บทที่ 2
การสำรวจเอกสารผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

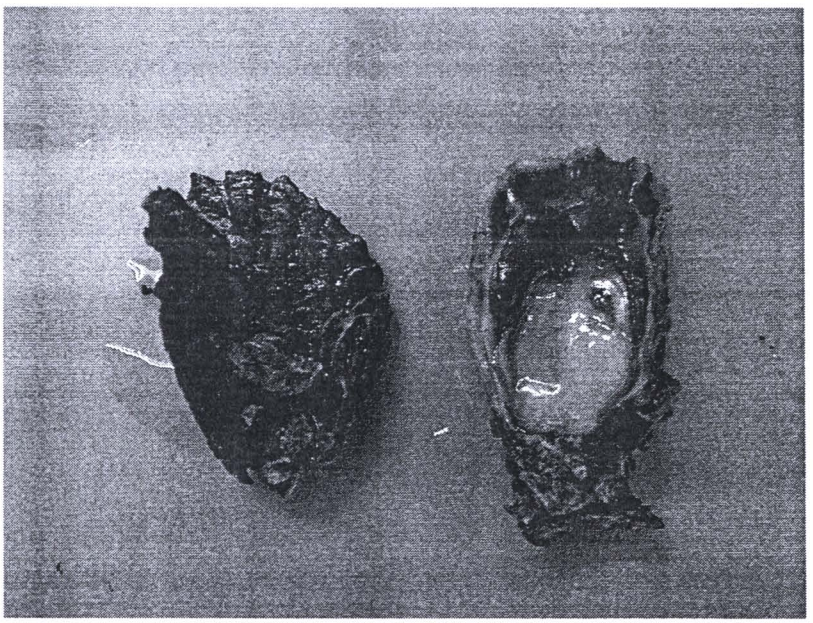
ลักษณะทั่วไปหอยนางรมปากจีบ

หอยนางรมปากจีบ (Rock oyster) หรือหอยเจาะ หอยอีรม เรียกแตกต่างกันไปแต่ละท้องที่ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Saccostrea cucullata* หอยนางรมปากจีบพบทั่วไปในทะเลบริเวณชายฝั่ง อาศัยอยู่ทั้งในน้ำกร่อยและในทะเลพบชุกชุมบริเวณที่มีน้ำขึ้นน้ำลงอยู่เป็นประจำ เช่น บริเวณที่ตื้นตามปากแม่น้ำและลำคลอง ตามชายเกาะหรือชายฝั่งที่มีกระแสน้ำหมุนเวียนถ่ายเทดี

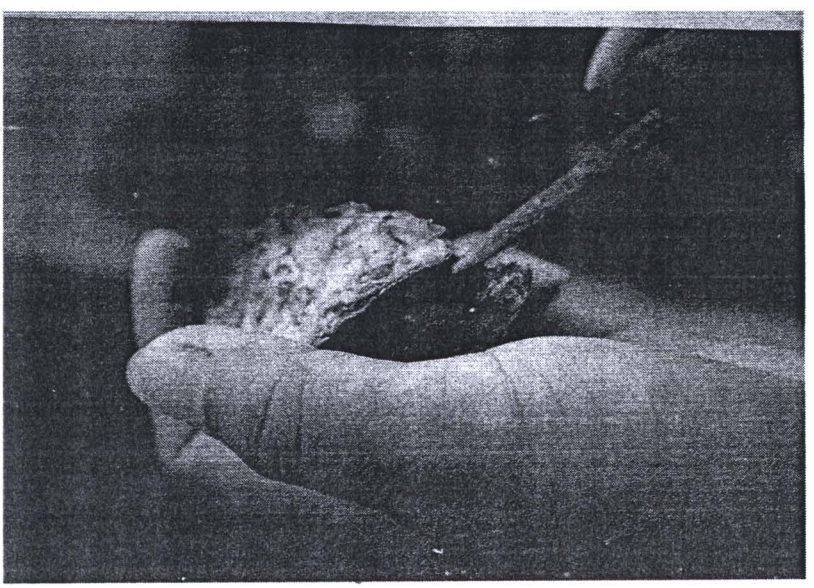
หอยนางรมที่มีการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ หอยนางรมพันธุ์เล็กหรือหอยนางรมปากจีบ ที่เลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในจังหวัดชลบุรี จันทบุรี และตราด ส่วนหอยนางรมอีกกลุ่มเป็นหอยนางรมพันธุ์ใหญ่หรือที่รู้จักกันดีว่าหอยตะโกรม ได้แก่ หอยตะโกรมกรามดำ (*Crassostrea iredalei*) พบได้ในแหล่งเลี้ยงหอยจังหวัดชลบุรี จันทบุรี ตราด และทางภาคใต้จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และระนอง หอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*) พบมากในแหล่งเลี้ยงหอยบริเวณจังหวัดสุราษฎร์ธานี ระนอง พังงา สงขลา กระบี่ และปัตตานี เป็นต้น (วันทนา อยู่สุข, 2543) สถานการณ์การเพาะเลี้ยงและผลผลิตหอยนางรมของประเทศไทยในปี 2533 มีมูลค่าประมาณ 5,325.95 บาทต่อไร่ แต่ในปี 2541 มูลค่ารายได้ที่ได้จากหอยนางรมสูงถึง 128,710.26 บาทต่อไร่ (กรมประมง, 2543)

หอยนางรมเป็นหอยสองฝาที่เกาะอยู่กับที่ มีเปลือกทั้งสองข้างมีขนาดไม่เท่ากัน ขอบเปลือกมีรอยหยักไม่สม่ำเสมอลักษณะเป็นจีบ เปลือกข้างซ้ายติดอยู่กับวัตถุที่เป็นของแข็ง (คเชนทร เฉลิมวัฒน์, 2544) และเป็นเปลือกที่มีขนาดใหญ่มีลักษณะเป็นถ้วย ส่วนเปลือกด้านขวาของหอย ซึ่งเป็นเปลือกด้านบนมีลักษณะแบนเรียบและมีขนาดเล็กกว่า มีแผ่นเกล็ดตามขอบเปลือก เปลือกหอยนางรมทั้งสองเชื่อมติดกันด้วยบานพับ (รูปที่ 1) รูปร่างลักษณะเปลือกหอยนางรมไม่คงที่ แม้จะเป็นชนิดเดียวกัน เนื่องจากสภาพพื้นที่อาศัย และวัตถุที่ลูกหอยลงเกาะต่างกัน เช่น ถ้าหอยเติบโตบนพื้นที่แข็ง เปลือกจะมีลักษณะขรุขระไม่เป็นทรง (ไพโรจน์ พรหมานนท์, 2526)

ลักษณะทั่วไปภายในเปลือกของหอยนางรมปากจีบเมื่อแกะเปลือกหอยออกมา (รูปที่ 2) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อแผ่นบาง ๆ ห่อหุ้มอยู่ทั้งสองข้าง เรียกว่า เนื้อแมนเทิล (mantle) มีลักษณะเป็นแผ่นริ้วบางแผ่คลุมถึงช่องปาก เหงือกมี 2 คู่ ทำหน้าที่กรองอาหารจากน้ำ ช่วยในการหายใจ และการขับถ่ายของเสียออกจากร่างกายบริเวณกึ่งกลางลำตัว ซึ่งมีกล้ามเนื้อยึดเปลือกซึ่งทำหน้าที่ปิดเปิดเปลือก และถัดเข้าไปเป็นลำตัวที่เป็นที่รวมอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ระบบประสาท ระบบการขับถ่ายของเสีย ระบบการย่อยอาหาร ระบบเลือด และระบบสืบพันธุ์ อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมจะเห็นเป็นเนื้อสีขาวปกคลุมกระเพาะอาหาร



รูปที่ 1 ลักษณะภายนอกและภายในของหอยนางรมปากจีบ



รูปที่ 2 การแกะหอยนางรมปากจีบเพื่อตรวจสอบเพศ

ชีววิทยาการสืบพันธุ์หอยนางรมปากจีบ

โดยทั่วไปหอยนางรมจะมีเพศแยก การจำแนกเพศของหอยนางรม ดูจากลักษณะภายนอกไม่ได้ นอกจากต้องเปิดเปลือกหอยออกแล้วสังเกตดูอวัยวะสืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จึงจะสามารถแยกเพศได้ หอยนางรมตัวผู้และตัวเมียที่มีความสมบูรณ์เพศจะพบว่ามีอวัยวะสืบพันธุ์เป็นสีขาวครีมเหมือนกัน (รูปที่ 3 และ 4)

การสืบพันธุ์ของหอยนางรมเหมือนหอยสองฝาทั่วไป เป็นการสืบพันธุ์ที่อาศัยการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาปฏิสนธิภายนอก (external fertilization) เมื่อไข่และน้ำเชื้อผสมกันจะมีการแบ่งตัวและพัฒนาเป็นลูกหอยวัยอ่อนระยะแรกเรียกว่า โทรโคฟอร์ (trochophore) ซึ่งสามารถว่ายน้ำได้โดยใช้ซิเลีย หอยนางรมจะใช้ชีวิตช่วงหนึ่งเป็นตัวอ่อนในระยะเวลลิเจอร์ (veliger) และเพดิวีลิเจอร์ (pediveliger) มีจุดสีดำ เรียกว่า ตา หรือ eyespot ตัวอ่อนของหอยนางรมจะดำรงชีวิตเป็นแพลงก์ตอนจุนกระทั่งถึงวัยลงเกาะพื้น เรียกหอยในระยะนี้ว่า หอยนางรมวัยเกล็ด ซึ่งจะเติบโตเป็นตัวเต็มวัยต่อไป ระยะเวลาที่ลูกหอยนางรมปากจีบใช้ในการพัฒนาจากแรกผสมพันธุ์จนถึงหอยนางรมวัยเกล็ดใช้เวลานานประมาณ 20-24 วัน ฤดูผสมพันธุ์และวางไข่ของหอยนางรมที่พบในประเทศไทย

ฤดูวางไข่ของหอยนางรมในประเทศไทยจะต่างกันแล้วแต่สถานที่และแตกต่างกันในแต่ละปีขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ความสมบูรณ์ของอาหาร

ชีววิทยาของน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

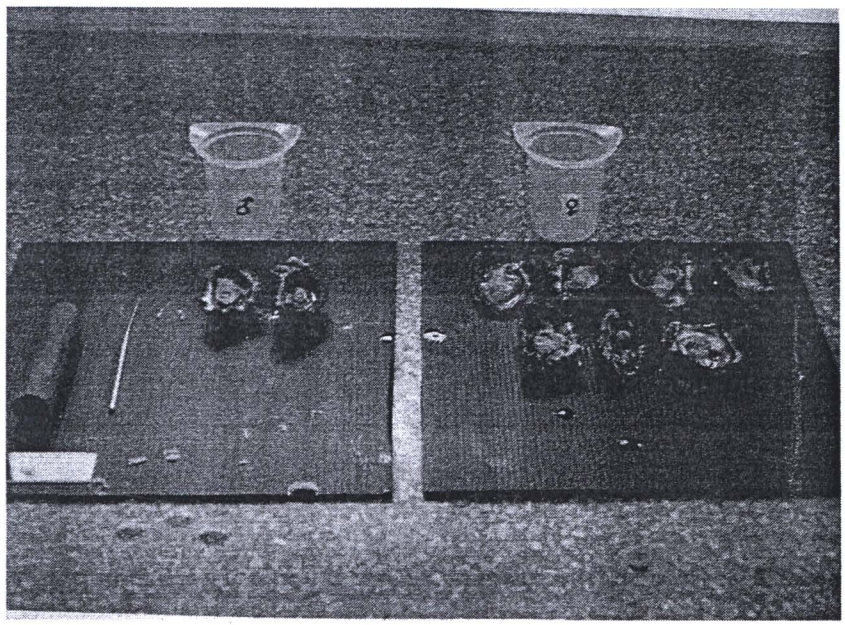
โดยทั่วไปสเปิร์มประกอบด้วยส่วนต่างๆ ดังนี้

1. ส่วนหัว (head) มีความแตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์น้ำโดยในส่วนหัวจะมีนิวเคลียสที่มี ดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรมเพื่อปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ นอกจากนี้อาจพบอะโครโซม ซึ่งแต่เดิมเรียกว่า อพิคอล บอดี้ (apical body) อยู่ภายในส่วนหัวโดยอะโครโซมเปลี่ยนแปลงมาจากกอลจิ บอดี้ (golgi body)

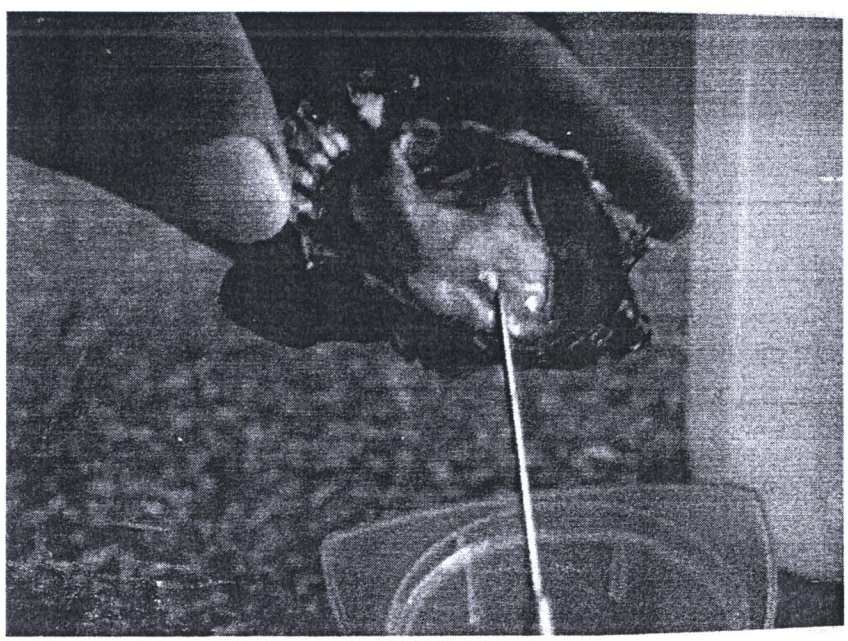
2. ส่วนกลาง (middle piece) เป็นส่วนที่อยู่ติดกับส่วนหัวโดยจะมีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมากที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มในการเคลื่อนที่

3. ส่วนหาง (tail) เป็นส่วนที่มีลักษณะยาวและในส่วนหางจะมีไฟบริล (fibril) อยู่ทั้งหมด 11 คู่ อยู่ตรงกลาง 2 คู่ และอยู่โดยรอบ 9 คู่ในปลาบางชนิดเช่น ปลาแซลมอน ปลาเทร้า ปลาเพรซ ปลาเพิช เป็นต้น พบว่า บริเวณปลายหางสเปิร์มจะเล็กลงเรียกว่า end piece

ปลา และหอยส่วนมากจะมีสเปิร์มที่มีส่วนหัวเป็นรูปทรงกลม (spherical shape) หรือทรงรี (ovate shape) โดยส่วนหัวมีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตรและความยาวสเปิร์มจากหัวจนถึงปลายหางแตกต่างกันไป ส่วนกลางมีขนาดเล็กและส่วนใหญ่มีหางจำนวน 1 หาง (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)



รูปที่ 3 การแยกหอยนางรมปากจีบเพศผู้และเพศเมียที่มีความสมบูรณ์ออกจากกัน



รูปที่ 4 บริเวณที่ตั้งของอวัยวะสืบพันธ์ (gonad) ของหอยนางรมปากจีบ

เซลล์สเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่เมื่อยังอยู่ในตัวสัตว์น้ำเมื่อรีดน้ำเชื้อสดออกมาใหม่ๆ แต่เซลล์สเปิร์มจะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว เมื่อน้ำเชื้อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่เหมาะสม เช่นน้ำเชื้อผสมกับน้ำภายนอกขณะที่พ่อแม่พันธุ์สัตว์น้ำผสมพันธุ์วางไข่ตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำเอาหยดเล็กๆ ของน้ำเชื้อผสมกับหยดน้ำบนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ก็จะพบว่าเซลล์สเปิร์มถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรุนแรง อันเป็นผลเนื่องมาจากการเจือจาง แต่การเคลื่อนที่ดังกล่าวจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็ว ดังนั้นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์น้ำโดยใช้อัตราการเคลื่อนที่เป็นหลักจึงต้องกระทำภายในทันทีทันใดที่น้ำเชื้อสัตว์น้ำผสมกับสารละลายบนกระจกสไลด์ ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีชีวิตอยู่ได้นานเมื่อเจือจางน้ำเชื้อสัตว์น้ำด้วยน้ำยาเจือจาง (extender) ใดๆ ก็ตาม น้ำยาชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวสเปิร์ม เพราะถ้าสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่แล้วแม้ว่าจะเก็บรักษาแช่เย็น หรือแช่แข็งดีเพียงใดก็ตาม ก็ไม่สามารถกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ขึ้นมาได้อีกเพื่อผสมกับไข่ในภายหลัง

Alavi *et al.* (2007) ศึกษาผลของ K^+ และ Ca^{2+}ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา *Perca fluviatilis* พบว่า Ca^{2+} มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยความเข้มข้นที่ 2.5 mM มีผลทำให้เปอร์เซนต์การเคลื่อนที่และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพิ่มขึ้น และเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+} เท่ากับ 5.0 mM เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่ 2.5 mM ส่วน K^+ พบว่าความเข้มข้นของ K^+ ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อเปอร์เซนต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยสเปิร์มจะเริ่มเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 40 mM และจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 80 mM สรุปได้ว่าอัตราการเจือจางของ K^+ และ Ca^{2+} มีผลต่อการเลื่อนที่ ความเร็วในการเคลื่อนที่และเปอร์เซนต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่

Alavi and Cosson (2005) ศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่และการรอดชีวิตของสเปิร์มพบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ การปฏิสนธิ และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มขึ้นอยู่กับการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิ เพราะประสิทธิภาพของสเปิร์มปลามีอยู่อย่างจำกัด อัตราเร็วของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะเพิ่มขึ้น เมื่ออุณหภูมิในสารละลายเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสั้นลง และเมื่อลดอุณหภูมิมีผลทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ช้าลงและระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มนานขึ้น โดยศึกษาผลของอุณหภูมิที่มีต่อการเคลื่อนที่ของปลา *Siberian sturgeon* พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม จะเคลื่อนที่ลดลงเมื่อเพิ่มอุณหภูมิจาก 10 องศาเซลเซียส จนถึง 17.5 องศาเซลเซียส และปลาฉลามปากเป็ด (*Polyodon spathula*) สามารถเคลื่อนที่ได้ 4 นาที แต่มีเพียง 1-5 เปอร์เซนต์เท่านั้นที่สามารถเคลื่อนที่ได้ถึง 6 นาที ที่ 10-12 องศาเซลเซียส

การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อหอย

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหอยที่เหมาะสมมีขั้นตอนที่สำคัญหลายขั้นตอน เริ่มตั้งแต่การนำหอยนางรมออกจากเชือก และต้องระวังอย่าให้หอยนางรมโดนน้ำอีก เพราะจะเป็นการกระตุ้นให้หอยนางรมปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา จากนั้นนำหอยนางรมใส่ถาด และทำการแกะเปลือก เมื่อแกะเปลือกแล้วเอากระดาษซับบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของสิ่งสกปรก หลังจากนั้นใช้เข็มเขี่ยบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ แล้วนำไปตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อแยกดูว่าเป็นไข่หรือสเปิร์ม เมื่อทราบว่าเป็นน้ำเชื้อก็ทำการรีดน้ำเชื้อลงในภาชนะที่เตรียมไว้บนน้ำแข็ง โดยอุปกรณ์ที่ใช้รีดควรมีความสะอาด ปราศจากเชื้อ และควรรีดน้ำเชื้อเบา ๆ เพราะอาจทำให้กระเพาะอาหารที่อยู่ติดกับบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์แตกออกมา ทำให้เศษอาหารมาปนเปื้อนกับน้ำเชื้อ และน้ำเชื้อหอยมีคุณภาพลดลง จากนั้นนำน้ำเชื้อที่ได้ไปประเมินคุณภาพน้ำเชื้อต่อไปก่อนนำน้ำเชื้อไปใช้ในการทดลองอื่นๆต่อไป

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของหอย ทำให้ทราบถึงคุณภาพของน้ำเชื้อที่ดีก่อนที่จะนำไปใช้ว่ามีความเหมาะสมมากน้อยเพียงไร โดยวิธีประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์น้ำ มี 3 วิธีหลัก ดังนี้

1. <u>ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ</u>

การประเมินทางกายภาพสามารถประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถประเมินได้โดยรีดน้ำเชื้อออกมาจากสัตว์น้ำหรือจากตัวหอย แล้วสังเกตลักษณะของน้ำเชื้อว่ามีความเหมาะสมอย่างไรเมื่อดูสีของน้ำเชื้อ และสิ่งเจือปนอื่น ๆ โดยน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีควรมีสีขาวขุ่น ไม่มีสิ่งเจือปน ไม่ว่าจะเป็นเมือก เลือด ปัสสาวะ หรือเศษอาหาร

2. <u>การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม</u>

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม สามารถพิจารณาได้ทั้งในแง่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การประเมินทำโดยสุ่มประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำในกล้องจุลทรรศน์ โดยกำหนดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มระดับต่างๆ เช่นกำหนดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อถูกกระตุ้นเป็น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100% (Vuthiphandchai et al., 1999)

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแบบนี้ต้องมีการฝึกประเมินอย่างสม่ำเสมอและใช้ประสบการณ์ความชำนาญในการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ เนื่องจากเป็นการประเมินแบบประมาณการ (subjective assessment) แม้ว่าจะมีความเที่ยงตรงต่ำกว่าการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ใช้เครื่องมืออัตโนมัติที่มีราคาแพง ซึ่งผู้ประกอบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำขนาดเล็ก และขนาดกลางไม่สามารถจัดซื้อเครื่องมือมาใช้ได้ การประเมินในลักษณะเช่นนี้น้ำเชื้อที่รวบรวมได้จะต้องไม่สัมผัสน้ำ เนื่องจากน้ำเชื้อของสัตว์น้ำไม่ว่าจะเป็นน้ำเชื้อของปลา และหอย เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำ

สเปิร์มจะมีการเคลื่อนที่ทันที และหยุดเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว ดังนั้นการรวบรวมน้ำเชื้อของปลาและหอยต้องไม่ให้น้ำเชื้อสัมผัสน้ำในระหว่างการนำไปประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หรือนำไปใช้ทดลองอื่นๆต่อไป

3. การประเมินการมีชีวิตของสเปิร์ม

การประเมินน้ำเชื้อวิธีนี้ ทำโดยการย้อมดูสเปิร์มที่มีชีวิตว่ามีมากน้อยอย่างไร เมื่อเปรียบเทียบกับสเปิร์มทั้งหมด การประเมินมีหลักว่า สเปิร์มที่ตายจะติดสีย้อมเนื่องจาก สเปิร์มตาย ทำให้ผนังเซลล์ (cell membrane) ไม่สามารถป้องกันไม่ให้สีย้อมเข้ามาในเซลล์ได้ ดังนั้นสเปิร์มที่ตายจึงติดสีย้อม ในขณะที่สเปิร์มที่มีชีวิต จะไม่ติดสีย้อม เนื่องจากผนังเซลล์สามารถป้องกันสีย้อมไม่ให้ซึมผ่านเข้ามาในเซลล์ได้ วิธีนี้มีความเที่ยงตรง แต่ก็อาจมีความผิดพลาดได้ระหว่างขั้นตอนการย้อมสี และการ fix ตัวอย่าง ซึ่งถ้าไม่ทำด้วยความระมัดระวังก็จะทำให้การประเมินพบสเปิร์มที่ตายมากเพิ่มขึ้น การตรวจสอบวิธีนี้สามารถทำควบคู่กับวิธีที่ 2 จะทำให้ผลการตรวจสอบคุณภาพน้ำเชื้อดีขึ้น

สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer or extender)

สารละลายบัฟเฟอร์ หรือเอ็กซ์เทนเดอร์ คือ น้ำยาที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อสัตว์น้ำก่อนการนำน้ำเชื้อสัตว์น้ำมาแช่แข็ง โดยที่เป็นสารละลายที่มีความสำคัญในการช่วยคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์ในระหว่างการแช่เย็นระยะสั้นๆก่อนการแช่แข็ง จึงเป็นสารละลายที่ช่วยคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์สเปิร์มก่อนและระหว่างการแช่แข็ง สารละลายบัฟเฟอร์ช่วยเจือจางน้ำเชื้อให้มีปริมาณมากขึ้น (extended semen) เพื่อสะดวกในการปฏิบัติการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ ดังนั้นสารละลายบัฟเฟอร์ที่ดีจะต้องไม่ส่งผลกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ เพราะถ้าสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ก่อนการแช่แข็งน้ำเชื้อ ก็ไม่มีประโยชน์ที่จะนำไปแช่แข็ง และเก็บรักษาต่อไป โดยทั่วไปส่วนประกอบทางเคมีของสารละลายบัฟเฟอร์ควรประกอบด้วยอิออน หรือแร่ธาตุชนิดต่างๆที่ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเลือด (seminal Plasma) และน้ำยาต้องมีค่าแรงดันออสโมติก (osmotic pressure) ใกล้เคียงกับค่าแรงดันออสโมติกของน้ำเลือด อย่างเช่น สัตว์น้ำจืด Extender ที่ใช้ควรมีค่าออสโมลาริตี้ 280-300 mOsmol/kg ส่วนสัตว์น้ำเค็มควรใช้ Extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ 200-300 mOsmol/kg (Wayman and Tiersch, 2000)

การหาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญในการแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ เนื่องจากสตว์น้ำแต่ละชนิดจะมีค่าออสโมลาลิตี้ในเซลล์และส่วนประกอบของแร่ธาตุในเซลล์ต่างกันจึงต้องเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ที่ต่างกันด้วย ดังเช่นในสเปิร์มของปลาและหอยที่สเปิร์มมีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้น จึงใช้สาร extender เฉพาะสำหรับแต่ละชนิด เช่น หอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor supertexa*) (Gwo et al., 2002) และหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) (Paniagua-

Chavez and Tiersch, 2001) ใช้ Extender ที่มีชื่อว่า Artificial Seawater อย่างไรก็ตามสเปิร์มของกุ้ง และปูไม่เคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นก็ต้องใช้สาร extender ที่เหมาะสมในการแช่แข็งถุงน้ำเชื้อ (spermatophore) เช่นกันเช่น กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ได้มีการศึกษาในเรื่องของ extender พบว่าสารละลาย Ca-Free Saline ไม่มีผลต่อรูปร่างของสเปิร์ม นอกจากนี้ extender ประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นแหล่งพลังงาน และสารเคมีบางตัวทำหน้าที่ต้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือมีส่วนประกอบที่เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

การแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็ง เป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวอุณหภูมิที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้มีความเกี่ยวข้องกับตัวแปรจำนวนมาก ได้แก่ การเลือกใช้สูตรน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ ชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไดโอโพรเทคแทนท์ (สารที่ช่วยป้องกันการเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง) ระยะสมดุล (equilibration time หรือช่วงระยะเวลาหลังจากผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนเริ่มทำการแช่แข็ง) และอัตราการลดอุณหภูมิ (cooling rate) และอัตราการละลาย (thawing rate) ซึ่งถ้ามีการปฏิบัติและเลือกใช้ตัวแปรอย่างถูกต้องเหมาะสมกับน้ำเชื้อสัตว์น้ำแต่ละชนิดอย่างเหมะสม ก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำได้นานหลายปี เมื่อจะนำมาใช้ก็นำออกมาละลายด้วยวิธีการและอุณหภูมิที่เหมาะสม ทำให้ผลการเพาะฟักผสมเทียมที่มีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด ดังนั้นตลอดเวลาที่ผ่านมาประมาณ 30 กว่าปี จึงมีผู้ศึกษาทดลองพัฒนาวิธีการเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำหลายๆชนิด ให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด แม้ว่างานวิจัยการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำส่วนมากได้ศึกษาในปลาน้ำจืด และปลาทะเล โดยการศึกษาในหอยมีค่อนข้างจำกัด

การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำแบบแช่แข็งมีหลักการทำงานที่คล้ายกันแต่ความสำเร็จที่ได้ส่วนมากแล้วมีความแตกต่างกันไปในสัตว์น้ำแต่ละชนิดทั้งในแง่ของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ตามที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบจึงต้องเริ่มจากการนำเอาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับหอยซึ่งต้องไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่มาเจือจางน้ำเชื้อ แล้วจึงนำไปผสมด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ ที่เวลาต่างๆกันเพื่อดูความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์ม จากนั้นจึงใช้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งที่แตกต่างกันโดยมีสมมติฐานว่าความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมปากจีบขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดและระดับของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม รวมทั้ง การเลือกรูปแบบการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสม ขณะแช่แข็ง

งานวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำเศรษฐกิจมีการศึกษาน้อยมากในประเทศไทย ซึ่งสาเหตุหนึ่งเกิดจากผู้ประกอบการสัตว์น้ำในประเทศไทย สามารถหาพ่อพันธุ์สัตว์น้ำได้ง่าย เนื่องจากสภาพอากาศที่ร้อนของประเทศไทย ทำให้ความสมบูรณ์เพศพ่อพันธุ์สัตว์น้ำเกิดได้ง่ายกว่า พ่อพันธุ์สัตว์น้ำในต่างประเทศที่อยู่ในเขตหนาว ซึ่งความสมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์จะเกิดขึ้นช้ากว่า จึงทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำนิยมศึกษามากในต่างประเทศ อย่างไรก็ตามในความเป็นจริงแล้วปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีในสัตว์น้ำหลายชนิดในประเทศไทยเป็นปัญหาที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อภาคการผลิตในโรงเพาะฟัก เช่นบ่อยครั้งที่ไม่สามารถหาพ่อพันธุ์ได้ขณะแม่พันธุ์มีความพร้อมในการผสมพันธุ์ หรือคุณภาพน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ในขณะที่แม่พันธุ์มีไข่ที่มีคุณภาพ เป็นต้น (Nell, 2002; Vuthiphandchai et al., 2009a; 2009b) ดังนั้นการวิจัยด้านการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำในประเทศไทยจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพื่อประโยชน์ทั้งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการอนุรักษ์สัตว์น้ำ

Gwo *et al.* (1991) ได้ศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker แบบแช่แข็ง พบว่า sperm extender ที่ประกอบด้วย เกลือแกง กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อขณะทำการแช่แข็ง โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ sperm extender ชนิดอื่นๆ ที่มีความสลับซับซ้อน หรือมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ และยังพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งตั้งแต่ –10 องศาเซลเซียส/นาที จนถึง –150 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิขณะนำมาผสมกับไข่

Conget *et al.* (1996) ใช้ cryoprotectant ต่างๆชนิด ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา rainbow trout แบบแช่แข็ง พบว่า การใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ร่วมกับ sucrose ให้ผลดีที่สุดในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยระยะเวลาที่เจือจางน้ำเชื้อใน cryoprotectant ก่อนทำการแช่แข็งไม่ควรเกิน 10 นาที และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งอย่างรวดเร็ว (30 องศาเซลเซียส/นาที) มีผลทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงกว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ (1 องศาเซลเซียส/นาที และ 10 องศาเซลเซียส/นาที)

Gwo *et. al.* (2002) ทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งของหอยเป๋าฮื้อ *(Haliotis diversicolor supertexa)* ทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ต่อสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 8 ชนิด คือ dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMA), ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), butylenes glycol (BG), polyethylene glycol, glycol and methanol ที่ความเข้มข้น 5-25% และประเมินการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 60 นาที ที่ 25°C พบว่า 100% DMSO ที่เจือจางด้วย ASW ในอัตราส่วน 1:1 และทำการแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิระหว่าง -3.5 °C ถึง -20°C ที่อุณหภูมิสุดท้ายต่างกัน (0, -30, -60, -90 และ -120°C) และนำมาเก็บในถังไนโตรเจนเหลว(-196°C) และใช้อัตราการละลายระหว่าง 45°C ถึง 145°C/min พบว่าน้ำเชื้อที่ลดอุณหภูมิสุดท้ายถึง -90°C ก่อนเข้าถังไนโตรเจนเหลวที่อัตราการ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 5 ส.ค. 2555
เลขทะเบียน 245671
เลขเรียกหนังสือ

ลดอุณหภูมิ -12 และ -15 °C/min ทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีที่สุด แต่การเคลื่อนก็ยังน้อยกว่าน้ำเชื้อสด

Paniagua *et al.* (2001) ทำการศึกษาการแช่แข็งของสเปิร์มและตัวอ่อนของหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) จากการทดลองใช้ตัวอ่อนหอยระยะ trochophore ที่มีความเข้มข้น 10,000 cell/ml มาเจือจางใน artificial water (ASW) และนำสเปิร์มความเข้มข้น $1x10^9$ ml มาเจือจางด้วยสารละลาย Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) หลังจากนั้นนำสเปิร์มและตัวอ่อนมาใส่ใน 15% propylene glycol ที่เจือจางใน ASW ทิ้งให้อยู่ในภาวะสมดุล 20 นาที และนำมาลดอุณหภูมิ 2.5 °C/นาที แล้วเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1 สัปดาห์ พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มและตัวอ่อนระยะ trochophore หลังจากนำมาละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 °C นาน 5 วินาที

Choi and Chang (2003) ทำการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ การพัฒนาระยะต่างๆ และการเพิ่มน้ำตาลที่มีต่อการแช่แข็งตัวอ่อนระยะ trochophore ของหอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata martensii*) พบว่า การเติม 0.2 M DMSO ผสมกับ 0.2 M glucrose และ sucrose ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิ 1 °C/นาที ทำให้อัตราการรอดชีวิตของลูกหอย มีการพัฒนาถึง late D- Shaped- larvae ประมาณ 89-91% หลังจากละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 25 °C นาน 10 วินาที

Dong *et al.* (2005) ทำการแช่แข็งสเปิร์มของ diploid และ tetraploid ของหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) โดยใช้ความเข้มข้นของสเปิร์ม $2x10^9$ cell/ml เจือจางใน Ca-F HBSS และ 8% DMSO พบว่า หอยนางรม diploid มีการเคลื่อนที่ 30% และการปฏิสนธิ 96% แต่ หอยนางรม tetraploid มีการเคลื่อนที่ต่ำกว่า 10% และการปฏิสนธิต่ำ 28% ตามลำดับ หลังการละลาย

Ieropoli *et al.* (2004) ทำการแช่แข็งสเปิร์มของหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) พบว่าการใช้ 10% ethylene glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 6 °C/นาที มีผลทำให้สเปิร์มที่แช่แข็ง เมื่อนำมาทำการปฏิสนธิ พบว่า มีอัตราการรอดถึงระยะ D-larvae 58.9%