การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง

อมรรัตน์ กิระวานิชย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวาริชศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
ธันวาคม 2559
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ อมรรัตน์ กิระวานิชย์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

(รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุบัณฑิต นิ่มรัตน์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธาน

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชงโค แซ่ตั้ง)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย)

....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุบัณฑิต นิ่มรัตน์)

....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ของมหาวิทยาลัยบูรพา

....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่...30....เดือน...ธันวาคม............ พ.ศ.2559

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก รศ.ดร.วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รศ.ดร.สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา และทุนวิจัยงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ของโครงการวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง สำหรับใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอพระคุณไว้เป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.สุเมธ ชมพูธวัช ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ตรวจแก้ไขและวิจารณ์ผลงาน ทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้นและผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์ในการตรวจสอบ รวมทั้งให้คำแนะนำแก้ไขการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัยให้มีคุณภาพ

ขอกราบขอพระคุณ คุณพ่อเฉลียว คุณแม่อาภรณ์ กิระวานิชย์ และสมาชิกทุกคนในครอบครัวที่คอยให้กำลังใจ และขอขอบคุณพี่ ๆ น้อง ๆ ทุกคนที่ชวยสนับสนุนผู้วิจัย ตลอดมาจนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จ

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่ บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษาและประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

อมรรัตน์ กิระวานิชย์

54910552: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; วท.ม. (วาริชศาสตร์)
ความสำคัญ: ปลาตะเพียนขาว/น้ำแข็งแห้ง/การแช่แข็ง/การเก็บรักษา/การละลาย

อมรรัตน์ กิระวานิชย์: การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง (CRYOPRESERVATION OF SILVER BARB (*Barbodes gonionotus*) SPERM WITH DRY ICE). คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย, Ph.D., สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, Ph.D., 118 หน้า. ปี.พ.ศ. 2560.

การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) ด้วยน้ำแข็งแห้ง โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง แบ่งการศึกษาการทดลองเป็น 3 ตอน ดังนี้ การทดลองที่ 1 และ 2 เพื่อศึกษาผลของการแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง โดยมีวัสดุห่อหุ้มหลอดฟางขนาด 0.25 ml. และ Cryotube ขนาด 1.8 ml. และระยะเวลาในการลดอุณหภูมิที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวหลังการละลาย ด้วยการใช้น้ำยาบัฟเฟอร์สูตร Ca-F HBSS และ DMSO 10% โดยนำหลอดฟาง 0.25 ml. ไปใส่ในอุปกรณ์ห่อหุ้มต่าง ๆ กัน พบว่าการใช้หลอดสายไฟฟ้าห่อหุ้มหลอดฟางแช่แข็งน้ำเชื้อมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 62±3.19% การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วย Cryotube 1.8 ml. ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 77±1.26% ตอนที่ 3 ศึกษาผลของอุณหภูมิเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย โดยเก็บไว้นานเป็นเวลา 28 วัน พบว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้ง แล้วนำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง (-20°C) มีคุณภาพสเปิร์มที่ต่ำกว่าคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง (-80°C) ในน้ำแข็งแห้ง (-79°C) และในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการเก็บรักษา การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพของน้ำแข็งแห้งในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ต่อไป

54910552: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.Sc. (AQUATIC SCIENCE)

KEYWORDS: *Barbodes gonionotus* /DRY ICE/FREEZING/RYOPRESERVATION/ THAWING

AMORNRAT KILAVANIT: CRYOPRESERVATION OF SILVER BARB (*Barbodes gonionotus*) SPERM WITH DRY ICE**.** ADVISORY COMMITTEE: VERAPONG VUTHIPHANDCHAI, Ph.D., SUBUNTITH NIMRAT, Ph.D. 118 P. 2017.

The study about sperm cryopreservation of Silver barb (*Barbodes gonionotus*) using dry ice was divided into three experiments. The first and second experiments determined the effects of wrapping materials around French straws (0.25 mL) and cryotubes (1.8 mL), and freezing time on the quality of frozen-thawed sperm. Sperm were diluted with calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) and dimethyl sulfoxide (DMSO) 10% prior to loading in French straws (0.25 mL) or cryotubes (1.8 mL). French straws inserted in the electric power line resulted in average post-thawed sperm motility of about 62±3.19%. Sperm cryopreserved in the cryotubes wrapped with aluminium foil had average percentages of post-thawed sperm of about 77±1.26%. The third experiment evaluated the effects of storage temperature on the quality of frozen-thawed sperm by cryostorage for 28 days. Sperm frozen with dry ice after storage in the refrigerator (-20°C) had post-thawed sperm qualities, significantly lower than those kept in the freezer (80°C), dry ice (-79°C) and liquid nitrogen (-196°C). This study indicates the potential of dry ice in freezing of *B. gonionotus* sperm that can be used for application in the hatchery.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... จ

สารบัญ .... ฉ

สารบัญตาราง .... ซ

สารบัญภาพ .... ฒ

บทที่

1 บทนำ 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4

สมมติฐานของการวิจัย 4

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 4

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 5

ปลาตะเพียนขาว 5

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22

3 วิธีดำเนินการวิจัย 25

อุปกรณ์และสารเคมี 25

วิธีการดำเนินการวิจัย 27

4 ผลการวิจัย 33

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดน้ำเชื้อ (French straw) ขนาด 0.25มิลลิลิตร ที่มีต่อการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว 33

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่มีต่อการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว 53

การทดลองที่ 3 ศึกษาการพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาตะเพียนขาวไว้ในรูปแบบต่าง ๆ ด้วยน้ำแข็งแห้ง 66

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ	95
สรุปผลการทดลอง	95
อภิปรายผล	97
ข้อเสนอแนะ	104
บรรณานุกรม	105
ภาคผนวก	111
ภาคผนวก ก	112
ประวัติย่อของผู้วิจัย	118

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1 เปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาต่างกัน และละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน 35

2 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาต่างกัน และละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน 36

3 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาต่างกัน และละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน 36

4 อุณหภูมิหลังการลายละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในการละลายน้ำเชื้อ 37

5 เปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 39

6 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในการละลายน้ำเชื้อ 39

7 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ใช้แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วยสายสายหลอดซิลิโคน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในการละลายน้ำเชื้อ 40

8 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางเมื่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 40

9 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางเมื่อห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 43

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

10 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟาง ที่หุ้มด้วยสายออกซิเจน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในการละลายน้ำเชื้อ 43

11 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วย สายออกซิเจน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันใน การละลายน้ำเชื้อ 44

12 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน หลอดฟางที่หอหุ้มด้วยสายออกซิเจน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 44

13 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้ม ด้วยหลอด Centrifuge tube โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในการละลายน้ำเชื้อ 46

14 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่หลอด Centrifuge tube ห่อหุ้มในแช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและ อุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 47

15 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วย หลอด Centrifuge tube โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในการละลายน้ำเชื้อ 47

16 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่หลอด Centrifuge tube ห่อหุ้มในแช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำแข็งแห้ง ที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 48

17 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วย หลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลาย น้ำเชื้อ 50

18 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการ ละลายน้ำเชื้อ 51

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

19 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 51
20 อุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางเมื่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 52
21 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ของกลุ่มควบคุม (Control) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 55
22 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ของกลุ่มควบคุม (Control) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 55
23 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ของกลุ่มควบคุม (Control) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 56
24 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในกลุ่มควบคุม (Control) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 56
25 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 58
26 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 58
27 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 59

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

28 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 59
29 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยอะลูมิเนียม โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 61
30 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่มีแผ่นอะลูมิเนียมห่อหุ้ม โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 61
31 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มแผ่นอลูมิเนียม โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 62
32 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นอูมิเนียม โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 63
33 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 64
34 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 64
35 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่หุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 65
36 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ 65
37 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 68

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

38 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 69

39 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 69

40 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 70

41 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 71

42 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 71

43 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 72

44 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 72

45 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 75

46 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 76

47 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 76

48 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 77

49 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 78

50 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 78

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

51 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 79
52 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 79
53 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 83
54 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 83
55 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 84
56 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 84
57 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 85
58 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 85
59 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 86
60 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 86
61 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 89
62 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 90
63 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 91

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่ หน้า

64 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษารักษาด้วยด้วยไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 91

65 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 92

66 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 92

67 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร 93

68 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (- 196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร 93

69 อัตราการลดอุณหภูมิภายในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยมีอุปกรณ์ห่อหุ้มเมื่อแช่แข็งอยู่ในน้ำแข็งแห้ง -79 องศาเซลเซียส 94

70 อัตราการลดอุณหภูมิภายใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร โดยมีอุปกรณ์ห่อหุ้มเมื่อแช่แข็งอยู่ในน้ำแข็งแห้ง -79 องศาเซลเซียส 95

71 การวัดขนาดวัสดุห่อหุ้มของหลอดแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำแข็งแห้ง 117

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะภายนอกปลาตะเพียน	6
2	ความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียของปลาตะเพียนเมื่อสมบูรณ์เพศ	7
3	เปรียบเทียบลักษณะเพศของปลาตะเพียนเพศผู้และเพศเมีย	8
4	ลักษณะรูปร่างสเปิร์ม	10
5	การเก็บน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการรีดมือ (Hand-stripping)	12
6	การตรวจสอบคุณภาพสเปิร์มด้วยการย้อมสี	14
7	วิธีการปฏิบัติในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยวิธีแช่แข็ง	17
8	เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Controlled – rate programmable freezer)	19
9	การใช้ไอไนโตรเจนเหลวลดอุณหภูมิ (Liquid nitrogen vapor)	20
10	ปิดปลายหลอดสายไฟฟ้าด้วยกาวซิลิโคลน	30
11	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยมีอุปกรณ์ห่อหุ้ม เมื่อแช่แข็งอยู่ในน้ำแข็งแห้ง -79 องศาเซลเซียส	94
12	การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร โดยมีอุปกรณ์ห่อหุ้ม เมื่อแช่แข็งอยู่ในน้ำแข็งแห้ง -79 องศาเซลเซียส	95
13	สายหลอดซิลิโคน	113
14	สายออกซิเจน	113
15	หลอด Centrifuge tube	113
16	หลอดสายไฟฟ้า	113
17	แผ่นสังกะสี	113
18	แผ่นอลูมิเนียม	113
19	กระดาษฟลอย์	114
20	หลอดฟาง (French straw) ยี่ห้อ Imv Technologies Paillette 0.25 ml	114
21	หลอด Cryotube 1.8 ml. ยี่ห้อ Thermo scientific Nunc cryotube vials	114
22	กล่องโฟมเก็บความเย็น (Styrofoam box) ที่บรรจุน้ำแข็งแห้ง	114
23	กล่องโฟมขนาดใหญ่ใช้เก็บกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งแห้ง	114
24	กาวซิลิโคนปิดปลายวัสดุห่อหุ้ม	114

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
25	ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส	115
26	ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส	115
27	น้ำแข็งแห้ง Dry ice	115
28	การแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง	115
29	การละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว	115
30	ถุงซิปล็อก	115
31	ปลาตะเพียนขาวที่ใช้ในการทดลอง	116
32	อาหารปลาตะเพียนขาว	116
33	การวัดอุณหภูมิภายในหลอดฟาง 0.25 ml.หลังการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ	116
34	การวัดอุณหภูมิภายใน Cryotube 1.8 ml.หลังการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ	116

บทที่ 1
บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) เป็นปลาน้ำจืดพื้นเมืองของไทยที่พบในแหล่งน้ำทั่วไป ปลาตะเพียนขาวเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนต่อสภาพแวดล้อม กินอาหารได้เกือบทุกชนิด และเจริญเติบโตได้ดีในแหล่งน้ำธรรมชาติ แพร่พันธุ์ง่าย จัดเป็นปลากินพืชจึงใช้เป็นปลากำจัดวัชพืชในแหล่งน้ำได้อีกด้วย นอกจากนี้ปลาตะเพียนขาวยังมีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยปริมาณการจับสัตว์น้ำจืด (รวมเพาะเลี้ยง) จำแนกเป็นรายชนิด ปี พ.ศ. 2551-2555 เริ่มมีปริมาณลดลงตามลำดับคือ 96.1, 93.2, 82.9, 71.4 และ 69.5 ตัน (ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง, 2557) เนื่องจากปัญหามลภาวะของแหล่งน้ำและการขยายตัวของชุมชน (สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อมเทคโนโลยี, 2545) ด้วยเหตุที่ปลาตะเพียนขาวเป็นปลาที่เพาะพันธุ์ได้ง่ายและมีช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ที่ยาวนาน (ตั้งแต่เดือนเมษายนจนถึงเดือนพฤศจิกายน) (Tafazzal & Ahmed, 1991) อีกทั้งสามารถรีดน้ำเชื้อได้โดยตรงทำให้สามารถเพาะพันธุ์ได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตามในบางช่วงฤดูของการผสมพันธุ์โดยเฉพาะช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ พ่อพันธุ์เริ่มไม่มีน้ำเชื้อแม้ว่าจะสามารถใช้ฮอร์โมนฉีดกระตุ้นสร้างน้ำเชื้อได้แต่คุณภาพน้ำเชื้อก็ลดต่ำลง ทำให้จำเป็นต้องรักษาคุณภาพน้ำเชื้อให้คงที่ ซึ่งก็ได้มีการทำงานวิจัย การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2548 ; รัชดาภรณ์ อินทเกษร, 2557) อย่างไรก็ตามการพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว แม้ว่าจะมีรายงานถึงความสำเร็จในการวิจัย แต่ด้วยเหตุที่ปลาตะเพียนขาวเป็นปลาที่มีราคาไม่สูงมาก ถ้าใช้เทคโนโลยีการแช่แข็งที่มีราคาแพง ก็จะทำให้การถ่ายทอดเทคโนโลยีไปยังผู้ประกอบการทำได้ยาก ดังนั้นการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยเทคโนโลยีที่มีราคาถูก แต่มีประสิทธิภาพ ก็น่าจะช่วยพัฒนาแนวทางการถ่ายทอดเทคโนโลยีการแช่แข็งให้ได้รับการยอมรับจากผู้ประกอบการมากขึ้น ด้วยการใช้ตู้แช่แข็งหรือน้ำแข็งแห้งที่หาได้ง่ายและราคาไม่แพง

ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาปัจจัยสำคัญที่จะทำให้การแช่แข็งประสบความสำเร็จนั้นคือวิธีการลดอุณหภูมิที่ทำให้ตัวอย่างน้ำเชื้อแข็งตัว จากทฤษฎีการแช่แข็งในขณะที่ทำการลดอุณหภูมิของเหลวภายนอกเซลล์จะกลายเป็นน้ำแข็งก่อนของเหลวภายในเซลล์ ทำให้ความเข้มข้นของตัวถูกละลายภายนอกสูงกว่าภายในเซลล์ จึงทำให้น้ำแพร่ออกจากเซลล์เพื่อปรับสมดุล (Denniston, Michelet, & Godke, 2000) ถ้าอัตราการลดอุณหภูมิที่เร็วเกินไป จะทำให้น้ำไหลออก

จากเซลล์รวดเร็วอาจทำให้เซลล์เหี่ยว และเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ จะทำให้เซลล์เกิดอันตรายได้ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536) หากอัตราการลดอุณหภูมิช้าเกินไปจะทำให้เซลล์ต้องปรับตัวนานเกินไป ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์เพราะมีการสูญเสียน้ำ และความเข้มข้นของสารละลายสูงเกินไป จึงทำให้ตกผลึกและการเหนี่ยวนำให้เกิดผลึกน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว (Denniston et al., 2000)

ดังนั้นการแช่แข็งจึงต้องใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมซึ่งกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยเครื่องมืออัตโนมัติที่ซึ่งนิยมใช้ในการควบคุมอัตราการลดอุณหภูมินั้นเป็นเครื่องมือที่มีราคาแพง (ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง, 2549) และใช้สารไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen) ในการลดอุณหภูมิ ซึ่งสารไนโตรเจนเหลวก็ได้มีการดัดแปลงนำมาใช้ในการลดอุณหภูมินอกเหนือจากวิธีการใช้เครื่องมืออัตโนมัติเช่น การวางตัวอย่างที่ต้องการแช่แข็งไว้เหนือไอไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen vapor) (Vuthiphandchaia, Irawana, & Nimrat, 2009; รัชดาภรณ์ อินทเกษร, 2557) และการแช่แข็งโดยใช้ถัง dry shippers (Carolsfeld, Godinho, Zaniboni, & Harvey, 2003 ; Maria, Viveiros, Freitas, & Oliveira, 2006) สารไนโตรเจนเหลวนั้นเป็นสารที่มีราคาแพงและต้องเก็บรักษาไว้ในถังเก็บที่มีลักษณะจำเพาะ (Liquid nitrogen tank) ที่ออกแบบมาเพื่อทำการเก็บรักษาไม่ให้เกิดการระเหย อีกทั้งต้องมีการป้องกันอันตรายจากอุณหภูมิที่ต่ำมาก และความเป็นพิษของตัวสารเองรวมถึงแรงดันที่สูงจนอาจทำให้เกิดอันตรายได้ ดังนั้นตัวถังไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen tank) จึงมีความหนาของตัวถังที่จะต้องป้องกันการถ่ายเทความร้อนและความเย็น สามารถรองรับความดันที่สูงทำให้ถังเก็บไนโตรเจนเหลวมีน้ำหนักมากจึงมีความยากลำบากในการขนส่งหรือลำเลียง แม้ปัจจุบันจะมีการผลิตถังขนาดเล็กหรือถัง dry shippers ออกมาก็ตามแต่ข้อจำกัดของขนาดถังสามารถทำให้ขนส่งน้ำเชื้อแช่แข็งได้ในปริมาณน้อยอาจ ไม่เพียงพอต่อการนำไปใช้ในกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อ อีกทั้งการสั่งซื้อสารไนโตรเจนเหลวจำนวนมากก็มีความยุ่งยากในการจัดหาสารไนโตรเจนเหลวเมื่อต้องเดินทางไปตามสถานที่ต่าง ๆ ที่อาจจะอยู่ห่างไกล จากข้อมูลที่กล่าวมานั้นจะเห็นได้ถึงข้อจำกัดการใช้สารไนโตรเจนเหลวเพื่อทำการแช่แข็งน้ำเชื้อหากต้องเดินทางออกไปทำการเก็บน้ำเชื้อนอกสถานที่ จึงมีความจำเป็นต้องพัฒนากระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่สะดวกรวดเร็วและง่ายต่อการจัดการหากสามารถใช้วิธีการอื่นในการลดอุณหภูมิของกระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ด้วยเทคโนโลยีที่มีราคาถูกก็จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ต่อไป

ในการศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการแช่แข็งปลาได้เริ่มมีการใช้น้ำแข็งแห้ง (Dry ice) ที่สามารถประสบความสำเร็จในการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิดเช่น ปลา loach (Yasui, Arias, Fujimoto, & Arai, 2008) Zebra fish (Draper, Stout, Hernandez, & Moens, 2009) common carp (Babiak & Glogowski, 1997) เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามงานวิจัยด้านดังกล่าวยังมี

การศึกษาอยู่ในวงจำกัด แม้ว่าการใช้น้ำแข็งแห้งยังไม่สามารถควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิที่คงที่หรือมีความเที่ยงตรงสูงได้ เนื่องจากในการแช่แข็งต้องนำหลอดบรรจุน้ำเชื้อสัมผัสกับน้ำแข็งแห้งโดยตรงจึงทำให้มีอัตราการลดอุณหภูมิรวดเร็วเกินไป (-33.3 ± 2.09 ºC/min; Yasui et al., 2008) แต่ถ้าแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งแล้วเซลล์สเปิร์มยังสามารถมีชีวิตรอดหรือมีคุณภาพดี ด้วยการพัฒนาเทคนิคแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยน้ำแข็งแห้งให้มีประสิทธิภาพขึ้น ก็จะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำดังนั้นการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง จึงจำเป็นต้องใช้วัสดุที่สามารถใช้หุ้มหลอดบรรจุน้ำเชื้อเพื่อที่จะสามารถปรับอัตราลดอุณหภูมิที่เหมาะสม ไม่รวดเร็วหรือช้าจนเกินไป เนื่องจากอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของเซลล์ และยังสามารถป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice cryctrl) ภายในเซลล์ทำให้เซลล์ที่ผ่านการแช่แข็งมีสภาพที่สมบูรณ์ และสามารถคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์ (Denniston et al., 2000) อย่างไรก็ตามอิทธิพลของความหนาและขนาดของภาชนะบรรจุน้ำเชื้อก็ยังส่งผลต่อการเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิและการละลายที่เหมาะสม (รัชดาภรณ์ อินทเกษร, 2557) จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาวิธีการในการแช่แข็งน้ำเชื้อโดยใช้น้ำแข็งแห้ง (Dry ice) ด้วยการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งน้ำเชื้อและการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำเชื้ออย่างเหมาะสม เพื่อให้สเปิร์มมีชีวิตรอด เมื่อนำไปใช้ประโยชน์ได้ต่อไปในภายหลัง

การพัฒนากระบวนเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำโดยวิธีการแช่แข็งในปัจจุบันนับได้ว่ามีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องและประสบความสำเร็จอย่างมากในสัตว์น้ำหลายชนิด ซึ่งเกือบทั้งหมดจะเป็นการวิจัยที่เกิดขึ้นในห้องทดลองของสถาบันการศึกษาและหน่วยงานของรัฐ เนื่องจากมีการใช้ต้นทุนที่สูงและวัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ มีราคาสูงรวมถึงเครื่องมือในการแช่แข็งก็เป็นอุปกรณ์จำเพาะไม่ได้มีการจำหน่ายทั่วไปต้องนำเข้ามาจากต่างประเทศ อีกทั้งเทคโนโลยีที่ใช้มีความยุ่งยากต้องใช้บุคลากรที่ผ่านการฝึกฝนจนมีความเข้าใจในกระบวนการแช่แข็งและการใช้วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ ด้วยเหตุนี้น้ำแข็งแห้ง (Dry ice) สามารถเป็นแหล่งความเย็นที่หาได้ง่ายและมีราคาถูกจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการนำมาลดอุณหภูมิแช่แข็ง เนื่องจากน้ำแข็งแห้งมีความเหมาะสมต่อการปฏิบัติงานทั้งในห้องปฏิบัติการและงานภาคสนาม (Yasui et al., 2008) ดังนั้นการนำวัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ มาประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อให้มีความสะดวกขึ้นและต้นทุนที่ลดลงอีกทั้งการลำเลียงน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ในการผสมเทียมก็ทำได้สะดวกกว่าการลำเลียงพ่อพันธุ์ โดยสามารถขนส่งน้ำเชื้อแช่แข็งไปภายในประเทศและระหว่างประเทศได้ง่าย ช่วยยืดอายุคุณภาพน้ำเชื้อที่ล่วงเลยฤดูกาลสืบพันธุ์ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาการเก็บรักษาพันธุกรรมของสัตว์น้ำ (Gene Bank) หรือป้องกันการสูญเสียพ่อพันธุ์สัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางพันธุกรรมและอาจใช้เป็นแนวทางของการพัฒนาแนวทางการพัฒนาไปสู่ธุรกิจการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาชนิดอื่น ๆ ต่อไป

วัตถุประสงค์การวิจัย

1. พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง

2. ศึกษาผลของวัสดุห่อหุ้มหลอดเก็บรักษาน้ำเชื้อและระยะเวลาในการลดอุณหภูมิด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง ที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวหลังการละลาย

3. ศึกษาผลของอัตราการละลาย ที่มีผลต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

4. ศึกษาผลของอุณหภูมิเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส, ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส, น้ำแข็งแห้ง -79 องศาเซลเซียส และในถังไนโตรเจนเหลว -196 องศาเซลเซียส ที่มีต่อคุณภาพหลังการละลาย

สมมติฐานของการวิจัย

1. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวอย่างง่ายด้วยน้ำแข็งแห้งมีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยชนิดของหลอดบรรจุน้ำเชื้อและวัสดุห่อหุ้มมีผลทำให้คุณภาพของสเปิร์มแตกต่างกัน

2. ระยะเวลาในการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวโดยใช้น้ำแข็งแห้งไม่มีผลต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวแช่แข็งหลังการละลาย

3. อัตราการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่แตกต่างกันมีผลต่อคุณภาพของสเปิร์มหลังการละลาย

4. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็ง ที่ลดอุณหภูมิโดยใช้น้ำแข็งแห้งที่อุณหภูมิต่างกันในชุดการทดลองต่าง ๆ มีผลต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวแช่แข็งหลังการละลาย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวโดยใช้น้ำแข็งแห้งที่นำไปสู่การประยุกต์ใช้ในการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

2. ช่วยในการลดต้นทุนการใช้วัสดุอุปกรณ์การแช่แข็งที่มีราคาสูงโดยสามารถใช้น้ำแข็งแห้งมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาแต่ยังคงประสิทธิ์ภาพในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

3. สามารถนำมาประยุกต์ใช้งานแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในภาคสนาม เนื่องจากน้ำแข็งแห้งมีจำหน่ายทั่วไป หาได้ง่ายทั่วทุกภูมิภาคและยังมีความปลอดภัยสูงกว่า

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาวิจัยเรื่องการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำยังมีรายงานการวิจัยไม่มากเมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งน้ำเชื้อในสัตว์บก ซึ่งหลักการแช่แข็งโดยทั่วไปมีขั้นตอนที่เหมือนกันตั้งแต่การรวบรวมน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี การเจือจางน้ำเชื้อด้วยน้ำยาที่เหมาะสม การเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (Cryoprotectant) ที่เหมาะสม รวมทั้งการลดอุณหภูมิและการละลายอย่างเหมาะสม ซึ่งงานวิจัยที่เกี่ยวข้องในการศึกษาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในรูปแบบต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

ปลาตะเพียนขาว

ปลาตะเพียนขาวหรือที่เรียกสั้น ๆ ว่า ปลาตะเพียน เป็นปลาน้ำจืดพื้นเมืองอีกชนิดหนึ่งและเป็นปลาที่คนไทยรู้จักกันดี มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Barbodes gonionotus* (Bleeker, 1850) มีชื่อสามัญว่า Jawa หรือ Carp ปลาตะเพียนเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว ทนต่อโรค มีแหล่งกำเนิดอยู่แถบประเทศอินโดนีเซีย ไทย เวียดนาม ศรีลังกา ปลาตะเพียนจะชอบอาศัยอยู่ตามแม่น้ำ ลำคลอง หนองบึง ห้วยและที่มีกระแสน้ำไหลอ่อน ๆ หรือน้ำนิ่ง (สุทธิพงศ์ วุฒิเจริญวงศ์, 2552)

การเพาะเลี้ยงปลาตะเพียนขาวได้เริ่มดำเนินการเป็นครั้งแรกก่อนปี พ.ศ. 2503 ที่สถานีประมง (บึงบอระเพ็ด) นครสวรรค์ ในระยะต่อมาได้มีการเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาว ได้รับการพัฒนาทั้งวิธีเลียนแบบธรรมชาติและผสมเทียม ซึ่งสามารถเผยแพร่และจำหน่ายในกับเกษตรกรนำไปทำการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ต่อไป (ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ, 2530)

Phylum Chordata
Class Actinopterygii
Order Cypriniformes
Family Cyprinidae
Genus *Barbodes*
Spesies *gonionotus*

ลักษณะของปลาตะเพียนขาว

ปลาตะเพียนขาวลักษณะของลำตัวเป็นแบบแบนข้าง ขอบหลังโค้งยกสูงขึ้นเล็กน้อย หัวเล็ก ปากเล็ก ริมฝีปากบาง จะงอยปากแหลม (นฤมล อัศวเกศมณี, 2550) เป็นปลาเกล็ดใหญ่ ลำตัวมีสีเงิน ครีบก้นสีเหลืองปะปนส้มเล็กน้อย บริเวณครีบหลังและครีบหางมีสีเทาปนเหลือง ครีบหลังมีก้านครีบแข็ง 3 ก้าน ก้านครีบอ่อน 8 ก้าน ก้านครีบแข็งอันสุดท้ายของครีบหลังเป็นกระดูกแข็งและหยักทางด้านหลัง ครีบก้นมีก้านครีบแข็ง 3 ก้าน ก้านครีบอ่อน 6 ก้าน ก้านครีบแข็งอันสุดท้ายของครีบก้นเป็นครีบอ่อนสามารถงอโค้งได้ปานกลาง มีเส้นข้างลำตัว 1 เส้น และมีเกล็ดตามเส้นข้างลำตัว 26-28 เกล็ด (นวลมณี พงศ์ธนา และทองอยู่ อุดมเลิศ, 2547) ที่โคนเกล็ดมีสีเทาเกือบดำ เมื่อปลาตะเพียนขาวโตเต็มที่จะมีขนาดลำตัวยาวถึง 50 เซนติเมตร ปลาตะเพียนเจริญได้ดีในแหล่งน้ำทั่วไป เป็นปลาที่เลี้ยงง่าย กินได้ทั้งพืชและอาหาร (อภิชาติ ศรีสะอาด, 2543) (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกปลาตะเพียน
ที่มา: http://www.oknation.net/blog/yaya2508/2013/09/05/entry-1

ลักษณะการกินอาหาร

ปลาตะเพียนขาวมีฟันในลำคอ (Pharyn geal teeth) เป็นฟันแบบกัดบก ชนิดกัดบดแบบ 3 แถว ซี่เหงือกเป็นซี่เล็ก มีซี่เงือกสั้น ๆ มีลักษณะทางเดินอาหารแบบไม่มีกระเพาะ ลำไส้ผนังบางยาวถึง 2.0-2.7 เท่าของความยาวลำตัว (อุธร ฤทธิลึก, 2550) ปลาตะเพียนขาววัยอ่อนกินสาหร่ายเดียวและกินแพลงก์ตอนขนาดเล็ก ส่วนลูกปลาตะเพียนขาวขนาด 3-5 นิ้ว กินพวกพืชน้ำ เช่น

แหนแดง ผักบุ้ง สาหร่ายพุงชะโดเป็นต้น ปลาตะเพียนขาวขนาดใหญ่ กินใบพืชบก เช่น ใบมันสำปะหลัง ใบมันเทศ หญ้าขนเป็นต้น สำหรับปลาตะเพียนขาวส่วนใหญ่มักจะกินอาหารในเวลากลางวันมากกว่ากลางคืน (อภิชาติ ศรีสอาด, 2543)

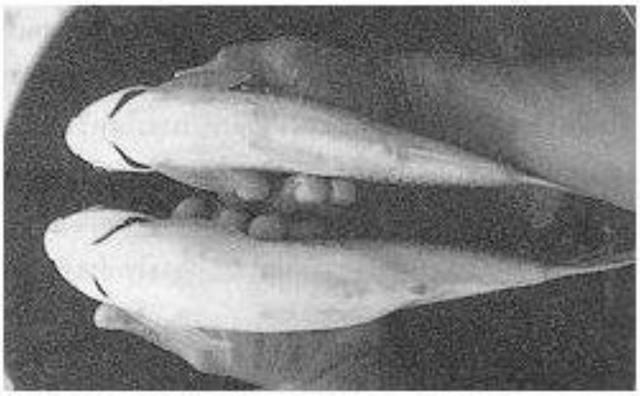
การแยกเพศของปลาตะเพียนขาว

เมื่อมองจากลักษณะภายนอกปลาตะเพียนขาวเพศผู้และเพศเมียคล้ายคลึงกันมากแต่อย่างไรก็ตามเมื่อถึงฤดูผสมพันธุ์พ่อแม่พันธุ์จะมีลักษณะแตกต่างกันอย่างชัดเจน (ภาพที่ 2 และภาพที่ 3)

1. เพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ เพศผู้จะมีลักษณะเล็กกว่า
2. เพศผู้ลำตัวเพรียวบาง
3. แผ่นกระดูกปิดเหงือก ของเพศผู้จะมีตุ่มสิว เมื่อลูบจะสากมือ แต่เพศเมียไม่มีตุ่มสิว ลักษณะลื่นมือ
4. เพศเมียหน้าท้องอูมเบ่ง พื้นท้องนิ่ม ช่องเพศมีลักษณะกว้างกว่าปกติ
5. หน้าท้องจะแบน พื้นท้องแข็งหากลองรีดเบา ๆ ตรงบริเวณ ท้องจะมีน้ำเชื้อสีขาว ขุ่นคล้ายน้ำนมไหลออกมา

ช่วงฤดูผสมพันธุ์ของปลาตะเพียนขาวคือเดือนพฤษภาคม-มิถุนายน แม่ปลา 1 ตัว สามารถออกไข่ได้ครั้งละประมาณ 50,000-100,000 ฟอง หลังการผสมพันธุ์จะฟักออกเป็นตัวภายใน 8-12 ชั่วโมง (สันต์ นาตะสุวรรณ, 2548) ปลาตะเพียนขาวจะวางไข่บริเวณที่มีกระแสน้ำไหล พื้นเป็นโคลน วิธีผสมพันธุ์ปลาตะเพียนขาวจะผสมพันธุ์เป็นกลุ่ม ไข่ปลาตะเพียนขาวมีลักษณะกึ่งจม กึ่งลอย (นฤมล อัศวเกศมณี, 2550)

ภาพที่ 2 ความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียของปลาตะเพียนเมื่อสมบูรณ์เพศ
ที่มา: http://www.fisheries.go.th/sf-naratiwas/tapian.html



ภาพที่ 3 เปรียบเทียบลักษณะเพศของปลาตะเพียนเพศผู้และเพศเมีย
ที่มา: http://www.fisheries.go.th/sf-naratiwas/tapian.html

น้ำเชื้อปลา (Fish milt)

อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาคือ รังไข่ของปลาเพศเมีย และอัณฑะในปลาเพศผู้ โดยทั่วไปในสัตว์มีกระดูกสันหลังมีรังไข่และอัณฑะ เจริญมาจากเซลล์ต้นกำเนิดต่างกัน รังไข่นั้นเกิดมาจากเซลล์ส่วนผิว (Cortex) ของผนังช่องท้อง (Peritoneal wall) เจริญหนาเป็นสันตามยาว ส่วนอัณฑะเกิดมาจากกลุ่มเซลล์ด้านใน (Medulla) จะมีกลุ่มเซลล์กลุ่มหนึ่งเจริญเร็วกว่าอีกกลุ่มหนึ่งที่เจริญช้ากว่าหรืออาจจะเสื่อมไปในที่สุด ปลาตัวนั้นจึงมีเฉพาะรังไข่หรืออัณฑะเพียงอย่างเดียว ทั้งรังไข่และอัณฑะเจริญมาจากเซลล์ที่เป็นเซลล์ส่วนผิว (พิชยา ณรงค์พงศ์, 2555)

อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้ (Testis)

อัณฑะหรือถุงน้ำเชื้อ (Testis) เป็นอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์เพศผู้ที่สำคัญ ซึ่งในปลาตะเพียนขาวเพศผู้มีลักษณะของถุงน้ำเชื้อเป็นพูยาว 2 พู หรือ ถุงยาว 2 ถุง มีสีขาวเหมือนน้ำนมในช่วงฤดูสืบพันธุ์มีน้ำหนักมากกว่าร้อยละ 12 ของน้ำหนักตัว (พิชยา ณรงค์พงศ์, 2555) ถุงน้ำเชื้อจะอยู่ติดกับผนังช่องท้องด้านบนติดกับไต มีเนื้อเยื่อยึดติดไว้เรียกว่า มีซอร์เซียม (Mesorchium) ช่วยยึดอัณฑะให้ติดผนังช่องท้องด้านบน บริเวณปลายอัณฑะด้านซ้าย (Pos-terior) ทั้ง 2 พูของปลากระดูกแข็งส่วนมากรวมถึงปลาตะเพียนขาวจะมีท่อน้ำเชื้อ (Sperm duct หรือ Vas deferens) เข้าเป็นท่อเดียวกันสั้น ๆ ไปตามแนวกึ่งกลางตัว แล้วเปิดออกสู่ภายนอกบริเวณช่องเพศ (Urogenital pore) ซึ่งทำให้น้ำเชื้อที่อยู่บริเวณเดียวกับช่องปัสสาวะไหลออกมาทางช่องเดียวกัน สำหรับปลาบางชนิดในปลาแซลมอนหรือปลาเทร้า จะไม่มีท่อน้ำเชื้อ สเปิร์มที่สร้างจากอัณฑะไหลเข้าสู่ช่องว่างในลำตัวแล้วจึงไหลออกนอกร่างกาย (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

นอกจากอัณฑะจะยังมีหน้าที่ในสร้างสเปิร์มแล้วยังผลิตฮอร์โมนเพศในระบบสืบพันธุ์ (Steroid hormone) อัณฑะของปลากระดูกแข็งแบ่งได้เป็น 2 ประเภทดังนี้

1. แบบทูบูลาร์ (Tubular type)

ลักษณะอัณฑะจะไม่มีช่องว่าง (Lumen) พบในปลาบางชนิด เช่น Guppy และ Cyprinodonts เป็นต้น ในระหว่างการพัฒนาการสร้างสเปิร์ม (Spermtogenesis) สเปิร์มจะพัฒนามาจากส่วนปลายของ (Blind sac) มายัง Vas deferens และปล่อยสเปิร์ม (Spermatoozoa) ออกไปทาง Vas deferens

2. แบบโลบูล (Lobule type)

ลักษณะอัณฑะที่มีช่องว่างบริเวณตรงกลาง (Central lumen) ทำหน้าที่ในการลำเลียงสเปิร์ม (Spermatozoa) ที่พัฒนาการสร้างสเปิร์มแล้วออกมายัง Vas deferens และปล่อยออกมานอกลำตัว ภายในอัณฑะของปลากระดูกแข็งโดยทั่วไปแล้ว จะมีลักษณะเหมือนอัณฑะของสัตว์มีกระดูกสันหลังโดยทั่วไป ประกอบด้วย เซมินิเฟรัส ทูบูล (Seminiferous tubule) ลักษณะเป็นขดไปมา มีหน้าที่ในการสร้างสเปิร์มชนิดต่าง ๆ ในระหว่างเซมินิเฟอรัส ทูบูล หรือ อินเตอร์โลบูลาร์สเปซ (Inter-lobular space) จะพบอินเตอร์สติเตียล เซลล์ (Interstitial cell) ทำหน้าที่ในการผลิตฮอร์โมนเพศ (Steroid) และพบหลอดเลือดฝอย (Blood vessels) ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนแก๊สและอาหาร (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

การสร้างเซลล์สเปิร์ม (Spermatogenesis)

การพัฒนาการสร้างสเปิร์มปลามีความสลับซับซ้อนน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับการสร้างไข่ การสร้างสเปิร์มมีขั้นตอนการพัฒนา 2 ขั้นตอนดังนี้ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

1. สเปิร์มมาโทเจเนซิส (Spermatogenesis) เป็นช่วงการสร้างจำนวนของสเปิร์มโดยการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส จึงทำให้มีจำนวนสเปอร์มาโทโกเนีย (Spermatogonia) เพิ่มมากขึ้นและเริ่มพัฒนาเข้าสู่ไพรมารี สเปอร์มาโทไซต์ (Primary spermatocyte) จากนั้นจะเกิดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 2 ครั้ง ดังนี้

การแบ่งเซลล์ไมโอซิส 1 (Meiosis I) ทำให้เป็นไพรมารี สเปอร์มาโทไซต์กลายเป็นเซ็คคันดารี สเปอร์มาโทไซต์(Secondary spermatocyte) ที่มีขนาดเล็กลงจำนวน 2 เซลล์

การแบ่งเซลล์ไมโอซิล 2 (Meiosis II) ทำให้เป็นเซ็คคันดารี สเปอร์มาโทไซต์กลายเป็นสเปอร์มาทิต (Spermatid) ฉะนั้นเมื่อเสร็จสิ้นการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสจะได้สเปอร์มาทิตเซลล์ 4 เซลล์ จากไพรมารี สเปอร์มาโทไซต์จำนวน 1 เซลล์ แม้ว่าสเปิร์มมาทิตจะมีโครโมโซม 1 ชุด แต่ยังไม่มีส่วนหางจึงยังไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้

2. สเปิร์มิเอชัน (Spermiation) จัดเป็นขั้นตอนที่สเปิร์มมาทิดมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นสเปิร์มมาโตซัว (Spermatozoa) ซึ่งจะมีหางและจะมีความพร้อมในการปฏิสนธิกับไข่ได้ สเปิร์มมิเอชันจึงหมายถึง ขบวนการที่สเปิร์มมาโตซัวแยกตัวหลุดออกมาจากเซอร์ โตไลเซลล์ และปล่อยออกมาในช่องว่างได้เป็นสเปิร์มมาโตซัว ซึ่งได้ถูกนำมาใช้

ลักษณะรูปร่างสเปิร์ม

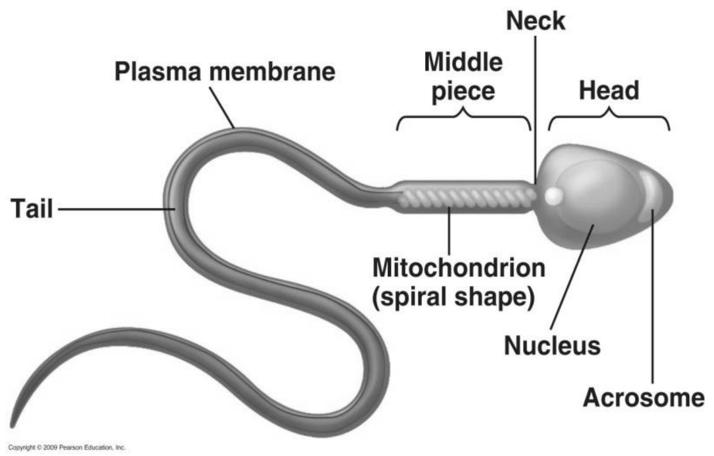
สเปิร์มของปลาประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ ดังนี้ (ภาพที่ 4)

1. ส่วนหัว (Head) มีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของปลา โดยในส่วนหัวของสเปิร์มจะมีนิวเคลียสที่มี ดีเอ็นเอ (DNA) หรือสารพันธุ์กรรมบรรจุอยู่ ซึ่งใช้ปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่

2. ส่วนกลาง (Middle piece) เป็นส่วนที่อยู่ติดกับส่วนหัวบริเวณนี้ โดยจะมีไมโทคอนเดีย (Mitochondria) ที่ทำหน้าที่ในการสร้างพลังงานแก่สเปิร์มใช้สำหรับการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และมีแอกเซียล ฟิลาเมนท์ (Axial filament)

3. ส่วนหาง (Tail) เป็นส่วนที่มีลักษณะยาวซึ่งเป็นองค์ประกอบของไฟบริล (Fibril) ทำหน้าที่สำคัญในการเคลื่อนไหว ซึ่งพัฒนาจากแอกเซียล ฟิลาเมนท์

สเปิร์มของปลากระดูกแข็งส่วนมากมีลักษณะหัวเป็นรูปทรงกลม (Spherical) หรือทรงรี (Ovate หรือ Acorn-shaped) โดยมีขนาดประมาณ 2-3 ไมโครเมตร ส่วนกลางมีขนาดเล็ก ความยาวสเปิร์มจากหัวจนถึงปลายหางยาวประมาณ 40-60 ไมโครเมตร และส่วนใหญ่สเปิร์มของปลามีหางจำนวน 1 หาง (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)



ภาพที่ 4 ลักษณะรูปร่างสเปิร์ม
ที่มา: http://www.biology.lifeeasy.org

การเก็บน้ำเชื้อ (Milt collection)

การรวบน้ำเชื้อจากปลาเพศผู้ในช่วงที่สมบูรณ์เพศ มีวิธีการรวบรวมน้ำเชื้อปลา 2 วิธีดังนี้ คือ

1. การรวบรวมน้ำเชื้อจากถุงน้ำเชื้อ (Testis removal)

การเก็บน้ำเชื้อปลาในลักษณะนี้ เนื่องจากถุงน้ำเชื้อหรืออัณฑะของปลาอยู่ภายในช่องท้อง มีลักษณะเป็นพูยาวสีขาว ติดอยู่ในบริเวณช่องท้องส่วนบน ติดอยู่กับบริเวณส่วนไต จึงรีดน้ำเชื้อออกมาไม่ได้ จึงต้องทำการผ่าท้องปลาเพื่อนำถุงน้ำเชื้อออกมาโดยต้องระวังมิให้ไตถูกทำลาย ซึ่งจะทำให้ช่องท้องมีเลือดออกได้ ในการผ่านั้นมีวิธีการดังนี้ นำปลามาวางยาสลบ เช็ดลำตัวปลาให้แห้ง นำแอลกอฮอล์มาเช็ดหน้าท้องปลา ก่อนทำการผ่าหน้าท้องปลา โดยนำมีดผ่าตัดมาผ่าหน้าท้องปลา ใช้ฟอร์เซปคีบดึงเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบ ๆ ออก ใช้ฟอร์เซปคีบดึงถุงน้ำเชื้อออกมาจากช่องท้องแล้ว จากนั้นใช้กรรไกรตัดส่วนปลายที่ติดกับช่องเพศออก นำไปซับกับกระดาษทิชชู่หรือล้างด้วยน้ำเกลือ ก่อนนำไปใช้ การเก็บน้ำเชื้อแบบนี้มีการทำในปลาดุกอัฟริกัน (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และกาญจนา หริ่มแพ็ง, 2552) ปลากะพงขาว (กล่าวขวัญ ศรีสุข, เอกรัฐ ศรีสุข, วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2551) เป็นต้น

2. การรีดน้ำเชื้อด้วยมือ (Hand-stripping)

วิธีนี้เป็นการรีดน้ำเชื้อจากตัวปลาโดยตรง โดยใช้นิ้วค่อย ๆ รีดเบา ๆ บริเวณช่วงท้องส่วนต้น ซึ่งเป็นที่ตั้งของพูน้ำเชื้อ จนไปถึงบริเวณช่องเปิดของช่องเพศ หากปลามีน้ำเชื้อสมบูรณ์น้ำเชื้อจะไหลออกจากปลายช่องเพศ ในระหว่างที่รีดน้ำเชื้อ ต้องระวังมิให้น้ำ เลือด ปัสสาวะ และอุจจาระปนลงในน้ำเชื้อ (อนงค์ หันพานนท์, 2539) โดยการเก็บน้ำเชื้อลักษณะนี้สามารถทำได้ในปลาหลายชนิดเช่น ปลาเทโพและปลาสวาย (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2546) ปลานวลจันทร์น้ำจืด (สมร พรชื่นชูวงศ์, 2554) และปลายี่สกไทย (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์, 2557) เป็นต้น

ภาพที่ 5 การเก็บน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการรีดมือ (Hand-stripping)
ที่มา: นางสาวอมรรัตน์ กิระวานิชย์

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ (Evaluation of sperm quality)

โดยทั่วไปสเปิร์มปลาจะไม่เคลื่อนที่ขณะที่อยู่ในเซมินอลฟลูอิด (Seminal fluid) แต่จะเริ่มมีการเคลื่อนที่แบบปราดเปรียว (Swim energetically) เมื่ออยู่ในน้ำโดยจะมีอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของปลาและสภาพแวดล้อม เช่น สเปิร์มปลาน้ำกร่อยและปลาทะเลมักจะเคลื่อนที่ได้นานกว่าสเปิร์มปลาน้ำจืด การเก็บรักษาสเปิร์มอยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารละลายภายในตัวของปลาจะทำให้สเปิร์มมีชีวิตได้ยาวนานขึ้น อีกทั้งอุณหภูมิน้ำมีผลอย่างมากต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่ออุณหภูมิน้ำสูงขึ้นจะทำให้สเปิร์มปลามีระยะเวลาการเคลื่อนที่ในน้ำสั้นกว่าเคลื่อนที่ในอุณหภูมิที่ต่ำกว่า นอกจากนี้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีระยะเวลาจำกัด เช่นปลาน้ำจืดส่วนมากสามารถเคลื่อนที่ได้นานประมาณไม่เกิน 1 นาที โดยจะว่ายน้ำปราดเปรียวในระยะแรก ๆ และค่อย ๆ ว่ายน้ำช้าลงจนหยุดการเคลื่อนที่ซึ่งในช่วงเวลาดังกล่าว ถ้าสเปิร์มไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ก็จะทำให้สเปิร์มตายในที่สุด โดยเฉพาะการผสมเทียมปลาต้องใช้ระยะเวลาผสมเทียมที่เร็วที่สุดไม่ให้สเปิร์มตาย เพื่อที่จะได้อัตราปฏิสนธิสูงที่สุด (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสามารถบอกความสมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์ได้ดี โดยการประเมินมี 4 วิธี ดังนี้

1. ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ

เมื่อทำการรีดน้ำเชื้อออกมาจากตัวปลาแล้วควรสังเกตลักษณะทางกายภาพ โดยสังเกต สี ความเข้มข้น ปริมาตรและสิ่งเจือปนอื่น ๆ น้ำเชื้อที่ดีควรมีสีขาวขุ่น ไม่มีสิ่งเจือปนของเมือก น้ำปัสสาวะหรืออุจจาระ วิธีการนี้จะเป็นการประเมินเบื้องต้นของน้ำเชื้อปลาที่จะนำมาใช้ประโยชน์

2. การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเป็นการประเมินอีกรูปแบบหนึ่งก่อนที่นำสเปิร์มมาทำการทดลองวิจัยหรือนำไปใช้ในการผสมเทียม การประเมินความสามารถในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแบ่งออกเป็น 2 วิธี ดังนี้

2.1 การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อด้วยสายตา

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยสายตาเป็นวิธีการคาดคะเนด้วยสายตาผ่านกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อมองดูลักษณะการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม แม้ว่าวิธีนี้จะไม่มีความเที่ยงตรงเท่าที่ควร ต้องอาศัยประสบการณ์ ความสามารถของผู้ประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การประเมินด้วยวิธีนี้แม้ว่ามีความเที่ยงตรงต่ำแต่ก็สามารถประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาเป็นที่ยอมรับได้ (พลชาติ ผิวเณร, คงภพ อำภพศักดิ์, ถาวร จีนหมึก และชมพูนุช มรรคทรัพย์, 2550), (สุเมธ ชมพูธวัช, 2550) และ (Vuthiphandchaia et al., 2009)

การพิจารณาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยสายตา เป็นการให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่โดยการกำหนดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสามารถจำแนกได้ 6 ระดับ ได้แก่ สเปิร์มที่มีการเคลื่อนที่ 0%, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% (Vuthiphandchai & Zoher, 1999) ดังนี้

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในลักษณะนี้แม้ว่าอาจจะไม่มีความเที่ยงตรงเท่าที่ควร แต่ก็สามารถใช้ประเมินได้ดีในระดับหนึ่ง วิธีการประเมินสามารถทำได้ โดยนำน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อที่ผ่านการแช่แข็งแล้วมาตรวจดูเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ โดยนำน้ำเชื้อมาหยดบนแผ่นสไลด์แล้วกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่ด้วยน้ำกลั่นหรือน้ำทะเล แล้วแต่ชนิดของสเปิร์ม จากนั้นปิดด้วยแผ่น cover glass แล้วนำมาประเมินการเคลื่อนที่ใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า นอกจากวิธีการประเมินการเคลื่อนที่แบบนี้จะทำได้ง่ายและใช้ต้นทุนน้อย เพราะใช้กล้องจุลทรรศน์เพียงอย่างเดียว และยังทราบระยะเวลาที่สเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่ เมื่อกระตุ้นจนกระทั่งหยุดเคลื่อนที่ว่าใช้เวลานานเท่าไร

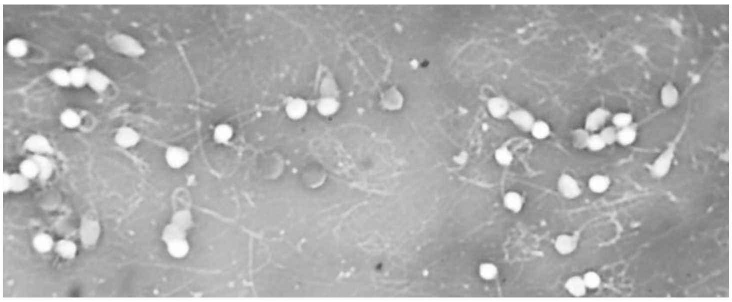
2.2 การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อด้วยโปรแกรมอัตโนมัติ (Computer Assisted Sperm Analyzer, CASA)

การประเมินการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อด้วยโปรแกรมอัตโนมัติ CASA หรือ Computer Assisted Sperm Analyzer เป็นวิธีที่มีความแม่นยำสูงสุด มีความคลาดเคลื่อนน้อย เนื่องจากเป็น

การประเมินด้วยโปรแกรมระบบคอมพิวเตอร์สามารถประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสามารถจำแนกได้ 3 แบบ (เคลื่อนที่แบบโค้ง วิถีเคลื่อนที่แบบตรง วิถีการเคลื่อนที่แบบเฉลี่ย) ความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มสเปิร์ม หาค่าความสัมพันธ์ในการเคลื่อนที่ ลักษณะกราฟการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อ การประเมินโดยใช้โปรแกรมอัตโนมัติ CASA จึงไม่จำเป็นต้องอาศัยประสบการณ์ในการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม อย่างไรก็ตามโปรแกรมอัตโนมัติ CASA ที่ต้นทุนสูง แต่ในงานการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาก็มีการใช้โปรแกรมอัตโนมัติ CASA ในการประเมินเช่นกัน (Fauvel, Suquet, & Cosson, 2010), (Jun, Qinghua, & Shicui, 2006)

3. การย้อมสีดูการมีชีวิตของสเปิร์ม

การประเมินด้วยวิธีนี้มีหลักการที่สำคัญ คือ นำน้ำเชื้อปลามาย้อมด้วยสีพิเศษบางชนิด เมื่อนำมาย้อมแล้ว สเปิร์มตายจะติดสีย้อม ในขณะที่สเปิร์มมีชีวิตจะไม่ติดสีย้อม อันเนื่องมาจากความสามารถของเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยอมให้สีผ่านเข้ามาในเซลล์ได้ ส่วนเซลล์ที่มีชีวิตจะมีกลไกการผ่านของสี ป้องกันไม่ให้สีผ่านเข้ามาในเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เซลล์ที่มีชีวิตจึงไม่ติดสีย้อม (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) การย้อมสีน้ำเชื้อปลาซึ่งเป็นวิธีที่นิยมกันโดยทั่วไปและทำได้ง่าย คือ การย้อมด้วยสี Eosin-Nigrosin ลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด (15 ไมโครลิตร) จากนั้นหยดน้ำเชื้อลงข้างสีที่หยดประมาณ 15 ไมโครลิตร ใช้เข็มเขี่ยน้ำเชื้อกับสีย้อมให้เข้ากัน ใช้แผ่น Cover glass กระจายให้บาง ๆ แล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 วินาที จากนั้นนำน้ำยาทาเล็บสีใสทาบาง ๆ ปิดด้วยแผ่น Cover glass จากนั้นนำไปประเมินตัวเป็นตัวตายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า (ภาพที่ 6) สเปิร์มตัวที่ตายจะติดสีชมพู สีแดง หรือสีม่วง ส่วนสเปิร์มตัวที่ยังไม่ตายก็จะตายก็จะไม่ติดสีย้อม (เรณู ยาชิโร และนิพนธ์ เสนอินทร์, 2551)



ภาพที่ 6 การตรวจสอบคุณภาพสเปิร์มด้วยการย้อมสี
ที่มา: นางสาวอมรรัตน์ กิระวานิชย์

4. การประเมินความหนาแน่นของสเปิร์ม

การประเมินความหนาแน่นของสเปิร์ม เป็นการประเมินจำนวนสเปิร์มต่อหน่วยปริมาตรที่มีในน้ำเชื้อ เพื่อให้ทราบความหนาแน่นของสเปิร์ม โดยนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางในน้ำกลั่นหรือสารละลายที่เหมาะสม ด้วยการเจือจางในอัตรา 1:10 หรือ 1:5000 แต่ขึ้นอยู่กับชนิดของน้ำเชื้อปลานำมาผสมกัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 5 นาที เพื่อให้สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ จากนั้นนำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วไปหยดบน Hemacytometer ทำการนับจำนวนสเปิร์มและคำณวนความหนาแน่นของสเปิร์มด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า (สมร พรชื่นชูวงศ์, 2554)

5. การประเมินน้ำเชื้อด้วยการนำไปผสมเทียม

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้ออีกวิธีหนึ่งคือการนำไปผสมเทียมกับไข่ เพื่อหาประสิทธิภาพน้ำเชื้อในการปฏิสนธิกับไข่ ซึ่งเป็นวิธีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อแช่แข็ง การผสมเทียมทำได้โดยการรีดไข่แล้วนำน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อแช่แข็งมาผสมกับไข่ กระตุ้นด้วยการเติมน้ำลงไปเล็กน้อย เมื่อเกิดปฏิสนธิของไข่กับสเปิร์มแล้วดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงและประเมินอัตราการปฏิสนธิของไข่ (กฤษณ์ มงคลปัญญา, 2536)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่อุณหภูมิต่ำ (Low temperature of fish sperm)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบ่งเป็น 2 ประเภท คือ

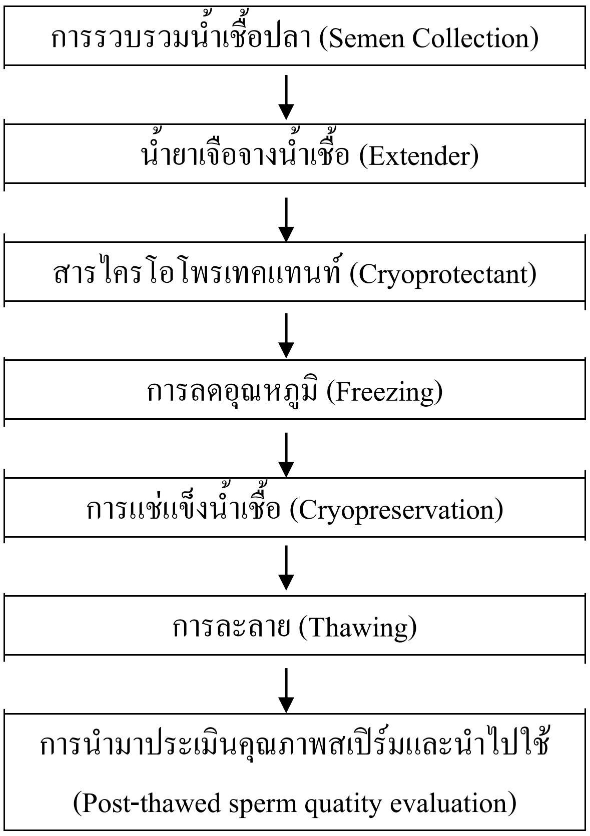
1. การเก็บรักษาระยะเวลาสั้น (Short or Chilled Storage)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อในระยะสั้นจัดเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อในตู้เย็นหรือถังน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บได้ในสภาพน้ำเชื้อเข้มข้นหรือเจือจางด้วยน้ำยาบัฟเฟอร์ (Extender) การเก็บรักษาน้ำเชื้อในลักษณะนี้สามารถเก็บได้นานเท่าไร ขึ้นอยู่กับการควบคุมไม่ให้สเปิร์มที่เจือจางในน้ำยาบัฟเฟอร์ถูกกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ ในขณะเก็บรักษา เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีโดยทั่วไปว่าสเปิร์มของปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำจืดจะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วและหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาที ดังนั้นการเลือกใช้น้ำยาบัฟเฟอร์ต้องมีความเหมาะสม เพราะถ้าใช้น้ำยาบัฟเฟอร์ที่ไม่เหมาะสมจะมีผลกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ซึ่งนั่นหมายถึงความล้มเหลวในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ เพราะสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ไปแล้วจึงไม่สามารถปฏิสนธิกับไข่ได้ เมื่อนำมาใช้ประโยชน์ในภายหลัง

2. การเก็บรักษาระยะเวลายาวโดยวิธีการแช่แข็ง (Cryopreservation)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ต้องมีการเลือกใช้สูตรน้ำยาที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อที่เหมาะสม ทั้งยังต้องทราบชนิด และระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ ซึ่งเป็นสารที่ช่วยป้องกันความเสียหายของเซลล์ในกระบวนการแช่แข็ง ระยะ Equilibration Time ช่วงเวลาหลังจากผสมน้ำเชื้อกับ

สารไครโอโพรเทคแทนท์ก่อนทำการลดอุณหภูมิแช่แข็ง และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม เนื่องจากตัวแปรเหล่านี้มีผลต่อการประสบผลสำเร็จในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา โดยการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาระยะเวลานานโดยวิธีการแช่แข็งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้ (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 วิธีการปฏิบัติในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยวิธีแช่แข็ง
ที่มา: วัฒนะ ลีลาภัทร (2551)

การรวบรวมน้ำเชื้อปลา (Semen collection)

การนำภาชนะมาใส่น้ำเชื้อปลาที่ได้มานั้นจะต้องเป็นภาชนะที่แห้ง สะอาด เช่นเดียวกัน ควรเป็นหลอดแก้วหรือกระบอกตวงที่มีระดับปริมาตร เพื่อจะได้ทำการบันทึกปริมาตรน้ำเชื้อที่นำมาใช้ในแต่ละครั้ง น้ำเชื้อปลาที่จะนำมาใช้ในการแช่แข็งจะต้องไม่มีการปนเปื้อนของเมือก น้ำเลือด ปัสสาวะ อุจจาระและของเสียอื่น ๆ (กฤษณ์ มงคงปัญญา และทัศนีย์ ภูมิพัฒน์, 2535)

น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อ (Extender)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาจำเป็นต้องใช้ Extender ในการเจือจางน้ำเชื้อปลา เพื่อยับยั้งไม่ให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของสเปิร์ม เพื่อให้สเปิร์มหยุดนิ่งไม่เกิดการเคลื่อนที่ก่อนการแช่แข็ง

(Suqet, Dreanno, Fauvel, Cosson, & Billard, 2000) นอกจากนี้น้ำยาเจือจางน้ำเชื้อยังเป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวสเปิร์ม ช่วยการทำงานของกระขบวนการเมแทบอลิซึม (สมร พรชื่นชูวงศ์, 2554) และยังช่วยในการเจือจางปริมาตรน้ำเชื้อที่มีความหนาแน่นสูง (พันล้านเซลล์/ มิลลิตร) ช่วยยืดอายุสเปิร์มให้นานขึ้น และคงความสามารถในการปฏิสนธิของสเปิร์ม (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551) เพื่อให้เกิดประโยชน์สูงสุดกับน้ำเชื้อปลาที่มีอยู่ในปริมาณจำกัด ดังนั้นในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นและเก็บรักษาแบบแช่แข็ง จึงจำเป็นต้องใช้ Extender มาเจือจางน้ำเชื้อ ซึ่งจะสามารถช่วยพัฒนาการเพาะพันธุ์ได้ นอกจากนี้การเลือกใช้ Extender ในการเจือจางน้ำเชื้อปลายังขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (เรณู ยาชิโร และนิพนธ์ เสนอินทร์, 2551) เช่น การใช้ Extender สูตร Calcium-free Hanks' balanced salt solution (Ca-F HBSS) สำหรับปลาดุก *Clarias macrocephalus* (Vuthiphandchai, Thadsri, & Nimrat, 2009)

สารไครโอโพรเทคเทนท์ (Cryoprotectant)

สารไครโอโพรเทคแทนท์ มีหน้าที่ ในการป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดการเสียหายจากการลดอุณหภูมิแช่แข็ง เนื่องจากกระบวนการแช่แข็งทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice cryctrl) ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตามสารไครโอโพรเทคแทนท์มีข้อเสีย คือ มีความเป็นพิษต่อเซลล์สเปิร์มหากใช้ความเข้มข้นสูง จึงต้องมีการประเมินความเป็นพิษของสารนี้ก่อนนำมาใช้ในการแช่แข็ง

สารไครโอโพรเทคแทนท์แบ่งออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้ (Muchlisin, 2005)

1. สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดซึมเข้าในเซลล์ (Permeating cryoprotectants)

สารไครโอโพรเทคแทนท์ในกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติในการป้องกันเซลล์ขณะแช่แข็งโดยจะลดอัตราการเกิดผลึกน้ำแข็งและลดขนาดของผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ป้องกันไม่ให้ขนาดของเซลล์เปลี่ยนแปลงที่มีสาเหตุจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารละลาย การเลือกใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ในกลุ่มนี้ขึ้นอยู่กับความสามารถในการซึมผ่านเข้าสู่ผนังเซลล์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้กันใน กลุ่มนี้ได้แก่ Dimethyl Sulfoxide (DMSO), Dimethyl Acetamide (DMA), Glycerol, Methanol, Propylene Glycol และ Ethylene Glycol เป็นต้น (Tiersch & Mazik, 2000)

2. สารไครโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่ไม่ซึมผ่านเซลล์ (Non-permeating cyoprotectants)

สารไครโอโพรเทคแทนท์ในกลุ่มนี้มีขนาดใหญ่ ไม่สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะใช้ร่วมกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ในกลุ่มแรก เพื่อเป็นการเสริมฤทธิ์ในการป้องกันเซลล์ สารไครโอโพรเทคแทนท์ในกลุ่มนี้นิยมใช้ที่ความเข้มข้นต่ำ (0.001-0.2 โมล) โดยสารไครโอโพรเทคแทนท์กลุ่มนี้ ได้แก่ น้ำตาล (Glucose, Sucrose)

โพลีเมอร์ (Dextran, Hydroxyethyl starch, Polyvinylpyrrolidone) โปรตีนไข่ชนิดต่าง ๆ ไข่แดง เซรุ่ม และนมผง (kimmed milk) (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551)

การลดอุณหภูมิ (Freezing)

การแช่แข็งเริ่มดำเนินการหลังจากปล่อยให้น้ำเชื้อหรือเซลล์ปรับตัวกับสารไครโอโพรเทคแทนท์ ช่วงระยะเวลาหนึ่งแล้วนำมาบรรจุใส่หลอดฟาง (French straw) หรือหลอดแช่แข็ง (Cryotube) เมื่อครบช่วงระยะเวลาที่ต้องการจึงทำการลดอุณหภูมิให้ต่ำลง เพื่อให้เซลล์หรือน้ำเชื้อแข็งตัว

การลดอุณหภูมิเป็นการเปลี่ยนแปลงสถานะของเซลล์ที่ต้องการแช่แข็งจากของเหลวมาเป็นของแข็ง การลดอุณหภูมิเป็นการสูญเสียความร้อนของสารละลายหรือเซลล์ที่ต้องการแช่แข็ง ซึ่งต่อมาจะเกิดจากเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็งและเกิดผลึกน้ำแข็ง เซลล์ที่อยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ในระหว่างกระบวนการแช่แข็ง เมื่ออุณหภูมิลดลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็งจะเกิดผลึกน้ำแข็งขึ้นกระจัดกระจายในเซลล์หรือภายนอกภายเซลล์ เมื่อน้ำกลายเป็นน้ำแข็งเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้สารละลายภายนอกเซลล์มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น ขบวนการนี้จะมีผลกระทบต่อเซลล์หากใช้อัตราลดอุณหภูมิที่ต่ำ ๆ เพราะจะทำให้เซลล์สูญเสียน้ำ (Dehydration) จากกระบวนการออสโมซีสโดยน้ำจะไหลจากความเข้มข้นสูงไปบริเวณที่มีความเข้มข้นอุณหภูมิต่ำ เพื่อรักษาความสมดุลระหว่างน้ำภายในเซลล์ ซึ่งสามารถทำให้เซลล์เสียหายได้ เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นสูง การใช้อัตราการลดอุณหภูมิสูง (High freezing rate) ในการแช่แข็งน้ำภายในเซลล์จะไม่ไหลออกจากเซลล์ ทั้งนี้เพราะน้ำภายในเซลล์เปลี่ยนสถานะเป็นของแข็งเสียก่อน อย่างไรก็ตามเซลล์มักจะเกิดความเสียหายจากผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ (Intercellular ice crystal) จึงทำให้เซลล์ไม่สามารถมีชีวิตได้ เนื่องจากได้รับความเสียหาย เพราะการใช้อัตราลดอุณหภูมิที่สูงและใช้เวลาน้อย จะทำให้เซลล์อยู่ในสภาวะความเข้มข้นสูง ระยะเวลาที่ยาวนาน ซึ่งจะสามารถทำให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ในขบวนการนี้เซลล์จะได้รับความเสียหายได้ในอุณหภูมิช่วง 0 ถึง -40 องศาเซลเซียส และถือเป็นช่วงที่เซลล์มักจะได้รับความเสียหาย (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551) วิธีการลดอุณหภูมิ เพื่อทำให้น้ำเชื้อหรือเซลล์แข็งตัว มีดังต่อไปนี้

1. การลดอุณหภูมิโดยใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Programmable freezer)

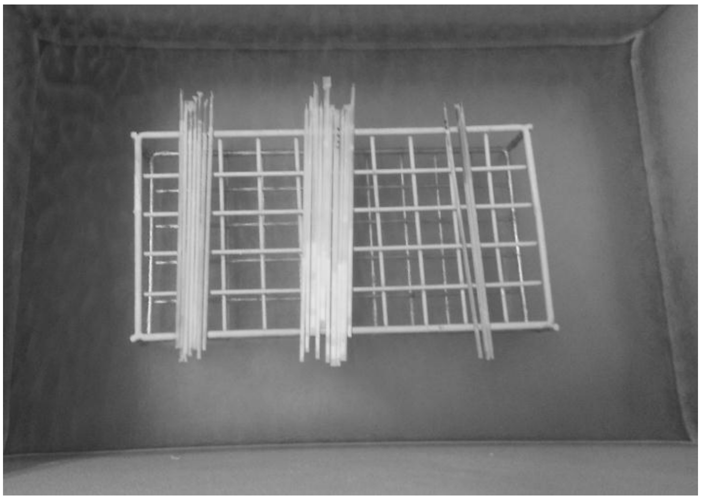
เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติเป็นอุปกรณ์ที่ใช้คอมพิวเตอร์ในการควบคุมการลดอุณหภูมิในการจ่ายไอไนโตรเจนเหลว จากถังเก็บไนโตรเจนเข้าสู่ช่องใส่ตัวอย่าง (Chamber) สามารถตั้งอัตราลดอุณหภูมิ จากคอมพิวเตอร์หรือส่วนควบคุมได้โดยตรงและมีความแม่นยำสูง ในปัจจุบันเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติมีจำนวนมากสามารถเลือกใช้ได้ตามปริมาณน้ำเชื้อและขนาดของทดลองที่ใช้ ข้อดีของเครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ คือมีอัตราลดอุณหภูมิที่สม่ำเสมอ แม่นยำและ

สามารถตั้งโปรแกรมให้ลดอุณหภูมิได้หลายขั้นตอน ส่วนข้อเสียคือไม่เหมาะกับการนำออกไปใช้ภาคสนามและมีราคาสูง

ภาพที่ 8 เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Controlled – rate programmable freezer)
ที่มา: นางสาวอมรรัตน์ กิระวานิชย์

2. การลดอุณหภูมิโดยใช้ไอไนโตรเจนเหลวจากกล่องโฟมหรือถังเก็บตัวอย่างแช่แข็ง (Liquid nitrogen vapor)

ด้วยเหตุที่ไนโตรเจนเหลวจะระเหยเป็นไอเย็นอยู่ตลอดเวลา แม้จะเก็บไว้ในถังเก็บไนโตรเจนเหลว ฉะนั้นการวางตัวอย่างที่ต้องการแช่แข็งด้วยไอไนโตรเจนเหลวจึงควรวางห่างจากผิวไนโตรเจนเหลวที่ระดับหนึ่ง ๆ ก็จะได้อัตราลดอุณหภูมิที่อัตราหนึ่ง อย่างไรก็ตามอัตราการลดอุณหภูมิจะไม่เที่ยงตรงมีโอกาสผกผันขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างในการวางตัวอย่างน้ำเชื้อที่ผิวหน้าไอไนโตรเจนเหลว และยังขึ้นอยู่กับขนาดของกล่องที่บรรจุไอไนโตรเจนเหลว หรือขนาดภาชนะที่บรรจุ ข้อดีคือ สามารถนำมาใช้งานสามารถนำไปใช้ในภาคสนามได้สะดวก และมีราคาถูก ข้อเสียคือ ความเที่ยงตรงของอัตราการลดอุณหภูมิต่ำกว่าการใช้เครื่องลดแบบอัตโนมัติ และต้องมีการคำนวณอัตราลดอุณหภูมิและระยะการวางตัวอย่างให้เหมาะสม



ภาพที่ 9 การใช้ไอไนโตรเจนเหลวลดอุณหภูมิ (Liquid nitrogen vapor)
ที่มา: นางสาวอมรรัตน์ กิระวานิชย์

3. การลดอุณหภูมิด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง (Dry ice)

น้ำแข็งแห้ง คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อยู่ในสถานะของแข็งหรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Solid Carbon Dioxide ซึ่งอุณหภูมิประมาณ -78.5 องศาเซลเซียส หรือ -109.3 ฟาเลนไฮต์ (Dunford, Lucas, Vent, Clark, & Cantrell, 2009) สูตรทางเคมีของน้ำแข็งแห้งเป็นสูตรเดียวกับคาร์บอนไดออกไซด์ปรกอบด้วย CO_2 คือ คาร์บอน 1 อะตอมและออกซิเจน 2 อะตอม น้ำแข็งแห้งเป็นการนำก๊าซคาร์บอนไซด์ออกไซด์โดยนำมาผ่านการอัดและทำให้เย็นตัวลง ภายใต้ความดันสูงจึงกลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เหลวแล้วจึงนำมาลดความดันอย่างรวดเร็ว โดยผ่านการพ่นคาร์บอนไดออกไซด์เหลวสู่บรรยากาศ สิ่งที่ได้คือผลึกน้ำแข็งคล้ายเกล็ดหิมะ จากนั้นจึงนำมาอัดเป็นรูปแบบต่าง ๆ ตามวัตถุประสงค์การนำไปใช้ เช่น แบบก้อน (Block) แบบแผ่น (Slice) แบบแท่ง (Pellet) น้ำแข็งแห้งมีความแตกต่างจากน้ำแข็งทั่วไปคือ อุณหภูมิความเย็น น้ำแข็งแห้งจะให้ความเย็นมากกว่าน้ำแข็งทั่วไป 2-3 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับน้ำแข็งปริมาตรเดียวกัน น้ำแข็งแห้งจะระเหิดกลายเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยไม่หลอมเหลวเหมือนน้ำแข็งทั่วไป (สุดาวรรณ อ่วมอ่อง, 2557)

กระบวนการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาโดยมีการวิธีการใช้น้ำแข็งแห้ง (Dry ice) ในการลดอุณหภูมิ ที่สามารถประสบความสำเร็จ ได้มีรายงานในการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาบางชนิดเช่น ปลา loach (Yasui et al., 2008) Zebra fish (Draper & Moens, 2009) และ common carp (Babiak & Glogowski, 1997) เป็นต้น

การละลาย (Thawing)

อุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายเซลล์แช่แข็งขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิ ความเข้มข้นของไครโอโพรเทคแทนท์ องค์ประกอบของน้ำยาที่ใช้เจือจาง และ Equilibration time รวมทั้งอัตราการละลาย (Thawing rate) โดยทั่วไปการละลายจะทำการละลายเซลล์แช่แข็ง จะทำการละลายใน Water bath ที่อุณหภูมิ 30-70 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับการทดลองในแต่ละชนิด (นลินี มารคแมน, 2527)

ประเภทวัสดุอุปกรณ์ห่อหุ้ม

หลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ยี่ห้อ IMV Technologies Paillette 0.25 ml) หลอดฟางผลิตมาจาก PVC (Polyvinyl chloride) ความหนาของหลอดฟาง 0.05 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.17 เซนติเมตร มีค่าการนำความร้อน 0.19 (W/m K) (The Engineering Tool Box, 2016)

Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร (Thermo scientific nunc cryotube vials 1.8 ml) ผลิตมาจาก Polypropylene ความหนาของ Cryotube 0.15 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.11 เซนติเมตร มีค่าการนำความร้อน 0.17 ถึง 0.22 (W/m K) (Ineos, 2014)

สายหลอดซิลิโคน (Silicone polymers) (Dura Siliconr tube ขนาด 5 x 9 mm.) สายซิลิโคนผลิตมาจากซิลิโคน ความหนาของสายหลอดซิลิโคน 0.99 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.48 เซนติเมตร มีค่าการนำความร้อน 0.14 (W/m K) (Clemens, 2001)

สายออกซิเจน (ท่อน้ำไทย THAI PIPE (5/32" x 1.5 ก.ก) สายออกซิเจน ผลิตมาจาก PVC (Polyvinyl chloride) ความหนาของสายออกซิเจน 0.195 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.495 เซนติเมตร มีค่าการนำความร้อน 0.19 (W/m K) (The Engineering Tool Box, 2016)

หลอด Centrifuge tube (nunc ขนาด 15 ml.) ผลิตมาจาก Polypropylene ความหนาของ Centrifuge tube 0.11 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.52 เซนติเมตร มีค่าการนำความร้อน 0.17 ถึง 0.22 (W/m K) (Ineos, 2014)

หลอดสายไฟฟ้า (300V. PVC/PVC 70°C VAF 2 x 1.5 SQ.MM. TABLE 2 THAI YAZAKI (W) TIS 11-2531) สายไฟฟ้าผลิตมาจาก PVC (Polyvinyl chloride) ความหนาของหลอดสายไฟฟ้า 0.14 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.39 เซนติเมตร มีค่าการนำความร้อน 0.19 (W/m K) (The Engineering Tool Box, 2016)

แผ่นสังกะสีห่อหุ้ม สังกะสีผลิตมาจาก สังกะสีมากกว่า 50 % เป็นโลหะเคลือบสังกะสี มีความหนาของ 0.03 เซนติเมตร มีค่าการนำความร้อน 166 (W/m K) (The Engineering Tool Box, 2016)

แผ่นอลูมิเนียมห่อหุ้ม แผ่นอลูมิเนียมผลิตมจากอลูมิเนียมผสมมีส่วน มีส่วนผสมขอม อลูมิเนียมบริสุทธิ์ ไม่น้อยกว่า 99% มีคุณสมบัติการขึ้นรูปที่ดี มีความหนาของแผ่น 0.03 เซนติเมตร มีค่าการนำความร้อน 76 (W/m K) (The Engineering Tool Box, 2016)

กระดาษฟอยล์ (Diamond Aluminum Foil) ฟอยล์ผลิตมาจากอลูมิเนียม ความหนาของกระดาษฟอลย์ 0.05 เซนติเมตร มีค่าการนำความร้อน 235 (W/m K) (The Engineering Tool Box, 2016)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Harvey, Keley and Smith (1982) ทำการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาม้าลาย *(Brachydanio rerio)* ด้วยน้ำแข็งแห้ง โดยใช้สารละลายที่ประกอบด้วย Fish ringer ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เมทานอล ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และ Skim milk powder 1.5 กรัม มาทำการเจือจางน้ำเชื้อปลาม้าลายในอัตราส่วนน้ำเชื้อ ต่อ สารละลาย เท่ากับ 1:5 จากนั้นนำตัวอย่างน้ำเชื้อเจือจางบรรจุลงในหลอด Centrifuge พลาสติก ขนาด 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ในหลอดทดลอง (Pyrex culture tube) ขนาด 12x100 มิลลิเมตร อีกครั้งก่อนนำหลอดตัวอย่างน้ำเชื้อไปฝังลงในน้ำแข็งแห้งเป็นระยะเวลา 20 นาที เพื่อลดอุณหภูมิตัวอย่างน้ำเชื้อให้เท่ากับ -79 องศาเซลเซียส และนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว นาน 25 วัน จากนั้นทำละลายตัวอย่างน้ำเชื้อปลาม้าลายแช่แข็งโดยตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง (25 องศาเซลเซียส) จนกระทั่ง น้ำเชื้อแช่แข็งเริ่มละลาย หลังจากนั้นทำการเจือจางน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลายทันที ด้วยสารละลาย Fish ringer ความเข้มข้น 40% ปริมาตร 10 เท่าของตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งหลังละลาย และทำการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อปลาม้าลายแช่แข็งหลังการละลาย ซึ่งจาการผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาม้าลายด้วยวิธีดังกล่าวนี้สามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลาม้าลายแช่แข็งหลังการละลายไว้ได้ โดยอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาม้าลายแช่แข็งหลังการละลาย มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 43 ± 12.3% และอัตราการเพาะฟักซึ่งมีค่าเท่ากับ 51±35.6% แปรผันตรงกับอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาม้าลายแช่แข็งหลังการละลาย

Babiak and Glogowski (1997) ทำการศึกษาและพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio L.*) ด้วยน้ำแข็งแห้ง โดยทำการเจือจางน้ำเชื้อปลาไน ด้วยชุดของสารละลาย Extender และ Cryoprotectant ที่แตกต่างกันทั้งหมด จำนวน 12 แบบ และการแช่แข็งโดยนำน้ำเชื้อปลาไนเจือจาง ปริมาตร 80 ไมโครลิตร มาหยดลงบนน้ำแข็งแห้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว เป็นระยะเวลา 2 วัน แล้วทำการสุ่มตัวอย่างน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้สารละลาย NaCl ความเข้มข้น

0.1-0.9% ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ต่อ ตัวอย่างน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็ง 1 เกล็ด หลังจากนั้นทำการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งหลังการละลายทันที ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการใช้สารละลาย BE2 Extender ร่วมกับ 10% Dimethyl-acetamide (DMA) และ 10% Egg yolk และการใช้สารละลาย Kurokura et al.'s Extender ร่วมกับ 15% DMA และ 10% Egg yolk ซึ่งแสดงอัตราการเพาะฟักเป็นระยะ Eyed eggs เท่ากับ 73% และ 69% ตามลำดับ และแสดงอัตราการเพาะฟักเป็นระยะ Swim-up larvae เท่ากับ 61% และ 52% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าอัตราเพาะฟักและอัตราการรอดชีวิตจากการอนุบาล ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

Muchlisin, Hashim, and Chong (2004) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากด *(Mystus nemurus)* ซึ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลองคือ ทดลองการสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ 3 ชนิด 3 ความเข้มข้น การใช้ Cryoprotectant จำนวน 4 ชนิด 3 ความเข้มข้น เมื่อเจือจางน้ำเชื้อปลากดแล้วนำน้ำเชื้อปลากดที่เจือจางแล้วมาบรรจุในหลอด Vials ขนาด 5 มิลลิลิตร นำน้ำเชื้อปลากดที่มีการเจือจางมาแช่ในถังน้ำแข็งแห้งนาน 5 นาที เมื่อครบระยะเวลาแล้วจึงนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลานาน 15 วัน จากนั้นนำสารละลายน้ำเชื้อไปทำการละลายโดยใช้อัตราการละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาที ปรากฏว่าน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยสาร 10% Methanol ได้ผลการทดลองดีที่สุดโดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 58% ซึ่งสูงกว่าสาร Cryoprotectants ชนิดอื่น ๆ ที่ทุกความเข้มข้น

Kusuda et al. (2005) ทำการทดองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาแซลมอน (*Hucho perryi*) ที่ใกล้สูญพันธุ์ โดยนำน้ำเชื้อปลาแซลมอนมาเจือจางในสารละลาย Extenders สูตร Fetal bovine serum (FBS) และ Cryoprotectant ชนิด 3 คือ Glycerol, Dimethyl sul-foxide (DMSO) และ Methanol นำสารละลายน้ำเชื้อปลาแซลมอนมาเจือจาง 3 แบบคือ 10% Glycerol + 90% FBS, 10% DMSO + 90% FBS และ 10% Methanol + 90% Glucose นำน้ำเชื้อปลาแซลมอนที่เตรียมจะแช่แข็งมา 100 ไมโครลิตร มาหยดบนน้ำแข็งแห้งทิ้งไว้เป็นระยะเวลา 5 นาที ย้ายมาเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 19 วัน นำน้ำเชื้อปลาแซลมอนแช่แข็งมาละลาย โดยใช้ Thawing solution 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วินาที ปรากฏว่าไม่พบความแตกต่างทางสถิติระหว่างสารละลายน้ำเชื้อทั้ง 3 แบบคือ 10% glycerol + 90% FBS, 10% DMSO + 90% FBS และ 10% Methanol + 90% Glucose จึงมีความเหมาะสมในการใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sakhalin taimen (*Hucho perryi*)

Yasui et al. (2008) ได้พัฒนาขบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในปลา loach *(Misguruns anguillicaudatus)* โดยใช้หลอดฟาง 0.25 มิลลิลิตร ในการบรรจุน้ำเชื้อปลา loach เจือจาง จึงทำการพัฒนาอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดน้ำเชื้อในการแช่แข็งในหลอด 3 ชนิดที่ได้ดัดขึ้นมาเองและใช้อุปกรณ์ที่

มีอยู่ทั่ว ๆ ไป ดังนี้ หลอดที่ 1 ใช้ Polyurethane pipe, vinyl adhesive (ชั้นที่ 1), cryogenic straw tube, vinyl adhesive (ชั้นที่ 2) หลอดที่ 2 ใช้อุปกรณ์หุ้มเหมือนหลอดที่1 แต่เพิ่มหลอดฉีดยาขนาด 1 ml. หลอดที่ 3 หลอดฉีดยาขนาด 1 ml. เพียงอย่างเดียว จากนั้นเก็บไว้ในน้ำแข็งแห้งนาน 2 นาที โดยมีอัตราลดอุณหภูมิ -421.4±119.84 (control), -55.8 ± 4.32 (หลอด 1), -40.2 ± 3.43 (หลอด 2) และ -33.3 ± 2.09 ºC/นาที (หลอด 3) ย้ายเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว เก็บไว้นาน 3 ชั่วโมง นำมาละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 10 วินาที จากผลการทดลองปรากฏว่าน้ำแข็งที่แช่แข็งด้วยรูปแบบหลอดที่ 3 ไม่มีความแตกต่างกับการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อสดที่ 83 ± 5% (72 ± 3%) ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ 146 ± 12 s และอัตราการฟัก 29 ± 04%

Draper et al. (2009) ได้ศึกษาวิธีการพัฒนาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาม้าลาย Zebrafish โดยนำน้ำเชื้อปลาม้าลายมาศึกษาในสูตรน้ำยาเจือจางที่แตกต่างกันจำนวน 2 สูตร สูตรที่ 1 น้ำยาเจือจาง Extender Ginsburg Fish Ringers 10 มิลลิลิตร และ Powdered Skin Milk 1.5 มิลลิกรัม ส่วนสูตรที่ 2 คือ น้ำยาเจือจาง Exterder Ginsburg Fish Ringers 10 มิลลิลิตร Powdered Skin Milk 1.5 มิลลิกรัม และ Methanol 1 มิลลิลิตร เมื่อทำการเจือจางน้ำยาเจือจางและน้ำเชื้อปลาม้าลายที่ได้มา 3.3 ไมโครลิตร นำน้ำเชื้อปลาม้าลายที่มีการเจือจางมา 10 ไมโครลิตร จึงใส่ใน 2.0 ml Cryogenic vials และใส่ใน 15 ml Conical tubes อีกหนึ่งชั้น จากนั้นนำมาใส่ใน 10 x 10 Cryoboxes ที่มีน้ำแข็งแห้งบดละเอียด นาน 20 นาที จากนั้นย้ายไปเก็บไว้ในถังไนโตรเจน เก็บรักษาไว้ 8 ปี (ตั้งแต่ปี 2001-2008) นำมาละลายในอุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส 8-10 วินาที ผลการปฏิสนธิพบว่าสเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่มีค่าเฉลี่ย 30% และสามารถปฏิสนธิได้สูงถึง 62% ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์และสารเคมี

1. ตัวอย่างพ่อปลาตะเพียนเพศผู้ที่สมบูรณ์เพศ อายุประมาณ 3-4 ปี
2. อุปกรณ์ที่ใช้ในการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อและเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง

2.1 สายหลอดซิลิโคนรูใส (Dura Siliconr tube ขนาด 5 x 9 mm.)

2.2 สายออกซิเจน (ท่อน้ำไทย THAI PIPE (5/32" x 1.5 ก.ก))

2.3 หลอด Centrifuge tube (nunc ขนาด 15 ml)

2.4 หลอดสายไฟฟ้า (300V. PVC/PVC 70^{o}C VAF 2 x 1.5 SQ.MM. TABLE 2 THAI YAZAKI (W) TIS 11-2531)

2.5 แผ่นสังกะสี

2.6 แผ่นอะลูมิเนียม

2.7 กระดาษฟอยล์ (Diamond Aluminum Foil)

2.8 หลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ยี่ห้อ IMV Technologies Paillette 0.25 ml)

2.9 หลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Thermo scientific nunc cryotube vials 1.8 ml

2.10 ถุงมือกันความเย็น

2.11 กาวซิลิโคน ยี่ห้อ GP Silicone sealant

2.12 ถาดรอง

2.13 แอลกอฮอล์

2.14 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)

3. อุปกรณ์ที่ใช้ในการเก็บน้ำเชื้อ

3.1 จานรองน้ำเชื้อ (Petri dish)

3.2 น้ำแข็ง

3.3 Tissue culture flask

3.4 ไมโครปิเปต

3.5 ฟอร์เซป

3.6 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.7 ผ้าขนหนู

3.8 กระดาษทิชชู่

4. อุปกรณ์และเครื่องมือในการแช่แข็ง

4.1 ถุงซิปล็อค (Zip lock bag)

4.2 น้ำแข็งแห้ง (Dry ice)

4.3 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

4.4 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส

4.5 กล่องโฟมเก็บความเย็น (Styrofoam box) ขนาด 20 x 33.5 x 25 เซนติเมตร

4.6 กล่องโฟม ขนาด 45 x 60 x 30 เซนติเมตร

4.7 ถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) (TAYLOR-WHARTON HC 34)

5. อุปกรณ์ในการตรวจสอบคุณภาพของสเปิร์ม

5.1 Hot plate

5.2 เทอร์โมมิเตอร์

5.3 กล้องจุลทรรศน์และกระดาษเช็ดเลนส์

5.4 Slide และ Cover slide

5.5 Oil

5.6 Hemacytometer

5.7 Thermometer Microprocessor K-Thermocouple HI 91530K

5.8 Eosin-Nigrosin

5.9 น้ำยาทาเล็บสีใส

5.10 น้ำกลั่น

6. สารเคมีในการเก็บแช่แข็งน้ำเชื้อ

6.1 Extender สูตร Calcium-free Hanks' balanced salt solution (Ca–F HBSS) NaCl 0.8890 g, KCI 0.0440 g, Na_2HPO_4-$2H_2O$ 0.0130 g, $NaHCO_3$ 0.0390 g, KH_2PO_4 0.0070 g, $MgSO_4$-$7H_2O$ 0.0220 g, Glucose 0.1110 g, น้ำกลั่น 100 ml ปรับpH ให้ได้ 7.6 (Vuthiphandchai et al, 2009)

6.2 Dimethyl sulfoxide (DMSO) 20%

วิธีการดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัยแบ่งเป็น 3 การทดลองหลักดังนี้

1. ศึกษาผลของอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดน้ำเชื้อ (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร มีต่อการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

2. ศึกษาผลของอุปกรณ์ห่อหุ้ม Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่มีผลต่อการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

3. ศึกษาการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาตะเพียนขาวไว้ในรูปแบบต่าง ๆ ด้วยน้ำแข็งแห้ง

การเก็บรวบรวมน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

พ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวอายุ 3-4 ปี ที่เลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ได้เลี้ยงแบบขุนเพื่อให้เป็นพ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวโดยให้อาหารเม็ดคุณภาพสูง 2-3 เดือน ให้อาหารปลาสำเร็จรูปชนิดลอยน้ำ อาหารปลาขนาดกลาง ยี่ห้อเซฟฟี่ฟีช ซึ่งมีปริมาณโภชนาการคือ โปรตีนไม่น้อยกว่า 30% ไขมันไม่น้อยกว่า 6% ความชื้นไม่มากกว่า 12% กากไม่มากกว่า 6% ก่อนทำการวบรวมเก็บน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวด้วยการงดอาหารปลา 1-2 วัน ก่อนรวบรวมน้ำเชื้อ

นำพ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวที่ใช้ในการรวบรวมน้ำเชื้อมาทำความสะอาดบริเวณท้องด้วยน้ำสะอาดและเช็ดบริเวณหน้าท้องมาถึงครีบก้น ให้แห้งใช้มือในการรีดน้ำเชื้อปลาตั้งแต่หน้าท้องมาถึงช่องเพศ ให้น้ำเชื้อปลาไหลออกมา น้ำเชื้อที่ไหลออกมาจะมีลักษณะขาวขุ่น โดยนำน้ำเชื้อที่ได้มาใช้ในการทดลองต้องไม่มีการเจือปนของหยดน้ำ เลือด ปัสสาวะ และอุจจาระ เมื่อได้น้ำเชื้อสีขาวขุ่นจึงนำมาใส่ในจานเพาะเชื้อ (Petri dish) ที่มีอยู่วางบนน้ำแข็งที่เตรียมไว้ จากนั้นจึงนำไปประเมินคุณภาพสเปิร์มของปลาตะเพียนขาวก่อนนำไปทำการทดลอง

การประเมินคุณภาพของสเปิร์ม

1. เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

การประเมินการเคลื่อนที่และระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มพ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวจะทำพร้อม ๆ กันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า ที่รวบรวมมาด้วยวิธีการใช้มือบีบรีดบริเวณท้องปลาตั้งแต่หน้าท้องมาถึงช่องเพศ นำน้ำเชื้อที่ได้มาผสมกับบัพเฟอร์สูตร Calcium-free Hanks' balanced salt solution (Ca–F HBSS) ในอัตราส่วน 1:1 โดยนำน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวมา 2,000 ไมโครลิตร ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ ที่มีชื่อว่า Calcium-free Hanks' balanced salt solution (Ca–F HBSS) 2,000 ไมโครลิตร ใน Tissue culture flask ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันแล้วนำไปวางบนน้ำแข็ง

การประเมินการเคลื่อนที่ และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อแช่ แข็งทำโดย นำไมโครปิเปตโหลด Extended milt ขึ้นมา 15 ไมโครลิตร ใส่ในแผ่น Slide และนำแผ่น Cover slide มาหยดน้ำกลั่นลงไป 20 ไมโครลิตร นำแผ่น Cover slide มาปิดประกบลงไปกับแผ่น Slide ที่มี Extened milt อยู่ทำการขยับแผ่น Cover slide ไปมาพร้อมกับการจับเวลา เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนของสเปิร์มและระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มใช้วิธีการของ Vuthiphandchai & Zohar (1999) และระยะการเคลื่อนที่ของสเปิร์มทำการจับเวลาเริ่มจาก สเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นจนกระทั่งสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ จับเวลาเป็นวินาที ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

2. เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์ม

ในการหาเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใช้วิธีการย้อมสีด้วยสี Eosin-Nigrosin โดยนำ Extended milt มาใช้ในการตรวจจากนั้นไปประเมินภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

การประเมินการมีชีวิตของสเปิร์มในน้ำเชื้อแช่แข็งทำโดยแบ่ง Slide ออกเป็น 2 ส่วน ส่วนด้านซ้ายใช้ไมโครปิเปตโหลด Extended milt 15 ไมโครลิตร มาใส่ในแผ่น Slide ส่วนด้านขาวให้หยด 0.5% Eosin และ 10% Nigrosin ใช้ Cover slide เกลี่ยสีทั้ง 2 ให้เข้ากัน เกลี่ยสีไปหา Extended milt เกลี่ยไปมา 2-3 รอบ จากนั้นเกลี่ยส่วนที่เหนียวหนืดน้ำเชื้อทิ้งไป (ทำให้บางที่สุด) นำ Slide ไปผ่านเปลวไฟไปมา 1-2 วินาที ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นใช้น้ำยาทาเล็บสีใสมาทา ให้ทั่ว slide (ทาบาง ๆ) (เรณู ยาชิโร และนิพนธ์ เสนอินทร์, 2551) ตัวสเปิร์มที่มีชีวิตอยู่จะไม่ติดสีที่ใช้ย้อม และตัวสเปิร์มที่ตายจะติดสีย้อม ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ โดยสุ่มนับสเปิร์มในสไลด์ในจำนวน 300 ตัว

$$\text{\% Sperm viability} = \frac{\text{จำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตทั้งหมด(ตัวเป็น)} \times 100}{\text{จำนวนสเปิร์มทั้งหมด (ตัวเป็น + ตัวตาย)}}$$

3. ความหนาแน่นของสเปิร์ม

การหาค่าความหนาแน่นของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวทำได้โดยน้ำเชื้อสดมาผสมกับน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1500 เท่า (สมร พรชื่นชูวงศ์, 2554) เขย่าให้เข้ากัน ใช้สไลด์นับเม็ดเลือด Hemocytometer ที่มีแผ่น Cover slide ปิดอยู่ นำไมโครปิเปตมาโหลดน้ำเชื้อมาใส่ใน Hemocytometer วางทิ้งไว้ 10 นาที (พลชาติ ผิวเณร และคณะ, 2550) จากนั้นทำการนับเซลล์สเปิร์มน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว นับที่มุมของ Hemocytometer ทั้ง 4 มุม และช่องตรงกลาง (รวมแล้วจะได้ 5 ช่อง) กลางภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400 เท่า

$$\text{จำนวนสเปิร์ม/มิลลิลิตร} = \frac{(\text{รวมจำนวนที่นับได้ทั้ง 5 บริเวณ}) \times 25 \times \text{dilution rate} \times 10^4}{5}$$

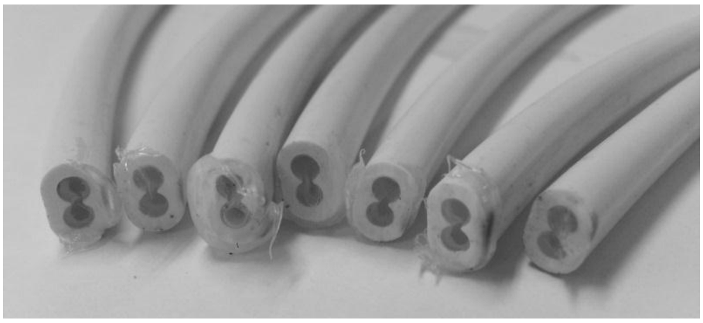
การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

นำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่รวบรวมได้ใหม่ ๆ มาผสมกับ Extender สูตร Calcium-free Hanks' balanced salt solution (Ca-F HBSS) ในอัตราส่วน 1:1 และผสม DMSO 20% อีกครั้ง แล้วจะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ DMSO เป็น 10% จากนั้นใช้หลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร นำไมโครปิเปตโหลดน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางเข้าในหลอดฟางในปริมาณ 80 ไมโครลิตร/หลอดฟาง ปิดปลายหลอดฟาง โดยใช้ฟอร์เซปผ่านไฟตะเกียงแอลกอฮอล์ไปมาแล้ว นำมาคีบปิดปลายหลอด ให้เรียบร้อยแล้วนำไปใช้ในการทดลองที่ 1

สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ที่เตรียมน้ำเชื้อโดยนำมาเจือจางใน Ca–F HBSS และ DMSO ตามวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว แต่นำมาใส่ Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ใช้ไมโครปิเปตโหลดน้ำเชื้อเข้ามาในหลอด 800 ไมโครลิตร ปิดฝาขวดให้เรียบร้อยแล้วนำไปใช้ในการทดลองที่ 2

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดน้ำเชื้อ (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่มีต่อการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

1. นำหลอดสายไฟฟ้า ขนาด 300 V VAF 2 x 1.5 SQ.MM. ความหนาของหลอดสายไฟ 0.14 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.39 เซนติเมตร (ภาพที่ 10) มาใช้ในการทดลองโดยนำมาเอาสายทองแดงด้านใน ออกให้หมด ได้เป็นหลอดสายไฟฟ้า ตัดสายไฟให้ได้ขนาดความยาว 12.5 เซนติเมตร นำกาวซิลิโคนมาปิดปลายด้านใดด้านหนึ่งของสายไฟฟ้า นำหลอดฟางมาใส่ในช่องของหลอดสายไฟ ช่องละ 1 หลอด นำสายออกซิเจน มาตัดให้มีความยาว 12.5 เซนติเมตร แล้วนำกาวซิลิโคนไปปิดปลายสายด้านใดด้านหนึ่ง สายออกซิเจนมีความหนา 0.195 เซนติเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.495 เซนติเมตร นำหลอดฟางมาใส่ในช่องของสายออกซิเจนจำนวน 2 หลอด และนำสายหลอดซิลิโคน มาตัดให้มีความยาว 12.5 เซนติเมตร แล้วนำกาวซิลิโคนไปปิดปลายสายด้านใดด้านหนึ่ง สายหลอดซิลิโคนมีความหนาของสายหลอดซิลิโคน 0.99 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.48 เซนติเมตร นำหลอดฟางมาใส่ในช่องของสายหลอดซิลิโคนจำนวน 3 หลอด และหลอด Centrifuge tube มีความยาวของหลอด 15 เซนติเมตร นำหลอดฟางมาตัดให้สั้น ขนาด 12 เซนติเมตร นำหลอดฟางใส่ลงไปใน Centrifuge tube จำนวน 3 หลอด หลอด Centrifuge tube ความหนา 0.11 เซนติเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.52 เซนติเมตร



ภาพที่ 10 ปิดปลายหลอดสายไฟฟ้าด้วยกาวซิลิโคลน

2. นำหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่เตรียมจะทำการแช่แข็งที่ภายในมีน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางด้วย Ca-F HBSS และ DMSO มาใส่ในอุปกรณ์ที่ เตรียมไว้ (สายหลอดซิลิโคน สายออกซิเจน หลอดสายไฟฟ้า หลอด Centrifuge tube และหลอดน้ำเชื้อเปล่าที่ไม่ได้ห่อหุ้ม) แล้วจึงนำไปใส่ในกล่องโฟมเก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งแห้งบดละเอียด เป็นกล่องเก็บความเย็น 2 ชั้น กล่องโฟมเก็บความเย็นมีขนาด 20 x 33.5 x 25 เซนติเมตร ใช้น้ำแข็งบดละเอียด 15 กิโลกรัม (¾ ของกล่อง) เก็บไว้ในน้ำแข็งแห้งด้วยระยะเวลาแตกต่างกันคือ 10, 20 และ 30 นาที

3. จากนั้นเมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้จึงนำหลอดฟางมาละลายด้วยอุณหภูมิที่ต่างกันและระยะเวลาการละลายต่างกันดังนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	**ระยะเวลาในการละลาย (วินาที)**
10	20
20	15
30	10
40	8
50	5
60	4
70	3

จากนั้นนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ละลาย (Thawing) ไปประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มตามวิธีการที่ได้กล่าวมาแล้ว

5. นำอุปกรณ์ที่ห่อหุ้มที่ให้ผลการประเมินที่ดีที่สุดมาใช้ในการทดลองที่ 3

6. การทดลองทั้งหมดทำ 3 ซ้ำ และทำการทดลองในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ของปลาตะเพียนขาว

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุปกรณ์ห่อหุ้ม Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่มีผลต่อการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

1. นำอุปกรณ์ห่อหุ้ม Cryotube 1.8 มิลลิลิตร ที่กำหนดไว้คือ แผ่นอะลูมิเนียม แผ่นสังกะสี และกระดาษฟอยล์ มาตัดตามขนาดของ Cryotube โดยตัดให้มีขนาดกว้าง 4 เซนติเมตร ยาว 3 เซนติเมตร (ภาคที่ 15, 16 และ 17) ซึ่งแผ่นสังกะสีมีความหนาของ 0.03 เซนติเมตร แผ่นอะลูมิเนียมมีความหนาของ 0.03 เซนติเมตร และกระดาษฟอยล์มีความหนาของ 0.01 เซนติเมตร

2. นำไมโครปิเปตมาโหลดน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เตรียมไว้ เจือจางด้วย Ca–F HBSS และ DMSO ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10% จากนั้นมาใส่ใน Cryotube ปริมาตร 800 ไมโครลิตร

3. นำอุปกรณ์ห่อหุ้ม Cryotube ที่เตรียมไว้มาห่อหุ้ม Cryotube

4. นำไปใส่ในกล่องโฟมเก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งแห้งบดละเอียด เพื่อทำการลดอุณหภูมิเป็นเวลานาน 10, 20 และ 30 นาที แช่แข็งในกล่องโฟม 20 x 33.5 x 25 เซนติเมตร ใส่น้ำแข็งแห้งบดละเอียดลงไป ¾ ของกล่อง

5. เมื่อครบเวลาที่กำหนดก็นำ Cryotube ออกมาละลายน้ำโดยมาเพิ่มอุณหภูมิ เพื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์ม ตามอุณหภูมิและระยะเวลาในการละลายดังต่อไปนี้

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	**ระยะเวลาในการละลาย (วินาที)**
30	120
40	90
50	60
60	45

6. นำอุปกรณ์ห่อหุ้มที่พิจารณาให้ผลดีที่สุดมาใช้ในการทดลองต่อไป (การทดลองที่ 3)

7. การทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ และการทดลองทั้งหมดทำในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ของปลาตะเพียนขาว

การทดลองที่ 3 ศึกษาการพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาตะเพียนขาวไว้ในรูปแบบต่าง ๆ ด้วยน้ำแข็งแห้ง

1. นำหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร และใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ใช้วัสดุห่อหุ้มที่ให้ผลการประเมินดีที่สุด ที่ใช้วัสดุห่อหุ้มที่ให้ผลการทดลองดีที่สุดมาทำการลดอุณหภูมิด้วยน้ำแข็งแห้ง ตามวิธีการทดลองที่ 1 และ 2

2. หลังจากการแช่แข็งน้ำเชื้อเอาอุปกรณ์ห่อหุ้มออกให้เหลือแต่หลอดเปล่าแล้วไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง (-20 และ -80 องศาเซลเซียส) นำชุดการทดลองที่เก็บรักษาแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งมาไว้ในกล่องโฟมขนาด 20 x 38.5 x 25 เซนติเมตร เติมน้ำแข็งแห้งแบบสลับวันเว้นวัน เติมลงไป ¾ ของกล่องโฟม จากนั้นนำกล่องโฟมที่บรรจุตัวอย่างน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว มาเก็บไว้ในกล่องโฟมใหญ่อีกครั้ง กล่องโฟมขนาดใหญ่ (25 x 60 x 30เซนติเมตร) วางไว้ในห้องทดลอง อุณหภูมิห้องทดลองอยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส และชุดการทดลองที่นำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้นาน 28 วัน ทั้งหลอดฟางและ Cryotube

3. จากนั้นประเมินผลการเก็บรักษาทุก ๆ 7 วัน

4. การละลายน้ำเชื้อในหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร นำมาละลายตามอุณหภูมิและเวลาในการละลายตามการทดลองที่ 1

5. อัตราการละลายน้ำเชื้อ Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร นำมาละลายตามอุณหภูมิและเวลาในการละลายตามการทดลองที่ 2

การทดลองทำทั้งหมด 3 ซ้ำ และการทดลองทั้งหมดทำในในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ของปลาตะเพียนขาว

บทที่ 4
ผลการวิจัย

การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง (*Barbodes gonionotus*) ได้ผลการวิเคราะห์ข้อมูลดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดน้ำเชื้อ (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่มีต่อการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

การแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำยา Extender สูตร Ca-F HBSS และ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10% โดยนำหลอดฟางไปใส่ในอุปกรณ์ห่อหุ้ม 4 ชนิด คือ สายหลอดซิลิโคน สายออกซิเจน หลอด Centrifuge tube และ หลอดสายไฟฟ้า จากนั้นนำไปลดอุณหภูมิโดยนำไปใส่ในกล่องโฟมเก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งแห้งบดละเอียดเป็นเวลานาน 10, 20 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้นำหลอดฟางบรรจุน้ำเชื้อออกจากอุปกรณ์ห่อหุ้ม แล้วนำหลอดฟางมาละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แข็งด้วยการใช้อุณหภูมิละลายที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ในเวลาที่ต่างกัน จากนั้นนำหลอดฟางที่ละลายมาวัดอุณหภูมิอุณหภูมิภายในหลอดน้ำเชื้อ และประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าที่แช่แข็งไว้นาน 10 นาที เมื่อนำไปละลายที่อุณหภูมิระหว่าง 30 องศาเซลเซียส 10 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยเท่ากับ 78±2.22 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ 90±9.52 วินาที การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม 86±3.29 เปอร์เซ็นต์ มีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่หุ้มในขณะที่หลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคนที่แช่แข็งไว้นาน แช่แข็งนาน 30 นาที นำมาละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 10 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 49±4.84 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ 97±11.48 วินาที การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม 37±4.58 เปอร์เซ็นต์ น้ำเชื้อแช่แข็งที่หุ้มด้วยสายออกซิเจนที่แช่แข็งไว้นาน 30 นาที ละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 10 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 47±5.77 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ 93±8.07 วินาที การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม 44±5.54 เปอร์เซ็นต์ หลอด Centrifuge tube แช่แข็งนาน 10 นาที นำมาละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 10 วินาที ที่ช่วงระยะเวลาเดียวกันโดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยมีค่าเท่ากับ 47±4.71 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ 83±13.03 วินาที การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม 56±7.35 เปอร์เซ็นต์ สำหรับน้ำเชื้อ

แช่แข็งในกลุ่มควบคุม (Control) ซึ่งไม่มีอุปกรณ์ห่อหุ้ม แช่แข็งนาน 20 นาที นำมาละลายที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส 20 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มเท่ากับ 38±2.22 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ 57±10.75 วินาที การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม 22±2.71 เปอร์เซ็นต์ อัตราการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำแข็งแห้งสำหรับน้ำเชื้อแช่แข็งในกลุ่มควบคุม (Control) ซึ่งไม่มีอุปกรณ์ห่อหุ้ม สายหลอดซิลิโคน สายออกซิเจน หลอดCentrifuge tube และหลอดสายไฟ สามารถลดอุณหภูมิได้ -78.8, -21, -37.2, -28 และ -31 องศาเซลเซียส/นาที

1. การทดสอบผลของการเก็บรักษาน้ำเชื้อและระยะเวลาในการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางที่ไม่ได้ใช้อุปกรณ์ห่อหุ้ม (Control) ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง

1.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยไม่ได้ใช้อุปกรณ์ห่อหุ้ม (Control)การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) โดยไม่มีอุปกรณ์ห่อหุ้มนาน 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นครบเวลาที่กำหนดไว้นำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อ มาละลายหลังการแช่แข็งเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Post thawed-sperm motility) ที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้อุณหภูมิในการละลายที่ 10 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับ 40, 60 และ 70 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายที่ 20 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ส่วนการใช้อุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับอุณหภูมิทุกอุณหภูมิในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ระยะเวลาในการแช่แข็งนาน 10, 20 และ 30 นาที ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ตารางที่ 1)

1.2 การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยไม่ได้ใช้อุปกรณ์ห่อหุ้ม (Control) การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการละลาย มีความแตกต่างกันโดยระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อทำการละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับอุณหภูมิ 10, 60 และอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส แต่ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิที่ 20, 40 และ 50 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งนาน 10, 20 และ 30 นาที ไม่มีผลทำให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ตารางที่ 2)

1.3 การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยไม่ได้ใช้อุปกรณ์ห่อหุ้ม (Control) การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียน หลังการละลายที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกันพบว่าเปอร์เซ็นต์

การมีชีวิตรอดของสเปิร์มเมื่อนำมาละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดที่การใช้อุณหภูมิในการละลายที่ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งนาน 10, 20 และ 30 นาที ไม่มีผลทำให้การมีชีวิตของสเปิร์มมีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ตารางที่ 3)

1.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการลายละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยไม่ได้ใช้อุปกรณ์ห่อหุ้ม (Control) การประเมินอุณหภูมิหลังการละลาย (Post-thawed temperature) ของน้ำเชื้อในหลอดฟางที่ถูกนำไปละลาย (Thawing) แล้วนำมาวัดอุณหภูมิภายในหลอดพบว่า เมื่อใช้อุณหภูมิที่ 50 และ 70 องศาเซลเซียส อุณหภูมิของน้ำเชื้อหลังละลายมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับอุณหภูมิที่ 40 และ 60 องศาเซลเซียส และพบว่าชุดอุณหภูมิที่กล่าวมาในข้างต้นยังมีความแตกต่างกับอุณหภูมิในการละลายที่ 10, 20 และ 30 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) จึงทำให้อุณหภูมิหลังการละลายภายในหลอดฟางขนาด ขนาด 0.25 มิลลิลิตร มีความแตกต่างกันไปตามลำดับอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็ง 10 และ 30 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับเวลาในการแช่แข็ง 20 นาที (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 1 เปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาต่างกัน และละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

การละลาย น้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
10˚C /20S	33±8.16^{1}	38±2.22^{1}	33±4.71^{1}
20˚C /15S	33±6.67^{12}	31±4.84^{12}	33±3.33^{12}
30˚C /10S	29±4.84^{123}	33±4.71^{123}	33±3.33^{123}
40˚C /8S	22±2.22^{234}	33±3.33^{234}	22±5.21^{234}
50˚C /5S	24±4.44^{123}	24±2.94^{123}	33±3.33^{123}
60˚C /4S	27±5.77^{34}	27±3.33^{34}	20±0.00^{34}
70˚C /3S	18±4.01^{4}	24±2.94^{4}	16±5.56^{4}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 2 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาต่างกัน และละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

การละลายน้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
10˚C /20S	63±10.36^{3}	57±10.75^{1}	73±12.18^{1}
20˚C /15S	70±14.51^{123}	74±9.50^{123}	102±14.62^{123}
30˚C /10S	96±7.15^{1}	75±10.37^{1}	101±16.92^{1}
40˚C /8S	75±8.74^{123}	100±11.89^{123}	59±16.40^{123}
50˚C /5S	87±14.12^{12}	99±13.02^{12}	81±12.68^{12}
60˚C /4S	65±15.59^{23}	80±15.21^{23}	55±12.4^{23}
70˚C /3S	52±14.35^{3}	92±14.49^{3}	47± 6.54^{3}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาต่างกัน และละลายที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน

การละลายน้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
10˚C /20S	20±3.54^{1}	22±2.71^{1}	25±2.98^{1}
20˚C /15S	33±4.54^{1}	24±4.12^{1}	27±3.91^{1}
30˚C /10S	25±3.06^{1}	23±3.79^{1}	23±2.27^{1}
40˚C /8S	31±4.07^{1}	29±3.30^{1}	23±6.33^{1}
50˚C /5S	24±2.19^{1}	22±2.68^{1}	19±1.67^{1}
60˚C /4S	20±3.89^{1}	23±3.73^{1}	23±1.72^{1}
70˚C /3S	15±3.27^{2}	21±2.72^{2}	10±3.38^{2}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4 อุณหภูมิหลังการลายละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน หลอดฟางขนาด ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้ง ที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กัน ในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
10˚C /20S	16±0.44[5,a]	16±0.04[1,b]	16±0.14[1,a]
20˚C /15S	20±0.35[4,a]	18±0.19[4,b]	18±0.14[4,a]
30˚C /10S	26±0.24[3,a]	26±0.17[3,b]	27±1.12[3,a]
40˚C /8S	30±0.30[2,a]	31±0.19[2,b]	30±0.16[2,a]
50˚C /5S	31±0.05[1,a]	31±0.18[1,b]	31±0.11[1,a]
60˚C /4S	31±0.21[2,a]	31±0.15[2,b]	31±0.15[2,a]
70˚C /3S	32±0.18[1,a]	31±0.21[1,b]	32±0.15[1,a]

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

2. การทดสอบผลของเก็บรักษาน้ำเชื้อและระยะเวลาในการลดอุณหภูมิ ต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง

2.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในน้ำแข็งแห้งโดยมีสายหลอดซิลิโคนเป็นอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งไว้นาน 10, 20 และ 30 นาที ก่อนทำการละลายที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิในการละลายที่ 10, 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตาม ช่วงระยะเวลาในการแช่แข็งที่ 10, 20 และ 30 นาที เปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 5)

2.2 การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน หลังจากการละลายที่อุณหภูมิต่างกัน ที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับการละลายที่

70 องศาเซลเซียส ส่วนการระยะเวลาในการแช่แข็ง 10, 20 และ 30 นาที ไม่มีความแตกต่างต่อระยะเวลาในการเคลื่อนของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 6)

2.3 การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน มีความแตกต่างกันจากอุณหภูมิในการละลายทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด ที่อัตราการละลายที่อุณหภูมิ 20 และ 50 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) อุณหภูมิ 10, 30 และ 40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีผลให้การมีชีวิตของสเปิร์มความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับอุณหภูมิข้างต้น ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งที่ 10 และ 20 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับการมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวในเวลาการแช่แข็ง 30 นาที (ตารางที่ 7)

2.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการลายละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน

การวัดอุณหภูมิหลังการละลายของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ใช้สายหลอดซิลิโคนห่อหุ้มหลอดฟาง (Post-thawed temperature) เมื่อนำหลอดฟางมาละลาย แล้วนำมาวัดอุณหภูมิหลังการละลายที่ 50 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิหลังการละลายมีความแตกต่างกับอุณหภูมิที่ 40 และ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และยังแตกต่างกับอุณหภูมิหลังการละลายที่ 10, 20 และ 30 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับอุณหภูมิที่กล่าวมาในข้างต้น ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็ง 10 และ 30 นาที มีความแตกต่างกับอุณหภูมิหลังการละลายที่ระยะเวลาในการแช่แข็ง 20 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10˚C /20S	47 ± 8.16^{1}	40 ± 3.33^{1}	38 ± 4.01^{1}
20˚C /15S	47 ± 4.71^{1}	40 ± 4.71^{1}	42 ± 2.22^{1}
30˚C /10S	40 ± 5.77^{1}	38 ± 5.21^{1}	49 ± 4.84^{1}
40˚C /8S	44 ± 2.94^{1}	42 ± 5.21^{1}	36 ± 6.48^{1}
50˚C /5S	40 ± 3.33^{2}	29 ± 3.51^{2}	31 ± 4.84^{2}
60˚C /4S	31 ± 3.51^{2}	27 ± 3.33^{2}	22 ± 2.22^{2}
70˚C /3S	9 ± 3.51^{3}	22 ± 2.22^{3}	11 ± 3.51^{3}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 6 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10˚C /20S	113 ± 17.85^{1}	92 ± 9.65^{1}	96 ± 8.78^{1}
20˚C /15S	85 ± 15.55^{1}	80 ± 11.92^{1}	88 ± 16.31^{1}
30˚C /10S	114 ± 17.59^{1}	109 ± 10.67^{1}	97 ± 11.48^{1}
40˚C /8S	86 ± 15.11^{1}	91 ± 16.77^{1}	101 ± 13.34^{1}
50˚C /5S	78 ± 10.88^{1}	106 ± 20.77^{1}	83 ± 14.20^{1}
60˚C /4S	106 ± 12.48^{1}	75 ± 12.21^{1}	93 ± 14.95^{1}
70˚C /3S	22 ± 11.59^{2}	99 ± 15.39^{2}	32 ± 12.14^{2}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ใช้แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วยสายสายหลอดซิลิโคน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	**20**	**30**
10˚C /20S	$44\pm6.57^{12,a}$	$32\pm4.05^{12,a}$	$33\pm4.71^{12,b}$
20˚C /15S	$42\pm4.98^{1,a}$	$47\pm4.33^{1,a}$	$37\pm2.88^{1,b}$
30˚C /10S	$33\pm7.02^{12,a}$	$46\pm3.65^{12,a}$	$37\pm4.58^{12,b}$
40˚C /8S	$36\pm5.65^{12,a}$	$38\pm4.90^{12,a}$	$29\pm4.45^{12,b}$
50˚C /5S	$50\pm7.71^{1,a}$	$42\pm3.46^{1,a}$	$29\pm5.75^{1,b}$
60˚C /4S	$35\pm5.48^{2,a}$	$40\pm5.78^{2,a}$	$21\pm3.39^{2,b}$
70˚C /3S	$10\pm4.22^{3,a}$	$23\pm1.93^{3,a}$	$11\pm3.69^{3,b}$

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 8 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางเมื่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	**20**	**30**
10˚C /20S	$17\pm0.12^{5,a}$	$16\pm0.14^{5,b}$	$17\pm0.25^{5,a}$
20˚C /15S	$20\pm0.13^{4,a}$	$17\pm0.04^{4,b}$	$19\pm0.26^{4,a}$
30˚C /10S	$28\pm0.06^{3,a}$	$29\pm0.25^{3,b}$	$28\pm0.28^{3,a}$
40˚C /8S	$30\pm0.40^{2,a}$	$31\pm0.27^{2,b}$	$31\pm0.21^{2,a}$
50˚C /5S	$31\pm0.16^{1,a}$	$31\pm0.18^{1,b}$	$31\pm0.23^{1,a}$
60˚C /4S	$30\pm0.12^{2,a}$	$31\pm0.21^{2,b}$	$31\pm0.21^{2,a}$

ตารางที่ 8 (ต่อ)

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
70˚C /3S	31±0.32[1,a]	31±0.25[1,b]	31±0.35[1,a]

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

3. การทดสอบผลของเก็บรักษาน้ำเชื้อและระยะเวลาในการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจนด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง

3.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจน

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในน้ำแข็งแห้ง โดยมีสายออกซิเจนเป็นอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดฟางนาน 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นครบเวลาที่กำหนดไว้นำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อออกจากสายออกซิเจนเพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่า ที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ตารางที่ 9)

3.2 การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจน

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่ในหลอดฟางที่หุ้มด้วยสายออกซิเจน มีความแตกต่างกันเมื่อใช้อุณหภูมิละลายต่างกันการละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับการละลายที่ 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งการละลายด้วยอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายที่ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ 10, 50 และ 70 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่ามีนัยสำคัญ (P>0.05) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งที่ 10 นาที ไม่มีผลทำให้ระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) กับการแช่แข็งนาน 20 และ 30 นาที แต่เวลาในการแช่แข็งนาน 20 และ 30 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ตารางที่ 10)

3.3 การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจน

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจน มีความแตกต่างกันเมื่อละลายที่อุณหภูมิต่างกันจึงทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม อุณหภูมิที่ละลาย 30 องศาเซลเซียส แตกต่างกับการละลายที่อุณหภูมิ 10, 20, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่กำหนด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) อุณหภูมิในการละลายที่ 50 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิในการละลายที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) อุณหภูมิในการประเมินการมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่ 50 และ 70 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว 10 นาที มีผลทำให้การมีชีวิตรอดของสเปิร์มแตกต่างกับการมีสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) กับการแช่แข็งนาน 20 และ 30 นาที (ตารางที่ 11)

3.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจน

อุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจน (Post-thawed temperature) ของหลอดฟางที่ถูกนำไปละลาย แล้วนำมาวัดอุณหภูมิของน้ำเชื้อหลังการละลายมีความแตกต่างกันที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับน้ำเชื้อในหลอดฟางหลังการละลายที่อุณหภูมิ 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ (P<0.05) เมื่อวัดอุณหภูมิหลังการละลายที่ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิหลังการละลายที่ 70 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่าง (P>0.05) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ 10 นาที เมื่อนำมาวัดอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลาย พบว่ามีความแตกต่างกับการแช่แข็งที่ระยะเวลา 20 และ 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางเมื่อห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
10˚C /20S	$29±4.84^{2}$	$29±3.51^{2}$	$44±4.44^{2}$
20˚C /15S	$38±2.22^{12}$	$42±4.01^{12}$	$38±2.22^{12}$
30˚C /10S	$38±5.21^{1}$	$44±4.44^{1}$	$47±5.77^{1}$
40˚C /8S	$44±2.94^{12}$	$38±6.19^{12}$	$33±3.33^{12}$
50˚C /5S	$38±4.01^{3}$	$27±3.33^{3}$	$16±5.56^{3}$
60˚C /4S	$24±2.94^{3}$	$27±3.33^{3}$	$27±3.33^{3}$
70˚C /3S	$27±3.33^{3}$	$22±2.22^{3}$	$11±4.84^{3}$

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 10 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วยสายออกซิเจน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
10˚C /20S	$83±18.00^{23,ab}$	$74±14.62^{23,a}$	$64±12.21^{23,b}$
20˚C /15S	$110±12.01^{1,ab}$	$94±14.58^{1,a}$	$114±13.43^{1,b}$
30˚C /10S	$81±14.08^{12,ab}$	$109±11.49^{12,a}$	$93±8.07^{12,b}$
40˚C /8S	$84±17.36^{12,ab}$	$108±10.88^{12,a}$	$80±3.44^{12,b}$
50˚C /5S	$99±17.52^{23,ab}$	$61±14.84^{23,a}$	$51±16.69^{23,b}$
60˚C /4S	$114±8.72^{1,ab}$	$110±18.86^{1,a}$	$97±11.26^{1,b}$
70˚C /3S	$50±13.24^{3,ab}$	$93±12.76^{3,a}$	$33±17.91^{3,b}$

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วยสายออกซิเจน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
น้ำแข็ง	**10**	**20**	**30**
10˚C /20S	$35\pm8.50^{2,a}$	$27\pm4.77^{2,b}$	$40\pm4.71^{2,b}$
20˚C /15S	$64\pm6.96^{2,a}$	$43\pm5.62^{2,b}$	$31\pm 4.78^{2,b}$
30˚C /10S	$54\pm7.19^{1,a}$	$55\pm3.84^{1,b}$	$44\pm5.54^{1,b}$
40˚C /8S	$52\pm3.25^{2,a}$	$44\pm7.21^{2,b}$	$41\pm4.36^{2,b}$
50˚C /5S	$25\pm5.68^{34,a}$	$23\pm6.05^{34,b}$	$12\pm4.38^{34,b}$
60˚C /4S	$18\pm2.71^{3,a}$	$22\pm 5.65^{3,b}$	$24\pm2.44^{3,b}$
70˚C /3S	$17\pm3.35^{4,a}$	$13\pm1.07^{4,b}$	$7\pm2.89^{4,b}$

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 12 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่หอหุ้มด้วยสายออกซิเจน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
น้ำแข็ง	**10**	**20**	**30**
10˚C /20S	$16\pm0.18^{6,c}$	$16\pm0.12^{6,b}$	$16\pm0.19^{6,a}$
20˚C /15S	$18\pm0.16^{5,c}$	$19\pm0.17^{5,b}$	$18\pm0.15^{5,a}$
30˚C /10S	$28\pm0.20^{4,c}$	$28\pm0.14^{4,b}$	$29\pm0.12^{4,a}$
40˚C /8S	$30\pm0.09^{3,c}$	$30\pm0.05^{3,b}$	$30\pm0.13^{3,a}$
50˚C /5S	$31\pm0.21^{1,c}$	$31\pm0.15^{1,b}$	$32\pm0.15^{1,a}$
60˚C /4S	$31\pm0.10^{2,c}$	$31\pm0.08^{2,b}$	$31\pm0.20^{2,a}$
70˚C /3S	$30\pm0.12^{2,c}$	$31\pm0.22^{2,b}$	$31\pm0.41^{2,a}$

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

4. การทดสอบผลของเก็บรักษาน้ำเชื้อและระยะเวลาในการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง

4.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง โดยมีหลอด Centrifuge tube เป็นอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดฟางบรรจุน้ำเชื้อนาน 10, 20 และ 30 นาที แล้วนำเอาเฉพาะหลอดฟางไปละลายหลังการแช่แข็งที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลาที่ต่างกัน พบว่าอุณหภูมิในการละลายส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ในการละลายน้ำเชื้อที่ 30 องศาเซลเซียส มีผลทำให้มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับอุณหภูมิที่ 10, 20, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส แต่การใช้อุณหภูมิที่ 10, 20, 40 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ระยะเวลาในการแช่แข็งที่ 20 และ 30 นาที มีความแตกต่างกับระยะเวลาในการแช่แข็ง 10 นาที ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ตารางที่ 13)

4.2 การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube มีความแตกต่างกันเมื่อใช้อุณหภูมิในการละลายต่างกันโดยระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อใช้การละลายที่อุณหภูมิที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับระยะเวลาในการเคลื่อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) อุณหภูมิที่ 30 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างสำหรับเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) อุณหภูมิที่ 50 และ 70 องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งที่ 10 และ 20 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับการแช่แข็งนาน 30 นาที (ตารางที่ 14)

4.3 การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube มีความแตกต่างกันเมื่อใช้อุณหภูมิในการละลายต่างกัน เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่ทำการละลายที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) กับอุณหภูมิ30 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิละลายที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) กับอุณหภูมิ

40 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) กับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ขณะเดียวกันอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับอุณหภูมิที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งที่ 10 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับการแช่แข็งนาน 20 และ 30 นาที (ตารางที่ 15)

4.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการลายละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟาง ขนาด ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube

อุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Polystyene (Post-thawed temperature) เมื่อนำไปละลายที่อุณหภูมิต่างกันแล้วนำมาวัดอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลายพบว่ามีความแตกต่างกันที่อุณหภูมิที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทุกอุณหภูมิกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้งนาน 20 และ 30 นาที มีผลทำให้อุณหภูมิหลังการละลายมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) การแช่แข็งนาน 10 นาที (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
10˚C /20S	27±3.33^{2,a}	36±2.94^{2,b}	29±3.51^{2,b}
20˚C /15S	31±3.51^{2,a}	33±4.71^{2,b}	36±4.44^{2,b}
30˚C /10S	47±4.71^{1,a}	36±4.44^{1,b}	42±4.01^{1,b}
40˚C /8S	40±5.77^{2,a}	22±4.01^{2,b}	29±33.51^{2,b}
50˚C /5S	40±3.33^{3,a}	7±3.33^{3,b}	4±2.93^{3,b}
60˚C /4S	31±4.84^{2,a}	22±2.22^{2,b}	27±4.71^{2,b}
70˚C /3S	16±4.44^{4,a}	4±2.94^{4,b}	2±2.22^{4,b}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 14 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่หลอด Centrifuge tube ห่อหุ้มในแช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10˚C /20S	119±14.54 [1,a]	125±10.13 [1,a]	85±16.82 [1,b]
20˚C /15S	105±19.11 [1,a]	113±11.27 [1,a]	115±9.29 [1,b]
30˚C /10S	83±13.03 [12,a]	117±5.54 [12,a]	74±13.38 [12,b]
40˚C /8S	107±18.31 [2,a]	68±15.15 [2,a]	54±9.16 [2,b]
50˚C /5S	49±10.64 [3,a]	25±15.93 [3,a]	22±14.42 [3,b]
60˚C /4S	106±10.62 [12,a]	104±7.10 [12,a]	78±13.27 [12,b]
70˚C /3S	27±10.82 [3,a]	12±10.59 [3,a]	12±12.22 [3,b]

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10˚C /20S	32±6.67 [2,a]	52±6.07 [2,b]	37±7.93 [2,b]
20˚C /15S	43±7.42 [12,a]	41±6.97 [12,b]	48±8.88 [12,b]
30˚C /10S	56±7.35 [1,a]	39±7.06 [1,b]	58±7.29 [1,b]
40˚C /8S	50± 8.19 [2,a]	23±6.80 [2,b]	30±5.60 [2,b]
50˚C /5S	56±5.17 [3,a]	7±3.56 [3,b]	3±2.52 [3,b]
60˚C /4S	31±7.31 [3,a]	17±1.88 [3,b]	20±3.57 [3,b]

ตารางที่ 15 (ต่อ)

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
70˚C /3S	13± 3.56^{4,a}	3±1.84^{4,A}	1 ±1.11^{4,b}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 16 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่หลอด Centrifuge tube ห่อหุ้มในแช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10˚C /20S	15±0.13^{6,b}	15±0.16^{6,a}	17±0.14^{6,a}
20˚C /15S	21±0.14^{5,b}	22±0.21^{5,a}	18±0.18^{5,a}
30˚C /10S	24±0.06^{4,b}	27±0.16^{4,a}	28±0.04^{4,a}
40˚C /8S	28±0.26^{3,b}	31±0.16^{3,a}	29±1.00^{3,a}
50˚C /5S	30±0.28^{2,b}	32±0.14^{2,a}	32±0.22^{2,a}
60˚C /4S	31±0.10^{2,b}	31±0.15^{2,a}	31±0.24^{2,a}
70˚C /3S	32±0.22^{1,b}	32±0.25^{1,a}	32±0.10^{1,a}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

5. การทดสอบผลของเก็บรักษาน้ำเชื้อและระยะเวลาในการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง

5.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง โดยมีหลอดสายไฟฟ้าเป็นอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดฟางนาน 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นครบเวลาที่กำหนดไว้นำหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อออกมาจากหลอดสายไฟฟ้าที่ห่อหุ้ม แล้วมานำไปละลายหลังการแช่แข็งเพื่อประเมินการเคลื่อนที่สเปิร์มด้วยกันที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลาที่ต่างกัน พบว่า เมื่อทำการละลายที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในตัวอย่างน้ำเชื้อแช่แข็งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) แต่การละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิที่ 10, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กันกับทุกอุณหภูมิที่กล่าวมาในข้างต้น ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อนาน 10, 20 และ 30 นาที มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ตารางที่ 17)

5.2 การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า มีความแตกต่างกันเมื่อใช้อุณหภูมิละลายต่างกัน ที่ผลการศึกษาปรากฏว่าการละลายน้ำเชื้อที่ 10, 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่มีความแตกต่างกันกับการละลายอุณหภูมิที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวนาน 10, 20 และ 30 นาที ไม่มีผลให้ระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ตารางที่ 18)

5.3 การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าใช้ มีความแตกต่างกันเมื่อใช้อุณหภูมิในการละลายต่างกัน โดยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด ของสเปิร์มที่ละลายที่อุณหภูมิ 10, 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่การละลายอุณหภูมิที่ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งที่น้ำเชื้อนาน 10, 20 และ 30 นาที มีผลทำให้การมีชีวิตของสเปิร์มความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ตารางที่ 19)

5.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการลายละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟาง ขนาด ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า

อุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วย

หลอดสายไฟฟ้า (Post-thawed temperature) แล้วนำมาวัดอุณหภูมิของน้ำเชื้อหลังการละลายที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวนาน 20 และ 30 นาที มีผลทำให้อุณหภูมิน้ำแข็งหลังการละลายมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกันการแช่แข็งนาน 10 นาที (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
10˚C /20S	$60\pm4.7^{2,a}$	$73\pm3.33^{2,b}$	$62\pm4.01^{2,c}$
20˚C /15S	$71\pm3.51^{1,a}$	$76\pm2.94^{1,b}$	$71\pm3.51^{1,c}$
30˚C /10S	$78\pm2.22^{1,a}$	$76\pm2.94^{1,b}$	$78\pm2.22^{1,c}$
40˚C /8S	$73\pm3.33^{1,a}$	$76\pm2.94^{1,b}$	$73\pm3.33^{1,c}$
50˚C /5S	$76\pm2.94^{3,a}$	$76\pm2.94^{3,b}$	$22\pm7.03^{3,c}$
60˚C /4S	$67\pm6.67^{4,a}$	$7\pm3.33^{4,b}$	$0\pm0.00^{4,c}$
70˚C /3S	$9\pm3.51^{5,a}$	$7\pm3.33^{5,b}$	$9\pm3.51^{5,c}$

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 18 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	**20**	**30**
10°C /20S	100±11.47^{12}	103±8.98^{12}	98±5.13^{12}
20°C /15S	128±12.82^{1}	115±13.91^{2}	127±16.41^{2}
30°C /10S	90±9.52^{12}	102±7.75^{12}	127±10.11^{12}
40°C /8S	109±11.06^{12}	112±10.93^{12}	107±11.98^{12}
50°C /5S	98±11.00^{2}	121±10.68^{2}	71±20.02^{2}
60°C /4S	121±5.03^{3}	39±19.84^{3}	0±0.00^{3}
70°C /3S	51±0.06^{3}	28±15.77^{3}	56±22.43^{3}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	**20**	**30**
10°C /20S	83±1.29^{1,a}	86±1.82^{1,b}	83 ± 2.59^{1,c}
20°C /15S	85±3.12^{1,a}	88±2.45^{1,b}	81 ± 4.47^{1,c}
30°C /10S	86±3.29^{1,a}	86±2.49^{1,b}	84 ± 4.94^{1,c}
40°C /8S	84±3.06^{1,a}	78±2.05^{1,b}	83 ± 3.25^{1,c}
50°C /5S	84±2.50^{2,a}	78±1.99^{2,b}	27±10.62^{2,c}
60°C /4S	79±8.17^{3,a}	4±2.15^{3,b}	0±0.00^{3,c}

ตารางที่ 19 (ต่อ)

การละลาย น้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
70°C /3S	5±1.92^{4,a}	5±2.33^{4,b}	6±2.26^{4,c}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 20 อุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางเมื่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	15.1±0.28^{7,b}	14.9±0.08^{7,a}	15.8±0.22^{7,a}
20°C /15S	18.1±0.21^{6,b}	20.5±0.98^{6,a}	19.0±0.22^{6,a}
30°C /10S	22.1±0.71^{5,b}	26.7±0.51^{5,a}	26.3±0.33^{5,a}
40°C /8S	27.0±0.46^{4,b}	28.5±0.43^{4,a}	29.0±0.15^{4,a}
50°C /5S	29.4±0.22^{3,b}	29.8±0.16^{3,a}	31.0±0.23^{3,a}
60°C /4S	29.4±0.21^{2,b}	31.9±0.19^{2,a}	31.6±0.26^{2,a}
70°C /3S	31.7±0.17^{1,b}	31.9±0.19^{1,a}	32.0±0.24^{1,a}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่มีต่อการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

การแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำยา Extender สูตร Ca-F HBSS และ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10% จากนั้นนำหลอด Cryotube ที่มีน้ำเชื้อมาใส่ในอุปกรณ์

ห่อหุ้ม 3 ชนิด คือ แผ่นสังกะสี แผ่นอะลูมิเนียม และ กระดาษฟอยล์ จึงนำไปลดอุณหภูมิโดยนำไปใส่ในกล่องโฟมเก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งแห้งบดละเอียดนาน 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นครบเวลาที่กำหนดไว้ นำหลอด Cryotube บรรจุน้ำเชื้อแช่แข็งออกจากอุปกรณ์ห่อหุ้มแต่ละชนิดแล้วนำมาละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ในเวลาที่ต่างกันจนน้ำเชื้อละลาย จากนั้นนำมาวัดอุณหภูมิภายในหลอดน้ำเชื้อ แล้วนำไปประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งในหลอด Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ไว้นาน 30 นาที ละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 45 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 80±0.00 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ 126±11.53 วินาที การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม 86±2.22 เปอร์เซ็นต์ หลอด Cryotube ที่ไม่ได้ห่อหุ้มอุปกรณ์ห่อหุ้ม (Control) แช่แข็งไว้นาน 20 นาที ละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 45 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 80±0.00 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ 85±6.06 วินาที การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม 82±3.75 เปอร์เซ็นต์ หลอด Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียมเมื่อแช่แข็งไว้นาน 20 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยเท่ากับ 53±3.33 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ 66±7.08 วินาที การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม 50±3.02 เปอร์เซ็นต์ และหลอด Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสีเมื่อแช่แข็งไว้นาน 20 นาที ละลายที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 45 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 27.33±2.45 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ 71±7.73 วินาที การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม 27±3.33 เปอร์เซ็นต์ ชนิดของวัสดุห่อหุ้ม Cryotube ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ในน้ำแข็งแห้งมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์ การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ตามลำดับ อัตราการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำแข็งแห้ง น้ำเชื้อแช่แข็งในกลุ่มควบคุม (Control) ใน Cryoyube ซึ่งไม่มีอุปกรณ์ห่อหุ้ม Cryoyube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี แผ่นอลูมิเนียม และกระดาษฟลอย์ สามารถลดอุณหภูมิได้ -72.6, -26.6, -16.9, และ -43.8 องศาเซลเซียส/นาที ตามลำดับ

1. การทดสอบผลของเก็บรักษาน้ำเชื้อและระยะเวลาในการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ที่ไม่ใช้อุปกรณ์ห่อหุ้ม (Control) ต่อคุณภาพน้ำแข็งหลังการละลาย

1.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotubeขนาด 1.8 มิลลิลิตร โดยไม่ได้ใช้อุปกรณ์ห่อหุ้ม (Control)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) โดยบรรจุน้ำเชื้อลงใน cryo tube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร แล้วนำไปแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งโดยไม่มีอุปกรณ์ห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม)นาน 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นครบเวลาที่กำหนดไว้นำหลอด Cryotube ที่บรรจุน้ำเชื้อมา

ละลาย เพื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (Post – thawed sperm motility) ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ที่เวลาที่ต่างกันพบว่าระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อและอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งนาน 10, 20 และ 30 นาที การใช้อุณหภูมิในการละลายที่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ตารางที่ 21)

1.2 การประเมินระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotubeขนาด 1.8 มิลลิลิตร โดยไม่ได้ใช้อุปกรณ์ห่อหุ้ม (Control)

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวใน cryotube ของกลุ่มควบคุมที่แช่แข็งนาน 30 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับการแช่แข็งที่ 10 และ 20 นาที ซึ่งมีระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังถูกกระตุ้นสั้นกว่า ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งที่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีผลทำให้ระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ตารางที่ 22)

1.3 การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร โดยไม่ได้ใช้อุปกรณ์ห่อหุ้ม (Control)

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ของกลุ่มควบคุม (Control) เมื่อแช่แข็งนาน 10, 20 และ 30 นาที พบว่าไม่มีความแตกต่างในระยะเวลาการแช่แข็งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ส่วนการใช้อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งที่ 50 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การมีชีวิตของสเปิร์มมีความแตกต่างกับการละลายอุณหภูมิ 30, 40 และ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อมีการย้อมสีเพื่อดูการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม (ตารางที่ 23)

1.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร โดยไม่ได้ใช้อุปกรณ์ห่อหุ้ม (Control)

อุณหภูมิของน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย (Post – thawed Temperature) ในหลอด Cryotube หลังการนำไปละลาย (Thawing) ที่อุณหภูมิ 60, 50, 40 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีผลทำให้อุณหภูมิน้ำเชื้อมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ส่วนอุณหภูมิหลังการละลายเมื่อแช่แข็งนาน 30 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับเวลาที่ใช้ในการแช่แข็งนาน 10 และ 20 นาที (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 21 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ของกลุ่มควบคุม (Control) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
30˚C /120S	73±3.33[a]	69±3.51[a]	69±4.84[a]
40˚C /90S	73±3.33[a]	73±3.33[a]	69±3.51[a]
50˚C /60S	71±3.51[a]	69±3.51[a]	71±4.84[a]
60˚C /45S	67±3.33[a]	80±0.00[a]	73±3.33[a]

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 22 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ของกลุ่มควบคุม (Control) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
30˚C /120S	87±6.76[b]	79±10.09[b]	105±10.90[a]
40˚C /90S	82±6.56[b]	93±9.44[b]	113±14.13[a]
50˚C /60S	83±7.47[b]	89±5.60[b]	115±8.74[a]
60˚C /45S	102±9.41[b]	85±6.06[b]	111±16.27[a]

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 23 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ของกลุ่มควบคุม (Control) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
30˚C /120S	78±3.68[2]	79±3.17[2]	87±2.33[2]
40˚C /90S	84±3.22[2]	79±3.24[2]	86±2.28[2]
50˚C /60S	76±4.00[1]	80±4.23[1]	89±2.29[1]
60˚C /45S	74±2.80[2]	82±3.75[2]	83±3.73[2]

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 24 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในกลุ่มควบคุม (Control) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
30˚C /120S	8.4±0.12[4,b]	9.3±0.23[4,b]	10.3±0.19[4,a]
40˚C /90S	12.5±0.31[3,b]	10.9±0.22[3,b]	11.6±0.34[3,a]
50˚C /60S	13.4±0.31[2,b]	14.5±0.27[2,b]	15.1±0.72[2,a]
60˚C /45S	16.3±0.50[1,b]	16.2±0.26[1,b]	17.7±0.32[1,a]

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

2. การทดสอบผลของเก็บรักษาน้ำเชื้อและระยะเวลาในการลดอุณหภูมิ ต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ที่หุ้มด้วยแผ่นสังกะสี ต่อคุณภาพน้ำแข็งหลังการละลาย

2.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว หลังการแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง ที่แช่แข็งใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำแข็งแห้ง โดยบรรจุน้ำเชื้อลงใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร โดยใช้แผ่นสังกะสีเป็นอุปกรณ์ห่อหุ้ม Cryotube และแช่แข็งนาน 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นครบเวลาที่กำหนดไว้นำหลอดน้ำ Cryotube ที่บรรจุมาน้ำเชื้อมาละลายหลังการแช่แข็งที่อุณหภูมิ ที่เวลาที่ต่างกัน พบว่าระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยการแช่แข็ง 20 นาที มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนทีของสเปิร์ม แตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เปรียบเทียบกับการแช่แข็งนาน 10 นาที แต่ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) กับการแช่แข็งนาน 30 นาที ส่วนอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ตารางที่ 25)

2.2 การประเมินระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งใน Cryotubeขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งใน Cryotube นาน 20 และ 30 นาที พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับการแช่แข็งนาน 10 นาที ซึ่งสเปิร์มมีระยะเวลาในการเคลื่อนที่หลังถูกกระตุ้นสั้นกว่า ส่วนการใช้อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งที่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีผลต่อระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 26)

2.3 การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งใน Cryotube นาน 10, 20 และ 30 นาที พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) การใช้อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 27)

2.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการลายละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี

อุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อแช่แข็งใน Cryotube หลังนำไปละลาย (Thawing) แล้วนำมาวัดอุณหภูมิของน้ำเชื้อหลังการละลายที่อุณหภูมิ 60, 50, 40 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่า

มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ส่วนอุณหภูมิของน้ำเชื้อหลังการละลายเมื่อแช่แข็งนาน 10, 20 และ 30 นาที พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 28)

ตารางที่ 25 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
น้ำแข็ง	**10**	**20**	**30**
30˚C /120S	16 ± 5.56^{b}	24 ± 5.56^{a}	24 ± 2.94^{ab}
40˚C /90S	13 ± 4.71^{b}	24 ± 4.44^{a}	16 ± 4.44^{ab}
50˚C /60S	11 ± 4.84^{b}	20 ± 5.77^{a}	18 ± 4.01^{ab}
60˚C /45S	18 ± 5.21^{b}	27 ± 3.33^{a}	16 ± 4.44^{ab}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 26 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
น้ำแข็ง	**10**	**20**	**30**
30˚C /120S	31 ± 10.46^{b}	48 ± 11.38^{a}	107 ± 16.73^{a}
40˚C /90S	35 ± 12.12^{b}	65 ± 10.44^{a}	47 ± 13.87^{a}
50˚C /60S	39 ± 17.29^{b}	61 ± 16.67^{a}	79 ± 18.07^{a}
60˚C /45S	47 ± 13.08^{b}	71 ± 7.73^{a}	58 ± 18.61^{a}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 27 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
30˚C /120S	24±2.90[a]	35±3.88[a]	26±3.78[a]
40˚C /90S	24±2.72[a]	28±4.67[a]	32±5.26[a]
50˚C /60S	23±2.30[a]	28 ±4.45[a]	34±4.72[a]
60˚C /45S	27±3.49[a]	27±3.33[a]	27±3.27[a]

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 28 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นสังกะสี โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
30˚C /120S	8.7±0.14[4,c]	10.4±0.30[4,a]	9.8±0.51[4,b]
40˚C /90S	9.5±0.27[3,c]	13.6±0.63[3,a]	11.9±0.40[3,b]
50˚C /60S	12.9±0.14[2,c]	16.1±0.30[2,a]	14.9±0.41[2,b]
60˚C /45S	16.6±0.42[1,c]	16.5±0.56[1,a]	16.7±0.38[1,b]

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

3. การทดสอบผลของเก็บรักษาน้ำเชื้อและระยะเวลาในการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ที่หุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียมต่อคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย

3.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว หลังการแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง ที่แช่แข็งใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียม

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้ง โดยบรรจุน้ำเชื้อลงใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร และใช้แผ่นอะลูมิเนียมเป็นอุปกรณ์ห่อหุ้ม Cryotube นาน 10, 20 และ 30 นาที ขณะแช่แข็ง จากนั้นครบเวลาที่กำหนดนำ Cryotube มาละลายหลังการแช่แข็ง พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งโดยมีแผ่นอะลูมิเนียมหุ้มนาน 20 นาที มีค่าสูงกว่าการแช่แข็งในระยะเวลา 10 และ 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ส่วนการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับการละลายที่อุณหภูมิที่ 30 และ 50 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แต่ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 29)

3.2 การประเมินระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งใน Cryotubeขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียม

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ใช้แผ่นอะลูมิเนียมห่อหุ้มนาน 30 นาที พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับการแช่แข็งนาน 20 นาที แต่การแช่แข็งนาน 10 นาที ไม่ส่งผลให้เวลาในการเคลื่อนที่มีความแตกต่างกับ การแช่แข็งที่ 20 และ 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (P>0.05) ต่อระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (ตารางที่ 30)

3.3 การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียม

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งใน Cryotube ที่มีแผ่นอะลูมิเนียมห่อหุ้มนาน 10, 20 และ 30 นาที พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) กับการใช้อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส ในการละลายน้ำเชื้อ แต่การใช้อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 31)

3.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นอะลูมิเนียม

อุณหภูมิของการแช่แข็งหลังการละลายในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร เมื่อ

นำไปละลายแล้วนำมาวัดอุณหภูมิของน้ำแข็งหลังการละลายที่ 60, 50, 40 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อ นาน 30, 20 และ 10 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 32)

ตารางที่ 29 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยอะลูมิเนียม โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
น้ำแข็ง	**10**	**20**	**30**
30˚C /120S	$24\pm4.44^{2,b}$	$53\pm3.33^{2,a}$	$36\pm5.56^{2,b}$
40˚C /90S	$44\pm4.44^{1,b}$	$53\pm3.33^{1,a}$	$49\pm7.54^{1,b}$
50˚C /60S	$44\pm6.48^{2,b}$	$44\pm4.44^{2,a}$	$24\pm7.29^{2,b}$
60˚C /45S	$42\pm5.21^{12,b}$	$40\pm4.71^{12,a}$	$44\pm4.44^{12,b}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 30 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่มีแผ่นอะลูมิเนียมห่อหุ้ม โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
น้ำแข็ง	**10**	**20**	**30**
30˚C /120S	80 ± 10.21^{ab}	61 ± 6.55^{b}	67 ± 12.37^{a}
40˚C /90S	72 ± 8.16^{ab}	66 ± 7.08^{b}	112 ± 17.10^{a}
50˚C /60S	87 ± 9.18^{ab}	59 ± 5.35^{b}	87 ± 24.36^{a}
60˚C /45S	72 ± 6.92^{ab}	73 ± 7.15^{b}	105 ± 14.76^{a}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 31 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มแผ่นอลูมิเนียม โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
30˚C /120S	43±2.51[3]	41±4.22[3]	45±4.56[3]
40˚C /90S	51±3.04[12]	50±3.02[12]	55±3.54[12]
50˚C /60S	51±4.66[23]	50±1.39[23]	42±4.85[23]
60˚C /45S	57±2.98[1]	61±3.89[1]	49±3.60[1]

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 32 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยแผ่นอูมิเนียม โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลายน้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
30˚C /120S	9.3±4.44[4,c]	10.4±3.33[4,b]	10.7±0.28[4,a]
40˚C /90S	10.9±4.44[3,c]	11.5±3.33[3,b]	13.2±0.34[3,a]
50˚C /60S	13.2±6.48[2,c]	15.6±4.44[2,b]	15.5±0.42[2,a]
60˚C /45S	15.8±5.21[1,c]	16.9±4.71[1,b]	17.0±0.39[1,a]

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

4. การทดสอบผลของเก็บรักษาน้ำเชื้อและระยะเวลาในการลดอุณหภูมิต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย

4.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว หลังการแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง ที่แช่แข็งใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำแข็งแห้ง โดยบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร แล้วหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์เป็นอุปกรณ์ห่อหุ้มและแช่แข็งนาน 10, 20 และ 30 นาที จากนั้นครบเวลาที่กำหนดไว้นำ Cryotube มาละลายที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ60 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์เคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยการใช้อุณหภูมิ 30 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่ามีความแตกต่างกับอุณหภูมิการละลายที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ในขณะเดียวกันการอุณหภูมิการละลายที่ 40 องศาเซลเซียส ไม่พบความแตกต่างของเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เมื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30, 50และ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เวลา 10, 20 และ 30 นาที ไม่ส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มให้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 33)

4.2 การประเมินระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งใน Cryotubeขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์

การประเมินระยะเวลา (วินาที) ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์พบว่าการแช่แข็งนานเป็นเวลา 10 และ 20 นาที มีความแตกต่างกับการแช่แข็งที่ 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ส่วนการใช้อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าไม่มีความแตกต่างต่อระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 34)

4.3 การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งใน Cryotube ที่หุ้มด้วยกระดาษฟอยล์นาน 10, 20 และ 30 นาที พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ส่วนการอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งที่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ต่อการมีชีวิตรอดหลังการแช่แข็งของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว (ตารางที่ 35)

4.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการลายละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์

อุณหภูมิน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งหลังการละลายหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งมาละลาย แล้วนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาวัดอุณหภูมิของน้ำแข็งหลังการละลายที่ 30, 40, 50 และ

60 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิของน้ำเชื้อหลังการละลายมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวนาน 10, 20 และ 30 นาที พบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ตารางที่ 36)

ตารางที่ 33 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
น้ำแข็ง	**10**	**20**	**30**
30˚C /120S	73±3.33^{2}	76±2.94^{2}	71±3.51^{2}
40˚C /90S	78±2.22^{12}	78±2.22^{12}	73±3.33^{12}
50˚C /60S	76±2.94^{2}	76±2.94^{2}	73±3.33^{2}
60˚C /45S	80±0.00^{1}	80±0.00^{1}	80±0.00^{1}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 34 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
น้ำแข็ง	**10**	**20**	**30**
30˚C /120S	92±9.86^{b}	89±5.37^{b}	127±15.71^{a}
40˚C /90S	89±12.29^{b}	88±4.81^{b}	112±13.42^{a}
50˚C /60S	91±10.71^{b}	69±10.39^{b}	100±9.57^{a}
60˚C /45S	86±6.92^{b}	83±9.30^{b}	126±11.53^{a}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 35 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน Cryotube ที่หุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง)	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
30˚C /120S	83±2.00[a]	81±3.34[a]	80±2.61[a]
40˚C /90S	87±3.07[a]	80±2.47[a]	81±3.31[a]
50˚C /60S	81±1.36[a]	85±2.19[a]	85±2.66[a]
60˚C /45S	81±1.83[a]	82±3.98[a]	86±2.22[a]

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 36 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งใน Cryotube ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	**ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)**		
	10	**20**	**30**
30˚C /120S	9.2±0.23[4,c]	10.0±0.38[4,b]	10.8±0.15[4,a]
40˚C /90S	11.5±0.34[3,c]	11.8±0.35[3,b]	13.0±0.16[3,a]
50˚C /60S	13.3±0.15[2,c]	15.0±0.34[2,b]	16.0±0.44[2,a]
60˚C /45S	15.2±0.39[1,c]	15.6±0.51[1,b]	17.3±0.45[1,a]

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

การทดลองที่ 3 ศึกษาการพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาตะเพียนขาวไว้ในรูปแบบต่าง ๆ ด้วยน้ำแข็งแห้ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) โดยบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร และ Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ใช้อุปกรณ์ห่อหุ้มที่ให้ผลการทดลองดีที่สุดเพื่อพัฒนาวิธีการเก็บรักษาให้มีประสิทธิ์ภาพดีขึ้น ทำโดยนำอุปกรณ์ห่อหุ้มออกให้เหลือแต่หลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร และ Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นภาชนะที่บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวจากนั้นนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ 4 อุณหภูมิ คือ ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส, ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส, กล่องโฟมเก็บความเย็นใส่น้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส), ถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) เก็บรักษาไว้นานเป็นระยะเวลา 28 วัน (4 สัปดาห์) ประเมินผลการเก็บรักษาที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อทุก ๆ 7 วัน โดยใช้อุณหภูมิในการละลายหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ตามเวลาที่กำหนดไว้ และ อุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ที่เวลาต่างกัน

1. การทดสอบผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ

1.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน

การเก็บรักษาแช่แข็งหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร หลังการแช่แข็งด้วยการห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า เมื่อครบเวลาที่กำหนดไว้นำหลอดน้ำเชื้อมาประเมินเปอร์เซ็นต์ที่การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่าการแช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ที่เก็บรักษาไว้นานเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าอัตราการละลายที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันกับการประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอุณหภูมิในการละลายที่ 10, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญในทางสถิติ ($P<0.05$) อุณหภูมิในการละลายที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิละลายที่ 70 องศาเซลเซียส อย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) มีความแตกต่างในการเคลื่อนที่ในวันที่ 7, 14, 21 และ 28 ในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยไม่ปรากฏอัตราการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (ตารางที่ 37) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการแช่แข็ง Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ ที่ไม่ปรากฏการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในการรักษาวันที่ 7, 14, 21 และ 28 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($P<0.05$) กับชั่วโมงการเริ่มต้น

(ชั่วโมงที่ 0) อุณหภูมิที่ 30 , 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ปรากฏผลไม่มีความแตกต่างในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 38)

1.2 การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาแช่แข็งหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าอุณหภูมิในการละลายที่ 10, 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างในระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิในการละลาย 60 และ 70 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และอุณหภูมิในการละลายที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างระหว่างเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่าชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) มีความแตกต่างกับการเก็บรักษาวันที่ 7, 14, 21 และ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ซึ่งสเปิร์มไม่มีการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 39) ในทำนองเดียวกันกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร พบว่าไม่ปรากฏระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในการรักษาวันที่ 7, 14, 21 และ 28 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ (P<0.05) กับชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) ส่วนอุณหภูมิในการละลายที่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่ส่งผลให้มีความแตกต่างต่อระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 40)

1.3 การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง –20 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 28 วัน

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟาง พบว่าการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งมีผลทำให้การมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่อุณหภูมิ 10, 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีค่าสูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่ 50 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) อุณหภูมิในการละลายการแช่แข็งที่ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิที่ 70 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว มีความแตกต่างกันในชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) เมื่อนำไปเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาแช่แข็งวันที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 41) และมีความสอดคล้องกับการแช่แข็ง

Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ปรากฏการมีชีวิตรอดของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างนัยสำคัญ (P<0.05) กับรักษาแบบแช่แข็งไว้นาน 7, 14, 21 และ 28 วัน อุณหภูมิที่ใช้การละลายหลอด Cryotube ที่บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ตารางที่ 42)

1.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน

อุณหภูมิหลังการละลาย (Post-thawed tempareture) ในหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากนำไปละลาย (Thawing) แล้วนำมาวัดอุณหภูมิภายในหลอดพบว่าอุณหภูมิหลังชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) และการเก็บรักษาไว้นาน 7 วัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับวันที่ 14, 21 และ 28 วัน อุณหภูมิหลังการละลายที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าทุกอุณหภูมิมีความแตกต่างกันทางสถิติทุกอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ตารางที่ 43) อุณหภูมิหลังการละลาย (Post-thawed tempareture) น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่บรรจุในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว เมื่อนำไปละลายที่อุณหภูมิต่างกันปรากฏผลมีความแตกต่างอุณหภูมิหลังการละลายที่ 60, 50, 40 และ 30 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ตามลำดับ การเก็บรักษาแช่แข็งวันที่ 21 มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 14 และ 28 วัน การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายน้ำเชื้อที่เก็บรักษาวันที่ 7 ไม่มีความแตกต่างกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ 28 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 44)

ตารางที่ 37 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10˚C /20S	$51±3.51^{2,a}$	$0±0^{2,b}$	$0±0^{2,b}$	$0±0^{2,b}$	$0±0^{2,b}$
20˚C /15S	$71±3.51^{1,a}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$
30˚C /10S	$76±2.94^{1,a}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$
40˚C /8S	$73±3.33^{1,a}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$
50˚C /5S	$16±5.56^{3,a}$	$0±0^{3,b}$	$0±0^{3,b}$	$0±0^{3,b}$	$0±0^{3,b}$

ตารางที่ 37 (ต่อ)

การละลายน้ำแข็ง	ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
60˚C /4S	$7±3.33^{34,a}$	$0±0^{34,b}$	$0±0^{34,b}$	$0±0^{34,b}$	$0±0^{34,b}$
70˚C /3S	$2±2.22^{4,a}$	$0±0^{4,b}$	$0±0^{4,b}$	$0±0^{4,b}$	$0±0^{4,b}$

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 38 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาไว้ที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
30˚C /120S	$76±2.94^{a}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$
40˚C /90S	$78±2.22^{a}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$
50˚C /60S	$73±3.33^{a}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$
60˚C /45S	$78±2.22^{a}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$	$0±0^{b}$

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 39 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
10˚C /20S	$80±7.99^{1,a}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$
20˚C /15S	$69±7.45^{12,a}$	$0±0^{12,b}$	$0±0^{12,b}$	$0±0^{12,b}$	$0±0^{12,b}$
30˚C /10S	$79±7.82^{1,b}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$	$0±0^{1,b}$

ตารางที่ 39 (ต่อ)

การละลายน้ำแข็ง	**ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
40˚C /8S	$77\pm9.59^{1,a}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$
50˚C /5S	$53\pm18.49^{12,a}$	$0\pm0^{12,b}$	$0\pm0^{12,b}$	$0\pm0^{12,b}$	$0\pm0^{12,b}$
60˚C /4S	$34\pm19.10^{23,a}$	$0\pm0^{23,b}$	$0\pm0^{23,b}$	$0\pm0^{23,b}$	$0\pm0^{23,b}$
70˚C /3S	$11\pm10.78^{3,a}$	$0\pm0^{3,b}$	$0\pm0^{3,b}$	$0\pm0^{3,b}$	$0\pm0^{3,b}$

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 40 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30˚C /120S	77 ± 9.41^{a}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}
40˚C /90S	100 ± 9.22^{a}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}
50˚C /60S	84 ± 10.55^{a}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}
60˚C /45S	94 ± 11.10^{a}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 41 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10°C /20S	$70\pm3.79^{1,a}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$
20°C /15S	$74\pm2.98^{1,a}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$
30°C /10S	$80\pm2.41^{1,a}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$
40°C /8S	$80\pm3.81^{1,a}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$	$0\pm0^{1,b}$
50°C /5S	$18\pm7.86^{2,b}$	$0\pm0^{2,b}$	$0\pm0^{2,b}$	$0\pm0^{2,b}$	$0\pm0^{2,b}$
60°C /4S	$9\pm4.67^{23,a}$	$0\pm0^{23,b}$	$0\pm0^{23,b}$	$0\pm0^{23,b}$	$0\pm0^{23,b}$
70°C /3S	$5\pm4.67^{3,a}$	$0\pm0^{3,b}$	$0\pm0^{3,b}$	$0\pm0^{3,b}$	$0\pm0^{3,b}$

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 42 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30°C /120S	91 ± 1.62^{a}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}
40°C /90S	85 ± 3.25^{a}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}
50°C /60S	88 ± 3.79^{a}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}
60°C /45S	89 ± 2.72^{a}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}	0 ± 0^{b}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 43 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10˚C /20S	14.8±0.23^{7,a}	17.1±0.44^{7,a}	13.4±0.32^{7,b}	14.6±0.45^{7,b}	14.1±0.15^{7,b}
20˚C /15S	18.3±0.24^{6,a}	18.1±0.39^{6,a}	16.1±0.48^{6,b}	17.2±0.50^{6,b}	17.1±0.47^{6,b}
30˚C /10S	25.4±0.29^{5,a}	25.2±0.33^{5,a}	24.3±0.32^{5,b}	26.1±0.63^{5,b}	25.5±0.16^{5,b}
40˚C /8S	29.1±0.26^{4,a}	27.8±0.44^{4,a}	27.9±0.42^{4,b}	30.3±0.26^{4,b}	28.0±0.12^{4,b}
50˚C /5S	30.5±0.26^{3,a}	30.1±0.56^{3,a}	31.1±0.24^{3,b}	28.7±0.17^{3,b}	29.9±0.31^{3,b}
60˚C /4S	30.8±0.16^{2,a}	31.6±0.23^{2,a}	31.1±0.27^{2,b}	30.1±0.23^{2,b}	30.4±0.12^{2,b}
70˚C /3S	31.4±0.33^{1,a}	32.0±0.28^{1,a}	31.7±0.43^{1,b}	30.2±0.28^{1,b}	30.9±0.20^{1,b}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 44 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30˚C /120S	9.2±0.24^{4,c}	9.0±0.32^{4,bc}	9.0±0.3^{24,b}	13.5±0.44^{4,a}	9.1±0.18^{4,bc}
40˚C /90S	12.4±0.39^{3,c}	12.7±0.41^{3,bc}	12.7±0.41^{3,b}	15.6±0.59^{3,a}	11.9±0.32^{3,bc}
50˚C /60S	12.7±0.54^{2,c}	12.4±0.42^{2,bc}	12.4±0.42^{2,b}	16.3±0.60^{2,a}	13.6±0.24^{2,bc}
60˚C /45S	15.3±0.40^{1,c}	15.8±0.31^{1,bc}	15.8±031^{1,b}	16.9±0.56^{1,a}	15.6±0.27^{1,bc}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

2. การทดสอบผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ

2.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยบรรจุน้ำเชื้อในหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร หลังแช่แข็งด้วยการห่อหุ้มหลอดสายไฟฟ้า นำหลอดน้ำเชื้อมาละลายประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สเปิร์มปลาตะเพียนขาว พบว่าอุณหภูมิที่ 20 และ 30 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับอุณหภูมิ 10, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาววันที่ 7 และ 14 มีความแตกต่างกับการเคลื่อนที่ในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 21 และวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 45)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส หลังการแช่แข็งด้วยการใช้กระดาษฟอยล์ห่อหุ้ม เป็นระยะเวลา 28 วัน เมื่อนำ Cryotube 1.8 มิลลิลิตร มาทำการเพิ่มอุณหภูมิ 4 อุณหภูมิ เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ พบว่าอุณหภูมิ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 14, 21 และวันที่ 28 ไม่มีความแตกต่างต่อการเคลื่อนที่น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 46)

2.2 การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน

ผลการประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับอุณหภูมิในการละลายที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) อุณหภูมิในการละลายที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ -80 องศาเซลเซียส ในวันที่ 7 มีความแตกต่างกับระยะเวลาเคลื่อนที่ในชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 14, 21 วันที่ 28 อย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาววันที่ 14, 21 และ 28 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 47)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส พบว่าการเก็บรักษาแบบแช่แข็งในวันที่ 7 มีความแตกต่างกับการเก็บรักษากับชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 14, 21 และ วันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ 30 , 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิในการลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไม่ส่งผลต่อการกระตุ้นให้เกิดความแตกต่างของระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 48)

2.3 การประเมินอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว หลังจากการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งมีอุณหภูมิต่างกันจึงทำให้การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ 10, 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับอุณหภูมิ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส อุณหภูมิในการละลายที่ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิในการละลายที่ 70 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว เมื่อนำมาประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดหลังการนำมาเก็บรักษา ปรากฏผลว่ามีความแตกต่างกันในชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของวันที่ 21 ไม่มีความแตกต่างกับวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) และเมื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) กับวันที่ 28 (ตารางที่ 49)

การเก็บรักษาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ปรากฏเปอร์เซ็นต์มีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการเก็บรักษาในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 21 และ 28 วัน พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับรักษาแบบแช่แข็งไว้นาน 14 วัน อุณหภูมิที่ใช้การละลายหลอด Cryotube ที่บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ตารางที่ 50)

2.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน

เมื่อนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่บรรจุในหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร มาวัดอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (Post-thawed tempareture) หลังจากการเก็บ

รักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้อุณหภูมิหลังการละลายที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติทุกอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) อุณหภูมิในการละลายที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) หลังการวัดอุณหภูมิน้ำเชื้อภายในหลอดฟาง ระยะในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) และวันที่ 7 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) การเก็บรักษาน้ำเชื้อวันที่ 21 ไม่มีความแตกต่างของอุณหภูมิหลังการละลาย เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 21 และ 28 มีความแตกต่างกันทางสถิติของอุณหภูมิหลังการละลายอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) เปรียบเทียบกับวันที่ 14 (ตารางที่ 51)

อุณหภูมิหลังการลาย (Post-thawed tempareture) น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอด Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร เมื่อนำไปละลายที่อุณหภูมิต่างกัน จากนั้นนำมาวัดอุณหภูมิภายในหลอด ปรากฏผลมีความแตกต่างอุณหภูมิหลังการละลายโดยน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับการประเมินอุณหภูมิหลังการละลายที่ 30 และ 40 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) การเก็บรักษาแช่แข็งวันที่ 21 มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 14 และ 28 วัน การแช่แข็งในวันที่ 7 ไม่มีความแตกต่างกับการแช่แข็งวันที่ 14 และวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 52)

ตารางที่ 45 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10˚C /20S	$51\pm3.51^{3,b}$	$67\pm4.71^{3,a}$	$73\pm3.33^{3,a}$	$64\pm5.56^{3,b}$	$53\pm4.71^{3,b}$
20˚C /15S	$71\pm3.51^{1,b}$	$78\pm2.22^{1,a}$	$71\pm3.51^{1,a}$	$73\pm3.33^{1,b}$	$76\pm2.94^{1,b}$
30˚C /10S	$76\pm2.94^{1,b}$	$78\pm2.22^{1,a}$	$76\pm2.94^{1,a}$	$73\pm3.33^{1,b}$	$80\pm0.00^{1,b}$
40˚C /8S	$73\pm3.33^{2,b}$	$76\pm2.94^{2,a}$	$76\pm2.94^{2,a}$	$56\pm6.48^{2,b}$	$58\pm6.19^{2,b}$
50˚C /5S	$16\pm5.56^{4,b}$	$51\pm3.51^{4,a}$	$69\pm4.84^{4,a}$	$18\pm2.22^{4,b}$	$18\pm5.21^{4,b}$
60˚C /4S	$7\pm3.33^{5,b}$	$38\pm7.03^{5,a}$	$18\pm5.21^{5,a}$	$9\pm3.51^{5,b}$	$4\pm2.94^{5,b}$

ตารางที่ 45 (ต่อ)

การละลายน้ำแข็ง	ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
70˚C /3S	2±2.22[6,b]	11±4.84[6,a]	9±3.51[6,a]	11±3.51[6,b]	16±6.48[6,b]

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 46 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
30˚C /120S	76±2.94[a]	78±2.22[a]	78±2.22[a]	76±2.94[a]	78±2.22[a]
40˚C /90S	78±2.22[a]	76±2.94[a]	76±2.94[a]	78±2.22[a]	80±8.00[a]
50˚C /60S	73±3.33[a]	80±0.00[a]	78±2.22[a]	80±0.00[a]	80±0.00[a]
60˚C /45S	78±2.22[a]	80±0.00[a]	78±2.22[a]	80±0.00[a]	80±0.00[a]

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 47 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
10˚C /20S	80±7.99[1,c]	95±14.13[1,a]	68±6.47[1,bc]	88±7.43[1,b]	76±6.62[1,bc]
20˚C /15S	69±7.45[1,c]	101±12.23[1,a]	72±8.27[1,bc]	81±9.54[1,b]	71±5.34[1,bc]
30˚C /10S	79±7.82[1,c]	95±10.42[1,a]	84±7.80[1,bc]	95±9.03[1,b]	81±7.16[1,bc]
40˚C /8S	77±9.59[1,c]	98±12.62[1,a]	87±15.05[1,bc]	89±10.30[1,b]	71±9.00[1,bc]

ตารางที่ 47 (ต่อ)

การละลายน้ำแข็ง	ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
50°C /5S	$53\pm18.49^{1,c}$	$107\pm15.10^{1,a}$	$85\pm11.32^{1,bc}$	$65\pm13.32^{1,b}$	$48\pm13.30^{1,bc}$
60°C /4S	$34\pm19.10^{2,c}$	$97\pm13.75^{2,a}$	$63\pm18.23^{2,bc}$	$52\pm21.15^{2,b}$	$22\pm16.19^{2,bc}$
70°C /3S	$11\pm10.78^{2,c}$	$50\pm22.03^{2,a}$	$32\pm13.34^{2,bc}$	$55\pm17.93^{2,b}$	$68\pm22.69^{2,bc}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 48 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
30°C /120S	77 ± 9.41^{b}	113 ± 11.33^{a}	90 ± 6.48^{b}	86 ± 3.79^{b}	88 ± 8.95^{b}
40°C /90S	100 ± 9.22^{b}	105 ± 11.65^{a}	83 ± 8.35^{b}	73 ± 6.94^{b}	86 ± 6.52^{b}
50°C /60S	84 ± 10.55^{b}	112 ± 8.97^{a}	64 ± 7.69^{b}	81 ± 10.51^{b}	73 ± 10.05^{b}
60°C /45S	94 ± 11.10^{b}	93 ± 10.08^{a}	81 ± 8.72^{b}	82 ± 6.72^{b}	78 ± 8.66^{b}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 49 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10°C /20S	70±3.79^{1,d}	86±2.99^{1,a}	76±5.11^{1,b}	84±3.70^{1,c}	71±5.18^{1,cd}
20°C /15S	74±2.89^{1,d}	83±2.54^{1,a}	76±4.45^{1,b}	77±3.10^{1,c}	74±4.00^{1,cd}
30°C /10S	80±2.41^{1,d}	86±3.30^{1,a}	80±3.21^{1,b}	88±2.89^{1,c}	74±4.14^{1,cd}
40°C /8S	80±3.81^{1,d}	86±2.79^{1,a}	82±2.12^{1,b}	62±4.65^{1,c}	69±2.79^{1,cd}
50°C /5S	18±7.86^{2,d}	81±3.88^{2,a}	72±3.39^{2,b}	47±6.97^{2,c}	35±9.14^{2,cd}
60°C /4S	9±4.67^{3,d}	80±4.55^{3,a}	32±11.07^{3,b}	9±5.13^{3,c}	6±4.24^{3,cd}
70°C /3S	5±4.67^{3,d}	21±8.57^{3,a}	29±11.43^{3,b}	16±5.81^{3,c}	28±10.53^{3c,d}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 50 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30°C /120S	91±1.62^{a}	81±2.99^{a}	72±5.32^{b}	86±2.34^{a}	84±3.70^{a}
40°C /90S	85±3.25^{a}	87±3.11^{a}	75±4.27^{b}	86±2.89^{a}	83±2.85^{a}
50°C /60S	88±3.79^{a}	85±4.46^{a}	76±5.11^{b}	83±4.71^{a}	82±3.92^{a}
60°C /45S	89±2.72^{a}	86±2.88^{a}	77±4.09^{b}	85±3.45^{a}	84±4.21^{a}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 51 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10˚C /20S	$14.8\pm0.23^{6,a}$	$15.1\pm0.29^{6,a}$	$14.0\pm0.22^{6,c}$	$13.2\pm0.15^{6,b}$	$13.9\pm0.24^{6,b}$
20˚C /15S	$18.3\pm0.24^{5,a}$	$17.2\pm0.20^{5,a}$	$16.0\pm0.35^{5,c}$	$15.9\pm0.15^{5,b}$	$17.1\pm0.17^{5,b}$
30˚C /10S	$25.4\pm0.29^{4,a}$	$25.2\pm0.24^{4,a}$	$24.7\pm0.56^{4,c}$	$25.8\pm0.28^{4,b}$	$25.6\pm0.08^{4,b}$
40˚C /8S	$29.1\pm0.26^{3,a}$	$27.6\pm0.26^{3,a}$	$27.2\pm0.43^{3,c}$	$29.3\pm0.16^{3,b}$	$29.1\pm0.22^{3,b}$
50˚C /5S	$30.5\pm0.26^{2,a}$	$31.3\pm0.20^{2,a}$	$29.4\pm0.25^{2,c}$	$30.8\pm0.19^{2,b}$	$30.2\pm0.26^{2,b}$
60˚C /4S	$30.8\pm0.16^{1,a}$	$32.1\pm0.25^{1,a}$	$31.0\pm0.23^{1,c}$	$30.9\pm0.21^{1,b}$	$30.8\pm0.19^{1,b}$
70˚C /3S	$31.4\pm0.33^{1,a}$	$31.9\pm0.28^{1,a}$	$31.7\pm0.31^{1,c}$	$30.9\pm0.19^{1,b}$	$30.7\pm0.19^{1,b}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 52 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30˚C /120S	$9.2\pm0.24^{3,c}$	$12.7\pm0.41^{3,b}$	$12.8\pm1.00^{3,b}$	$16.7\pm0.55^{3,a}$	$11.2\pm0.34^{3,b}$
40˚C /90S	$12.4\pm0.39^{2,c}$	$13.9\pm0.48^{2,b}$	$14.0\pm0.27^{2,b}$	$15.8\pm0.74^{2,a}$	$14.4\pm0.37^{2,b}$
50˚C /60S	$12.7\pm0.54^{1,c}$	$13.5\pm0.53^{1,b}$	$15.3\pm0.79^{1,b}$	$16.1\pm0.50^{1,a}$	$16.9\pm0.53^{1,b}$
60˚C /45S	$15.3\pm0.40^{1,c}$	$14.5\pm0.41^{1,b}$	$15.4\pm0.70^{1,b}$	$15.5\pm0.79^{1,a}$	$15.5\pm0.75^{1,b}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

3. การทดสอบผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ

3.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งแห้ง (–79 องศาเซลเซียส) นาน 28 วัน

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้งที่อุณหภูมิ –79 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยบรรจุน้ำเชื้อในหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร หลังการแช่แข็งด้วยการห่อหุ้มหลอดสายไฟฟ้า นำหลอดน้ำเชื้อที่เก็บรักษามาละลายน้ำเชื้อเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สเปิร์มปลาตะเพียนขาว พบว่าอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างในทางสถิติต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับอุณหภูมิ 10, 20, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส การละลายที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิในการละลายที่ 40 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) อุณหภูมิในการละลายที่ 10 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับ การละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในน้ำแข็งแห้ง พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 21, 28 มีความแตกต่างกับการเคลื่อนที่ วันที่ 7 และวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 53)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube 1.8 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ –79 องศาเซลเซียส ในน้ำแข็งแห้งนาน 28 วัน หลังการแช่แข็งด้วยการใช้กระดาษฟอยล์ห่อหุ้มแล้วนำมาละลายเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 14, 21 และวันที่ 28 ไม่มีความแตกต่างในการเก็บรักษาในน้ำแข็งแห้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) พบว่าอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ 30 และ 40 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างเมื่อประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) อุณหภูมิ 50 และ 60 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างทางสถิติต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ในขณะเดียวกันอุณหภูมิในการละลายที่ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และอุณหภูมิในการลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ 30, 40 และ 60 พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 54)

3.2 การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) นาน 28 วัน

ผลการประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่า ระยะเวลาในการเคลื่อนที่สเปิร์มหลังจากของการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ 10, 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับอุณหภูมิในการละลายที่ 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) อุณหภูมิในการละลายที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในน้ำแข็งแห้ง –79 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาเก็บรักษาในวันที่ 7 และวันที่ 14 มีความแตกต่างกับระยะเวลาเคลื่อนที่ในชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 21 วันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 55)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในน้ำแข็ง พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในระหว่างการเก็บรักษาในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 14 และวันที่ 21 มีความแตกต่างกับการเก็บรักษาในวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) การละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ 30 , 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไม่ส่งผลต่อระยะเวลาในการเคลื่อนที่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 56)

3.3 การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) นาน 28 วัน

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว หลังจากการเก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งแห้ง พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งมีผลต่อการมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวโดยที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับอุณหภูมิในการละลายที่ 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีนัยสำคัญทางสถิติอย่าง (P<0.05) อุณหภูมิในการละลายที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) อุณหภูมิในการละลายที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ระยะเวลาในการเก็บรักษาสเปิร์มปลาตะเพียนขาว เมื่อนำมาประเมินการมีชีวิตรอดของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว พบว่าวันที่ 7 และ 14 มีความแตกต่างกับชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), 21 และ 28 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มวันที่ 7 ไม่มีความแตกต่างกับวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) ไม่มีความแตกต่างกับวันที่ 21 และวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 57)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่เก็บรักษาในน้ำแข็งแห้งพบว่าการเก็บรักษาในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7 และ 21 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ต่อการมีชีวิตรอดของสเปิร์มการเก็บรักษาน้ำเชื้อในวันที่ 14, 21 ไม่มีความแตกต่างต่อการแช่แข็งในวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) อุณหภูมิในการละลายที่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ปรากฏว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) (ตารางที่ 58)

3.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาไว้ในน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) นาน 28 วัน

อุณหภูมิหลังการละลาย (Post-thawed tempareture) ในหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว หลังจากนำไปละลาย (Thawing) แล้วนำมาวัดอุณหภูมิภายในหลอดพบว่าอุณหภูมิหลังชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) และการเก็บรักษาไว้นาน 7 วัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในวันที่ 14, 21 และ 28 วัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) อุณหภูมิหลังการละลายที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าทุกอุณหภูมิมีความแตกต่างกันทางสถิติทุกอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) (ตารางที่ 59)

อุณหภูมิหลังการละลาย (Post-thawed tempareture) ในหลอด Cryotube 1.8 มิลลิลิตร เมื่อนำไปละลายที่อุณหภูมิต่างกัน จากนั้นวัดอุณหภูมิภายในหลอด ปรากฏว่ามีความแตกต่างของอุณหภูมิหลังการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ 60, 50, 40 และ 30 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) การเก็บรักษาแช่แข็งชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับชุดการทดลองของวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การแช่แข็งในวันที่ 7, 21 และ 28 วัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติต่ออุณหภูมิหลังการละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 60)

ตารางที่ 53 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**น้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส)**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10°C /20S	51±3.51^{3,c}	69±4.84^{3,b}	71±3.51^{3,a}	64±5.56^{3,c}	67±5.77^{3,c}
20°C /15S	71±3.51^{2,c}	71±3.51^{2,b}	76±2.94^{2,a}	71±3.51^{2,c}	69±3.51^{2,c}
30°C /10S	76±2.94^{1,c}	76±2.94^{1,b}	80±0.00^{1,a}	76±2.94^{1,c}	80±0.00^{1,c}
40°C /8S	73±3.33^{23,c}	73±3.33^{23,b}	76±2.94^{23,a}	69±5.88^{23,c}	51±8.24^{23,c}
50°C /5S	16±5.56^{4,c}	69±3.51^{4,b}	67±4.71^{4,a}	18±4.01^{4,c}	27±9.43^{4,c}
60°C /4S	7±3.33^{5,c}	22±4.01^{5,b}	42±5.21^{5,a}	7±3.33^{5,c}	7±3.33^{5,c}
70°C /3S	2±2.22^{6,c}	11±3.51^{6,b}	24±4.44^{6,a}	9±4.84^{6,c}	7±3.33^{6,c}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 54 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**น้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส)**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30°C /120S	76±2.94^{a}	78±2.22^{a}	78±2.22^{a}	80±0.00^{a}	78±2.22^{a}
40°C /90S	78±2.22^{a}	80±0.00^{a}	80±0.00^{a}	78±2.22^{a}	76±2.94^{a}
50°C /60S	73±3.33^{a}	76±2.94^{a}	78±2.22^{a}	76±2.94^{a}	80±0.00^{a}
60°C /45S	78±2.22^{a}	80±0.00^{a}	80±0.00^{a}	80±0.00^{a}	80±0.00^{a}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 55 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**น้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส)**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10°C /20S	$80\pm7.99^{12,b}$	$89\pm13.67^{12,a}$	$78\pm6.39^{12,a}$	$73\pm9.90^{12,b}$	$64\pm3.29^{12,b}$
20°C /15S	$69\pm7.45^{12,b}$	$85\pm9.60^{12,a}$	$97\pm13.74^{12,a}$	$75\pm12.16^{12,b}$	$79\pm6.70^{12,b}$
30°C /10S	$79\pm7.82^{1,b}$	$84\pm3.85^{1,a}$	$92\pm9.55^{1,a}$	$85\pm11.34^{1,b}$	$81\pm7.15^{1,b}$
40°C /8S	$77\pm9.59^{12,b}$	$80\pm6.67^{12,a}$	$86\pm8.41^{12,a}$	$78\pm12.38^{12,b}$	$74\pm9.78^{12,b}$
50°C /5S	$53\pm18.49^{2,b}$	$91\pm11.81^{2,a}$	$89\pm8.60^{2,a}$	$67\pm15.49^{2,b}$	$39\pm14.55^{2,b}$
60°C /4S	$34\pm19.10^{3,b}$	$71\pm11.04^{3,a}$	$86\pm13.34^{3,a}$	$23\pm12.16^{3,b}$	$16\pm8.23^{3,b}$
70°C /3S	$11\pm10.78^{3,b}$	$36\pm11.61^{3,a}$	$81\pm14.33^{3,a}$	$29\pm15.24^{3,b}$	$33\pm16.71^{3,b}$

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 56 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**น้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส)**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30°C /120S	77 ± 9.41^{a}	96 ± 8.96^{a}	82 ± 11.82^{ab}	88 ± 7.20^{a}	71 ± 7.85^{b}
40°C /90S	100 ± 9.22^{a}	77 ± 5.54^{a}	79 ± 9.51^{ab}	103 ± 9.90^{a}	79 ± 6.53^{b}
50°C /60S	84 ± 10.55^{a}	86 ± 10.20^{a}	90 ± 7.46^{ab}	80 ± 5.87^{a}	76 ± 6.84^{b}
60°C /45S	94 ± 11.10^{a}	100 ± 5.99^{a}	72 ± 11.00^{ab}	101 ± 7.54^{a}	67 ± 5.73^{b}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 57 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**น้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส)**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10˚C /20S	70±3.79^{12,b}	84±2.66^{12,a}	72±5.94^{12,a}	80±4.22^{12,b}	85±3.50^{12,b}
20˚C /15S	74±2.98^{12,b}	83±2.57^{12,a}	68±3.91^{12,a}	78±2.61^{12,b}	81±3.20^{12,b}
30˚C /10S	80±2.41^{1,b}	82±3.35^{1,a}	73±5.46^{1,a}	86±3.17^{1,b}	83±3.50^{1,b}
40˚C /8S	80±3.81^{2,b}	78±2.59^{2,a}	69±3.84^{2,a}	72±5.54^{2,b}	56±9.49^{2,b}
50˚C /5S	18±7.86^{3,b}	82±3.12^{3,a}	67±4.45^{3,a}	28±7.15^{3,b}	30±11.38^{3,b}
60˚C /4S	9±4.67^{4,b}	34±5.27^{4,a}	56±5.84^{4,a}	15±6.68^{4,b}	15±7.48^{4,b}
70˚C /3S	5±4.67^{4,b}	13±4.47^{4,a}	47±6.52^{4,a}	16±8.45^{4,b}	16±8.14^{4,b}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 58 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**น้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส)**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30˚C /120S	91±1.62^{a}	85±2.57^{a}	84±4.22^{b}	85±3.29^{ab}	84±3.36^{b}
40˚C /90S	85±3.25^{a}	92±2.28^{a}	78±4.99^{b}	87±2.73^{ab}	82±3.78^{b}
50˚C /60S	88±3.79^{a}	86±2.67^{a}	76±2.89^{b}	84±3.33^{ab}	81±3.33^{b}
60˚C /45S	89±2.72^{a}	99±3.26^{a}	82±2.93^{b}	80±3.34^{ab}	83±3.34^{b}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 59 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**น้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส)**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10˚C /20S	$14.8 \pm 0.23^{7,a}$	$13.0 \pm 0.22^{7,d}$	$14.9 \pm 0.21^{7,c}$	$14.4 \pm 0.57^{7,ab}$	$14.0 \pm 0.25^{7,b}$
20˚C /15S	$18.3 \pm 0.24^{6,a}$	$15.2 \pm 0.29^{6,d}$	$16.9 \pm 0.29^{6,c}$	$18.2 \pm 0.31^{6,ab}$	$16.7 \pm 0.25^{6,b}$
30˚C /10S	$25.4 \pm 0.29^{5,a}$	$24.9 \pm 0.23^{5,d}$	$25.6 \pm 0.32^{5,c}$	$25.4 \pm 0.29^{5,ab}$	$25.0 \pm 0.24^{5,b}$
40˚C /8S	$29.1 \pm 0.26^{4,a}$	$27.4 \pm 0.24^{4,d}$	$27.6 \pm 0.34^{4,c}$	$28.1 \pm 0.32^{4,ab}$	$29.2 \pm 0.34^{4,b}$
50˚C /5S	$30.5 \pm 0.26^{3,a}$	$27.7 \pm 0.24^{3,d}$	$28.9 \pm 0.15^{3,c}$	$30.4 \pm 0.19^{3,ab}$	$30.4 \pm 0.27^{3,b}$
60˚C /4S	$30.8 \pm 0.16^{2,a}$	$29.5 \pm 0.37^{2,d}$	$29.2 \pm 0.32^{2,c}$	$30.8 \pm 0.20^{2,ab}$	$30.9 \pm 0.17^{2,b}$
70˚C /3S	$31.4 \pm 0.33^{1,a}$	$30.9 \pm 0.20^{1,d}$	$31.1 \pm 0.26^{1,c}$	$30.9 \pm 0.23^{1,ab}$	$30.7 \pm 0.16^{1,b}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 60 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**น้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส)**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30˚C /120S	$9.2 \pm 0.24^{4,c}$	$13.6 \pm 0.52^{4,b}$	$14.9 \pm 0.48^{4,a}$	$9.9 \pm 0.38^{4,b}$	$12.2 \pm 0.36^{4,b}$
40˚C /90S	$12.4 \pm 0.39^{3,c}$	$14.8 \pm 0.68^{3,b}$	$14.5 \pm 0.33^{3,a}$	$14.0 \pm 0.92^{3,b}$	$15.4 \pm 0.49^{3,b}$
50˚C /60S	$12.7 \pm 0.54^{2,c}$	$15.0 \pm 0.46^{2,b}$	$16.3 \pm 0.67^{2,a}$	$18.1 \pm 0.32^{2,b}$	$14.9 \pm 0.58^{2,b}$
60˚C /45S	$15.3 \pm 0.40^{1,c}$	$14.9 \pm 0.44^{1,b}$	$17.2 \pm 0.30^{1,a}$	$17.6 \pm 0.28^{1,b}$	$16.9 \pm 0.48^{1,b}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

4. การทดสอบผลการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อ

4.1 การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยถังไนโตรเจนเหลว -196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน โดยบรรจุน้ำเชื้อในหลอดฟาง (French straw) 0.25 มิลลิลิตร หลังแช่แข็งด้วยการหุ้มหลอดสายไฟฟ้า นำหลอดน้ำเชื้อมาละลายประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สเปิร์มปลาตะเพียนขาว พบว่าการละลายที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับอุณหภูมิ 10, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวในชั่วโมงเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 14, 21 และวันที่ 28 มีความแตกต่างกันของการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) การเก็บรักษาวันที่ 21 ไม่มีความแตกต่างกับวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) การเก็บรักษาในชั่วโมงเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), 21 ไม่มีความแตกต่างกับวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 61)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube 1.8 มิลลิลิตร หลังการแช่แข็งด้วยการใช้กระดาษฟอยล์ ไว้ในไนโตรเจนเหลวเป็นระยะเวลา 28 วัน แล้วนำมาละลายเพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ พบว่าอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) มีความแตกต่างต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาวันที่ 7, 14, 21 และวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 62)

4.2 การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 28 วัน

ผลการประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลว โดยบรรจุในหลอดฟาง 0.25 มิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อุณหภูมิในการละลายที่ 10, 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) อุณหภูมิในการละลายที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ -196 องศาเซลเซียส

ในวันที่ 7 และ 14 มีความแตกต่างของระยะเวลาเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 21 วันที่ 28 อย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 63)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในน้ำแข็ง พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของการเก็บรักษาในชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 14, 21 และ 28 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ 30 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส ปรากฏผลว่าอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวทำให้การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ (P<0.05) ในขณะเดียวกันอุณหภูมิในการละลายที่ 30, 40 และ 60 องศาเซลเซียส พบว่าการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และอุณหภูมิในการลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ 30, 50 และ 60 พบว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 64)

4.3 การประเมินอัตราการมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว หลังจากการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิ 20, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) อุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว เมื่อนำมาประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังนำมาเก็บรักษา ปรากฏว่ามีความแตกต่างกันในชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของวันที่ 14 ไม่มีความแตกต่างกับวันที่ 21 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) และเมื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) กับวันที่ 28 (ตารางที่ 65)

การรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร รักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว นำมาประเมินผลทุก 7 วัน จากนั้นนำมาทำการละลายการแช่แข็งที่อุณหภูมิต่างกัน เพื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว พบว่าอุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างในการละลาย

ที่อุณหภูมิต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การเก็บรักษาในวันที่ 7, 21, 28 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) การเก็บรักษาชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) ไม่มีความแตกต่างกับวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตราางที่ 66)

4.4 การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษารักษาที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน

เมื่อนำหลอดน้ำเชื้อปละตะเพียนแช่แข็งมาทำการละลายแล้วมาอุณหภูมิภายหลังการละลาย อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าอุณหภูมิภายหลังการละลายที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติทุกอุณหภูมิอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) ระยะเวลาการเก็บรักษาที่ชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 14, 21 และ 28 วัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในวันที่ 14, 21 และ 28 วัน ไม่มีความแตกต่างในการเก็บรักษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 67)

อุณหภูมิหลังการลาย (Post-thawed tempareture) ในหลอด Cryotube 1.8 มิลลิลิตร เมื่อนำไปละลายที่อุณหภูมิต่างกัน จากนั้นวัดอุณหภูมิภายในหลอด ปรากฏผลมีความแตกต่างอุณหภูมิหลังการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ 60, 50, 40 และ 30 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) มีความแตกต่างกับวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) การเก็บรักษาในวันที่ 7, 14, 21 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) การเก็บรักษาชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) ไม่มีความแตกต่างกับวันที่ 14 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 68)

ตารางที่ 61 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลาย น้ำแข็ง	ไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10˚C /20S	$51±3.51^{2,d}$	$62±6.19^{2,a}$	$73±3.33^{2,b}$	$64±5.56^{2,c}$	$62±5.21^{2,cd}$
20˚C /15S	$71±3.51^{1,d}$	$73±3.33^{1,a}$	$71±4.84^{1,b}$	$71±3.51^{1,c}$	$73±3.33^{1,cd}$
30˚C /10S	$76±2.94^{1,d}$	$78±2.22^{1,a}$	$80±0.00^{1,b}$	$80±0.00^{1,c}$	$80±0.00^{1,cd}$
40˚C /8S	$73±3.33^{1,d}$	$76±2.94^{1,a}$	$69±4.84^{1,b}$	$80±0.00^{1,c}$	$62±8.46^{1,cd}$

ตารางที่ 61 (ต่อ)

การละลาย น้ำแข็ง	ไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
40˚C /8S	73±3.33[1,d]	76±2.94[1,a]	69±4.84[1,b]	80±0.00[1,c]	62±8.46[1,cd]
50˚C /5S	16±5.56[3,d]	71±4.84[3,a]	44±9.30[3,b]	38±10.24[3,c]	36±12.81[3,cd]
60˚C /4S	7±3.33[4,d]	73±3.33[4,a]	24±2.94[4,b]	7±3.33[4,c]	4±2.94[4,cd]
70˚C /3S	2±2.22[5,d]	31±12.52[5,a]	20±4.71[5,b]	0±0.00[5,c]	0±0.00[5,cd]

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 62 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลาย น้ำแข็ง	ไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
30˚C /120S	76±2.94[b]	80±0.00[a]	80±0.00[a]	80±0.00[a]	80±0.00[a]
40˚C /90S	78±2.22[b]	80±0.00[a]	80±0.00[a]	80±0.00[a]	80±0.00[a]
50˚C /60S	73±3.33[b]	80±0.00[a]	80±0.00[a]	80±0.00[a]	80±0.00[a]
60˚C /45S	78±2.22[b]	80±0.00[a]	80±0.00[a]	80±0.00[a]	80±0.00[a]

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 63 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วย ไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**น้ำแข็งแห้ง (-196 องศาเซลเซียส)**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10˚C /20S	80±7.99^{1,b}	96±14.92^{1,a}	78±7.34^{1,a}	81±9.08^{1,b}	87±5.78^{1,b}
20˚C /15S	69±7.45^{1,b}	85±10.44^{1,a}	86±13.42^{1,a}	86±7.95^{1,b}	93±9.39^{1,b}
30˚C /10S	79±7.82^{1,b}	76±7.98^{1,a}	81±11.83^{1,a}	69±6.32^{1,b}	69±8.49^{1,b}
40˚C /8S	77±9.59^{1,b}	77±6.94^{1,a}	78±8.42^{1,a}	88±10.54^{1,b}	80±6.43^{1,b}
50˚C /5S	53±18.49^{2,b}	94±10.66^{2,a}	71±14.76^{2,a}	45±12.41^{2,b}	36±13.58^{2,b}
60˚C /4S	34±19.10^{2,b}	87±8.15^{2,a}	81±7.75^{2,a}	22±12.26^{2,b}	15±10.35^{2,b}
70˚C /3S	11±10.78^{3,b}	34±17.84^{3,a}	57±14.89^{3,a}	0±0.00^{3,b}	0±0.00^{3,b}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 64 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษารักษาด้วย ด้วยไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลายน้ำแข็ง	**ไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)**				
	ชั่วโมงที่ 0	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30˚C /120S	77±9.41^{12}	72±9.66^{12}	67±7.02^{12}	101±14.17^{12}	85±8.53^{12}
40˚C /90S	100±9.22^{1}	81±10.47^{1}	96±11.88^{1}	108±8.89^{1}	79±7.89^{1}
50˚C /60S	84±10.55^{2}	89±12.01^{2}	80±6.24^{2}	77±10.81^{2}	76±8.69^{2}
60˚C /45S	94±11.10^{12}	83±6.38^{12}	75±8.37^{12}	90±8.56^{12}	86±10.80^{12}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 65 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลาย	**ไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)**				
น้ำแข็ง	**ชั่วโมงที่ 0**	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10˚C /20S	$70\pm3.79^{12,c}$	$87\pm2.54^{12,a}$	$74\pm3.52^{12,b}$	$81\pm2.30^{12,b}$	$80\pm3.51^{12,c}$
20˚C /15S	$74\pm2.98^{1,c}$	$81\pm4.64^{1,a}$	$74\pm4.40^{1,b}$	$86\pm2.67^{1,b}$	$85\pm2.84^{1,c}$
30˚C /10S	$80\pm2.41^{12,c}$	$83\pm3.62^{12,a}$	$62\pm4.50^{12,b}$	$84\pm3.06^{12,b}$	$80\pm2.88^{12,c}$
40˚C /8S	$80\pm3.81^{2,c}$	$83\pm3.82^{2,a}$	$65\pm3.66^{2,b}$	$74\pm2.02^{2,b}$	$56\pm4.55^{2,c}$
50˚C /5S	$18\pm7.86^{3,c}$	$77\pm2.98^{3,a}$	$63\pm8.52^{3,b}$	$54\pm13.53^{3,b}$	$21\pm7.79^{3,c}$
60˚C /4S	$9\pm4.67^{4,c}$	$79\pm2.52^{4,a}$	$45\pm6.02^{4,b}$	$17\pm8.30^{4,b}$	$4\pm2.94^{4,c}$
70˚C /3S	$5\pm4.67^{5,c}$	$17\pm7.69^{5,a}$	$38\pm9.65^{5,b}$	$0\pm0.00^{5,b}$	$0\pm0.00^{5,c}$

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 66 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลาย	**ไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)**				
น้ำแข็ง	**ชั่วโมงที่ 0**	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30˚C /120S	91 ± 1.62^{c}	96 ± 2.58^{b}	97 ± 2.76^{a}	93 ± 2.23^{b}	90 ± 3.62^{bc}
40˚C /90S	85 ± 3.25^{c}	96 ± 2.16^{b}	97 ± 2.16^{a}	95 ± 2.04^{b}	93 ± 2.16^{bc}
50˚C /60S	88 ± 3.79^{c}	96 ± 2.33^{b}	98 ± 1.89^{a}	94 ± 2.10^{b}	88 ± 3.89^{bc}
60˚C /45S	89 ± 2.72^{c}	98 ± 1.56^{b}	99 ± 1.04^{a}	93 ± 2.53^{b}	91 ± 3.23^{bc}

หมายเหตุ แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 67 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยน้ำแข็งแห้ง (-196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลาย	**น้ำแข็งแห้ง (-196 องศาเซลเซียส)**				
น้ำแข็ง	**ชั่วโมงที่ 0**	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
10˚C /20S	14.8±0.23^{7,a}	13.1±0.26^{7,c}	12.1±0.16^{7,b}	13.6±0.39^{7,b}	13.6±0.29^{7,b}
20˚C /15S	18.3±0.24^{6,a}	13.7±0.26^{6,c}	15.5±0.55^{6,b}	17.2±0.49^{6,b}	15.7±0.38^{6,b}
30˚C /10S	25.4±0.29^{5,a}	24.5±0.27^{5,c}	25.1±0.29^{5,b}	25.6±0.40^{5,b}	25.3±0.19^{5,b}
40˚C /8S	29.1±026^{4,a}	26.7±0.25^{4,c}	28.8±0.72^{4,b}	28.5±0.24^{4,b}	29.1±0.34^{4,b}
50˚C /5S	30.5±0.26^{3,a}	27.7±0.46^{3,c}	30.7±0.43^{3,b}	29.9±0.34^{3,b}	30.2±0.30^{3,b}
60˚C /4S	30.8±0.16^{2,a}	28.9±0.17^{2,c}	31.3±0.26^{2,b}	30.6±0.22^{2,b}	31.0±0.27^{2,b}
70˚C /3S	31.4±0.33^{1,a}	30.6±0.29^{1,c}	32.0±0.28^{1,b}	30.8±0.19^{1,b}	31.1±0.22^{1,b}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

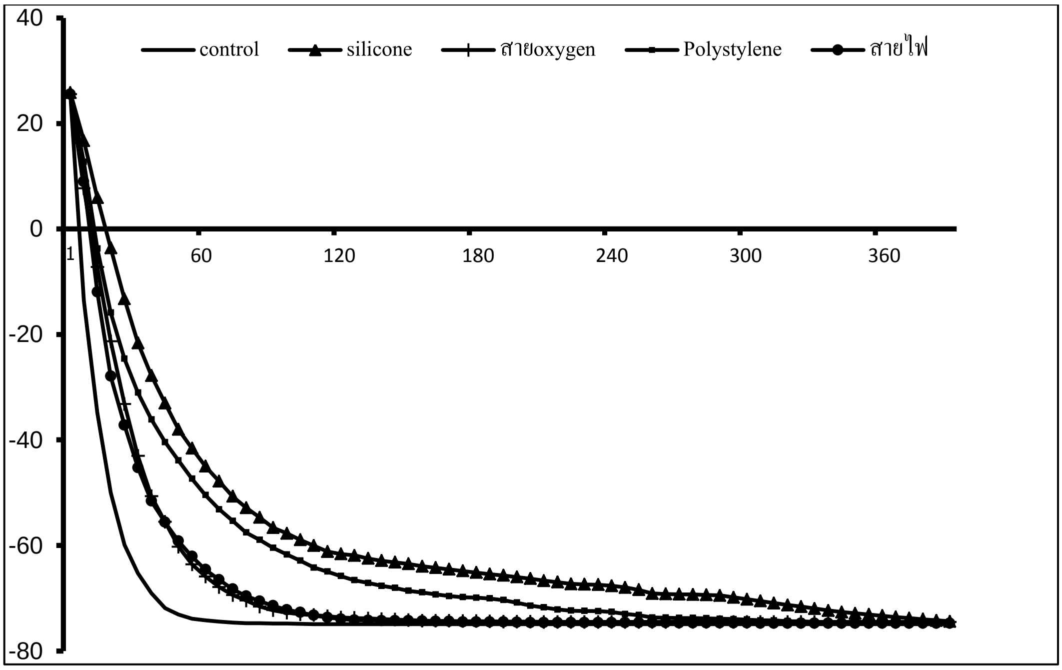
ตารางที่ 68 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาด้วยไนโตรเจนเหลว (- 196 องศาเซลเซียส) แช่แข็งด้วย Cryotube 1.8 มิลลิลิตร

การละลาย	**ไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส)**				
น้ำแข็ง	**ชั่วโมงที่ 0**	**วันที่ 7**	**วันที่ 14**	**วันที่ 21**	**วันที่ 28**
30˚C /120S	9.2±0.24^{4,c}	10.8±0.32^{4,b}	8.6±0.22^{4,bc}	9.7±0.27^{4,b}	10.5±0.30^{4,a}
40˚C /90S	12.4±0.39^{3,c}	13.4±0.33^{3,b}	10.9±0.29^{3,bc}	13.1±0.49^{3,b}	13.3±0.35^{3,a}
50˚C /60S	12.7±0.54^{2,c}	14.7±0.67^{2,b}	15.4±0.42^{2,bc}	13.8±0.71^{2,b}	17.1±0.59^{2,a}
60˚C /45S	15.3±0.40^{1,c}	14.5±0.46^{1,b}	16.7±0.61^{1,bc}	16.1±0.33^{1,b}	17.5±0.36^{1,a}

<u>หมายเหตุ</u> แสดงค่า mean ± SE(n=9)

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

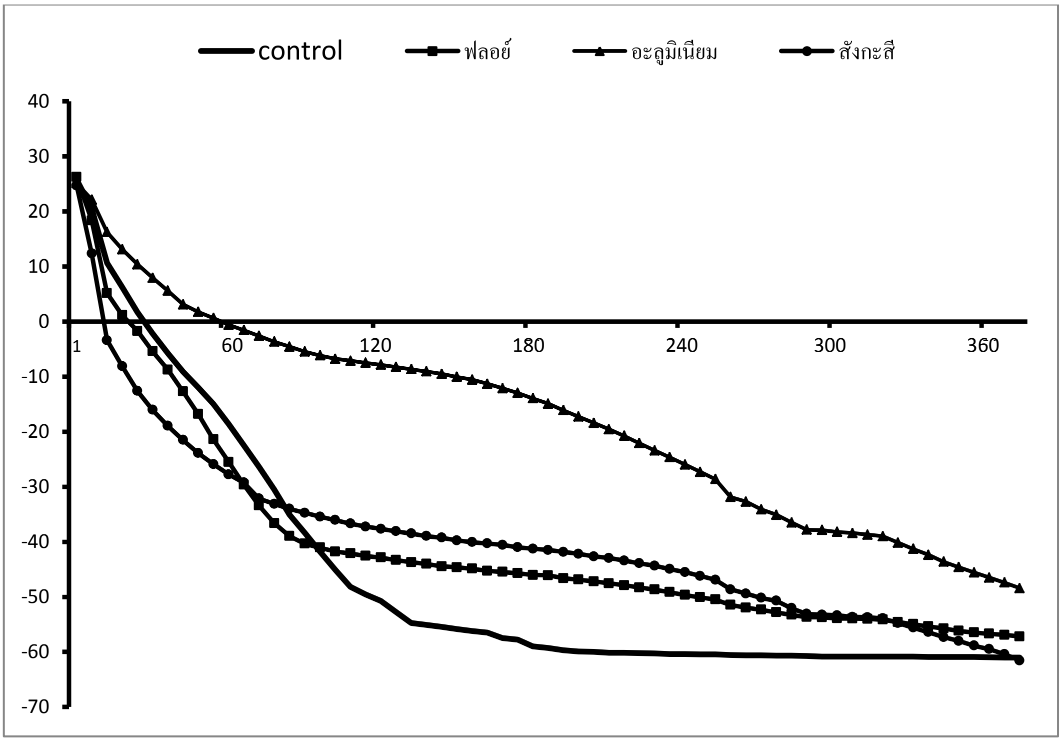
ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)



ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยมีอุปกรณ์ห่อหุ้ม เมื่อแช่แข็งอยู่ในน้ำแข็งแห้ง -79 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 69 อัตราการลดอุณหภูมิภายในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยมีอุปกรณ์ห่อหุ้ม เมื่อแช่แข็งอยู่ในน้ำแข็งแห้ง -79 องศาเซลเซียส

ชนิดของวัสดุ	อัตราการลดอุณหภูมิในหลอด (องศาเซลเซียส/นาที)
หลอดฟางไม่มีอุปกรณ์ในห่อหุ้ม (Control)	-78.8
สายหลอดซิลิโคนห่อหุ้มหลอดฟาง	-21
สายออกซิเจนห่อหุ้มหลอดฟาง	-37.2
หลอด Centrifuge tube ห่อหุ้มหลอดฟาง	-28
หลอดสายไฟห่อหุ้มหลอด	-31.8



ภาพที่ 12 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิภายใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร โดยมีอุปกรณ์ห่อหุ้ม เมื่อแช่แข็งอยู่ในน้ำแข็งแห้ง -79 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 70 อัตราการลดอุณหภูมิภายใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร โดยมีอุปกรณ์ห่อหุ้ม เมื่อแช่แข็งอยู่ในน้ำแข็งแห้ง -79 องศาเซลเซียส

ชนิดของวัสดุ	**อัตราการลดอุณหภูมิในหลอด (องศาเซลเซียส/นาที)**
Cryotube ไม่มีอุปกรณ์ในห่อหุ้ม (Control)	-72.6
แผ่นสังกะสีห่อหุ้ม Cryotube	-26.6
แผ่นอะลูมิเนียมห่อหุ้ม Cryotube	-16.9
กระดาษฟอยล์ห่อหุ้ม Cryotube	-43.8

บทที่ 5
สรุป อภิปราย และข้อเสนอแนะ

สรุปผลการทดลอง

1. ศึกษาผลของอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดน้ำเชื้อ (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่มีต่อการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

จากผลการศึกษาการแช่แข็งในหลอดห่อหุ้ม 4 ชนิด คือ สายหลอดซิลิโคน สายออกซิเจน หลอด Centrifuge tube หลอดสายไฟฟ้า พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่อยู่ในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงสุด คือ 78±2.22 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดสูงเฉลี่ยเท่ากับ 86±3.29 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 90±9.52 วินาที และอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังละลาย 22.1±0.71 องศาเซลเซียส

2. ศึกษาผลของอุปกรณ์ห่อหุ้ม Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่มีต่อการแช่แข็งและการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

จากผลการทดลองการแช่โดยนำอุปกรณ์มาห่อหุ้ม 3 ชนิดด้วยกัน คือ แผ่นสังกะสี, แผ่นอะลูมิเนียม และกระดาษฟอยล์ พบว่า Cryotube ที่หอหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 80±0.00 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดสูงถึง 86±2.22 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 126±11.53 วินาที และอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังละลาย 17.3±0.45 องศาเซลเซียส

3. ศึกษาการพัฒนาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งปลาตะเพียนขาวไว้ในรูปแบบต่าง ๆ ด้วยน้ำแข็งแห้ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งไว้เป็นเวลา 28 วัน โดยเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ที่ตู้แช่ -20 องศาเซลเซียส พบว่าไม่ปรากฏการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายและไม่พบการมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังการเก็บรักษา ทั้งในหลอดฟางและ Cryotube

การเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส ในเวลานาน 28 วัน ในหลอดฟางปรากฏเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงถึง 80±0.00 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 74±4.14 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 81±7.16 วินาที อุณหภูมิน้ำเชื้อหลังละลายที่ 25.6±0.08 องศาเซลเซียส และใน Cryotube ประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้ 80±0.00 เปอร์เซ็นต์ ประเมินการมีชีวิตรอดของสเปิร์มได้สูงถึง 84±4.21

เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 78±8.66 วินาที อุณหภูมิน้ำเชื้อหลังละลายที่ 15.5±0.75 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในน้ำแข็งแห้ง -79 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน ในหลอดฟางพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 80±0.00 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 85±3.50 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 81±7.15 วินาที อุณหภูมิน้ำเชื้อหลังละลายที่ 25.0±0.24 องศาเซลเซียส และใน Cryotube เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 80±0.00 เปอร์เซ็นต์ ประเมินการมีชีวิตรอดของสเปิร์มเฉลี่ย 83±3.34 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 67±5.73 วินาที อุณหภูมิน้ำเชื้อหลังละลายที่ 16.9±0.48 องศาเซลเซียส

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในถังไนโตรเจนเหลว -196 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 28 วัน ในหลอดฟางพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงเฉลี่ยเท่ากับ 80±0.00 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 80±2.88 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 69±8.49 วินาที อุณหภูมิน้ำเชื้อหลังละลายที่ 25.3±0.19 องศาเซลเซียส และใน Cryotube พบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเฉลี่ยเท่ากับ 80±0.00 เปอร์เซ็นต์ ประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเฉลี่ยเท่ากับ 91±3.23 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 86±10.80 วินาที อุณหภูมิน้ำเชื้อหลังละลายที่ 17.5±0.36 องศาเซลเซียส

อภิปรายผล

1. การใช้ CaF-HBSS และ DMSO 10%

การใช้ Calcium-Free Hank’s balanced salt solution และ DMSO (Dimethyl sulfoxide) 20% ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวมีค่าสูงถึง 80% การมีชีวิตของสเปิร์มมากกว่า 98% เมื่อเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในบัฟเฟอร์สูตร CaF-HBSS ในอัตราส่วน 1:1 ร่วมกับ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10%

การเจือจางน้ำเชื้อ Ca-FHBSS เพื่อให้น้ำเชื้อเจือจางไม่หนืดเกินไป ทำให้น้ำเชื้อที่ถูกเจือจางสามารถใส่ลงไปในหลอดฟาง หรือ Cryotube ได้ง่าย อีกทั้งน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางยังได้แหล่งพลังงานจากสารละลายบัฟเฟอร์ โดยสเปิร์มจะไม่เคลื่อนที่ในระหว่างการเจือจาง ดังนั้นคุณสมบัติของสารละลายบัฟเฟอร์ต้องมีองค์ประกอบของอิออนต่าง ๆ และมีค่าแรงดันออสโมติกที่ใกล้เคียงกับน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (Seminal fluid) (วัฒนะ ลีลาภัทร, 2551) น้ำเชื้อของปลาตะเพียนขาวมีค่าออสโมลาริตี้ประมาณ 293.11±2.52 mOsm/kg สารละลายบัฟเฟอร์ที่มีค่าออสโมลาริตี้ต่ำกว่า 200 mOsm/kg จะทำให้สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ และสารละลายบัฟเฟอร์มีค่าออสโมลาริตี้มากกว่า

300 mOsm/kg (รัชดาภรณ์ อินทเกษม, 2557) เมื่อเจือจางน้ำเชื้อปลาพบว่าไม่มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ดังนั้นการใช้บัฟเฟอร์สูตร CaF-HBSS จึงมีความเหมาะสมที่นำมาใช้ในการเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว และใช้ร่วมกับ DMSO 10% ซึ่งเป็นความเข้มข้นสุดท้ายหลังการเจือจาง สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่สามารถแทรกซึมเข้าสู่เซลล์สเปิร์ม ป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์สเปิร์ม สารไครโอโพรแทคแทนท์ในระดับความเข้มข้น 10 % มีความเป็นพิษกับเซลล์สเปิร์มปลาตะเพียนขาวน้อยมาก เช่นเดียวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (รัชดาภรณ์ อินทเกษม, 2557) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (ไกรสร ภู่สุวรรณ, 2555) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน (กมลวรรณ เสวิภณ, 2550) การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาดุกอุย *Clarias macrocephalus* (Vuthiphandchai et al., 2009) ที่ต่างก็ใช้ DMSO ในการแช่แข็งน้ำเชื้อแล้วให้ผลดี

2. การแช่แข็ง

การใช้น้ำแข็งแห้งลดอุณหภูมิน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางแล้ว แล้วนำไปใส่ภายในช่องของหลอดสายไฟทั้ง 2 ช่อง หลอดสายไฟฟ้าเป็นวัสดุห่อหุ้มป้องกันการสัมผัสความเย็นจากน้ำแข็งแห้งโดยตรง ซึ่งหลอดสายไฟผลิตมาจาก PVC (Polyvinyl chloride) ความหนา 0.14 เซนติเมตร หลอดสายไฟมีค่าการนำความร้อน 0.19 (W/ m K) (The Engineering Tool Box, 2016) จึงสามารถลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (Freezing rate) ที่อัตรา -31.8 องศาเซลเซียส/ นาที จากผลการทดลองสอดคล้องกับการละลายของ Yasui et al. (2008) ที่นำหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 6.65 มิลลิเมตร มาเป็นอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำมาลดอุณหภูมิในน้ำแข็งแห้ง 2 นาที ซึ่งภายในหลอดฉีดยามีช่องว่างระหว่างหลอดฟางและหลอดฉีดยา จึงทำให้ไอความเย็นของน้ำแข็งแห้งบดละเอียดไหลผ่านหลอดฉีดยาเข้ามาสู่หลอดฟางที่กำลังลดอุณหภูมิ ซึ่งสามารถลดอุณหภูมิได้ในอัตรา -33.3±2.09 องศาเซลเซียส/นาที การใช้น้ำแข็งแห้งลดอุณหภูมิสามารถลดอุณหภูมิได้ เช่นเดียวกับการใช้เครื่องมืออัตโนมัติในลดอุณหภูมิน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ที่ใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิได้อัตราการลดอุณหภูมิที่ -8 องศาเซลเซียส/ นาที (รัชดาภรณ์ อินทเกษม, 2557; Boonthai et al., 2014) และน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ ที่ลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติที่อัตรา -10 องศาเซลเซียส/นาที (ผาณิต จันโอกุล, 2553) และยังสอดคล้องกับการใช้ไอไนโตรเจนเหลวในการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*) (Irawan et al., 2010)

การนำ Cryotube มาห่อหุ้มด้วยกระดาษฟอยล์ กระดาษฟอยล์เป็นวัสดุที่ทำจากโลหะอะลูมิเนียม โดยอะลูมิเนียมซึ่งมีค่าความนำความร้อนถึง 300 K หรือ 235 (W/m K) ซึ่งเป็นวัสดุที่นำความร้อนได้ดี ในทางกลับกันกระดาษฟอยล์มีก็นำความเย็นได้ดี จึงนำความเย็นจากน้ำแข็งแห้งมาสัมผัสกับ Cryotube ได้ดีจึงส่งผลให้สามารถลดอุณหภูมิด้วยน้ำแข็งแห้งได้ -43.8 องศาเซลเซียส/นาที

ซึ่งสามารถใช้ได้เหมือนกับการลดอุณหภูมิด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ลดอุณหภูมิในอัตรา -1 องศาเซลเซียส/นาที เมื่อทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วย Cryovial (รัชดาภรณ์ อินทเกษม, 2557) สอดคล้องกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาม้าลาย (*Brachydanio rerio*) ที่บรรจุลงในหลอด Centrifuge พลาสติกขนาด 12 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่ใน Pyrex culture tube ขนาด 12x100 มิลลิลิตร แล้วไปเก็บไว้ในน้ำแข็งแห้งนาน 20 นาที ซึ่งสามารถลดอุณหภูมิได้ 16 องศาเซลเซียส/นาที Harvey et al. (1982) เช่นเดียวกันยังสอดคล้องกับการแช่แข็งแช่แข็งน้ำเชื้อปลากด (*Mystus nemurus*) ด้วย Vials ขนาด 5 มิลลิลิตร ที่นำมาเก็บไว้ในถังน้ำแข็งแห้ง 5 นาที Muchlisin et al. (2004) และยังสอดคล้องกับการทดลองของ Draper et al. (2009) ที่เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาม้าลาย (Zebra fish) ใน Cryogenic vials ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่นำมาใส่ไว้ใน Conical tube ขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บแช่แข็งไว้ในน้ำแข็งแห้งบดละเอียดนาน 20 นาที

การลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งจะสัมพันธ์กับเวลาในการเปลี่ยนสถานะจากของเหลวเป็นของแข็ง โดยการลดอุณหภูมิช้า ๆ น้ำภายในเซลล์สเปิร์มจะไหลออกมาทำให้เซลล์อยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์ การออสโมซีสของน้ำจะไหลจากที่ที่มีความเข้มข้นสูงไปสู่ที่มีความเข้มข้นต่ำ เมื่อน้ำกลายเป็นน้ำแข็งจะทำให้เซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้น (Solute effect) น้ำภายในเซลล์ไหลออกมานอกเซลล์ (Dehydration) ซึ่งจะเป็นการสูญเสียน้ำภายในเซลล์ จะทำให้เซลล์หดตัว (shrinkage) แต่การลดอุณหภูมิด้วยการใช้อัตราลดอุณหภูมิที่สูงขึ้นเพื่อแช่แข็งเซลล์ น้ำภายในเซลล์จะไหลออกมาน้อยซึ่งจะยังคงสภาพความสมบูรณ์ของเซลล์ (Denniston et al., 2000) การลดความเย็นด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่สูงและระยะเวลาน้อย จะทำให้น้ำกระจายแพร่ออกจากเซลล์สู่ภายนอกน้อยลงจะคงสภาพความสมบูรณ์ของเซลล์ไว้ อย่างไรก็ตามการแช่แข็งจะมีระยะเวลาสมดุล (Equilibration Time) ต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ (Leung, 1991) เซลล์สเปิร์มที่มีขนาดเล็กสามารถคงสภาพความสมบูรณ์ของเซลล์ได้มาก เนื่องจากจะสูญเสียน้ำส่วนหนึ่งภายในระหว่างการแช่แข็ง โดยจะสูญเสียน้ำภายในเซลล์น้อยกว่าเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ การลดอุณหภูมิอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ 4 องศาเซลเซียส ถึง -70 องศาเซลเซียส จะทำให้สารไครโอโพรเทคแทนท์ที่แทรกซึมเข้าสู่ภายในเซลล์ค่อย ๆ ปรับระดับออสโมลาริตี้และสมุดลย์การเกิดผลึกน้ำแข็ง (Ice crystal) ภายในเซลล์สเปิร์มอย่างต่อเนื่อง (Yamaner, Ekici, Tuncelli, & Memis, 2015)

3. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิต่าง ๆ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในหลอดฟาง 0.25 มิลลิลิตร ลดอุณหภูมิด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง แล้วนำไปเก็บที่ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส หลังการลดอุณหภูมิด้วยน้ำแข็งแห้งและประเมินผลทุก ๆ 7 วัน ซึ่งไม่ปรากฏการเคลื่อนที่และการมีชีวิตรอดของสเปิร์ม ทั้งในหลอดฟาง และ Cryotube ซึ่งแตกต่างกับการทดลองของ ปรียานุช ลิมปิสวัสดิ์ (2558) ที่เก็บรักษาน้ำเชื้อ

ปลาตะเพียนขาวด้วยการลดอุณหภูมิแช่แข็งด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง จากนั้นนำไปเก็บในตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานสุด 2 วัน ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 13.0±6.7 เปอร์เซ็นต์ ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 45±22.8 วินาที แต่เมื่อประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในวันที่ 3 ก็ไม่ปรากฏว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ แต่การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มที่ทำการเก็บรักษาไว้ 1 เดือน ของการศึกษา ปริยานุช ลิมปิสวัสดิ์ (2558) พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดสูงถึง 22.6 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ก็ตามหลังจากการลดอุณหภูมิ เพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้งที่ -79 องศาเซลเซียส แล้วนำมาเก็บไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จะเป็นทำให้ความเย็นลดคลงอย่างช้า ๆ จาก -79 องศาเซลเซียส ลดลงเหลือ -20 องศาเซลเซียส เมื่ออุณหภูมิลดลงประสิทธิภาพในการแช่แข็งและเก็บรักษาลดลง ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่ -20 องศาเซลเซียส จึงไม่สามารถทำการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ได้นาน เนื่องจากอุณหภูมินี้ไม่สามารถหยุดยั้งกิจกรรมการทำงานภายในเซลล์การของสเปิร์มได้ แต่การเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ที่ -70 ถึง -90 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานหลายปี (Ryan, 2004) เช่นเดียวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในน้ำแข็งแห้งบดละเอียด (Powdered) ของการศึกษาครั้งนี้ให้ผลการเก็บเช่นเดียวกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาม้าลาย (Zebrafish) (Carmichael, Westerfield, & Varga, 2009)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน ในหลอดฟางมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าสูงถึง 80±0.00 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเฉลี่ยเท่ากับ 74±4.14 เปอร์เซ็นต์ และใน Cryotube ประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้ 80±0.00 เปอร์เซ็นต์ ประเมินการมีชีวิตรอดได้สูงถึง 84±4.21 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความสอดคล้องกับ ปริยานุช ลิมปิสวัสดิ์ (2558) ที่เก็บรักษาน้ำปลาตะเพียนขาว ในหลอดฟาง 0.25 มิลลิลิตร ลดอุณหภูมิด้วยน้ำแข็งแห้งนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เป็นระยะนาน 1 เดือน หลังการละลายแล้วนำเอาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาประเมินยังพบการเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 53 เปอร์เซ็นต์ การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม 73.3 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอุณหภูมิที่ต่ำกว่า -130 องศาเซลเซียส จะสามารถหยุดยั้งกิจกรรมภายในเซลล์ (Germann, Oh, Schmidt, Schon, & Zimmerman, 2013) ทำให้สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งจากนั้นย้ายลงไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 28 วันในการทดลองครั้งนี้ พบว่ามีสอดคล้องกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาม้าลาย ที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง จากนั้นนำไปเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 25 วัน พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์ม 43±12.3 เปอร์เซ็นต์ และมีเปอร์เซ็นต์การเพาะฟัก 51±35.6 เปอร์เซ็นต์ หลังการผสมเทียม (Harvey et al., 1982) ยังมีความสอดคล้องกับการ

เก็บรักษาน้ำเชื้อปลากด (*Mystus nemurus*) ที่อุณหภูมิต่ำโดยการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้งบดละเอียด จากนั้นนำมาเก็บรักษาไว้ในถังไนโตรเจนเหลว 15 วัน พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าประมาณ 58 เปอร์เซ็นต์ (Muchlisin et al., 2004) นอกจากนี้การทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาม้าลาย ลดอุณหภูมิด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง จากนั้นย้ายไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลวนาน 8 ปี เมื่อนำมาปฏิสนธิกับไข่ปลาสามารถปฏิสนธิได้สูงถึง 62 เปอร์เซ็นต์ (Draper et al., 2009) การเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานเนื่องจากอุณหภูมิที่ -196 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ต่ำมากจึงสามารถหยุดยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ (Wolf & Bryant, 1999) และไม่มีการกระตุ้นให้เกิดกิจกรรมภายในเซลล์ (Chain & Quinn, 2010)

4. การเพิ่มอุณหภูมิน้ำเชื้อ

การเพิ่มอุณหภูมิหรือการละลายน้ำเชื้อ เป็นการย้อนกลับกระบวนการแช่แข็งเพื่อทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งให้กลับสภาพของเหลวแบบเดิม เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป ในระหว่างการลดอุณหภูมิ น้ำภายในตัวสเปิร์มจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็นรูปของผลึกน้ำแข็ง (Ice crystal) ที่อยู่ในสเปิร์ม เมื่อเพิ่มอุณหภูมิอย่างช้า ๆ และระยะเวลาสั้น เซลล์สเปิร์มไม่สามารถซึมซับน้ำที่สูญเสียไป (Dehydrated) กลับเข้าสู่เซลล์ได้ เพียงพอทำให้ผลึกน้ำแข็งในตัวสเปิร์มยังไม่ละลาย การเพิ่มอุณหภูมิในขณะทำการละลายในอัตราที่สูงขึ้นและเวลานานจะทำให้สเปิร์มเสียหายได้ (Leung, 1991)

จากผลการวัดอุณหภูมิหลังการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ภายในหลอดฟาง

0.25 มิลลิลิตร ที่ละลายด้วยอุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลายอยู่ระหว่าง 13-30 องศาเซลเซียส การใช้อุณหภูมิละลายที่ 50-70 องศาเซลเซียส มีค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลายที่สูงขึ้นวัดได้ 31-32 องศาเซลเซียส และ Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ที่ละลายที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส พบว่ามีค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลายที่ 8-17 องศาเซลเซียส ด้วยเหตุที่อุณหภูมิในตัวปลาจะอยู่ในระดับใกล้เคียงกันอุณหภูมิของน้ำ อันเนื่องจากปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น (สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์, 2545) ดังนั้นการละลายน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งจึงต้องให้อุณหภูมิน้ำเชื้อมีค่าใกล้เคียงกับตัวปลา เพื่อให้สเปิร์มยังคงมีชีวิต เพราะถ้าอุณหภูมิน้ำเชื้อสูงเกินไปหลังจากการละลาย จะทำให้สเปิร์มตายมากขึ้น

การบรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในการทดลองนี้บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวลงไป 80 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร เมื่อใช้อุณหภูมิละลายน้ำเชื้อที่สูงอาจส่งผลให้อุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อภายในหลอดฟางที่วัดได้มีค่าสูงตามไปด้วย ตัวสเปิร์มที่อยู่ภายในหลอดทดลองอาจจะได้รับความเสียหาย เมื่อนำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อจึงไม่พบ

เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังการละลายที่น้ำแข็งมีอุณหภูมิสูงขึ้น ดังนั้นการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อยู่ในหลอดฟาง จึงควรใช้อุณหภูมิละลายที่เหมาะสมตั้งแต่ 10-40 องศาเซลเซียส จะทำให้สเปิร์มยังคงมีคุณภาพดีอยู่เมื่อนำมาประเมิน ได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีหลังการละลาย เช่นเดียวกับ การทดลองนำน้ำเชื้อปลา loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) ที่แช่แข็งมาทำการละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที (Yasui et al., 2008) อัตราการละลายน้ำเชื้อปลา Sturgeon ที่แช่แข็งในในหลอดฟาง 0.5 มิลลิลิตร ควรใช้อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 8 วินาที (Yamaner et al., 2015) และยังสอดคล้องกับการละลายน้ำเชื้อปลาช่อนทะเลหลังการแช่แข็งที่ควรใช้การละลายที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที ซึ่งได้บรรจุน้ำเชื้อปลาช่อนทะเลลงไป 0.23 มิลลิลิตร ในหลอดฟาง 0.25 มิลลิลิตร (นิพนธ์ เสนอินทร์, ธีรวัฒน์ จริตงาม และเรณู ยาชิโร, 2555) และยังสอดคล้องกับการการละลายน้ำเชื้อปลากะรังหงส์อุณหภูมิที่ 40 องศาเซลเซียส 8 วินาที (เรณู ยาชิโร และนิพนธ์ เสนอินทร์, 2551) แต่มีความแตกต่างกับการทดลองการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว ของรัชดาภรณ์ อินทเกษม (2557) ที่ละลายน้ำเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 วินาที หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยบรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวลงไป 0.20 มิลลิลิตร และการทดลองการละลายน้ำเชื้อปลาใน (*Cyprinus carpio*) ของ Irawan (2010) ที่ละลายน้ำเชื้อปลาในที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 วินาที โดยได้บรรจุน้ำเชื้อปลาลงไป 200 ไมโครลิตร ในหลอดฟาง 0.25 มิลลิลิตร

ด้วยเหตุที่ปริมาตรในการบรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวลงไปในหลอดฟาง ในการทดลองครั้งนี้ได้บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวลงไป 80 ไมโครลิตร (ในหลอดฟาง 250 ไมโครลิตร) บรรจุน้ำเชื้อลงไปไม่ถึง 50% ของหลอด เมื่อนำไปละลายในอุณหภูมิที่สูงจะทำสเปิร์มได้รับความเสียหาย จากการทดลองในครั้งนี้อุณหภูมิในการละลายที่ 70 เซลเซียส เมื่อนำมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่ามีค่าเฉลี่ยในการเคลื่อนที่เพียง 31 เปอร์เซ็นต์ และชนิดของหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร มีความหนา 0.05 เซนติเมตร มีค่าการนำความร้อน 0.19 (W/m K) (The Engineering Tool Box, 2016) ซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิในการละลาย 10-40 องศาเซลเซียส และเมื่อวัดค่าอุณหภูมิของน้ำเชื้อภายในหลอดฟางหลังการละลายมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 13-30 องศาเซลเซียส โดยที่อุณหภูมิน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงปลาตะเพียนขาว มีอุณหภูมิ 25-31 องศาเซลเซียส

สำหรับ Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวลงไป 800 ไมโครลิตร นำมาละลายที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์ม ก็พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ และ

การมีชีวิตรอดของสเปิร์มมีค่าสูง เช่นเดียวกับการทดลองในการละลายน้ำเชื้อปลาม้าลายที่แช่แข็งในหลอด Vials ขนาด 5 มิลลิลิตร โดยใช้อุณหภูมิน้ำ 40 องศาเซลเซียส นาน 5 วินาที (Muchlisin et al., 2004) สอดคล้องกับการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาม้าลายในหลอด Cryogenic vials ขนาด 2 มิลลิลิตร ที่บรรจุน้ำเชื้อปลาม้าลายที่มีการเจือจางลงไป 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำน้ำเชื้อแช่แข็งละลายที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส 10 วินาที (Draper et al., 2009)

จากการทดลองเพิ่มอุณหภูมิน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในการทดลองนี้ ในครั้งนี้มีความแตกต่างกันในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวของ รัชดาภรณ์ อินทเกษม (2557) ที่บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปในหลอด Cryovial ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ละลายน้ำเชื้อโดยใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 50 วินาที เพียงแต่ในการทดลองในครั้งนี้ได้บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวลงไปใน Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ในปริมาณ 800 ไมโครลิตร และเมื่อละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 45 วินาที เมื่อวัดอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลายพบว่ามีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 8-17 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาประเมินคุณภาพหลังการละลายพบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตสูง

สรุปผลการทดลอง

1. น้ำแข็งแห้งสามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวได้อย่างมีประสิทธิภาพ
2. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำแข็งแห้งด้วยหลอดฟาง 0.25 มิลลิลิตร สามารถทำได้โดยใช้หลอดสายไฟฟ้าห่อหุ้มหลอดฟาง และใช้กระดาษฟอยล์หุ้มหลอด Cryotube 1.8 มิลลิลิตร ขณะแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง
3. อัตราการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางที่เหมาะสมควรใช้ระหว่างอุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส และใน Cryotube 1.8 มิลลิลิตร ควรใช้ที่อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส
4. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้นาน 28 วัน ในอุณหภูมิตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปละตะเพียนขาวไว้ได้ แต่การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียสและน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) มีประสิทธิภาพเหมือนกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในถังไนโตรเจนเหลว ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และการมีชีวิตของสเปิร์มมีค่าสูง

ข้อเสนอแนะ

1. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้ง ควรประเมินน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการนำไปผสมเทียม เพื่อประเมินประสิทธิภาพของน้ำเชื้อแช่แข็งในการปฏิสนธิกับไข่ เพื่อการประยุกต์ใช้ต่อไป

2. การนำน้ำแข็งแห้งมาใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเหมาะสมที่จะนำมาประยุกต์กับภาคการผลิตในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เนื่องจากน้ำแข็งแห้งหาได้ง่าย ราคาไม่สูง ไม่จำเป็นต้องใช้อุปกรณ์หรือภาชนะจำเพาะเหมือนไนโตรเจนเหลว อีกทั้งยังคงประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ในระยะเวลาหนึ่ง และการใช้น้ำแข็งแห้งยังสามารถนำมาใช้งานภาคสนามได้อีกด้วย

บรรณานุกรม

กมลวรรณ เสวีภณ. (2550). *การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน (Cuprinus carpio) อย่างง่าย*. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

กฤษณ์ มงคลปัญญา และทัศนีย์ ภูมิพัฒน์. (2535). การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็ง. *วารสารประมง, 45*(6), 1111-1123.

กฤษณ์ มงคลปัญญา. (2536). *การเก็บน้ำเชื้อปลาแบบแช่แข็งหลักการ/ วิธีการ/ ประโยชน์*. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

กล่าวขวัญ ศรีสุข, เอกรัฐ ศรีสุข, วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2551). *การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางชีวเคมีของน้ำเชื้อปลากะพงขาว ที่เก็บแช่เย็นและแช่แข็ง*. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ไกรสร ภู่สุวรรณ. (2555). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ*. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

นลินี มารคแมน. (2527). *การศึกษาเบื้องต้นกรรมวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาสัตววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นวลมณี พงศ์ธนา และทองอยู่ อุดมเลิศ. (2547). *การปรับปรุงพันธุ์ปลาตะเพียนขาว Genetic Improvement of Silver Barb Babonymus gonionotus*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 9/2547. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำปทุมธานี, สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง.

นิพนธ์ เสนอินทร์, ธีรวัฒน์ จริตงาม และเรณู ยาชิโร. (2555). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาช่อนทะเล, Rachycentron canadum (Linnaeus, 1766) โดยวิธีการแช่แข็ง*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 35/2555. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรมประมง.

นฤมล อัศวเกศมณี. (2550). *การเลี้ยงปลาน้ำจืด*. กรุงเทพฯ: ภาพพิมพ์.

ปกรณ์ อุ่นประเสริฐ.(2530). *การเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืด*. กรุงเทพฯ: นลิน.

ปฏิญญา อ้นขวัญเมือง. (2549). *การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (Puntius goninotus) อย่างง่าย*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ปรียานุช ลิมปิสวัสดิ์. (2558). *ผลของอุณหภูมิเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งต่อคุณภาพน้ำเชื้อ*. ปัญหาพิเศษวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ผาณิต จันโอกุล. (2553). *การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายี่สกเทศ (Labeo rohita)*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

พลชาติ ผิวเณร, คงภพ อำพลศักดิ์, ถาวร จีนหมึก และชมพูนุช มรรคทรัพย์. (2550). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานิลโดยวิธีแช่แข็ง Cryopreservation of nile tilaple (Oreochromic niloticus) spermatozoa*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 6/2550. กลุ่มวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำจืด, สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ, กรมประมง.

พิชยา ณรงค์พงศ์ . (2555). *มีนวิทยา*. กรุงเทพฯ: วี.พริ้น (1991).

รัชดาภรณ์ อินทเกษร. (2557). *การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตเพียนขาว (Barbodes gonionotus)*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

เรณู ยาชิโร และนิพนธ์ เสนอินทร์. (2551). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะรังหงส์, Cromileptes altivelis (Valenciennes,1828) โดยวิธีแช่แข็ง*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 50/2551. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรมประมง.

วัฒนะ ลีลาภัทร. (2551). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 1/2551. กลุ่มอำนวยการและประสานงานวิชาการ, กรมประมงกระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย. (2536). *การเก็บเพาะพันธุ์ปลา*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2548). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวและปลาดุกอุย แบบแช่เย็นและแช่แข็งเพื่อการผสมเทียม*. ชลบุรี: คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย. (2546). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเทโพและปลาสวาย แบบแช่แข็งเพื่อการผสมเทียม*. ชลบุรี: ภาควิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย, สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และกาญจนา หริ่มเพ็ง. (2552). *การประยุกต์ใช้สมุนไพรในภาคตะวันออก เพื่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาดุกอัฟริกันแบบแช่แข็ง*. ชลบุรี: คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2557). *การพัฒนาศักยภาพในการจัดเก็บรักษาน้ำเชื้อปลายี่สกไทย เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์*. ชลบุรี: คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ศูนย์สารสนเทศ กรมประมง. (2555). *สถิติการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2555*. เอกสารฉบับที่ 9/2557. กรุงเทพฯ: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

สมโภชน์ อัคคะทวีวัฒน์. (2545). *ภาพปลาและสัตว์น้ำของไทย* (พิมพ์ครั้งที่ 4). กรุงเทพฯ: องค์การค้าของคุรุสภา.

สมร พรชื่นชูวงศ์. (2554). *รายงานการวิจัยการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลานวลจันทร์และการศึกษาอัตราส่วนระหว่างสเปิร์มและไข่ที่เหมาะสม ของการใช้น้ำเชื่อสดและน้ำเชื้อแช่แข็ง*. รายงานการวิจัย. นครราชสีมา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

สันต์ นาตะสุวรรณ. (2548). *คู่มือปลาน้ำจืด Fresh – water Fisher Handbook*. กรุงเทพฯ: เพ็ท-แพล้น พับลิชชิ่ง.

สำนักงานนโยบายและแผนสิ่งแวดล้อม กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. (2545). *รายงานสถานการณ์คุณภาพสิ่งแวดล้อม พ.ศ. 2544*. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์วิฑูรย์การปก.

สุดาวรรณ อ่วมอ่อง. (ม.ป.ป.). *น้ำแข็งแห้ง*. เข้าถึงได้จาก http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_toxic/a_tx_1_001c.asp?info_id=265

สุทธิพงศ์ วุฒิเจริญวงศ์. (2552). *การเพาะพันธุ์ปลา*. กรุงเทพฯ: ธนวัชการพิมพ์.

สุเมธ ชมภูธวัช. (2550). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงแดง (Lutjanus argentimaculatus) ด้วยวิธีการแช่แข็ง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

อนงค์ หันพานนท์. (2539). *การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาสวายโดยวิธีแช่แข็ง*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, โครงการวิทยาศาสตร์ชีวภาพ, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อภิชาติ ศรีสอาด. (2543). *คู่มือการเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดเศรษฐกิจ* (พิมพ์ครั้งที่ 2). กรุงเทพฯ: นาคา อินเตอร์มิเดีย.

อุธร ฤทธิลึก. (2550). *การเลี้ยงปลาเพื่อการค้า*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

Bakjak, I., & Glogowski, J. (1997). Cryopreservation of sperm of common carp *Cyprinus carpio L. Aquacuiyure Research, 28,* 567-571.

Boonthai, T., Sooksawat, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2014). Evaluation of the potential source of bacterial contamination during cryopreservation process of silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm. *Aquaculture Research,* 1-13.

Carolsfeld, J., Godinho, H. P., Zaniboni Filho, E., & Harvey, B.J. (2003). Cryoperservation of sperm in Brazilian migratory fish conservation. *Journal of Fish Biology, 63,* 472-489.

Carmichael, C., Westerfield, M., & Varga, Z. M. (2009). Cryopreservation and in vitro at the Zebrafish. *HIH Pubic Access, 546,* 45-65.

Chian, R. C. (2010). Cryobiology : an overview. In R. C. Chian, & P. Quinn. (Eds.), *Fertility Cryopreservation* (pp. 1-9). New York: Cambridge University Press.

Denniston, R. S., Michelet, S., & Godke, R. A. (2000). Principles of cryopreservation. In R. T. Terrence, & M. M. Patricia. (Eds.), *Cryopreservation in aquatic species* (pp. 56-74). USA: World Aquacutrure Society. Baton Rouge, Louisiana.

Draper, B. W., Stout, J., Hernandez, R., & Moens, C. (2009). A High- throughput sperm freezing protocol for zebrafish cryopreservation. *Journal Visualized Experiments, 29,* 1395.

Dunford, J. V., Lucas, J., Vent, N., Clark, R. F., & Cantrell, F. L. (2009). Asphyxiation due to dry ice in a walk-in freezer. *The Journal of Emergency Medicine, 36*(4), 353-356.

Fauvel, C., Suquet, M., & Cosson, J. (2010). Evaluation of fish sperm quality. *Journal of Applied Ichthyology, 26*(5), 636-643.

Germann, A., Oh, Y-J., Schmidt, T., Schon, U., & Zimmerman, H. (2013). Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, Viability and T-cell function. *Cryobiology, 67*, 193-200.

Harvey, B., Kelley, R. N., & Ashwood-Smith, M. J. (1982). Cryopreservation of zebra fish spermatozoa using methanol. *CAN. J ZOOL, 60,* 1867-1870.

Ineos. (2016). *Typical Engineering Properties of Polypropylene*. Retrieved from http://www.ineos.com/globalassets/ineos-group/businesses/ineos-olefins-and-polymers-usa/products/technical-information--patents/ineos-engineering-properties-of-pp.pdf

Lrawan, H., Vuthiphandchai, V., & Nimrat, S. (2010). The effect of extenders, Cryoprotectants and Cryoproservation methods on common carp (Cyprinus carpio) sperm. *Animal Reproduction Science, 122,* 236-243.

Kusuda, S., Koide, N., Kawamula, H., Teranishi, T., Nakajima, J., Yamaha, E., Arai, K., & Ohta, H. (2005). Cryopreservation diluents for spermatozoa of Sakhalin taimen *Hucho perryi. FISHERIES SCIENCE, 71,* 293-298.

Leung, L. K. P. (1991). Principles of biological Cryopreservation. In G. M. Jamieson. (Ed.), *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa* (pp. 231-244). Cambridge: Cambridge University Press.

Jun, L. I., Qinghua, L. I. U., & Shicui, Z. (2006). Evaluation of the damage in the fish spermatozoa cryopreservation. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 24*(4), 370-377.

Maria, A. N., Viveiros, A. T. M., Freitas, R. T. F., & Oliveira, A. V. (2006). Extenders and cryoprotectant for cooling and freezing of piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) semen, an endangered Brazilian teleost fish. *Aquaculture, 260,* 298-306.

Muchlisin, Z. A., Hashim, R., & Chong, A. S. C. (2004). Prelimary 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.

Muchlisin, Z. A. (2005). Current Status of Extenders and Cryoprotrctacts on Fish Spermatozoa Cryopreservation. *BIODIVERSITAS* , *6*(1), 12-15.

Ryan, J. (2004). *General Guide for Cryogenically Storing Animal Cell Cultures. Coring Incorporated Printed*. Retrieved from https://static.fishersci.com/cmsassets/downloads/segment/Scientific/pdf/Cell_Culture/Technical_Guides/cryogen_storing_animalcultures.pdf.

Suquet, M., Dreanno, C., Fauvel, C., Cosson, J., & Billard, R. (2000). Cryopreservation of sperm in marine fish. *Aquaculture Research, 31,* 231-243.

Tafazzal, M., & Ahmed, A. T. A. (1991). Breeding biology of tawes (*Puntius gonionotus* Bleeker). *Indian journal of Fisheries, 38* (1), 26-29.

The Engineering Tool Box. (2016). *Plastics-Thermal Conductivity Coefficients*. Retrieved from http://www.engineeringtoolbox.com/thermal-conductivity-plastics-d_1786.html

Tiersch, T. R., & Mazik , P. M. (2000). *Cryopreservation in aquatic species*. USA: World Aquacutrure Society, Baton Rouge, Louisiana.

Vuthiphandchai, V., Thadsri, I., & Nimrat, S. (2009). Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. *Aquaculture, 296,* 58-64.

Vuthiphandchai, V., & Zohar, Y. (1999). Age-related sperm quality of captive striped bass *Morone saxatilis. Journal World Aquacult Society, 30*, 65-72. ใน วีรพงศ์ วุฒิพันธ์ชัย และสุบัณฑิต นิ่มรัตน์. (2553). *การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากะพงขาวด้วยวิธีแช่แข็ง*. ชลบุรี: คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

Wolf, J., & Bryant, G. (1999). Feezing, drying and/or vitrification of membrane-solute-water systems. *Cryoiology, 39,* 103-129.

Yasui, G. S., Arias – Rodriguez, L., Fujimoto, T., & Arai, K. (2008). Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered ice. *Cryoletters, 29*(5), 383-390.

Yamaner, G., Ekici, A., Tuncelli, G., & Memis, D. (2015). A brief overview on cryopreservation method of sturgeon sperm. *Journal of Fisheries & Sciences, 30*(2), 14-20.

ภาคผนวก

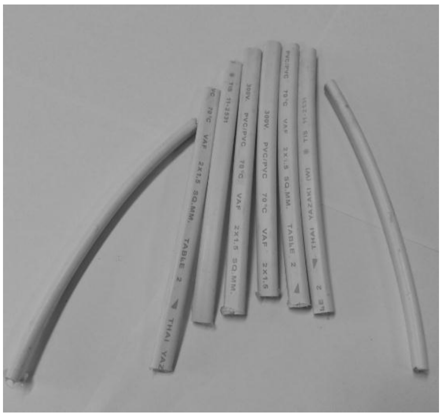
ภาคผนวก ก

อุปกรณ์ที่ใช้ในการลดอุณหภูมิน้ำเชื้อและเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง

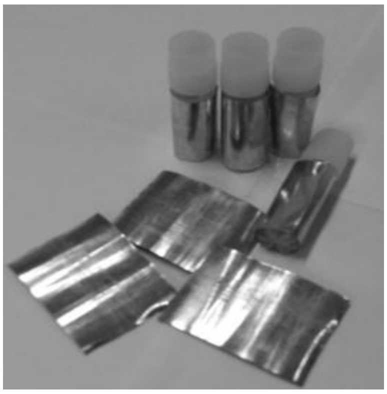
ภาพที่ 13 สายหลอดซิลิโคน

ภาพที่ 14 สายออกซิเจน

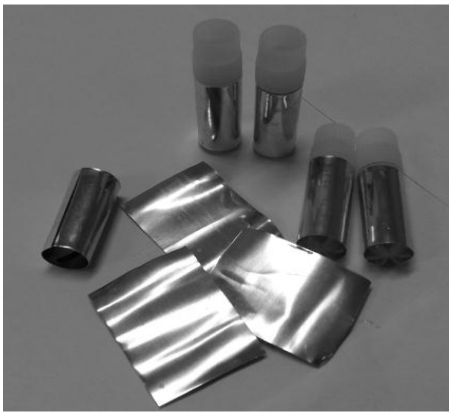
ภาพที่ 15 หลอด Centrifuge tube



ภาพที่ 16 หลอดสายไฟฟ้า



ภาพที่ 17 แผ่นสังกะสี



ภาพที่ 18 แผ่นอลูมิเนียม

ภาพที่ 19 กระดาษฟลอย์

ภาพที่ 20 หลอดฟาง (French straw) ยี่ห้อ Imv Technologies Paillette 0.25 ml

ภาพที่ 21 หลอด Cryotube 1.8 ml. ยี่ห้อ Thermo scientific Nunc cryotube vials

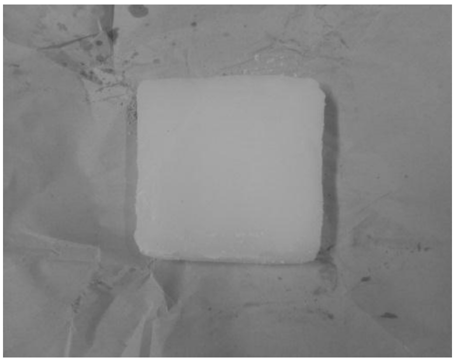
ภาพที่ 22 กล่องโฟมเก็บความเย็น (Styrofoam box) ที่บรรจุน้ำแข็งแห้ง

ภาพที่ 23 กล่องโฟมขนาดใหญ่ ใช้เก็บกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็งแห้ง

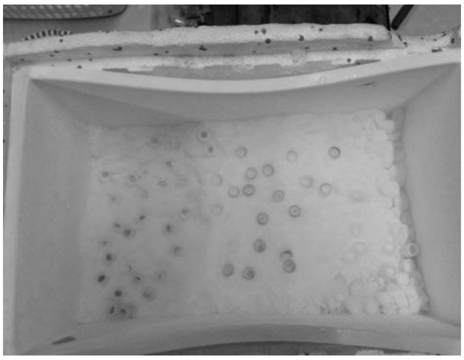
ภาพที่ 24 กาวซิลิโคนปิดปลายวัสดุห่อหุ้ม

ภาพที่ 25 ตู้แช่แข็ง -20 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 26 ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส



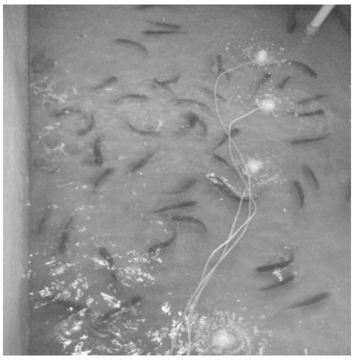
ภาพที่ 27 น้ำแข็งแห้ง Dry ice



ภาพที่ 28 การแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง

ภาพที่ 29 การละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

ภาพที่ 30 ถุงซิปล็อก



ภาพที่ 31 ปลาตะเพียนขาวที่ใช้ในการทดลอง

ภาพที่ 32 อาหารปลาตะเพียนขาว

ภาพที่ 33 การวัดอุณหภูมิภายในหลอดฟาง 0.25 ml.หลังการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ภาพที่ 34 การวัดอุณหภูมิภายใน Cryotube 1.8 ml.หลังการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิต่าง ๆ

ตารางที่ 71 การวัดขนาดวัสดุห่อหุ้มของหลอดแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำแข็งแห้ง

ลำดับ	ชนิดของวัสดุ	ความหนาของวัสดุ (เซนติเมตร)	เส้นผ่านศูนย์กลาวัสดุ (เซนติเมตร)
1	หลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ยี่ห้อ IMV Technologies Paillette 0.25 ml)	0.05	0.17
2	Cryotube ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ยี่ห้อ(Thermo scientific nunc cryotube vials 1.8 ml)	0.15	1.11
3	สายหลอดซิลิโคน (Silicone polymers) (Dura Siliconr tube ขนาด 5 x 9 mm.)	0.99	0.48
4	สายออกซิเจน (ท่อน้ำไทย THAI PIPE (5/32" x 1.5 ก.ก)	0.195	0.495
5	หลอด Centrifuge tube (nunc ขนาด 15 ml.)	0.11	1.52
6	หลอดสายไฟฟ้า (300V. PVC/PVC 70^{o}C VAF 2 x 1.5 SQ.MM. TABLE 2 THAI YAZAKI (W) TIS 11-2531)	0.14	0.39
7	แผ่นสังกะสี	0.03	-
8	แผ่นอลูมิเนียม	0.03	-
9	กระดาษฟอยล์ (Diamond Aluminum Foil)	0.01	-