be released to the blood by G protein-coupled receptor systems (Chompoothawee, 1998). Testosterone initiates in spermatogenesis. It is also the precursor for estradiol production of vitelogenin during egg development (Scott et al., 1980).

Long term GnRHa delivery systems are important tools in controlling the maturation of Striped Bass (Van der Kraak et al., 1983). Hormones with a suitable concentration in a sustained release delivery system have been demonstrated to stimulate gonad development, reduce stress from multiple handling and assist the stock to become ready for breeding (Zohar et al., 1989b, 1990a, 1995a,b; Goren et al., 1990). In this study, GnRHa together with domperidone and testosterone or estradiol suspended in soybean oil as a sustained released dosage form were used to induce maturation of MGC. Fish maturation was evaluated after the treatment from sex hormone blood level and gonad development.

Materials and Methods

Fish Samples

The experiment was conducted from April to August in 2001. Fish were divided into two groups. The first group had 16 males and 16 females (nine years old,

14 kg) reared in earthen ponds (1,400 m²) at the Department of Fisheries Technology, Maejo University, Chiang Mai. The second group had 6 females and 6 males (seven years old, 13 kg) reared in earthen ponds at Charan Farm in Chiang Rai, Thailand. Sex identification was performed by physical observation and confirmed by biopsy of the gonads. Each fish was marked by injecting Alcian blue dye solution on different parts of the fish. Fish were fed daily with feeds containing 20 % protein (8.15 % fishmeal, 4.9 % soybean, 4 % rice bran and 3 % broken rice in combination with 1 % premix and 1 % tuna oil) at 2 % of the body weight.

Hormone preparation

An amount of 10 ml of Suprefact[→] (10,000 µg ml⁻¹ of buserelin or GnRHa) was evaporated under reduced pressure by a centrifuge (Centrivap Model LABCONCO 78120-01, USA) at 30 ± 2 °C, 2,500 rpm for 3 hrs. Domperidone (10 mg per tablet, Motilium[→]) was ground and dissolved in ethanol, and then filtered. The filtrate was evaporated at 45 °C by an evaporator (Rotavapor, R-124 BUCHI, SWITZERLAND). The dried powder was collected. The contents of buserelin and domperidone were analyzed by HPLC (Thermo Separation Products, USA UV 1000/P2000). The calculated amount of buserelin and domperidone was suspended aseptically in sterile soybean oil. The suspension was kept at 4 °C until use.

Hormone treatment

Fish in the first group at the Department of Fisheries Technology, Maejo University in Chiang Mai were divided into 5 treatments (Table 1). Each treatment had 4 males and 4 females. Each fish was intramuscularly injected with the sample at 0.2 ml kg⁻¹ on April 1, 2001. Blood samples were taken at 0, 15, 60 and 120 days after the treatment and assayed for testosterone and estradiol level by electrochemiluminescence immunoassay.

Fish in the second group at Charan Farm in Chiang Rai were divided into 2 treatments (Table 2). Each treatment had 3 males and 3 females. Each fish was intramuscularly injected with the sample at 0.2 ml kg⁻¹ in April 15, 2001. Blood samples were taken at 0, 15, 60 and 150 days after the treatment and assayed for testosterone and estradiol level by electrochemiluminescence immunoassay.

Quantitative analysis of testosterone and estradiol blood level

One millilitre of the blood sample was taken from the caudal vasculature of each fish at 0, 15, 60, 120 and 150 days after the treatment. The serum sample was separated by centrifugation at 10,000 rpm for 5 min and stored at - 30 °C. Fifty microliters of the serum were used to determine the estradiol (E2) and testosterone (T) by an electrochemiluminescence immunoassay analyzer (Elecsys1010, Roche Germany). A polyclonal antibody from rabbit was directed against 17β- estradiol and a mouse monoclonal antibody was directed against testosterone.

Gonadosomatic index (GSI)

One male and one female from each treatment at Maejo University were sacrificed at 15 (April 15, 2001) and 60 days (June 15, 2001) post injection and the average gonadosomatic index (GSI) of ovaries and testis was determined according to the following equation (Nikolsky, 1963):

$$\text{GSI (\%)} = \frac{\text{gonads weight (kg)} \times 100}{\text{body weight (kg)}}$$

Gonad histology

The mid of ovary and testis samples taken from one female and one male at Maejo University 15 days (April 15, 2001) post treatment was fixed in 10 % formalin, hydrated and embedded in paraffin. The section of 6 µm thick was stained with haematoxylin and eosin. The oocytes and spermatocyte were evaluated according to the 4 stages of Jarimopas et al., (1994) and Prat et al., (2001) respectively, as follow.

Oocytes:

- Stage 1 Central germinal vesicles (CGV)
- Stage 2 Migrating germinal vesicles (MGV)
- Stage 3 Peripheral germinal vesicles (PGV)
- Stage 4 Maturation (germinal vesicle breakdown, GVBD)

Spermatocytes:

- Stage 1 Spermatogonia (cell diameter 0.01-0.02 mm)
- Stage 2 Spermatocyte (less than 0.01-0.02 mm)
- Stage 3 Spermatid (small cell in group no tail)
- Stage 4 Spermatozoa (small cell with tail in vas deferens)

Spermatozoa and egg sampling

After 60 days (June 15, 2001) post injection, the 2-3 mm catheter tube was inserted in the urogenital papilla of the fish for egg and sperm sampling. Before eggs and sperms were stripped (July 8, 2001), the fish was first injected with 10 µg kg⁻¹ of GnRHa combined with 2.5 mg kg⁻¹ at DOM. After 6 hrs, the second injection was 20 µg kg⁻¹ of GnRHa combined with 2.5 mg kg⁻¹ of DOM. Eggs and sperms were stripped at 20 hrs after the first injection. One gram of eggs was counted to estimate fecundity. The sperm volume was measured by a syringe and the densities were determined by a hemathocrit slide and calculated according to the following equation (Aas et al., 1991) :

$$\text{Number of sperm (mm}^{-3}\text{)} = \frac{\text{average counting number} \times \text{dilution rate}}{0.02}$$

Data and statistical analysis

Germ cell stages and GSI of the fish were presented in graphs and tables. Differences in mean of E2 and T blood levels were determined by Analysis of Variance (ANOVA, $P < 0.05$), and the Least Significance Difference Test (LSD) were analyzed by Statistic Package for Social Science (SPSS).

Results

Testosterone (T) and Estradiol (E2) level

There were no significant differences in the serum T level in males at Maejo University at 15 and 120 days post injection with hormone suspended in soybean oil in comparing with control ($P > 0.05$). However, there were significant different fluctuations of the serum T level after 60 days post injection compared to prior injection and the control ($P < 0.05$). Moreover, the group treated with T at 20 mg ml⁻¹ showed a higher T level than other treatments. The serum E2 level in females at 15 and 60 days post injection was significantly different in fluctuations from before and the control ($P < 0.05$). The group treated with 200 µg kg⁻¹ of GnRHa in combination with 10 mg ml⁻¹ of DOM at 60 day post injection gave the highest level of serum E2 level. However, the hormone levels decreased after 120 days (Fig 1, and 2).

At Charan Farm in Chiang Rai, no significant difference in fluctuations of serum T level in males before and 150 days post injection was observed ($P > 0.05$). But, there were significant fluctuation of serum T level at 15 and 60 days post injection than before injection and the control ($P < 0.05$). Moreover, the group that was treated with 300 µg kg⁻¹ of GnRHa in combination with 10 mg kg⁻¹ of DOM gave a T level higher than the control group. The serum E2 level in females at 60 days post injection was significant different in fluctuations from before injection and the control. The group treated with 300 µg kg⁻¹ of GnRHa in combination with 10 mg ml⁻¹ of DOM gave the highest serum E2 level at 60 days after the treatment and was significant different from the control ($P < 0.05$, Fig 3, and 4).

GSI and reproductive parameters

After 15 days of the treatment of fish at Maejo University injected with 200 µg kg⁻¹ of GnRHa in combination with 10 mg kg⁻¹ of DOM, the highest GSI of 1.3 % in females and 0.25 % in males, were observed. After 60 days of the treatment, sperm cells in all male groups were in the spermatid and spermatozoa stages (Fig 5 and 6). The central germinal vesicle stage (CGV) and the migrating germinal vesicle stage (MGV) in all groups were found (Fig 7 and 8). The female did not reach ovulation maturation after 15 days of the treatment. After 60 days of post injection, GSI in all groups increased. The highest GSI of 9 % and 2.9 % in female and male, respectively were observed in the groups injected with 200 and 300 µg kg⁻¹ of GnRHa in combination with 10 and 20 mg kg⁻¹ of DOM. Fish received E2 gave the lowest GSI. After the 60 days post injection, eggs and sperms were sampled by siphoning with a catheter tube from the groups which received

soybean oil, and injected with GnRHa in combination with DOM . Stripping eggs could be obtained only from a female injected with 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRHa in combination with DOM at 20 mg kg^{-1} . Sperm could be obtained only from one male injected with 7 and 15 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRHa in combination with 2.5 mg kg^{-1} of DOM. The sperm volume and density tended to be the highest in the fish treated with 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRHa in combination with 20 mg kg^{-1} of DOM. After 82 days of the treatment, 125 g of stripped eggs were inseminated with 20 ml of sperms. However, no fertilized eggs were obtained (Table 3 and Fig 9).

Discussion

After 60 days (June 15, 2001) of injected with 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRHa in combination with 10 mg kg^{-1} of DOM, female MGC the E2 level gave significantly higher than before injection and the control. This may be due to the period of the hormone treatment that was integrated with the beginning of the spawning season on June for MGC (Manosroi et al., 2003). Prat et al., 1999 was reported that , Sea Bass injected with GnRHa alone, or in combination with DOM, induced an increase of plasma E2 concentration. Sower et al., (1984) found a higher concentration of E2 after the administration of GnRHa to vitellogenic females than to postvitellogenic females. During the spawning season (after 60 days of the treatment), the T level was higher than the E2 level, which agreed with the previous study (Haddy and Pankhurst, 2000). On June (after the hormone treatment), the T and E2 levels of the seven years old fish at Charan Farm were lower than the nine years old fish at Maejo University. After 120 days of the treatment (August 15, 2001), all T and E2 levels decreased to less than 0.02 ng ml^{-1} in males and 76 pg ml^{-1} in females. This may be due to the post spawning season. According to our previous study, T and E2 levels of *Pangasius hypophthalmus* at one and a half years old injected with 100 to 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRHa in combination with 10-20 mg kg^{-1} of DOM were the highest after 240 days of the treatment (September 15, 2001, Manosroi et al., 2003).

In April (after 15 days of the treatment), the highest GSI of the nine years old catfish received 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRHa combined with 10 mg kg^{-1} of DOM was 1.28 % in females and 0.25 % in males. In comparison to the eight years old MGC which did not receive exogenous hormone, they showed GSI of 0.45 % and 0.06 % in females and males, respectively. The highest GSI was obtained in June of 2.8 % in male and 8.9 % in female fish injected with 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRHa in combination with 10 mg kg^{-1} of DOM. This was comparable to *P. hypophthalmus*. *P. hypophthalmus* injected with 100 to 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ of GnRHa in combination with 5 to 20 mg kg^{-1} of DOM gave a GSI (in June) of 13.9 to 14.5 and 4.6 to 6.3 % in female and male, respectively. The spawning season appeared to begin in June. On the other hand, a germ cell stage (in May) of MGC at three and a half years old had a primary growth phase in female and spermatogonia in male, while germ cells of most MGC broodstock from the Maekong River composed of mid-vitellogenesis and yolk granules in female and spermatozoa in male, respectively (Narkong, 1994). The GSI values of female and male fish (190 and 142 kg) from the Maekong River were 8.7 % and 6.3 % respectively (Mongkonpunya, 1992). Previous work on the propagation of the five years old MGC females (20 kg) in earthen ponds was conducted by implanting

miniosmotic pumps containing 2.1 ml with 1 mg ml⁻¹ of GnRH α with the combination of 20 mg ml⁻¹ of DOM into the abdominal cavity under the pelvic fin, the ovaries were at the beginning stage after two months treatment (Phonprasit et al., 1993).

On July 7, 2001, sperm could be obtained from half of the treated fish including the control group. The ovum could be obtained by sampling with a catheter tube from the control group (treated with soybean oil only), and from fish treated with GnRH α in combination with DOM. In the control group, this may be due to the fact that soybean oil which is oil derived from plant usually containing cholesterol that can be a precursor of sex steroidal hormone production. (Dence et al., 1980). On the other hand, T and E2 can also be produced in the gonads of the brooder during pre spawning season. However, after 20 hrs of the second injection with 7 and 15 μ g kg⁻¹ of GnRH α in combination with 2.5 mg kg⁻¹ of DOM, only 125 grams of the stripped eggs were obtained from one female and the highest sperm volume were obtained from one male treated with 300 μ g kg⁻¹ of GnRH α in combination with 20 mg kg⁻¹ of DOM. Our research on hormone need results show consistency with Solar et al., (1995) who injected broodstock of Salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) with 250 μ g kg⁻¹ of GnRH, and implanted with GnRH which dissolved in polymer. Their results showed both hormone treated Salmon gave higher percentage of spawning than the control group within 14 days after the treatment.

Eggs could not be fertilized due to poor quality of eggs (early maturation). It had also been reported that early GnRH administration in Atlantic salmon induces a very low percentage of female ovulating with poor quality of eggs (Crim and Glebe, 1984). This is also due to the reproductive problems which are usually more serious in female broodstock in captivity, and the absence of final oocyte maturation (Zohar and Mylonas, 2001).

Conclusions and Comments

For the nine years old MGC fish (14 kg of body weight) at Maejo University, groups that were treated with 200 μ g kg⁻¹ of GnRH α in combination with 10 mg kg⁻¹ of DOM showed higher sex hormone levels after 15 and 60 days of the treatment than the control group and gave better ovulation than the seven years old MGC at Charan Farm in Chiang Rai. This nine years old MGC treated with 300 μ g kg⁻¹ of GnRH α in combination with 20 mg kg⁻¹ DOM also showed better GSI, volume and density of sperms and eggs after 82 days of the treatment during spawning season than other groups. The nine years old males produced the best qualities of sperm but low quality of eggs.

The nine years old MGC reared from earthen pond have a potential to alternative to the MGC broodstock from the Mekong River. However, It needs future studies including the development of high nutritional feed for female broodstock. In addition, more frequent hormone application may be conducted when the females reach maturity. Although hormones are required for synchronous spawning, the right time and amount used need to be optimized.

Acknowledgments

We acknowledge the Thailand Research Fund and National Science and Technology Development Agency for the funding. We appreciate the suggestion of Assoc. Prof. Dr. Padermsak Jarayabhand, Dr. Apichart Termvidchakorn and Dr. Somsri Ngamwongchon.

References

- Aas, G.H., Rafstic, T. and Gjarde, B. 1991. Evaluation of milt quality of Atlantic salmon. *Aquaculture*, 95, 125-132.
- Chompoothawee, S. 1998. Pharmaceutical of Hormone. Department of Pharmacy. Faculty of Pharmacy, Chulalongkorn University. (in Thai)
- Crim, L.W. and Glebe, B.D., 1984. Advancement and synchrony of ovulation in Atlantic salmon with pelleted LHRH analog. *Aquaculture* 43, 47-56.
- Goren, A., Zohar, Y., Fridkin, M., Elhanati, E. and Koch, Y., 1990. Degradation of gonadotropin releasing hormone in the gilthead seabream, *Sparus aurata*; I. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* 79, 291-305.
- Dence, J.B. 1980. Steroids and peptides : Selected chemical aspects for biology, biochemistry and medicine. Canada : John Wiley & Sons, Inc.
- Haddy, J.A. and Pankhurst, N.W. 2000. The efficacy of exogenous hormones in stimulating changes in plasma steroids and ovulation in wild black bream *Acanthopagrus butcheri* is improved by treatment at capture. *Aquaculture* 191 : 350-366.
- Jarimopas, P., Thawarat, P. and Inthakaul, A. 1994. The Red Tilapia Reproductive of Thai Stain. *Thai Fisheries Gazette*, 47(1), 49-62.
- Lin, H.R., Van der Kraak, G., Zhou, X.J., Liang, J.Y., Peter, R.E., River, J.E. and Vale, W.W. 1988. Effects of [D-Arg6, Trp7, Pro9 Net] Luteinizing hormone-releasing hormone (sGnRH α) and [D-Ala6, Pro9 Net] –Luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH α), in combination with pimozone or domperidone, on gonadotropin release and ovulation in the Chinese loach and common carp. *Gen. Comp. Endocrinol.* 69, 31-40.
- Manosroi, A., Meng-Umphon, K. and Manosroi, J. 2003. Annual sex hormonal profiles, gonad development and age determination of the Mekong Giant Catfish (*Pangasianodon gigas*, Chevey). *Aquaculture Research*. In press.
- Meng-Umphon, K. 2003. Plabuk (Thai). Department of Fisheries Technology, Maejo University, Chiang Mai. In press 2003. (in Thai)
- Mongkonpunya, K. 1992. Fish Sperm Cryopreservation. Department of Science, Faculty of Science, Kasatsart University. (in Thai)
- Narkong, N. 1994. The Anatomy of Mekong Giant Catfish (*Pangasinodon gigas*, Chevey). Master of Science Thesis (Zoology), Department of Zoology, Faculty of Science, Kasatsart University. (in Thai)
- Nikolsky, G.V. 1963. The ecology of fish. London: Academic Press.
- Phonprasit, S., Thevaratmaikul, P. and Mongkonpunya, K. 1993. The propagation and

- development of the Mekong Giant Catfish. Department of Fisheries, Thai Fisheries Gazette., 46(5) : 339-415.(in Thai)
- Phonprasit, S. and Thevarat, P. 1998. The Mekong giant catfish biology and breeding. Thai Fisheries Gazette. 51(2): 107-115.(in Thai)
- Prat, F., Zanuy, S., Carrillo, M., De Mones, A. and Fostier, A. 1999. Effects of constant short and long photoperiod regimes in the spawning performance and sex steroid levels of female and male sea bass, (*Dicentrarchus labrax*, L). J. Fish Biol. 54, 125-137.
- Prat, F., Zanuy, S. and Carrillo, M. 2001. Effects of gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRHa) and pimozone on plasma levels of sex steroid and ovarian development in sea bass (*Dicentrarchus labrax*, L). Aquaculture. 193, 325-338.
- Scott, A.P., Bye, V.J. Baynes, S.M. and Springate, J.R.C. 1980. Seasonal variations in plasma concentration of 11- ketotestosterone and 17 α -hydroxyprogesterone in the Japanese eel. Fisheries Science. 66: 644-654
- Solar, I.I, Smith, J., Dye, H.M., McKinley, D., Zohar, Y. and Donaldson, E.M. 1995. Induced ovulation of Chinook salmon using a GnRHa implant : effect on spawning, egg viability and hormone levels. p.381-392. In E.M. Donaldson (ed). Manipulation of reproduction in farmed fish. Animal Reproduction Science.
- Sower, S.A., Iwamoto, R.N., Dickhoff, W.W. and Gorbman, A. 1984. Ovulatory and steroidal responses in coho salmon and steelhead trout following administration of salmon gonadotropin and D-Ala6, des Gly10 gonadotropin-releasing hormone ethylamide (GnRHa). Aquaculture 43, 35-46.
- Van der Kraak, G., Lin, H.R., Donaldson, E.M., Dye, H.M. and Hunter, G.A. 1983. Effects of LH-RH and des-Gly10 -[D-Ala6]-LH-RH ethylamide on plasma gonadotropin levels and oocyte maturation in adult female coho salmon (*Hypophthalmichthys molitrix*) and goldfish (*Carassius auratus*). Aquaculture 78, 81-86.
- Zohar, Y., Harel, M., Hassin, S. and Tandler, A. 1995a. Gilthead sea bream (*Sparus aurata*). pp.94-117 In: N.R., Bromage and R.J. Roberts, (eds.), Broodstock management and Egg and Larval Quality. Blackwell, Oxford,.
- Zohar, Y., Elizur, A., Sherwood, N.M., Rivier, J.F. and Zmora, N. 1995b. Gonadotropin releasing potencies of the three native forms of gonadotropin releasing hormones present in the brain of gilthead seabream, *Sparus aurata*. Gen. Comp. Endocrinol. 97, 289-299.
- Zohar, Y., Tosky, M., Pagelson, G. and Finkelman, Y. 1989b. Induction of spawning in the gilthead seabream, *Sparus aurata*, using [D-Ala6-Pro9Net]-LHRH: comparison with the use of HCG. Israeli J. Aquaculture-Bamidgeh 41, 105-113.
- Zohar, Y., Goren, A., Fridkin, M., Elhanati, E. and Koch, Y. 1990a. Degradation of gonadotropin-releasing hormones in the gilthead sea bream *Sparus aurata*: II. Cleavage of native salmon GnRH, mammalian LHRH and their analogs in the pituitary, kidney and liver. Gen. Comp. Endocrinol. 79, 306-331.
- Zohar, Y. and Mylonas, C.C. 2001. Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormone to genes. *Aquaculture*, 197, 99-136.

Table 1 The dosage treatment of GnRHa, domperidone, testosterone and estradiol oil suspension in MGC at Maejo University, Chiang Mai, Thailand.

Treatment No.	Sex	Number	Average Weight	Description of treatment	Amount (ml BW ⁻¹)
T1 (control)	Male	4	14.50±1.80	Soybean oil only	2.90
	Female	4	14.35±3.09		2.87
T2	Male	4	14.03±3.75	200 µg kg ⁻¹ GnRHa and 10 mg kg ⁻¹ DOM in soybean oil	2.80
	Female	4	14.33±4.19		2.87
T3	Male	4	14.28±1.80	300 µg kg ⁻¹ GnRHa and 20 mg kg ⁻¹ DOM in soybean oil	2.86
	Female	4	14.80±3.50		2.96
T4	Male	4	14.13±2.56	20 mg kg ⁻¹ Testosterone (T) in soybean oil for male	2.83
T5	Female	4	14.40±1.58	20 mg kg ⁻¹ Estradiol (E2) in soybean oil for female	2.88

Table 2 Dosage of GnRHa, domperidone, testosterone and estradiol in fish at Charan Farm in Chiang Rai, Thailand.

Treatment No.	Sex	Number	Average Weight	Description of treatment	Amount (ml BW ⁻¹)
T1 (control)	Male	3	12.83±1.26	Soybean oil	2.56
	Female	3	14.33±0.29		2.86
T2	Male	3	13.83±1.04	300 µg kg ⁻¹ GnRHa and DOM 20 mg kg ⁻¹ in soybean oil	2.76
	Female	3	14.33±1.15		2.86

Table 3 GSI, volumes and densities of the stripped eggs and sperm of MGC (9 years old) 15 and 60 days post treatment at Maejo University in Chiang Mai, Thailand.

Treatment	Sex	Weight (Kg.)	GSI (%)		No of fish stripped N=2	Volume and density of stripped eggs or sperm stripped after 82 days treatment		
			15 days (Apr 15,2001)	60 days (Jun 15,2001)		sperm		Egg (g)
						Cc kg ⁻¹ .	(cell mm ⁻³)	
T ₁ (Soybean oil, Control)	Female	14.50	0.85	7.95	-	-	-	-
	Male	14.63	-	2.75	1	1.0	2,575,000±169,272	-
T ₂ (GnRHa 200µg kg ⁻¹ + DOM 10 mg kg ⁻¹)	Female	14.20	1.23	8.91	-	-	-	-
	Male	14.33	0.25	2.87	1	1.06	2,716,670±659,267	-
T ₃ (GnRHa 300µg kg ⁻¹ + DOM 20 mg kg ⁻¹)	Female	14.50	0.64	9.01	1	-	-	125
	male	15.00	0.25	3.05	1	1.33	2,735,000±515,678	-
T ₄ (E2 20 mg kg ⁻¹)	Female	14.53	0.28	1.46	-	-	-	-
T ₅ (T 20 mg kg ⁻¹)	Male	14.40	0.17	2.77	1	1.08	2,635,000±985,771	-

Note : GnRHa = Gonadotropin Releasing Hormone analog; DOM = Domperidone; E2 = Estradiol; T = Testosterone

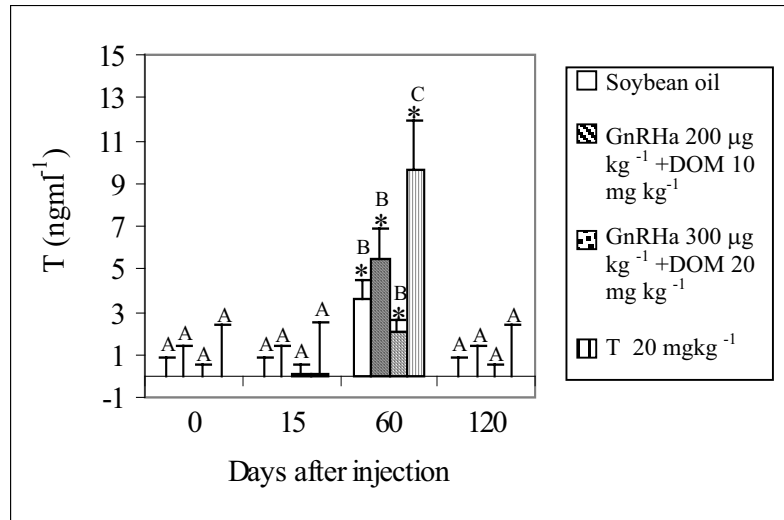


Figure 1 The average serum testosterone levels (ng ml^{-1}) in males *P gigas* (9 years old, 14 kg) at Maejo University in Chiang Mai at 0, 15, 60 and 120 days after injection of the 4 treatments. Data are represented as the mean $\pm$ SEM. Asterisks on top of the bar indicate differences between initial and after hormone injection. The letter A, B and C indicate the significant differences between them ($P < 0.05$).

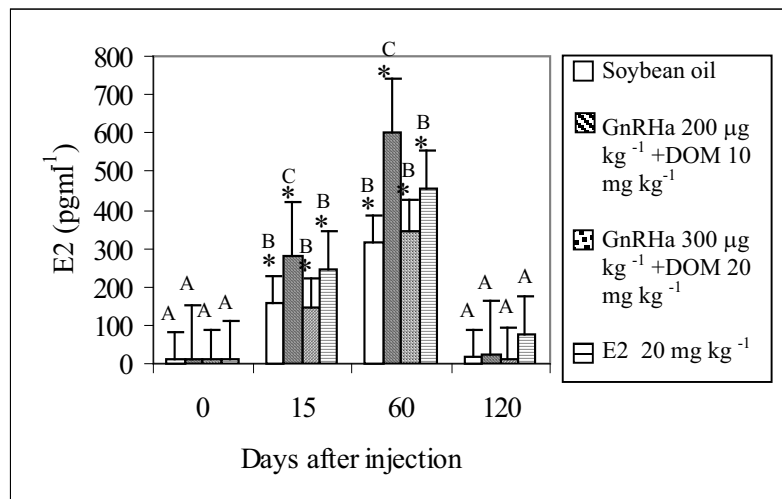


Figure 2 The average serum estradiol level (pg ml^{-1}) in females *P gigas* (9 years old, 14 kg) at Maejo University in Chiang Mai at 0, 15, 60 and 120 days after injection of the 4 treatments. Data are represented as the mean $\pm$ SEM. Asterisks on top of the bar indicate differences between before and after hormone injection. The letter A, B and C indicate the significant differences between them ($P < 0.05$).

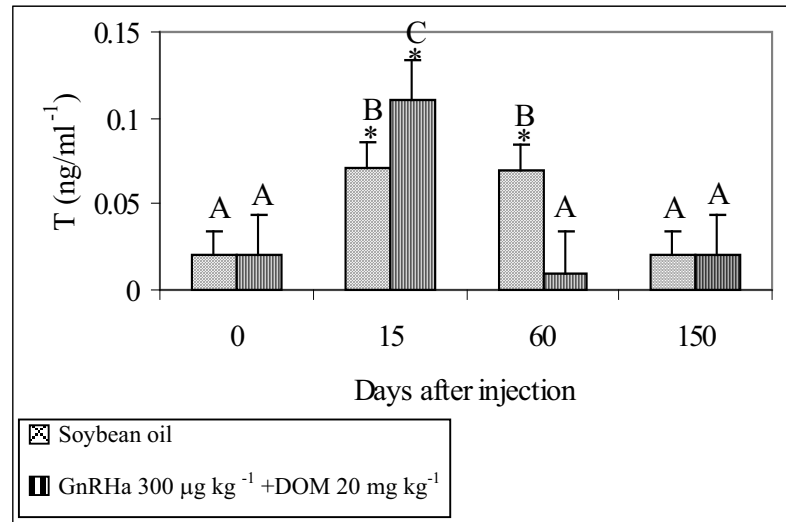


Figure 3 The average serum testosterone level (ng ml⁻¹) in males *P. gigas* (7 years old) at Charan Farm in Chiang Rai at 0, 15, 60 and 150 days after hormone injection from 2 treatments. Data is represented as the mean±SEM. Asterisks on top of the bar indicate differences between before and after injection. The letter A, B and C indicate the significant differences between them (P<0.05).

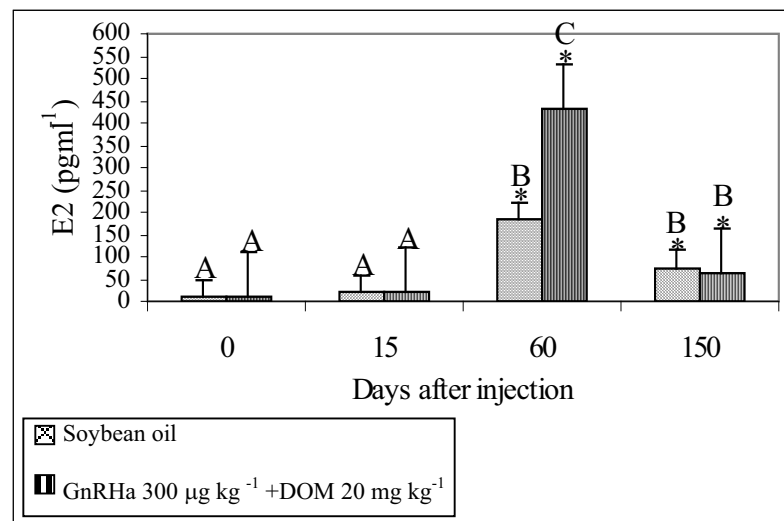


Figure 4 The average serum estradiol level (pg ml⁻¹) in female *P. gigas* (7 years old) at Charan Farm in Chiang Rai at 0, 15, 60 and 150 days after hormone injection from 2 treatments. Data is represented as the mean±SEM. Asterisks on top of the

bar indicate differences between before and after injection. The letter A, B and C indicate the significant differences between them ($P<0.05$).

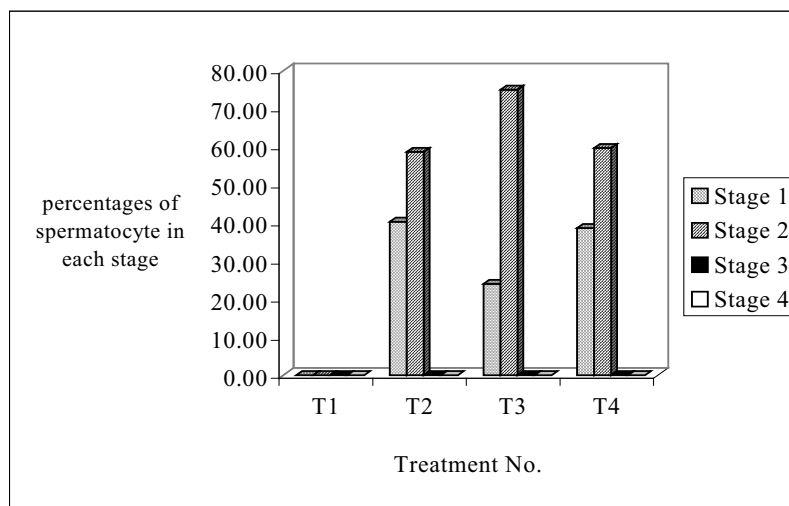


Figure 5 Percentages of spermatocytes in each stage of MGC (9 years old) at 15 days after the treatment at Maejo University, Chiang Mai, Thailand.

Note: T1 Soybean oil

T2 GnRHa 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in combination with DOM. 10 mg kg^{-1}

T3 GnRHa 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in combination with DOM. 20 mg kg^{-1}

T4 T 20 mg kg^{-1}

Stage 1 Spermatogonia (cell diameter 0.01-0.02 mm. blue color)

Stage 2 Spermatocyte (Spermatocyte ; less than 0.01-0.02 mm)

Stage 3 Spermatid (small cell in group no tail)

Stage 4 Spermatozoa (small cell with tail in vas deferens)



Figure 6 Spermatozoa at 60 days (July, 2001) after the treatment with GnRHa 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in combination with DOM 20 mg kg^{-1} .

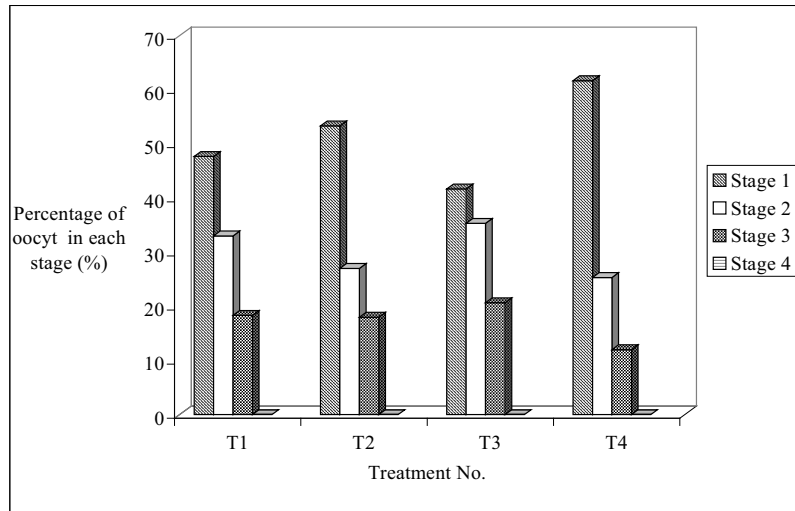


Figure 7 Percentages of oocyte in each stages of MGC (9 years old) after 15 days of the treatment at Maejo University, Chiang Mai, Thailand.

Note: T1 Soybean oil

T2 GnRHa 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in combination with DOM. 10 mg kg^{-1}

T3 GnRHa 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in combination with DOM. 20 mg kg^{-1}

T4 E2 20 mg kg^{-1}

Stage 1 Central germinal vesicle (CGV)

Stage 2 Migrating germinal vesicle (MGV)

Stage 3 Peripheral germinal vesicle (PGV)

Stage 4 Maturation (germinal vesicle breakdown, GVBD)

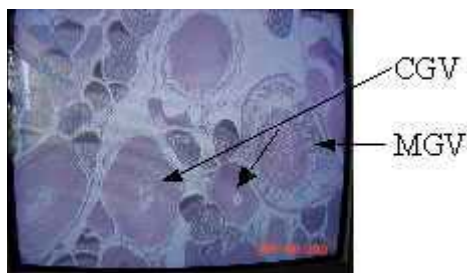


Figure 8 Oocyte at 15 days (April, 2001) after the treatment with GnRHa 200 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in combination with DOM (10 mg kg^{-1}).



Figure 9 Stripped eggs at 82 days (July, 2001) after the treatment with GnRHa 300 $\mu\text{g kg}^{-1}$ in combination with DOM (20 mg kg^{-1}).