245671
ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245671

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Development of Sperm Cryopreservation Technology for Oyster (*Saccostrea cucullata*) Aquaculture

รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

ตุลาคม ๒๕๕๔

b00250576

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
245671

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Development of Sperm Cryopreservation Technology for Oyster (*Saccostrea cucullata*) Aquaculture

รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

รองศาสตราจารย์ ดร. สุบัณฑิต นิ่มรัตน์
ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

ตุลาคม ๒๕๕๔

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่องการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๓ และ ๒๕๕๔ จากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณยิ่งยศ แตงทอง คุณสุกัญญา มากทรัพย์ คุณอัญชลี เพชรเหมือน และคุณปาริชาด อิ่มละมัย ที่ได้ช่วยเตรียมสถานที่ทดลอง ช่วยรวบรวมน้ำเชื้อสัตว์ทดลอง และวิเคราะห์สถิติ และขอขอบคุณภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่ให้ความอนุเคราะห์ในการใช้สถานที่ และอุปกรณ์ต่างๆระหว่างการศึกษาวิจัย ทำให้การวิจัยดำเนินการไปด้วยดี

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และ สุบัณฑิต นิ่มรัตน์

ตุลาคม ๒๕๕๔

บทคัดย่อ

245671

หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) เป็นหอยทะเลเศรษฐกิจที่นิยมเลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลและมีความสำคัญทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศ อย่างไรก็ตามการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบยังไม่เคยมีการศึกษาเพื่อประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ทำให้โครงการวิจัยเรื่องนี้ได้พัฒนาขึ้นมา โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ เริ่มจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่รวบรวมในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ การแช่เย็นน้ำเชื้อหอยนางรมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบแล้วเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว ผลการทดลองพบว่าพ่อพันธุ์หอยนางรมปากจีบที่รวบรวมมาตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ มีเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซนต์การมีชีวิตของสเปิร์มที่มีค่าสูง และไม่แตกต่างกันทางสถิติ การนำเอาน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบมาแช่เย็นในสารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆ กัน 5 ชนิดได้แก่ Artificial sea water (ASW), Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F-HBSS), Ringer solution, 0.85% NaCl และ Calcium-free saline (Ca-F Saline) พบว่า น้ำยาสูตร Ca-F Saline สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด และการใช้อัตราส่วนเจือจางน้ำเชื้อต่อสารละลายบัฟเฟอร์เป็น 1 ต่อ 2 ให้ประสิทธิภาพการเก็บรักษาที่ดีกว่าการใช้อัตราส่วน 1 ต่อ 1 หรืออัตราส่วน 1 ต่อ 3 การการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบ เริ่มจากการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 10 ชนิด (Dimethyl sulfoxide; DMSO, Methanol, Sucrose, Trehalose, Ethanol, Formamide, Propylene glycol, Ethylene glycol, Acetamide และ Glycerol) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เพื่อทราบข้อมูลความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม จึงนำน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบมาเจือจางในสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (DMSO, Propylene glycol และ Ethylene glycol) ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน แล้วแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกัน (2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที) โดยลดอุณหภูมิไปจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย (final temperature) ที่ -30 องศาเซลเซียส หรือ -80 องศาเซลเซียส แล้วนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส) แล้วทำการละลายน้ำเชื้อ (thawing) เพื่อประเมินคุณภาพสเปิร์ม ปรากฏว่า การลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งมาถึงอุณหภูมิสุดท้าย -30 หรือ -80 องศาเซลเซียส ให้ผลการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการผสมเทียมและการผลิตลูกหอยในโรงเพาะฟัก

Abstract

245671

Rock oyster (*Saccostrea cucullata*) is marine mollusk commonly cultured along the coast of Thailand. As cryopreservation of Rock oyster sperm has not received attention for aquaculture, this project was therefore developed the freezing protocol for Rock oyster sperm based on sequential studies of sperm quality during the spawning season, chilled storage of semen, cryoprotectant toxicity and cryopreservation of semen. There was no significant differences ($P>0.05$) in percentages of sperm motility and viability of semen during the season. Rock oyster semen were diluted in one of the five sperm extenders, namely Artificial sea water (ASW), Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F-HBSS), Ringer, 0.85% NaCl and Calcium-free saline (Ca-F Saline). Ca-F Saline was the best extender for storage of Rock oyster semen at 4°C. Dilution ratio of semen and extender at 1:2 was superior to dilution ratios at 1:1 or 1:3 during chilled storage. Nine types of cryoprotectants (Dimethyl sulfoxide; DMSO, Methanol, Sucrose, Trehalose, Ethanol, Formamide, Propylene glycol, Ethylene glycol, Acetamide and Glycerol) were tested to evaluate the baseline information of cryoprotectant toxicity on sperm motility. Rock oyster sperm was then frozen with one of the three cryoprotectants at various final concentrations using different cooling rates at 2.5, 5, 7.5, 10 and 12.5°C/minute to the final temperatures at -30°C or -80°C before plunging in liquid nitrogen. There was no significant difference ($P>0.05$) in post-thaw sperm motility between the final temperature at -30°C and -80°C. Freezing of Rock oyster semen can be used to artificially inseminate the eggs for seed production.

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ..... i

บทคัดย่อ..... ii

Abstract..... iii

สารบัญ..... iv

สารบัญตาราง..... v

สารบัญรูป..... vi

บทที่

1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย..... 1

2 การสำรวจเอกสารผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 5

3 วิธีดำเนินการทดลอง..... 15

4 ผลการทดลอง..... 21

5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง..... 46

เอกสารอ้างอิง..... 55

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่รวบรวมมาจากธรรมชาติ	21
2	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่เจือจางใน อัตราส่วน 1 ต่อ 1	23
3	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่เจือจางใน อัตราส่วน 1 ต่อ 2	23
4	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่เจือจางใน อัตราส่วน 1 ต่อ 3	24
5	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบใน DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน	26
6	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบใน Methanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน	27
7	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบใน Sucrose ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน	32
8	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบใน Trehalose ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน	33
9	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบใน Ethanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน	34
10	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบใน Formamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน	35
11	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบใน Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน	36
12	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบใน Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน	37
13	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบใน Acetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน	38
14	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบใน Glycerol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน	39

15	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่แช่แข็งด้วย DMSO ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน จาก 25 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส ก่อนนำเข้าถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)	41
16	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่แช่แข็งด้วย Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน จาก 25 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส ก่อนนำเข้าถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)	41
17	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่แช่แข็งด้วย Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน จาก 25 องศาเซลเซียส ถึง -30 องศาเซลเซียส ก่อนนำเข้าถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)	42
18	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่แช่แข็งด้วย DMSO ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน จาก 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำเข้าถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)	44
19	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่แช่แข็งด้วย Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน จาก 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำเข้าถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)	44
20	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมปากจีบที่แช่แข็งด้วย Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างกัน จาก 25 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำเข้าถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)	45

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ลักษณะภายนอกและภายในของหอยนางรมปากจีบ	6
2	การแกะหอยนางรมปากจีบเพื่อตรวจสอบเพศ	6
3	การแยกหอยนางรมปากจีบเพศผู้และเพศเมียที่มีความสมบูรณ์ออกจากกัน	8
4	บริเวณที่ตั้งของอวัยวะสืบพันธ์ (gonad) ของหอยนางรมปากจีบ	8
5	การปิดปลายหลอดฟางด้วยความร้อน	19
6	เครื่องมือควบคุมการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งน้ำเชื้อ	19