บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หอยนางรมที่มีการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยมีอยู่ 2 กลุ่ม คือ หอยนางรมพันธุ์เล็กหรือหอยนางรมปากจีบ ที่เลี้ยงกันอย่างแพร่หลายในจังหวัดชลบุรี จันทบุรี และตราด ส่วนหอยนางรมอีกกลุ่มเป็นหอยนางรมพันธุ์ใหญ่หรือที่รู้จักกันดีว่าหอยตะโกรม ได้แก่ หอยตะโกรมกรามดำ (*Crassostrea iredalei*) พบได้ในแหล่งเลี้ยงหอยจังหวัดชลบุรี จันทบุรี ตราด และทางภาคใต้จังหวัดประจวบคีรีขันธ์และระนอง หอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*) พบมากในแหล่งเลี้ยงหอยภาคใต้จังหวัดสุราษฎร์ธานี ระนอง พังงา สงขลา กระบี่ และปัตตานี เป็นต้น (วันทนา อยู่สุข, 2543) สถานการณ์การเพาะเลี้ยงและผลผลิตหอยนางรมในประเทศไทย นับตั้งแต่ปี 2533 จนถึงปี 2541 ผลผลิตหอยนางรมได้จากการเพาะเลี้ยงทั้งหมด ในปี 2533 ประมาณรายได้จากหอยนางรมเป็น 5,325.95 บาทต่อไร่ แต่ในปี 2541 มูลค่ารายได้ที่ได้จากหอยนางรมสูงถึง 128,710.26 บาทต่อไร่ (กรมประมง, 2543)

หอยตะโกรมกรามขาว (*C. belcheri*) เป็นหอยสองฝาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นอาหารทะเลที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย ปัจจุบันความต้องการทางการตลาดค่อนข้างสูงเนื่องจากผลผลิตยังไม่เพียงพอต่อความต้องการภายในประเทศ ทำให้หอยตะโกรมกรามขาวมีราคาสูง (นิพนธ์ ศิริพันธ์, 2543) หอยตะโกรมกรามขาวที่เลี้ยงได้มาจากธรรมชาติเป็นหลัก จึงทำให้ประสบปัญหาการขาดแคลนลูกหอยเนื่องจากปริมาณลูกหอยในธรรมชาติลดน้อยลงด้วยสาเหตุต่าง ๆ เช่น การจับจากแหล่งน้ำธรรมชาติ การขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ รวมทั้งปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น การเกิดน้ำเสีย ปัญหาการตื้นเขินของแหล่งน้ำ และปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี เป็นต้น (เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ บรรจง เทียนส่งรัศมี วันทนา อยู่สุข และณิฏฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์, 2546) ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่แข็ง เป็นทางออกทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาการขาดแคลนพันธุ์หอยตะโกรมกรามขาวทั้งยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกพันธุ์หรือปรับปรุงพันธุ์ได้ดีกว่าการอาศัยลูกพันธุ์จากธรรมชาติเพียงอย่างเดียว

โดยทั่วไปการเก็บรักษาน้ำเชื้อเพื่อยืดระยะเวลาการเก็บรักษาที่สเปิร์มสามารถมีชีวิตอยู่ได้สามารถทำได้ใน 2 ลักษณะได้แก่ การเก็บรักษาในระยะเวลาสั้น (Short-Term Storage) โดยเจือจางน้ำเชื้อในน้ำยาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมแล้วนำมาเก็บรักษาไว้ในถังน้ำแข็งหรือในตู้เย็นที่อุณหภูมิ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

0-4 องศาเซลเซียส ก็สามารถยืดระยะเวลาที่สเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่ออกไปได้นานขึ้นหลายสัปดาห์ และทำให้น้ำเชื้อถูกใช้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่มีการสูญเสีย ข้อดีของการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำทำให้ง่ายแก่การจัดการขณะผสมไข่กับน้ำเชื้อในระหว่างการผสมเทียม เพราะน้ำเชื้อจะถูกเตรียมและเก็บรักษาไว้ก่อนซึ่งจะนำมาใช้ได้ทันที ทำให้การผสมเทียมทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้นอีกทั้งการลำเลียงน้ำเชื้อแช่เย็นทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ ส่วนอีกวิธีหนึ่งเป็นการเก็บรักษาในระยะเวลายาว (Long-Term Storage) โดยการนำเอาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในน้ำยาบัฟเฟอร์ (Extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็ง (Cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อได้เป็นเวลานานเป็นปี (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) สำหรับในประเทศไทยการศึกษาการเก็บน้ำเชื้อหอยแบบแช่แข็งยังไม่มีใครศึกษาเมื่อเทียบกับในต่างประเทศ การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยแบบแช่แข็งยังมีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจเพื่อผลิตหอยที่โตเร็ว หรือทนทานต่อโรคให้มากขึ้นเพราะสามารถควบคุมช่วงเวลาการผสมเทียมหรือการผสมข้ามพันธุ์หอยชนิดต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ โดยสามารถขนส่งน้ำเชื้อแช่แข็งไปภายในประเทศและระหว่างประเทศได้ง่าย และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์น้ำ (Gene Bank) หรือป้องกันการสูญเสียพ่อพันธุ์สัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางพันธุกรรม และยังอาจใช้เป็นแนวทางของการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาตัวอ่อนของลูกหอยต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อที่มีผลต่อระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส

2. ศึกษาชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่แข็ง

3. พัฒนาเทคนิคในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว

สมมติฐานของการวิจัย

1. การเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวในน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาสภาพของสเปิร์มได้ในระยะเวลาหนึ่ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มของหอยตะโกรมกรามขาวแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ ชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลา

3. อัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing Rate) อุณหภูมิสุดท้าย (Final Temperature) และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (Thawing Rate) ที่แตกต่างกัน ทำให้อัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มของหอยตะโกรมกรามขาวแตกต่างกันหลังการแช่แข็ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาวแบบแช่แข็ง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยและสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ ที่หาได้ยากหรือใกล้สูญพันธ์ต่อไปในอนาคต

2. ทำให้ทราบถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว และชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ควรใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยตะโกรมกรามขาว

ขอบเขตของการวิจัย

การเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาว โดยนำมาเก็บรักษาไว้ในน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส และศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่าง ๆ ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาว เพื่อนำมาพิจารณาเลือกใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่เหมาะสมในการแช่แข็ง โดยใช้อุณหภูมิสุดท้ายของการแช่แข็งที่แตกต่างกัน หรือที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส โดยมุ่งเน้นการศึกษาเกี่ยวกับการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลาย เพื่อให้เซลล์มีชีวิตรอด โดยการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย และศึกษาผลของระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอยตะโกรมกรามขาวที่ผ่านการแช่แข็ง แล้วนำมาเก็บไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C)

นิยามศัพท์เฉพาะ

Cryopreservation คือ การเก็บรักษาเซลล์สืบพันธุ์หรือเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตทั้งพืช และสัตว์ ได้แก่ การเก็บรักษาเซลล์ไข่ น้ำเชื้อตัวผู้ ตัวอ่อน หรืออวัยวะของสิ่งมีชีวิต โดยผ่านกระบวนการแช่แข็ง แล้วนำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

Extender คือ สารละลายของเกลือที่ใช้ในการเตรียมน้ำเชื้อก่อนการแช่แข็งซึ่งบางครั้งมีสารอินทรีย์รวมอยู่ด้วยช่วยในการเก็บรักษาเซลล์ให้มีชีวิตรอดระหว่างการลดอุณหภูมิ และยังเป็น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารอาหารแก่เซลล์ ส่วนมาก Extender มีค่า Osmolality ใกล้เคียงกับ Seminal Fluid ของสัตว์ชนิดนั้นจึงทำให้สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่

Cryoprotectant คือ สารเคมีที่ช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง (Ice Crystal) ภายในเซลล์และช่วยชลอการสูญเสียน้ำทำให้เซลล์มีชีวิตรอดในกระบวนการแช่แข็ง

Equilibration Time คือ ระยะเวลาที่เซลล์ปรับตัวกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนเริ่มทำการแช่แข็ง

Freezing คือ การทำให้ของเหลวที่อยู่รอบ ๆ เซลล์และภายในเซลล์ค่อย ๆ แข็งตัว ในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิ อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม จะทำให้น้ำดึงออกจากเซลล์อย่างต่อเนื่องจะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์

Thawing คือ การละลายเซลล์ที่แข็งตัวโดยการเพิ่มอุณหภูมิ ก่อนนำไปใช้ประโยชน์ ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิไม่เหมาะสม อาจทำให้เซลล์ปรับสภาพไม่ทัน ทำให้เซลล์แตกและประสบความล้มเหลวหลังการแช่แข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University