บทคัดย่อ

230018

รหัสโครงการ : DBG4980006

ชื่อโครงการ : การพัฒนาเทคโนโลยีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่อุณหภูมิต่ำเพื่อการอนุรักษ์และการเพาะเลี้ยง

ชื่อนักวิจัย : รองศาสตราจารย์ ดร. วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
สังกัดภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

E-mail Address : verapong@buu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ : 3 ปี

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาเพื่อพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่อุณหภูมิต่ำแบบแช่เย็น และแบบแช่แข็งเพื่อประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์พันธุ์ปลาดุกอุย โดยทำการศึกษาแบ่งออกเป็น 11 ขั้นตอน โดยขั้นตอนแรกทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มปลาดุกอุยในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ จากการศึกษาพบว่าคุณภาพสเปิร์มปลาดุกอุยลดลงอย่างเด่นชัดในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ต่อมาในขั้นตอนที่ 2 ผลของแรงดันออสโมติกต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุกอุย พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาดุอุยถูกควบคุมโดยค่าระดับแรงดันออสโมติก โดยสเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกเท่ากับหรือใกล้เคียงกับน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม และสเปิร์มจะเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีแรงดันออสโมติกลดลง ในขั้นตอนที่ 3 ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ โดยพบว่าการใช้ถุงพลาสติก ziplock สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด และการให้ออกซิเจนสมทบช่วยยืดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้นานขึ้นกว่าไม่ให้ออกซิเจนสมทบ ขั้นตอนที่ 4 ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ ทราบว่าสารละลายบัฟเฟอร์ Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) มีความเหมาะสมที่สุดในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส โดยที่อัตราการเจือจางน้ำเชื้อด้วย Ca-F HBSS สามารถเจือจางได้สูงสุด 4 เท่า และน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วย Ca-F HBSS ในช่วงกลางฤดูผสมพันธุ์วางไข่สามารถเก็บรักษาได้นานกว่าน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในช่วงต้น หรือปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ขั้นตอนที่ 5 ทำการศึกษาความเป็นพิษของสาร cryoprotectant ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ทราบว่า DMSO ที่ความเข้มข้น 10% มีความเหมาะสมมากที่สุดในนำมาแช่แข็ง จึงนำ DMSO มาแช่แข็งน้ำเชื้อในขั้นตอนที่ 6 ก็ได้ผลการแช่แข็งที่ดี โดยอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมขณะแช่แข็งน้ำเชื้อคือ 3 - 10 องศาเซลเซียส/นาที ขั้นตอนที่ 7 ศึกษาความสามารถของน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ปลาดุกอุย พบว่าประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่มีค่าไม่แตกต่างจากน้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม) ขั้นตอนที่ 8 ศึกษาผลของอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้ออยู่ในช่วง 30 ถึง 70 องศาเซลเซียส ขั้นตอนที่ 9 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณและชนิดของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาดุกอุยแช่แข็งที่ได้เก็บรักษาไว้ ในไนโตรเจนเหลว พบว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อปลาดุกอุยที่เก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวมีค่าลดลงระหว่างการเก็บรักษา ขั้นตอนที่ 10 ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย โดยเก็บน้ำเชื้อในไนโตรเจนเหลวนาน 8 เดือน พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแช่แข็งหลังการละลายมีค่าลดลงเมื่อเก็บรักษานานขึ้น แต่เปอร์เซนต์การปฏิสนธิกับไข่และเปอร์เซนต์การฟักของไข่มีค่าไม่เปลี่ยนแปลง ในขั้นตอนสุดท้ายพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้ออย่างง่ายๆ การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยอย่างง่าย ทราบว่าการใช้หลอดฟาง (French straw) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุยต้องแช่แข็งที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4 เซนติเมตร ในขณะที่การแช่แข็งในหลอด cryovial สามารถทำได้ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตร

Abstract

230018

Project Code : DBG4980006

Project Title : Development of low temperature preservation technology of Thai walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen for conservation and aquaculture

Investigator : Associate Prof. Verapong Vuthiphandchai

Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University

E-mail Address : verapong@buu.ac.th

Project Period : 3 years

This purpose of this research was to develop suitable technology for chilled storage or cryopreservation of Thai walking catfish (*Clarias macrocephalus*) sperm for aquaculture and conservation. Experiment design was divided into 11 steps. The first experiment evaluated changes in sperm quality of walking catfish during the spawning season and found a decrease in sperm quality during the end of spawning season. The second experiment tested the effects of osmotic pressure on sperm motility using different electrolyte and non-electrolytes solutions. Sperm motility of walking catfish was controlled by the level of osmotic pressure; sperm motility was initiated in low osmotic pressure solutions. The third experiment stored undiluted milt at 0-4°C using different containers and found that plastic ziplock bag maintained sperm motility potential longer than other containers. Oxygen supplementation in undiluted milt resulted in longer storage period than a treatment without oxygen supplementation. The fourth experiment was designed to determine appropriate conditions for successful storage of diluted milt at 0-4°C. Calcium-free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS) was the most suitable extender for storage of walking catfish milt. A maximum dilution ratio of milt to Ca-F HBSS of 1:4 was achieved. Extended milt obtained during the mid of spawning season was superior to that during the beginning or end of spawning season. The fifth experiment found that 10% DMSO was the most suitable combination for freezing of sperm based on toxicity experiment of cryoprotectants. The sixth experiment founded that successful cryopreservation of walking catfish milt was obtained using a controlled-rate programmable freezer at freezing rates of 3-10°C/min. The seven experiments were set to test the fertilization capacity of frozen-thawed catfish milt compared to fresh milt. There was no difference in fertilization capacity between frozen-thawed and fresh milt. The eight experiments were designed to evaluate the effect of thawing temperature on post-thaw sperm motility. Suitable temperature for thawing walking catfish sperm was between 30-70°C. The ninth experiment studied changes in the quantity and quality of bacteria in cryopreserved sperm of walking catfish kept in liquid nitrogen. A decrease in bacterial contamination was evident as storage time was increased. The tenth experiment assessed the effect of storage period of cryopreserved milt on change in sperm quality of frozen-thawed milt. After storage for 8 months, a decrease in post-thaw sperm motility was observed although fertilization capacity and hatching rate of cryopreserved semen on eggs were not affected. In the last experiment, a development of simple cryopreservation for walking catfish milt was initiated. Freezing of walking catfish milt in French straw was successful in liquid nitrogen vapour at 4 cm above the surface of liquid nitrogen while that in cryovial was observed at 2 cm above the surface of liquid nitrogen.