3233

กิจกรรมทางชีวเคมีของตัวอสุจิในการปฏิสนธิของปลานิล

Biochemical Activity of Sperm in the Fertilization of Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

โดย

นาง ประภาพร อุทารพันธุ์

และ

นาย วิชัย วัฒนกุล

ปลานิล - วิจัย

กพผ.
เลขหมู่ QL639.2 ป11 2533
เลขทะเบียน 016946
-4 มี.ค. 2535

รายงานโครงการวิจัย

ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณ คณะวิทยาศาสตร์ ประจำปี 2532

ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

การศึกษากิจกรรมของตัวอสุจิอาจเป็นวิธีการหนึ่งที่ช่วยพัฒนาเทคนิคการเพาะพันธุ์ปลา ให้เพียงพอแก่ความต้องการบริโภค ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดผสมพันธุ์ตลอดปี แพร่พันธุ์ได้ง่าย เจริญเติบโตเร็วและมีราคาไม่แพง จึงเหมาะต่อการเป็นปลาตัวอย่างสำหรับการศึกษาครั้งนี้

การเคลื่อนที่และเวลาของการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ มีบทบาทสำคัญต่อการปฏิสนธิ ปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ก็มีผลกระทบต่อการปฏิสนธิด้วย ตัวอสุจิปลานิลเคลื่อนที่ในน้ำจืดสังเคราะห์ที่ประกอบด้วย 1.5 mM NaCl, 0.5 mM KCl, 1.0 mM $CaCl_2$ และ 0.5 mM $MgSO_4$ ใน 10 mM Tris-HCl, pH 7.0 ได้ 72.50 ± 1.89 % ซึ่งดีกว่าในน้ำจืดธรรมชาติกรอง (43.08 ± 1.45 %) และในน้ำกลั่น (33.03 ± 7.15 %) ที่ pH เดียวกัน ตามลำดับ และเคลื่อนที่ได้นาน 7, 3 และ 2 นาที ตามลำดับ ไอออนแต่ละชนิดได้แก่ Na^+, K^+, Ca^{2+} และ Mg^{2+} ที่ความเข้มข้นเท่าเทียมกับในน้ำจืดสังเคราะห์ มีผลเพิ่มเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิเช่นกันกับของน้ำจืดสังเคราะห์แต่น้อยกว่า ตัวอสุจิเคลื่อนที่ได้ดีที่สุดในตัวกลางที่มี pH 7.0 ตัวกลางที่เป็นกรดหรือเป็นด่างมากขึ้นมีผลลดการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลง การสั่นไหวของหางตัวอสุจิเกิดมากขึ้นตามความเข้มข้นของ ATP ที่เพิ่มขึ้นและเกิดมากสุดที่ 1.0 mM ATP บ่งชี้ให้เห็นว่า ATP อาจเป็นแหล่งพลังงานที่ใช้ในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิปลานิล

ในการศึกษาเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ โดยใช้ตัวยับยั้งซึ่งได้แก่ 1-Methyl-3-isobutyl-xanthine (MIX), Sodium vanadate, 1-Fluoro-2,4-dinitrobenzene (FDNB) และ Quabain ซึ่งเป็นตัวยับยั้งของเอนไซม์ Phosphodiesterase, Dynein ATPase, Creatine Kinase และ Na^+/K^+-ATPase ตามลำดับ พบว่า MIX กระตุ้นให้เกิดการสั่นไหวของหางตัวอสุจิ ในขณะที่ FDNB และ Sodium Vanadate ยับยั้งการสั่นไหวของหางตัวอสุจิ และค่าการยับยั้งการสั่นไหวของหางตัวอสุจิ 50 % ($K_{0.5}$) ของ FDNB และของ Sodium vanadate เท่ากับ 1.6 µM และ 25 µM ตามลำดับ แอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์ Na^+/K^+-ATPase, Dynein ATPase และ Creatine Kinase ของตัวอสุจิปลานิลมีค่าเป็น 20.85,76.22 และ 794.48 nmole/min/mg Protein ตามลำดับ และมีค่า $K_{0.5}$ ของ Quabain, Sodium vanadate และของ FDNB ต่อการยับยั้งแอคทิวิตี้ของเอนไซม์ Na^+/K^+-ATPase, Dynein ATPase และ Creatine kinase เท่ากับ 1.6 mM, 25 µM และ1.8 µM ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับค่า $K_{0.5}$ ของการยับยั้งการสั่นไหวของหางตัวอสุจิ

โดย Sodium vanadate และ FDNB พบว่ามีค่าเท่าหรือใกล้เคียงกันแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ Dynein ATPase, Creatine Kinase และอาจรวมทั้ง Na^+/K^+-ATPase มีบทบาทช่วยในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ เพราะตัวยับยั้งของเอนไซม์เหล่านี้สามารถยับยั้งแอคทิวิตี้จำเพาะของเอนไซม์และยับยั้งการสั่นไหวของหางตัวอสุจิได้พอ ๆ กัน ซึ่งต่างจากเอนไซม์ Phosphodiesterase ที่มีบทบาทในทางตรงกันข้าม ทั้งนี้เพราะตัวยับยั้งของเอนไซม์ช่วยเพิ่มอัตราการสั่นไหวของหางตัวอสุจิ

Ionophore A23187 ไม่สามารถกระตุ้นตัวอสุจิของปลานิลให้เกิดปฏิกิริยาอะโครโซมในน้ำจืดสังเคราะห์ที่ pH 7.0 ได้ ในขณะที่การปฏิสนธิของตัวอสุจิเกิดได้ดีที่สุดในน้ำจืดสังเคราะห์ รองลงมาคือในน้ำจืดธรรมชาติกรองและน้ำกลั่น ตามลำดับ โดยมีการปฏิสนธิเป็น 77.60 ± 2.04, 62.40 ± 2.04 และ 55.20 ± 1.50 % ตามลำดับ ส่วนการปฏิสนธิใน 10 mM Tris-HCl ที่มี pH 4-9 พบว่าจะดีที่สุดที่ pH 7.0 (80.00 ± 2.04 %) และการปฏิสนธิจะลดลงในด่างที่เป็นกรดหรือเป็นด่างมากขึ้น

จากการศึกษาโปรตีนในซีรัมของปลานิล *Oreochromis niloticus* ไม่พบโปรตีนเพศผู้ ทั้งปลานิลเพศผู้และเพศเมียซึ่งมีวัยเจริญพันธุ์ต่าง ๆ กันมีแบบแผนของโปรตีนในซีรัมใน 7% SDS-PAGE ไม่แตกต่างกัน จึงทำให้ไม่สามารถนำโปรตีนในซีรัมมาใช้ในการบ่งบอกความสมบูรณ์เพศแทนค่าดัชนีการสืบพันธุ์ และใช้ในการคัดเลือกพ่อ-แม่พันธุ์ได้