

การเก็บรักษาไม้เชื้อปลากะพงแดงแบบแช่เยือกแข็ง

Lutjanus argentimaculatus Forsskal, 1775



นายวิโรจน์ หิรัญชัยพฤกษ์

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2539

ISBN 974-635-007-2

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I1720737X

SPERM CRYOPRESERVATION OF RED SNAPPER

Lutjanus argentimaculatus Forsskål, 1775



Mr. WIROJ HIRUNCHAIYAPUCK

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Biotechnology

Graduate School


Chulalongkorn University

Academic Year 1996

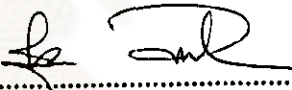
ISBN 974-635-007-2

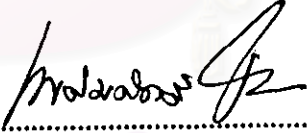
หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดงแบบแช่เยือกแข็ง *Lutjanus*
argentimaculatus Forsskal, 1775
โดย นายวิโรจน์ หิรัญชัยพฤกษ์
สาขาวิชา เทคโนโลยีทางชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เผด็จศักดิ์ จารย์ยะพันธ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร.พองจำ อรรถนัยกานนท์


บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเล่มนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต



.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร.สันติ นงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


.....ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเวียง)


.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เผด็จศักดิ์ จารย์ยะพันธ์)


.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.พองจำ อรรถนัยกานนท์)


.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมณะเศวต)

วิโรจน์ หิรัญชัยพุกฤษ : การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดงแบบแช่เยือกแข็ง *Lutjanus argentimaculatus* Forsskal, 1775 อ.ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เมตติศักดิ์ จารยะพันธุ์ อ.ที่ปรึกษาร่วม อาจารย์ ดร.พองจำ อรรถยกานนท์, 76 หน้า. ISBN 974-635-007-2

ในการศึกษาลักษณะของน้ำเชื้อปลากะพงแดง *Lutjanus argentimaculatus* Forsskal, 1775 พบว่า ลักษณะโดยทั่วไปของอสุจิปลากะพงแดงคล้ายกับอสุจิในปลากระดูกแข็งทั่วไป โดยมีส่วนหัวค่อนข้างกลม และไม่มีอโครโซม ความหนาแน่นเฉลี่ยของอสุจิที่นับได้เท่ากับ 20.94×10^6 เซลล์ต่อมิลลิเมตร ระดับการเคลื่อนที่ของอสุจิประมาณ 9-10 โดยมีอัตราการเคลื่อนไหวเฉลี่ยและมีเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตนับได้จากการย้อมสี Eosin-Nigrosin เท่ากับ 50.99% และ 69.43% ตามลำดับ

ในการศึกษาสูตรน้ำยาเจือจาง และสารรักษาสภาพที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อ พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละสูตรของน้ำยาเจือจาง ($P=0.233$) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตพบว่า สูตรน้ำยา Modified Cortland Solution, Asever's Solution และ Glucose Normal Saline Solution ให้เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตสูงกว่าสูตรน้ำยาอื่นๆ สำหรับการศึกษาหาสารรักษาสภาพที่เหมาะสมพบว่ามี ความแตกต่างกันทางสถิติในการใช้สารรักษาสภาพ ($P < 0.001$) โดยการใช้ DMSO เป็นสารรักษาสภาพ ให้เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตสูงกว่าการใช้ Glycerol เป็นสารรักษาสภาพ โดยมีสมการเส้นตรงระหว่างความสัมพันธ์ของเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตจากการใช้ DMSO เป็นสารรักษาสภาพกับเวลา เขียนได้เป็น $Y = 46.07 - 9.58X$ ($R^2 = 0.888$) โดย $Y =$ เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตซึ่งนับได้จากการย้อมสี (LDS) และ $X =$ ค่า Natural logarithm ของระยะเวลาในการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งเป็นวัน โดยระยะเวลาในการทดลองเท่ากับ 188 วัน

การศึกษาถึงผลของวิธีการลดอุณหภูมิ อันได้แก่ การลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว การลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ และการลดอุณหภูมิโดยการทำให้เป็นเกล็ด ต่ออัตราการรอดของอสุจิ โดยพิจารณาจากเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิต พบว่าการลดอุณหภูมิด้วยวิธีการทำให้เป็นเกล็ดให้เปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีชีวิตสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$) สำหรับการศึกษากรรมวิธีในการเพิ่มอุณหภูมิของอสุจิที่เก็บรักษาไว้ โดยการละลายอย่างช้าๆ การละลายที่อุณหภูมิห้อง และการละลายที่ 60°C พบว่าทั้งสามวิธีให้ผลที่ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P = 0.215$)

เมื่อพิจารณาโดยรวมแล้วสามารถสรุปได้ว่า การใช้ Asever's Solution + 10% DMSO และลดอุณหภูมิ ด้วยการทำให้เป็นเกล็ด และเพิ่มอุณหภูมิโดยการอุ่นที่ 60°C เป็นวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดงแบบแช่เยือกแข็งที่ดีที่สุด โดยให้เปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตสูงที่สุดในการทดลองนี้เท่ากับ $75.67 \pm 10.89\%$

ภาควิชา.....
สาขาวิชา.....เทคโนโลยีอาหารสัตว์
ปีการศึกษา.....2539

ลายมือชื่อนิติกร.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C626989
KEY WORD:

MAJOR BIOTECHNOLOGY

SPERM / SPERMATOZOA / CRYOPRESERVATION / RED SNAPPER

WIROJ HIRUNCHAIYAPUCK : SPERM CRYOPRESERVATION OF RED SNAPPER *Lutjanus argentimaculatus* Forsskål, 1775. THESIS ADVISOR : ASSISTANT PROFESSOR PADERMSAK JARAYABHAND, Ph.D. THESIS COADVISER : PORCHAM ARANYAKANANDA, Ph.D. 76 pp. ISBN 974-635-007-2

The study on sperm characteristics of Red Snapper *Lutjanus argentimaculatus* Forsskål, 1775 revealed that they are similar to most teleosts with round head shape and lack of acrosome. Average sperm density was 20.94×10^6 cells per ml. Sperm motility ratings between 9-10. Average sperm motility and percent of live sperm detected by Eosin-Nigrosin stained were 50.99%, was 69.43%, respectively.

The next part of this study involved types of diluent and cryoprotectant. It was found that the effect of diluent on sperm preservation was not significant ($P = 0.233$). However, Modified Cortland Solution, Alsever's Solution and Glucose Normal Saline Solution as diluent gave higher percent of live sperm than other. The study on two types of cryoprotectant showed that DMSO gave a significant higher percent of live sperm than that of glycerol ($P < 0.001$). The linear equation between percent of live sperm and time when using DMSO is $Y = 46.07 - 9.58X$ ($R^2 = 0.888$) where as $Y =$ percent of living sperm by counting from LDS (Live-dead stain) and $X =$ natural logarithm of storage time (day). 188 days of the experiment.

The study on freezing methods, i.e. rapid freezing method, slow freezing method and pelleting method by checking percent of live sperm was also conducted. It was found that the pelleting method resulted in the highest percent of live sperm ($P < 0.001$) There was no significantly difference among thawing method, i.e. thawing in low temperature, room temperature and high temperature (60°C) ($P = 0.215$).

Finally can be concluded from this study that Alsever's Solution + 10% DMSO freezing by pellets method and thawing in 60°C is the best procedure for sperm cryopreservation. This procedure results in $75.67 \pm 10.89\%$ of live sperm.

ภาควิชา.....

สาขาวิชา..... เกษตรเทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา..... ๒๕39

ลายมือชื่อนิสิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยการเพาะเลี้ยงปลาทะเล ของ สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เผด็จศักดิ์ จารยะพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้โอกาส และสนับสนุนในการทำวิจัย ตลอดจนให้คำปรึกษาในด้านต่างๆ รวมทั้งเงินทุนส่วนหนึ่งในวิทยานิพนธ์นี้ และขอกราบขอบพระคุณ ดร.พองจำ อรรถยกานนท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้ให้ความกรุณาปรึกษาในด้านแนวคิดและแผนการดำเนินงาน ตลอดจนสนับสนุนตัวอย่างพ่อพันธุ์ปลากระพงแดงในการทดลอง

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเสวต ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เผด็จศักดิ์ จารยะพันธุ์ ดร.พองจำ อรรถยกานนท์ และอาจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเขียร ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้ข้อคิดเสนอแนะ รวมทั้งให้ความกรุณาตรวจสอบรายละเอียดต่างๆ ในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรจิตวิกรกุล อาจารย์ ดร.เจริญ นิตธรรมยง อาจารย์ ดร.วรรณพ วิทยาญจน์ และดร.ประสาท กิตตะคุปต์ ที่กรุณาให้ความสนับสนุนคำปรึกษาในด้านการออกแบบการทดลอง และเป็นกำลังใจอย่างดียิ่งเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ณีฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์ และอาจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์ ที่ได้ให้ความกรุณา และเป็นกำลังใจอย่างดียิ่งแก่ผู้เขียนในการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบพระคุณ คุณธานีนทร สิงหะไกรวรรณ จากศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก ที่ได้กรุณาสนับสนุนตัวอย่างน้ำเชื้อปลากระพงแดง

ขอขอบคุณสุธิดา สุวรรณโกสม ที่ได้เอื้อเฟื้อที่พัก

ขอขอบคุณ คุณนุตล โมฬี เจ้าหน้าที่ และคณงาน ของสถานีวิจัยวิทยาศาสตร์ทางทะเลและศูนย์ฝึกนิสิต เกาะสีชัง สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่กรุณาช่วยในการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อปลากระพงแดง

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้เงินสนับสนุนในงานวิจัยนี้บางส่วน

ขอขอบคุณพี่ เพื่อน และน้องๆ ทุกท่าน ที่ได้ให้กำลังใจ และความช่วยเหลือในงานวิจัยโดยเฉพาะคุณวรินทร์ มโนสิทธิศักดิ์ คุณปรมสุดา สมาน คุณอนุภาพ พานิชผล คุณรุ่งตะวัน ยมหล้า คุณปิยะวรรณ ไหมละเอียด คุณปิยะนารถ ตุ่มวอน

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ คุณอา พี่ชาย และน้องๆทุกคนที่เป็นกำลังใจให้ผู้เขียนมาโดยตลอด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญรูป.....	ญ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. สํารวจเอกสาร.....	5
3. เทคนิค และวิธีในการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดง.....	19
4. ชนิดของน้ำยาเจือจาง และสารรักษาสภาพที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ.....	29
5. ผลกระทบจากกรรมวิธีในการแช่เยือกแข็ง และการละลายที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ.....	41
6. สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ.....	60
รายการอ้างอิง.....	62
ภาคผนวก.....	67
ประวัติผู้เขียน.....	76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดงอัตราส่วนในการละลายของสารละลายส่งผลต่ออัตราการเคลื่อนไหวของ อสุจิปลา Rainbow trout.....	9
2. แสดงอัตราเฉลี่ยในการลดอุณหภูมิจากการเก็บน้ำเชื้อด้วยเทคนิคการใช้หลอด Vial, หลอดฟาง และการทำให้เป็นเกล็ด.....	11
3. แสดงองค์ประกอบของน้ำยาเจือจางที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีแช่เยือกแข็ง.....	12
4. แสดงระดับของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่ตรวจสอบได้จากการทดลองที่ 1.....	26
5. แสดงปริมาณสารที่ใช้ในการเตรียมน้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ.....	30
6. แสดงผลทางสถิติ (ANOVA) ที่ได้จากเปอร์เซ็นต์ของอสุจิที่มีชีวิตที่เวลา 188 วัน.....	34
7. แสดงคุณภาพของตัวอย่างน้ำเชื้อที่เก็บไว้ ณ เวลาต่างๆ เปรียบเทียบโดยการใช้ DMSO และ Glycerol เป็นสารรักษาสภาพ.....	35
8. แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Modified Cortland Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีต่างๆ.....	47
9. แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Modified Cortland Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ.....	48
10. แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Modified Cortland Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิด้วยการทำให้เป็นเกล็ด และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ.....	49
11. แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Alsever's Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ.....	50
12. แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Alsever's Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ.....	51
13. แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Alsever's Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิด้วยการทำให้เป็นเกล็ด และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ.....	52
14. แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Glucose Normal Saline Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีต่างๆ.....	53
15. แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Glucose Normal Saline Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการต่างๆ.....	54
16. แสดงผลของคุณภาพน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บด้วย Glucose Normal Saline Solution ร่วมกับ 10% DMSO โดยลดอุณหภูมิด้วยการทำให้เป็นเกล็ด และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีการ ต่างๆ.....	55

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. แสดงขอบเขตการแพร่กระจายของปลากะพงแดง.....	6
2. ก) แสดงคู่ของเชื้อยวบริเวณกรมด้านบนของปลากะพงแดง (<i>L. argentimaculatus</i>) ข) แสดงภาพกรมของปลาหมอสี (<i>L. johnii</i>) ที่ไม่มีเชื้อ.....	6
3. แสดงกรรมวิธีในการเก็บน้ำเชื้อปลากะพงแดง.....	25
4. แสดงลักษณะสีของน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่เก็บได้.....	23
5. แสดงลักษณะ และขนาดของตัวอสุจิปลากะพงแดงที่ตรวจพบภายใต้ กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย x 100.....	24
6. แสดงการติดสีของอสุจิปลากะพงแดง เมื่อทำการย้อมด้วยสีย้อม Eosin-Nigrosin.....	25
7. แสดงในแผนภาพการทดลองลดอุณหภูมิในการเก็บน้ำเชื้อแช่เยือกแข็งของ ปลากะพงแดง.....	32
8. แสดงอัตราการลดลงของอสุจิที่มีชีวิตที่ระยะเวลาต่าง ๆ เปรียบเทียบระหว่าง DMSO และ Glycerol ในการเป็นน้ำยารักษาสภาพ.....	36
9. แสดงเส้นสมการของอสุจิที่มีชีวิตที่เวลาต่าง ๆ เมื่อใช้ DMSO และ Glycerol เป็นน้ำยารักษาสภาพ.....	37
10. แสดงแผนภาพกรรมวิธีการลดอุณหภูมิในแบบต่างๆ.....	44
11. แสดงแผนภาพกรรมวิธีในการเพิ่มอุณหภูมิแบบต่างๆ.....	45
12. แสดงเปอร์เซ็นต์อสุจิที่มีชีวิตภายหลังจากการลด และเพิ่มอุณหภูมิด้วยวิธีต่างๆ.....	56

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย