รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ปีที่ ๒

เรื่อง

การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis asinina*) เพื่อการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์

Development of sperm preservation technology of abalone (*Haliotis asinina*) for commercial aquaculture

โดย

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[1]
สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[2]

[1]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์
[2]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๗
มหาวิทยาลัยบูรพา

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยเรื่อง การ พัฒนาเทคนิคการเก็บรักษา น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis asinina*) เพื่อการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ ได้ศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อในสภาพต่างๆ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจาง และเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ รวมทั้งประเมินผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และผลของอัตราการลดอุณหภูมิและการเก็บรักษาต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง ผลการศึกษาพบว่าน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่รวบรวมออกมาใหม่ๆ สามารถเก็บแช่เย็นนาน 4 ชั่วโมง และยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง แต่น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อยู่ในน้ำทะเลมีการเลื่อนที่ของสเปิร์มสูงในระยะ 2 ชั่วโมงแรกเท่านั้น การให้ออกซิเจนสมทบในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ ช่วยยืดระยะเวลาเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานกว่าไม่ใช้ออกซิเจนสมทบ โดย culture flask มีความเหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ การนำน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อมาเจือจางในสารละลายต่างๆ พบว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ ถูกควบคุมโดยแรงดันออสโมติกที่มีค่าสูงขึ้นเมื่อใช้สาร electrolyte และ non-electrolyte ในการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การเจือจางน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อในสารละลายบัฟเฟอร์สูตรต่างๆ (artificial seawater, Ringer solution และ calcium free saline; Ca-F saline) ในอัตราส่วน 1:1, 1:2 และ 1:4 พบว่า Ca-F saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ โดยไม่ควรเจือจางเกินอัตราส่วน 1 : 2 เพราะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานกว่าชุดการทดลองอื่นๆ การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ทำโดยนำน้ำเชื้อของหอยเป๋าฮื้อมาเจือจางใน สารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 6 ชนิด (dimethyl sulfoxide; DMSO, propylene glycol, acetamide, methanol, ethanol และ ethylene glycol) ที่ระดับความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% ที่ระยะเวลาต่างๆ กัน ตั้งแต่ 15 - 240 วินาที พบว่า DMSO, methanol และ ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำต่อน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ โดยนำเอาน้ำเชื้อ เจือจางด้วย DMSO ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% และลดอุณหภูมิด้วย เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ในอัตรา 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาทีไปจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 หรือ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อด้วยการใช้ 5 %DMSO และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด

Abstract

Development of sperm preservation technology of abalone (*Haliotis asinina*) for commercial aquaculture was investigated. The purpose of the project was to evaluate sperm motility of *H. asinina* under various conditions and assess successful storage time of *H. asinina* sperm stored under non-diluted and diluted conditions, evaluate the effects of cryoprotectants on sperm motility and assess the effects of freezing rate and cryostorage on post-thawed sperm motility. Freshly collected sperm can be chilled-stored for 4 hrs with high motility while diluted sperm in seawater had high motility only during the fist two hrs of dilution. Supplementation of oxygen prolonged sperm motility as compared to the non-supplemented group. Tissue culture flask was suitable to chilled-stored of *H. asinina* sperm. Activation of *H. asinina* sperm with various solutions showed that sperm motility was regulated by high osmolality from both electrolyte and non-electrolyte solutions. Chilled storage of *H. asinina* sperm with artificial seawater, Ringer solution and calcium free saline (Ca-F saline) at ratios of 1:1, 1:2 และ 1:4 showed the suitability of Ca-F saline in storage of *H. asinina* sperm at ratios less than 1 : 2. Study on cryoprotectant toxicity on sperm motility, semen was diluted in one of six cryoprotectants (dimethyl sulfoxide; DMSO, propylene glycol, acetamide, methanol, ethanol และ ethylene glycol) at 5, 10, 15 and 20% for 15-240 seconds showed that DMSO, methanol and ethylene glycol were the least toxic cryoprotectants. Freezing of semen was performed by diluting semen in DMSO at 5, 10, 15 and 20% prior to cooling with controlled-rated programmable freezer at rates of 2.5, 5, 7.5, 10 and 12 °C/min to final temperatures of -40 or -80°C prior to cryostorage. Highest post-thawed sperm motility was obtained from a treatment using 5% DMSO and 10 °C/min to -80 °C.

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis asinina*) เพื่อการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ พ .ศ. ๒๕๕๗ จากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) มหาวิทยาลัยบูรพา โดยรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ เป็นผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อในสภาพต่างๆ การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำ ทั้งการเจือจาง และ ไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ และการศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และการแช่แข็งน้ำเชื้อ ข้าพเจ้าขอขอบคุณ คุณปฏิญญา อ้นขวัญเมือง คุณอรุณ บุญธรรม คุณจารุณี วิสิลา และคุณศิริพร คชรัตน์ ที่ช่วยในการทดลอง รวบรวมน้ำเชื้อ และการวิเคราะห์ทางสถิติ และภาควิชาวาริชศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์ต่างๆระหว่างการศึกษาวิจัย ทำให้การวิจัยดำเนินการไปได้ตามวัตถุประสงค์ของโครงการ

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์

เมษายน ๒๕๕๘

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		ii
บทคัดย่อ		iii
Abstract		iv
สารบัญ		v
สารบัญตาราง		vi
สารบัญรูป		vii
บทที่		
1	ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
2	การสำรวจเอกสาร	6
3	วิธีดำเนินการทดลอง	13
4	ผลการทดลอง	22
5	อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง		44

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อในสภาพต่างๆ.........................	23
2	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อที่เก็บแช่เย็นโดยไม่ให้ออกซิเจนสมทบ...	24
3	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อที่เก็บแช่เย็นโดยให้ออกซิเจนสมทบ...	24
4	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อเมื่อกระตุ้นด้วย NaCl และ KCl..	25
5	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อเมื่อกระตุ้นด้วย glucose และ mannitol..	26
6	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ	27
7	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ เจือจางใน Ca-F saline ที่อัตราส่วนต่างๆ...	27
8	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน...	30
9	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน.........................	30
10	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Acetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน....................................	31
11	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน......................................	31
12	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Ethanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน..	33
13	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน..........................	33
14	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกันจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย (-40 องศาเซลเซียส)..	36
15	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกันจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย (-80 องศาเซลเซียส)..	36

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	หอยเป๋าฮื้อที่ใช้ในการทดลอง	16
2	ลักษณะพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อที่ใช้ในการทดลอง	16
3	การเลี้ยงพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ	17
4	ตำแหน่งของอัณฑะในพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ	17
5	ลักษณะอัณฑะพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อที่นำออกมาจากตัวหอย	18
6	การรวบรวมน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ	18
7	การบรรจุน้ำเชื้อพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อใส่ในหลอดฟาง	21
8	การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลว	21

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

หอยเป๋าฮื้อ หอยร้อยรู หรือหอยโข่งทะเล เป็นหอยทะเลฝาเดียว (gastropod) ที่พบกระจายทั่วโลก มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากราคาที่สูง และเป็นที่นิยมเลี้ยงทั้งในยุโรป และเอเชีย เช่น สหรัฐอเมริกา ออสเตรเรีย นิวซีแลนด์ เม็กซิโก จีน ญี่ปุ่น ฮ่องกง เกาหลี อินเดียเป็นต้น สำหรับการบริโภคหอยเป๋าฮื้อก็นิยมบริโภคอย่างแพร่หลายในลักษณะของอาหารทั้งในลักษณะของหอยเนื้อ และหอยตากแห้งและยังมีการบริโภคในลักษณะของยาแผนโบราณที่ทำให้ร่างกายแข็งแรง โดยเฉพาะในประเทศจีน ญี่ปุ่น ฮ่องกง เกาหลีที่มีการบริโภคอย่างมาก ทำให้การเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อเริ่มได้รับความสนใจอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลก และความต้องการของตลาดโลกมีมากขึ้นในช่วงเวลาประมาณ 10 ปีที่ผ่านมานี้ (Oakes and Ponte, 1996) อย่างไรก็ตามหอยเป๋าฮื้อส่วนมากที่เลี้ยงกันทั่วไปมักได้มาจากการเพาะเลี้ยง ส่วนน้อยได้มาจากการจับในธรรมชาติ ทำให้มีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้ออย่างแพร่หลายในหลายประเทศเพื่อควบคุมผลผลิตให้ได้ปริมาณมากเพียงพอกับความต้องการบริโภคในประเทศและการส่งออก (Jarayabhand and Paphavasit, 1996) แม้ว่าโดยทั่วไปแล้วหอยทะเลที่มีการเพาะเลี้ยง หรือจับจากธรรมชาติส่วนใหญ่เป็นหอย 2 ฝา (bivalve) ซึ่งปริมาณหอย 2 ฝาที่ถูกจับออกมาบริโภคในแต่ละปีทั่วโลกมีประมาณ 3 ล้านตัน ซึ่งส่วนใหญ่เป็น oyster, mussels, clams และ scallops และมีการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์หอย 2 ฝาหลายชนิดในโลก แต่หอยเป๋าฮื้อ ซึ่งเป็นหอยฝาเดียว ก็เป็นที่นิยมเลี้ยงในเอเชียในหลายประเทศ เนื่องจากมีราคาสูง

การเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อในประเทศไทยอย่างเป็นระบบเพิ่งจะเริ่มมีในระยะเวลาประมาณ 10 ปีที่ผ่านมานี้เอง และหอยเป๋าฮื้อก็จัดเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวใหม่ที่กำลังมาแรงในประเทศไทยในขณะนี้เนื่องจากผลตอบแทนที่สูง ซึ่งเป็นแรงจูงใจที่ทำให้ผู้ประกอบเอกชนจำนวนมากที่อยู่บริเวณชายฝั่งทะเลที่แต่เดิมเลี้ยงกุ้งกุลาดำ หรือกุ้งขาวก็เริ่มสนใจเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อแทนกุ้งทะเลที่เริ่มเลี้ยงได้ยากขึ้นเนื่องจากราคาของกุ้งทะเลในตลาดโลกที่ต่ำลงและสภาพการเลี้ยงกุ้งทะเลที่นับวันจะเลี้ยงยากขึ้นอันเนื่องจากการแพร่ระบาดของโรคกุ้ง ทำให้ผู้ประกอบการเลี้ยงกุ้งทะเลส่วนหนึ่งเริ่มมองหาสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวใหม่เพื่อการเพาะเลี้ยงมากขึ้น หอยเป๋าฮื้อเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีศักยภาพสูงในการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์อย่างครบวงจร และมีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายในฟาร์มเอกชนบริเวณจังหวัดติดชายฝั่งทะเล โดยเฉพาะทางภาคใต้ของประทศไทยที่หลายๆฟาร์มได้รับการสนับสนุนทางด้านการวิจัยและพัฒนา และการถ่ายทอดเทคโนโลยีจากหน่วยงานของภาครัฐเพื่อให้สามารถผลิตหอยเป๋าฮื้อในเชิงพาณิชย์ และสามารถส่งออกไปจำหน่ายในตลาดโลก เนื่องจากหอยเป๋าฮื้อเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีราคาแพง โดยในท้องตลาด ขนาด 40-50 ตัว/กิโลกรัม มีราคาต่อกิโลกรัมอยู่ระหว่าง 1,000-1,500 บาท และขนาด 10 ตัว/กิโลกรัมราคาประมาณ 2300-3800 บาท/กิโลกรัม (สิทธิศักดิ์ เหมืองสิน, 2545) ในปัจจุบันมูลค่าการบริโภคหอยเป๋าฮื้อในสหรัฐอเมริกาอยู่ที่ประมาณ 750 ล้านบาทต่อปี อย่างไรก็ตามตลาดผู้บริโภคหอยเป๋าฮื้อที่ใหญ่ที่สุดอยู่ในฮ่องกง จีน และญี่ปุ่น และมีมูลค่าการบริโภคประมาณ 7,500 - 10,000 ล้านบาทต่อปี โดยมีตลาดใหญ่อยู่ในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งมีราคาจำหน่ายประมาณกิโลกรัมละ 2,000 - 2,400 บาท อย่างไรก็ตามหอยเป๋าฮื้อพันธุ์ไทยซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Haliotis asinina* แม้ว่าจะมีขนาดค่อนข้างเล็กเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างๆที่

จำหน่ายตามท้องตลาดทั่วโลกก็เป็นจุดแข็งที่หอยสายพันธุ์ *H. asinina* สามารถส่งออกไปจำหน่ายในตลาดโลกได้ดี เพราะหอยสายพันธุ์นี้พบแพร่กระจายส่วนใหญ่เฉพาะในเอเซียตะวันออกเฉียงใต้ และหอยสายพันธุ์นี้ก็ได้รับความนิยมในการบริโภคสูง สำหรับหอยเป๋าฮื้อขนาดเล็กเช่นสายพันธุ์ของไต้หวันชนิด *H. diversicolor* สามารถผลิตและส่งไปขายยังต่างประเทศเช่น จีน ญี่ปุ่นและเกาหลี นอกจากนี้ในปัจจุบันในตลาดโลกก็ได้มีความต้องการบริโภคตลาดหอยเป๋าฮื้อขนาด 25-100 กรัมหรือ หอยขนาด 1.5-3 นิ้ว หรือเรียกหอยขนาดค็อกเทล (cocktail size abalone) ขึ้นมาทำให้มีความต้องการหอยเป๋าฮื้อขนาดเล็กมากขึ้น ทำให้เห็นได้ชัดถึงศักยภาพการตลาดหอยขนาดเล็กเช่นหอยเป๋าฮื้อต่อการส่งออกไปตลาดโลก

หอยเป๋าฮื้อทั่วโลกมีทั้งหมดประมาณ 70-80 ชนิด แต่มีประมาณ 22 ชนิดที่มีขนาดใหญ่ หอยเป๋าฮื้อที่พบในประเทศไทยมี 3 ชนิดได้แก่ *Haliotis asinina*, *Haliotis ovina* และ *Haliotis varia* โดยในประเทศไทย มักจะพบมากหอยเป๋าฮื้อพันธุ์ *Haliotis asinina* อยู่ในธรรมชาติเป็นส่วนใหญ่ อีกทั้งหอยเป๋าฮื้อชนิดนี้ยังมีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว และมีขนาดที่ใหญ่กว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหอยเป๋าฮื้ออีก 2 ชนิด จึงทำให้หอยเป๋าฮื้อพันธุ์ *Haliotis asinina* มีความเหมาะสมที่จะนำมาส่งเสริมการเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์เพื่อเป็นทางเลือกของสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวใหม่ต่อไป (Jarayabhand *et al*., 2003; ธานินทร์ สิงหะไกรวรรณ และมาซาโนริ โดอิ, 2536) อย่างไรก็ตามการเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อในประเทศไทยยังประสบปัญหาสายพันธ์พ่อแม่พันธุ์หอยในบางครั้งที่มีการเจริญเติบโตที่ไม่ดีเทียบเท่ากับสายพันธุ์ต่างประเทศ ทำให้ลูกหอยเป๋าฮื้อที่เพาะได้ก็โตช้า ใช้เวลานานขึ้นกว่าจะขายได้ ดังนั้นถ้าสามารถนำน้ำเชื้อพ่อพันธุ์หอยที่โตเร็ว หรือได้ถูกคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีไว้ภายในฟาร์มแล้วนำมาผสมเทียมกับไข่ในภายหลังก็จะทำให้ลักษณะที่ดีของพ่อพันธุ์ถ่ายทอดๆปยังลูกหอยได้

ด้วยเหตุที่การเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อในประเทศไทยในขณะนี้สามารถควบคุมผลผลิตได้ครบวงจรในฟาร์มหอยเชิงพาณิชย์ ตั้งแต่การเพาะพันธุ์ การอนุบาล และการเลี้ยงจนถึงขนาดตลาด เช่นทราบวิธีการเพาะพันธุ์ที่ได้อัตรารอดที่ดีขึ้นแม้ว่าอัตรารอดหลังการลงเกาะจะมีค่าไม่ถึง 5% ก็ตาม หรือสามารถหาวัตถุดิบอาหารสัตว์ที่เหมาะสมมาผลิตอาหารเม็ดเพื่อทดแทนการใช้สาหร่ายทะเลในการเลี้ยงหอย เป็นต้น (ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ , 2543) (ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ , 2543) กรมประมงสามารถเพาะพันธุ์หอยชนิดนี้ได้เป็นครั้งแรกในประเทศไทย โดยศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก โดยปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์หอยวางไข่เองตามธรรมชาติในปี 2532 และจากนั้นได้มีการวิจัยและพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยชนิดนี้อย่างต่อเนื่องทำให้ปัจจุบันนี้ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์สามารถควบคุมการผลิตให้หอยเป๋าฮื้อผสมพันธุ์วางไข่ตามเวลาที่ต้องการได้ตลอดปีและผลิตลูกพันธุ์หอยเป๋าฮื้อขนาดตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตร ขึ้นไปเป็นจำนวนมากอย่างสม่ำเสมอจนสามารถส่งไปทดลองเลี้ยงตามหน่วยงานของกรมประมงหลายแห่ง เพื่อที่จะหาข้อมูลเกี่ยวกับเทคนิคการเลี้ยงหรือรูปแบบการเลี้ยงที่เหมาะสมแล้วขยายผลการวิจัยสู่เกษตรกร ประกอบกับผลงานวิจัยจากหลายๆฝ่ายที่เกี่ยวข้องกับหอยชนิดนี้ทำให้มีความเป็นไปได้สูงในการที่จะสนับสนุนให้มีการเลี้ยงหอยชนิดนี้ในเชิงพาณิชย์เพื่อส่งออกไปจำหน่ายในต่างประเทศต่อไป อย่างไรก็ตามปัญหาหลักปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการผลิตหอยเป๋าฮื้อเชิงพาณิชย์อย่างมาก คือพ่อแม่พันธุ์ตามธรรมชาติที่หาได้ยาก และมีปริมาณน้อยลงค่อนข้างมาก ซึ่งแม้ว่าจะสามารถขุนพ่อแม่พันธุ์ขึ้นมาใช้เองในฟาร์มได้ (domestication of broodstock) แต่ก็ต้องใช้เวลาเลี้ยงหลายปี และบางครั้งการติดโรคก็ทำให้พ่อแม่พันธุ์สูญเสีย ส่งผลต่อการผลิตลูกพันธุ์ อีกทั้งพ่อแม่พันธุ์ก็สามารถใช้เพาะพันธุ์ได้ช่วงหนึ่งก็ต้องจัดหาพ่อแม่พันธุ์ใหม่มา

ใช้ ทำให้ต้องใช้พ่อแม่พันธุ์ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด อีกทั้งสายพันธุ์หอยเป๋าฮื้อในประเทศไทยมักมีการเจริญเติบโตช้ากว่าสายพันธุ์ต่างประเทศ ทำให้มีความจำเป็นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อพ่อพันธุ์หอยที่โตเร็ว หรือได้ปรับปรุงสายพันธุ์เอาไว้แล้วมาใช้ประโยชน์ในการผสมเทียมกับไข่ในภายหลัง นอกจากนี้การเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อในปัจจุบันจะปล่อยพ่อแม่พันธุ์แยกบ่อกันเพื่อกระตุ้นให้ปล่อยไข่และน้ำเชื้อออกมาด้วยเทคโนโลยีที่เหมาะสม แล้วจึงรวบรวมน้ำเชื้อในบ่อพ่อพันธุ์มาเทลงเพื่อปฏิสนธิกับไข่ในบ่อแม่พันธุ์ ซึ่งเมื่อพิจารณาอย่างละเอียดจะพบว่าในการปฏิสนธิไข่นั้นไม่จำเป็นต้องใช้น้ำเชื้อจำนวนมาก แต่การที่หอยเป๋าฮื้อตัวผู้ปล่อยน้ำเชื้อออกมาเมื่อถูกกระตุ้นนั้นจะปล่อยน้ำเชื้อออกมาจนหมด ซึ่งน้ำเชื้อส่วนที่เหลือจากการใช้ปฏิสนธิกับไข่ก็จะสูญเสียไปโดยเปล่าประโยชน์ ดังนั้นแนวทางการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อส่วนที่เหลือจากการใช้ หรือการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อเมื่อได้พ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพดี หรือเก็บน้ำเชื้อจากสายพันธุ์ที่ได้คัด เลือกปรับปรุง พันธุ์ไว้แล้ว โดยทำการเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส (chilled storage) หรือเก็บแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (cryopreservation) จะทำให้การเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อสามารถควบคุมการผลิตได้ตามที่ต้องการ เพราะหอยเพศผู้จะไม่เป็น limiting factor ในการเพาะพันธุ์อีกต่อไป ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อจะง่ายกว่าการเก็บรักษาไข่ของตัวเมียที่มีขนาดใหญ่และมีไข่แดงที่เป็นอุปสรรคตามธรรมชาติ (natural barrier) ซึ่งทำให้การเก็บรักษาไข่ค่อนข้างจะสลับซับซ้อนและยากกว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแบบแช่เย็น และแบบแช่แข็ง เป็นทางออกทางหนึ่งในการแก้ไขปัญหาการขาดแคลนพ่อพันธุ์หอย เป๋าฮื้อที่มีคุณภาพดีของประเทศไทย เนื่องจากในบางครั้ง ในระหว่างการเพาะพันธุ์อาจจะได้พ่อพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์ เพศก็จริงแต่ไม่สามารถหาแม่พันธุ์มาผสมได้ทำให้ไม่สามารถเพาะพันธุ์หอย ถ้ามีการนำน้ำเชื้อมาเก็บรักษาโดยวิธีการแช่เย็น หรือแช่แข็งก็จะสามารถนำน้ำเชื้อเหล่านั้นมาใช้ได้ในทุกเวลาที่ต้องการเมื่อแม่พันธุ์มีความพร้อม หรือเมื่อพ่อพันธุ์หอยมีน้ำเชื้อแต่ไม่ได้นำมาเพาะพันธุ์ก็จะทำให้ ปริมาณน้ำเชื้อลดหายไปในปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ตามธรรมชาติของหอย ซึ่ง ถ้าสามารถรวบรวมน้ำเชื้อที่มีปริมาณมากเหล่านั้นในช่วง peak ของฤดูผสมพันธุ์วางไข่ แล้วเก็บแช่เย็นหรือเก็บแช่แข็ง เอาไว้มาใช้ในภายหลังได้ ก็เป็นประโยชน์ต่อการจัดการในโรงเพาะฟัก อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่กล่าวมาข้างต้นนี้เป็นปัญหาทั่วๆไปที่เกิดในโรงเพาะฟักเนื่องจากฤดูกาล (season) หรือความแปรปรวนของสัตว์น้ำแต่ละตัว (individual variation) แต่ด้วยเหตุที่ปัญหาหลักการเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อในประเทศไทยมีความเกี่ยวข้องกับสายพันธุ์หอยเป๋าฮื้อที่โตช้าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศตามที่กล่าวมาแล้ว ดังนั้นเมื่อฟาร์มเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อภาคเอกชนที่ได้คัดเลือกหรือปรับปรุงได้สายพันธุ์หอยเป๋าฮื้อที่โตดีเอาไว้แล้วก็ควรนำน้ำเชื้อที่ดีเหล่านั้นมาเก็บรักษาไว้ในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) แทนที่จะปล่อยให้น้ำเชื้อหายไปตามฤดูกาลเพื่อประโยชน์ของการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อเชิงพาณิชย์ รวมทั้งการจัดเก็บน้ำเชื้อสายพันธุ์หอยที่ดีในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ ซึ่งก็ เป็นประโยชน์ต่อการจัดการในโรงเพาะฟัก ช่วยลดต้นทุนในการเลี้ยงขุนพ่อพันธุ์ เพราะไม่ต้องเลี้ยงขุนพ่อพันธุ์ไว้ในโรงเพาะฟักเป็นเวลานาน และยัง ช่วยลดการเกิดปัญหาการผสมแบบเลือดชิดได้ เพราะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อเป็นรุ่นๆ ได้ ทำให้สามารถบริหารจัดการปรับปรุงพันธุ์หอยได้โดยตรง

โดยทั่วไปการเก็บรักษาน้ำเชื้อสามารถทำได้ใน 2 ลักษณะได้แก่ การเก็บรักษาในระยะเวลาสั้น (Short-Term Storage) โดยเจือจางน้ำเชื้อในน้ำยาบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมแล้วนำมาเก็บรักษาไว้ในถังน้ำแข็งหรือในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ก็สามารถยืดระยะเวลาที่สเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่ออกไปได้นานขึ้นหลายสัปดาห์ และทำให้น้ำเชื้อถูกใช้อย่างมีประสิทธิภาพโดยไม่มีการสูญเสีย

ข้อดีของการเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ 2-4 องศาเซลเซียส ทำให้ง่ายแก่การจัดการขณะผสมไข่กับน้ำเชื้อในระหว่างการผสมเทียม เพราะน้ำเชื้อจะถูกเตรียมและเก็บรักษาไว้ก่อนซึ่งจะนำมาใช้ได้ทันที ทำให้การผสมเทียมทำได้สะดวกและรวดเร็วขึ้นอีกทั้งการลำเลียงน้ำเชื้อแช่เย็นทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ ส่วนอีกวิธีหนึ่งเป็นการเก็บรักษาในระยะเวลายาว (Long-Term Storage) โดยการนำเอาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในน้ำยาบัฟเฟอร์ (Extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็ง (Cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อ พร้อมกับลดอุณหภูมิที่เหมาะสม ก่อนที่จะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อได้เป็นเวลานานเป็นปี (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยแบบแช่แข็งยังมีบทบาทสำคัญต่อการปรับปรุงพันธุ์หอยที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เพื่อผลิตหอยที่โตเร็ว หรือทนทานต่อโรคให้มากขึ้นเพราะสามารถควบคุมช่วงเวลาการผสมเทียมหรือการผสมข้ามพันธุ์หอยชนิดต่าง ๆ ได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้การลำเลียงน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ โดยสามารถขนส่งน้ำเชื้อแช่แข็งไปภายในประเทศและระหว่างประเทศได้ง่าย และยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์น้ำ (Gene Bank) หรือป้องกันการสูญเสียพ่อพันธุ์สัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางพันธุกรรม และยังอาจใช้เป็นแนวทางของการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาตัวอ่อนของลูกหอยต่อไปในอนาคต

การพัฒนาการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อในประเทศไทยจำเป็นต้องมีการวิจัยเชิงรุกเพื่อเพิ่มคุณภาพและผลผลิตของหอยเพื่อการแข่งขันของประเทศโดยการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีต่างๆที่เกี่ยวข้อง ซึ่งการแก้ไขปัญหาการจัดการการเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อให้มีประสิทธิภาพดีขึ้นสามารถทำโดยเอาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อมาแช่แข็งและเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจน ซึ่งจะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีได้นานเป็นปีๆ ทั้งประโยชน์เชิงพาณิชย์ การปรับปรุงพันธุ์ และการอนุรักษ์สายพันธุ์ที่ดี ด้วยเหตุที่การพัฒนาเพิ่มศักยภาพในการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อเชิงพาณิชย์ของประเทศไทยยังมีความเป็นไปได้สูงมาก เนื่องจากโครงสร้างพื้นฐานของธุรกิจการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศมีการพัฒนา อย่างเป็นระบบ อยู่ตลอดเวลา และผู้ประกอบการมีความพร้อมในการพัฒนารูปแบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชนิดใดก็ตามที่ให้ผลตอบแทนสูงในระหว่างการเลี้ยง ประกอบกับปัญหาการโตช้าของหอยเป๋าฮื้อในประเทศไทย ทำให้การเพิ่มขีดความสามารถในการแข่งขันดังกล่าว สู่ตลาดโลก จะไม่เกิดขึ้นถ้าส่วนหนึ่ง ส่วนใดของระบบไม่มีการปรับตัว ดังนั้นโครงการวิจัยเรื่องนี้จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อหาองค์ความรู้ใหม่ที่เกี่ยวข้องกับปัจจัยที่ควบคุมความสำเร็จในการพัฒนาเทคนิคแช่เย็นหรือ แช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ จากสายพันธุ์ที่โตดี และได้ปรับปรุงพันธุ์เอาไว้แล้ว รวมทั้งการนำข้อมูล วิจัยที่ได้มาประยุกต์ใช้เพื่อส่งเสริมและสนับสนุนการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อเชิงพาณิชย์ ของประเทศ ต่อไป เพื่อเสริมสร้างศักยภาพในการแข่งขันของประเทศที่สามารถเป็นผู้ผลิตและส่งออกหอยเป๋าฮื้อไปขายในต่างประเทศ และก่อให้เกิดการเสริมสร้างการพัฒนาที่ยั่งยืนของการเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อของประเทศ

วัตถุประสงค์โครงการวิจัย

1. ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำยาบัฟเฟอร์สูตรต่าง ๆ ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส
2. ศึกษากลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ
3. ศึกษาชนิด ปริมาณความเข้มข้น และระยะเวลาของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ

4. ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพสเปิร์ม

5. เพื่อพัฒนาเทคนิคในการแช่เย็น และการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อเพื่อใช้ในการเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อเชิงพาณิชย์

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแบบแช่เย็น และแช่แข็ง ซึ่งข้อมูลดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาสายพันธุ์ที่ดีของพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อเพื่อการเพาะพันธุ์ต่อไป และยังเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัยเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยทะเลเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ เช่น หอยเชลล์ หรือสัตว์น้ำชนิดอื่นๆที่หาได้ยากหรือใกล้สูญพันธ์ต่อไปในอนาคต

2. ทำให้ทราบถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ และปัจจัยต่างๆที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ

3. ทราบชนิดของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ควรใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแบบแช่แข็ง

4. ได้พัฒนาเทคนิคการเก็บน้ำเชื้อหอยแบบแช่แข็งเพื่อการผสมเทียม โดยการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) หรือใช้เครื่องมือราคาถูกด้วยการแช่แข็งอย่างง่ายๆภายในถังโฟม (styrofoam box) ทำให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อในไนโตรเจนเหลวได้ในระยะเวลาที่นานขึ้นเพื่อใช้ประโยชน์สูงสุดในการผสมเทียม

5. การนำน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่ได้แช่เย็น หรือแช่แข็งมาใช้ในการเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อเชิงพาณิชย์จะมีการนำมาใช้ในอนาคตมากขึ้น อันเนื่องจากความต้องการลูกพันธุ์หอยที่สูงขึ้นจะทำให้มีการเพาะพันธุ์มากขึ้น ซึ่งนั่นหมายถึงจะต้องมีการใช้น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อให้คุ้มค่า และลดการสูญเสียน้ำเชื้อไปโดยเปล่าประโยชน์ให้มากที่สุด ซึ่งการพัฒนาเหล่านี้จะช่วยทำให้การผลิตลูกหอยเป๋าฮื้อทำได้ตลอดปี

<u>ประโยชน์ต่อเกษตรกร</u>

การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแบบแช่เย็นจะทำให้เกษตรกรมีทางเลือกในการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยเทคโนโลยีราคาถูก ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อนอกจากสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อในลักษณะที่เป็นธนาคารอสุจิ (sperm bank) ของสายพันธุ์หอยที่มีลักษณะดีแล้ว ยังทำให้การเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อมีความสะดวกขึ้นเช่นกัน และทำให้ใช้น้ำเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด ข้อมูลดังกล่าวยังสามารถไปใช้ในการพัฒนางานวิจัยเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยชนิดอื่นๆของประเทศไทยที่หาได้ยากหรือใกล้สูญพันธ์ต่อไปในอนาคต

<u>ประโยชน์ต่อนักวิชาการและหน่วยงานของรัฐ</u>

ความรู้ที่เกี่ยวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการผลิตหรือการเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อของกรมประมง ซึ่งมีหน้าที่ส่งเสริมให้เกษตรกรมีอาชีพการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ความรู้ที่ได้สามารถไปประยุกต์ใช้ในการจัดการการเพาะพันธุ์หอยเศรษฐกิจชนิดอื่นๆ ทำให้สามารถเพาะพันธุ์หอยได้ตลอดปีตามที่ต้องการ และไม่เกิดปัญหาการขาดแคลนลูกพันธุ์หอย

บทที่ 2
การสำรวจเอกสาร

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาหอยเป๋าฮื้อ

หอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis asinina*) เป็นหอยฝาเดียว มีเปลือกแบน เป็นรูปยาวรียอดเตี้ย มีสีเขียวเข้ม น้ำตาล หรือแดงคล้ำตามขอบเปลือก (อนุวัตน์และฮิลลิแบร์, 2529) จัดอยู่ใน Class Gastopoda, Order Archaeogastopoda และ Family Haliotidae ภายนอกเปลือกมีลักษณะเป็นวงรีๆ ซ้อนกันออกไป มีลักษณะเหมือนก้นหอยแน่นกว้างเตี้ย คล้ายโล่ และไม่สมมาตร มีปาก ตา 1 คู่ หนวด 1 คู่ (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2540) และช่องเล็กๆ ที่เรียกว่ารูหายใจ ในหอยชนิด *Haliotis asinina* จะมีรูบนเปลือกหอย 5 – 7 รู (คเชนทร เฉลิมวัฒน์, 2544) เรียงเป็นแถวยาวไปจนถึงขอบปากรูเล็กๆ รูเหล่านี้จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่อหอยโตขึ้นรูเก่าจะถูกปิดไป ยังเหลือแต่รูใหม่ซึ่งหอยแต่ละชนิดมีรูไม่เท่ากัน

ส่วนอวัยวะภายใน มีเหงือกเป็นคู่อยู่ในแอ่งด้านซ้ายของลำตัว มีหัวใจ 3 ห้อง มีรูเปิดเหล่านี้เป็นอวัยวะรับสัมผัส เพราะมีอวัยวะคล้ายหนวดเล็กๆ ยื่นออกมารับประสาทเข้าถึง ทวารหนัก (anus) และ openings จะเปิดออกตามรูนี้ ทางน้ำจะไหลออกอยู่ทางด้านบนของลำตัว โดยไหลออกทางรูต่างๆ รวมทั้งเซลล์สืบพันธุ์ น้ำที่ไหลออกมาจะพาเอาของเสียที่มาจากทวารหนักและ mephridia ออกจากตัว (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2540) หอยเป๋าฮื้อมีลักษณะการกินอาหารแบบขูดขีด (grazer) ตามบริเวณซอกหิน โดยในธรรมชาติกิน สาหร่ายทะเล รวมทั้งสิ่งมีชีวิตเล็ก ๆ บริเวณพื้นผิวในเวลากลางคืนเป็นส่วนใหญ่

หอยเป๋าฮื้อมีการสืบพันธุ์แบบภายนอกลำตัว (external fertilization) มีเพศแยกกัน (dioecious) มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1 : 1 อวัยวะสืบพันธุ์จะพัฒนาอยู่รอบๆ ต่อมสร้างน้ำย่อย เมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์จะเห็นอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะมีสีขาวครีมชัดเจน ส่วนรังไข่ของเพศเมียจะเป็นสีเขียวมองเห็นไม่ชัดเจนคล้ายอวัยวะภายใน โดยสังเกตได้จากการหงายท้องขึ้นและเปิดกล้ามเนื้อเท้า ตอนล่างของเปลือกออกจะเห็นอวัยวะสืบพันธุ์ สำหรับหอยเป๋าฮื้อชนิด *Haliotis asinina* เพศเมียสามารถสืบพันธุ์โดยมีขนาดความยาว 4.4 เซนติเมตร จะมีช่วงการวางไข่สูงในเดือนตุลาคม ส่วนความถี่ของการวางไข่ของหอยจะอยู่ในช่วงเดือนกันยายนถึงมีนาคม ส่วนพ่อพันธุ์จะสร้างสเปิร์มได้ทั้งปี (บุญรัตน์ ประทุมชาติ, 2540)

2. น้ำเชื้อและสเปิร์มของสัตว์น้ำ

โดยทั่วไปน้ำเชื้อ (semen) ของสัตว์น้ำประกอบด้วย เซลล์สเปิร์ม (spermatozoa) และน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal fluid) เหมือนที่พบในสัตว์ทั่วไป โดยน้ำเชื้อถูกสร้างขึ้นมาและเก็บไว้ในอัณฑะ (testis) และปล่อยออกนอกร่างกายเมื่อมีการผสมพันธุ์วางไข่ ในระหว่างเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์หอยเป๋าฮื้อเพศผู้ มีอัณฑะสีขาว ซึ่งมีน้ำเชื้อจำนวนมากอยู่ภายใน แต่หอยเป๋าฮื้อเพศเมีย 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 ทำหน้าที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มใน ระหว่างการเคลื่อนที่ และ 3.) ส่วนหาง (tail) เป็นส่วนที่มีลักษณะยาว ใช้ในการเคลื่อนที่ระหว่างการปฏิสนธิ (วีรพงศ์, 2536)

น้ำเชื้อหอยทะเลขณะที่ยังอยู่ในตัวหอย สเปิร์มที่อยู่ในน้ำเชื้อจะไม่เคลื่อนที่ (immotile) แต่เมื่อหอยเพศผู้ปล่อยน้ำเชื้อออกมาขณะผสมพันธุ์วางไข่ สเปิร์มจะเคลื่อนที่ทันทีเพื่อปฏิสนธิกับไข่ ดังนั้นเซลล์สเปิร์มของหอยจะไม่เคลื่อนที่เมื่อยังอยู่ในตัว หอยหรือเมื่อรีดน้ำเชื้อสดออกมาใหม่ๆ แต่สเปิร์มหอยจะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว เมื่อน้ำเชื้อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่เหมาะสม เช่นน้ำเชื้อหอยผสมกับน้ำทะเลภายนอกขณะที่พ่อแม่พันธุ์ หอยผสมพันธุ์วางไข่ตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำเอาน้ำเชื้อหอยมาผสมกับสารละลายที่เหมาะสม บนแผ่นกระจกสไลด์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะ ทำให้เซลล์สเปิร์มถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วเช่นกัน อันเป็นผลมาจากค่าแรงดันออสโมติกของน้ำเชื้อ (osmotic pressure) ที่เปลี่ยนไป การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยทะเลเมื่อถูกกระตุ้น สามารถเคลื่อนที่ไกเนานหลายนาที 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 ดังนั้นการที่จะเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียสได้นาน จึงควรเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าแรงดันออสโมติกเท่ากับระดับที่พบใน seminal fluid เพราะจะช่วยป้องกันมิให้สเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ได้ เนื่องจากเมื่อสเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่ ก็จะมีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วมาก และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาที่รวดเร็ว ซึ่งหลักการควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในปลาเช่นนี้น่าจะมีหลักการเดียวกัมที่พบในสัตว์น้ำจำพวกหอยเช่นกัน

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม นิยมใช้ในการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อสัตว์น้ำจำพวกปลาและหอย 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 ซึ่งน้ำยาชนิดนั้นจะต้อง

ไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวสเปิร์ม เพราะถ้าสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่แล้วแม้ว่าจะเก็บรักษาแช่เย็นดีเพียงใดก็ตาม ก็ไม่สามารถกระตุ้นให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ขึ้นมาได้อีกเพื่อผสมกับไข่ในภายหลัง การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มของน้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็งสามารถใช้หลักการประเมินเช่นเดียวกับที่ใช้ในน้ำเชื้อสด เพียงแต่ใช้สารละลายที่เหมาะสม กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ในอัตราการเจือจางที่เหมาะสม (Vuthiphandchai et al., 2009)

3. การเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ

การเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ ส่วนใหญ่นิยมใช้พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงขุนภายในฟาร์มมาเพาะพันธุ์ (domestication of broodstock) เพราะพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติ หาได้ยากมาก และปรับตัวเข้ากับโรงเพาะฟักได้ยาก ทำให้ฟาร์มเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อต้องบริหารจัดการหาพ่อแม่พันธุ์ทดแทนในช่วงเวลาที่เหมาะสม ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ ทำโดยนำพ่อแม่พันธุ์หอยมาใส่ในในบ่อขนาด 10 - 15 ลูกบาศก์เมตร ให้น้ำทะเลที่สะอาด ให้อากาศ ให้สาหร่ายวุ้น สาหร่ายผมนาง หรืออาหารเม็ดเป็นอาหาร พ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในการเพาะพันธุ์ต้องมีความสมบูรณ์เพศ เปลือกไม่ผุกร่อน ไม่มีบาดแผลตามตัว โดยแต่ละตัวควรมีน้ำหนักระหว่าง 80 - 150 กรัม อัณฑะควรมีสีครีม ส่วนเพศเมียจะรังไข่สีเขียวเข้ม ปล่อยเพศผู้ต่อเพศเมียในอัตราส่วน 1 ต่อ 4 ลงไปในบ่อเพาะพันธุ์ โดยให้สภาพแวดล้อมในบ่อให้มีช่วงมืดและช่วงสว่างช่วงละ 12 ชั่วโมง ในระหว่างการเพาะพันธุ์ควรเปิดให้น้ำทะเลที่สะอาดหมุนเวียนตลอดเวลา เนื่องจากหอยเป๋าฮื้อผสมพันธุ์วางไข่ตอนกลางคืน ซึ่งถ้าน้ำทะเลไม่ไหลเวียนจะมีโอกาสที่ไข่ได้รับการปฏิสนธิด้วยสเปิร์มมากกว่า 1 ตัว เรียกว่า โพลีสเปิร์มมี (polyspermy) ซึ่งทำให้ไข่หอยไม่สมบูรณ์แล้วตายไป การเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ หลังจากทำการขุนพ่อแม่พันธุ์หอยช่วงหนึ่ง หอยจะเริ่มปล่อยไข่และน้ำเชื้อหลังจากขุนในระยะเวลาประมาณ 4 - 7 วัน โดยพ่อแม่พันธุ์หอยเป๋าฮื้อที่ใช้เพาะพันธุ์ควร อยู่แยกกันคนละบ่อ ตามที่กล่าวมาแล้ว เมื่อพบว่าหอย เพศเมีย ปล่อยไข่ออกมา จะสังเกตเห็นเป็นเม็ดไข่สีเขียวขนาดเล็กที่พื้นบ่อ ส่วนบ่อที่มีหอยเพศผู้จะพบว่าน้ำในถังจะเป็นสีขาวขุ่น ซึ่งเป็นน้ำเชื้อที่ปล่อยออกมา

การผสมเทียม เริ่มจากทำการสุ่มดูลักษณะของไข่ ซึ่งไข่หอยที่ดีต้องมีลักษณะกลม มีขนาดประมาณ 180 - 190 ไมครอน ทำการประเมิน น้ำเชื้อว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ ดีหรือไม่ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งประเมินความหนาแน่นสเปิร์ม แล้วนำสเปิร์มมาผสมกับไข่ ในระหว่างการผสมเทียม น้ำเชื้อหอยที่นำมาใช้ผสมกับไข่ควรมีความหนาแน่นไม่เกิน 500,000 เซลล์/มล. ของปริมาตรน้ำในถังไข่ โดยเทน้ำเชื้อผสมกับไข่ แล้วปล่อยไว้ประมาณ 10 นาทีเพื่อให้ไข่ผสมกับน้ำเชื้อ หลังจากนั้นใช้สายยางทำการรวบรวมไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วลงในภาชนะรวบรวมไข่ ด้วยการใช้ใช้ผ้ากรองทำการสุ่มนับจำนวนไข่ที่ได้ เพื่อที่จะคำนวณความหนาแน่นในการอนุบาลลูกหอยหลังฟักออกมาเป็นตัวในถังต่อไป

4. การแช่เย็น และการแช่แข็งน้ำเชื้อหอย

การที่จะประสบผลสำเร็จในการเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อจากพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงขุนขึ้นมาเองจำเป็นต้องพัฒนาศักยภาพในการแช่เย็น และแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อให้มีประสิทธิภาพที่จะครอบคลุมช่วงเวลาที่แม่พันธุ์พร้อม หรือมีไข่ เพราะจะสามารถควบคุมการผลิตเชิงพาณิชย์ได้ตามที่ต้องการ

ความสำเร็จของการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแบบแช่เย็นขึ้นอยู่กับการควบคุมไม่ให้สเปิร์มที่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ขณะเก็บรักษา เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีโดยทั่วไปว่าน้ำเชื้อของหอยทะเลเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล จะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วและหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาต่อมา ดังนั้นการเลือกใช้สารละลายบัฟเฟอร์ต้องมีความเหมาะสม เพราะอาจมีผลกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ได้ ซึ่งนั่นหมายถึงความล้มเหลวในการเก็บรักษาน้ำเชื้อของหอย เพราะ สเปิร์มไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ เนื่องจากสเปิร์มได้หยุดเคลื่อนที่ไปก่อนหน้านี้ นอกจากนี้ปัจจัยชนิดต่างๆที่มีผลต่อการเคลื่อนที่ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อก็จะต้องศึกษาให้ทราบแน่ชัดว่ามีปัจจัยอะไรเฉพาะบ้างหรือไม่ที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ เพื่อให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยให้คงคุณภาพนานที่สุดขณะเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส กรอบแนวความคิดของการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อจึงได้มุ่งศึกษาเกี่ยวกับการเลือกสารละลายบัฟเฟอร์ใช้ที่เหมาะสม การใส่ออกซิเจนสมทบและยาปฏิชีวนะในการเก็บรักษา

การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแบบแช่แข็งมีหลักการแช่แข็งน้ำเชื้อที่คล้ายกันกับการแช่แข็งน้ำเชื้อของปลา หรือน้ำเชื้อสัตว์บก แต่ความสำเร็จที่ได้จากการแช่แข็ง น้ำเชื้อส่วนมากแล้วมีความแตกต่างกันไปในสัตว์น้ำแต่ละชนิดทั้งในแง่ของชนิดและความเข้มข้นของไครโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) ที่ใช้ อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง (freezing rate) และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (thawing rate) ดังนั้นการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อจึงต้องเริ่มจากการนำเอาสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมสำหรับหอยซึ่งต้องไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่มาเจือจางน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ แล้วจึงนำไปผสมด้วยไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ ที่เวลาต่างๆกันเพื่อดูความเป็นพิษของไครโอโพรเทคแทนท์ที่อาจมีต่อสเปิร์ม จากนั้นจึงใช้อัตราการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และ อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อละลายน้ำเชื้อที่แตกต่างกันโดยมีสมมติฐานว่าความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อขึ้นอยู่กับการเลือกใช้ชนิดและระดับของไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม รวมทั้ง การลดหรือเพิ่มอุณหภูมิอย่างเหมาะสม

การพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็น หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ เป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้เกษตรกร หรือผู้ประกอบการนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตเชิงพาณิชย์ได้ทันที การแช่เย็น หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อให้ประสบผลสำเร็จต้องทราบข้อมูลพื้นฐานของสเปิร์มว่าสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อจะเคลื่อนที่ หรือหยุดเคลื่อนที่นั้นเกิดจากปัจจัยอะไร และทำไมจึงเป็นเช่นนั้น ข้อมูลพื้นฐานที่ได้นี้สามารถนำมาประยุกต์ใช้ได้ทั้งการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยที่ต้องทำให้สเปิร์มหอยอยู่นิ่งๆตลอดการเก็บแช่เย็นที่อุณภูมิ 2-4 องศาเซลเซียสเพื่อต้องการกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่เมื่อต้องการผสมกับไข่เท่านั้น และยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการแช่แข็งน้ำเชื้อที่ต้องการหยุดกิจกรรมต่างๆของเซลล์สเปิร์มไว้ที่ -196 องศาเซลเซียสขณะเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลว การแช่เย็นน้ำเชื้อใช้เทคโนโลยีที่มีราคาถูกแต่ต้อง optimize สภาพต่างๆให้สเปิร์มหอยไม่เคลื่อนที่ขณะเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดที่เหมาะสม ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยในระยะแรกจำเป็นต้องใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ เพราะสามารถควบคุมการลดอุณหภูมิให้คงที่ และเที่ยงตรง แต่ด้วยเหตุที่เครื่องมือชนิดนี้ที่มีราคาแพงหลายแสนบาท หรือเกือบหนึ่งล้านบาทขึ้นอยู่กับบริษัทผู้ผลิต ดังนั้นแม้ว่าสามารถพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อได้ แต่ผู้ที่จะนำเอาเทคโนโลยีไปใช้ก็คงเป็นผู้ประกอบการรายใหญ่เท่านั้นที่มีเงินลงทุนสูง ดังนั้นการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อในขั้นสุดท้ายจำเป็นต้องพัฒนาเทคโนโลยีให้มีราคาถูกลงเป็นสิ่งจำเป็นแก่ผู้ประกอบการขนาดเล็ก หรือขนาดกลาง ที่สามารถนำเอาเทคโนโลยีไปใช้ได้ทันที โดยผู้ประกอบการฟาร์มเพาะเลี้ยงหอย

เป๋าฮื้อเชิงพาณิชย์ไม่จำเป็นต้องลงทุนอะไรที่แพงเลย ซึ่งแนวทางหนึ่งที่ทำได้ คือต้องแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อในภาชนะที่มีราคาถูก เช่น ถังโฟม ฯลฯ เป็นต้นโดยนำข้อมูลอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ได้จากการใช้เครื่องมือแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติมาปรับใช้กับการแช่แข็งในถังโฟม แนวทางดังกล่าวจะต้องวางตัวอย่างน้ำเชื้อหอยที่ต้องการแช่แข็งไว้เหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในความสูงที่เหมาะสม (บริเวณไอไนโตรเจนเหลว) ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อในขั้นสุดท้ายจะสามารถทำให้มีราคาถูกได้ และสามารถประยุกต์ใช้ได้ทันที ทำให้สามารถส่งเสริมให้การเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อสามารถควบคุมผลผลิตได้ตามที่ต้องการด้วยการใช้เทคโนโลยีที่มีราคาถูก

การนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้ประโยชน์ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ทำได้โดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาผสมเทียมกับไข่ ช่วยทำให้การเพาะฟักผสมเทียมที่มีประสิทธิภาพสูงไม่ต่างจากน้ำเชื้อสด ถ้าบริหารจัดการอย่างถูกต้อง ดังนั้นตลอดเวลาที่ผ่านมาประมาณ 30 กว่าปี จึงมีผู้ศึกษาทดลองพัฒนาวิธีการเก็บน้ำเชื้อสัตว์น้ำหลายๆชนิดให้มีประสิทธิภาพมากที่สุด แม้ว่างานวิจัยส่วนมากได้ศึกษาในสัตว์น้ำจืดโดยมีการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อในสัตว์ทะเลไม่มากนัก

Paniagua-Chavez et al. (1998) ได้รายงานว่าการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อหอยนางรมที่เก็บแช่เย็น เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้คุณภาพน้ำเชื้อหอยลดลงอย่างรวดเร็วขณะเก็บรักษา ซึ่งสามารถทำนายคุณภาพน้ำเชื้อแช่เย็นขณะเก็บรักษาว่าสามารถเก็บได้นานเพียงไรก็ทำนายได้จากปริมาณแบคทีเรียที่มีในน้ำเชื้อ ซึ่งการแก้ไขปัญหาการปนเปื้อนแบคทีเรียในน้ำเชื้อนิยมทำโดยใช้ยาปฏิชีวนะ 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 และถ้านำ 0.05 M Methanol ผสมกับ 0.25 M sucrose นำไปแช่แข็งพบว่า ส่วนใหญ่ (46.9 ± 0.4%) สามารถทำให้ลูกหอยมีชีวิตรอดในช่วงการลดอุณหภูมิ ถึง - 6 องศาเซลเซียส ภายในระยะเวลา 15 นาที ถ้านำ 0.05 หรือ 1.00 M Methanol ผสมกับ 0.25 M sucrose ส่วนน้อยตัวอ่อนของลูกหอยจะมีชีวิตรอดในช่วงที่ลดอุณหภูมิในช่วง –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 ซึ่งเจือจางลงในน้ำทะเลที่ความเค็ม 25 ppt ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และปรับความหนาแน่นให้อยู่ประมาณ 1500 ml จากนั้นดูดลูกหอยที่ผสมสารละลายปริมาณ 0.5 ml ใส่ในหลอด จากนั้นนำไปลดอุณหภูมิ ให้ได้อุณหภูมิสุดท้าย -1 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) ศึกษาถึงการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งของหอยเป๋าฮื้อเล็ก (*Haliotis diversicolor supertexta*) การทดสอบความเป็นพิษของสเปิร์มโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 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 สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยที่สุดคือ 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 สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ดีที่สุด หลังจากการละลาย การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัดเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

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

Poncet (2003) ทำการทดลองผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์อัตราการลดอุณหภูมิ และการละลายของ hemocytes ที่มีผลต่อหอยเป๋าฮื้อ *(Haliotis tuberculata)* โดยเอา hemocytes จาก sltandardized cell stock ใช้ 10% glycerol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ อัตราการลดอุณหภูมิ 1 องศาเซลเซียส/นาที และอัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (3 หรือ 9 องศาเซลเซียส/นาที) แล้วเลี้ยงไว้ 2 วัน พบว่าเซลล์มีอัตราการรอด 96% และนำไปวัด DNA และโปรตีน ให้ค่า 83% และ 78% ตามลำดับ และอัตราเมตาบอลิซึมสูง แต่หลังจากเลี้ยงไว้เว้น 6 วันปรากฏว่าเซลล์เปาะบางและได้รับอันตราย ฉะนั้นจะต้องมีการทดลองหาสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม วิธีการแช่แข็งที่เหมาะสม การละลาย hemocytes ซึ่งจะส่งผลต่อการรอดชีวิตของหอย

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

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

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

บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

บีกเกอร์ขนาดต่างๆ

ขวดรูปชมพู่ขนาด 125 250 และ 500 มิลลิลิตร

ไมโครปิเปตขนาดต่างๆ

กระดาษกรอง

เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง

เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)

เครื่องแช่แข็งน้ำเชื้ออัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)

กล้องจุลทรรศน์

Hemacytometer

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

พ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ

สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการ แช่เย็น การแช่แข็ง และการย้อมสี

วิธีดำเนินการทดลอง

1. <u>การรวบรวมน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ</u>

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

หอยเป๋าฮื้อถูกนำมาทำความสะอาดเปลือกก่อนทำการเก็บรวบรวมน้ำเชื้อ โดยทำการคัดพ่อพันธุ์ที่แข็งแรง เปิดเปลือกบางส่วนเพื่อดูตำแหน่งของอัณฑะ (testis) (รูปที่ 4 และ 5) การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อหอย ทำโดยการเปิดเปลือกแล้วใช้เข็มเขี่ยแทงตรงบริเวณ gonad ซึ่งมีสีครีมขาว ระวังไม่ให้กระเพาะอาหาร (stomach) แตก จากนั้นเก็บน้ำเชื้อที่รวบรวมได้ใส่ไว้ในจานแก้ว เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป เอาน้ำเชื้อแตะบนสไลด์ 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 เปอร์เซ็นต์ไม่ได้นำมาใช้ในการทดลอง เพื่อให้มั่นใจว่าขณะทำการทดลองน้ำเชื้อหอยมีคุณภาพที่ดีพอ หอยตัวผู้ที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ผ่านหลักเกณฑ์ที่วางไว้ ได้ถูกรวบรวมน้ำเชื้อเพื่อนำไปศึกษาต่อ โดยการใช้หลอด syringe ขนาด 1 มิลลิลิตร รวบรวมน้ำเชื้อไปใส่ใน eppendorf tube ต่อไป แล้วจึงเก็บไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพสเปิร์มไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลง น้ำเชื้อที่ได้เหล่านี้ถูกเก็บไว้บนน้ำแข็งไม่เกิน 1 ชั่วโมง ในระหว่างขั้นตอนการแช่เย็น หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อ

2. <u>การประเมินคุณภาพสเปิร์มในน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ</u>

การประเมินคุณภาพหอยเป๋าฮื้อ 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

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดที่ถูกเจือจางด้วยสารไครโอโพรเทคแทนท์ (extended semen) ทำการประเมินการเคลื่อนที่โดยดูดสารละลายเหล่านั้นออกมา 10 ไมโครลิตร แล้วกระตุ้นด้วยน้ำทะเลปริมาตร 90 ไมโครลิตร สำหรับการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการ

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

3. <u>การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อในสภาพต่างๆ</u>

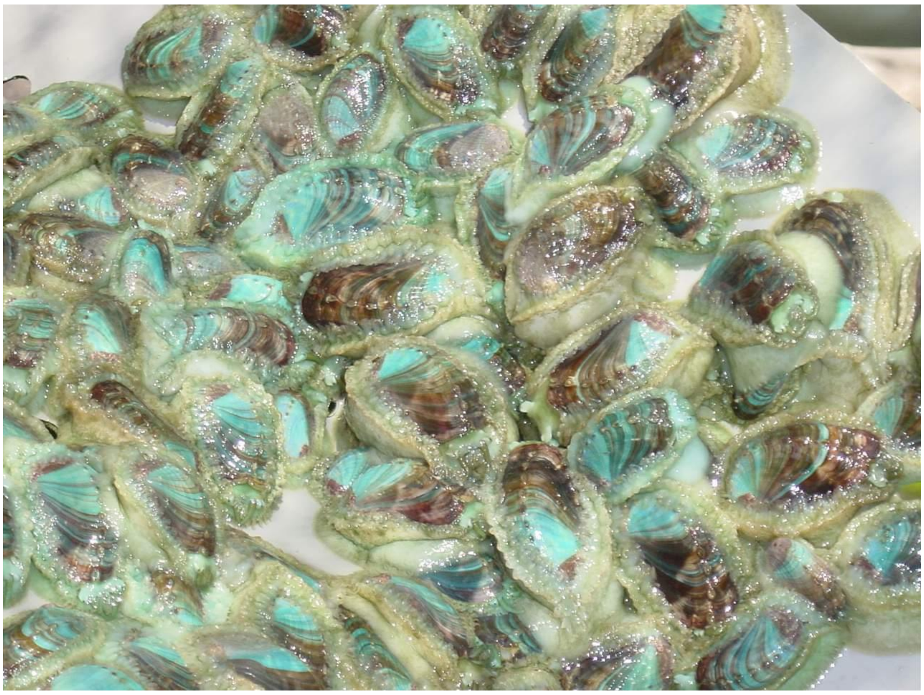
น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อได้นำมาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มใน 2 ลักษณะได้แก่ สภาพสดไม่เจือจางในสารละลาย (fresh and undiluted milt) และ สภาพสดที่เจือจางในน้ำทะเล (diluted milt) โดยน้ำเชื้อทั้ง 2 ลักษณะนี้เก็บไว้ใน หลอดทดลองแล้วนำไป เก็บรักษาใน ถังน้ำแข็ง (0-4 องศาเซลเซียส) จากนั้นนำน้ำเชื้อเหล่านี้มาประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทุกๆ 2 ชั่วโมง จนถึงเวลา 18 ชั่วโมงหลังการเก็บรักษา การทดลองทั้งหมดทำ 3 ซ้ำเพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานที่จำเป็นของคุณภาพน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ

4. <u>การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแบบแช่เย็น</u>

4.1 <u>การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์</u>

การทดลองมี 6 ชุดการทดลองเพื่อศึกษาถึงผลของลักษณะของภาชนะ และการให้ออกซิเจนที่มีต่อระยะเวลาการเก็บน้ำเชื้อแช่เย็น โดยน้ำเชื้อ หอยเป๋าฮื้อ ถูกเก็บรักษาไว้ในภาชนะต่างๆกัน 3 ชนิดได้แก่ culture flask ขนาด 25 มิลลิลิตร Beaker ขนาด 50 มิลลิลิตร และถุงพลาสติก ziplock ขนาด 200 มิลลิลิตร ทั้งในสภาพไม่ให้ออกซิเจนและให้ออกซิเจนสมทบ ในกรณีที่ไม่ให้ออกซิเจนสมทบนั้น น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อสัมผัสอากาศโดยตรง แต่การให้ออกซิเจนสมทบนั้น ทำการอัดออกซิเจนสมทบเข้าไป โดยทำการอัดออกซิเจนบริสุทธิ์ทันทีที่เสร็จสิ้นการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

น้ำเชื้อถูกรวบรวมจาก พ่อพันธุ์หลายตัว (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 หอยเป๋าฮื้อที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ 2 ลักษณะพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อที่ใช้ในการทดลอง

รูปที่ 3 การเลี้ยงพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ

รูปที่ 4 ตำแหน่งของอัณฑะในพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ

รูปที่ 5 ลักษณะอัณฑะพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อที่นำออกมาจากตัวหอย

รูปที่ 6 การรวบรวมน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ

4.2 <u>การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์</u>

4.2.1 การศึกษาผลของ osmotic pressure ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายต่างชนิดกันซึ่ง ถูกเตรียมให้มีค่าความดันออสโมติก (osmolality) ต่างกันเพื่อทดสอบผลของ osmotic pressure ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเพื่อทราบถึงช่วง osmotic pressure ที่เหมาะสมที่จะใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ต่อไป สารละลาย NaCl, KCl, glucose และ mannitol ได้ถูกเตรียมขึ้นให้มีค่า osmolality ตั้งแต่ 25 จนถึง 1600 mOsm/kg โดยมีค่าเพิ่มขึ้น เป็นช่วงๆด้วย deionized water เพื่อนำไปกระตุ้นน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อว่ามีการเคลื่อนที่มากน้อยอย่างไร 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 ที่ทำให้สเปิร์มหอยเป๋าฮื้อมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด (complete activation point) และไม่เคลื่อนที่ (immotile) น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อถูกนำมาทดลองในช่วงต้นฤดู กลางฤดู และปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยทดลอง 6 ซ้ำ/ชุดการทดลอง

4.2.2 การศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ

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

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

5. <u>การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแบบแช่แข็ง</u>

5.1 <u>ศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ</u>

ในขั้นตอนนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อต้องการทราบความเข้มข้นของไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสมก่อนที่นำไปใช้ในขั้นตอนกา รแช่แข็งน้ำเชื้อ การทดลองเริ่มจากการนำน้ำเชื้อของหอยเป๋าฮื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ artificial seawater (ASW) โดยใช้น้ำเชื้อ หอยเป๋าฮื้อจากพ่อพันธุ์หลายตัว (pooled semen) เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ ASW ในอัตราส่วน 1:1 โดยปริมาตรภายใน tissue culture flask ขนาด 25 มิลลิลิตรที่ อุณหภูมิห้อง ในขณะเดียวกันไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆ (dimethyl sulfoxide; DMSO, propylene glycol, acetamide, methanol, ethanol และ ethylene glycol) ได้ถูกเตรียมขึ้นมา และนำมาผสมเข้ากับน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง เพื่อให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายของไครโอโพรเทคแทนท์เป็น 5%, 10%, 15% และ 20% ตามลำดับ การเช็คเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ ในการทดลองนี้ทำในระยะเวลาต่างๆ กัน ตั้งแต่ 15 , 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 และ 240 วินาที หลังจากใส่ไครโอโพรเทคแทนท์ลงไปในน้ำเชื้อที่เจือจางโดยใช้น้ำทะเลที่ผ่านการฆ่าเชื้อมากระตุ้นการเคลื่อนที่ เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

การทดลองในขั้นนี้ทำให้ทราบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระยะเวลาต่างๆ กันก่อนที่จะทำการแช่แข็ง การทดลองได้ทำ 6 ซ้ำที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) โดยใช้ pooled semenในช่วงเวลาต่างๆกัน

5.2 <u>การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ</u>

การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ เริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อที่รวบรวมจากพ่อพันธุ์หลายตัวมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ ASW ในอัตราส่วน 1:1 แล้วจึงผสม DMSO ในระดับความเข้มข้นต่างๆกัน (5, 10, 15 และ 20%) แล้วปล่อยไว้ 10 นาทีเพื่อให้เกิดสภาพสมดุลของสารละลาย (equilibrium) ก่อนที่น้ำเชื้อจะถูกแช่แข็ง น้ำเชื้อที่ถูกเจือจางรวบรวมใส่ในหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ปิดปลายหลอดให้แน่น (รูปที่ 7) การแช่แข็งน้ำเชื้อทำโดยนำหลอดฟางเหล่านี้มาใส่ในเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (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/นาทีไปจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย (final temperature) -40 องศาเซลเซียส พักไว้ 5 นาที แล้วนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (รูปที่ 8) ส่วนน้ำเชื้อที่แช่แข็งมาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว โดยทำการทดลอง 6 ซ้ำ น้ำเชื้อที่ถูกแช่แข็ง ทั้งหมดถูกนำมาละลายใน water bath ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย (post-thawed sperm motility) ตามวิธีที่กล่าวมาแล้ว

6. <u>การวิเคราะห์ทางสถิติ</u>

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

รูปที่ 7 การบรรจุน้ำเชื้อพ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อใส่ในหลอดฟาง

รูปที่ 8 การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแช่แข็งไว้ในถังไนโตรเจนเหลว

บทที่ 4
ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 5 ตอน คือ

1. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อในสภาพต่างๆ
2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์
3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์
4. ผลของความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ
5. การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ

1. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อในสภาพต่างๆ

การประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ พบว่าพ่อพันธุ์หอยที่ใช้ทดลองมีลักษณะสมบูรณ์เพศ มี gonad สีขาวขุ่น มีเปลือกที่มีลักษณะ สมบูรณ์ เปลือกสีเขียวเข้ม ความกว้างของเปลือกประมาณ 3.5 เซนติเมตรขึ้นไป น้ำหนักเฉลี่ยของหอยเป๋าฮื้อ (N=78) เท่ากับ 7.92 กรัม มีความหนาแน่นของสเปิร์ม (N = 25) เฉลี่ยเท่ากับ 3.18×10^{12} ตัวต่อมิลลิลิตร

น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ ที่รวบรวม ออกมาแล้ว เก็บรักษาในสภาพสด และ ในสภาพเจือจางในน้ำทะเล ตรวจสอบดูการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า น้ำเชื้อสดที่เก็บไว้ในถังน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 0- 4 องศาเซลเซียส มีระยะเวลาในการเก็บ รักษาไว้ได้ประมาณ 1 8 ชั่วโมง ก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเล แต่น้ำเชื้อสดที่เก็บแช่เย็นนานกว่า 6 ชั่วโมง มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 50% ในขณะที่ น้ำเชื้อสดที่เจือจางในน้ำทะเล สามารถ เก็บรักษาได้ เพียงประมาณ 8 ชั่วโมง เท่านั้น เพราะสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ (ตารางที่ 1)

2. การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

การเก็บรักษาน้ำเชื้อ หอยเป๋าฮื้อ ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียสได้ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2 และ 3 ซึ่งการเก็บรักษาโดยไม่ให้ออกซิเจนสมทบ พบว่าการ ใช้ถุงพลาสติก ziplock สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด 36 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำ ทะเล ในขณะที่น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่เก็บรักษาใน culture flask และ beaker สามารถเก็บรักษาได้เพียง 12 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 2) สำหรับการเก็บแช่เย็น โดยให้ออกซิเจนสมทบปรากฏว่า การให้ออกซิเจนสมทบช่วยให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อได้นานขึ้น โดย การใช้ culture flask และถุงพลาสติก ziplock สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 48 ชั่วโมงก่อนที่สเปิร์มจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อกระตุ้นด้วยน้ำทะเล แต่น้ำเชื้อที่เก็บรักษาใน beaker สามารถเก็บรักษาได้นานเพียง 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อในสภาพต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	Sperm Motility (%)	
	สเปิร์มสด	สเปิร์มสด + น้ำทะเล
0	93.3 ± 6.7 [a]	93.3 ± 6.7 [a]
2	73.3 ± 6.7 [b]	80 ± 0 [b]
4	66.7 ± 6.7 [bc]	40 ± 0 [c]
6	46.7 ± 6.7 [d]	16.7 ± 3.3 [d]
8	33.3 ± 6.7 [e]	0
10	26.7 ± 6.7 [e]	0
12	20 ± 0 [e]	0
14	13.3 ± 3.3 [f]	0
16	8.3 ± 6.7 [f]	0
18	0	0

หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันบนแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อที่เก็บแช่เย็นโดยไม่ให้ออกซิเจนสมทบ

ชั่วโมง	ภาชนะที่บรรจุ (ไม่ให้ออกซิเจนสมทบ)		
	Culture flask	Beaker	Plastic ziplock
0	93.3 ± 6.7^{a}	91.5 ± 3.9^{a}	93.3 ± 6.7^{a}
6	76.9 ± 3.3^{b}	46.3 ± 4.5^{b}	86.5 ± 3.3^{a}
12	26.7 ± 2.9^{c}	16.7 ± 3.8^{c}	56.7 ± 2.9^{b}
24	-	-	43.9 ± 5.7^{c}
36	-	-	23.3 ± 4.5^{d}
48	-	-	-
60	-	-	-
72	-	-	-

หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อที่เก็บแช่เย็นโดยให้ออกซิเจนสมทบ

ชั่วโมง	ภาชนะที่บรรจุ (ไม่ให้ออกซิเจนสมทบ)		
	Culture flask	Beaker	Plastic ziplock
0	93.3 ± 2.9^{a}	89.7 ± 3.8^{a}	91.5 ± 4.5^{a}
6	76.7 ± 5.9^{b}	72.4 ± 4.8^{b}	82.2 ± 5.8^{a}
12	52.5 ± 3.5^{c}	32.3 ± 3.5^{c}	66.7 ± 3.8^{b}
24	38.4 ± 5.9^{d}	13.7 ± 4.6^{d}	56.4 ± 4.3^{c}
36	26.9 ± 2.9^{e}	-	38.5 ± 3.9^{d}
48	8.7 ± 2.2^{f}	-	21.7 ± 5.1^{e}
60	-	-	-
72	-	-	-

หมายเหตุ: ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง มีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

3.1 การศึกษาผลของ osmotic pressure ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

สเปิร์มหอยเป๋าฮื้อเมื่อกระตุ้นด้วย NaCl และ KCl ที่มีค่าความดันออสโมติกต่ำ ไม่มีการเคลื่อนที่ แต่สเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่เมื่อ ถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่า แรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้น 200 mM (KCl) และ 300 mM (NaCl) และยังคงเคลื่อนที่ประมาณ 80-100% เมื่อถูกกระตุ้นด้วยค่าแรงดันออสโมติกที่สูงขึ้นระหว่าง 700-800 mM (ตารางที่ 4)

จากการทดสอบทางสถิติ พบว่า การใช้ KCl 200 mM และ NaCl 200 mM ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ KCl 300 และ 400 mM และ NaCl 300 และ 400 mM ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ KCl และ NaCl 500, 600, 700, 800 mM ($P < 0.05$) และชนิดของสารละลายทั้งสอง (KCl และ NaCl) ไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อเมื่อกระตุ้นด้วย NaCl และ KCl

Molarity (mM	สาร Electrolyte	
	KCl	NaCl
0	0	0
25	0	0
50	0	0
100	0	0
150	0	0
200	$5.2 \pm 1.4^{a,1}$	0
300	$2.1 \pm 1.1^{a,1}$	$26.7 \pm 3.8^{a,1}$
400	$33.3 \pm 3.8^{a,1}$	$40.3 \pm 1.2^{a,1}$
500	$66.7 \pm 3.8^{a,1}$	$46.7 \pm 3.8^{a,1}$
600	$66.7 \pm 3.8^{a,2}$	$60.3 \pm 1.5^{a,2}$
700	$80.2 \pm 1.2^{a,2}$	$73.3 \pm 3.8^{a,2}$
800	$80.7 \pm 1.8^{a,2}$	$96.3 \pm 1.1^{a,3}$

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)
ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

สเปิร์มหอยเป๋าฮื้อเมื่อกระตุ้นด้วย glucose และ mannitol ที่มีค่าความดันออสโมติกต่ำ ไม่มีการเคลื่อนที่ แต่เริ่มเคลื่อนที่เมือแรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้น 600 mM (glucose) และ 400 mM (manitol) และเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น มากกว่า 80% เมื่อกระตุ้นด้วย glucose และ mannitol ที่มีค่าแรงดันออสโมติกเพิ่มขึ้นเป็น 1600 mM (ตารางที่ 5)

จากการทดสอบทางสถิติพบว่า ระดับแรงดันออสโมติกต่างๆ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) และสารละลายทั้งสอง (glucose และ mannitol) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อเมื่อกระตุ้นด้วย glucose และ mannitol

Molarity (mM	สาร Non-Electrolyte	
	Glucose	Mannitol
0	0	0
50	0	0
100	0	0
200	0	0
300	0	0
400	0	6.7 ± 0.9 [a,1]
600	26.7 ± 3.4 [a,1]	26.7 ± 3.8 [a,1]
800	46.7 ± 3.8 [a,1]	40.5 ± 1.1 [a,1]
1000	66.7 ± 2.9 [a,1]	60.4 ± 1.3 [a,1]
1200	66.7 ± 1.8 [a,1]	66.7 ± 3.8 [a,1]
1400	73.3 ± 3.7 [a,1]	73.3 ± 3.8 [a,1]
1600	86.7 ± 3.4 [a,1]	86.7 ± 3.8 [a,1]

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P > 0.05)
ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P > 0.05)

3.2 <u>การศึกษาชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ</u>

การแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อด้วย artificial seawater, Ringer solution และ calcium free saline (Ca-F saline) พบว่า น้ำเชื้อหอยเป๋าอื้อที่เก็บแช่เย็นใน Ca-F Saline สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุดที่ 30 ชั่วโมง รองลงมาคือ Ringer solution เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 18 ชั่วโมง และน้ำยาสูตร artificial seawater เก็บรักษาน้ำเชื้อได้ 2 ชั่วโมง (ตารางที่ 6)

การศึกษาผลของอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยการเจือจางน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อใน Ca-F saline ที่อัตราส่วน = 1:1, 1:2 และ 1:4 ได้แสดงไว้ในตารางที่ 7 การเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วน 1:1 และ 1:2 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) โดยเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นาน 30 ชั่วโมง แต่น้ำเชื้อที่เจือจางในอัตราส่วน 1:4 เก็บรักษาได้ 18 ชั่วโมง

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดต่างๆ

ชั่วโมง	ชนิดสารละลายบัฟเฟอร์		
	Artificial seawater	Ringer solution	Ca-F saline
0	86.7 ± 4.2^{a}	89.7 ± 2.9^{a}	90.5 ± 3.7^{a}
6	13.3 ± 2.7^{b}	52.3 ± 3.2^{b}	84.5 ± 2.8^{a}
12	0	13.3 ± 3.5^{c}	62.4 ± 3.9^{b}
18	0	6.7 ± 2.9^{d}	43.9 ± 5.7^{c}
24	0	0	23.5 ± 4.5^{d}
30	0	0	13.3 ± 3.8^{e}
36	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อเจือจางใน Ca-F saline ที่อัตราส่วนต่างๆ

ชั่วโมง	อัตราส่วนการเจือจาง		
	1 : 1	1 : 2	1 : 4
0	86.7 ± 3.5^{a}	93.3 ± 6.7^{a}	87.4 ± 2.9^{a}
6	73.7 ± 6.7^{a}	82.3 ± 4.2^{a}	64.6 ± 4.1^{b}
12	53.3 ± 3.7^{b}	43.3 ± 3.5^{b}	22.5 ± 5.9^{c}
18	46.7 ± 6.7^{b}	33.5 ± 4.9^{bc}	11.5 ± 4.7^{d}
24	13.3 ± 3.3^{c}	26.7 ± 4.7^{c}	0
30	6.7 ± 3.3^{c}	6.7 ± 2.9^{d}	0
36	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันในแนวตั้ง แสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

4. การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแบบแช่แข็ง

4.1 ศึกษาความเข้มข้นของ cryoprotectant ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ

จากการทดลองศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 6 ชนิด คือ DMSO, propylene glycol, acetamide, methanol, ethanol และ ethylene glycol ที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยสารไครโอโพรเทคแทนท์แต่ละชนิดทดลองกับน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่ความเข้มข้น 4 ระดับ คือ 5 , 10, 15 และ 20 % ที่อุณหภูมิห้อง และทำการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในระยะเวลาต่าง ๆ กัน คือ 0, 15, 30, 60, 90, 120, 150, 180, 210 และ 240 นาทีหลังการใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ ได้ผลการทดลองดังนี้

4.1.1 การทดสอบความเป็นพิษของสาร dimethylsulfoxide (DMSO) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินผลคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยเป๋าฮื้อ พบว่า สเปิร์ม ของน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 93.3 ± 6.7% แต่เมื่อนำสเปิร์มสดมาผสมเจือจางในสารละลาย DMSO พบว่า ที่ความเข้มข้น 5 % สเปิร์มยังสามารถเคลื่อนที่ได้ โดยมีค่าเฉลี่ยใน 4 ความเข้มข้นเท่ากับ 76.7% และเมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที สเปิร์มที่อยู่ใน 5%% DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 10% ส่วนที่ความเข้มข้น 10 และ 15% สเปิร์ม หยุดการเคลื่อนที่ เมื่อเวลาผ่านไป 150 นาที และ 120 นาทีตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 20 % สเปิร์มสามารถเคลื่อนที่ได้ เมื่อเวลาผ่านไปไม่เกิน 15 นาที เท่านั้น อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มใน DMSO ที่ความเข้มข้น 5 หรือ 10% เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาทียังคงมีค่าเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 73% (ตารางที่ 8)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5 % ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 10 % ($P > 0.05$) แต่ สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 10 % มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารละลาย DMSO 15 % และ 20% ($P < 0.05$)

ระยะเวลากับความเข้มข้นของสารละลาย DMSO มีผลร่วมกันทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เนื่องจากระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นของส่งผลให้สาร DMSO ที่ทุกความเข้มข้นทำให้เกิดความเป็นพิษภายในเซลล์ โดยทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลง

4.1.2 การทดสอบความเป็นพิษของสาร Propylene glycol (PG) ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยเป๋าฮื้อก่อนเริ่มทำการทดลอง พบว่า สเปิร์ม ของน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูง มี ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 93.3 ± 6.7 % เมื่อนำ น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อมาผสมในสารละลาย propylene glycol พบว่าที่ความเข้มข้น 5 % สเปิร์มมีความสามารถในการเคลื่อนที่ได้ตลอดระยะเวลาทดสอบ สเปิร์มที่อยู่ใน 10 % PG สามารถเคลื่อนที่อยู่ได้เมื่อเวลาผ่านไปไม่เกิน 90 นาที เท่านั้น และที่ความเข้มข้น 15% PG สเปิร์มสามารถเคลื่อนที่อยู่ได้เมื่อเวลาผ่านไปไม่เกิน 15 นาที เท่านั้น ในขณะ ที่ความเข้มข้น 20% เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 9)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย propylene glycol ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 % ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P > 0.05) และ ความเข้มข้นกับระยะเวลา มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.1.3 การทดสอบความเป็นพิษของสาร Acetamide ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของหอยเป๋าฮื้อก่อนเริ่มทำการทดลอง พบว่า สเปิร์ม ของน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เท่ากับ 86.7 ± 6.7 % เมื่อนำ น้ำเชื้อสดผสมในสารละลาย Acetamide พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลาย Acetamide ที่ความเข้มข้น 5% สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ได้ไม่เกิน 5% เมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที ส่วนที่ความเข้มข้น 10 % สเปิร์ มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 120 นาที ส่วนที่ความเข้มข้น 15 % สเปิร์มสามารถเคลื่อนที่อยู่ได้ 15 นาที ก่อนจะหยุดเคลื่อนที่ ส่วนที่ความเข้มข้น 20 % เมื่อนำสเปิร์มสดมาผสมในสารละลาย Acetamide สเปิร์ม มีการเคลื่อนที่ลดลงทันที เหลือเพียงประมาณ 10% และสเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่เมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที (ตารางที่ 10)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย Acetamide ทุก ๆ ความเข้มข้นไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P > 0.05) และเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อเป๋าฮื้อ กับความเข้มข้นของสารละลาย Acetamide มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05)

4.1.4 การทดสอบความเป็นพิษของสาร Methanol ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยเป๋าฮื้อก่อนเริ่มทำการทดลอง พบว่า น้ำเชื้อ สดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 93.33 ± 6.67 % เมื่อนำสเปิร์มมาผสมกับสารละลาย Methanol พบว่า ที่ความเข้มข้น 5 และ 10% เมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที สเปิร์มยังสามารถเคลื่อนที่ได้ มีค่าสูงระหว่าง 33.3-56.3% แต่ในขณะที่ความเข้มข้นที่ 15 และ 20 % เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ลดต่ำลงเหลืออยู่ระหว่าง 5-16.7% และสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่หลังจากเวลาผ่านไป 60 นาที อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มใน methanol ความเข้มข้น 5 หรือ 10% เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาทียังคงมีค่าเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 73% (ตารางที่ 11)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า สารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้น 5% ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 10 % (P > 0.05) แต่ความเข้มข้น 10 % มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้น 15% และ 20% (P < 0.05) ระยะเวลากับความเข้มข้นมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P < 0.05) แต่ที่ความเข้มข้น 5 % และ 10% ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P > 0.05)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	76.7± 3.3^{a,1}	76.7 ± 3.3^{a,1}	76.7 ± 3.3^{a,1}	76.7 ± 2.9^{a,1}
15	76.7 ± 3.3^{a,1}	76.7 ± 3.3^{a,1}	60 ± 0^{ab,1}	20 ± 0^{b,2}
30	76.7 ± 3.3^{a,1}	73.3 ± 6.7^{ab,1}	53.3 ± 6.7^{ab,2}	0
60	53.3 ± 6.7^{ab,1}	33.3 ± 6.7^{b,2}	16.7 ± 3.3^{c,3}	0
90	46.7 ± 6.7^{ab,1}	20 ± 0^{c,2}	6.7 ± 3.3^{c,3}	0
120	40 ± 0^{b,1}	10 ± 0^{c,2}	0	0
150	40 ± 0^{b,1}	0	0	0
180	33.3 ± 6.7^{bc,1}	0	0	0
210	16.7 ± 3.3^{c,1}	0	0	0
240	6.7 ± 3.3^{c,1}	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Propylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	60 ± 0^{a,1}	46.7 ± 6.7^{a,1}	16.7 ± 3.3^{a,2}	13.3 ± 6.7^{a,2}
15	46.7 ±6.7^{ab,1}	40 ± 0^{ab,1}	6.7 ± 3.3^{b,2}	0
30	40 ± 0^{ab,1}	26.7 ± 3.3^{ab,1}	0	0
60	33.3 ± 6.7^{ab,1}	20 ± 0^{b,1}	0	0
90	33.3 ± 6.7^{ab,1}	10 ± 0^{c,2}	0	0
120	26.7 ± 6.7^{ab,1}	0	0	0
150	20 ± 0^{b,1}	0	0	0
180	16.7 ± 3.3^{b,1}	0	0	0
210	6.7 ± 3.3^{c,1}	0	0	0
240	3.3 ± 3.3^{c,1}	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 10 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Acetamide ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	$60 \pm 0^{a,1}$	$46.7 \pm 6.7^{a,2}$	$16.7 \pm 3.3^{a,3}$	$13.3 \pm 6.7^{a,3}$
15	$46.7 \pm 6.7^{ab,1}$	$40 \pm 0^{ab,1}$	$6.7 \pm 3.3^{b,2}$	0
30	$40 \pm 0^{ab,1}$	$16.7 \pm 3.3^{c,2}$	0	0
60	$33.3 \pm 6.7^{b,1}$	$20 \pm 0^{c,2}$	0	0
90	$33.3 \pm 6.7^{b,1}$	$10 \pm 0^{c,2}$	0	0
120	$26.7 \pm 6.7^{bc,1}$	0	0	0
150	$20 \pm 0^{bc,1}$	0	0	0
180	$16.7 \pm 3.3^{bc,13}$	0	0	0
210	$6.7 \pm 3.3^{c,1}$	0	0	0
240	$3.3 \pm 3.3^{c,1}$	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Methanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	$80 \pm 0^{a,1}$	$80 \pm 0^{a,1}$	$73.3 \pm 6.7^{a,1}$	$53.3 \pm 6.7^{a,1}$
15	$80 \pm 0^{a,1}$	$80 \pm 0^{a,1}$	$33.3 \pm 6.7^{b,2}$	$16.67 \pm 3.4^{b,2}$
30	$73.3 \pm 6.7^{a,1}$	$73.3 \pm 6.7^{ab,1}$	$16.7 \pm 3.3^{c,2}$	$5 \pm 2.9^{c,2}$
60	$73.3 \pm 6.7^{ab,1}$	$73.3 \pm 6.7^{ab,1}$	0	0
90	$73.3 \pm 6.7^{ab,1}$	$73.3 \pm 6.7^{ab,1}$	0	0
120	$73.3 \pm 6.7^{ab,1}$	$66.7 \pm 6.7^{ab,1}$	0	0
150	$66.7 \pm 6.7^{ab,1}$	$53.3 \pm 6.7^{c,1}$	0	0
180	$66.7 \pm 6.7^{ab,1}$	$46.7 \pm 6.7^{c,2}$	0	0
210	$53.3 \pm 6.7^{c,1}$	$40 \pm 0^{c,2}$	0	0
240	$56.3 \pm 6.7^{c,1}$	$33.3 \pm 6.7^{c,2}$	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน แสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.1.5 การทดสอบความเป็นพิษของสาร Ethanol ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดของหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis asinina*) ก่อนเริ่มทำการทดลองมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าเท่ากับ 86.7 ± 6.7 % เมื่อนำน้ำเชื้อสดผสมในสารละลาย Ethanol ที่ความเข้มข้น 5 % เมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที สเปิร์มยังคงสามารถเคลื่อนที่ได้ 13.3 ± 3.3% ส่วนที่ความเข้มข้น 10 % เมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ และ การใช้ ethanol ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 % เมื่อนำน้ำเชื้อสดใส่ในสารละลาย ethanol ที่ความเข้มข้นดังกล่าว สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่หลังการเจือจางใน ethanol (ตารางที่ 12)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย ethanol 5% มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีการเคลื่อนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับ ethanol 10% ($P < 0.05$) และ การใช้ethanol 10% มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ ethanol ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 % ($P < 0.05$) ความเข้มข้นกับระยะเวลามีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

4.1.6 การทดสอบความเป็นพิษของสาร Ethylene glycol ที่ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20%

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดของหอยเป๋าฮื้อ พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ 93.3 ± 6.7% การทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่ใน ethylene glycol 5, 10, 15 และ 20% พบว่าสเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่ระหว่าง 3.3 – 60% เมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที โดยน้ำเชื้อที่เจือจางด้วย 5% และ 10% ethylene glycol ยังคงมีการเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงกว่า 50% เมื่อเวลาผ่านไป 240 นาที อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มใน ethylene glycol ความเข้มข้น 5 หรือ 10% เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาทียังคงมีค่าเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 73% (ตารางที่ 13)

การทดสอบทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย ethylene glycol 5% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ กับ ethylene glycol ที่ความเข้มข้น 10% ($P > 0.05$) แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับ ethylene glycol ที่ความเข้มข้น 15 และ 20% ($P < 0.05$) เวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสารละลาย ethylene glycol ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Ethanol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	73.3 ± 3.7 ^{a,1}	60 ± 0 ^{a,2}	0	0
15	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	16.7 ± 3.3 ^{b,2}	0	0
30	66.7 ± 6.7 ^{ab,1}	3.3 ± 3.3 ^{c,2}	0	0
60	66.7 ± 6.7 ^{ab,1}	0	0	0
90	66.7 ± 6.7 ^{ab,1}	0	0	0
120	60 ± 0 ^{b,1}	0	0	0
150	53.3 ± 6.7 ^{b,1}	0	0	0
180	40 ± 0 ^{bc,1}	0	0	0
210	33.3 ± 0 ^{c,1}	0	0	0
240	13.3 ± 3.3 ^{c,1}	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้งแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอนแสดงความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อหลังจากเจือจางในสารละลาย Ethylene glycol ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาแตกต่างกัน

เวลา (นาที)	ความเข้มข้น (%)			
	5	10	15	20
0	80 ± 0 ^{a,1}	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	66.7 ± 6.7 ^{b,1}	53.3 ± 6.7 ^{c,1}
15	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	60 ± 0 ^{b,1}	33.3 ± 6.7 ^{c,1}
30	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	46.7 ± 6.7 ^{b,1}	26.7 ± 6.7 ^{c,1}
60	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	40 ± 0 ^{b,1}	20 ± 0 ^{c,1}
90	73.3 ± 6.7 ^{a,1}	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	33.3 ± 6.7 ^{b,1}	26.7 ± 6.7 ^{c,1}
120	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	26.7 ± 6.7 ^{b,1}	16.7 ± 3.3 ^{c,1}
150	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	26.7± 6.7 ^{b,1}	8.3 ± 1.7 ^{c,1}
180	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	60 ± 0 ^{a,1}	20 ± 0 ^{b,1}	6.7 ± 1.7 ^{c,1}
210	66.7 ± 6.7 ^{a,1}	53.3 ± 6.7 ^{a,1}	20 ± 0 ^{b,1}	5 ± 0 ^{c,1}
240	60 ± 0 ^{a,1}	46.7 ± 6.7 ^{a,1}	20 ± 0 ^{b,1}	3.3 ± 1.7 ^{c,1}

ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันในแนวนอน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)
ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันในแนวตั้ง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$)

4.2 <u>การศึกษาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ</u>

4.2.1 การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อด้วย DMSO

การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อด้วยการใช้น้ำยาสูตร Artificial seawater (ASW) ร่วมกับสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5 , 10, 15 และ 20 % โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิแตกต่างกันคือ 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที เริ่มทำการแช่แข็งจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียสและ -80 องศาเซลเซียส พักไว้ 5 นาที แล้วนำน้ำเชื้อมาละลายได้ผลการทดลองดังนี้

4.2.1.1 การแช่แข็งมาที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส

น้ำเชื้อสด (freshly collected semen) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 93.33% น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5 % เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2.5, 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลัง การละลายที่อุณหภูมิเท่ากับ 16.7±3.3%, 6.7 ± 3.3%, 53.3 ± 6.7%, 66.7 ± 6.7% และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 10 % เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2.5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของมีค่าเท่ากับ 6.7 ± 3.3%, 3.3 ± 3.3%, 53.3 ± 6.7%, 20 ± 0% และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 1 5% เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2.5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของมีค่าเท่ากับ 0%, 0%, 3.3 ± 3.3%, 6.7 ± 3.3% และ 0% ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 20% เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 2.5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียส สเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่หลังการละลาย (ตารางที่ 14)

จากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5% จะมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ 10%, 15% และ 20 % ($P < 0.05$) ส่วนสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 10 % มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 15 % และ 20% ($P < 0.05$) แต่ในทางตรงข้าม สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 15 และ 20 % ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติของอัตราการลดอุณหภูมิทุกระดับ พบว่า มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ที่อัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที และ 12. 5 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติ ($P > 0.05$) จากข้อมูลทางสถิติพบว่า อัตราการลดอุณหภูมิที่ 7.5 องศาเซลเซียส/นาที มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มดีที่สุด รองลงมาคือการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10, 2.5, 5 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

4.2.1.1 การแช่แข็งมาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

น้ำเชื้อสดหอยเป๋าฮื้อก่อนนำการแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 93.3 % น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 5 % เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลัง การละลายที่อุณหภูมิเท่ากับ 40 ± 0%, 20 ± 0%, 73.3 ± 6.7% และ 33.3 ± 6.7% ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 10% เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของมีค่าเท่ากับ 20 ± 0%, 3.3 ± 3.3%, 60 ± 0% และ 0 % ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 15% เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของมีค่าเท่ากับ 20 ± 6.7%, 0%, 40 ± 0% และ 0 % ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้น 20% เมื่อใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5, 7.5, 10 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จนถึงอุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของมีค่าเท่ากับ 0%, 0%, 26.7 ± 6.7% และ 0 % ตามลำดับ (ตารางที่ 15)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย DMSO ทุกระดับความเข้มข้นมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การใช้ อัตราการลดอุณหภูมิที่ 5 , 7.5 และ 12.5 องศาเซลเซียส/นาที ไม่มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่มีผลแตกต่างกันอย่างมีนัยทางสถิติกับอัตราการลดอุณหภูมิ 5 และ 10 องศาเซลเซียส/นาที ($P < 0.05$) (ตารางที่ 15)

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกันจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย (-40 องศาเซลเซียส)

ความเข้มข้นของ DMSO (%)	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย				
	2.5 องศาเซลเซียส/นาที	5 องศาเซลเซียส/นาที	7.5 องศาเซลเซียส/นาที	10 องศาเซลเซียส/นาที	12.5 องศาเซลเซียส/นาที
5	$16.7 \pm 3.3^{a,2}$	$6.7 \pm 3.3^{a,3}$	$53.3 \pm 6.7^{a,1}$	$66.7 \pm 6.7^{a,1}$	0
10	$6.7 \pm 3.3^{b,3}$	$3.3 \pm 3.3^{b,3}$	$53.3 \pm 6.7^{a,1}$	$20 \pm 0^{b,2}$	0
15	0	0	$3.3 \pm 3.33^{b,2}$	$6.7 \pm 3.3^{c,1}$	0
20	0	0	0	0	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อที่แช่แข็งด้วยสารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นและอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกันจนถึงอุณหภูมิสุดท้าย (-80 องศาเซลเซียส)

ความเข้มข้นของ DMSO (%)	เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย			
	5 องศาเซลเซียส/นาที	7.5 องศาเซลเซียส/นาที	10 องศาเซลเซียส/นาที	12.5 องศาเซลเซียส/นาที
5	$40 \pm 0^{a,2}$	$20 \pm 0^{a,3}$	$73.3 \pm 6.7^{a,1}$	$33.3 \pm 6.7^{a,2}$
10	$20 \pm 0^{b,2}$	$3.3 \pm 3.3^{b,3}$	$60 \pm 0^{b,1}$	0
15	$20 \pm 6.7^{b,2}$	0	$40 \pm 0^{c,1}$	0
20	0	0	$26.7 \pm 6.7^{c,1}$	0

ตัวอักษร superscript ที่แตกต่างกันตามแนวตั้ง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)
ตัวเลข superscript ที่ต่างกันตามแนวนอน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญของสถิติ ($P < 0.05$)

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อในสภาพต่างๆ

จากการประเมินคุณภาพของน้ำเชื่อหอยเป๋าฮื้อ โดยผ่าตัดเอา gonad หอยออกมา แล้วแยกน้ำเชื้อออกเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำน้ำเชื้อสดแช่ในน้ำแข็ง ส่วนที่ 2 นำน้ำเชื้อสดผสมในน้ำทะเล นำไปแช่ในน้ำแข็ง (0-4 องศาเซลเซียส) แล้วทำการเช็คดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (sperm motility) ที่เวลาผ่านไป 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 และ 18 ชั่วโมง พบว่า สเปิร์มสดมีการเคลื่อนที่ได้นานกว่า สเปิร์มที่ผสมในน้ำทะเล ซึ่งถ้าเลือก น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ มาใช้ในการแช่แข็ง ต่อไปควรเลือกน้ำเชื้อสดมาใช้ทดลองในการแช่แ ข็ง เนื่องจากน้ำเชื้อสดที่เก็บแช่เย็นนาน 4 ชั่วโมงยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิรมสูง แม้ว่าเมื่อเก็บแช่เย็นไว้นานเกิน 6 ชั่วโมงขึ้นไป การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามการนำน้ำเชื้อสดมาแช่เย็นในลักษณะเช่นนี้ อาจมีผลทำให้มีการระเหย หรือ ทำให้น้ำเชื้อแห้งเร็วขึ้น เพราะต้องตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็นระยะๆ อยู่เสมอ รวมทั้งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ ที่มีปริมาณจำกัดยังต้องสัมผัสกับอากาศตลอดเวลา ซึ่งอาจมีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่อาจลดต่ำลง ทำให้เก็บรักษาน้ำเชื้อได้ไม่นาน เท่าที่ควร สำหรับการนำน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อยู่ในน้ำทะเลมาใช้ประโยชน์แช่แข็ง ควรนำน้ำเชื้อที่พ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อปล่อยออกมาในน้ำทะเลไม่เกิน 2 ชั่วโมง เนื่องจาก ในช่วงเวลาดังกล่าว สเปิร์มยังมีการเคลื่อนที่สูงเมื่อนำเอาน้ำเชื้อสดออกมาแล้วเจือจางด้วยน้ำทะเล แต่น้ำเชื้อที่หอยปล่อยออกมาในน้ำทะเลถ้าปล่อยไว้นานเกิน 4 ชั่วโมง กลับพบว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้ไม่เหมาะสมในการนำไปแช่แข็งต่อไป

Suquet et al. (2010) ศึกษาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยนางรมแปซิฟิคที่มีโครโมโซม 4n (tetraploid Pacific oyster sperm) เมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเลพบว่า สเปิร์มหอย 4n สามารถเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นได้นานกว่า 20 ชั่วโมง แต่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่าสเปิร์มหอย 2n แสดงให้เห็นว่าคุณภาพสเปิร์มหอย 4n ต่ำกว่าคุณภาพสเปิร์มหอย 2n เนื่องจากระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอย 4n ตั้งแต่ถูกกระตุ้นจนหยุดเคลื่อนที่จะใช้เวลาสั้นกว่าที่พบในหอย 2n แม้ว่าระดับพลังงานในสเปิร์มหอย 4n (intracellular ATP concentration) มีค่าสูงกว่าที่พบในสเปิร์มหอย 2n แสดงให้เห็นว่าการหยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอย 4n ไม่เกี่ยวข้องกับระดับ ATP ในสเปิร์มเนื่องจาก ATP ยังมีค่าสูงอยู่ แต่การหยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอย 4n เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างสเปิร์มหอย 4n (morphological alteration) ที่ทำให้สเปิร์มไม่เคลื่อนที่ และสเปิร์มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากหลังจากเวลากระตุ้นผ่านไป 24 ชั่วโมง

จากข้อมูลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสดของชุดการทดลองนำน้ำเชื้อสดไปเก็บรักษาแล้วเมื่อนำไปกระตุ้นด้วยน้ำทะเล และข้อมูลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในชุดการทดลองนำน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อแล้วเจือจางในทะเลแล้วเก็บรักษา สามารถนำข้อมูลที่ได้มาบริหารจัดการการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่เย็น และการแช่แข็ง เพราะว่าการนำน้ำเชื้อสดออกจากตัวหอยส่งผลทำให้หอยบาดเจ็บ และตายได้ ซึ่งควรหลีกเลี่ยงในการใช้พ่อพันธุ์ที่หาได้ยาก และที่มีค่าเหล่านี้เพื่อให้ใช้เป็นพ่อพันธุ์ได้นาน อย่างไรก็ตามในความเป็นจริงแล้วในระหว่างการเพาะพันธุ์หอยเป๋าฮื้อ พบว่าหอยเพศผู้จะปล่อยน้ำเชื้อจำนวนมากออกมาในน้ำทะเล ซึ่งแม้ว่าเมื่อตักน้ำเชื้อไปผสมกับไข่ที่อยู่คนละบ่อในระหว่างการผสมเทียมแล้ว ก็ยังมีน้ำเชื้ออีกมากที่เหลืออยู่และไม่ได้ใช้ประโยชน์ โดยมีการปล่อยทิ้งไป โดยเปล่า

ประโยชน์ ดังนั้นจากข้อมูลที่ทราบว่า น้ำเชื้อที่หอยที่ปล่อยออกมาในน้ำทะเลไม่เกิน 2 ชั่วโมง ยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง จึงควรที่จะทำการน้ำน้ำเชื้อเหล่านี้มากรองเพื่อให้ได้สเปิร์มที่เข้มข้น แล้วนำไปแช่แข็งทันที เพื่อทำให้น้ำเชื้อที่ต้องปล่อยทิ้งเหล่านี้ไม่สูญเสียไปโดยเปล่าประโยชน์ แต่สามารถนำไปแช่แข็งแล้วนำมาใช้ประโยชน์ได้ในภายหลัง

5.2 การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยไม่เจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ ที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ออกซิเจนสมทบ พบว่าการใช้ถุงพลาสติก ziplock สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด เปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับพื้นที่ผิวของถุง ziplock ที่มีมากกว่า culture flask และ beaker ทำให้สามารถบรรจุอากาศได้มากกว่า และอีกทั้งถุง ziplock สามารถปิดได้ ทำให้น้ำเชื้อไม่ระเหย หรืออาจระเหยไปได้ยากกว่าเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อที่เก็บในภาชนะ culture flask และ beaker การให้ออกซิเจนสมทบในระหว่างการแช่เย็นน้ำเชื้อสด ทำให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ให้ออกซิเจนสมทบ โดยชุดการทดลองที่เก็บรักษาน้ำเชื้อในถุง ziplock มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกับชุดการทดลองที่ใช้ culture flask แสดงว่าการแช่เย็นน้ำเชื้อสดหอยเป๋าฮื้อในสภาพให้ออกซิเจนสมทบ ทำได้ทั้งในภุง ziplock และ culture flask แต่ควรทำใน culture flask เนื่องจากมีความสะดวกในการใช้มากกว่าถุง ziplock การศึกษาในอนาคตควรพัฒนาวิธีการที่ทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อสดหอยเป๋าฮื้อด้วยวิธีการแช่เย็น ให้สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีได้นานขึ้น

Christensen and Tiersch (1996) ได้ทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อของปลา channel catfish โดยการแช่เย็นน้ำเชื้อในน้ำยาสูตร HBSS ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางใน HBSS (diluted milt) สามารถเก็บไว้ได้นานกว่าการนำ testis ทั้งชิ้นไปแช่ใน HBSS (intact testis) โดยได้ศึกษาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 4 วิธี ดังนี้ 1). เก็บ testis ทั้งชิ้น (intact testis) 2). เก็บน้ำเชื้อแบบมีการให้และไม่ให้ออกซิเจนสมทบ 3). เก็บน้ำเชื้อในสูตรน้ำยาที่มียาปฏิชีวนะ หรือไม่มียาปฏิชีวนะ 4). เก็บน้ำเชื้อในสูตรน้ำยาที่มี methanol หรือไม่มี methanol ผสมอยู่ 5). เก็บน้ำเชื้อในสูตรน้ำยาที่มี glucose และ methanol หรือ ไม่มี glucose และ methanol ผสมอยู่ โดยผลการทดลองในครั้งนี้พบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางในสูตรน้ำยา HBSS ทำให้สเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่นานถึง 9 วัน (diluted milt) ซึ่งนานกว่าการเก็บแบบ intact testis ในสูตรน้ำยา HBSS ซึ่งเก็บได้เพียง 2 วันเท่านั้น

5.3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อุณหภูมิต่ำโดยเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์

การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเปาฮื้อ เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลาย NaCl และ KCl มีค่าสูงประมาณ 80-100% เมื่อถูกกระตุ้นด้วยค่าแรงดันออสโมติกที่สูงขึ้นระหว่าง 700-800 mM และสเปิร์มยังคงมีการเคลื่อนที่มากกว่า 80% เมื่อถูกกระตุ้นด้วย glucose และ mannitol ที่ระดับ 1600 mM แสดงให้เห็นว่า สเปิร์มหอยเป๋าฮื้อมีการเคลื่อนที่ได้มากขึ้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสาร electrolyte และสาร electrolyte ที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงขึ้น

การแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อในสารละลาย calcium free saline (Ca-F saline) ให้ผลการเก็บรักษาดีกว่าแช่ในสารละลาย artificial seawater และ Ringer solution แสดงว่า Ca-F saline เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ การเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำที่

อุณหภูมิต่ำระหว่าง 0-4 องศาเซลเซียส ในน้ำเชื้อหอยยังไม่มีรายงานการศึกษา ซึ่งอาจเนื่องมาจากความนิยมในการศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป็นส่วนใหญ่ ที่เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานกว่า อย่างไรก็ตามการแช่เย็นน้ำเชื้อในสัตว์น้ำเท่าที่มีการรายงาน เป็นการศึกษาในน้ำเชื้อปลาเป็นส่วนใหญ่ การเจือจางน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อด้วย Ca-F saline อย่างมากที่สุดไม่ควรเจือจางเกินอัตราส่วน 1 : 2 เพราะการเจือจางในอัตราส่วน 1 : 1 และ 1 : 2 ให้ผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ไม่ต่างกัน แต่การเจือจางในอัตรา 1 : 4 ทำให้การเก็บรักษาได้สั้นลง ซึ่งอัตราการเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในสัตว์น้ำหลายชนิดมีค่าแตกต่างกันไป เช่น อัตราส่วน 1:5 สำหรับน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกัน (Mansour et al. 2004) อัตราส่วน 1:3 สำหรับน้ำเชื้อปลา Atlantic cod และน้ำเชื้อปลา haddock (DeGraaf and Berlinsky, 2004) และอัตราส่วน 1:3 สำหรับน้ำเชื้อ ปลา sturgeon (Park and Chapman, 2005)

ระยะเวลาที่น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อเจือจางในสารละลาย Ca-F saline ยังขึ้นอยู่กับตัวแปรอื่นๆ เช่น ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อระหว่างตัวหอย เทคนิคการแช่เย็น การใช้ยาปฏิชีวนะที่เหมาะสม เป็นต้น ซึ่งการศึกษาต่อไปในอนาคตควรจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับตัวแปรเหล่านี้ ด้วยเหตุที่พ่อพันธุ์หอยเป๋าฮื้อมีขนาดเล็ก และน้ำเชื้อที่ได้จากการรีดหอยแต่ละตัวมีปริมาณน้อย ทำให้ใช้เวลารวบรวมน้ำเชื้อนานกว่าจะได้น้ำเชื้อปริมาณมากพอสำหรับการทดลอง ทำให้ น้ำเชื้อบางส่วนอาจมีการระเหย (evaporation) ระหว่างการรวบรวม มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อ ทำให้ระยะเวลาเก็บรักษาได้สั้นลง

5.4 ผลของความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ

DMSO, methanol และ ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำต่อน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ เนื่องจาก เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่อยู่ในความเข้มข้น 5 หรือ 10% ยังคงมีค่าเฉลี่ยสูงไม่ต่ำกว่า 73% โดยที่ Propylene glycol, Acetamide และ Ethanol มีความเป็นพิษสูง การศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 5 ชนิดต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม มีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาสัมผัสสารนานขึ้น และความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์สูงขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในสัตว์น้ำหลายชนิดเช่น turbot (Dreanno etal., 1997), Arctic charr (Richardson et al., 2000) และ common snook (Tiersch et al., 2004)

Gwo et al. (2002) ทดสอบ ความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 8 ชนิด (DMSO, dimethyl acetamide, ethylene glycol, propylene glycol, butylene glycol, polyethylene glycol, glycerol และ methanol) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อพันธุ์เล็ก (*Haliotis diversicolor supertexta*) โดยนำน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อพันธุ์เล็กมาเจือจางใน artificial seawater ที่มีสารไครโอโพรเทคแทนท์ความเข้มข้นระหว่าง 5-25 % และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเมื่อเวลาผ่านไป 60 นาที ก่อนแช่แข็ง พบว่า สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เป็นพิษน้อยที่สุดคือ 10% DMSO

Vuthiphandchai et al. (2005) ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 9 ชนิด ได้แก่ methanol, ethanol, ethylene glycol, propylene glycol, dimethyl sulfoxide (DMSO), acetamide, formamide, glycerol and sucrose ตัวอ่อนกุ้งกุลาดำระยะเริ่มต้น ระยะกลางและระยะท้ายของการพัฒนา โดยนำตัวอ่อนเหล่านั้นแช่ในสาร ไครโอโพรเทคแทนท์ความเข้มข้น

5, 10, 15 และ 20% นาน 10 หรือ 20 นาทีแล้วนำไปฟักในน้ำทะเลให้เป็นตัวอ่อน พบว่าความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ขึ้นอยู่กับ ระยะการพัฒนาของตัวอ่อน ชนิดและความเข้มข้นของ สารไครโอโพรเทคแทนท์ และระยะเวลาสัมผัสสาร โดยตัวอ่อนระยะท้ายของการพัฒนามีความทนต่อสารไครโอโพรเทคแทนท์มากที่สุด อีกทั้ง DMSO, acetamide, glycerol และ sucrose จัดเป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์มีความเป็นพิษต่ำเปรียบเทียบสารสารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นๆ

Vuthiphandchai et al. (2007) ศึกษาความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 5 ชนิด (DMSO, ethylene glycol, propylene glycol, formamide และ methanol) ต่อการมีชีวิตของสเปิร์มกุ้งกุลาดำ โดยนำถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำมาแช่ในสารละลาย calcium-free saline (Ca-F saline) ความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20% พบว่า DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มต่ำที่สุด

ความเหมาะสมในการใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์เพื่อนำมาใช้แช่แข็ง สามารถประเมินจากความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่อเซลล์ที่แช่แข็ง โดยสัตว์น้ำแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนต่อความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์แตกต่างกัน เช่น methanol มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลา Arctic charr (Mansour et al., 2006) และ bagrid catfish (Muchlisin et al., 2004) Propylene glycol มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลา African catfish (Horváth and Urbanyi) และ winter flounder (Rideout et al., 2003) Ethylene glycol มีความเป็นพิษต่ำต่อสเปิร์มปลากะพงขาว (Sansone et al., 2002) ปลาดุกอัฟริกัน (Viveiros et al., 2000) และปลาแซลมอน (Lahnsteiner et al., 1997) Dimethylacetamide เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำซึ่งสามารถนำไปแช่แข็งน้ำเชื้อปลา rainbow trout (McNiven et al., 1993), common snook (Tiersch, et al., 2004), and Arctic charr (Richardson et al., 2000, Mansour et al., 2006)

Ieropoli et al. (2004) ทดสอบความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ 4 ชนิด (DMSO, ethylene glycol, propylene glycol และ glycerol) ความเข้มข้น 5-15% ต่อน้ำเชื้อหอยนางรมแปซิฟิค (*Crassostrea gigas*) โดยให้นำเชื้ออยู่ในสารไครโอโพรเทคแทนท์นานถึง 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส) และประเมินความสามารถในการปฏิสนธิและการพัฒนาของตัวอ่อนมาที่ระยะ D larval stage พบว่า 5% DMSO, 10% ethylene glycol และ 15% propylene glycol มีความเหมาะสมในการที่จะคัดเลือกไปใช้แช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรมต่อไปเพราะมีความเป็นพิษต่อสเปิร์มต่ำ

5.5 การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ

การแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อด้วย DMSO มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 องศาเซลเซียสให้ค่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด (66.7%) เมื่อใช้ 5% DMSO และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที อีกทั้งเมื่อแช่แข็งด้วย DMSO มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสให้ค่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด (73.3%) เมื่อใช้ 5 %DMSO และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที แสดงว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อด้วยการใช้ 5% DMSO และใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส /นาทีมีความเหมาะสมในการนำไปใช้ โดยการแช่แข็งมาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสแล้วนำน้ำเชื้อไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวจะให้ค่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด

ปัจจัยที่มีผลต่อการประสบความสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อ ขึ้นอยู่กับตัวแปรที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแช่แข็งต้องมีความเหมาะสม เช่น คุณภาพน้ำเชื้อต้องดี ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ต้องเหมาะสม รวมทั้งการพิจารณาเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิหรือการละลายที่ไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ที่แช่แข็ง โดยทั่วไปการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำหลายชนิดมักพบว่า DMSO สามารถแช่แข็งน้ำเชื้อได้ดี เนื่องจากคุณสมบัติในการปกป้องเซลล์หรือการป้องกันไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็ง (ice crystal) ดังเช่นการวิจัยในผลงานวิจัยต่อไปนี้

Suquet et al. (1998) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา turbot (*Psetta maxima*) ด้วยการใช้ 10% DMSO ร่วมกับ 10% BSA แล้วเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลว 9 เดือน พบว่า น้ำเชื้อแช่แข็งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าระหว่าง 60-90%

Gwo et al. (2002) แช่แข็ง น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อเล็ก (*Haliotis diversicolor supertexta*) ด้วยการนำน้ำเชื้อหอยเจือจางใน artificial seawater ที่มี 10% DMSO ปล่อยไว้ 60 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และบรรจุน้ำเชื้อในหลอด cryotube และลดอุณหภูมิในอัตรา 3.5 ถึง 2 0 องศาเซลเซียส/นาทีมาที่อุณหภูมิสุดท้ายแตกต่างกัน (0 , -30, -60, -90 และ -120 องศาเซลเซียส) ก่อนเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า การเลือกใช้ อัตราการลดอุณหภูมิที่ 12 หรือ 15 องศาเซลเซียส/นาที มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม หลังการละลาย (post-thawed sperm motility) มีค่าที่ดีที่สุดแม้ว่ามีค่าต่ำกว่าน้ำเชื้อสด จึงต้องการน้ำเชื้อแช่แข็งในปริมาณมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสดเพื่อผสมกับไข่ให้มีประสิทธิภาพการผสมเท่ากัน

Vuthiphandchai et al. (2007) แช่แข็งถุงน้ำเชื้อกุ้งกุลาดำด้วยการใช้ 5% DMSO และลดอุณหภูมิด้วยอัตรา 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -30 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า การแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส/นาที จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียส มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุด

Vuthiphandchai et al. (2009) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากะพงแดง โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางใน Ringer solution เติมสารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO 5% หรือ 10%, propylene glycol 5% หรือ 10%, ethylene glycol 5% หรือ 10%, ethanol 5% และ methanol 5% นำไปแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 3, 5, 10 และ 12 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -40 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว ปรากฏว่า น้ำเชื้อปลากะพงแดงที่แช่แข็งด้วย 10% DMSO ลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาทีมาที่ -80 องศาเซลเซียสมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและการมีชีวิตของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงสุดเท่ากับ 91.1% และ 92.7% ตามลำดับ

พลชาติ ผิวเณร และพนม กระจ่างพจน์ สอดศุข (2546) ทำการแช่แข็ง น้ำเชื้อปลาหมอไทยด้วยการใช้น้ำยาสูตร Carp #1 ที่มี 10 % DMSO เป็นองค์ประกอบ โดยเจือจางน้ำเชื้อในน้ำยาในอัตราส่วน 1:5 ปล่อยให้น้ำเชื้ออยู่ในภาวะสมดุลที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนการแช่แข็งในอัตราการลดอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส/นาที ปรากฏว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่หลังการละลายประมาณ 60% และมีประสิทธิภาพการปฏิสนธิไข่ใกล้เคียงกับการใช้น้ำเชื้อสด

อย่างไรก็ตาม การแช่แข็งในสัตว์น้ำหลายชนิดก็มีรายงานถึงประสิทธิภาพของสารไครโอโพรเทคแทนท์ตัวอื่นนอกเหนือไปจาก DMSO ในการแช่แข็งเซลล์ให้ผลดี เนื่องจากความแตกต่างของชนิดสัตว์น้ำ และชนิดของเซลล์ที่แช่แข็ง ดังที่พบในงานวิจัยต่อไปนี้

Rana and McAndrew (1989) แช่แข็งน้ำเชื้อปลานิล (*Oreochromis* spp.) ในหลอดฟาง 0.5 มิลลิลิตร ด้วยการใช้น้ำยา Fish Ringer solution ที่มี 12.5% methanol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อใน Fish Ringer solution ในอัตราส่วน 1 :1, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10 และ 1:20 พบว่า การ แช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิระหว่าง 5- 50 องศาเซลเซียส/นาทีที่อัตราส่วนการเจือจางต่างกัน ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพการปฏิสนธิกับไข่ปลานิล และให้ค่าอัตราการฟักระหว่าง 86.2-98.6% แต่การแช่แข็งในหลอด cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตรด้วย 12.5% methanol เมื่อเก็บไว้นาน 13 เดือนมีผลทำให้คุณภาพน้ำเชื้อแปรปรวนมาก และสามารถปฏิสนธิไข่ได้ไม่ขึ้นกับระยะเวลาเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวมีค่าระหว่าง 38.7-93.4%

Poncet et al. (200 3) ทำการแช่แข็งเซลล์ Hemocyte ของหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis tuberculata*) โดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ 5 รูปแบบ (20% DMSO, 20% glycerol, 20% ethylene glycol, 12% DMSO+12% glycerol และ 8% DMSO+8% glycerol+8% ethylene glycol) โดยนำเซลล์ Hemocyte มาเจือจางในสารละลาย Alsever ที่เติม anticoagulant แล้วใส่สารไครโอโพรเทคแทนท์ ปล่อยไว้ 20 นาทีและลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิต่างกันมาที่ -90 องศาเซลซียสก่อนเก็บในไนโตรเจนเหลว ปรากฏว่า การใช้ 10% glycerol ให้ผลดีที่สุดในการแช่แข็งและอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้า (1 องศาเซลเซียส/นาที) ให้ผลดีกว่าการใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (3 และ 9 องศาเซลเซียส/นาที) ซึ่งเมื่อนำ Hemocyte มาเลี้ยงต่ออีก 2 วันแล้วประเมินการรอดชีวิตของเซลล์จากการวิเคราะห์ DNA และ โปรตีน พบว่ามีค่าเท่ากับ 83 % และ 78% ตามลำดับ รวมทั้ง metabolic activity จากการประเมิน MTT reduction assay ก็ยังมีค่าสูงถึง 96% แม้ว่าเมื่อเลี้ยงเซลล์ผ่านไป 6 วันการรอดชีวิตของเซลล์จะลดต่ำลง

Ieropoli et al. (2004) แช่แข็งน้ำเชื้อหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) ด้วยการใช้ DMSO, ethylene glycol และ propylene glycol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15 % พบว่า น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยการใช้ 10% ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ โดยเมื่อให้อยู่ในระยะเวลาสมดุล 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (26 องศาเซลเซียส) แล้วลดอุณหภูมิด้วยอัตรา 6 องศาเซลเซียส /นาทีในระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อ มีผลทำให้สามารถปฏิสนธิไข่และพัฒนามาที่ระยะ D larval stage มีค่าไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้น้ำเชื้อสดผสมกับไข่ เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 11, 16 หรือ 21 องศาเซลเซียส/นาที

Fabbrocini et al. (2000) แช่แข็ง น้ำเชื้อปลา Sea bream (*Sparus aurata*) ที่เจือจางด้วย 1 % NaCl ที่มีสารไครโอโพรเทคแทนท์ 10 % ethylene glycol, 10% propylene glycol หรือ 5% DMSO ด้วยอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา เท่ากับ 1 :6 ทำการแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิสุดท้าย -150 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า น้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วย 5% DMSO และลดอุณหภูมิ 1 0 องศาเซลเซียส/นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุด

สรุปผลการทดลอง

1. น้ำเชื้อสดของหอยเป๋าฮื้อที่เก็บแช่เย็นนาน 4 ชั่วโมงยังคงมีการเคลื่อนที่ของสเปิรมสูง แต่น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่อยู่ในน้ำทะเลมีการเลื่อนที่ของสเปิร์มสูงในระยะ 2 ชั่วโมงแรกเท่านั้น

2. การให้ออกซิเจนสมทบในระหว่างการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ ทำให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานกว่าไม่ใช้ออกซิเจนสมทบ โดย culture flask มีความเหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ

3. การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหอยเป๋าฮื้อ ถูกควบคุมโดยแรงดันออสโมติกที่มีค่าสูงขึ้น

4. Calcium-free saline (Ca-F saline) เป็นสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่เย็นน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ ในอัตราส่วนของน้ำเชื้อ : Ca-F saline ไม่เกิน 1 : 2

5. DMSO, methanol และ ethylene glycol เป็นสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่มีความเป็นพิษต่ำต่อน้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อ

6. น้ำเชื้อหอยเป๋าฮื้อที่แช่แข็งด้วยการใช้ 5% DMSO และอัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที มาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสก่อนนำไปเก็บในไนโตรเจนเหลว มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด

เอกสารอ้างอิง

กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. *การ*เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง หลักการ/วิธีการ/ประโยชน์ . มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 128 หน้า.

สิทธิศักดิ์ เหมืองสิน. 2545. หอยเป๋าฮื้อสัตว์น้ำเศรษฐกิจตัวใหม่ของไทย. การสัมมนา Abalone Seedling And Management (for Abalone Promotion in Future). 31 มค. - 1 กพ. 45 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

คเชนทร เฉลิมวัฒน์. 2544. การเพาะเลี้ยงหอย : ภาควิชาวาริชศาสตร์ ; คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ; ชลบุรี : หน้า 211-228.

บุญรัตน์ ประทุมชาติ. 2540. การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง. ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี. หน้า 479-520.

พลชาติ ผิวเณร และ พนม กระจ่างพจน์สอดสุข. 2546. การเก็บรักษาเชื้อพันธุ์สัตว์น้ำในรูปน้ำเชื้อแช่แข็ง. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ. กรุงเทพ. 52 หน้า

อนุวัฒน์ นทีวัฒนา และจอห์น ฮิลลิแบร์ก. 2529 . การสำรวจชนิดของหอยโข่งทะเลบริเวณเกาะภูเก็ตและความเป็นไปได้ของการเพาะเลี้ยงหอยโข่งทะเลในประเทศไทย. วารสารการประมง. 39 (2). หน้า 177.

ศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์. 2543. การเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ. กรมประมง. 44 หน้า

ธานินทร์ สิงหะไกรวรรณ และมาซาโนริ โดอิ . 2536. การทดลองเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อพันธุ์พื้นเมืองของไทย. ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก กองประมงทะเล กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. พิมพ์ครั้งที่ 1.

Choi,Y.H and Chang, Y.J. 2004 The influence of cooling rate,developmental stage,and the addition of sugar on the cryopreservation of larvae of the peal oyster *Pinctada fucada martensii*. Cryobiology 46: 190-193.

Christensen, J.M. and Tiersch, T.R. 1996. Refrigerated storage of channel catfish sperm. Journal of the World Aquaculture Society 27: 340-346.

DeGraaf, J.D., Berlinsky, D.L., 2004. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (*Gadus morhua*) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. Aquaculture 234: 527-540.

Dreanno, C., Suquet, M., Quemener, L., Cosson, J., Fierville, F., Normant, Y., Billard, R. 1997. Cryopreservation of turbot (*Scophthalmus maximus*) spermatozoa. Theriogenology 48: 589-603.

Dong, Q., Eudeline, B., Huang, C., Allen, S.K. and Tiersch, T.R. 2005. Commercial-scale sperm cryopreservation of diploid and tetraploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*. Cryobiology 50: 1-16.

Fabbrocini, A., Lavendera, S.L., Rispoli, S. and Sansone, G. 2000. Cryopreservation of seabream (*Sparus aurata*) spermatozoa. Cryobiology 40: 46-53.

Gwo, J.C. 1995. Cryopreservation of oyster (*Crassostrea gigas*) embryos. Theriogenology 43: 1163-1174.

Gwo, J.C., Chen, Cuan-Wen and Cheng, Hsien-Yu. 2002. Semen cryopreservation of small abalone *(Haliotis diversicolor supertexa)*. Theriogenology 58: 1563-1578.

Horváth, A. and Urbanyi, B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved of African catfish sperm, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). Aquaculture Research 31: 317-324.

Ieropoli, S., Masullo, P., Santo, M. and Sansone, G. 2004. Effects of extender composition, cooling rate and freezing on the fertilization viability of spermatozoa of the Pacific oysters, (*Crassostrea gigas*). Cryobiology 49: 250-257.

Jarayabhand, P. and Paphavasit, N. 1996. A review of the culture of tropical abalone with special reference to Thailand. Aquaculture 140: 159-168.

Lahnsteiner, F., Weismann, T. and Patzner. R.A. 1997. Methanol as cryoprotectant and the suitability of 1.2 ml and 5 ml straws for cryopreservation of semen from salmonid fishes. Aquaculture Research 28: 471-479.

Mansour, N., Lahnsteiner, F. and Berger, B., 2004. Characterization of the testicular semen of the African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822), and its short-term storage. Aquaculture Research 35: 232-244.

Mansour, N., Richardson, G.F. and McNiven, M.A. 2006. Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa. Aquaculture Research 37: 862-868.

McNiven, M.A., Gallant, R.K. and Richardson, G.F. 1993. Dimethyl-acetamide as cryoprotectant for rainbow trout spermatozoa. Theriogenology 40: 943-948.

Morisawa, M. 1985. Initiation mechanism of sperm motility at spawning in teleosts. Zool. Science 2: 605-615.

Muchlisin, Z.A., Hashim, R. and Chong, A.S.C. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. Theriogenology 62: 25-34.

Oakes, F.R. and Ponte, R.D. 1996. The abalone market: opportunities for cultured abalone. Aquaculture 140: 187-195.

Palleroni, N.J. 1984. Family I. Pseudomonadaceae Winsloe, Broadhurst, Buchanan, Krumwiede, Rogers and Smith 1917, 555AL, Pages 141-199 in N.R. Krieg and J.G. Holt editors. Bergey's manual of systematic bacteriology, volume I. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, Maryland, USA.

Paniagua-Chavez, C.G., Buchanan, J.T. and Tiersch, T.R. 1998. Effect of extender solutions and dilution on motility and fertilizing ability of eastern oyster sperm. Journal of Shellfish Research 17, 231–237.

Paniagua-Chavez, C.G. Buchanan, J.T., Supan, J.E. and Tiersch, T.R. 2000. Cryopreservation of sperm and larvae of the eastern oyster In: Cryopreservation in Aquatic Species. Tiersch, T.R. and Mazik, P.M. Editors. World Aquaculture Society, Baton Rouge, Louisiana. Pp. 230-239.

Park, C. and Chapman, F.A. 2005. An extender solution for the short-term storage of sturgeon semen. North American Journal of Aquaculture 67: 52-57.

Poncet, J.M., Serpentini, A., Boucaud-Comoy, E., Lebel, J.M. 2003. Influence of cryoprotenctive agent and cooling rate on frozen and thawed hemocytes from the Mollusk *Haliotis taberculata*. Cryobiology 47: 184-189.

Rana, K.J. and McAndrew, B.J. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. Aquaculture 76: 335-345.

Renard, P. 1991. Cooling and freezing tolerances in embryos of the Pacific Oyster, Crassostrea gigas. Nethanol and Socrose effects. Aquaculture 92: 43-57.

Richardson, G.F., Miller, T.L. and McNiven, M.A. 2000. Cryopreservation of Arctic charr, *Salvelinus alpinus* (L), semen in various extenders and in three sizes of straw. Aquaculture Research 31: 307-315.

Rideout, R.M., Litvak, M.K., Trippel, E.A. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder Pseudopleuronectes americanus (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. Aquaculture Research 34: 653-659.

Sansone, G., Fabbrocini, A., Ieropoli, S., Langellotti, A.L., Occidente, M. and Matassino, D. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa after thawing. Cryobiology 44: 229-239.

Suquet, M., Dreanno, C., Petton, B., Normant, Y., Omnes, M.H. and Billard, R. 1998. Long-time effects of the cryopreservation of turbot (*Psetta maxima*) spermatozoa. Aquatic Living Resources 11: 45-48.

Suquet, M., Labbe, V., Brizard, R., Donval, A., Le Coz, J.R., Quere, C. and Haffray, P. 2010. Changes in motility, ATP content, morphology and fertilisation capacity during the movement phase of traploid Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) sperm. Theriogenology 74(1): 111-117.

Tiersch, T.R., Wayman, W.R., Skapura, D.P., Neidig, C.L. and Grier, H.J. 2004. Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). Aquaculture Research 35: 278-288.

Viveiros, A.T.M., So, N. and Komen, J. 2000. Sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus*: cryoprotectants, freezing rates and sperm : egg dilution ratio. Theriogenology 54: 1395-1408.

Vuthipandchai, V., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. 2009. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: Effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability, and fertilization capacity. Theriogenology 72: 129-138.

Vuthiphandchai, V., Nimrat, S., Kotcharat, S. and Bart, A.N. 2007. Development of a cryopreservation protocol for long-term storage of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) spermatophores. Theriogenology 68: 1192-1199.

Vuthiphandchai, V., Pengpun, B. and Nimrat, S. 2005. Effect of cryoprotectant toxicity and temperature sensitivity on the embryos of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). Aquaculture 246: 275-284.