บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

จากการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*) แบบแช่แข็งจะเห็นได้ว่า หอยตะโกรมกรามขาวที่นำมาทำการทดลองมีน้ำหนัก ความกว้าง และความยาวของหอยทั้งเปลือกเฉลี่ยเท่ากับ 328.78±19.57 กรัม 8.9±0.73 เซนติเมตร และ 11.2±0.63 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนน้ำหนักของตัวหอยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.35±3.57 กรัม จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยตะโกรมกรามขาว พบว่า น้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว มีความหนาแน่นของสเปิร์มเฉลี่ย 2.27±0.06 x10^{10} ตัวต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่พบในหอยแมลงภู่ (*Perna canaliculus*) มีความเข้มข้นของสเปิร์มเท่ากับ 2.0 x10^{10} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Smith et al., 2001) หอยนางรม 2n และ 4n (*Crassostrea gigas*) มีความหนาแน่นของสเปิร์มเท่ากับ 2.7±0.5 x10^{10} เซลล์ต่อกรัมของน้ำหนัก Gonad (Dong et al., 2005a; Dong, Huang, Eudeline, & Tiersch, 2005b) หอยนางรม (*C. gigas*) มีความเข้มข้นของสเปิร์มเท่ากับ 10-20 x10^{9} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Ieropoli et al., 2004) หอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata martensii*) มีความเข้มข้นของสเปิร์มเท่ากับ 1.5 x10^{10} ตัวต่อมิลลิลิตร (Kawamoto et al., 2007) และหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor supertexa*) มีความเข้มข้นของสเปิร์มเท่ากับ 1x10^{9} ตัวต่อมิลลิลิตร (Gwo et al., 2002) เป็นต้น และน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวมีค่า Osmolality เฉลี่ยเท่ากับ 655±6.55 mOsm/ kg ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับที่พบในน้ำเชื้อของหอยนางรม (*Crassostrea virginica*) มีค่า Osmolality เฉลี่ยเท่ากับ 573±45 mOsm/ kg (Paniagua-Chavez, Buchanan, & Tiersch, 1998b) สำหรับน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวก่อนการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและสเปิร์มที่มีชีวิตเฉลี่ยเท่ากับ 98.89±2.98% และ 96.26±0.98% ตามลำดับ

การศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาว

จากการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาว พบว่า น้ำเชื้อสด (Fresh Milt) ที่เก็บรักษาไว้ในถังน้ำแข็งที่อุณหภูมิ 2-4°C หยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งสามารถเก็บรักษาได้นานกว่าน้ำเชื้อสดที่เจือจางในน้ำทะเล 30 ppt (Fresh Milt+Seawater 30 ppt) จะหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเล 30 ppt โดยน้ำเชื้อสดมีการเคลื่อนที่ที่ดีอยู่ในช่วงเวลา 28 ชั่วโมง ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 80-100% และน้ำเชื้อสดที่

เจือจางในน้ำทะเลจะมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีภายใน 2 ชั่วโมง มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 86.67±6.67% หลังจากนั้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลงเมื่อเวลาผ่านไป เช่นเดียวกับการทดลองของ Dong et al. (2005a) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อสดของหอยนางรม 2n และ 4n (*C. gigas*) ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 7 วัน พบว่า หอยนางรม 2n มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงจากเวลาเริ่มต้น (37±24%) จนถึง 7 วัน (62±23%) และหอยนางรม 4n มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงจากเวลาเริ่มต้น (39±24%) จนถึง 7 วัน (24±18%) แต่การศึกษาของ Paniagua-Chavez et al. (1998b) ได้ทำการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อของหอยนางรม (*C. virginica*) พบว่า น้ำเชื้อสดสามารถเก็บรักษาได้นาน 48 ชั่วโมง ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง 86±11% และน้ำเชื้อสดที่เจือจางในน้ำทะเลจะมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ดีเท่ากับ 80±10% ถึง 96±5% ภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นการเคลื่อนที่จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ซึ่งจากการทดลองของ Tsai and Chao (1994) ได้นำสเปิร์มสดของหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor*) ที่เก็บไว้นาน 2 ชั่วโมง มาผสมเทียมกับไข่ พบว่า อัตราการฟักเป็นตัวเฉลี่ย 98.80±0.49% ที่อุณหภูมิ 25°C

การศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4°C

จากการทดสอบชนิดของน้ำยาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการแช่เย็นน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาว ที่อุณหภูมิ 2-4°C พบว่า น้ำยาสูตร Ca-F HBSS มีความเหมาะสมมากที่สุดในการเจือจางและแช่เย็นน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว เนื่องจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 72 ชั่วโมง และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงที่สุดคือ 86.67±6.67% ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Paniagua-Chavez et al. (1998b) ที่ได้ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรม (*C. virginica*) ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่า Ca-F HBSS ที่มีค่า Osmolality เท่ากับ 830 mOsm/ kg สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้นาน 1 วัน มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง 96±5% และเมื่อนำมาปฏิสนธิกับไข่ หลังจาก 12 ชั่วโมง ทำให้ได้ลูกหอยระยะ Trochophore มีอัตราการรอด 48% เช่นเดียวกับ Dong, Eudeline, Allen, and Tiersch (2002) ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของหอยนางรม 2n (*C. gigas*) พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางใน Ca-F HBSS ที่ค่า Osmolality สูง 1000 mOsm/ kg มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด คือ 81±9% และเมื่อเติม Caffeine 10 mM ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงขึ้น จึงมีความเหมาะสมต่อคุณภาพสเปิร์มที่แช่เย็น ซึ่งจากการศึกษาผลของการเจือจางและการแช่เย็นน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 2-4°C ในหอยหลาย ๆ ชนิดที่ พบว่า

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Ca-F HBSS มีความเหมาะสมมากที่สุด เช่น หอยนางรม (*C. virginica*; Paniagua-Chavez & Tiersch, 2001; Paniagua-Chavez et al., 2006) หอยนางรม 2n (*C. gigas*; Dong et at., 2005b) หอยนางรม 4n (*C. gigas*; Dong, Huang, Eudeline, Allen, & Tiersch, 2006) หอยนางรม 2n และ 4n (*C. gigas*; Dong et al., 2005a; Dong, Huang, & Tiersch, 2007)

ส่วนน้ำยาสูตร HBSS ที่อัตราส่วน 1: 2 และ 1: 4 เก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวได้นาน 48 ชั่วโมง ซึ่งเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าเท่ากับ 80±0% และ 73.33±6.67% ตามลำดับ ให้ผลการทดลองเช่นเดียวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยนางรม (*C. virginica*) ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่า HBSS ที่มีค่า Osmolality 833 mOsm/ kg มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง 73±3% เมื่อเก็บไว้นาน 1 วัน และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงน้อยกว่า 10% เมื่อเก็บรักษาไว้นาน 4 วัน (Paniagua-Chavez et al., 1998b) การแช่แข็งสเปิร์มของหอยนางรม (*C. virginica* Gmelin) พบว่า HBSS เป็นน้ำยาบัฟเฟอร์ที่ดีที่สุดในการเจือจางน้ำเชื้อ (Zell, Bamford, & Hidu, 1979) นอกจากนี้ในปลา Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*) พบว่า HBSS มีความเหมาะสมในการเจือจางและแช่เย็นน้ำเชื้อ (Tiersch, Goudie, & Carmichael, 1994)

ซึ่งน้ำยาสูตร ASW ที่อัตราส่วน 1: 2 และ 1: 4 เก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวได้นาน 6 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 80±0% และ 73.33±6.67% ตามลำดับ จากผลการทดลองของ Paniagua-Chavez et al. (1998b) ศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของหอยนางรม (*C. virginica*) ที่เจือจางใน ASW ที่ค่า Osmolality แตกต่างกัน คือ 22, 203, 403, 601 และ 833 mOsm/ kg ที่อุณหภูมิ 4°C นาน 24 ชั่วโมง พบว่า ASW ที่มีค่า Osmolality 833 mOsm/ kg มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีกว่า ASW ที่มีค่า Osmolality 601 mOsm/ kg โดยมีค่าเท่ากับ 85±4% และ 79±2% ตามลำดับ และ ASW ที่มีค่า Osmolality 833 mOsm/ kg หลังจากเก็บรักษาไว้นาน 3 วัน การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงน้อยกว่า 10% ตามลำดับ จากการศึกษาของ Dong et al. (2002) พบว่าสเปิร์มของหอยนางรม 4n (*C. gigas*) มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงเมื่อแช่เย็นด้วย ASW ที่มีค่า Osmolality 1000 mOsm/ kg (83±14%) และการเคลื่อนที่จะลดลงเมื่อค่า Osmolality สูงกว่า 1000 mOsm/ kg และสเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อค่า Osmolality น้อยกว่า 500 mOsm/ kg เช่นเดียวกับการศึกษาของ Gwo et al. (2002) ได้ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อของหอยเป๋าฮื้อโดยใช้ ASW ในการเจือจางน้ำเชื้อหอย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการแช่แข็งตัวอ่อนของหอยหลาย ๆ ชนิด พบว่า การใช้ ASW ในการเจือจางนั้นมีความเหมาะสมและทำให้ลูกหอยมีอัตราการรอดสูง ได้แก่ ตัวอ่อนระยะ Trochophore (*C.virginica*; Paniagua-Chavez, Buchanan, Supan, & Tiersch, 1998a; Paniagua-Chavez & Tiersch, 2001) เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

จากการทดลองครั้งนี้น้ำยาสูตร DCSB4 ที่อัตราส่วน 1: 2 และ 1: 4 สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวได้นานเพียง 1 ชั่วโมง ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 86.67±6.67% และ 80±0% ตามลำดับ เช่นเดียวกับการศึกษาในหอยนางรม (*C. virginica*) ที่อุณหภูมิ 4°C พบว่า DCSB4 มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มตั้งแต่เริ่มเจือจาง (73±3%) เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นทำให้มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง (Paniagua-Chavez et al., 1998b) เช่นเดียวกับ Bougrier and Rabenomanana (1986) พบว่า DCSB4 เป็นน้ำยาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมต่อการเจือจางน้ำเชื้อของหอยนางรม (*C. gigas*) แช่แข็ง ในขณะที่น้ำเชื้อสด (Control) มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงเท่ากับ 80±0% เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้นาน 24 ชั่วโมง จากการศึกษาของ Dong et al. (2005a) พบว่า สเปิร์มสดของหอยนางรม 2n และ 4n (*C. gigas*) มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงจากเวลาเริ่มต้นจนถึง 7 วัน เท่ากับ 62±23% ถึง 37±24% และ 39±24% ถึง 24±18% ตามลำดับ เช่นเดียวกับน้ำเชื้อสดของหอยนางรม (*C. virginica*) สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 48 ชั่วโมง ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง 86±11% (Paniagua-Chavez et al., 1998b) นอกจากนี้ยังมีการใช้น้ำทะเลในการเจือจางน้ำเชื้อหอย เช่น หอยนางรม (*C. gigas*) ใช้น้ำทะเลความเค็ม 34 ppt ในการเจือจางน้ำเชื้อ (Ieropoli et al., 2004) และหอย Mangrove Oyster (*Crassostrea rhizophorae*) ใช้น้ำทะเลความเค็ม 28 ppt ในการเจือจางน้ำเชื้อ (Nascimento et al., 2005)

การเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ในอัตราส่วน 1: 2 และ 1: 4 ไม่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกราม แสดงว่าการเจือจางน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์เพื่อการเก็บรักษาแบบแช่เย็นสามารถทำได้มากถึงอัตราส่วน 1: 4 ซึ่งสอดคล้องกับการแช่เย็นน้ำเชื้อของหอยนางรม (*C. virginica*) พบว่า การเจือจางน้ำเชื้อใน ASW และ Ca-F HBSS ที่อัตราส่วน 1: 1 และ 1: 3 ที่เก็บรักษานาน 24 ชั่วโมง มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยมากกว่า 80% (Paniagua-Chavez et al., 1998b) นอกจากนี้การเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นมีปัญหาที่พบอีกอย่างหนึ่งคือ การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียเมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อนานขึ้นทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงอย่างรวดเร็วหลังการเจือจาง (Aas, Refstie, & Gjerde, 1991; Hara, Canto, & Almendras, 1982; Stoss, Buyukhatipoglu, & Holtz, 1972) การเติม Antibiotics ช่วยลดจำนวนแบคทีเรียระหว่างการแช่เย็น (Scott & Baynes, 1980) มีงานวิจัยหลายฉบับที่กล่าวถึง เช่น หอยนางรม (*C.virginica*; Paniagua-Chavez et al., 1998b) ปลา Channel Catfish (*Ictalurus punctatus*; Jenkins & Tiersch, 1997) เป็นต้น

ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่เย็น เช่น ค่าออสโมลาลิตี้ (Osmolality) ความเข้มข้นของสเปิร์ม (Sperm Concentration) การปนเปื้อนแบคทีเรีย (Bacterial Contamination) อุณหภูมิ (Temperate) การเพิ่มออกซิเจน (Oxygen Content) การละลายหรือการเกิดแกนิค

(Dissolved or-Ganic Matter) และ pH (Stoss et al., 1972) นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบของน้ำยาบัฟเฟอร์ (Extender Composition) ความเข้มข้นของแร่ธาตุ (Ionic Concentration) (Dong et al., 2002; Lahnsteiner, Berger, Weismann, & Patzner, 1997; Sunitha & Jayaprakas, 1997) และการเติมคาเฟอีน (Caffeine) ช่วยให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีขึ้น (Scheerer & Thorgaard, 1989; Tiersch et al., 1998)

การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มของหอยตะโกรมกรามขาว

จากผลการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาว พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นจาก 5-20% และแช่ในระยะเวลาที่นานขึ้นจาก 0-180 นาที ซึ่งพบว่า สารละลาย DMSO, Propylene Glycol และ Methanol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุด รองลงมาคือ Ethylene Glycol มีความเป็นพิษในระดับปานกลาง ขณะที่สารละลาย Sucrose, Ethanol, Acetamide, Glycerol และ Trehalose มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มมากที่สุด ดังนั้นระยะเวลาตั้งแต่ผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ (Equilibration Time) ที่มีความเหมาะสมก่อนการลดอุณหภูมิควรอยู่ในช่วง 10-20 นาทีแรก ซึ่งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงอยู่ระหว่าง 80-100% ซึ่งสันนิษฐานว่าเป็นเวลาที่สารไครโอโพรเทคแทนท์สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์แล้วไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับการทดลองของ Nascimento et al. (2005) ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 3 ชนิดคือ DMSO, Propylene Glycol และ Methanol ที่มีต่อสเปิร์มและตัวอ่อนระยะ Trochophore ของหอย Mangrove Oyster (*C. rhizophorae*) พบว่า DMSO มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มและตัวอ่อนระยะ Trochophore ที่ระยะเวลาสมดุล 20 นาที และสาร Propylene Glycol กับ Methanol มีความเป็นพิษสูงต่อสเปิร์มและตัวอ่อนระยะ Trochophore แต่ Methanol มีความเป็นพิษต่ำต่อตัวอ่อนระยะ Trochophore เช่นเดียวกับการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มของหอยนางรม (*C.virginica*) พบว่า สารละลาย Propylene Glycol ที่ความเข้มข้น 0-15% ที่ระยะเวลาสมดุล 15 นาที มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มต่ำ (Bougrier & Rabenomanana, 1986; Paniagua-Chavez & Tiersch, 2001)

การศึกษาของ Ieropoli et al. (2004) ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มของหอยนางรม (*C. gigas*) พบว่า สารละลาย DMSO, Propylene Glycol และ Ethylene

Glycol ความเข้มข้น 5-15% ที่ระยะเวลาสมดุล 10 นาที ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อย และสารละลาย Glycerol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มมากที่สุด เนื่องจากการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลงเมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นและระยะเวลาเพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับการศึกษาของ Dong et al. (2005b) พบว่า สารละลาย DMSO, Propylene Glycol และ Methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมต่อการแช่แข็งสเปิร์มของหอยนางรม 2n (*C. gigas*) ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อย จากการศึกษาของ Dong et al. (2006) พบว่า สารละลาย DMSO, Propylene Glycol, Ethylene Glycol, Methanol และ DMA (*N, N*-Dimethyl Acetamide) ที่ความเข้มข้น 5-10% ซึ่งมีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มของหอยนางรม 4n (*C. gigas*) แต่สารละลาย Glycerol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มสูง และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงเมื่อใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นต่ำ ๆ ซึ่งการทดลองของ Kawamoto et al. (2007) พบว่า สารละลาย Methanol และ DMF (*N, N*-Dimethyl Formamide) มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มของหอยมุกแกลบ (*Pinctada fucata martensii*) แต่สารละลาย DMSO และ Glycerol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มสูง และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลง เมื่อระยะเวลาสมดุลนานขึ้นมากกว่า 10 นาที

จากงานวิจัยส่วนใหญ่มีการใช้สารละลาย DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อของสัตว์น้ำหลายชนิดได้แก่ ปลาน้ำจืด เช่น ปลาไน *(Cyprinus carpio*; Kurokura, Hirano, Tomita, & Iwahashi, 1984) และปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*; Viveiros, So, & Komen, 2000) เป็นต้น ปลาทะเล เช่น ปลาเก๋า (*Epinephelus malabaricus*; Chao, Tsai, & Liao, 1992) ปลา rainbow trout (Conget et al., 1996) และปลากะพง (*Lateolabrax japonicus*; Ji et al., 2004) เป็นต้น และหอยทะเล เช่น หอยนางรม (*C.virginica*; Zell et al., 1979) หอยนางรม (*Crassostrea tulipa*; Yankson & Moyse, 1991) หอยนางรม (*C. gigas*; Usuki, Hamaguchi, & Ishioka, 1999) หอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor supertexa*; Tsai & Chao, 1994; Gwo et al., 2002) เป็นต้น นอกจากนี้สารละลาย Methanol มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มของปู (*Scylla serrata*) (Bhavanishankar & Subramoniam, 1997) จากรายงานการวิจัยของ Adam et al. (2004) พบว่า การนำสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (DMSO ความเข้มข้น 2.5-15%) รวมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (0.45 M Trehalose) มีความเหมาะสมในการแช่แข็งสเปิร์มของหอยนางรม (*C. gigas*) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Acosta-Salmon, Jerry, and Southgate (2007) ที่ศึกษาผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อสเปิร์มของหอยมุกแกลบ (*Pinctada margaritifera* L.) พบว่า 0.45 M Trehalose ผสมกับ 0, 0.64, 1.02 หรือ 1.53 M DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มต่ำ ซึ่ง Trehalose ช่วยลดความเป็นพิษของ DMSO (Anchordoguy, Rudolph, Carpenter, & Crowe, 1987)

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่แข็ง

จากการแช่แข็งน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวโดยนำสเปิร์มมาแช่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด ได้แก่ DMSO, Propylene Glycol และ Methanol โดยแช่ไว้ในสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15% และ 20% และแช่ไว้นาน 10 นาที ก่อนที่จะนำมาลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่อง Programmable Controlled-Rate Freezer โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ -1, -2.5, -5, -7.5, -10 และ -12.5°C/ นาที ที่อุณหภูมิสุดท้ายแตกต่างกันคือ -30°C และ -80°C แล้วเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) นาน 1 ชั่วโมง พบว่า DMSO ความเข้มข้น 5-20% ที่อุณหภูมิสุดท้าย -30°C ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิ ภายหลังการละลาย และที่อุณหภูมิสุดท้าย -80°C ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงที่สุดอยู่ระหว่าง 77.77-82.23% รองลงมาคืออัตราการลดอุณหภูมิ -2.5°C/ นาที ที่ความเข้มข้น 5-15% DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีอยู่ระหว่าง 57.77-73.33% หลังจากการละลายน้ำเชื้อ

จากการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor*) ทั้ง 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 การใช้เครื่อง Programmable Freezer พบว่า การใช้ 8% DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 97.76±1.94% อัตราการลดอุณหภูมิ -25°C/ นาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 23°C ถึง -30°C แล้วแช่ไนโตรเจนเหลวนาน 30 นาที และวิธีที่ 2 การใช้ Liquid Nitrogen Vapor พบว่า สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 4-12% ที่แช่แข็ง โดยนำตัวอย่างวางเหนือผิวไนโตรเจนเหลวความสูง 4 เซนติเมตร นาน 20 นาที แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วนำมาละลาย ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง 91.90±2.84% (Tsai & Chao, 1994) ซึ่งการทดลองของ Gwo et al. (2002) การแช่แข็งน้ำเชื้อของหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor supertexa*) โดยนำสเปิร์มมาเจือจางใน Artificial Seawater (ASW) และเติม 10% DMSO ด้วยอัตราส่วน 1: 1 แล้วแช่แข็ง โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -12 และ -15°C/ นาที จนถึงอุณหภูมิ -90°C แล้วนำมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ 50-75% และมีการปฏิสนธิ เท่ากับ 48% หลังการละลาย

จากรายงานการวิจัยของ Choi and Chang (2003) ได้ทำการศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ 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 เมื่อแช่แข็งแล้วละลายทำให้ลูกหอยระยะ Trochophore มีการพัฒนาถึงระยะ D- Shaped Larvae ประมาณ 89-91% หลังจากละลายใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 25°C นาน 10 วินาที เช่นเดียวกับ Dong et al. (2005a) ที่ทำการแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สเปิร์มของหอยนางรม 2n และ 4n (*C. gigas*) โดยใช้ความเข้มข้นของสเปิร์ม $2x10^9$ cell/ ml เจือจางใน Ca-F HBSS และ 8% DMSO พบว่า หอยนางรม 2n มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (30%) และการปฏิสนธิ (96%) แต่หอยนางรม 4n มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (<10%) และการปฏิสนธิ (<28%) ตามลำดับ เช่นเดียวกับการทดลองของ Adam et al. (2004) ที่ได้ศึกษาการแช่แข็งสเปิร์มของหอยนางรม (*C. gigas*) โดยใช้ 0.45 M Trehalose ผสมกับ DMSO ความเข้มข้น 5-12.5% ซึ่งทำการลดอุณหภูมิจาก $0^{\circ}C$ ถึง $-80^{\circ}C$ พัก 10 นาที ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-50^{\circ}C$/ นาที พบว่าสเปิร์มแช่แข็ง มีอัตราการปฏิสนธิ เท่ากับ 80±5% หลังจากละลาย

งานวิจัยของ Ieropoli et al. (2004) ทำการแช่แข็งสเปิร์มของหอยนางรม (*C. gigas*) พบว่า การใช้ 10% Ethylene Glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-6^{\circ}C$/ นาที มีผลทำให้สเปิร์มที่แช่แข็งเมื่อนำมาทำการปฏิสนธิ พบว่า มีอัตราการรอดถึงระยะ D-Larvae 58.9% และการศึกษาของ Hanquet-Dufour et al. (2006) ที่แช่แข็ง Vesicular Cell ของ *C. gigas* พบว่า การผสมระหว่าง 4% DMSO + 4% Glycerol + 4% Ethylene Glycol ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-1^{\circ}C$/ นาที แล้วนำมาทำการลดอุณหภูมิถึง $-70^{\circ}C$ แล้วแช่ไนโตรเจนเหลว หลังจากละลาย มีจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 84.4±10% และการใช้ 10% Glycerol เพียงอย่างเดียว มีจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 91.5±5.2% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ $-3^{\circ}C$/ นาที เมื่อลดอุณหภูมิถึง $-50^{\circ}C$ แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว

นอกจากนี้ยังมีการแช่แข็งในปลาหลายชนิด เช่น Ji et al. (2004) การแช่แข็งสเปิร์มของปลากะพง (*Lateolabrax japonicus*) โดยนำสเปิร์มที่เจือจางใน Modified Plaice Ringer Solution (MPRS) เติม 10% DMSO ผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาวางไว้เหนือผิวหน้าของไนโตรเจนเหลวความสูง 6 เซนติเมตร นาน 10 นาที พบว่า มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 68.3% และสเปิร์มที่แช่ไนโตรเจนเหลวนาน 3 วัน มีอัตราการปฏิสนธิ 84.8% และอัตราการฟัก 70.1% และสเปิร์มที่แช่ไนโตรเจนเหลวนาน 1 ปี มีอัตราการปฏิสนธิ 83.5% และอัตราการฟัก 90% ตามลำดับ และการศึกษาของ Acosta-Salmon et al. (2007) ที่แช่แข็งสเปิร์มของหอยมุกแกลบ (*Pinctada margaritifera* L.) พบว่า การใช้ 0.45 M Trehalose ผสมกับ 0, 0.64, 1.02 หรือ 1.53 M DMSO มีความเหมาะสมต่อการแช่แข็ง เนื่องจากสเปิร์มมีอัตราการรอดหลังการละลาย ซึ่ง Trehalose ช่วยป้องกันเซลล์ระหว่างการแช่แข็งโดยมีผลต่อการคงที่ของ Phospholipids ในเซลล์เมมเบรน (Cell Membrane) การป้องกันการถูกทำลายโดยการเกิดดีไฮเดรชัน (Dehydration) (Anchordoguy et al., 1987) นอกจากนี้ก็มีรายงานว่า Trehalose ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ (Ice Crystallisation) การเปลี่ยนแปลงสารละลายภายนอกเซลล์ (Extracellular Solution) (Woelders, Mattgijh, & Engel, 1997) ป้องกันเซลล์โดยการลดความเข้มข้นของเกลือ (Salt Concentration)

ก่อนแช่แข็ง (Holt, 2000) การเติมน้ำตาลในสารละลาย DMSO จะช่วยให้สเปิร์มมีอัตราการรอดชีวิตสูงขึ้น ได้แก่ ปู (*Scylla serrata*; Jeyalectumie & Subramoniam, 1989) และกุ้งทะเล (*Sicyonia ingentis*; Anchordoguy, Crowe, Griffin, & Clark, 1988)

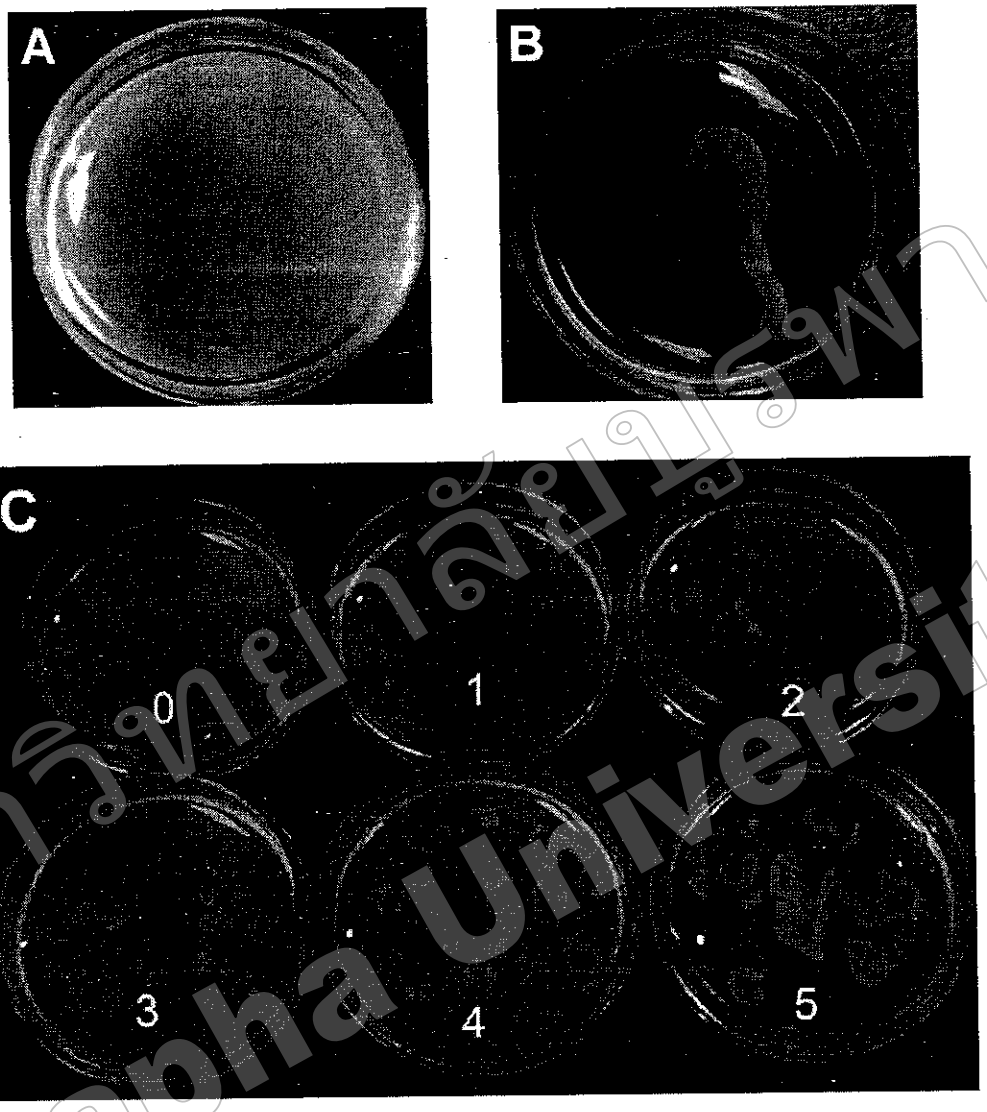
ในขณะที่สารละลาย Methanol ทุกระดับความเข้มข้น อัตราการลดอุณหภูมิ และอุณหภูมิสุดท้ายต่าง ๆ กัน พบว่า ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย จากผลการทดลองนี้ไม่สอดคล้องกับการทดลองของ Dong et al. (2005b) ที่แช่แข็งสเปิร์ม 2n ของหอยนางรม (*C. gigas*) โดยลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 4°C ถึง -30°C ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -5°C/ นาที และลดอุณหภูมิจาก -30°C ถึง -80°C ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -45°C/ นาที ก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า การใช้ 6% Methanol มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 70% และมีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 98% สำหรับการใช้สารละลาย Methanol ในการแช่แข็งยังมีงานวิจัยค่อนข้างน้อยในสัตว์น้ำจำพวกสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Invertrebrate) แต่ก็มีการศึกษาบ้างในหอยนางรม (*C. gigas*; Iwata, Kurokura, & Hirano, 1989) หอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor supertexa*; Gwo et al., 2002) เป็นต้น

ส่วนสารละลาย Propylene Glycol ที่ความเข้มข้น 5-20% ทุกระดับอัตราการลดอุณหภูมิและอุณหภูมิสุดท้ายต่าง ๆ กัน พบว่า ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย ซึ่งผลการทดลองที่ได้ไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Paniagua-Chavez et al. (1998a) ที่แช่แข็งตัวอ่อนระยะ Trochophore ของหอยนางรม (*C. virginica*) โดยนำตัวอ่อนระยะ Trochophore มาใส่ใน 15% Propylene Glycol ที่เจือจางใน ASW ทิ้งให้อยู่ในภาวะสมดุล 20 นาที และนำมาลดอุณหภูมิที่อัตราการลดอุณหภูมิ -2.5°C/ นาที แล้วเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 1 สัปดาห์ พบว่า ตัวอ่อนระยะ Trochophore มีอัตราการรอดชีวิตจนพัฒนาถึงระยะ D-Stage เท่ากับ 24% หลังจากละลายที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 วินาที เช่นเดียวกับการทดลอง Paniagua-Chavez and Tiersch (2001) ที่ทำการแช่แข็งสเปิร์มและตัวอ่อนระยะ Trochophore ของหอยนางรม (*C. virginica*) โดยนำตัวอ่อนระยะ Trochophore ที่มีความเข้มข้น 10,000 cell/ ml มาเจือจางใน Artificial Seawater (ASW) และนำสเปิร์มความเข้มข้น $1x10^9$ ml มาเจือจางด้วย Ca-F HBSS หลังจากนั้นนำสเปิร์มและตัวอ่อนมาใส่ใน 10-15% Propylene Glycol ที่เจือจางใน ASW ทิ้งให้อยู่ในภาวะสมดุล 15 นาที และนำมาทำการลดอุณหภูมิ -2.5°C/ นาที จากอุณหภูมิ 15°C ถึง -30°C พัก 5 นาที แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลวนาน 2 สัปดาห์ พบว่า มีอัตราการรอดชีวิตของสเปิร์มและตัวอ่อนระยะ Trochophore หลังจากนำมาละลายใน Water Bath ที่อุณหภูมิ 70°C นาน 15 วินาที และการศึกษาของ Dong et al. (2006) ได้ทำการแช่แข็งสเปิร์ม 4n ของหอย *C. gigas* โดยใช้ 6% PEG (Polyethylene Glycol) ผสมกับ 4% Propylene Glycol และ 6% PEG ผสมกับ 4% DMSO ที่ระยะเวลาสมดุลระหว่างน้ำเชื้อกับ

สารไครโอโพรเทคแทนท์ 60 นาที แช่แข็งโดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ -5°C/ นาที พบว่า หลังจากการละลายมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 50% อัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 48% และอัตราการฟักเท่ากับ 28% ตามลำดับ

จากการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว พบว่า สารละลาย Propylene Glycol ภายหลังการละลาย น้ำเชื้อจะมีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไปคือ มีลักษณะแยกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำใสกับส่วนที่เป็นสีขาวข้น (ลักษณะคล้ายเส้นก๋วยเตี๋ยว) จึงไม่สามารถตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้ จากผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dong et al. (2005a) พบว่า หลังการละลาย สเปิร์มจะรวมตัวกันเป็นก้อน (Sperm Agglutination) ซึ่งเกี่ยวเนื่องกับความเข้มข้นของสเปิร์มสูง อาจจะเกิด Acrosomal Reaction ระหว่างแช่แข็งและการละลาย จึงเกิดการปล่อยพันธะโมเลกุล (Releases the Bindin Molecules) ทำให้เซลล์เปลี่ยนจากของเหลวเป็นก้อน (Coagulate Cells) ทำให้โครงสร้างของสเปิร์มบางส่วนถูกทำลาย เช่น อะโครโซม (Acrosome) และส่วนหางแตก (Broken Tails) เป็นต้น

การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวในครั้งนี้ พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งจับตัวกันเป็นก้อนในบางครั้ง ซึ่งการเกิดขึ้นของปรากฏการณ์นี้น่าจะเกี่ยวกับจำนวนสเปิร์มที่ใช้แช่แข็งที่มากเกินไปดังการศึกษาของ Dong et al. (2007) ที่ได้ทำการแช่แข็งสเปิร์ม 2n และ 4n ของหอยนางรม (*C. gigas*) โดยควบคุมความเข้มข้นของสเปิร์ม เพื่อดูว่ามีผลต่อการจับตัวเป็นก้อนของน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่า การใช้ความเข้มข้นของสเปิร์มต่ำ ($2.5x10^7$ cell/ ml) สเปิร์มไม่จับตัวเป็นก้อน (Non-Sperm Agglutination) แต่ความเข้มข้นของสเปิร์มที่มากกว่า $2.5x10^8$ cell/ ml มีผลทำให้สเปิร์มมีการจับตัวเป็นก้อน (Sperm Agglutination) ระหว่างการแช่แข็งและการละลาย นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้สารละลาย DMSO ความเข้มข้นน้อย (2-10%) มีผลทำให้สเปิร์มจับตัวเป็นก้อน แต่ DMSO ความเข้มข้นสูงกว่า 12% ไม่มีการจับตัวเป็นก้อนของสเปิร์ม จึงได้จำแนกลักษณะของการรวมตัวเป็นก้อนของสเปิร์ม (Sperm Agglutination) ไว้ 6 ระดับ คือ ระดับ 0 (Homogeneous Suspension) ระดับ 1 (Few Clumps Discernable) ระดับ 2 (Many Clumps Evident) ระดับ 3 (Aggregation of Clumps) ระดับ 4 (Formation of Elongated Clumping "Noodles") ระดับ 5 (Formation of Well-Developed Noodles) เป็นต้น (แสดงดังภาพที่ 5-1) นอกจากนี้ยังมีรายงานหลายฉบับที่กล่าวถึงการเกิด Sperm Agglutination หลังการละลายได้แก่ หอย *C. virginica* (Hughes, 1973) หอย *C. gigas* (Bougrier & Rabenmanana, 1986; Kurokura, Namba, & Ishikawa, 1990; Adam et al., 2004) ปลา *Cyprinus carpio* (Horvath, Miskolczi, & Urbanyi, 2003) และปลา *Micropogonias undulates* (Gwo & Arnold, 1992) เป็นต้น



ภาพที่ 5-1 ลักษณะของน้ำเชื้อที่แช่แข็ง หลังจากการละลาย ดังนี้

(A) Homogeneous Suspension

(B) Elongated "Noodles"

(C) ลักษณะของ Sperm Agglutination 6 ระดับ คือ

0 = Homogeneous Suspension 3 = Aggregation of Clumps

1 = Few Clumps Discernable 4 = Formation of Elongated Clumping "Noodles"

2 = Many Clumps Evident 5 = Formation of Well-Developed Noodles

(Dong et al., 2007)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

อัตราการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวแช่แข็ง พบว่า อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 70°C มีความเหมาะสมมากที่สุดในการละลายน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด รองมาคืออัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 50°C และ 30°C นาน 5 วินาที ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ Paniagua-Chavez et al.(1998a); Paniagua-Chavez & Tiersch (2001) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของหอยนางรม *C. virginica* คือ 70°C นาน 15 วินาที เช่นเดียวกับ Gwo et al. (2002) ใช้อุณหภูมิ 70°C นาน 1 นาที ในการละลายน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor supertexa*) ที่แช่แข็ง และ Choi and Chang (2003) ใช้อุณหภูมิ 25°C นาน 10 วินาที ในการละลายน้ำเชื้อหอย (*Pinctada margaritifera* L.) ส่วน Dong et al. (2005a); Dong et al. (2005c) พบว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อของหอยนางรม 2n และ 4n (*C. gigas*) คือ 40-60°C นาน 5-7 วินาที และ Adam et al. (2004) ใช้อุณหภูมิ 20°C นาน 15-20 วินาที ในการละลายน้ำเชื้อหอย (*C. gigas*) เป็นต้น

การศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) นาน 6 เดือน โดยนำตัวอย่างมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและสเปิร์มที่มีชีวิต พบว่า สารละลาย 10% DMSO และ 15% DMSO เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 6 เดือน ในขณะที่ 5% DMSO ไม่สามารถเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) นานเกิน 1 เดือน เนื่องจากน้ำเชื้อจับตัวเป็นก้อนมีสีขาวขุ่น จึงไม่สามารถตรวจสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและสเปิร์มที่มีชีวิตได้ ส่วน 20% DMSO พบว่า ไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและสเปิร์มที่มีชีวิต จากการทดลองของ Paniagua-Chavez et al. (1998a) ทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยนางรม (*C.virginica*) ที่แช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 2 ปี เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายแล้วผสมกับไข่ พบว่า มีอัตราการฟักเป็นตัวและพัฒนาถึงระยะ D-Stage เท่ากับ 24% เช่นเดียวกับการศึกษาของ Tsai & Chao (1994) ได้นำน้ำเชื้อของหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor*) แช่แข็งมาเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลวนาน 20 วัน และ 365 วัน หลังจากละลายน้ำเชื้อแช่แข็งแล้วนำมาปฏิสนธิกับไข่ พบว่า มีอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 94.80% และ 89.10% ตามลำดับ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวก็มีรายงานการศึกษาในหอยหลาย ๆ ชนิด เช่น หอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis diversicolor supertexa*; Gwo et al., 2002) และ หอยนางรม (*C. gigas*; Dong et al., 2005b) เป็นต้น ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะยาวเป็นปี จะอยู่ในลักษณะของ Sperm Bank/ Gene Bank จะสามารถนำมาประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และการอนุรักษ์สัตว์น้ำที่สำคัญของประเทศได้ต่อไป

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สรุปผลการทดลอง

1. น้ำเชื้อสด สามารถเก็บรักษาได้นาน 28 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 2-4°C ซึ่งสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมากกว่า 80% และน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยน้ำทะเล 30 ppt สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีภายในเวลา 2 ชั่วโมง

2. น้ำยาบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS มีความเหมาะสมมากที่สุดในการเจือจางและแช่เย็นน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว เนื่องจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 72 ชั่วโมง และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงเท่ากับ 86.67±6.67% และการเจือจางน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์เพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นสามารถทำได้มากถึงอัตราส่วน 1: 4

3. ความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาว พบว่า สารละลาย DMSO, Propylene Glycol และ Methanol มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยที่สุด รองลงมาคือ Ethylene Glycol มีความเป็นพิษในระดับปานกลาง ขณะที่สารละลาย Sucrose, Ethanol, Acetamide, Glycerol และ Trehalose มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มมากที่สุด และระยะเวลาตั้งแต่ผสมน้ำเชื้อกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ (Equilibration Time) ที่มีความเหมาะสมก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการแช่แข็งจึงควรอยู่ในช่วง 10-20 นาทีแรก เนื่องจากมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงอยู่ระหว่าง 80-100% สันนิษฐานว่าเป็นเวลาที่สารไครโอโพรเทคแทนท์สามารถแพร่เข้าสู่เซลล์แล้วไม่ทำอันตรายต่อเซลล์ และการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลง เมื่อความเข้มข้น และเวลานานขึ้น

4. สารละลาย DMSO ความเข้มข้น 10-15% ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ นาที โดยการลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25°C ถึง -80°C พัก 5 นาที แล้วแช่ในไนโตรเจนเหลว (-196°C) มีความเหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว

5. อัตราการเพิ่มอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่า อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที มีความเหมาะสมที่สุดในการละลายน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแช่แข็ง

6. ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) นาน 6 เดือน แล้วนำตัวอย่างมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและสเปิร์มที่มีชีวิต พบว่า สารละลาย 10% DMSO และ 15% DMSO สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 6 เดือน ซึ่งการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 26.67-33.33% และสเปิร์มที่มีชีวิตเท่ากับ 18.73-30.95% ตามลำดับ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อเสนอแนะ

1. การเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่เย็น ควรมีการศึกษาเพิ่มโดยการให้ออกซิเจนสมทบเพื่อช่วยยืดระยะเวลาให้นานขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา

2. การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว ควรมีการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ออกฤทธิ์ภายนอกและภายในเซลล์ร่วมกัน เปรียบเทียบกับการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์เพียงชนิดเดียว เพื่อดูว่าการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์แบบใดถึงจะเหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวมากที่สุด

3. ควรทำการผสมเทียมน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแช่แข็ง เพื่อดูการปฏิสนธิของสเปิร์มเปรียบเทียบกับการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University