บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หอยนางรมในเขตร้อนที่เลี้ยงกันแพร่หลายมี 3 สกุล ได้แก่ *Crassostrea Ostrea* และ *Saccostrea* โดยใช้ลักษณะของเปลือกในการจำแนก อย่างไรก็ดีรูปร่างของเปลือกดังกล่าวอาจเปลี่ยนแปลงได้ตามสภาพแวดล้อมแม้ว่าจะเป็นหอยชนิดเดียวกัน ส่วนการดำรงชีวิตก็แตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมด้วย โดยพบว่าสกุล *Ostrea* สามารถปรับตัวได้ดีในน้ำทะเลค่อนข้างใส มีตะกอนเพียงเล็กน้อย ความเค็มค่อนข้างสูง มีการสืบพันธุ์และวางไข่แตกต่างจากสกุลอื่น โดยจัดเป็นพวก Ovoviviparous ในขณะที่สกุลอื่นเป็นพวก Oviparous ส่วนสกุล *Crassostrea* สามารถปรับตัวได้ดีในบริเวณป่าชายเลนซึ่งเป็นน้ำที่มีความขุ่นมาก ความเค็มของน้ำเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ แต่จะค่อนข้างต่ำ และสกุล *Saccostrea* ส่วนใหญ่พบในทะเลเขตร้อนทั่วไปที่ความเค็มค่อนข้างสูง (Quayle, 1980)

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน

หอยตะโกรมกรามขาวมีชื่อสามัญว่า Belcher's Oyster มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Crassostrea belcheri* จัดอยู่ในอนุกรมวิธาน คือ

Phylum Mollusca
Class Bivalvia
Order Ostreoida
Family Ostreidae
Genus *Crassostrea*
Species *belcheri*

(Barnes, 1993)

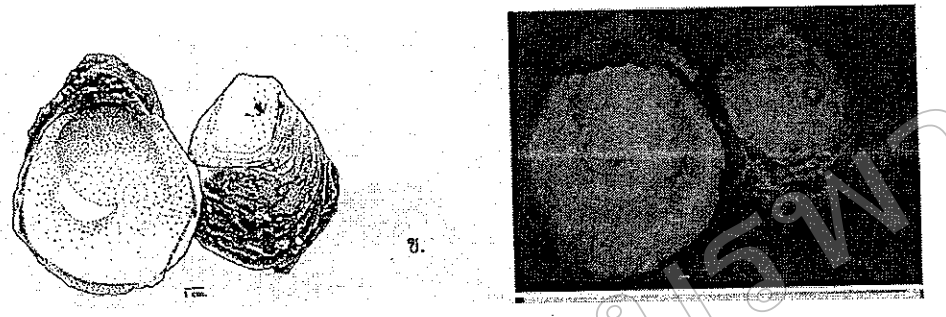
ลักษณะทั่วไปของหอยตะโกรมกรามขาว

1. ลักษณะเปลือกภายนอก

เปลือกหนา ขนาดค่อนข้างใหญ่ ความยาวและความสูงของเปลือก 9 ซม. และ 13 ซม. ขอบเปลือกไม่เป็นรอยหยัก มีแผ่นเกล็ดตามขอบเปลือกด้านในของเปลือกมีสีขาวขุ่น ขอบเปลือกไม่มีปมหรือสัน รอยกล้ามเนื้อยึดเปลือกเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยวมีสีขาว แอ่งใต้ขั้วเปลือกไม่ลึก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

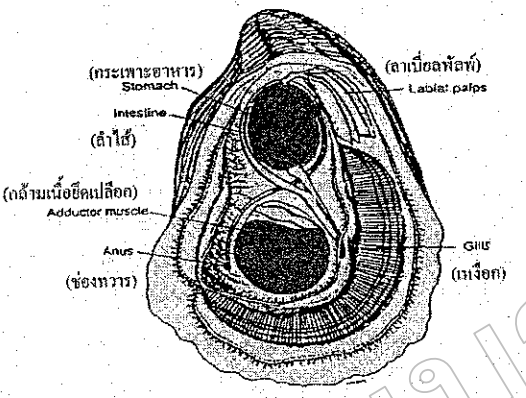
แผ่นรอบคอบเปลือกแคบ (ภาพที่ 2-1)



ภาพที่ 2-1 ลักษณะด้านในเปลือกซ้ายและด้านนอกเปลือกขวาของหอยตะโกรมกรามขาว (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

2. ลักษณะภายในเปลือก

ภายในเปลือกประกอบด้วย ลำตัวของหอยมีเนื้อเยื่อบาง ๆ ห่อหุ้มลำตัวทั้ง 2 ข้าง เรียกว่า แผ่นเนื้อแมนเทิล (Mantle) มีลักษณะเป็นแผ่นบางแผ่คลุมถึงช่องปาก และ Labial Palp เหงือกเป็นอวัยวะที่ใช้กรองอาหารมีอยู่ 2 คู่ หรือ 4 แถว การกินอาหารโดยการกรองอาหารจากน้ำโดยน้ำไหลผ่านเข้ามาในช่องแมนเทิลไหลผ่านเหงือกและออกไปทางท่อน้ำออก อาหารต่าง ๆ ที่พัดพามากับน้ำจะติดบนซี่เหงือก อาหารที่มีขนาดใหญ่ไปจะตกลงในช่องแมนเทิลตอนล่างและถูกขับออกทางท่อน้ำออก อาหารที่มีอนุภาคขนาดเล็กจะมีเมือกมาปกคลุมและมีเส้นหนวดเล็ก ๆ คอยพัดโบกให้อนุภาคเหล่านี้เข้าสู่ทางเดินอาหาร นอกจากนี้เหงือกทำหน้าที่ในการหายใจและช่วยในการขับถ่ายของเสียออกจากร่างกาย บริเวณกึ่งกลางลำตัวมีกล้ามเนื้อยึดเปลือกทำหน้าที่ปิดเปิดเปลือก ส่วนถัดเข้าไปเป็นลำตัวซึ่งเป็นที่รวมอวัยวะต่าง ๆ ได้แก่ ระบบประสาท ระบบการขับของเสีย ระบบเลือด และระบบสืบพันธุ์ (ภาพที่ 2-2) อวัยวะสืบพันธุ์จะเห็นเป็นเนื้อสีขาวปกคลุมกระเพาะอาหาร ช่องทางออกของเซลล์สืบพันธุ์สู่ภายนอกลำตัว หอยพวกนี้มีการปฏิสนธิ (Fertilization) ของไข่และอสุจิเกิดในน้ำทะเล (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)



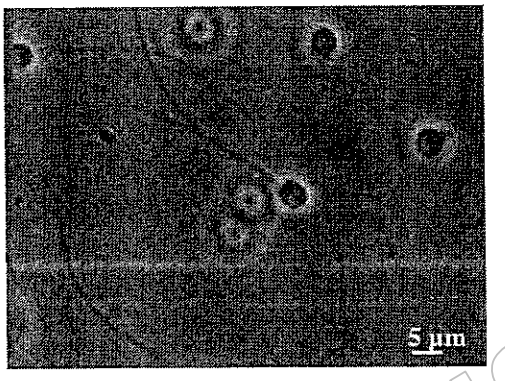
ภาพที่ 2-2 อวัยวะภายในของหอยนางรม (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

ชีววิทยาการสืบพันธุ์

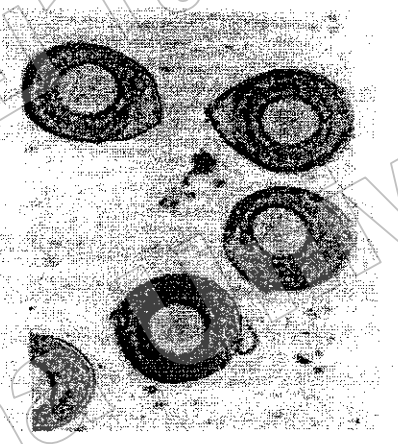
หอยตะโกรมกรามขาวมีเพศแยกกัน ยกเว้นในบางกรณีที่พบหอยที่มีทั้งสองเพศอยู่ในตัวเดียวกัน (Protandrous Hermaphrodite) คือ มีต่อมเพศ 2 คู่ เป็นรังไข่ (Ovary) และอัณฑะ (Testis) 1 คู่ เมื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัย ระยะแรกอัณฑะทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในขณะที่รังไข่ยังไม่เจริญ ต่อมาเมื่อรังไข่ทำหน้าที่สร้างไข่ อัณฑะก็จะหยุดทำหน้าที่ จึงดูคล้ายกับว่าหอยพวกนี้สามารถเปลี่ยนเพศได้ (วันทนา อยู่สุข, 2528) การเปลี่ยนแปลงเพศขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม Quayle (1969) กล่าวว่า เมื่อใดก็ตามที่อาหารมีปริมาณน้อย หอยนางรมจะมีการเปลี่ยนแปลงจากเพศเมียไปเป็นเพศผู้มาก และในทางตรงกันข้ามเพศผู้จะเปลี่ยนเป็นเพศเมียเมื่อมีอาหารอุดมสมบูรณ์ พบว่า เพศของ *O.virginica* ที่เปลี่ยนไปแต่ละปีนั้นการเปลี่ยนแปลงมักเกิดในช่วงฤดูหนาวมากกว่าฤดูอื่น แสดงว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเปลี่ยนเพศด้วย

การจำแนกเพศของหอย ดูจากลักษณะภายนอกไม่ได้ ต้องเปิดเปลือกหอยออกมา แล้วสังเกตดูจากอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad) ที่ปกคลุมอยู่รอบกระเพาะอาหาร หอยตะโกรมกรามขาวเพศผู้และเพศเมียที่มีความสมบูรณ์เพศ พบว่า อวัยวะสืบพันธุ์มีสีครีมขาวเหมือนกัน จึงต้องนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ จะเห็นว่า หอยเพศผู้ สเปิร์มว่ายน้ำแข็งแรง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 ไมโครเมตร (ภาพที่ 2-3) ส่วนหอยเพศเมีย ไข่ควรมีลักษณะค่อนข้างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 ไมโครเมตร (ภาพที่ 2-4) (คเชนทร เฉลิมวัฒน์, 2544) โดยธรรมชาติพบหอยมีความสมบูรณ์เพศและผสมพันธุ์ได้เกือบตลอดทั้งปี ยกเว้นในช่วงฤดูฝนที่น้ำมีความเค็มต่ำหรือในช่วงที่หอยผอมหลังฤดูวางไข่ (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-3 ลักษณะสเปิร์มของหอยนางรม *Crassostrea virginica* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 ไมโครเมตร (Paniagua-Chavez, Jenkins, Segovia, & Tiersch, 2006)



ภาพที่ 2-4 ลักษณะไข่ของหอยนางรม *Crassostrea virginica* ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 50 ไมโครเมตร (Quayle, 1969; คเชนทร เฉลิมวัฒน์, 2544)

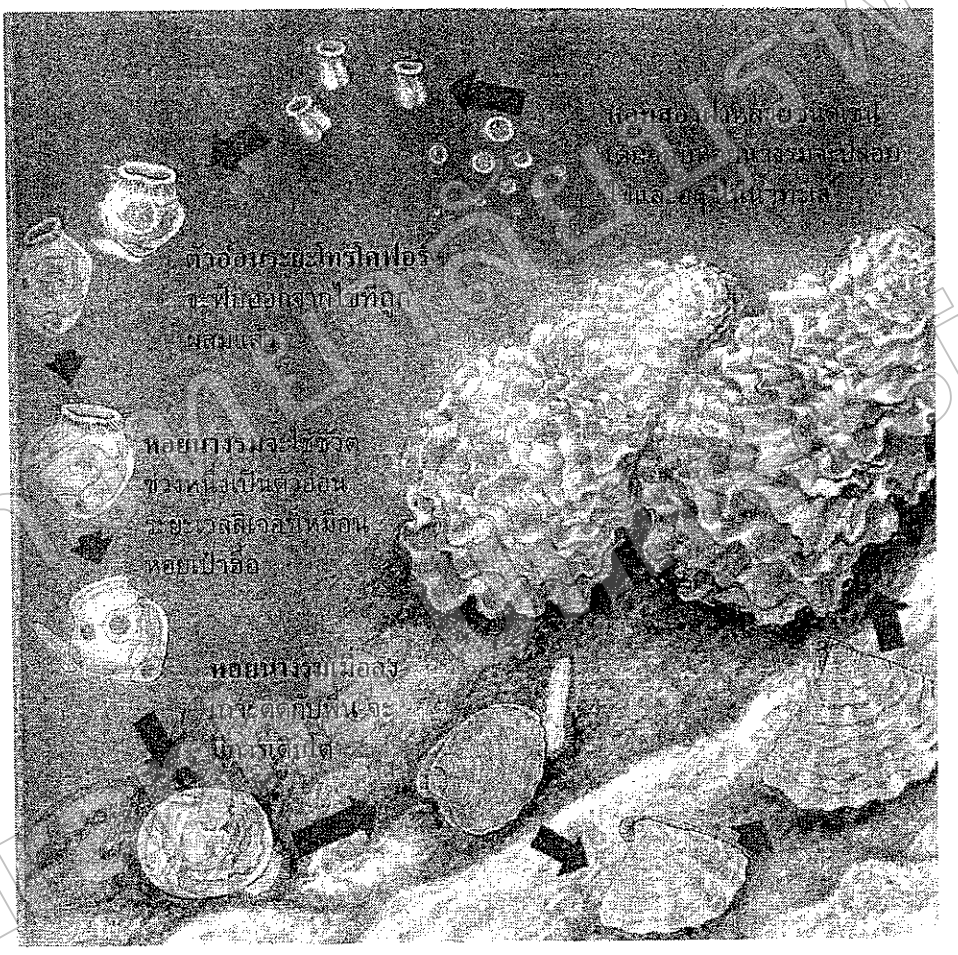
1. การปฏิสนธิ

การปฏิสนธิในหอยสองฝามีสองแบบคือ การปฏิสนธิข้ามตัว (Cross-Fertilization) และการปฏิสนธิภายในตัว (Self-Fertilization)

การปฏิสนธิข้ามตัวคือ หอยสองฝาส่วนใหญ่มีการปฏิสนธิข้ามตัวโดยเพศผู้ปล่อยสเปิร์มและหอยเพศเมียปล่อยไข่ลงในน้ำทะเล เมื่อเกิดการปฏิสนธิแล้วได้ไซโกต (Zygote) ซึ่งเจริญไปเป็นตัวอ่อนที่ไม่มีเปลือกเรียกตัวอ่อนระยะนี้ว่า โทรโคฟอร์ (Trochophore) จากนั้นพัฒนาต่ออีกหลายขั้นตอนเช่นวิลีเจอร์ (Veliger) และเพดิวิลีเจอร์ (Pediveliger) จนกระทั่งพัฒนาเป็นตัวอ่อนที่พร้อมลงเกาะและจมลงสู่พื้นทะเลเพื่อฝังตัวหรือลงเกาะ (Set) ติดกับพื้นหรือวัสดุที่เหมาะเพื่อเจริญเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (ภาพที่ 2-5)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การปฏิสนธิภายในตัวคือ หอยสองฝาที่มีทั้งสองเพศในตัวเดียวกันอาจมีการปฏิสนธิภายในตัวเกิดขึ้นโดยการผสมของสเปิร์มและไข่จากอวัยวะสืบพันธุ์เดียวกัน เมื่อสเปิร์มและไข่ยังอยู่ภายในท่อสืบพันธุ์ โดยมากมักพบในหอยสองฝาที่มีท่อสืบพันธุ์ร่วมกัน (สุชาติ อุปถัมภ์ มาลียา เคลือตราชู เยาวลักษณ์ จิตรามวงศ์ และศิริวรรณ จันทเตนีย์, 2538)



ภาพที่ 2-5 วงจรชีวิตของหอยนางรม (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

2. ปัจจัยควบคุมวงจรการสืบพันธุ์

การเจริญเต็มที่ของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยสองฝาขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกและปัจจัยภายในหลายประการ ปัจจัยภายนอก เช่น อุณหภูมิ อิทธิพลของดวงจันทร์ ความลึกของน้ำ ความสมบูรณ์ของอาหาร ความหนาแน่นของประชากร ตลอดจนปรสิตภายใน และปัจจัยอื่น ๆ อุณหภูมิเป็นปัจจัยภายนอกที่สำคัญที่สุดต่อการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์และการหลั่งของเซลล์สืบพันธุ์ ปัจจัยภายในการวางไข่ขึ้นอยู่ภายใต้การควบคุมของเซลล์นิวโรเซครีทอรี (Neurosecretory Cell) เช่น

หอยแมลงภู่ และหอยนางรม เป็นต้น เซลล์นิวโรเซครีทอรีในปมประสาทเซรีบรัล (Cerebral Ganglion) มีส่วนในการยับยั้งการตอบสนองต่อปัจจัยที่ทำให้เกิดการวางไข่ ฮอร์โมนมีส่วนสำคัญในการหลั่งเซลล์สืบพันธุ์ของหอยสองฝาด้วย พบได้ในสเปิร์มของหอยนางรม คือ ไดแอนทลิน (Diantlin) ทำหน้าที่กระตุ้นการหลั่งไข่ โดยทำให้ช่องแมนเทิลขยายตัว และคลายกล้ามเนื้อแอดดักเตอร์ ทำให้ไข่ออกมาได้มากขึ้น (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)

3. ระบบสืบพันธุ์

ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของหอยสองทั้งเพศผู้และเพศเมียจะคล้ายคลึงกันคือมีอวัยวะสืบพันธุ์หนึ่งคู่ พบอวัยวะสืบพันธุ์จะอยู่ชิดกันจนไม่สามารถแยกออกได้ระบบสืบพันธุ์ของหอยสองฝาที่มีเพศผู้และเพศเมียแยกกัน จะพบอวัยวะสืบพันธุ์ใกล้กับกระเพาะอาหาร ลำไส้ และตับ ส่วนใหญ่ท่อสืบพันธุ์จะเปิดออกสู่ช่องแมนเทิลไปสู่รูเปิดของระบบสืบพันธุ์ (Gonopore) จะอยู่ใกล้ ๆ กับรูเปิดไต (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)

4. การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยสองฝา

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Spermatogenesis)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เริ่มต้นจาก Primary Germ Cell มีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส (Mitosis) ของเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรก (Primary Germ Cell) ที่อยู่รอบผนังฟอลลิเคิล โดยสเปอร์มาโตโกเนียในระยะแรก (Primary Spermatogonia) และระยะที่สอง (Secondary Spermatogonia) โดยสเปอร์มาโตโกเนียทั้งสองระยะจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องใกล้กับศูนย์กลางลูเมน (Lumen) ขนาดของสเปอร์มาโตโกเนียจะเล็กกว่าเซลล์สืบพันธุ์เริ่มต้น ต่อมาสเปอร์มาโตโกเนียระยะที่สองจะเปลี่ยนไปเป็นสเปอร์มาโตไซต์ระยะแรก (Primary Spermatocyte) ซึ่งจะแบ่งตัวแบบไมโอซิส (Meiosis) ต่อไปเป็นสเปอร์มาโตไซต์ระยะที่สอง (Secondary Spermatocyte) หลังจากนั้นมีการแบ่งตัวขั้นสุดท้ายเปลี่ยนไปเป็นสเปอร์มาติด (Spermatid) การสร้างสเปอร์มาโตไซต์ระยะแรกและระยะที่สอง สเปอร์มาติดเกิดอย่างต่อเนื่องจากผนังเซลล์เข้าสู่ศูนย์กลางของลูเมน สเปอร์มาติดจะเปลี่ยนเป็นสเปอร์มาโตซัว (Spermatozoa) จนเต็มลูเมน (Eversole, 1989)

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Oogenesis)

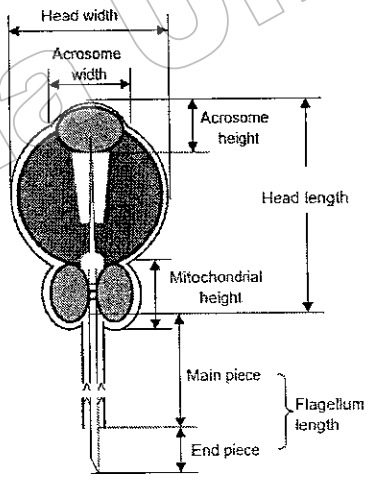
การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยสองฝาเพศเมียจะเริ่มจากการแบ่งตัวแบบไมโตซีส (Mitosis) ของเซลล์สืบพันธุ์ (Primary Germ Cell) ตามผนังฟอลลิเคิลให้ได้โอโอโกเนีย (Oogonia) ซึ่งจะแบ่งแบบไมโอซิสให้โอโอไซต์ (Oocyte) และจะเข้าสู่ระยะก่อนให้การกำเนิดไข่แดง (Previtellogenic) ซึ่งจะมีปริมาณการเพิ่มปริมาณนิวเคลียส (Nucleus) และไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) อย่างช้า ๆ และเมื่อถึงระยะที่มีการให้กำเนิดไข่แดง (Vitellogenic) และพบว่าเริ่มมีการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สะสมอาหารได้แก่ ไข่แดง (Yolk) ไขมัน (Lipid) และไกลโคเจน (Glycogen) โอโอไซต์จะเริ่มเปลี่ยนรูปร่างด้วยการสะสมอาหารเหล่านี้ และเคลื่อนที่ออกจากผนังฟอลลิเคิลเข้าสู่ส่วนกลางของฟอลลิเคิล แต่อย่างไรก็ตามยังมีบางส่วนที่ยังยึดติดกับผนังฟอลลิเคิลโดยก้านบาง ๆ เมื่อได้ขนาดก็จะหลุดออกจากก้านเข้าสู่ลูเมนพร้อมที่จะถูกขับออกสู่ภายนอก การแบ่งเซลล์สืบพันธุ์จะเกิดขึ้นเรื่อย ๆ จนได้ไข่พร้อมที่จะวางและผสมพันธุ์ หอยที่วางไข่และปล่อยเชื้อตัวผู้หมดแล้ว ลักษณะถุงจะเหี่ยวเล็กลง มีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันขึ้นมาแทนภายในถุง และระหว่างถุงซึ่งอวัยวะสืบพันธุ์จะเข้าสู่ระยะเตรียมฟอลลิเคิลใหม่อีกครั้ง และพร้อมที่จะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใหม่อีกครั้ง (Eversole, 1989)

5. ลักษณะเซลล์สืบพันธุ์

สเปิร์มของหอยสองฝา ประกอบด้วย ส่วนหัว (Head) ส่วนกลาง (Main Piece) และส่วนหาง (End Piece) โดยส่วนหัวมีนิวเคลียสรูปร่างค่อนข้างยาวมีอะโครโซม (Acrosome) ซึ่งมีเอนไซม์ใช้ในการย่อยผนังของไข่ ส่วนกลางของสเปิร์มมีไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ประมาณ 4-5 อัน ล้อมเซลทริโอล (Centriole) ส่วนหางคือ แฟลกเจลลัม (Flagellum) (ภาพที่ 2-6) (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)

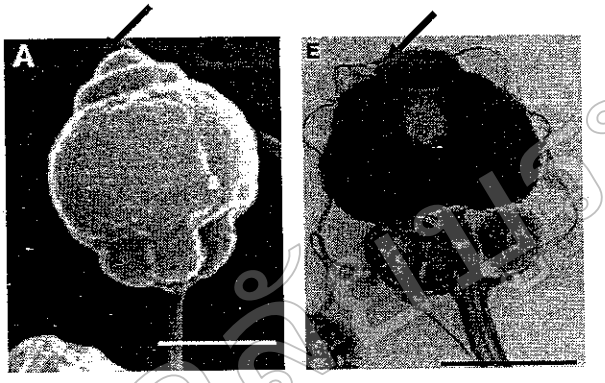


ภาพที่ 2-6 ลักษณะโครงสร้างของสเปิร์มหอยนางรม *Crassostrea virginica* (Galtsoff & Philpott, 1960)

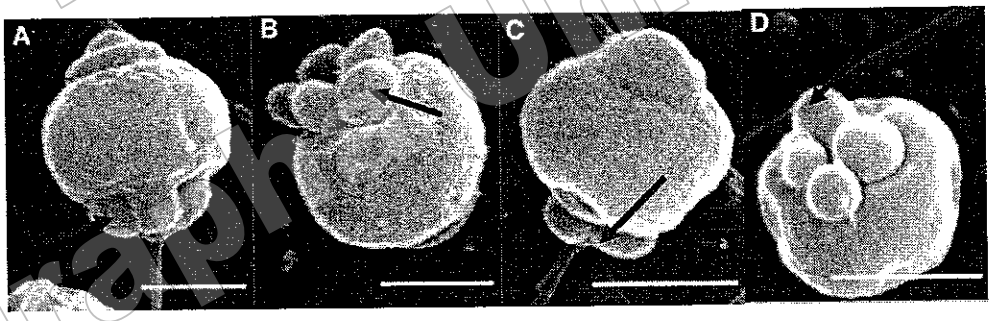
จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างของสเปอร์มาโตซัวของหอยนางรม 2n และ 4n (*Crassostrea gigas*) พบว่า ส่วนหัวของสเปิร์มมีอะโครโซมรูปร่างคล้ายหมวกแก๊ป (Cap-Shaped Acrosome) (ภาพที่ 2-7 AB) นิวเคลียสรูปร่างกลม (Spherical Nucleus) หอยนางรม 4n พบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไมโทคอนเดรีย 4-6 อัน (ภาพที่ 2-8 AB) และ 2n พบไมโทคอนเดรีย 4 อัน (ภาพที่ 2-8 CD) ล้อมเซลทริโอล ส่วนแฟลกเจลลัมและซีเลียมีการเรียงตัวของไมโครทิวบิล (Microtubule) ในซีเลียเป็นแบบ 9+2 (Dong, Huang, & Tiersch, 2005c)



ภาพที่ 2-7 ลักษณะส่วนหัวมีอะโครโซมรูปร่างแบบ Cap-Shaped Acrosome ของหอยนางรม *Crassostrea gigas* ถ่ายด้วยกล้องอิเล็กตรอน (หัวลูกศรชี้บอกตำแหน่งอะโครโซม)
A, B = อะโครโซมรูปร่างแบบ Cap-Shaped Acrosome (Dong et al., 2005c)



ภาพที่ 2-8 ลักษณะไมโทคอนเดรียของหอยนางรม 2n และ 4n *Crassostrea gigas* ที่ถ่ายด้วยกล้องอิเล็กตรอน (หัวลูกศรชี้แสดงตำแหน่งไมโทคอนเดรีย)
A, B = หอยนางรม 4n พบไมโทคอนเดรีย 5 อัน
C, D = หอยนางรม 2n พบไมโทคอนเดรีย 4 อัน (Dong et al., 2005c)

ไข่ของหอยสองฝา มักมีรูปร่างกลม พวกหอยสองฝาที่มีระยะตัวอ่อนเจริญภายนอกมักมีไข่ขนาดเล็ก ส่วนหอยสองฝาที่มีระยะตัวอ่อนเจริญอยู่ภายในมักมีไข่ขนาดใหญ่ ไข่ของหอยสองฝาน้ำเค็มมีปริมาณไข่แดงมากอาจถึงร้อยละ 30 ปริมาตรไข่ขาวทั้งหมด ไข่แดงมีแกลนูล (Granule) สองอยู่ 2 ชนิดคือ ชนิดที่เป็นโปรตีนและชนิดที่เป็นไขมัน หอยสองฝาที่มีไข่ขนาดเล็กมักผลิตไข่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จำนวนมาก อาศัยอยู่ในทะเลบริเวณน้ำตื้น เช่น หอยนางรมชนิดต่าง ๆ ส่วนหอยสองฝาที่มีขนาดใหญ่และมีระยะตัวอ่อนเจริญอยู่ภายในมักผลิตไข่เป็นจำนวนน้อย (สุชาติ อุปถัมภ์ และคณะ, 2538)

แหล่งอาศัยและการแพร่กระจาย

หอยตะโกรมกรามขาว อาศัยอยู่ได้ทั้งน้ำกร่อยและน้ำเค็ม พบชุกชุมตามบริเวณพื้นที่แถบชายฝั่ง ที่มีสภาพเป็นหินหรือก้อนหิน กระจัดกระจายตามบริเวณปากแม่น้ำ ลำคลอง ป่าชายเลน ที่น้ำท่วมถึง โดยหอยจะเกาะตามหิน รากโกรงกาง หลักหรือหัวตอ และวัตถุอื่น ๆ ที่จมน้ำ (ปิยพงศ์ โชติพันธ์ อุดม สิทธิภู่ประเสริฐ ชีรนันท์ บัวเพชร ปรเมษฐ์ พลอยประดับและขจรเดช รักเดช, 2525) หอยตะโกรมกรามขาวจะเจริญเติบโตในแหล่งน้ำที่มีความเค็มประมาณ 15-30 ppt (กรมประมง, 2540) (ภาพที่ 2-8)

แหล่งแหล่งที่สำรวจพบในภาคตะวันออก

1. จังหวัดจันทบุรี พบบริเวณปากน้ำจันทบุรี ติดต่อกับปากน้ำแหลมสิงห์ที่เกาะเปริดและปากน้ำเวฬุ
2. จังหวัดตราด พบที่อ่าวกระป๋อง แหลมคัน แต่ไม่ชุกชุม

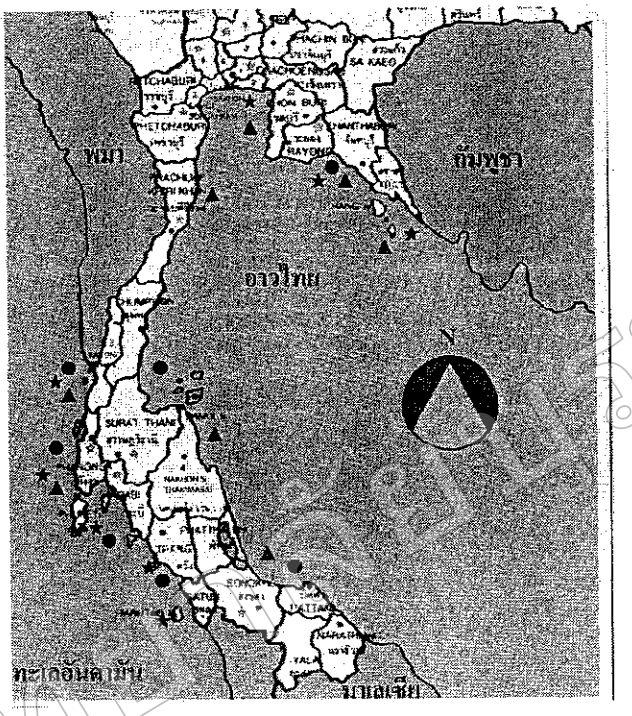
แหล่งที่สำรวจพบในภาคใต้ฝั่งตะวันออก

1. จังหวัดสุราษฎร์ธานี มีชุกชุมที่เกาะปราบ คลองท่าทอง กาญจนดิษฐ์ คลองพุมเรียง
2. จังหวัดสงขลา มีชุกชุมที่คลองนาทับ คลองสะกอม คลองเทพา ปากทะเลสาปสงขลา
3. จังหวัดปัตตานี มีชุกชุมที่คลองมะรอด อำเภอบานาเระ
4. จังหวัดนราธิวาส พบที่คลองตากใบ และปากแม่น้ำบางนรก

แหล่งที่สำรวจพบในภาคใต้ฝั่งมหาสมุทรอินเดีย

1. จังหวัดสตูล พบที่คลองปูยู คลองสาคร เกาะสาหร่าย และเกาะตะรุเตา เป็นต้น (ไพโรจน์ พรหมานนท์, 2526)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 2-9 การแพร่กระจายของหอยตะโกรมกรามขาว (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

● หอยตะโกรมกรามขาว

การเพาะพันธุ์หอย

การเพาะหอยนางรมหรือหอยตะโกรมสามารถทำได้ 2 วิธี คือ การกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (Spawning Induction) และการผสมเทียมโดยการผ่าตัด (Sacrification Technique) ดังนี้

1. การกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

การกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์คือการทำให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกตามความต้องการซึ่งทำได้หลายวิธีแต่หลักการสำคัญคือการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์อย่างฉับพลันอย่างไรก็ดีประเด็นสำคัญที่สุดในการกระตุ้นให้หอยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยหลัก ๆ ขึ้นอยู่กับประสิทธิภาพในการขุนพ่อแม่พันธุ์ กล่าวคือพ่อแม่พันธุ์จะต้องมีการเจริญอย่างเต็มที่ก่อนจึงจะประสบความสำเร็จในการกระตุ้น วิธีหลัก ๆ ที่ใช้ในการกระตุ้นมีดังต่อไปนี้

วิธีที่ 1 การปล่อยแห้ง ทำได้โดยการนำพ่อแม่พันธุ์หอยนางรมมาทำความสะอาดแล้วผึ่งแห้งไว้ในอากาศเป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง บางครั้งอาจจะผึ่งไว้กลางแดดแต่ต้องไม่ให้อุณหภูมิร้อนจัดเกินไป จากนั้นนำพ่อแม่พันธุ์ลงในถังกระตุ้นการวางไข่ที่ใส่น้ำทะเลที่กรองแล้วเอาไว้ โดยน้ำทะเลต้องมีอุณหภูมิเท่ากันกับอุณหภูมิน้ำทะเลปกติที่อยู่ในที่ร่มคือประมาณ 28 องศาเซลเซียส

พ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์เพียงพอจะวางไข่และปล่อยน้ำเชื้อออกมาภายใน 3-6 ชั่วโมง หากหอยไม่วางไข่และปล่อยน้ำเชื้อออกมาแล้วก็จะหยุดทำการกระตุ้น โดยจะทำการกระตุ้นต่อในวันรุ่งขึ้น โดยจะทำการกระตุ้นติดต่อกันไม่เกิน 3 วัน ตามปกติถ้าการกระตุ้นได้ผล หอยตัวผู้จะปล่อยน้ำเชื้อออกมาก่อน แล้วตัวเมียจึงจะวางไข่ในเวลาต่อมา ซึ่งมีวิธีสังเกตคือน้ำเชื้อของหอยตัวผู้จะถูกพ่นออกมาเป็นสายตลอดเวลาดูเหมือนคนพ่นควันบุหรี่เป็นลักษณะจาง ๆ เหมือนหมอก ขณะที่ไข่ของหอยตัวเมียมีสีขาวขุ่น ๆ และถูกพ่นออกมาเป็นครั้ง ๆ ประมาณ 1-3 นาทีต่อครั้ง ถ้าสังเกตดูใกล้ ๆ จะสามารถเห็นเป็นเม็ดเล็ก ๆ ได้ เมื่อหอยเริ่มวางไข่และปล่อยน้ำเชื้อแล้วต้องรีบแยกหอยตัวเมียและหอยตัวผู้ออกมาใส่ในภาชนะต่างหากแยกเพศกัน ปล่อยให้หอยปล่อยไข่และน้ำเชื้อแล้วจึงค่อยทำการนับจำนวนไข่แล้วนำมาผสมภายหลัง แต่ไม่ควรทิ้งระยะเวลาให้นานเกินไปเพราะจะทำให้น้ำเชื้อหอยมีคุณภาพต่ำลงทำให้อัตราการผสมลดลง ในขั้นนี้อาจปล่อยให้ไข่และน้ำเชื้อผสมกันในบ่อเพาะเลยก็ได้ แต่อาจจะมีปัญหาในกรณีที่หอยตัวผู้มีมากกว่าหอยตัวเมียจะทำให้ไข่ที่ได้รับการผสมจากสเปิร์มหลายตัวแล้วทำให้ไข่ไม่พัฒนาเป็นลูกหอย (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

วิธีที่ 2 การใช้อุณหภูมิ วิธีนี้ใช้การเปลี่ยนอุณหภูมิน้ำที่แช่หอย โดยการเติมน้ำทะเลที่ผ่านการกรองแล้วที่อุณหภูมิปกติลงบนกระบะพ่อแม่พันธุ์หอยพอท่วมตัวหอยทุกตัว แช่ทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที แล้วจึงเติมน้ำทะเลที่ต้มแล้วลงในกระบะให้ได้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว แช่หอยทิ้งไว้อีกประมาณ 30 นาที ถ่ายน้ำออกแล้วเติมน้ำทะเลอุณหภูมิปกติอีกครั้ง ทำแบบนี้ใหม่ประมาณ 3-4 รอบ ถ้าหอยไม่ปล่อยไข่หรือน้ำเชื้อแสดงว่าพ่อแม่พันธุ์ยังไม่สมบูรณ์พอ แต่ถ้าหอยปล่อยไข่หรือน้ำเชื้อแล้วจะต้องแยกหอยใส่ภาชนะต่างหากแล้วค่อยนำมาผสมกัน

2. เทคนิคการผสมเทียมโดยการผ่าตัด

การผสมเทียมโดยการผ่าตัดเป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว แต่มีข้อเสียคือวิธีนี้ทำให้พ่อแม่พันธุ์ตาย และใช้พ่อแม่พันธุ์ได้ครั้งเดียว รวมทั้งพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในการเพาะ จำเป็นจะต้องมีความสมบูรณ์เพศ นอกจากนั้นความสะอาดของน้ำเชื้อเพศผู้และเพศเมียก็เป็นสิ่งสำคัญอีกด้วย ขั้นตอนในการดำเนินการมีดังนี้

2.1 เตรียมพ่อแม่พันธุ์ ทำความสะอาดเปลือกพ่อแม่พันธุ์ เพื่อลดปริมาณเชื้อโรคที่จะติดต่อสู่ลูก

2.2 เปิดฝาพ่อแม่พันธุ์โดยใช้สิ่วตอกบริเวณบานพับของเปลือกหอย

2.3 ใช้มีดผ่าตัดค่อย ๆ แหย่เข้าไปตัดกล้ามเนื้อที่ยึดเปลือกทั้งสองข้างเอาไว้

2.4 เมื่อเปิดฝาแล้ว ตรวจดูสภาพทั่วไปของพ่อแม่พันธุ์ด้วยตาเปล่า ถ้าพ่อแม่พันธุ์มีความสมบูรณ์เพศจะเห็นเนื้อหอยเต็มช่องว่างระหว่างเปลือกและส่วนของเนื้อหอยจะมีสีขาวหรือ

สีครีมและสามารถมองเป็นท่อเซลล์สืบพันธุ์เป็นลายเห็นได้ชัดโดยจะพบอยู่รอบ ๆ กล้ามเนื้อที่ยึดเปลือกเอาไว้ ในขั้นนี้ไม่สามารถแยกเพศหอยได้ ยกเว้นแต่ผู้ที่มีความชำนาญมาก

2.5 ใช้หลอดหยดรีดเบา ๆ บริเวณท่อเชื้อ ดูดเอาเซลล์สืบพันธุ์มาเล็กน้อย หยดลงบนสไลด์หลุมแล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ ใช้กำลังขยายประมาณ 40 เท่า เพื่อแยกเพศหอยและดูความสมบูรณ์ของไข่และน้ำเชื้อ โดยน้ำเชื้อตัวผู้จะมีลักษณะเป็นเม็ดกลมขนาดเล็กมาก มีหางและเคลื่อนที่ได้ ถ้าเซลล์แข็งแรงจะมองเห็นการเคลื่อนที่ตลอดเวลา ถ้าไม่แข็งแรงก็จะเคลื่อนไหวน้อย ส่วนไข่จะมีลักษณะได้หลายแบบ ตอนแรกจะมองเห็นเป็นเม็ดขนาดใหญ่ รูปร่างรี รูปหยดน้ำ รูปสามเหลี่ยม และค่อนข้างกลม เพราะถูกบีบอัดอยู่ในรังไข่ หากทิ้งไว้สักพักก็จะเห็นไข่รูปร่างกลมขึ้น (ภาพที่ 2-5) ในขั้นนี้จะต้องแยกหอยเพศผู้และเพศเมียเก็บไว้คนละภาชนะที่มีเครื่องหมาย

2.6 รีดไข่หรือน้ำเชื้อออกมาแยกใส่ในกระบอกพลาสติกที่มีน้ำทะเลปริมาตร 1 ลิตร (ความเค็มระหว่าง 25-30 ppt) ควบคุมเรื่องทำความสะอาดโดยการรีดเบา ๆ ระวังไม่ให้ส่วนของเหลวที่อยู่ในกระเพาะอาหารหรือเนื้อเยื่อหอยหลุดติดปะปนออกมา ไม่จำเป็นต้องรีดไข่หรือน้ำเชื้อจนหมดเพราะอาจจะทำให้มีเชื้อโรคติดลูกหอยที่ผสมได้คงเอาแต่เฉพาะส่วนที่รีดออกได้โดยการกดด้วยแรงปานกลางเท่านั้น

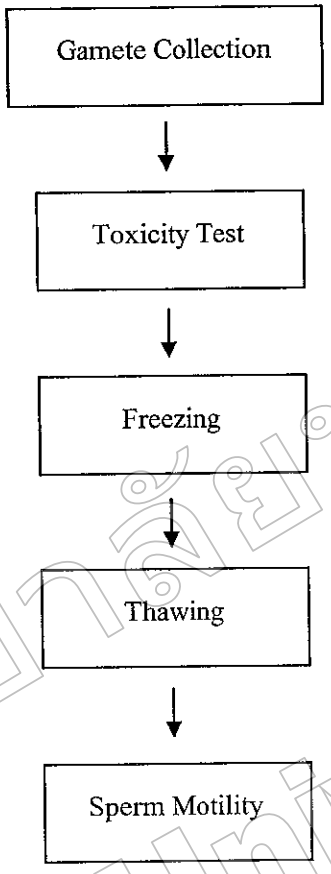
2.7 สุ่มเซลล์ไข่ไปนับจำนวนใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ เพื่อประมาณจำนวนไข่ที่ผสมและจำนวนบ่อที่จะใช้ โดยจะมีปริมาณไข่ 1,000,000 ฟองต่อบ่อ หรือประมาณ 10-20 ฟองต่อมิลลิลิตร

2.8 ผสมไข่และน้ำเชื้อเข้าด้วยกัน โดยเทลงในถังที่มีน้ำทะเลสะอาดประมาณ 10 ลิตร ให้อากาศเบา ๆ ทิ้งไว้ให้ผสมกันประมาณ 5-10 นาที แล้วจึงเทน้ำผ่านผ้ากรองขนาดตา 58 ไมครอนลงบ่อขนาด 1 ตัน ซึ่งใส่น้ำทะเลที่ผ่านการกรองและมีความเค็มประมาณ 25 ppt ให้อากาศเบา ๆ ทิ้งไว้ประมาณ 6-8 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิน้ำประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส เมื่อลูกหอยเริ่มว่ายน้ำได้จะให้สาหร่ายเซลล์เดียวพวก Isochrysis เป็นอาหารประมาณบ่อละ 1.5-3 ลิตร เมื่อให้อาหารแล้วเพิ่มความแรงของอากาศขึ้นเล็กน้อยเพื่อให้ลูกหอยและอาหารกระจายได้ทั่วบ่อ

2.9 เมื่อลูกหอยอายุครบ 24 ชั่วโมงหอยจะเข้าระยะรูปตัวดี (D-Shaped) แล้วจึงเริ่มเปลี่ยนน้ำ (คเชนทร เฉลิมวัฒน์, 2544; เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ และคณะ, 2546)

การแช่แข็งเซลล์ (Cryopreservation)

การแช่เข็งเซลล์ คือ การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั้งพืชและสัตว์ ได้แก่ การเก็บรักษาเซลล์ไข่ น้ำเชื้อตัวผู้ ตัวอ่อน หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต โดยผ่านกระบวนการแช่แข็ง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส



ภาพที่ 2-10 กระบวนการ Cryopreservation (Tiersch & Mazik, 2000)

วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อมี 2 แบบ คือ

1. การเก็บรักษาระยะเวลาสั้น (Short or Chilled Storage)

เป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้ในสภาพน้ำเชื้อเข้มข้นหรือเจือจางด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ (Extender) ที่เหมาะสมกับน้ำเชื้อของสัตว์น้ำแต่ละชนิด การเก็บรักษาน้ำเชื้อในลักษณะนี้สามารถเก็บได้หรือไม่ ขึ้นอยู่กับการควบคุมไม่ให้สเปิร์มที่เจือจางในน้ำยาบัฟเฟอร์ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะเก็บรักษา เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีโดยทั่วไปว่าสเปิร์มของปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำจะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วและหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาที ดังนั้นการเลือกใช้น้ำยาบัฟเฟอร์ต้องมีความเหมาะสมเพราะอาจมีผลกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ได้ ซึ่งนั่นหมายถึงความล้มเหลวในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพราะสเปิร์มไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ ดังที่ปรากฏในงานวิจัยเหล่านี้

Morisawa, Suzuki, Shimizu, Morisawa, and Yasuda (1983) ได้ศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของปลาน้ำจืดหลายชนิด เช่น ปลาไน ปลาดุก พบว่า Osmotic Pressure ที่มีค่าลดลงจะมีผล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ในการกระตุ้นทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่มากขึ้น ในทางตรงกันข้ามสเปิร์มของปลาทะเลจะเคลื่อนที่มากขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่า Osmatic Pressure สูงกว่าระดับที่พบใน Seminal Fluid ฉะนั้นการที่จะเก็บน้ำเชื้อแช่เย็นได้นานจึงควรเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ที่มีค่า Osmolality เท่ากับระดับที่พบใน Seminal Fluid เพราะจะช่วยป้องกันมิให้สเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ได้ เนื่องจากเมื่อสเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่ จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมาก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาทีเท่านั้น

Stoss, Geries, and Holtz (1987) ได้ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Rainbow Trout แช่เย็นโดยไม่เจือจางด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ พบว่า ความสูงของน้ำเชื้อที่เก็บไม่ควรเกิน 5-6 มิลลิเมตร ขณะเก็บแช่เย็นเพื่อให้สเปิร์มได้มีอากาศถ่ายเทอย่างเพียงพอ

DiLauro, Krise, Hendrix, and Baker (1994) ศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Atlantic Sturgeon แช่เย็นโดยไม่เจือจางน้ำยาบัฟเฟอร์ไว้บนน้ำแข็ง และให้ออกซิเจนสมทบทุกวันพบว่าน้ำเชื้อสามารถเก็บได้เป็นระยะเวลา 5 วัน โดยที่คุณภาพของสเปิร์มไม่เปลี่ยนแปลง

Satterfield and Flickinger (1995) ได้นำน้ำเชื้อปลา Walleye ปริมาณ 8 มิลลิลิตร มาเจือจางด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน น้ำเชื้อ: น้ำยาบัฟเฟอร์ 1: 2 ภายในกล่องแซนวิส (Plastic Rubbermaid Sandwich Container) ขนาด 11.4 x 10.8 ซม. แล้วจึงเก็บแช่เย็นในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งอัดออกซิเจนสมทบทุกวัน ปรากฏว่า น้ำเชื้อแช่เย็นที่เก็บไว้นาน 5 วัน สามารถปฏิสนธิไข่ปลาได้ดี มีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับการใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ ๆ

2. การเก็บรักษาระยะเวลายาวโดยวิธีการแช่แข็ง (Cryopreservation)

เป็นการเก็บแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196°C ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีนี้ต้องมีการเลือกใช้สูตรน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อ ยังต้องทราบชนิดและระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (สารที่ช่วยป้องกันความเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง) ระยะ Equilibration Time (ช่วงเวลาหลังจากผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนทำการแช่แข็ง) และอัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง ทำให้การแช่แข็งของสเปิร์มสำเร็จ (นิศา ไชยรักษ์, 2539)

สำหรับงานวิจัยด้านการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งส่วนมาก มีความแตกต่างกันไปในสัตว์น้ำแต่ละชนิดทั้งในแง่ของชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ดังนั้นการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวจึงต้องเริ่มจากการนำเอาน้ำยาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับหอยแต่ละชนิดซึ่งไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่มาเจือจางน้ำเชื้อ แล้วนำไปผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ที่เวลาต่าง ๆ กัน เพื่อดูความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่อาจมีต่อสเปิร์ม จากนั้นจึงใช้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน โดยมีสมมติฐานว่าความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว ขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดและระดับของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมและการลดหรือเพิ่มอุณหภูมิอย่างเหมาะสม ดังที่ปรากฏในงานวิจัยเหล่านี้

Gwo, Strawn, Longnecker, and Arnold (1991) ได้ศึกษาการเก็บน้ำเชื้อปลา Atlantic Croaker แบบแช่แข็ง พบว่า น้ำยาบัฟเฟอร์ ที่ประกอบด้วย เกลือแกง กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อขณะทำการแช่แข็ง โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับน้ำยาบัฟเฟอร์ชนิดอื่น ๆ ที่มีความสลับซับซ้อน หรือมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ และยังพบว่าอัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็งตั้งแต่ -10°C/ นาที จนถึง -150°C/ นาที ไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิขณะนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาผสมกับไข่

Conget, Fernandez, Herrera, and Mingvell (1996) ใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ต่าง ๆ ชนิด ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา Rainbow Trout แบบแช่แข็ง พบว่า การใช้ Dimethyl Sulfoxide (DMSO) ร่วมกับ Sucrose ให้ผลดีที่สุดในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยระยะเวลาที่เจือจางน้ำเชื้อในสารไครโอโพรเทคแทนท์ ก่อนทำการแช่แข็งไม่ควรเกิน 10 นาที และการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งอย่างรวดเร็ว (-30°C/ นาที) มีผลทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนไหวที่สูงกว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ (-1°C/ นาที และ -10°C/ นาที)

Gwo, Chen, and Cheng (2002) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งของหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor supertexa*) นำน้ำเชื้อมาเจือจางใน Artificial Seawater (ASW) และเติม 10% DMSO โดยอัตราส่วน 1: 1 แล้วทำการแช่แข็ง โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -12 และ -15°C/ นาที แล้วนำมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ 50-75% และมีการปฏิสนธิเท่ากับ 48% หลังการละลาย

Paniagua-Chavez and Tiersch (2001) ทำการศึกษาการแช่แข็งของสเปิร์มและตัวอ่อนของหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) จากการทดลองใช้ตัวอ่อนหอยระยะ Trochophore ที่มีความเข้มข้น 10,000 cell/ ml มาเจือจางใน Artificial Seawater (ASW) และนำสเปิร์มความเข้มข้น $1x10^9$ ml มาเจือจางด้วย 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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Choi and Chang (2003) ทำการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ การพัฒนาระยะต่าง ๆ และการเพิ่มน้ำตาลที่มีต่อการแช่แข็งตัวอ่อนระยะ Trochophore ของหอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata martensii*) พบว่า การเติม 0.2 M DMSO ผสมกับ 0.2 M Glucrose และ Sucrose ที่ระดับอัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที เมื่อแช่แข็งแล้วละลาย ทำให้หอยระยะ Trochophore พัฒนามาถึงระยะ D-Shaped Larvae ประมาณ 89-91% หลังจากละลายใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 10 วินาที

Ieropoli, Masullo, Santo, and Sansone (2004) ทำการแช่แข็งสเปิร์มของหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) พบว่า การใช้ 10% Ethylene Glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -6°C/ นาที มีผลทำให้สเปิร์มที่แช่แข็ง เมื่อนำมาทำการปฏิสนธิกับไข่ พบว่า ไข่มีอัตราการรอดถึงระยะ D-Larvae เท่ากับ 58.9%

Dong, Eudeline, Huang, Allen, and Tiersch (2005a) ทำการแช่แข็งสเปิร์มของ 2n และ 4n ของหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) โดยใช้ความเข้มข้นของสเปิร์ม $2x10^9$ cell/ ml เจือจางใน Ca-F HBSS และ 8% DMSO พบว่า หอยนางรม Diploid มีการเคลื่อนที่ 30% และการปฏิสนธิ 96% แต่หอยนางรม Tetraploid มีการเคลื่อนที่น้อยกว่า 10% และการปฏิสนธิต่ำ 28% ตามลำดับ

Ji, Chen, Tian, Yu, and Sha (2004) ทำการแช่แข็งสเปิร์มของปลากะพง (*Lateolabrax japonicus*) โดยนำสเปิร์มที่เจือจางใน Modified Plaice Ringer Solution (MPRS) เติม 10% DMSO ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาวางไว้เหนือผิวหน้าของไนโตรเจนเหลว 6 เซนติเมตร นาน 10 นาที พบว่า สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ 68.3% และสเปิร์มที่แช่ไนโตรเจนเหลวนาน 3 วัน มีอัตราการปฏิสนธิ 84.8% และอัตราการฟัก 70.1% ในขณะที่สเปิร์มที่แช่ไนโตรเจนเหลวนาน 1 ปี มีอัตราการปฏิสนธิ 83.5% และการฟัก 90% ตามลำดับ

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ แบ่งเป็น 3 วิธี คือ

1. รีดโดยตรงจากตัวปลา โดยกดเบา ๆ ตรงส่วนท้อง น้ำเชื้อจะไหลออกมา เช่น ปลาตะเพียน ปลาสวาย เป็นต้น

2. โดยใช้เข็มฉีดยาดูดจากช่องเปิดของน้ำเชื้อ (Urogenital Pore) เช่น ปลาบึก

3. โดยการผ่าเพื่อนำอัณฑะ (Testis) ไปบดแยกเอาน้ำเชื้อออก ซึ่งมักปฏิบัติกับสัตว์น้ำซึ่งมีน้ำเชื้อน้อย หรือไม่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ เช่น ปลาดุก เป็นต้น (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2538)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

โดยทั่วไปสเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในเซมินอล ฟลูอิด (Seminal Fluid) และเคลื่อนไหวปราดเปรียวเมื่ออยู่ในน้ำทะเล สเปิร์มสามารถเคลื่อนที่ได้นานแตกต่างกันไปตามชนิดและสภาพแวดล้อม การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของสัตว์น้ำ ทำให้ทราบถึงความสมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์ที่จะนำมาเพาะเลี้ยงว่ามีความเหมาะสมมากน้อยเพียงไร โดยวิธีประเมิน 3 วิธีดังนี้ คือ

1. ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

เมื่อรีดน้ำเชื้อออกมาจากสัตว์น้ำหรือตัวหอยที่มีความเข้มข้นหรือปริมาณที่เหมาะสม ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ ต้องสังเกตดูสี ความเข้มข้น ปริมาตร และสิ่งเจือปนอื่น ๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น ไม่มีสิ่งเจือปน (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

2. การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสามารถพิจารณาได้ในแง่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราการเคลื่อนไหวของสเปิร์ม ทำการสุ่มนับจำนวนสเปิร์มภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยกำหนดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็น 6 ระดับ คือ น้ำเชื้อที่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามลำดับ (Vuthiphandchai & Zohar, 1999)

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อวิธีนี้ เป็นวิธีที่ได้ผลเร็วแต่ผลที่ได้ไม่แน่นอน และยังมีปัญหาว่าปลาน้ำจืดจะเคลื่อนที่ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เช่น ปลา Razorback Sucker สเปิร์มเคลื่อนที่ไม่ถึง 10 วินาที (Wayman & Tiersh, 2000) ส่วนปลาทะเลไม่ค่อยพบกับปัญหาเท่าใดเพราะสเปิร์มเคลื่อนที่ได้นานกว่า และพบว่าสเปิร์มของพวกครัสเตเชียนหลายชนิด เช่น กุ้งและพวกเดคาปอด (Decapod) อื่น ๆ ไม่มีการเคลื่อนที่ ทำให้การประเมินโดยใช้การเคลื่อนที่กับสัตว์เหล่านี้ จึงไม่สามารถทำได้ (Lezcano, Granja, & Salazar, 2004) เห็นได้ว่าการประเมินน้ำเชื้อโดยดูการเคลื่อนที่จึงไม่สามารถประเมินกับสเปิร์มสัตว์ทุกชนิด อย่างไรก็ตามกุ้งทะเลหลายชนิดนั้นสเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อออกมานอกตัว จึงไม่สามารถประเมินจากการเคลื่อนที่ได้ต้องใช้การประเมินโดยวิธีอื่นซึ่งวิธีหนึ่งที่สามารถประเมินน้ำเชื้อได้คือการย้อมสี

3. การย้อมสีสเปิร์มเป็นการตรวจดูสเปิร์มที่มีชีวิตและสเปิร์มที่ไม่มีชีวิต (Live-Dead Staining) โดยวิธีนี้มีหลักการคือ สีพิเศษบางชนิดเมื่อนำมาย้อมแล้ว สเปิร์มตายจะดูดซับสีหรือติดสีม่วง ในขณะที่สเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ดูดซึมสีหรือไม่ติดสีย้อม อันเนื่องมาจากความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยอมให้สีผ่านเข้ามาในเซลล์ได้ ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะมีกลไกป้องกันไม่ให้สีผ่านเข้ามาในเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เซลล์ที่มีชีวิตจึงไม่ติดสีย้อม โดยทั่วไปนิยมใช้สีอิโอซิน (Eosin) ผสมกับสีอื่น ๆ ที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิด คือ สีอิโอซิน-นิโกรซิน (Eosin-Nigrosin) และ อิโอซิน- ฟาสท์กรีน (Eosin-Fast Green FCF) นำมาใช้ได้ผลดีสำหรับน้ำเชื้อสด และน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำยาที่ไม่มี

ไขมันเป็นองค์ประกอบ สำหรับน้ำยาที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ เช่น มีไข่แดงหรือนมผง ไขมันในน้ำยาจะทำให้เกิดการติดสีที่ไม่สม่ำเสมอการนับสเปิร์มที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตจะทำได้ไม่ถูกต้อง การย้อมสเปิร์มโดยใช้สี Eosin-Nigrosin สเปิร์มที่มีชีวิตจะไม่ติดสีเห็นเป็นสีขาว ส่วนสเปิร์มที่ตายแล้วจะติดสี (Fribourgh, 1966)

การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้ออีกวิธีหนึ่งคือการตรวจหาความสามารถของน้ำเชื้อในการผสมกับไข่ โดยนำไข่มาปฏิสนธิกับสเปิร์มแล้วดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่มีการปฏิสนธิ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

น้ำยาบัฟเฟอร์

น้ำยาบัฟเฟอร์ (Extender) เป็นสารละลายที่มีความสำคัญคือช่วยคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์ในระหว่างการแช่เย็น (Graybill & Horton, 1969) ช่วยให้เก็บน้ำเชื้อได้นานกว่าปกติ และเป็นการเจือจางน้ำเชื้อให้มีปริมาณมากขึ้น เพื่อสะดวกในการปฏิบัติการ น้ำยาเจือจางนั้นจะไม่ส่งผลกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ หากจะพิจารณาส่วนประกอบทางเคมีของสูตรน้ำยาชนิดต่าง ๆ ที่ควรนำมาใช้ในการแช่แข็ง ควรมีหลักการดังนี้ สูตรน้ำยาต่าง ๆ เหล่านี้ ประกอบด้วยอิออนต่าง ๆ ที่ใกล้เคียงกับของเหลวในเลือด (Seminal Plasma) และน้ำยาต้องมีแรงดันออสโมติกใกล้เคียงที่สุดกับแรงดันออสโมติกของน้ำเลือด อย่างเช่น สัตว์น้ำจืด Extender ที่ใช้ควรมีค่าออสโมลาริตี้ 280-300 mOsmol/ kg ส่วนสัตว์น้ำเค็มควรใช้ Extender ที่มีค่าออสโมลาริตี้ 200-300 mOsmol/ kg (Wayman & Tiresch, 2000) การหา Extender ที่เหมาะสมเป็นสิ่งสำคัญ สิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมี Osmolality ในเซลล์และส่วนประกอบของแร่ธาตุในเซลล์ต่างกันจึงต้องเลือกใช้ Extender ที่ต่างกันด้วย เช่น หอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor supertexa*) (Gwo et al., 2002) และหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) (Paniagua-Chavez & Tiersch, 2001) ใช้ Extender ที่มีชื่อว่า Artificial Seawater ส่วนในกุ้งตระกูลพีเนียส เช่น กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) กุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) ได้มีการศึกษาในเรื่องของ Extender เช่นกัน พบว่า สารละลาย Ca-Free Saline ไม่มีผลต่อรูปร่างของสเปิร์ม (Bray & Lawrence, 1998) นอกจากนี้ Extender ประกอบด้วยสารเคมีที่ทำหน้าที่ควบคุมความเป็นกรด-ด่าง เป็นแหล่งพลังงานและสารเคมีบางตัวทำหน้าที่ต้านหรือทำลายพิษจากของเสียที่ขับถ่ายออกมาจากเซลล์ หรือมีส่วนประกอบที่เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

สารไครโอโพรเทคแทนท์

สารไครโอโพรเทคแทนท์ เป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างการแช่แข็ง (Freezing) เนื่องจากการแข็งตัวของน้ำภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ ทำให้เสียคุณสมบัติ Permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์ ความเป็นกรด-ด่าง จะเปลี่ยนแปลงไป

1. การจำแนกประเภทสารไครโอโพรเทคแทนท์

เราสามารถจำแนกประเภทออกเป็น 2 พวก คือ ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์และออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ ดังนี้

1.1 ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (Permeating Cryoprotectant) ได้แก่ DMSO, Glycerol, Methanol, Ethanol และ Propylene Glycol เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้จำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งและป้องกันอันตรายได้ดีในระดับที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูง (1-4 M) ขณะแช่แข็งหากพิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์แอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่สูงสุด รองลงมาได้แก่ DMSO และ Glycerol ตามลำดับ สารเหล่านี้มีข้อเสียประการหนึ่งคือ เป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ

1.2 ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (Non-Permeating Cryoprotectant) ได้แก่ Polyvinyl Pyrrolidone (PVP), Hydroxyethyl Starch (HES), Daxtrans, Albumin, Polyethylene Glycol และน้ำตาลต่าง ๆ เช่น Sucrose และ Glucose เป็นต้น สารเคมีกลุ่มนี้ออกฤทธิ์ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์ขณะที่อยู่นอกเซลล์และใช้ได้ผลดีที่ความเข้มข้นต่ำกว่าพวกแรก (0.01-0.2 M) และเป็นพิษน้อยกว่า

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 2 ชนิดนั้นให้ผลดีกว่าที่จะใช้สารตัวใดตัวหนึ่งในสัตว์บางชนิด โดยจะช่วยให้เกิดการดึงน้ำจากเซลล์อย่างค่อยเป็นค่อยไป เป็นการลดปัญหาอันตรายที่อาจเกิดเนื่องจากการเปลี่ยนความดันออสโมซิส เนื่องจากน้ำถูกดึงออกจากเซลล์หรือเข้าสู่เซลล์เร็วเกินไป (มนต์ชัย ควงจินดา จำเนียร สัตยาพันธุ์ วรรณา สุจริตและเทวินทร์ วงพระลัย, 1995) ตัวอย่างมีการรายงานการแช่แข็งปลา Rainbow Trout พบว่า การใช้ DMSO กับ Sucrose ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 30°C/ นาที ให้ผลดีกว่าการใช้ DMSO อย่างเดียว (Conget et al., 1996) นอกจากการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 2 ชนิดร่วมกันได้ผลดีในสัตว์ขนาดเล็ก และสัตว์ขนาดใหญ่ เช่น โคนมก็มีความก้าวหน้าในการใช้สาร 2 ชนิดร่วมกัน ซึ่งการแช่แข็งตัวอ่อนโคนมพัฒนาไปมาก มีการปรับใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ร่วมกันหลายชนิดเช่น ปัจจุบันมีสารป้องกันการแข็งตัวที่เรียกว่า Vitrified Solution ซึ่งสารนี้ประกอบด้วยสารป้องกันการแข็งตัวหลายชนิด (มนต์ชัย ควงจินดา และคณะ, 1995) การพัฒนาหาชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ได้มีการปรับเปลี่ยนเพื่อให้ได้สารที่เหมาะสมเรื่อยมา และสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดยังมี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความเป็นพิษแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิดแต่ละระยะการเจริญเติบโตทนต่อความเป็นพิษต่างกัน ดังรายงานของ Newton and Subramonium (1996) ได้รายงานว่า ตัวอ่อนกุ้งตระกูล Penaeid ในระยะ Nauplii ทนต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเข้มข้นสูงเมื่อเทียบกับระยะ Morulae

กระบวนการแช่แข็งต้องนำ Extender มาละลายในสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนแล้วจึงค่อยนำไปผสมกับน้ำเชื้อหรือไข่หรือตัวอ่อน โดยการใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อควรใส่อย่างช้า ๆ และที่อุณหภูมิต่ำ (Wayman & Tiersch, 2000) เพื่อช่วยให้เซลล์ค่อย ๆ ปรับสภาพ สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่จะใช้ในการแช่แข็งนี้ ควรเป็นน้ำยาที่เตรียมขึ้นมาใหม่ หรือถ้าจะเตรียมไว้ล่วงหน้าควรเติมยาปฏิชีวนะและเก็บไว้ในตู้เย็น อย่างไรก็ตามไม่ควรเตรียมล่วงหน้านานกว่า 1-2 วันและเมื่อใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์นี้ลงสู่น้ำเชื้อแล้วต้องทิ้งระยะให้สารนี้ซึมเข้าไปในเซลล์ (Equilibration Time) ซึ่งเป็นขั้นตอนหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสำเร็จในการแช่แข็งเช่นกัน โดยในสัตว์แต่ละชนิด สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละตัว แต่ละความเข้มข้นจะมี Equilibration Time ต่างกัน ฉะนั้นในการแช่แข็งต้องมีการทดลองหา Equilibration Time ที่เหมาะสมด้วย ถ้าปล่อยให้สารไครโอโพรเทคแทนท์ผสมกับน้ำเชื้ออยู่นานเกินไปจะมีผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ แต่ถ้าน้ำเชื้อผสมอยู่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์น้อยเกินไป อาจจะยังซึมเข้าสู่เซลล์ยังไม่ทั่วถึงเมื่อนำเซลล์ไปแช่แข็งจึงเกิดความล้มเหลวได้

2. กลไกการออกฤทธิ์ของสารไครโอโพรเทคแทนท์

สารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดมีกลไกการทำงานแตกต่างกันไป เพราะสารเคมีแต่ละชนิดมีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์แตกต่างกัน หากพิจารณาถึงอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น Sucrose ไม่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ แต่ Glucrose แพร่ผ่านได้ ส่วนแอลกอฮอล์ผ่านได้เร็วกว่า DMSO และ Glycerol ตามลำดับ สารไครโอโพรเทคแทนท์มีผลต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ คือ มีผลต่อแรงดันออสโมติก (Osmotic Pressure) จุดเยือกแข็ง (Freezing Point) และช่วยปรับแรงดันออสโอติกของของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ จะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการแช่แข็งได้เพราะ

2.1 ป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ โดยทำให้ของเหลวแข็งตัวช้าลงและทำให้น้ำในเซลล์มีน้อยลง

2.2 ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ โดยสารไครโอโพรเทคแทนท์แพร่เข้าสู่เซลล์ไปแทนที่น้ำในเซลล์ที่แพร่ออกจากเซลล์ เพราะความแตกต่างของแรงดันออสโอติกที่เปลี่ยนไปเนื่องจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายนอกเซลล์ก่อนที่ของเหลวภายในเซลล์จะแข็งตัว

2.3 ช่วยป้องกันอันตรายเนื่องจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโตรไลท์ คือ

เมื่อมีการควบคุมการเกิดเกล็ดน้ำแข็งและลดขนาดของเซลล์ ขณะทำการแช่แข็งได้ย่อมทำให้เซลล์คงสภาพปกติมีชีวิตอยู่ได้

2.4 ช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มออกาแนลล์ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

การลดอุณหภูมิ

การลดอุณหภูมิ (Freezing) คือ การทำให้ของเหลวที่อยู่รอบ ๆ เซลล์ และภายในเซลล์ค่อย ๆ แข็งตัว ในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิ ของเหลวภายนอกเซลล์จะเป็นน้ำแข็งก่อนของเหลวภายในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายนอกสูงกว่าภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เพื่อปรับสมดุล ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิช้าเกินไปจะทำให้เซลล์ต้องปรับตัวนานเกินไป ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อเซลล์เพราะมีการสูญเสียน้ำและความเข้มข้นของสารละลายสูงเกินไปอาจทำให้ตกผลึก การเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว (Seeding) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยป้องกันการสูญเสียน้ำมากเกินไป ทำได้โดยใช้ปากคีบที่เย็นจัดที่แช่ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) มากรีดหลอดน้ำเชื้อที่ลดอุณหภูมิลงถึงประมาณ -5 หรือ -7°C ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิเร็วเกินไปจะทำให้น้ำไหลออกจากเซลล์เร็วเกินไปอาจทำให้เซลล์เหี่ยว และเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ที่มีแทงเซลล์และเยื่อหุ้มออการ์แนลล์ทำให้เซลล์ได้รับอันตรายได้ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

ดังนั้นจะเห็นว่าอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมมีความสำคัญต่อการรอดชีวิตของเซลล์ อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นคือ อัตราการลดอุณหภูมิที่พอเหมาะเพื่อให้น้ำถูกดึงออกจากเซลล์อย่างต่อเนื่องจะป้องกันการเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ หรือเกิดขึ้นได้น้อย (Seidel, 1984)

การเพิ่มอุณหภูมิ

การเพิ่มอุณหภูมิเป็นสิ่งจำเป็นเนื่องจากต้องละลายเซลล์ที่แข็งตัวไปใช้ประโยชน์ ขณะทำการละลาย เกล็ดน้ำแข็งที่อยู่ภายนอกเซลล์จะละลายก่อน น้ำจากภายนอกเซลล์ย่อมจะแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ และขนาดของเซลล์จะเพิ่มขึ้นหลังการละลาย ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิไม่เหมาะสมอาจทำให้เซลล์ปรับสภาพไม่ทันหรืออาจทำให้เซลล์แตกได้ และประสบความล้มเหลวจากการแช่แข็ง (Wayman & Tiersch, 2000)

การดึงสารป้องกันการแข็งตัวออกจากเซลล์หลังจากที่ผ่านการละลายแล้ว เซลล์จะต้องผ่านการดึงสารป้องกันการแข็งตัวออกจากเซลล์เสียก่อน ทั้งนี้เนื่องจากสารป้องกันการแข็งตัวที่อยู่ภายในเซลล์ อาจทำอันตรายเซลล์ได้ เพราะมีคุณสมบัติของการเป็น Oxidizing Agent และเพื่อเป็น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การดึงน้ำกลับเข้าสู่เซลล์ทำให้เซลล์กลับเข้าสู่สภาพเดิม ซึ่งการดึงสารป้องกันการแข็งตัวออกจากเซลล์นั้นปัจจุบันทำได้ 2 วิธี คือ

1. การดึงสารป้องกันการแข็งตัวออกเป็นขั้น (Stepwise Dilution) โดยใส่เซลล์ที่แช่แข็งลงใน Freezing Solution ที่มีความเข้มข้นย้อนทางเดิมเพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลายอย่างกะทันหันจนเซลล์ปรับตัวไม่ได้ ซึ่งไม่ควรใช้เวลามากกว่า 45-90 นาที (Schneider & Mazur, 1984)

2. การดึงสารป้องกันการแข็งตัวออกแบบครั้งเดียว (1-Step Dilution) โดยมี Sucrose เป็นตัวช่วยปรับความเข้มข้น (Renard & Cochard, 1989) ซึ่งจากการทดลองของ Prather, Spire, and Schalles (1987) พบว่า มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันกับวิธีแรก

ปัจจัยที่มีผลกระทบต่ออัตราการมีชีวิตรอดหลังการแช่แข็ง

ปัจจัยที่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ หรืออัตราการรอดชีวิตของเซลล์มีมากมายหลายประการเพราะการปฏิบัติงานทุกขั้นตอน นับตั้งแต่วิธีการเก็บตัวอย่างเซลล์ การปฏิบัติต่อตัวอย่างเซลล์ ตลอดจนสูตรน้ำยา และการเตรียมน้ำยา สำหรับเจืองเซลล์นั้น ๆ หากพิจารณาในอีกแง่หนึ่งพบว่า อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ภายหลังการแช่แข็งและการละลายนั้นยังขึ้นอยู่กับ

1. ขนาดของเซลล์
2. อัตราการลดอุณหภูมิ
3. อัตราการแพร่ของน้ำผ่านผนังเซลล์

ปัจจัยทั้ง 3 ประการนี้ มีความสัมพันธ์กับปริมาณน้ำภายในเซลล์ กล่าวคือ สามารถคำนวณหาปริมาณน้ำภายในเซลล์ได้ เพราะมีความผันแปรกับอุณหภูมิ ถ้าทราบพื้นที่ผิวของเซลล์ อัตราการแพร่ของน้ำผ่านผนังเซลล์ และความผันแปรของอัตราการแพร่ของน้ำที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน ความสัมพันธ์ดังกล่าวนี้เสนอไว้โดย Mazur (1963) และเป็นที่ยอมรับและยึดถือเป็นหลักปฏิบัติทั่วไปคือ

1. เซลล์ที่มีขนาดใหญ่หรืออัตราส่วนระหว่างพื้นที่ผิวต่อปริมาตรเซลล์มีค่าน้อยเมื่อนำมาแช่แข็งต้องลดอุณหภูมิอย่างช้า ๆ เพื่อเปิดโอกาสให้น้ำแพร่ออกนอกเซลล์ได้มากพอ ในขณะทำการแช่แข็ง ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้เซลล์ถูกทำลาย

2. ถ้าธรรมชาติของผนังเซลล์ เยื่อหุ้มเซลล์เป็นสาเหตุในการแพร่ของน้ำเข้าออกเซลล์ได้ยาก อัตราการลดอุณหภูมิจึงจำเป็นต้องช้าลง เพื่อเปิดโอกาสให้น้ำแพร่ออกนอกเซลล์ได้มากเพียงพอ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ชนิดและขนาดของหลอดบรรจุ

หลอดที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งมีหลายแบบได้แก่ หลอดฟาง (Straw) หลอดยาฉีด (Ampule) หลอดไครโอ (Cryotube) หลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้ง 3 แบบนี้มีความจุหลายขนาดแตกต่างกัน ซึ่งหลอดแต่ละชนิดมีทั้งข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน ผู้ใช้จึงควรเลือกให้เหมาะสมกับชนิดและขนาดของหลอดบรรจุ หรือวิธีการนำไปใช้ ให้เหมาะสมกับชนิดของน้ำเชื้อที่จะทำการเก็บและวิธีการเก็บรักษา (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University