

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

หอยเป่าฮื้อ หอยร่อยรู หรือหอยโข่งทะเล เป็นหอยทะเลฝาเดียว (gastropod) ที่พบกระจายทั่วโลก มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากราคาที่สูง และเป็นที่นิยมเลี้ยงทั้งในยุโรป และเอเชีย เช่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเลีย นิวซีแลนด์ เม็กซิโก จีน ญี่ปุ่น ฮองกง เกาหลี อินเดีย เป็นต้น สำหรับการบริโภคหอยเป่าฮื้อก็นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในลักษณะของอาหารทั้งในลักษณะของหอยเนื้อ และหอยตากแห้งและยังมีการบริโภคในลักษณะของยาแผนโบราณที่ทำให้ร่างกายแข็งแรง โดยเฉพาะในประเทศจีน ญี่ปุ่น ฮองกง เกาหลีที่มีการบริโภคอย่างมาก ทำให้การเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮื้อเริ่มได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก และความต้องการของตลาดโลกมีมากขึ้นในช่วงเวลาประมาณ 10 ปีที่ผ่านมา (Oakes and Ponte, 1996) อย่างไรก็ตามหอยเป่าฮื้อส่วนมากที่เลี้ยงกันทั่วไปมักได้มาจากการเพาะเลี้ยง ส่วนน้อยได้มาจากการจับในธรรมชาติ ทำให้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮื้ออย่างแพร่หลายในหลายประเทศเพื่อควบคุมผลผลิตให้ได้ปริมาณมากเพียงพอกับความต้องการบริโภคในประเทศและการส่งออก (Jarayabhand and Paphavasit, 1996) แม้ว่าโดยทั่วไปแล้วหอยทะเลที่มีการเพาะเลี้ยง หรือจับจากธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นหอย 2 ฝา (bivalve) ซึ่งปริมาณหอย 2 ฝาที่ถูกจับออกมาบริโภคในแต่ละปีทั่วโลกมีประมาณ 3 ล้านตัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็น oyster, mussels, clams และ scallops และมีการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์หอย 2 ฝาลายชนิดในโลก แต่หอยเป่าฮื้อ ซึ่งเป็นหอยฝาเดียว ก็เป็นที่นิยมเลี้ยงในเอเชียในหลายประเทศ เนื่องจากมีราคาสูง

การเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮื้อในประเทศไทยอย่างเป็นระบบเพิ่งจะเริ่มมีในระยะเวลาประมาณ 10 ปีที่ผ่านมาเอง และหอยเป่าฮื้อก็จัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวใหม่ที่กำลังมาแรงในประเทศไทยในขณะนี้เนื่องจากผลตอบแทนที่สูง ซึ่งเป็นแรงจูงใจที่ทำให้ผู้ประกอบการเอกชนจำนวนมากที่อยู่บริเวณชายฝั่งทะเลที่แต่เดิมเลี้ยงกุ้งกุลาดำ หรือกุ้งขาวก็เริ่มสนใจเลี้ยงหอยเป่าฮื้อแทนกุ้งทะเลที่เริ่มเลี้ยงได้ยากขึ้นเนื่องจากราคาของกุ้งทะเลในตลาดโลกที่ต่ำลงและสภาพการเลี้ยงกุ้งทะเลที่นับวันจะเลี้ยงยากขึ้นอันเนื่องจากการแพร่ระบาดของโรคกุ้ง ทำให้ผู้ประกอบการเลี้ยงกุ้งทะเลส่วนหนึ่งเริ่มมองหาสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวใหม่เพื่อการเพาะเลี้ยงมากขึ้น หอยเป่าฮื้อเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีศักยภาพสูงในการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์อย่างครบวงจร และมีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายในฟาร์มเอกชนบริเวณจังหวัดติดชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะทางภาคใต้ของประเทศไทยที่หลายๆฟาร์มได้รับการสนับสนุนทางด้านการวิจัยและพัฒนา และการถ่ายทอดเทคโนโลยีจากหน่วยงานของภาครัฐเพื่อให้สามารถผลิตหอยเป่าฮื้อในเชิงพาณิชย์ และสามารถส่งออกไปจำหน่ายในตลาดโลก เนื่องจากหอยเป่าฮื้อเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีราคาแพง โดยในท้องตลาด ขนาด 40-50 ตัว/กิโลกรัม มีราคาต่อกิโลกรัมอยู่ระหว่าง 1,000-1,500 บาท และขนาด 10 ตัว/กิโลกรัมราคาประมาณ 2,300-3,800 บาท/กิโลกรัม (สิทธิศักดิ์เหมืองสิน, 2545) ในปัจจุบันมูลค่าการบริโภคหอยเป่าฮื้อในสหรัฐอเมริกาอยู่ที่ประมาณ 750 ล้านบาทต่อปี อย่างไรก็ตามตลาดผู้บริโภคหอยเป่าฮื้อที่ใหญ่ที่สุดอยู่ในฮ่องกง จีน และญี่ปุ่น และมีมูลค่าการบริโภคประมาณ 7,500 - 10,000 ล้านบาทต่อปี โดยมีตลาดใหญ่อยู่ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีราคาจำหน่ายประมาณกิโลกรัมละ 2,000 - 2,400 บาท อย่างไรก็ตามหอยเป่าฮื้อพันธุ์ไทยซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Halotis asinina* แม้ว่าจะมีขนาดค่อนข้างเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างๆที่

จำหน่ายตามท้องตลาดทั่วโลกก็เป็นจุดแข็งที่หอยสายพันธุ์ *H. asinina* สามารถส่งออกจำหน่ายในตลาดโลกได้ดี เพราะหอยสายพันธุ์นี้พบแพร่กระจายส่วนใหญ่เฉพาะในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และหอยสายพันธุ์นี้ได้รับความนิยมในการบริโภคสูง สำหรับหอยเป่าอื้อขนาดเล็กเช่นสายพันธุ์ของไต้หวันชนิด *H. diversicolor* สามารถผลิตและส่งไปขายยังต่างประเทศเช่น จีน ญี่ปุ่นและเกาหลี นอกจากนี้ในปัจจุบันในตลาดโลกก็มีความต้องการบริโภคตลาดหอยเป่าอื้อขนาด 25-100 กรัมหรือ หอยขนาด 1.5-3 นิ้ว หรือเรียกหอยขนาดค็อกเทล (cocktail size abalone) ขึ้นมาทำให้มีความต้องการหอยเป่าอื้อขนาดเล็กมากขึ้น ทำให้เห็นได้ชัดถึงศักยภาพการตลาดหอยขนาดเล็กเช่นหอยเป่าอื้อต่อการส่งออกในตลาดโลก

หอยเป่าอื้อทั่วโลกมีทั้งหมดประมาณ 70-80 ชนิด แต่มีประมาณ 22 ชนิดที่มีขนาดใหญ่ หอยเป่าอื้อที่พบในประเทศไทยมี 3 ชนิดได้แก่ *Halotis asinina*, *Halotis ovina* และ *Halotis varia* โดยในประเทศไทย มักจะพบมากหอยเป่าอื้อพันธุ์ *Halotis asinina* อยู่ในธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ อีกทั้งหอยเป่าอื้อชนิดนี้ยังมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว และมีขนาดที่ใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหอยเป่าอื้ออีก 2 ชนิด จึงทำให้หอยเป่าอื้อพันธุ์ *Halotis asinina* มีความเหมาะสมที่จะนำมาส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์เพื่อเป็นทางเลือกของสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวใหม่ต่อไป (Jarayabhand *et al.*, 2003; ธาณินทร์ สิงห์ไกรวรรณ และมาซาโนริ ไดอิ, 2536) อย่างไรก็ตามการเพาะพันธุ์หอยเป่าอื้อในประเทศไทยยังประสบปัญหาสายพันธุ์พ่อแม่พันธุ์หอยในบางครั้งที่มีการเจริญเติบโตที่ไม่ดีเทียบเท่ากับสายพันธุ์ต่างประเทศ ทำให้ลูกหอยเป่าอื้อที่เพาะได้ก็โตช้า ใช้เวลานานขึ้นกว่าจะขายได้ ดังนั้นถ้าสามารถนำน้ำเชื้อพ่อแม่พันธุ์หอยที่โตเร็ว หรือได้ถูกคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีไว้ภายในฟาร์มแล้วนำมาผสมเทียมกับไข่ในภายหลังก็จะทำให้ลักษณะที่ดีของพ่อแม่พันธุ์ถ่ายทอดไปยังลูกหอยได้

ด้วยเหตุที่การเพาะเลี้ยงหอยเป่าอื้อในประเทศไทยในขณะนี้สามารถควบคุมผลผลิตได้ครบวงจรในฟาร์มหอยเชิงพาณิชย์ ตั้งแต่การเพาะพันธุ์ การอนุบาล และการเลี้ยงจนถึงขนาดตลาด เช่น ทราบวิธีการเพาะพันธุ์ที่ได้อัตราการรอดที่ดีขึ้นแม้ว่าอัตราการรอดหลังการลงเกาะจะมีค่าไม่ถึง 5% ก็ตาม หรือสามารถหาวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมมาผลิตอาหารเม็ดเพื่อทดแทนการใช้สาหร่ายทะเลในการเลี้ยงหอย เป็นต้น (ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์, 2543) (ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์, 2543) กรมประมงสามารถเพาะพันธุ์หอยชนิดนี้ได้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย โดยศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก โดยปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์หอยวางไข่เองตามธรรมชาติในปี 2532 และจากนั้นได้มีการวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยชนิดนี้อีกอย่างต่อเนื่องทำให้ปัจจุบันนี้ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์สามารถควบคุมการผลิตให้หอยเป่าอื้อผสมพันธุ์วางไข่ตามเวลาที่ต้องการได้ตลอดปีและผลิตลูกพันธุ์หอยเป่าอื้อขนาดตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตร ขึ้นไปเป็นจำนวนมากอย่างสม่ำเสมอจนสามารถส่งไปทดลองเลี้ยงตามหน่วยงานของกรมประมงหลายแห่ง เพื่อที่จะหาข้อมูลเกี่ยวกับเทคนิคการเลี้ยงหรือรูปแบบการเลี้ยงที่เหมาะสมแล้วขยายผลการวิจัยสู่เกษตรกร ประกอบกับผลงานวิจัยจากหลายๆฝ่ายที่เกี่ยวข้องกับหอยชนิดนี้ทำให้มีความเป็นไปได้สูงในการที่จะสนับสนุนให้มีการเลี้ยงหอยชนิดนี้ในเชิงพาณิชย์เพื่อส่งออกจำหน่ายในต่างประเทศต่อไป อย่างไรก็ตามปัญหาหลักปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตหอยเป่าอื้อเชิงพาณิชย์อย่างมาก คือพ่อแม่พันธุ์ตามธรรมชาติที่หาได้ยาก และมีปริมาณน้อยลงค่อนข้างมาก ซึ่งแม้ว่าจะสามารถขุนพ่อแม่พันธุ์ขึ้นมาใช้เองในฟาร์มได้ (domestication of broodstock) แต่ก็ต้องใช้เวลาเลี้ยงหลายปี และบางครั้งการติดโรคก็ทำให้พ่อแม่พันธุ์สูญเสีย ส่งผลต่อการผลิตลูกพันธุ์ อีกทั้งพ่อแม่พันธุ์ก็สามารถใช้เพาะพันธุ์ได้ช่วงหนึ่งก็ต้องจัดหาพ่อแม่พันธุ์ใหม่มา

ใช้ ทำให้ต้องใช้พ่อแม่พันธุ์ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด อีกทั้งสายพันธุ์หอยเป่าฮื้อในประเทศไทยมักมีการเจริญเติบโตช้ากว่าสายพันธุ์ต่างประเทศ ทำให้มีความจำเป็นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อพ่อแม่พันธุ์หอยที่โตเร็ว หรือได้ปรับปรุงสายพันธุ์เอาไว้แล้วมาใช้ประโยชน์ในการผสมเทียมกับไขในภายหลัง

นอกจากนี้การเพาะพันธุ์หอยเป่าฮื้อในปัจจุบันจะปล่อยพ่อแม่พันธุ์แยกบ่อกันเพื่อกระตุ้นให้ปล่อยไข่และน้ำเชื้อออกมาด้วยเทคโนโลยีที่เหมาะสม แล้วจึงรวบรวมน้ำเชื้อในบ่อพ่อแม่พันธุ์มาเทลงเพื่อปฏิสนธิกับไขในบ่อแม่พันธุ์ ซึ่งเมื่อพิจารณาอย่างละเอียดจะพบว่าในการปฏิสนธิไขนั้นไม่จำเป็นต้องใช้น้ำเชื้อจำนวนมาก แต่การที่หอยเป่าฮื้อตัวผู้ปล่อยน้ำเชื้อออกมาเมื่อถูกกระตุ้นนั้นจะปล่อยน้ำเชื้อออกมาจนหมด ซึ่งน้ำเชื้อส่วนที่เหลือจากการใช้ปฏิสนธิกับไขก็จะสูญเสียไปโดยเปล่าประโยชน์ ดังนั้นแนวทางการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อส่วนที่เหลือจากการใช้ หรือการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อเมื่อได้พ่อแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพดี หรือเก็บน้ำเชื้อจากสายพันธุ์ที่ได้คัด เลือกปรับปรุง พันธุ์ไว้แล้ว โดยทำการเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส (chilled storage) หรือเก็บแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (cryopreservation) จะทำให้การเพาะพันธุ์หอยเป่าฮื้อสามารถควบคุมการผลิตได้ตามที่ต้องการ เพราะหอยเพศผู้จะไม่เป็น limiting factor ในการเพาะพันธุ์อีกต่อไป ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อจะง่ายกว่าการเก็บรักษาไขของตัวเมียที่มีขนาดใหญ่และมีไข่แดงที่เป็นอุปสรรคตามธรรมชาติ (natural barrier) ซึ่งทำให้การเก็บรักษาไขค่อนข้างจะสลับซับซ้อนและยากกว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อแบบแช่เย็น และแบบแช่แข็ง เป็นทางออกทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์หอย เป่าฮื้อที่มีคุณภาพดีของประเทศไทย เนื่องจากในบางครั้ง ในระหว่างการเพาะพันธุ์อาจจะได้พ่อแม่พันธุ์ที่มีความสมบูรณ์ เพศก็จริงแต่ไม่สามารถหาแม่พันธุ์มาผสมได้ ทำให้ไม่สามารถเพาะพันธุ์หอย ถ้ามีการนำน้ำเชื้อมาเก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็น หรือแช่แข็งก็จะสามารถนำน้ำเชื้อเหล่านั้นมาใช้ได้ในทุกเวลาที่ต้องการเมื่อแม่พันธุ์มีความพร้อม หรือเมื่อพ่อแม่พันธุ์หอยมีน้ำเชื้อแต่ไม่ได้นำมาเพาะพันธุ์ก็จะทำให้ ปริมาณน้ำเชื้อลดหายไปในปลายฤดูผสมพันธุ์ว่าไขตามธรรมชาติของหอย ซึ่ง ถ้าสามารถรวบรวมน้ำเชื้อที่มีปริมาณมากเหล่านั้นในช่วง peak ของฤดูผสมพันธุ์วางไข่แล้วเก็บแช่เย็นหรือเก็บแช่แข็ง เอาไว้มาใช้ในภายหลังได้ ก็เป็นประโยชน์ต่อการจัดการในโรงเพาะฟัก อย่างไรก็ตามปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นนี้เป็นปัญหาทั่วไปที่เกิดขึ้นในโรงเพาะฟักเนื่องจากฤดูกาล (season) หรือความแปรปรวนของสัตว์น้ำแต่ละตัว (individual variation) แต่ด้วยเหตุที่ปัญหาหลักการเพาะพันธุ์หอยเป่าฮื้อในประเทศไทยมีความเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์หอยเป่าฮื้อที่โตช้า เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศตามที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นเมื่อฟาร์มเพาะพันธุ์หอยเป่าฮื้อภาคเอกชนที่ได้คัดเลือกหรือปรับปรุงได้สายพันธุ์หอยเป่าฮื้อที่โตดีเอาไว้แล้วก็ควรนำน้ำเชื้อที่ดีเหล่านั้นมาเก็บรักษาไว้ในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) แทนที่จะปล่อยให้ไข่หายไปตามฤดูกาลเพื่อประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮื้อเชิงพาณิชย์ รวมทั้งการจัดเก็บน้ำเชื้อสายพันธุ์หอยที่ดีในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ ซึ่งก็ เป็นประโยชน์ต่อการจัดการในโรงเพาะฟัก ช่วยลดต้นทุนในการเลี้ยงขุนพ่อแม่พันธุ์ เพราะไม่ต้องเลี้ยงขุนพ่อแม่พันธุ์ไว้ในโรงเพาะฟักเป็นเวลานาน และยัง ช่วยลดการเกิดปัญหาการผสมแบบเลือดชิดได้ เพราะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อเป็นรุ่นๆ ได้ ทำให้สามารถบริหารจัดการปรับปรุงพันธุ์หอยได้โดยตรง

โดยทั่วไปการเก็บรักษาน้ำเชื้อสามารถทำได้ใน 2 ลักษณะได้แก่ การเก็บรักษาในระยะเวลานสั้น (Short-Term Storage) โดยเจือจางน้ำเชื้อในน้ำยาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมแล้วนำมาเก็บรักษาไว้ในถังน้ำแข็งหรือในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ก็สามารถยืดระยะเวลาที่สเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไขออกไปได้นานขึ้นหลายสัปดาห์ และทำให้น้ำเชื้อถูกใช้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่มีการสูญเสีย

ข้อดีของการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ 2-4 องศาเซลเซียส ทำให้ง่ายแก่การจัดการขณะผสมไขกับน้ำเชื้อในระหว่างการผสมเทียม เพราะน้ำเชื้อจะถูกเตรียมและเก็บรักษาไว้ก่อนซึ่งจะนำมาใช้ได้ทันที ทำให้การผสมเทียมทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้นอีกทั้งการลำเลียงน้ำเชื้อแช่เย็นทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพอพันธุ์ ส่วนอีกวิธีหนึ่งเป็นการเก็บรักษาในระยะเวลายาว (Long-Term Storage) โดยการนำเอาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในน้ำยาบัฟเฟอร์ (Extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็ง (Cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิที่เหมาะสม ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคูณภาพของน้ำเชื้อได้เป็นเวลานานเป็นปี (กฤษฎ มงคลปัญญา, 2536) การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยแบบแช่แข็งยังมีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์หอยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อผลิตหอยที่โตเร็ว หรือทนทานต่อโรคให้มากขึ้นเพราะสามารถควบคุมช่วงเวลาการผสมเทียมหรือการผสมข้ามพันธุ์หอยชนิดต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพอพันธุ์ โดยสามารถขนส่งน้ำเชื้อแช่แข็งไปภายในประเทศและระหว่างประเทศได้ง่าย และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุ์กรรมของสัตว์น้ำ (Gene Bank) หรือป้องกันการสูญเสียพอพันธุ์สัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางพันธุกรรม และยังสามารถใช้เป็นแนวทางของการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาตัวอ่อนของลูกหอยต่อไปในอนาคต

การพัฒนาการเลี้ยงหอยเป่าฮื้อในประเทศไทยจำเป็นต้องมีการวิจัยเชิงรุกเพื่อเพิ่มคุณภาพและผลผลิตของหอยเพื่อการแข่งขันของประเทศโดยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีต่างๆที่เกี่ยวข้อง ซึ่งการแก้ไขปัญหาคือการจัดการการเพาะพันธุ์หอยเป่าฮื้อให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นสามารถทำโดยเอาน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อมาแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจน ซึ่งจะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีได้นานเป็นปีๆทั้งประโยชน์เชิงพาณิชย์ การปรับปรุงพันธุ์ และการอนุรักษ์สายพันธุ์ที่ดี ด้วยเหตุที่การพัฒนาเพิ่มศักยภาพในการเลี้ยงหอยเป่าฮื้อเชิงพาณิชย์ของประเทศไทยยังมีความเป็นไปได้สูงมากเนื่องจากโครงสร้างพื้นฐานของธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศมีการพัฒนาอย่างเป็นระบบอยู่ตลอดเวลา และผู้ประกอบการมีความพร้อมในการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดใดก็ตามที่ให้ผลตอบแทนสูงในระหว่างการเลี้ยง ประกอบกับปัญหาการโตช้าของหอยเป่าฮื้อในประเทศไทย ทำให้การเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันดังกล่าว สู้ตลาดโลก จะไม่เกิดขึ้นถ้าส่วนหนึ่ง ส่วนใดของระบบไม่มีการปรับตัว ดังนั้นโครงการวิจัยเรื่องนี้จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อหาองค์ความรู้ใหม่ที่เกี่ยวกับปัจจัยที่ควบคุมความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคแช่เย็นหรือ แช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อจากสายพันธุ์ที่ดี และได้ปรับปรุงพันธุ์เอาไว้แล้ว รวมทั้งการนำข้อมูลวิจัยที่ได้มาประยุกต์ใช้เพื่อส่งเสริมและสนับสนุนการเลี้ยงหอยเป่าฮื้อเชิงพาณิชย์ ของประเทศ ต่อไป เพื่อเสริมสร้างศักยภาพในการแข่งขันของประเทศที่สามารถเป็นผู้ผลิตและส่งออกหอยเป่าฮื้อไปขายในต่างประเทศ และก่อให้เกิดการเสริมสร้างการพัฒนาที่ยั่งยืนของการเลี้ยงหอยเป่าฮื้อของประเทศ

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส
2. ศึกษากลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อ
3. ศึกษาชนิด ปริมาณความเข้มข้น และระยะเวลาของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ

4. ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อแช่แข็ง ที่มีต่อคุณภาพสเปิร์ม
5. เพื่อพัฒนาเทคนิคในการแช่เย็น และการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อเพื่อใช้ในการเพาะพันธุ์ หอยเป่าอื้อเชิงพาณิชย์

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อแบบแช่เย็น และแช่แข็ง ซึ่ง ข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดีของพ่อพันธุ์หอยเป่าอื้อเพื่อการเพาะพันธุ์ ต่อไป และยังเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัยเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยทะเลเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ เช่น หอยเชลล์ หรือสัตว์น้ำชนิดอื่นๆที่ทำได้ยากหรือใกล้สูญพันธุ์ต่อไปในอนาคต
2. ทำให้ทราบถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อ และ ปัจจัยต่างๆที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อ
3. ทราบชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ควรใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อแบบแช่แข็ง
4. ได้พัฒนาเทคนิคการเก็บน้ำเชื้อหอยแบบแช่แข็งเพื่อการผสมเทียม โดยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) หรือใช้เครื่องมือราคาถูกลงด้วยการ แช่แข็งอย่างง่ายภายในกล่องโฟม (styrofoam box) ทำให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อใน ไนโตรเจนเหลวได้ในระยะเวลาที่นานขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์สูงสุดในการผสมเทียม
5. การนำน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อที่ได้แช่เย็น หรือแช่แข็งมาใช้ในการเพาะพันธุ์หอยเป่าอื้อเชิงพาณิชย์จะมีการนำมาใช้ในอนาคตมากขึ้น อันเนื่องมาจากความต้องการลูกพันธุ์หอยที่สูงขึ้นจะทำให้มีการเพาะพันธุ์มากขึ้น ซึ่งนั่นหมายถึงจะต้องมีการใช้น้ำเชื้อหอยเป่าอื้อให้คุ้มค่า และลดการสูญเสีย น้ำเชื้อไปโดยเปล่าประโยชน์ให้มากที่สุด ซึ่งการพัฒนาเหล่านี้จะช่วยทำให้การผลิตลูกหอยเป่าอื้อทำได้ตลอดปี

ประโยชน์ต่อเกษตรกร

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อแบบแช่เย็นจะทำให้เกษตรกรมีทางเลือกในการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยเทคโนโลยีราคาถูกลง ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อนอกจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อในลักษณะที่เป็นธนาคารอสุจิ (sperm bank) ของสายพันธุ์หอยที่มีลักษณะดีแล้ว ยังทำให้การเพาะพันธุ์หอยเป่าอื้อมีความสะดวกขึ้นเช่นกัน และทำให้ใช้น้ำเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ข้อมูลดังกล่าวยังสามารถนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยชนิดอื่นๆของประเทศไทยที่ทำได้ยากหรือใกล้สูญพันธุ์ต่อไปในอนาคต

ประโยชน์ต่อนักวิชาการและหน่วยงานของรัฐ

ความรู้ที่เกี่ยวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิตหรือการเพาะพันธุ์หอยเป่าอื้อของกรมประมง ซึ่งมีหน้าที่ส่งเสริมให้เกษตรกรมีอาชีพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ความรู้ที่ได้สามารถไปประยุกต์ใช้ในการจัดการการเพาะพันธุ์หอยเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ ทำให้สามารถเพาะพันธุ์หอยได้ตลอดปีตามที่ต้องการ และไม่เกิดปัญหาการขาดแคลนลูกพันธุ์หอย

บทที่ 2 การสำรวจเอกสาร

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาหอยเป่าฮื้อ

หอยเป่าฮื้อ (*Halotis asinina*) เป็นหอยฝาเดียว มีเปลือกแบน เป็นรูปยาวรียอดเตี้ย มีสีเขียวเข้ม น้ำตาล หรือแดงคล้ำตามขอบเปลือก (อนุวัตนและฮิลลิแบร์, 2529) จัดอยู่ใน Class Gastopoda, Order Archaeogastopoda และ Family Haliotidae ภายนอกเปลือกมีลักษณะเป็นวงรีๆ ขอบกันออกไป มีลักษณะเหมือนกันหอยแนวกว้างเตี้ย คล้ายโล่ และไม่สมมาตร มีปาก ตา 1 คู่ หนวด 1 คู่ (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2540) และช่องเล็กๆ ที่เรียกว่ารูหายใจ ในหอยชนิด *Halotis asinina* จะมีรูบนเปลือกหอย 5 – 7 รู (คเชนทร เณลิวัฒน์, 2544) เรียงเป็นแถวยาวไปจนถึงขอบปากรูเล็กๆ รูเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อหอยโตขึ้นรูเก่าจะถูกปิดไป ยังเหลือแต่รูใหม่ซึ่งหอยแต่ละชนิดมีรูไม่เท่ากัน

ส่วนอวัยวะภายใน มีเหงือกเป็นคู่อยู่ในแอ่งด้านซ้ายของลำตัว มีหัวใจ 3 ห้อง มีรูเปิดเหล่านี้เป็นอวัยวะรับสัมผัส เพราะมีอวัยวะคล้ายหนวดเล็กๆ ยื่นออกมาสัมผัสกับอากาศเข้าถึง ทวารหนัก (anus) และ openings จะเปิดออกตามรูนี้ ทางน้ำจะไหลออกอยู่ทางด้านบนของลำตัว โดยไหลออกทางรูต่างๆ รวมทั้งเซลล์สืบพันธุ์ น้ำที่ไหลออกมาจะพาเอาของเสียที่มาจากทวารหนักและ nephridia ออกจากตัว (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2540) หอยเป่าฮื้อมีลักษณะการกินอาหารแบบขูดขีด (grazer) ตามบริเวณซอกหิน โดยในธรรมชาติกิน สาหร่ายทะเล รวมทั้งสิ่งมีชีวิตเล็กๆ บริเวณพื้นผิวในเวลากลางวันเป็นส่วนใหญ่

หอยเป่าฮื้อมีการสืบพันธุ์แบบภายนอกลำตัว (external fertilization) มีเพศแยกกัน (dioecious) มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1 : 1 อวัยวะสืบพันธุ์จะพัฒนาอยู่รอบๆ ต่อมสร้างน้ำย่อย เมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์จะเห็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะมีสีขาวครีมชัดเจน ส่วนรังไข่ของเพศเมียจะเป็นสีเขียวมองเห็นไม่ชัดเจนคล้ายอวัยวะภายใน โดยสังเกตได้จากการหายใจต้องขึ้นและเปิดกล้ามเนื้อเหง้า ตอนล่างของเปลือกออกจะเห็นอวัยวะสืบพันธุ์ สำหรับหอยเป่าฮื้อชนิด *Halotis asinina* เพศเมียสามารถสืบพันธุ์โดยมีขนาดความยาว 4.4 เซนติเมตร จะมีช่วงการวางไข่สูงในเดือนตุลาคม ส่วนความถี่ของการวางไข่ของหอยจะอยู่ในช่วงเดือนกันยายนถึงมีนาคม ส่วนพ่อพันธุ์จะสร้างสเปิร์มได้ทั้งปี (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2540)

2. น้ำเชื้อและสเปิร์มของสัตว์น้ำ

โดยทั่วไปน้ำเชื้อ (semen) ของสัตว์น้ำประกอบด้วย เซลล์สเปิร์ม (spermatozoa) และน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal fluid) เหมือนที่พบในสัตว์ทั่วไป โดยน้ำเชื้อถูกสร้างขึ้นและเก็บไว้ในอัณฑะ (testis) และปล่อยออกนอกร่างกายเมื่อมีการผสมพันธุ์วางไข่ ในระหว่างเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ หอยเป่าฮื้อเพศผู้ มีอัณฑะสีขาว ซึ่งมีน้ำเชื้อจำนวนมากอยู่ภายใน แต่หอยเป่าฮื้อเพศเมีย มีรังไข่สีเขียวที่มีไข่อยู่ภายใน โดยทั่วไปสเปิร์ม ของหอยทะเล มีความแตกต่างจาก สเปิร์มของปลา ตรงที่สเปิร์มของหอย มีอะโครโซม (acrosome) ที่บริเวณหัวสเปิร์มเพื่อ ใช้ในการย่อยผิวไข่ ขณะปฏิสนธิ

เนื่องจากไข่หอยไม่มี micropyle ที่ให้สเปิร์มว่ายเข้าไปปฏิสนธิกับไข่เหมือนไข่ปลา สเปิร์มของหอยทะเลประกอบด้วยส่วนต่างๆ 3 ส่วนได้แก่ 1.) ส่วนหัว (head) มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของหอย โดยในส่วนหัวมีนิวเคลียส (nucleus) ที่มี ดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรมเพื่อปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ 2.) ส่วนกลาง (middle piece) เป็นส่วนของสเปิร์มที่อยู่ติดกับส่วนหัวโดยจะมีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมาก ทำหน้าที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มในระหว่างการเคลื่อนที่ และ 3.) ส่วนหาง (tail) เป็นส่วนที่มีลักษณะยาว ใช้ในการเคลื่อนที่ระหว่างการปฏิสนธิ (วีรพงศ์, 2536)

น้ำเชื้อหอยทะเลขณะที่ยังอยู่ในตัวหอย สเปิร์มที่อยู่ในน้ำเชื้อจะไม่เคลื่อนที่ (immotile) แต่เมื่อหอยเพศผู้ปล่อยน้ำเชื้อออกมาขณะผสมพันธุ์วางไข่ สเปิร์มจะเคลื่อนที่ทันทีเพื่อปฏิสนธิกับไข่ ดังนั้นเซลล์สเปิร์ม ของหอยจะไม่เคลื่อนที่เมื่อยังอยู่ในตัว หอยหรือเมื่อรีดน้ำเชื้อสดออกมาใหม่ๆ แต่สเปิร์มหอยจะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว เมื่อน้ำเชื้อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่เหมาะสม เช่นน้ำเชื้อหอยผสมกับน้ำ ทะเลภายนอกขณะที่พ่อแม่พันธุ์ หอยผสมพันธุ์วางไข่ตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำเอาน้ำเชื้อหอยมาผสมกับ สารละลายที่เหมาะสม บนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะ ทำให้เซลล์สเปิร์มถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วเช่นกัน อันเป็นผลมาจากค่าแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ (osmotic pressure) ที่เปลี่ยนไป การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยทะเลเมื่อถูกกระตุ้น สามารถเคลื่อนที่ไกลนานหลายนาทีก หรือเป็นชั่วโมง โดยกลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยทะเล มีความเกี่ยวข้องกับระดับค่าแรงดันออสโมติกที่สูงขึ้นกว่าที่พบในน้ำเชื้อ ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ทำให้สเปิร์มหอยทะเลเคลื่อนที่ (hyper-osmolality) (Morisawa et al., 1983)

Morisawa (1985) ได้ศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาหลายชนิดทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล พบว่า ค่าแรงดันออสโมติก เป็นปัจจัยหลักที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดย ค่าแรงดันออสโมติกของสารละลายที่มีค่าลดต่ำลงจากระดับที่พบใน seminal plasma มีผลในการกระตุ้นทำให้สเปิร์มปลาน้ำจืดเคลื่อนที่ ในการทางตรงกันข้ามสเปิร์มของปลาทะเลจะเคลื่อนที่มากขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงกว่าระดับที่พบใน seminal fluid ดังนั้นการที่จะเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่เย็น ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสได้นาน จึงควรเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าแรงดันออสโมติกเท่ากับระดับที่พบใน seminal fluid เพราะจะช่วยป้องกันมิให้สเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ได้ เนื่องจากเมื่อสเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่ ก็จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมาก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาที่รวดเร็ว ซึ่งหลักการควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในปลาเช่นนี้จะมีหลักการเดียวกันที่พบในสัตว์น้ำจำพวกหอยเช่นกัน

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม นิยมใช้ในการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์น้ำจำพวกปลา และหอย เนื่องจากทำได้รวดเร็ว และสะท้อนถึงคุณภาพสเปิร์มได้ดี แม้ว่าการประเมินด้วยสายตา (subjective estimation) ที่ให้ความเที่ยงตรงต่ำกว่าการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยการใช้เครื่องมือวัดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (computer-assisted sperm analysis; CASA) ซึ่งมีความถูกต้องและเที่ยงตรงสูง (objective estimation) การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสามารถใช้ประเมินได้ในน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยที่การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดของสัตว์น้ำ ต้องทำการเจือจางน้ำเชื้อให้มีสเปิร์มไม่หนาแน่นก่อนนำไปนับใน hemacytometer เช่นเจือจางประมาณ 1,000 5,000 หรือ 10,000 เท่าขึ้นอยู่กับความหนาแน่นของสเปิร์มของปลาที่แตกต่างกัน สำหรับน้ำเชื้อแช่เย็นที่ต้องการเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีชีวิตอยู่ได้นาน เมื่อเจือจางน้ำเชื้อปลา หรือหอยด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ (extender) ใดๆ ก็ตาม ซึ่งน้ำยาดังกล่าวจะต้อง

ไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวสเปิร์ม เพราะถ้าสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่แล้วแม้ว่าจะเก็บรักษาแช่เย็นดีเพียงใดก็ตาม ก็ไม่สามารถกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ขึ้นมาได้อีกเพื่อผสมกับไข่ในภายหลัง การประเมนการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของน้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถใช้หลักการประเมนเช่นเดียวกับที่ใช้ในน้ำเชื้อสด เพียงแต่ใช้สารละลายที่เหมาะสม กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ในอัตราการเดินทางที่เหมาะสม (Vuthiphandchai et al., 2009)

3. การเพาะพันธุ์หอยเป่าฮื้อ

การเพาะพันธุ์หอยเป่าฮื้อ ส่วนใหญ่นิยมใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มมาเพาะพันธุ์ (domestication of broodstock) เพราะพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติ หาได้ยากมาก และปรับตัวเข้ากับโรงเพาะฟักได้ยาก ทำให้ฟาร์มเพาะพันธุ์หอยเป่าฮื้อต้องบริหารจัดการหาพ่อแม่พันธุ์ทดแทนในช่วงเวลาที่เหมาะสม ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮื้อ ทำโดยนำพ่อแม่พันธุ์หอยมาใส่ในบ่อขนาด 10 - 15 ลูกบาศก์เมตร ให้น้ำทะเลที่สะอาด ให้อากาศ ให้สาหร่ายวุ้น สาหร่ายผมนาง หรืออาหารเม็ดเป็นอาหาร พ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในการเพาะพันธุ์ต้องมีความสมบูรณ์เพศ เปลือกไม่ผุกร่อน ไม่มีบาดแผลตามตัว โดยแต่ละตัวควรมีน้ำหนักระหว่าง 80 - 150 กรัม อัตรหาคอมีสีครีม ส่วนเพศเมียจะรังไข่สีเขียวเข้ม ปล่อยเพศผู้ต่อเพศเมียในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 ลงไปในบ่อเพาะพันธุ์ โดยให้สภาพแวดล้อมในบ่อให้มีช่วงมืดและช่วงสว่างช่วงละ 12 ชั่วโมง ในระหว่างการเพาะพันธุ์ควรเปิดให้น้ำทะเลที่สะอาดหมุนเวียนตลอดเวลา เนื่องจากหอยเป่าฮื้อผสมพันธุ์วางไข่ตอนกลางคืน ซึ่งถ้าไม่ไหลเวียนจะมีโอกาสที่ไข่ได้รับการปฏิสนธิด้วยสเปิร์มมากกว่า 1 ตัว เรียกว่า โพลีสเปิร์มมี (polyspermy) ซึ่งทำให้ไข่หอยไม่สมบูรณ์แล้วตายไป การเพาะพันธุ์หอยเป่าฮื้อ หลังจากทำการขุนพ่อแม่พันธุ์หอยช่วงหนึ่ง หอยจะเริ่มปล่อยไข่และน้ำเชื้อหลังจากขุนในระยะเวลาประมาณ 4 - 7 วัน โดยพ่อแม่พันธุ์หอยเป่าฮื้อที่ใช้เพาะพันธุ์ควรอยู่แยกกันคนละบ่อตามที่กล่าวมาแล้ว เมื่อพบว่าหอยเพศเมียปล่อยไข่ออกมา จะสังเกตเห็นเป็นเม็ดไข่สีเขียวขนาดเล็กที่พื้นบ่อ ส่วนบ่อที่มีหอยเพศผู้จะพบว่าน้ำในถังจะเป็นสีขาวขุ่น ซึ่งเป็นน้ำเชื้อที่ปล่อยออกมา

การผสมเทียม เริ่มจากการสุ่มดูลักษณะของไข่ ซึ่งไข่หอยที่ดีต้องมีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 180 - 190 ไมครอน ทำการประเมน น้ำเชื้อว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ ดีหรือไม่ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งประเมนความหนาแน่นสเปิร์ม แล้วนำสเปิร์มมาผสมกับไข่ ในระหว่างการผสมเทียม น้ำเชื้อหอยที่นำมาใช้ผสมกับไข่ควรมีความหนาแน่นไม่เกิน 500,000 เซลล์/มล. ของปริมาตรน้ำในถังไข่ โดยเทน้ำเชื้อผสมกับไข่ แล้วปล่อยให้ประมาณ 10 นาทีเพื่อให้ไข่ผสมกับน้ำเชื้อ หลังจากนั้นใช้สายยางทำการรวบรวมไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วลงในภาชนะรวบรวมไข่ ด้วยการใช้ผ้ากรองทำการสูบน้ำจำนวนไข่ที่ได้ เพื่อที่จะคำนวณความหนาแน่นในการอนุบาลลูกหอยหลังฟักออกมาเป็นตัวในถังต่อไป

4. การแช่เย็น และการแช่แข็งน้ำเชื้อหอย

การที่จะประสบผลสำเร็จในการเพาะพันธุ์หอยเป่าฮื้อจากพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงขุนขึ้นมาเอง จำเป็นต้องพัฒนาศักยภาพในการแช่เย็น และแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อให้มีประสิทธิภาพที่จะครอบคลุมช่วงเวลาที่แม่พันธุ์พร้อม หรือมีไข่ เพราะจะสามารถควบคุมการผลิตเชิงพาณิชย์ได้ตามที่ต้องการ

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อแบบแช่เย็นขึ้นอยู่กับความสามารถในการควบคุมไม่ให้สเปิร์มที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะเก็บรักษา เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีโดยทั่วไปว่าน้ำเชื้อของหอยทะเลเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล จะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วและหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาต่อมา ดังนั้นการเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ต้องมีความเหมาะสม เพราะอาจมีผลกระทบต่อน้ำเชื้อสเปิร์มเคลื่อนที่ได้ ซึ่งนั่นหมายถึงความล้มเหลวในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอย เพราะ สเปิร์มไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ เนื่องจากสเปิร์มได้หยุดเคลื่อนที่ไปก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ปัจจัยชนิดต่างๆที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อก็ต้องศึกษาให้ทราบแน่ชัดว่าปัจจัยอะไรเฉพาะบ้างหรือไม่ที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อ เพื่อให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยให้คงคุณภาพนานที่สุดขณะเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส กรอบแนวความคิดของการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อจึงได้มุ่งศึกษาเกี่ยวกับการเลือกสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ที่เหมาะสม การใส่ออกซิเจนสมทบและยาปฏิชีวนะในการเก็บรักษา

การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อแบบแช่แข็งมีหลักการแช่แข็งน้ำเชื้อที่คล้ายกันกับการแช่แข็งน้ำเชื้อของปลา หรือน้ำเชื้อสัตว์บก แต่ความสำเร็จที่ได้จากการแช่แข็ง น้ำเชื้อส่วนมากแล้วมีความแตกต่างกันไปในสัตว์น้ำแต่ละชนิดทั้งในแง่ของชนิดและความเข้มข้นของไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) ที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง (freezing rate) และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (thawing rate) ดังนั้นการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อจึงต้องเริ่มจากการนำเอาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับหอยซึ่งต้องไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่มาจากน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อ แล้วจึงนำไปผสมด้วยไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ ที่เวลาต่างๆกันเพื่อดูความเป็นพิษของไครโอโพรเทคแทนท์ที่อาจมีต่อสเปิร์ม จากนั้นจึงใช้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อที่แตกต่างกันโดยมีสมมติฐานว่าความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อขึ้นอยู่กับทางเลือกใช้นิดและระดับของไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม รวมทั้ง การลดหรือเพิ่มอุณหภูมิอย่างเหมาะสม

การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็น หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อ เป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้เกิดเกษตรกร หรือผู้ประกอบการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเชิงพาณิชย์ได้ทันที การแช่เย็น หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อให้ประสบผลสำเร็จต้องทราบข้อมูลพื้นฐานของสเปิร์มว่าสเปิร์มหอยเป่าอื้อจะเคลื่อนที่ หรือหยุดเคลื่อนที่นั้นเกิดจากปัจจัยอะไร และทำไมจึงเป็นเช่นนั้น ข้อมูลพื้นฐานที่ได้นี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ทั้งการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยที่ต้องทำให้สเปิร์มหอยอยู่นิ่งๆ ตลอดการเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียสเพื่อต้องการกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่เมื่อต้องการผสมกับไข่เท่านั้น และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการแช่แข็งน้ำเชื้อที่ต้องการหยุดกิจกรรมต่างๆ ของเซลล์สเปิร์มไว้ที่ -196 องศาเซลเซียสขณะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว การแช่เย็นน้ำเชื้อใช้เทคโนโลยีที่มีราคาถูกแต่ต้อง optimize สภาพต่างๆให้สเปิร์มหอยไม่เคลื่อนที่ขณะเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดที่เหมาะสม ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยในระยะแรกจำเป็นต้องใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ เพราะสามารถควบคุมการลดอุณหภูมิให้คงที่ และเที่ยงตรง แต่ด้วยเหตุที่เครื่องมือชนิดนี้ที่มีราคาแพงหลายแสนบาท หรือเกือบหนึ่งล้านบาทขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ผลิต ดังนั้นแม้ว่าสามารถพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อได้ แต่ผู้ที่จะนำเอาเทคโนโลยีไปใช้ ก็คงเป็นผู้ประกอบการรายใหญ่เท่านั้นที่มีเงินลงทุนสูง ดังนั้นการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อในขั้นสุดท้ายจำเป็นต้องพัฒนาเทคโนโลยีให้มีราคาถูกลงเป็นสิ่งจำเป็นแก่ผู้ประกอบการขนาดเล็ก หรือขนาดกลาง ที่สามารถนำเอาเทคโนโลยีไปใช้ได้ทันที โดยผู้ประกอบการฟาร์มเพาะเลี้ยงหอย

เป่าอื้อเชิงพาณิชย์ไม่จำเป็นต้องลงทุนอะไรที่แพงเลย ซึ่งแนวทางหนึ่งที่ทำได้ คือต้องแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อในภาชนะที่มีราคาถูก เช่น ถังโฟม ฯลฯ เป็นต้นโดยนำข้อมูลอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติมาปรับใช้กับการแช่แข็งในถังโฟม แนวทางดังกล่าวจะต้องวางตัวอย่างน้ำเชื้อหอยที่ต้องการแช่แข็งไว้เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในความเสี่ยงที่เหมาะสม (บริเวณไอไนโตรเจนเหลว) ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อในขั้นสุดท้ายจะสามารถทำให้มีราคาถูกลงได้ และสามารถประยุกต์ใช้ได้ทันที ทำให้สามารถส่งเสริมให้การเพาะพันธุ์หอยเป่าอื้อสามารถควบคุมผลผลิตได้ตามที่ต้องการด้วยการใช้เทคโนโลยีที่มีราคาถูก

การนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ทำได้โดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาผสมเทียมกับไข่ ช่วยทำให้การเพาะฟักผสมเทียมที่มีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด ถ้าบริหารจัดการอย่างถูกต้อง ดังนั้นตลอดเวลาที่ผ่านมาประมาณ 30 กว่าปี จึงมีผู้ศึกษาทดลองพัฒนาวิธีการเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำหลายๆชนิดให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด แม้ว่าจะงานวิจัยส่วนมากได้ศึกษาในสัตว์น้ำจัดโดยมีการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อในสัตว์ทะเลไม่มากนัก

Paniagua-Chavez et al. (1998) ได้รายงานว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อหอยนางรมที่เก็บแช่เย็น เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อหอยลดลงอย่างรวดเร็วขณะเก็บรักษา ซึ่งสามารถทำนายคุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นขณะเก็บรักษาว่าสามารถเก็บได้นานเพียงไรก็ทำนายได้จากปริมาณแบคทีเรียที่มีในน้ำเชื้อ ซึ่งการแก้ไขปัญหาคือการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อนิยมทำโดยใช้ยาปฏิชีวนะ penicillin และ streptomycin ใส่เข้าไปในน้ำเชื้อก็สามารถทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานขึ้น

Renard (1991) ศึกษาผลของ Methanol และ sucrose ที่มีผลต่อการแช่แข็งและการแช่เย็นในลูกหอยในลูกหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) โดยนำลูกหอยที่เริ่มมีการแบ่งเซลล์ (2-4 cell) ไปแช่แข็งด้วยน้ำทะเลที่ปราศจากสาร Cryoprotectant ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 25 นาที แต่ถ้าเพิ่ม 0.5 M sucrose ลงไปเล็กน้อย จะทำให้ลูกหอยมีความอดทนอยู่ในสภาพการแช่เย็นที่เพิ่มขึ้น และช่วยลดการบาดเจ็บในการแช่เย็น และถ้าเพิ่ม 0.05 M Methanol ผสมกับ 0.25 M sucrose นำไปแช่แข็งพบว่า ส่วนใหญ่ ($46.9 \pm 0.4\%$) สามารถทำให้ลูกหอยมีชีวิตรอดในช่วงการลดอุณหภูมิ ถึง -6 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 15 นาที ถ้าเพิ่ม 0.05 หรือ 1.00 M Methanol ผสมกับ 0.25 M sucrose ส่วนน้อยตัวของลูกหอยจะมีชีวิตรอดในช่วงที่ลดอุณหภูมิ ในช่วง -10 องศาเซลเซียส และ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว

Paniagua-Chavez et al. (2000) ได้ทำการศึกษา การแช่แข็งของสเปิร์มและตัวอ่อนของหอยนางรมในภาคตะวันออก ในการทดลองใช้ตัวอ่อนหอยระยะ trochophore ที่มีความเข้มข้น 10,000 ตัว/มิลลิลิตร และ สเปิร์มมีความเข้มข้นประมาณ 1×10^9 มิลลิลิตร จากนั้นนำสเปิร์ม ไปเจือจางด้วย Ca-F-HBSS และนำตัวอ่อนระยะ trochophore มาเจือจางในน้ำทะเลเทียม (ASW) ทั้งสเปิร์มและตัวอ่อน จะใส่สารละลาย cryoprotectant ที่มี (ASW) น้ำทะเลเทียมและ 15 % propylene glycol ทำให้เข้ากัน จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในระยะสมดุล 20 นาที ที่อุณหภูมิ 2-1 องศาเซลเซียส นำไปบรรจุลงหลอดฟางแล้วเข้าเครื่อง controlled-rate freezer เพื่อแช่แข็งใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -2.5 องศาเซลเซียส/นาที จนถึงอุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส จากนั้นทิ้งไว้ 5 นาทีแล้วนำมาใส่ในถังไนโตรเจนเหลว สามารถเก็บไว้ได้นาน 1 สัปดาห์ ละลายใน water bath ใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ภายใน 5 วินาที

Gwo (1995) ศึกษาการทดลอง การแช่แข็งตัวอ่อนของลูกหอยนางรม พบว่าเมื่อนำลูกหอยในระยะ trochophore มาผสมกับ 15% dimethyl sulfoxide (DMSO) หรือ 10% propylene glycol ซึ่งเจือจางลงในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 25 ppt ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และปรับความหนาแน่นให้อยู่ประมาณ 1500 ml จากนั้นดูดลูกหอยที่ผสมสารละลายปริมาณ 0.5 ml ใส่ในหลอด จากนั้นนำไปลดอุณหภูมิให้ได้อุณหภูมิต่ำสุดที่ -1 ถึง -5 องศาเซลเซียส โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิระหว่าง -1.5 ถึง -2.5 องศาเซลเซียส/นาที จากนั้นลดอุณหภูมิต่อไปให้ได้ระหว่าง -30 ถึง -40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปใส่ในถังไนโตรเจนเหลว นำไปละลายใน water bath ที่อุณหภูมิห้อง ถ้าหอยมีชีวิตอยู่จะว่ายน้ำได้ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 2-3 วัน จะพัฒนาต่อไป

Gwo et al. (2002) ศึกษาถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งของหอยเป่าอื้อเล็ก (*Haliotis diversicolor supertexta*) การทดสอบความเป็นพิษของสเปิร์มโดยใช้สารโครีโอโพรเทคแทนท์ 8 ชนิด คือ dimethyl sulfoxide (DMSO), dimethyl acetamide (DMA), ethylene glycol (EG), propylene glycol (PG), butylenes glycol (BG), polyethylene glycol, glycerol and methanol ที่ความเข้มข้นระหว่าง 5-25% และประเมินการเคลื่อนที่ เมื่อเวลา 60 นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ก่อนการแช่แข็ง พบว่า สารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยที่สุดคือ 10% DMSO ที่ผสมกับ artificial seawater (ASW) ทำการเจือจางน้ำเชื้อ 1:1 กับ extender ใส่ในหลอดขนาด 1.5 ml และทำการแช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ ระหว่าง 3.5 ถึง -20 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิสุดท้ายแตกต่างกัน (0, -30, -60, -90 และ -120 องศาเซลเซียส) และนำมาเก็บในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) จากการทดลอง จะพบว่าน้ำเชื้อที่ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -12 และ -15 องศาเซลเซียส/นาที เมื่อจุ่มในไนโตรเจนเหลว สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ที่ดีที่สุด หลังจากการละลาย การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

Yoon and Yoong (2003) ได้ศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนของลูกหอยมุก (*Pinctada fucata*) ในระยะต่างๆ โดยเพิ่ม sugar ลงไปจากการทดลองพบว่า อัตราการรอดตายในการแช่แข็งและการละลายของลูกหอยในระยะ trochophores มีเพียง 43.1 % อัตราการลดอุณหภูมิตั้งแต่ 1 องศาเซลเซียส/นาที ส่วนอัตราการรอดชีวิตของลูกหอยในหลังการแช่แข็งและการละลายจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อหอยมีการพัฒนาการเจริญเติบโตขึ้นซึ่งในระยะ umbo stage และ last D-shaped larvae จะมีการรอดถึง 91% ซึ่งมีผลมาจากการใส่ 0.2 M glucose หรือ sucrose ลงไปพร้อมกับการแช่แข็ง

Poncet (2003) ทำการทดลองผลของสารโครีโอโพรเทคแทนท์อัตราการลดอุณหภูมิ และการละลายของ hemocytes ที่มีผลต่อหอยเป่าอื้อ (*Haliotis tuberculata*) โดยเอา hemocytes จาก standardized cell stock ใช้ 10% glycerol เป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส/นาที และอัตราการลดอุณหภูมิตั้งแต่ 3 หรือ 9 องศาเซลเซียส/นาที แล้วเลี้ยงไว้ 2 วัน พบว่าเซลล์มีอัตราการรอด 96% และนำไปวัด DNA และโปรตีน ให้ค่า 83% และ 78% ตามลำดับ และอัตราเมตาบอลิซึมสูง แต่หลังจากเลี้ยงไว้ 6 วันปรากฏว่าเซลล์เปาะบางและได้รับอันตราย ฉะนั้นจะต้องมีการทดลองหาสารละลายโครีโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม วิธีการแช่แข็งที่เหมาะสม การละลาย hemocytes ซึ่งจะส่งผลต่อการรอดชีวิตของหอย

Dong et al. (2005) ทำการแช่แข็งสเปิร์มของ diploid และ tetraploid ของหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) โดยใช้ความเข้มข้นของสเปิร์ม 2×10^9 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 องศาเซลเซียส/นาที มีผลทำให้สเปิร์มที่แช่แข็ง เมื่อนำมาทำการปฏิสนธิ พบว่า มีอัตราการรอดถึงระยะ D-larvae 58.9%

Choi and Chang (2004) ทำการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ พัฒนาการของระยะตัวอ่อน และการเพิ่มน้ำตาลเข้าไปในกระบวนการแช่แข็ง ที่มีผลต่อตัวอ่อนของหอยมุก (*Pinctada Fucutamartensis*) พบว่าอัตราการลดอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส/นาที ตัวอ่อนหอยนางรมระยะ trochophores มีอัตราการรอด 43.1% ระยะ late D-shaped larvae มีอัตราการรอด 91% เมื่อมีการเติม 0.2 M glucose หรือ sucrose

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

ปิ๊กเกอร์ขนาดต่างๆ

ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 250 และ 500 มิลลิลิตร

ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ

กระดาษกรอง

เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)

เครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)

กล้องจุลทรรศน์

Hemocytometer

ถังเก็บไนโตรเจนเหลวขนาดใหญ่ (dewar)

ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ

ตู้ autoclave

ตู้อบเครื่องแก้ว (hot air oven)

Glass micropipette ขนาด 5,10 และ 100 ไมโครลิตร

French Straw 0.25 มิลลิลิตร

Canister

canes

Vial tubes

rack

Tissue culture flasks

Thermocouple probe thermometer (K-type, HI 91530K, Hanna Instruments Inc.)

ไนโตรเจนเหลว

ฟอพันธุ์หอยเป่าฮื้อ

สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการ

แช่เย็น การแช่แข็ง และการย้ายมสึ

วิธีดำเนินการทดลอง

1. การรวบรวมน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์หอยเป่าฮือ

พ่อพันธุ์หอยเป่าฮือถูกรวบรวมและลำเลียงมาจากชายฝั่งอ่าวไทยจังหวัดตราด และชายฝั่งอันดามันจังหวัดภูเก็ต มายังโรงเพาะฟักของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่หอย (รูปที่ 1 และ 2) โดยลำเลียงมาด้วยรถยนต์และควบคุมอุณหภูมิน้ำทะเลให้เย็นระหว่างการลำเลียงพ่อพันธุ์ พ่อพันธุ์หอยถูกเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสเพื่อให้ปรับตัวก่อนการรวบรวมน้ำเชื้อ (รูปที่ 3) และถูกนำมาชั่งน้ำหนักก่อนที่จะทำการรวบรวมน้ำเชื้อออกมา เพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อหอยก่อนและระหว่างการทดลอง เพื่อทราบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อ

หอยเป่าฮือถูกนำมาทำความสะอาดเปลือกก่อนทำการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ โดยทำการคัดพ่อพันธุ์ที่แข็งแรง เปิดเปลือกบางส่วนเพื่อดูตำแหน่งของอวัยวะ (testis) (รูปที่ 4 และ 5) การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อหอย ทำโดยการเปิดเปลือกแล้วใช้เข็มแทงตรงบริเวณ gonad ซึ่งมีสีครีมขาว ระวังไม่ให้กระเพาะอาหาร (stomach) แตก จากนั้นเก็บน้ำเชื้อที่รวบรวมได้ใส่ไว้ในจานแก้ว เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป เอน้ำเชื้อแต่ละบนสไลด์ นำมาส่องดูใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อแยกเพศผู้ หลังจากนั้นทำการรวบรวมน้ำเชื้อ โดยน้ำเชื้อที่ใช้ในการศึกษาถูกรวบรวมจากพ่อพันธุ์หอยหลายตัว (pooled semen samples) เพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation) (รูปที่ 6) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีเท่านั้นถูกนำมาใช้ในการแช่เย็น หรือแช่แข็ง โดยต้องเป็นน้ำเชื้อที่มีลักษณะขาวขุ่น หนืด และไม่มีเมือก หรือน้ำย่อยกระเพาะอาหาร และต้องมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้น น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ไม่นำมาใช้ในการทดลอง เพื่อให้มั่นใจว่าขณะทำการทดลองน้ำเชื้อหอยมีคุณภาพที่ดีพอ หอยตัวผู้ที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ผ่านหลักเกณฑ์ที่วางไว้ ได้ถูกรวบรวมน้ำเชื้อเพื่อนำไปศึกษาต่อ โดยการใช้หลอด syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร รวบรวมน้ำเชื้อไปใส่ใน eppendorf tube ต่อไป แล้วจึงเก็บไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพสเปิร์มไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลง น้ำเชื้อที่ได้เหล่านี้ถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งไม่เกิน 1 ชั่วโมง ในระหว่างขั้นตอนการแช่เย็น หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อ

2. การประเมินคุณภาพสเปิร์มในน้ำเชื้อหอยเป่าฮือ

การประเมินคุณภาพหอยเป่าฮือ พิจารณาจาก ความหนาแน่นของสเปิร์ม และการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยความหนาแน่นของสเปิร์มทำการประเมินโดยการเจือจางน้ำเชื้อ (10 ไมโครลิตร) ด้วย 0.9% saline โดยเจือจาง 10,000 เท่า ผสมให้เข้ากันใน eppendorf tube ด้วยการใช้ vortexer แล้วจึงนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางไปหยดบน hemacytometer และ นับจำนวนสเปิร์มที่พบโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า แล้วจึงคำนวณกลับหาความหนาแน่นของสเปิร์ม การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ของน้ำเชื้อสด (fresh semen) ทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อ สด (1 ไมโครลิตร) ที่รวบรวมจากตัวหอย ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วจึงหยดน้ำ ทะเล ลงไป 100 ไมโครลิตร พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆอย่างรวดเร็วเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ และประเมินเปอร์เซ็นต์ที่สเปิร์มเคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดที่ถูกเจือจางด้วยสารโครีโอโพรเทคแทนท์ (extended semen) ทำการประเมินการเคลื่อนที่โดยดูดสารละลายเหล่านี้นออกมา 10 ไมโครลิตร แล้วกระตุ้นด้วยน้ำทะเลปริมาตร 90 ไมโครลิตร สำหรับการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการ

แช่แข็งน้ำเชื้อ (cryopreserved semen) ทำโดยการตัดหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อแล้วนำน้ำเชื้อที่ละลาย 5 ไมโครลิตรแล้วกระตุ้นด้วยน้ำทะเลปริมาตร 95 ไมโครลิตร การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเหล่านี้ทำ 3 ซ้ำ โดยในแต่ละสไลด์ประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอีก 3 ซ้าย่อยให้เสร็จภายในเวลาไม่เกิน 15 วินาทีหลังจากสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ (รวม 9 ซ้าย่อย) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percentage of motile sperm) ประเมินจากจำนวนสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วย ทะเล โดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ได้ 6 ระดับ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนที่ได้ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% (Vuthiphandchai et al., 2009)

3. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าฮื้อในสภาพต่างๆ

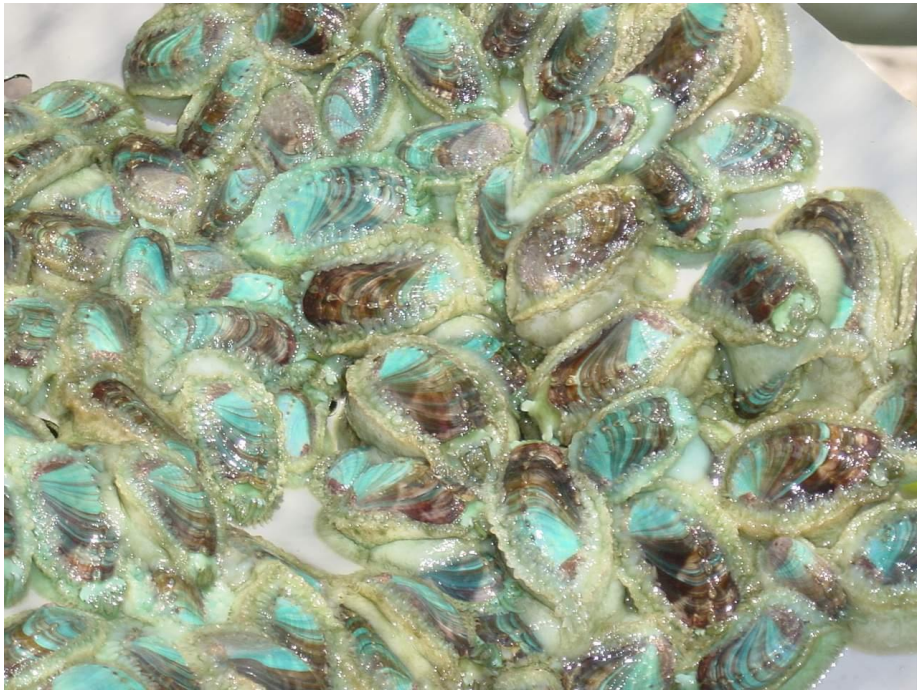
น้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อได้นำมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มใน 2 ลักษณะได้แก่ สภาพสดไม่เจือจางในสารละลาย (fresh and undiluted milt) และ สภาพสดที่เจือจางในน้ำทะเล (diluted milt) โดยน้ำเชื้อทั้ง 2 ลักษณะนี้เก็บไว้ในหลอดทดลองแล้วนำไปเก็บรักษาในถังน้ำแข็ง (0-4 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำน้ำเชื้อเหล่านี้มาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทุกๆ 2 ชั่วโมง จนถึงเวลา 18 ชั่วโมงหลังการเก็บรักษา การทดลองทั้งหมดทำ 3 ซ้ำเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นของคุณภาพน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อ

4. การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อแบบแช่เย็น

4.1 การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

การทดลองมี 6 ชุดการทดลองเพื่อศึกษาถึงผลของลักษณะของภาชนะ และการให้ออกซิเจนที่มีต่อระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อแช่เย็น โดยน้ำเชื้อ หอยเป่าฮื้อ ถูกเก็บรักษาไว้ในภาชนะต่างๆกัน 3 ชนิดได้แก่ culture flask ขนาด 25 มิลลิลิตร Beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร และถุงพลาสติก ziplock ขนาด 200 มิลลิลิตร ทั้งในสภาพไม่ให้ออกซิเจนและให้ออกซิเจนสมทบ ในกรณีที่ไมให้ออกซิเจนสมทบนั้น น้ำเชื้อหอยเป่าฮื้อสัมผัสอากาศโดยตรง แต่การให้ออกซิเจนสมทบนั้น ทำการอัดออกซิเจนสมทบเข้าไป โดยทำการอัดออกซิเจนบริสุทธิ์ทันทีที่เสร็จสิ้นการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

น้ำเชื้อถูกรวบรวมจากพ่อพันธุ์หลายตัว (pooled samples) (3 ซ้ำ/ชุดการทดลอง) โดยน้ำเชื้อในทุกชุดการทดลองถูกนำมาเก็บรักษาไว้ที่ อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียสในตู้ incubator การสุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อของทุกชุดการทดลอง ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มที่เวลา 0, 6, 12, 24, 36, 48, 60 และ 72 ชั่วโมงหลังการเก็บรักษาด้วยการ ประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เพื่อทราบช่วงระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล



รูปที่ 1 หอยเป่าฮื้อที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 2 ลักษณะฟอพันธุ์หอยเป่าฮื้อที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ 3 การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์หอยเป่าฮื้อ



รูปที่ 4 ตำแหน่งของอวัยวะในพ่อแม่พันธุ์หอยเป่าฮื้อ



รูปที่ 5 ลักษณะอันทะพอพันธุ์หอยเป่าฮื้อที่นำออกมาจากตัวหอย



รูปที่ 6 การรวบรวมน้ำเชื้อจากพอพันธุ์หอยเป่าฮื้อ

4.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

4.2.1 การศึกษาผลของ osmotic pressure ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

น้ำเชื้อหอยเป่าอื้อ ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายต่างชนิดกันซึ่ง ถูกเตรียมให้มีค่าความดันออสโมติก (osmolality) ต่างกันเพื่อทดสอบผลของ osmotic pressure ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพื่อทราบถึงช่วง osmotic pressure ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ต่อไป สารละลาย NaCl, KCl, glucose และ mannitol ได้ถูกเตรียมขึ้นให้มีค่า osmolality ตั้งแต่ 25 จนถึง 1600 mOsm/kg โดยมีค่าเพิ่มขึ้นเป็นช่วงๆด้วย deionized water เพื่อนำไปกระตุ้นน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อว่ามีการเคลื่อนที่มากน้อยอย่างไร โดยเตรียม NaCl และ KCl ที่ความเข้มข้น 25, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600, 700 และ 800 mOsm/kg สำหรับ glucose และ mannitol เตรียมให้มีความเข้มข้น 50, 100, 200, 300, 400, 600, 800, 1000, 1200, 1400 และ 1600 mOsm/kg การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ทำโดยหยดน้ำเชื้อสดที่รวบรวมมาใหม่ๆ 5 ไมโครลิตรลงบนกระจกสไลด์ แล้วจึงหยดสารละลายต่างชนิดกันที่เตรียมขึ้นมาเพื่อทดสอบลงไป 100 ไมโครลิตร แล้วใช้ cover glass กดลงไปเบาๆแล้วประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ทันทีด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่าตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้ว การทดลองนี้ทำให้ทราบถึงระดับ osmolality ที่ทำให้สเปิร์มหอยเป่าอื้อมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด (complete activation point) และไม่เคลื่อนที่ (immotile) น้ำเชื้อหอยเป่าอื้อถูกนำมาทดลองในช่วงต้นฤดู กลางฤดู และปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยทดลอง 6 ซ้ำ/ชุดการทดลอง

4.2.2 การศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อ

ในการพัฒนาหาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อแบบแช่เย็นนี้ สารละลายบัฟเฟอร์ต่างๆชนิดถูกเตรียมขึ้นมาเพื่อเจือจางน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อ โดยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ artificial seawater, Ringer solution และ calcium free saline (Ca-F saline) ซึ่งเป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่นิยมนำมาใช้แช่เย็นน้ำเชื้อปลาทะเลและหอยทะเลหลายชนิด สารละลายบัฟเฟอร์เหล่านี้จะถูกเตรียมขึ้นมาโดยใส่ penicillin-streptomycin 0.1% เพื่อควบคุมการเจริญของแบคทีเรีย น้ำเชื้อหอยเป่าอื้อถูกนำมาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมขึ้นใน tissue culture flask ขนาด 25 ml ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อ : สารละลายบัฟเฟอร์ = 1 : 1 แล้วผสมให้เข้ากันเป็นเนื้อเดียวโดยเขย่าเบาๆจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส จากนั้นน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางจะถูกสุ่มประเมินเช็คเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ตามเวลาที่กำหนดจนกระทั่งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ โดยทดลอง 3 ซ้ำ

ในขั้นตอนต่อมาทำการศึกษาผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม โดยนำน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อมาเจือจางใน Ca-F saline ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อ : Ca-F saline = 1:1, 1:2 และ 1:4 แล้วประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่เก็บไว้ที่ 2-4 องศาเซลเซียสตามเวลาที่กำหนด จนกระทั่งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

5. การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าอื้อแบบแช่แข็ง

5.1 ศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป่าอื้อ

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบความเข้มข้นของโครีโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมก่อนที่นำไปใช้ในขั้นตอนการแช่แข็งน้ำเชื้อ การทดลองเริ่มจากการนำน้ำเชื้อของหอยเป่าอ้อมมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ artificial seawater (ASW) โดยใช้ น้ำเชื้อหอยเป่าอ้อมจากพ่อพันธุ์หลายตัว (pooled semen) เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ ASW ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตร ภายใน tissue culture flask ขนาด 25 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิห้อง ในขณะที่เดียวกันโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ (dimethyl sulfoxide; DMSO, propylene glycol, acetamide, methanol, ethanol และ ethylene glycol) ได้ถูกเตรียมขึ้นมา และนำมาผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของโครีโอโพรเทคแทนท์เป็น 5%, 10%, 15% และ 20% ตามลำดับ การแช่เปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ ในการทดลองนี้ทำในระยะเวลาต่างๆ กัน ตั้งแต่ 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 และ 240 วินาที หลังจากใส่โครีโอโพรเทคแทนท์ลงในน้ำเชื้อที่เจือจาง โดยใช้ น้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อมากระตุ้นการเคลื่อนที่ เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

การทดลองในขั้นนี้ทำให้ทราบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ก่อนที่จะทำการแช่แข็ง การทดลองได้ทำ 6 ซ้ำที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) โดยใช้ pooled semen ในช่วงเวลาต่างๆ กัน

5.2 การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอ้อม

การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป่าอ้อม เริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อที่รวบรวมจากพ่อพันธุ์หลายตัวมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ ASW ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสม DMSO ในระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน (5, 10, 15 และ 20%) แล้วปล่อยให้ 10 นาทีเพื่อให้เกิดสภาพสมดุลของสารละลาย (equilibrium) ก่อนที่น้ำเชื้อจะถูกแช่แข็ง น้ำเชื้อที่ถูกเจือจางรวบรวมใส่ในหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ปิดปลายหลอดให้แน่น (รูปที่ 7) การแช่แข็งน้ำเชื้อทำโดยนำหลอดฟางเหล่านี้นำใส่ในเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ด้วยการลดอุณหภูมิแบบ one-step freezing จากอุณหภูมิเริ่มต้น (initial temperature) ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) โดยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ต่างๆ กันตั้งแต่ 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาฬิกาจนถึงอุณหภูมิต่ำสุด (final temperature) -40 องศาเซลเซียส พักไว้ 5 นาที แล้วนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (รูปที่ 8) ส่วนน้ำเชื้อที่แช่แข็งมาที่อุณหภูมิต่ำสุด -80 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาฬิกาที่ก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว โดยทำการทดลอง 6 ซ้ำ น้ำเชื้อที่ถูกแช่แข็ง ทั้งหมดถูกนำมาละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motility) ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว

6. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของ สเปิร์ม ในแต่ละชุดการทดลองถูกนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Analysis of variance (two-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS



รูปที่ 7 การบรรจุน้ำเชื้อพ่อพันธุ์หอยเป่าฮือใส่ในหลอดฟาง



รูปที่ 8 การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป่าฮือแช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลว