

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ ๒

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis asinina*)
เพื่อการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์

Development of sperm preservation technology of abalone
(*Haliotis asinina*) for commercial aquaculture

โดย

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย¹
สัณติ นิมรัตน์²

¹ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗
มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษา น้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ (*Haliotis asinina*) เพื่อการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ ได้ศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของหอยเป่าฮื้อในสภาพต่างๆ และการเก็บรักษา น้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจาง และเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ รวมทั้งประเมินผลของสารไครโอโพรเทคแทนต์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และผลของอัตราการลดอุณหภูมิและการเก็บรักษาต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่า น้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อที่รวบรวมออกมาใหม่ๆ สามารถเก็บแช่เย็นนาน 4 ชั่วโมง และยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง แต่น้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อที่อยู่ในน้ำทะเลมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงในระยะ 2 ชั่วโมงแรกเท่านั้น การให้ออกซิเจนสมทบในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ ช่วยยืดระยะเวลาเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานกว่าไม่ให้ออกซิเจนสมทบ โดย culture flask มีความเหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ การนำน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อมาเจือจางในสารละลายต่างๆ พบว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มของหอยเป่าฮื้อ ถูกควบคุมโดยแรงดันออสโมติกที่มีค่าสูงขึ้นเมื่อใช้สาร electrolyte และ non-electrolyte ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การเจือจางน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อในสารละลายบัฟเฟอร์สูตรต่างๆ (artificial seawater, Ringer solution และ calcium free saline; Ca-F saline) ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 พบว่า Ca-F saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ โดยไม่ควรเจือจางเกินอัตราส่วน 1 : 2 เพราะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานกว่าชุดการทดลองอื่นๆ การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนต์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ทำโดยนำน้ำเชื้อของหอยเป่าฮื้อมาเจือจางใน สารละลายไครโอโพรเทคแทนต์ 6 ชนิด (dimethyl sulfoxide; DMSO, propylene glycol, acetamide, methanol, ethanol และ ethylene glycol) ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ตั้งแต่ 15 - 240 วินาที พบว่า DMSO, methanol และ ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนต์ที่มีความเป็นพิษต่อน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ โดยนำเอน้ำเชื้อเจือจางด้วย DMSO ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% และลดอุณหภูมิด้วย เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ในอัตรา 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที่ไปจนถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ -40 หรือ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อด้วยการใช้ 5 %DMSO และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที่ มาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด

Abstract

Development of sperm preservation technology of abalone (*Haliotis asinina*) for commercial aquaculture was investigated. The purpose of the project was to evaluate sperm motility of *H. asinina* under various conditions and assess successful storage time of *H. asinina* sperm stored under non-diluted and diluted conditions, evaluate the effects of cryoprotectants on sperm motility and assess the effects of freezing rate and cryostorage on post-thawed sperm motility. Freshly collected sperm can be chilled-stored for 4 hrs with high motility while diluted sperm in seawater had high motility only during the first two hrs of dilution. Supplementation of oxygen prolonged sperm motility as compared to the non-supplemented group. Tissue culture flask was suitable to chilled-store of *H. asinina* sperm. Activation of *H. asinina* sperm with various solutions showed that sperm motility was regulated by high osmolality from both electrolyte and non-electrolyte solutions. Chilled storage of *H. asinina* sperm with artificial seawater, Ringer solution and calcium free saline (Ca-F saline) at ratios of 1:1, 1:2 and 1:4 showed the suitability of Ca-F saline in storage of *H. asinina* sperm at ratios less than 1 : 2. Study on cryoprotectant toxicity on sperm motility, semen was diluted in one of six cryoprotectants (dimethyl sulfoxide; DMSO, propylene glycol, acetamide, methanol, ethanol and ethylene glycol) at 5, 10, 15 and 20% for 15-240 seconds showed that DMSO, methanol and ethylene glycol were the least toxic cryoprotectants. Freezing of semen was performed by diluting semen in DMSO at 5, 10, 15 and 20% prior to cooling with controlled-rate programmable freezer at rates of 2.5, 5, 7.5, 10 and 12 °C/min to final temperatures of -40 or -80°C prior to cryostorage. Highest post-thawed sperm motility was obtained from a treatment using 5% DMSO and 10 °C/min to -80 °C.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ (*Haliotis asinina*) เพื่อการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗ จากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โดยรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เป็นผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อในสภาพต่างๆ การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำ ทั้งการเจือจาง และไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ และการศึกษาความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนต์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และการแช่แข็งน้ำเชื้อ ข้าพเจ้าขอขอบคุณ คุณปณิญา อ้นขวัญเมือง คุณอรุณ บุญธรรม คุณจารุณี วิสิลา และคุณศิริพร คชรรัตน์ ที่ช่วยในการทดลองรวบรวมน้ำเชื้อ และการวิเคราะห์ทางสถิติ และภาควิชาวาริชศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์ต่างๆระหว่างการศึกษาวิจัย ทำให้การวิจัยดำเนินการไปได้ตามวัตถุประสงค์ของโครงการ

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิมรัตน์

เมษายน ๒๕๕๘