บทที่ 4
ผลการวิจัย

จากการศึกษาเทคนิคในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) ได้ผลการทดลองดังนี้

การทดลองที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

ตารางที่ 1 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อสดในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่

เดือน	การเคลื่อนที่สเปิร์ม(%)	ระยะเวลา (sec)	สเปิร์มมีชีวิต(%)	Osmolality (mOsm/kg)	ความหนาแน่นของสเปิร์ม (ตัว/ml)	pH	จำนวนปลาที่มีน้ำเชื้อ/ จำนวนปลาทั้งหมด
เม.ย.53	100±0	48.67±7.63	99.19±0.75	256.22±6.13	5.19×10^{9}	6.5	4/6
พ.ค.53	100±0	48.67±8.14	98.70+1.03	266.56±1.92	4.67×10^{9}	7.0	4/6
มิ.ย.53	100±0	57.67±12.09	97.04+2.92	280.11±1.95	1.27×10^{10}	6.5	5/6
ก.ค.53	100±0	71.00±18.52	97.96±1.86	291.56±2.74	2.07×10^{10}	6.5	6/6
ส.ค.53	100±0	93.33±22.50	97.11±2.61	293.11±2.52	2.26×10^{10}	7.0	6/6
ก.ย.53	97.78±2.22	70.67±16.86	97.19+3.05	278.89±1.98	1.90×10^{10}	7.0	6/6
ต.ค.53	97.78±2.22	69.33+6.02	99.78±2.75	281.78±1.08	2.10×10^{10}	6.5	5/6
พ.ย.53	----------	ไม่มีน้ำเชื้อ	----------				0/0
ธ.ค.53	----------	ไม่มีน้ำเชื้อ	----------				0/0
ม.ค.53	----------	ไม่มีน้ำเชื้อ	----------				0/0
ก.พ.54	----------	ไม่มีน้ำเชื้อ	----------				0/0
มี.ค.54	95.56±2.94	58.00±1.73	97.11±3.12	278.78±3.48	2.35×10^{9}	7.0	4/6
เม.ย.54	100±0	50.67±6.65	97.19+1.87	267.67±2.44	3.38×10^{9}	7.0	5/6

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของน้ำเชื้อในตารางที่ 1 พบว่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (%) ปลาตะเพียนขาว ตั้งแต่เดือน เมษายน-ตุลาคม ปี 2553 และเมษายน ปี 2554 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง เท่ากับ 100±0 โดยเดือนกันยายน-ตุลาคม ปี 2553 มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากัน คือ 97.78±2.22 พบว่า ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ปี 2553 - กุมภาพันธ์ ปี 2554 ไม่สามารถรีดน้ำเชื้อมาทำการประเมินได้ หลังจากนั้น พบว่าปลาตะเพียนขาวจะเริ่มมีน้ำเชื้ออีกครั้งตั้งแต่เดือนมีนาคมเป็นต้นไป และสเปิร์มจะมีระยะเวลาในการเคลื่อนที่นานที่สุดในเดือนสิงหาคม เท่ากับ 93.33 วินาที แต่ในเดือนเมษายน-มิถุนายน ปี 2553 และเดือนมีนาคม-เมษายน ปี 2554 มีระยะเวลาในการเคลื่อนที่ต่ำกว่า 60 วินาที ส่วนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มมีผลไปทิศทางเดียวกับเปอร์เซ็นต์เคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยในเดือนที่สามารถรีดน้ำเชื้อได้จะมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตสูง สำหรับค่า Osmolality ในน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม พบว่าในเดือนสิงหาคมมีค่า Osmolality สูงเท่ากับ 293.11±2.52 mOsm/kg และมีความหนาแน่นของสเปิร์ม 2.26×10^{10} ตัว/ml ส่วน pH ตั้งแต่เดือนเมษายน ปี 2553 - เมษายนปี 2554 มีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-7

ดังนั้นจากการทดลองศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ พบว่า เดือนสิงหาคม ปี 2553 เป็นช่วงที่น้ำเชื้อมีความสมบูรณ์ที่สุด โดยมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง เท่ากับ 100±0 สเปิร์มมีระยะเวลาในการเคลื่อนที่ เท่ากับ 93.33 วินาที ส่วนเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มมีผลไปทิศทางเดียวกับเปอร์เซ็นต์เคลื่อนที่ของสเปิร์ม มีค่า Osmolality เท่ากับ 293.11±2.52 mOsm/kg และมีความหนาแน่นของสเปิร์ม 2.26×10^{10} ตัว/ml จึงนำข้อมูลที่ได้ไปทำการทดลองต่อเพื่อศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม(การทดลองที่2) ซึ่งจะทำการทดลองในเดือนสิงหาคม ปี 2554

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของแรงดันออสโมติก (Osmotic pressure) ต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม

จากการทดลองการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวในสารละลาย 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีประจุ ได้แก่ $CaCl_2$, KCl และ NaCl และกลุ่มที่ไม่มีประจุ ได้แก่ Sucrose และ Mannital ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 และ 500 mM เมื่อนำสารละลาย 2 กลุ่ม มาวัดค่าออสโมลาริตี้ ที่ความเข้มข้นจากน้อยไปหามาก พบว่าระดับค่าออสโมลาริตี้เพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารละลายเพิ่มขึ้น และทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่าที่ระดับออสโมลาริตี้ต่ำมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง และเมื่อระดับออสโมลาริตี้เพิ่มมากขึ้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลงตามไปด้วยโดยได้ผลการทดลองดังนี้

2.1 สารละลาย $CaCl_2$ซึ่งเป็นสารละลายกลุ่มที่มีประจุ

จากการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มพบว่า ความเข้มข้นของสารละลายที่ 0 และ 50 mM มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูง เท่ากับ 100±0.00 และ 95±1.63 มีค่า Osmolality 41.78±1.73 mOsm/kg และ138.11±7.32 mOsm/kg ตามลำดับ ตั้งแต่ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 100 mM มีค่า Osmolality 227.22±4.35 mOsm/kg ทำให้สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และระดับออสโมลาริตี้ในสารละลายกลุ่มที่มีประจุ $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น(mM)	Sperm Motility (%)	Osmolality (mOsm/Kg)
0	100±0.00[1]	41.78±1.73
50	95±1.63[2]	138.11±7.32
100	0[3]	227.22±4.35
150	0[3]	329.22±5.64
200	0[3]	450.22±5.76
250	0[3]	579.44±1.73
300	0[3]	706.67±2.75
350	0[3]	851.33±2.29
400	0[3]	995.44±2.70
450	0[3]	1111.78±1.53
500	0[3]	1241.78±4.32

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

2.2 สารละลาย NaCl ซึ่งเป็นสารละลายกลุ่มที่มีประจุ

จากผลการทดลองประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย 0, 50, 100 mM มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 100±0.00, 100±0.00 และ 98.51±1.02 ตามลำดับ โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แต่มีความแตกต่างกัน ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 150 mM ขึ้นไป มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 10 % ซึ่งมีค่า Osmolality 243.33±2.22 mOsm/Kg และที่ความเข้มข้นสูงทำให้สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 3)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และระดับออสโมลาริตี้ในสารละลายกลุ่มที่มีประจุ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น(mM)	Sperm Motility (%)	Osmolality (mOsm/Kg)
0	100±0.00[1]	32.89±2.68
50	100±0.00[1]	95.33±0.65
100	98.51±1.02[1]	182.44±2.28
150	2.96±1.39[2]	243.33±2.22
200	0[3]	342.33±3.08
250	0[3]	413.44±2.46
300	0[3]	537.11±4.69
350	0[3]	624.44±4.40
400	0[3]	705.11±0.98
450	0[3]	767.56±3.53
500	0[3]	927.78+5.63

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

2.3 สารละลาย KCl ซึ่งเป็นสารละลายกลุ่มที่มีประจุ

จากการทดลอง พบว่าระดับความเข้มข้น0, 50, 100 mM มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเท่ากับ 100±0.00 % โดยไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) แต่มีความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05) ที่ระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 150 mM ไปขึ้นจนถึง 500 mM และพบว่าที่ค่า Osmolality ตั้งแต่ 300 mOsm/Kg ขึ้นไปทำให้สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 4)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และระดับออสโมลาริตี้ในสารละลายกลุ่มที่มีประจุ KCl ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น(mM)	Sperm Motility (%)	Osmolality (mOsm/Kg)
0	100±0.00[1]	39.89±1.56
50	100±0.00[1]	86.33±1.73
100	100±0.00[1]	172.11±1.60
150	78.51±1.82[2]	241.56±1.86
200	0[3]	318.22±2.63
250	0[3]	397.44±7.27
300	0[3]	509.33±1.19
350	0[3]	603.00±2.16
400	0[3]	705.89±1.43
450	0[3]	794.33±1.28
500	0[3]	883.00+1.00

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

2.4 สารละลาย mannitol ซึ่งเป็นสารละลายกลุ่มที่ไม่มีประจุ

จากการทดลองพบว่า ค่า Osmolality แปรผันตามอัตราความเข้มข้นของสาร เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น ค่า Osmolality เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย 0-250 mM โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 100±0.00 ถึง 97.03±1.39 แต่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) ที่ความเข้มข้น 300 - 500 mM ส่วน Osmolality ที่ความเข้มข้น 300 - 500 mM ซึ่งมีค่า Osmolality อยู่ระหว่าง 297.11+1.49 ถึง 494.22±1.78 mOsm/Kg พบว่าสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 5)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และระดับออสโมลาริตี้ในสารละลายกลุ่มที่ไม่มีประจุ mannitol ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น(mM)	Sperm Motility (%)	Osmolality (mOsm/Kg)
0	100±0.00[1]	21.00±1.35
50	97.77±1.23[1]	51.00±1.68
100	98.51±1.02[1]	89.67±1.30
150	97.77±1.23[1]	160.78±6.48
200	98.51±1.02[1]	196.89±1.92
250	97.03±1.39[1]	240.22±3.12
300	0[2]	297.11±1.49
350	0[2]	334.33±4.02
400	0[2]	397.11±0.93
450	0[2]	432.44±2.99
500	0[2]	494.22±1.78

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(P>0.05)

2.5 สารละลาย Sucrose ซึ่งเป็นสารละลายกลุ่มที่ไม่มีประจุ

โดยพบว่าค่า Osmolality แปรผันตามอัตราความเข้มข้นของสารละลาย Sucrose เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้นค่า Osmolality เพิ่มขึ้น จากผลการทดลองประเมินการเคลื่อนที่ ของสเปิร์ม พบว่า ความเข้มข้นของสารละลาย 0,50,150,200 mM โดยไม่แตกต่างกันทางสถิติ(P>0.05) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มอยู่ระหว่าง 100±0.00 ถึง 97.77 ±1.23 แต่มีความแตกต่างกันต่างสถิติ (P<0.05) ที่ความเข้มข้น 100, 250-500 mM ส่วน Osmolality ที่ความเข้มข้นของสารละลาย 300-500 mM ซึ่งมีค่า Osmolality อยู่ระหว่างเท่ากับ 297.11±1.49 ถึง 506.00±2.04 mOsm/Kg พบว่าสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และระดับออสโมลาริตี้ในสารละลายกลุ่มที่ไม่มีประจุ Sucrose ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

ความเข้มข้น(mM)	Sperm Motility (%)	Osmolality (mOsm/Kg)
0	100±0.00[1]	22.89±1.17
50	100±0.00[1]	50.33±0.88
100	94.07 ±1.79[2]	86.33±2.89
150	97.77 ±1.23[1]	149.11±6.21
200	98.51± 1.02[1]	188.67±4.00
250	2.96 ±1.39[3]	237.00±4.12
300	0[4]	299.67±2.84
350	0[4]	336.44±5.25
400	0[4]	361.78±6.09
450	0[4]	447.44±7.47
500	0[4]	506.00±2.04

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ดังนั้นจากการทดลองระดับค่าออสโมลาริตี้ของสารละลาย 2 กลุ่ม พบว่าเมื่อระดับค่าออสโมลาริตี้เพิ่มมากขึ้น การเคลื่อนที่ของสเปิร์มจะลดลง และสเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่เมื่อมีค่าออสโมลาริตี้สูงกว่า 300 mOsm/Kg สาร $CaCl_2$, KCl และ NaCl มีผลโดยตรงต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม แต่เมื่อใช้ $CaCl_2$ ที่ระดับความเข้มข้น 100 mM ขึ้นไป หรือสาร KCl และ NaCl ที่ระดับความเข้มข้น 200 mM ขึ้นไป สามารถหยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้ ส่วน Sucroseและ mannitol สามารถหยุดการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่ระดับค่าออสโมลาริตี้มากกว่า 293.11±2.52 mOsm/Kg หรือความเข้มข้นของสาร 300 mM ขึ้นไป ซึ่งสารเหล่านี้เป็นส่วนประกอบของสารละลายบัฟเฟอร์ควรมีค่าออสโมลาริตี้ใกล้เคียงของเหลวในตัวปลา เพื่อป้องกันการกระตุ้นการเคลื่อนที่หรือการใช้พลังงานของสเปิร์ม รักษาให้ตัวอสุจิคงรูปและมีอัตราการรอดอยู่ตลอดเวลาที่เก็บรักษาไว้เพื่อการเพาะขยายพันธุ์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การทดลองที่ 3 การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติ

การทดลองที่ 3.1 ศึกษาชนิด และระดับความเข้มข้นของสารไครโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม ต่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว

จากการทดสอบการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติโดยใช้สารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO, methanol, Ethylene Glycol (EG) ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 5%, 10%, 15%, 20% ผสมสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และนำน้ำเชื้อหลังการแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 70°C นาน 5 วินาที ทำการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ได้ผลการทดลองดังนี้

1.ผลจากอัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/min ที่เจือจางในสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างชนิดกันและระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากการทดลอง พบว่า DMSO 5%, 10%, 15% มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับ 20% DMSO ส่วน Methanol พบว่า 5%, 10% มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับ 15%, 20% Methanol และ พบว่า Ethylene Glycol 15%, 20% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) แต่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับ 5%, 10%

จากการทดลองสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และยังพบว่า 10% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงสุดเท่ากับ 63.70±6.13 (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว เจือจางใน DMSO, Methanol และ Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -1°C /min

สารไครโอโพรเทคแทนท์	ความเข้มข้นของสารละลาย			
	5%	10%	15%	20%
DMSO	47.41 ± 5.66^{a1}	62.96 ± 6.13^{a1}	57.04 ± 7.69^{a1}	2.22 ± 1.23^{b2}
MET	25.19 ± 6.80^{a2}	20 ± 6.64^{a}	0 ± 0.00^{b2}	0 ± 0.00^{b2}
EG	15.56 ± 5.78^{b2}	5.93 ± 2.57^{b2}	53.33 ± 5.21^{a1}	45.93 ± 8.39^{a1}

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)
ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

2. ผลจากอัตราการลดอุณหภูมิ -5°C/min ที่เจือจางในสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างชนิดกันและระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากผลการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง พบว่า DMSO 5%, 15%, 20% มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับ 10% DMSO ส่วน Methanol พบว่า 5%, 20% มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับ 10%, 15% Methanol และ พบว่า Ethylene Glycol 5%, 10%, 20% ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P>0.05) แต่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับ 15%

จากการทดลองสารไครโอโพรเทคแทนท์ ทั้ง 3 ชนิด DMSO, Methanol , Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้น 5%, 10%, 15% และ 20% มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และยังพบว่า 10% DMSO มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงสุดเท่ากับ 65.18±4.96 (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว เจือจางใน DMSO, Methanol และ Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -5°C /min

สารไครโอโพรเทคแทนท์	ความเข้มข้นของสารละลาย			
	5%	10%	15%	20%
DMSO	$48.89\pm5.78^{b,1}$	65.19 ± 4.96^{a1}	46.67 ± 7.77^{b1}	35.56 ± 6.49^{b1}
MEI	$21.48+5.32^{b,2}$	40.75 ± 5.32^{a2}	$47.41+8.41^{a1}$	20.00 ± 7.39^{b2}
EG	$34.81\pm7.88^{b,1}$	$38.51+8.66^{b2}$	55.56 ± 7.94^{a1}	37.77 ± 8.42^{b1}

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)
ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

3.ผลจากอัตราการลดอุณหภูมิ -8°C/min ที่เจือจางในสารไครโอโพรเทคแทนท์ต่างชนิดกันและระดับความเข้มข้นต่างกัน

จากผลการทดลองการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม พบว่า 10% DMSO มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) กับ 5%, 15%, 20% และเมื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารละลายทั้ง 3 ชนิด DMSO, Methanol, Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้น 10% มีความแตกต่างกันทางสถิติ

อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) และยังพบว่ามีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงสุดเท่ากับ 91.85±2.20 ส่วนที่ความเข้มข้น 5%, 15%, 20% มีที่เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ต่ำกว่า 50% (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว เจือจางใน DMSO, Methanol และ Ethylene Glycol ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ-8°C / min

สารไครโอโพรเทคแทนท์	ความเข้มข้นของสารละลาย			
	5%	10%	15%	20%
DMSO	$41.48\pm9.17^{c,1}$	$91.85\pm2.20^{a,1}$	$65.19\pm2.94^{b,1}$	$15.74\pm3.72^{d,1}$
MET	$22.96\pm4.73^{b,2}$	$62.22\pm4.69^{a,2}$	$52.59\pm8.21^{a,2}$	$2.22\pm1.23^{c,2}$
EG	$14.84\pm4.21^{b,2}$	$34.81\pm4.47^{a,3}$	$20.00\pm3.01^{b,3}$	$26.30\pm3.84^{b,1}$

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)
ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 10 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวแช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/ min, -5°C/ min และ -8°C/ min

อัตราการลดอุณหภูมิ	สารไครโอโพรเทคแทนท์ (10% DMSO)
-1°C/ min	63.70 ± 6.13^{2}
-5°C/ min	65.18 ± 4.96^{2}
-8°C/ min	$91.85+2.20^{1}$

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ดังนั้นจากผลทดลองการศึกษาชนิด และความเป็นพิษของสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ด้วยวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว(ตารางที่ 9) พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิ -8°C/min ด้วย 10% DMSO มีความเป็นพิษต่อสเปิร์มน้อยสุดทำให้สเปิร์มหลังการแช่แข็ง

มีการเคลื่อนที่เฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 91.85±2.20 % โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับ - 1°C/ min, -5°C/ min จึงเหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

การทดลองที่ 3.2 ศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิของขนาดหลอดที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อและอัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง

จากการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่า อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/min อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (thaw) 50°C, 70°C มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับ 30°C และ 90°C ส่วนอัตราการลดอุณหภูมิ -5°C/min พบว่า อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 70°C ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับ 30°C, 50°C, 90°C ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -8°C/min พบว่า 50°C, 70°C , 90°C มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับ 30°C (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวในการแช่แข็งด้วยสารละลาย 10% DMSO ด้วยหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 1.5 ml โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกัน หลังการแช่แข็งนำมาละลายที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิต่าง ๆ (30, 50, 70 และ 90 °C)

อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ (thaw): ระยะเวลาที่ละลาย	อัตราการลดอุณหภูมิ (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม)		
	-1 °C/min	-5 °C/min	-8°C/min
30 °C นาน 140 วินาที	67.40 ± 2.85^{a,2}	54.07±2.34^{a,2}	65.20±3.77^{a,2}
50 °C นาน 90 วินาที	82.96 + 2.96^{a,1}	60.00+3.54^{b,2}	73.33±3.84^{a,1}
70 °C นาน 70 วินาที	87.40 +3.22^{a,1}	77.77±2.46^{a,1}	79.25±3.28^{a,1}
90 °C นาน 55 วินาที	74.07±2.08^{a,2}	62.96±3.80^{b,2}	69.62±1.95^{a,12}

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)
ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

ดังนั้นจากการทดลองศึกษาอัตราการลดอุณหภูมิของขนาดหลอดที่ใช้บรรจุน้ำเชื้อ และอัตราการเพิ่มอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง พบว่า ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -1 °C/ min ที่อัตราการเพิ่มอุณหภูมิ 70 °C นาน 70 วินาที ทำให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงสุดเท่ากับ 87.40 ±3.22 คือ จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในทดลอง ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษา

น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) โดยเครื่องมืออัตโนมัติ เป็นระยะเวลานาน 3 เดือน

การทดลองที่ 4 การแช่แข็งน้ำปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟม โดยมีความสูงเหนือไอไนโตรเจนเหลว, ระยะเวลาที่ใช้ในการลดอุณหภูมิ และขนาดของภาชนะบรรจุน้ำเชื้อที่แตกต่างกัน

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว แบบแช่แข็งอย่างง่ายในกล่องโฟม โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-FHBSS ผสมสารโครโอโพรเทคแทนท์ คือ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10% นำสารละลายน้ำเชื้อใส่หลอดฟาง 0.25 ml, 0.5 ml และใส่หลอด cryotube ขนาด 1.5 ml นำไปลดอุณหภูมิภายในกล่องโฟมเหนือผิวหน้าไนโตรเจนในระดับที่ต่างกัน 3 ระดับคือ 2, 4 และ 6 cm โดยใช้เวลาการลดอุณหภูมิภายในกล่องโฟม 2 ระยะ คือ 10 min และ15 min จากนั้นนำหลอดตัวอย่างมาเก็บในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นเวลา 7 วัน จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อได้ผลการทดลองดังนี้ (ตารางที่ 12)

ผลของการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวอย่างง่ายในกล่องโฟม โดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อที่มีขนาด 0.25 ml, 0.5 ml และ 1.5 ml จากการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เท่ากับ 100±0.0 และผลการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็ง พบว่า ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4 cm และ 6 cm ในขนาดภาชนะบรรจุน้ำเชื้อ 0.25 และ 0.5 ml ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)ในระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 min และที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 4 cm ในขนาดภาชนะบรรจุน้ำเชื้อ 1.5 ml ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$)ในระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 min ส่วนที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 cm ในขนาดภาชนะบรรจุน้ำเชื้อ 0.25,0.5 และ 1.5 ml มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 min และที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 cm ในขนาดภาชนะบรรจุน้ำเชื้อ 1.5 ml มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 และ 15 min

ในการทดลองเมื่อเปรียบเทียบหลอดบรรจุน้ำเชื้อทั้ง 3 ขนาด พบว่าหลอดบรรจุน้ำเชื้อ 0.5 ml ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 cm นาน 15 min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงสุดคือ 94.07±1.79 เมื่อเปรียบเทียบกับหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 0.25 ml ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 cm นาน 10 min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงสุดคือ 93.33±1.84 และหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 1.5 ml ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 cm นาน 10 min มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่เฉลี่ยของสเปิร์มสูงสุดคือ 62.96±2.54 (ตารางที่ 12)

จากการศึกษาทดลองครั้งนี้ เลือกหลอดขนาด 1.5 ml ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 cm ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 min เพื่อไปศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายและเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลานาน 3 เดือน เพราะเป็นขนาดที่เหมาะสม คุ้มทุนเหมาะสมที่จะใช้ในการพัฒนาอุตสาหกรรมภาคการผลิตเชิงพาณิชย์ ในการนำไปผสมพันธุ์ หรือเป็นการเก็บรักษาน้ำเชื้อพันธุ์ปลาต่อไป

ตารางที่ 12 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวในการแช่แข็งด้วยสารละลาย 10% DMSO ด้วยภาชนะบรรจุน้ำเชื้อ 3 (0.25, 0.5 และ 1.5 ml) โดยใช้เทคนิคการแช่แข็งในกล่องโฟม ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนระดับต่าง ๆ และระยะเวลาต่าง ๆ กัน

ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว	ขนาดภาชนะบรรจุน้ำเชื้อ					
	0.25 ml		0.5 ml		1.5 ml	
	ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ		ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ		ระยะเวลาการลดอุณหภูมิ	
	10 min	15 min	10 min	15 min	10 min	15 min
2 cm	26.67±3.3^{c2}	10.37±3.08^{d2}	48.15±3.46^{b2}	57.78±2.89^{a2}	51.85± 3.24^{a1}	31.11± 3.59^{c2}
4 cm	85.19±2.52^{a1}	90.37±2.23^{a1}	91.11±1.94^{a1}	91.85±2.23^{a1}	55.56± 3.00^{b1}	52.59± 4.42^{b1}
6 cm	93.33±1.84^{a1}	90.37±1.95^{a1}	88.49±1.94^{a1}	94.07±1.79^{a1}	62.96± 2.54^{b1}	40.74±4.20^{c1}

ตัวเลข superseript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)
ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

การทดลองที่ 5 ศึกษาผลของระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลานาน 3 เดือน

จากการทดลองการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งโดยใช้หลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 1.5 ml ด้วยเครื่องมืออัตโนมัติใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 10% DMSO ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -1°C/min (ได้จากการทดลองที่ 3.2) แล้วนำไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 3 เดือน ทำการประเมินการเคลื่อนที่ทุก ๆ 1 เดือน พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อ 3 เดือน เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีแนวโน้มลดลงโดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) (ตารางที่ 13)

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแบบแช่แข็งด้วยเครื่องมือกล่องโฟม (เครื่องมืออย่างง่าย) ที่ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 6 cm ด้วยระยะเวลาการลดอุณหภูมิ 10 min (ได้จากการทดลองที่ 4) พบว่า ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มโดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 13)

จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเครื่องมืออัตโนมัติกับเครื่องมือกล่องโฟม (เครื่องมืออย่างง่าย) พบว่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในเดือนที่ 3 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) ส่วนในเดือนที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และยังพบว่า การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยเครื่องมืออัตโนมัติมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงกว่าการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยกล่องโฟม (เครื่องมืออย่างง่าย)

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการแช่แข็งสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 10% DMSO เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยเปรียบเทียบระหว่างเครื่องมืออัตโนมัติและกล่องโฟม (เครื่องมืออย่างง่าย)

ชนิดของเครื่องมือ	เดือน (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม)		
	1	2	3
เครื่องมืออัตโนมัติ	$77.04\pm1.75^{a,1}$	$66.67\pm2.13^{b,1}$	$51.85\pm3.25^{c,1}$
กล่องโฟม(เครื่องมืออย่างง่าย)	$45.18\pm2.27^{a,2}$	$43.70\pm3.70^{a,2}$	$44.44\pm3.59^{a,1}$

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)
ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 14 ระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (วินาที) หลังการแช่แข็งสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และสารละลายไครโอโพรเทคแทนท์ 10% DMSO เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว (-196°C) เป็นระยะเวลา 3 เดือน โดยเปรียบเทียบระหว่างเครื่องมืออัตโนมัติ และ กล่องโฟม (เครื่องมืออย่างง่าย)

ชนิดของเครื่องมือ	เดือน (เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม)		
	1	2	3
เครื่องมืออัตโนมัติ	64.59±1.39 ^{a,1}	59.93±1.18 ^{a,1}	52.15±1.65 ^{a,1}
กล่องโฟม(เครื่องมืออย่างง่าย)	53.81±2.27 ^{a,1}	49.63±3.53 ^{a,1}	49.70±3.70 ^{a,1}

ตัวเลข superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)
ตัวอักษร superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05)

ส่วนในเรื่องของระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่พบความแตกต่างกันของระยะเวลาการเคลื่อนที่ในแต่ละเดือนและเครื่องมือที่ใช้ทั้งสองชนิดในทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 14)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University