



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลา
ด้วยน้ำแข็งแห้งสำหรับใช้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Development of fish sperm cryopreservation program
using dry ice for the hatchery

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย
สุบัณฑิต นิมรัตน์

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256101A1080035
สัญญาเลขที่ 37/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย การพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลา
ด้วยน้ำแข็งแห้งสำหรับใช้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

Development of fish sperm cryopreservation program
using dry ice for the hatchery

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย¹
สุภัณฑิต นิมรัตน์²

¹ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

²ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กุมภาพันธ์ 2562

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งสำหรับใช้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ สำเร็จเรียบร้อยลงได้ โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ (เงินอุดหนุนจากรัฐบาล) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 37/2561 ขอขอบคุณ คุณอมรรัตน์ ภิระวานิชย์ ที่ช่วยในการดูแลปลาทดลองและแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่อง การพัฒนาเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งสำหรับใช้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ได้ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง โดยนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวมาผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) ที่มี 10% DMSO นำไปแช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่มีวัสดุห่อหุ้มต่างชนิดกัน (สายหลอดซิลิโคน สายออกซิเจน หลอด Centrifuge tube และหลอดสายไฟฟ้า) แล้วทำการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาแตกต่างกัน เปรียบเทียบกับชุดการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อโดยไม่มีวัสดุห่อหุ้มหลอดฟาง (กลุ่มควบคุม) แล้วนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิแตกต่างกัน พบว่าชุดการทดลองที่แช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้หลอดสายไฟฟ้าหุ้มหลอดฟาง ให้คุณภาพสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุดหลังจากการแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งนาน 10 นาทีและการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส โดยแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรด้วยวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสมภายในกล่องโฟมด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งแล้วนำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส ได้ทำการประเมินการเปลี่ยนแปลงคุณภาพสเปิร์มระหว่างการเก็บรักษาในตู้แช่แข็งทุกๆ 7 วันนาน 28 วัน โดยนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิต่างกัน พบว่า การละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูง และน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็งนาน 28 วันยังคงมีคุณภาพสเปิร์มที่ดี แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟมด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งและทำเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาให้น้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดฟางให้ยังคงมีคุณภาพดีอยู่ได้นาน 28 วัน ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในภาคการผลิตในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

คำสำคัญ: น้ำแข็งแห้ง; การแช่แข็ง; น้ำเชื้อ; สเปิร์มมาโทซัว; คุณภาพสเปิร์ม

ABSTRACT

The research project entitled “Development of fish sperm cryopreservation program using dry ice for the hatchery” was aimed to determine the effects of cooling rates and thawing rates on post-thawed sperm quality of fish sperm frozen by crushed dry ice. Fish sperm were diluted with Calcium-free Hank’s balanced salt solution (Ca-F HBSS) containing 10% DMSO, and frozen in 0.25 mL straws wrapped with various insulation materials (silicone tube, oxygen tube, centrifuge tube and VAF wire) within the Styrofoam box containing crushed dry ice at various freezing time, in comparison with straws frozen without insulation material. Straws frozen with the VAF wire as insulation material had the highest post-thawed sperm quality after freezing in dry ice for 10 min. and thawing at 30°C. In order to evaluate the effects of cryostorage on sperm quality, diluted sperm within 0.25 mL straws were frozen within Styrofoam box using the most appropriate freezing protocol of dry ice prior to storage in the freezer at -80°C. Changes in post-thawed sperm quality were evaluated every 7 days by thawing of frozen samples at different temperatures. Results showed that the use of thawing temperature at 30°C resulted in high percentages of post-thawed sperm motility and sperm viability and frozen sperm stored in the freezer for 28 days exhibited good post-thawed sperm quality. This indicated that freezing of fish sperm by dry ice within Styrofoam box, followed by storage in the freezer at -80°C, was effective to preserve frozen sperm with good post-thawed quality for 28 days, which is useful for application within the production sector of the hatchery.

Keywords: Dry ice; Cryopreservation; Semen; Spermatozoa; Sperm quality

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อ.....	ii
Abstract.....	iii
สารบัญ.....	iv
สารบัญตาราง.....	v
สารบัญรูป.....	vi
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	9
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	21
4 ผลการทดลอง.....	29
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	49
เอกสารอ้างอิง.....	53
ผลผลิต (Output).....	58
ประวัติคณะผู้วิจัย.....	59

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	การบรรจุหลอดฟางที่มีน้ำเชื่อมอยู่ภายในเข้าไปในภาชนะ 3 ลักษณะเพื่อ แช่แข็งน้ำเชื่อมปลา loach ในน้ำแข็งแห้งที่บดเป็นผง.....	20
2	พ่อพันธุ์ปลาคะเพียนขาว.....	27
3	พ่อพันธุ์ปลาคะเพียนขาวก่อนทำการสลับ.....	27
4	การรวบรวมน้ำเชื่อมปลาเพื่อใช้ในการทดลอง.....	28
5	หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิเมตรที่ใช้ในการทดลอง.....	28

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

ประเทศไทยมีความก้าวหน้าในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ อันเนื่องมาจากสภาพภูมิอากาศที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มีการส่งออกสัตว์น้ำหลายชนิดไปจำหน่ายในตลาดต่างประเทศทั้งในยุโรป และอเมริกา รวมทั้งมีการบริโภคสัตว์น้ำในประเทศอย่างแพร่หลาย ซึ่งสภาพอากาศที่ร้อนของประเทศไทย ทำให้สัตว์น้ำหลายชนิดโตเร็ว อีกทั้งการส่งเสริมจากหน่วยงานภาครัฐที่เกี่ยวข้องในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และความเชี่ยวชาญด้านทักษะการเพาะเลี้ยงของเกษตรกร และผู้ประกอบการ ทำให้การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่องจนเป็นอุตสาหกรรมการเกษตรหลักชนิดหนึ่งที่สามารถนำรายได้เข้าประเทศจำนวนมาก โดยมีผลผลิตสัตว์น้ำสูงโดยเฉพาะการเลี้ยงในระบบพัฒนา อย่างไรก็ตามการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศไทยยังมีค่อนข้างจำกัด ทำให้เสียโอกาสในการแข่งขันของประเทศ เนื่องจากเป็นที่ทราบโดยทั่วไปแล้วว่าการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ จะช่วยทำให้คุณภาพ และผลผลิตสัตว์น้ำดีขึ้น และยังอาจช่วยลดต้นทุนการผลิตสัตว์น้ำได้ถ้าเลือกใช้เทคโนโลยีชีวภาพที่เหมาะสมในการแก้ไขปัญหาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ด้วยเหตุที่การเพาะพันธุ์ปลาน้ำจืดบางชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทย ยังมีปัญหาเกี่ยวกับการขาดแคลนน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี หรือพ่อพันธุ์ไม่มีน้ำเชื้อในบางช่วงของฤดูกาลเพาะพันธุ์ปลา ทำให้ไม่สามารถเพาะพันธุ์ปลาได้อย่างมีประสิทธิภาพ จึงมีความจำเป็นในการวิจัยเชิงรุกเพื่อการจัดเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดีเอาด้วยเทคโนโลยีที่เหมาะสมเพื่อนำน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพดีมาใช้ประโยชน์ในภายหลังเมื่อไม่สามารถจัดหาพ่อพันธุ์คุณภาพดีได้

ในธรรมชาติปลาส่วนใหญ่ผสมพันธุ์วางไข่ตามฤดูกาล ซึ่งบ่อยครั้งที่พ่อแม่พันธุ์ปลาที่ใช้เพาะพันธุ์ในโรงเพาะฟักมีความสมบูรณ์เพศไม่พร้อมกัน ทำให้เกิดปัญหาในด้านการจัดการในโรงเพาะฟัก เช่น ในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ พ่อพันธุ์ปลามีปริมาณน้ำเชื้อลดลง ซึ่งแม้ว่าสามารถกระตุ้นได้โดยการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้ปลาสร้างน้ำเชื้อได้ (spermiation) แต่กลับพบว่าแม่พันธุ์มีไข่แก่น้อยมาก หรือคุณภาพน้ำเชื้อลดลง ทำให้การเพาะพันธุ์ปลาบางชนิดไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควร แม้ว่าในปลาหลายชนิดจะพบว่าช่วงระยะเวลาที่พ่อพันธุ์สมบูรณ์เพศมีน้ำเชื้อ (spermiation period) มักจะเกิดก่อนช่วงเวลาที่แม่พันธุ์มีไข่แก่ และยังมีน้ำเชื้อยาวนานกว่าช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์มีไข่แก่ หรือสุกเต็มที่ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย 2535; Vuthiphandchai et al., 2009b) นอกจากนี้ในบางครั้งช่วงระยะเวลาที่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ ก็ไม่สัมพันธ์กับช่วงระยะเวลาที่แม่พันธุ์ตกไข่ ซึ่งก็อาจเกิดจากพ่อพันธุ์ปลาถูกรีดน้ำเชื้อบ่อยครั้งจนไม่สามารถผลิตน้ำเชื้อได้ทัน หรืออาจเกิดจากคุณภาพอาหารหรือความแปรปรวนของพ่อพันธุ์ปลาแต่ละตัวที่ผลิตน้ำเชื้อที่มีคุณภาพต่างกัน ทำให้มีความยุ่งยากในการจัดการในระหว่างการผสมเทียมในโรงเพาะฟักเป็นอย่างมาก (เสนห์ ผลประสิทธิ์ และคณะ 2536; Büyükhattipoğlu and Holtz, 1984) อีกทั้งการใช้น้ำเชื้อปลาที่รีดออกมาใหม่ๆเพื่อการผสมเทียมกับไข่นั้นก็มีข้อจำกัดตรงที่จะต้องใช้น้ำเชื้อผสมเทียมกับไข่ทันที ไม่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานเป็นชั่วโมง เพราะคุณภาพน้ำเชื้อปลาลดลงอย่างรวดเร็วหลังรีดออกนอกตัวปลา ทำให้อัตราการปฏิสนธิต่ำหรือผสมไม่ติด อีกทั้งการจับพ่อพันธุ์ปลา หรือการรีดน้ำเชื้อปลาบ่อยครั้ง ทำให้พ่อพันธุ์มีบาดแผลที่ท้องจากการรีดน้ำเชื้อถ้าใช้บ่อยครั้ง ซึ่งส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อปลาลดลง ส่งผลต่อการผลิต

ลูกปลา (Irawan et al., 2010) นอกจากนี้ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด เช่นปลากะพงขาว ก็มีการกลายเพศ (sex reversal) เมื่อเจริญเติบโตขึ้น และในปลาบางชนิดในระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาบางชนิด เช่นปลาดุกอุยและปลาดุกเทศ ต้องมีการผ่าเอาถุงน้ำเชื้อ (testis) เพื่อขยี้เอาน้ำเชื้อออกมาผสมเทียมกับไข่ รวมทั้งสภาพความเครียดของพ่อแม่พันธุ์ปลาที่ถูกกักขังในโรงเพาะฟัก (hatchery) เมื่อถูกนำออกจากพ่อแม่พันธุ์ปลามาพักระยะเวลาสั้นๆในโรงเพาะฟัก ก็ยังมีผลโดยตรงทำให้ต่อมใต้สมองหลังฮอรโมน gonadotropin II (GtH II) น้อยลง (Mylonas et al., 1997) ส่งผลทำให้ปริมาณน้ำเชื้อที่รีดได้ลดลงอย่างรวดเร็ว (expressible milt) ในระยะเวลาสั้นๆ ทำให้การจัดการระหว่างโรงเพาะพันธุ์ปลาเหล่านี้อาจประสบปัญหา จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการวางแผนบริหารจัดการในการควบคุมให้น้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพคงที่เพื่อนำมาใช้ผสมเทียมในโรงเพาะฟัก

การเพาะพันธุ์ปลาในประเทศไทยซึ่งอยู่ในประเทศเขตร้อนโดยภาพรวมแม้ว่าปัญหาจะไม่รุนแรงเหมือนกับปลาที่อาศัยอยู่ในประเทศเขตหนาว เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำที่สูงกว่า ทำให้ปลาที่อยู่ในประเทศเขตร้อนมีการพัฒนาสร้างไข่ (oogenesis) และการสร้างน้ำเชื้อ (spermiation) ที่เร็วขึ้น อันเป็นผลจากระดับเมตะบอลิซึมที่สูงของปลาที่อยู่ในประเทศเขตร้อน ทำให้การพัฒนาาระบบสืบพันธุ์เกิดได้เร็วกว่า และใช้ระยะเวลาที่สั้นกว่าในการเลี้ยงขุนให้พ่อแม่พันธุ์ปลาที่มีความสมบูรณ์เพศ (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) อย่างไรก็ตามปัญหาคุณภาพน้ำเชื้อปลาหลายชนิดก็ยังคงมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณ และคุณภาพน้ำเชื้อที่ลดลง ซึ่งก็ยังเป็นปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อภาคการผลิตในโรงเพาะฟักทั้งของภาคเอกชน และภาครัฐราชการที่เกี่ยวข้อง โดยเฉพาะในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ของปลาน้ำจืดบางชนิดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจจะประสบปัญหาการเพาะพันธุ์อย่างมาก เนื่องจากขาดแคลนน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี ทำให้มีผลต่อการเพาะพันธุ์ปลา ดังนั้นการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจากพ่อแม่พันธุ์ที่มีน้ำเชื้อคุณภาพดี หรือพ่อแม่พันธุ์ที่ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ไว้แล้วนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ภายหลังจึงเป็นประโยชน์โดยตรงภาคการผลิต เช่นในช่วงเวลาที่พ่อแม่พันธุ์ปลามีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดี หรือมีปริมาณมาก จึงควรทำการแช่แข็งแล้วเก็บรักษาไว้และนำมาใช้ผสมเทียมเพาะพันธุ์ปลาในภายหลังเมื่อขาดแคลนน้ำเชื้อ แม้ว่าพ่อแม่พันธุ์ปลาน้ำจืดในประเทศไทยอาจจะหาได้ไม่ยาก แต่ปัญหาการขาดแคลนน้ำเชื้อในบางช่วงฤดูกาลส่งผลกระทบต่อผลิตลูกปลาโดยตรง อย่างไรก็ตามการพัฒนางานวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยหรือต่างประเทศมักแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (controlled-rate programmable freezer) ที่มีราคาแพงหลายแสนบาท (สามารถเคลื่อนย้ายไปภาคสนามได้) หรือหลายล้านบาท (ไม่สามารถเคลื่อนย้ายไปภาคสนามได้) ทำให้ผู้ประกอบการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำขนาดกลางหรือขนาดเล็กมีข้อจำกัดในการลงทุนเพิ่มในต้นทุนการผลิตด้วยการซื้อเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อ ดังนั้นการพัฒนางานวิจัยด้านการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยเทคโนโลยีที่ไม่แพง และไม่สลับซับซ้อน จึงเป็นสิ่งจำเป็นที่ต้องมีการพัฒนาเทคนิควิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาเพื่อให้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีพร้อมอยู่ตลอดเวลาในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) เพื่อการผสมเทียม และสามารถใช้งานได้อย่างรวดเร็วตลอดช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ โดยถ้าเป็นเทคโนโลยีที่สามารถถ่ายทอดให้ผู้ประกอบการทำได้ง่าย ๆ มีราคาถูก และใช้เครื่องมือไม่สลับซับซ้อนในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลา ก็จะสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีดังกล่าวให้ผู้ประกอบการนำไปใช้เพาะพันธุ์ปลาเชิงพาณิชย์ได้มากขึ้นต่อไป เพราะปลาน้ำจืดจัดเป็นสัตว์น้ำชนิดหนึ่งที่มีราคาถูก เมื่อเปรียบเทียบกับราคาปลาในต่างประเทศ ดังนั้นการพัฒนาหารูปแบบเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการแช่แข็ง

น้ำเชื้อปลา จึงต้องเป็นเทคโนโลยีที่ถูก ใช้สะดวก แต่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อให้มีความคุ้มค่าในการนำเทคโนโลยีชีวภาพที่เหมาะสมมาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาเชิงพาณิชย์ได้ต่อไป

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่มีคุณภาพเป็นระยะเวลานานๆ ให้ได้ผลดีนั้น สามารถทำได้โดยการแช่แข็งน้ำเชื้อ (semen cryopreservation) ซึ่งเป็นเทคโนโลยีชีวภาพแขนงหนึ่งที่น่ามาประยุกต์ใช้เพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลาหลายชนิดในต่างประเทศ แต่ในประเทศไทยเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อ ยังมีการประยุกต์ใช้ในวงจำกัด เนื่องจากเทคโนโลยีมีราคาสูง มีความสลับซับซ้อน และต้องใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ที่มีราคาแพงตั้งแต่สามแสนบาทจนถึงหลายล้านบาท ประกอบกับความเชื่อที่ว่าสามารถหาพ่อพันธุ์ปลาที่มีน้ำเชื้อได้ตลอดช่วงการเพาะพันธุ์ ทั้งที่จริงแล้วการขาดแคลนพ่อพันธุ์ปลาน้ำจืดบางชนิดที่มีน้ำเชื้อคุณภาพดีในช่วงปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ยังคงเป็นปัญหาหลักที่ส่งผลกระทบต่อ การเพาะพันธุ์ปลาบางชนิด (เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน 2545) โดยทั่วไปแล้ว การแช่แข็งน้ำเชื้อทำโดยนำเอาน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) พร้อมกับใส่สารที่ป้องกันไม่ให้เซลล์เป็นอันตรายในระหว่างการแช่แข็งซึ่งเรียกว่าสารโครีโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) แล้วจึงเอาไปบรรจุในหลอดบรรจุน้ำเชื้อพร้อมกับลดอุณหภูมิ (freezing) อย่างเป็นระบบให้ถึงอุณหภูมิต่ำสุดที่ที่ต้องการ ด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติก่อนที่จะเก็บรักษา (cryostorage) ไว้ในถังไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งสามารถรักษาคุณภาพของน้ำเชื้อปลาได้เป็นเวลานานเป็นปีๆ และเมื่อต้องการนำน้ำเชื้อปลาที่ได้แช่แข็งมาใช้ประโยชน์ก็ละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง (thawing) ที่อุณหภูมิต่ำที่เหมาะสม แล้วประเมินคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย (post-thawed sperm quality) (Vuthiphandchai et al. 2009)

เทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อในขณะนี้ได้มีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลก เช่นในผู้ชายที่มีปัญหาหมันบุตรยาก หรือป่วยเป็นโรคร้ายแรงแต่ต้องการมีบุตร จึงมีการนำน้ำเชื้อไปแช่แข็งแล้วนำมาผสมเทียมกับไข่ในภายหลัง สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์ในประเทศไทยมีการทำอย่างแพร่หลายในสัตว์จำพวกวัว ซึ่งการเพาะขยายพันธุ์วัวในประเทศไทยของเกษตรกรผู้เลี้ยง ต่างก็ใช้น้ำเชื้อวัวแช่แข็งที่ได้จากกรมปศุสัตว์มาผสมเทียมเป็นวิธีมาตรฐาน ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยยังมีการศึกษาวิจัยไม่แพร่หลาย ซึ่งสาเหตุหลักส่วนหนึ่ง เกิดจากการแช่แข็งน้ำเชื้อเป็นเทคโนโลยีที่สลับซับซ้อน มีความเกี่ยวข้องกับการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ ซึ่งมีราคาแพง ทำให้ผู้ประกอบการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำขนาดเล็ก หรือขนาดกลางมีข้อจำกัดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาแม้ว่าจะมีความต้องการใช้น้ำเชื้อปลาแช่แข็งเพื่อการเพาะพันธุ์ และการอนุรักษ์ โดยเฉพาะในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด ซึ่งการวิจัยในการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยเทคโนโลยีที่มีราคาถูก แต่มีประสิทธิภาพสูงด้วยการนำแหล่งความเย็นอื่นที่มีราคาถูกเช่น น้ำแข็งแห้ง (dry ice) มาใช้ในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง จะทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสะดวกขึ้น เพราะสามารถจัดหาน้ำแข็งแห้งได้ในทุกจังหวัดของประเทศไทย ในขณะที่ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) หาได้เฉพาะในจังหวัดที่มีอุตสาหกรรมขนาดใหญ่เท่านั้น ดังนั้นการนำเอาน้ำแข็งแห้งมาแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จึงเป็นประโยชน์ต่อผู้ประกอบการเพาะพันธุ์ปลาทุกภาคส่วนทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก เพราะสามารถแช่แข็งน้ำเชื้อปลาได้ในทุกบริเวณทั้งภายในหรือภายนอกฟาร์ม และยังทำให้ประเทศไทยมีเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ด้วยเหตุที่การวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยมีความจำเป็นเพื่อประโยชน์ด้านการเพาะเลี้ยง และการอนุรักษ์ แต่การพัฒนาวิจัยด้านนี้ของประเทศไทย ได้เริ่มมีการพัฒนางานวิจัยด้านดังกล่าวด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งทำให้การนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปใช้ประโยชน์ยังทำไม่ได้

เต็มที่ เพราะมีความเกี่ยวข้องกับ ความสลับซับซ้อนของเทคโนโลยี ต้นทุนที่สูงของเทคโนโลยี ทำให้ ต้นทุนการผลิตสูง อีกทั้งความนิยมของผู้ประกอบการในการใช้น้ำแข็งสดของปลาในระหว่าง การเพาะพันธุ์ปลา รวมทั้งราคาปลาที่มีราคาถูกกว่าราคาเนื้อวัวหรือเนื้ออื่นๆโดยภาพรวม จึงทำให้การ นำเอาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำแข็งปลามาประยุกต์ใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาจึงมียังมีน้อย และจำกัดอยู่ ในสถานศึกษา บริษัทเอกชนขนาดใหญ่ และกรมประมงเป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นการพัฒนาศักยภาพการ ประยุกต์ใช้น้ำแข็งแช่แข็งไปใช้เพาะพันธุ์ปลาให้เป็นที่ยอมรับอย่างแพร่หลาย จึงต้องพัฒนาเทคโนโลยี การแช่แข็งน้ำแข็งอย่างง่าย ๆ ไม่สลับซับซ้อน มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ เพื่อให้มีการนำน้ำแข็งแช่แข็งไปใช้ ประโยชน์ให้มากขึ้นในการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็งน้ำแข็ง พ่อพันธุ์ตามที่กล่าวมาแล้ว

การแช่แข็งน้ำแข็งปลาด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง (dry ice) มีหลักการ และวิธีการแช่แข็ง เหมือนกับการแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติทุกประการ เริ่มตั้งแต่ การรวบรวมน้ำแข็ง การ เจือจางน้ำแข็งในสารละลายบัฟเฟอร์ (sperm extender) และสารโครีโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectant) การบรรจุน้ำแข็งในหลอดบรรจุน้ำแข็ง หรือหลอดฟาง (French straw) การลด อุณหภูมิ (freezing) และการละลาย (thawing) เพียงแต่มีความแตกต่างในการเลือกใช้แหล่งลด อุณหภูมิ (source of cooling) ที่เป็นน้ำแข็งแห้ง (-79 องศาเซลเซียส) หรือไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) เท่านั้น (-196 องศาเซลเซียส) การแช่แข็งน้ำแข็งปลาชนิดใดก็ตาม ต้องมีการพัฒนา วิธีการแช่แข็งที่เหมาะสม ต้องทราบว่าตัวแปรเหล่านั้นที่มีความเหมาะสม ต้องใช้สภาพการทดลองที่ เหมาะสมอย่างไร (optimized protocols) ในปัจจุบันการแช่แข็งน้ำแข็งปลาด้วยน้ำแข็งแห้งใน ต่างประเทศ ได้เริ่มมีการศึกษาในหลายประเทศ แต่ยังไม่เคยมีรายงาน หรือผลงานวิจัยตีพิมพ์เผยแพร่ การแช่แข็งน้ำแข็งปลาด้วยน้ำแข็งแห้งในประเทศไทย สำหรับในประเทศไทยการแช่แข็งน้ำแข็งปลา ด้วยการใช้อุปกรณ์ลดอุณหภูมิอัตโนมัติได้มีการตีพิมพ์ผลงานวิจัยโดยนักวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (Irawan et al., 2010; Vuthiphandchai et al., 2009) และยังไม่มียางานการ แช่แข็งน้ำแข็งปลาท้องถิ่นด้วยน้ำแข็งแห้งในประเทศไทย โดยหลักการทั่วไปการแช่แข็งน้ำแข็งปลา ด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ จะใช้ไนโตรเจนเหลวเป็นแหล่งความเย็นในการทำให้อุณหภูมิลดลง ได้เร็ว หรือช้าตามที่ต้องการโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์เป็นตัวกำหนด อย่างไรก็ตามการแช่แข็ง น้ำแข็งปลาด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง จะใช้น้ำแข็งแห้งเป็นแหล่งความเย็นในการทำให้อุณหภูมิลดต่ำลงได้ เร็ว หรือช้าได้เช่นกัน แต่ต้องมีการพัฒนารูปแบบการลดอุณหภูมิให้เหมาะสม เพราะแม้ว่าน้ำแข็งแห้ง เป็นแหล่งอุณหภูมิที่ไม่เย็นมากเท่าไนโตรเจนเหลว แต่ก็สามารถนำมาแช่แข็งน้ำแข็งปลาให้มีอัตราการ ลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เหมาะสมได้เช่นกัน ดังนั้นถ้าสามารถแช่แข็งน้ำแข็งปลาด้วย น้ำแข็งแห้ง แล้วมีประสิทธิภาพเทียบเท่าการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว ก็จะเป็นการพัฒนาต่อ ยอดงานวิจัยที่ได้เทคโนโลยีที่มีราคาถูก มีความสะดวก และไม่สลับซับซ้อน ซึ่งสามารถนำไปใช้เชิง พาณิชย์ได้ทันที และเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของประเทศ

น้ำแข็งแห้งเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่แข็งตัว ที่ได้ผ่านกรรมวิธีการผลิต โดยนำก๊าซ คาร์บอนไดออกไซด์มาผ่านการอัดและลดอุณหภูมิลงภายใต้ความดันสูงจนได้ออกมาเป็น คาร์บอนไดออกไซด์เหลวจากนั้นก็ทำการลดความดันลงอย่างรวดเร็ว จนกลายเป็นของแข็งไปใน ที่สุดน้ำแข็งแห้งมีความเย็นที่อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส น้ำแข็งแห้ง (น้ำแข็งแห้งราคา 30 บาท/ กิโลกรัม) มีราคาถูกกว่าไนโตรเจนเหลว (ราคาไนโตรเจนเหลว 60 บาท/กิโลกรัม) ทำให้ช่วยลดต้นทุน การแช่แข็งน้ำแข็งปลาได้ดี เพราะการแช่แข็งน้ำแข็งปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง และเก็บรักษาน้ำแข็งที่แช่แข็ง

ไว้ในน้ำแข็งแห้งต่อไปเป็นเวลานาน ใช้น้ำแข็งแห้งในปริมาณที่ไม่มาก อันเนื่องจากน้ำแข็งแห้งมีการระเหยตัวช้า ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำ ในขณะที่การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยไนโตรเจนเหลว ต้องใช้ไนโตรเจนเหลวในปริมาณที่มากทั้งในระหว่างการแช่แข็ง และการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งต่อไป เนื่องจากไนโตรเจนเหลวมีการระเหยตัวที่เร็วมากระหว่างการแช่แข็ง และจำเป็นต้องเติมไนโตรเจนเหลวลงไปถึงไนโตรเจนเหลวบ่อยครั้งระหว่างการเก็บรักษา ทำให้มีต้นทุนการผลิตที่สูงกว่าการใช้น้ำแข็งแห้ง อีกทั้งการใช้น้ำแข็งแห้งในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายังมีความปลอดภัยสูงกว่าไนโตรเจนเหลว เพราะอุณหภูมิน้ำแข็งแห้งไม่เย็นจัดเหมือนไนโตรเจนเหลว และน้ำแข็งแห้งเป็นของแข็ง ลำเลียงไปที่ต่างๆ ได้ง่ายมาก ไม่มีอันตรายมากเท่าไนโตรเจนเหลวที่อาจกระเด็นทำอันตรายแก่ร่างกาย การลำเลียงไนโตรเจนเหลวที่เป็นของเหลวมีอันตรายมาก เพราะนอกจากต้องมีถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) ใส่ไนโตรเจนเหลวแล้ว ยังต้องระวังอันตรายจากอุบัติเหตุระหว่างการลำเลียงทางรถยนต์ที่ถังไนโตรเจนเหลวอาจพลิกคว่ำ ซึ่งจะอันตรายมาก นอกจากนี้ น้ำแข็งแห้งได้มีการนำไปใช้ประโยชน์ในการวิจัยทางการแพทย์ อุตสาหกรรมอาหารและถนอมอาหาร การแช่เย็นผัก หรือสินค้าเกษตรอื่นๆ ที่จำเป็นต้องขนส่งในระยะทางที่ไกลๆ อย่างแพร่หลาย เนื่องจากน้ำแข็งแห้งระเหิดเป็นไอ ซึ่งต่างจากน้ำแข็งที่ละลายเป็นน้ำ ที่สร้างความเสียหายกับสินค้าอาหาร และสินค้าเกษตรได้มากกว่า ด้วยเหตุที่น้ำแข็งแห้งให้ความเย็นคงที่ มีน้ำหนักเบาเมื่อเทียบกับตัวนำความเย็นอื่นๆ และมีราคาไม่แพง จึงทำให้น้ำแข็งแห้งได้รับความนิยมในการเก็บรักษาอาหารหลายชนิด เพียงแต่ต้องระวังอันตรายจากความเย็นที่ถูกน้ำแข็งกัด และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระเหิดออกมา ทำให้ต้องมีการถ่ายเทอากาศที่ดี เช่นเดียวกับต้องระวังอันตรายจากก๊าซไนโตรเจนที่ระเหิดออกมาจากไนโตรเจนเหลวที่ต้องมีการถ่ายเทอากาศที่ดีเช่นกันในระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อ

ดังนั้นการพัฒนาหารูปแบบเทคโนโลยีชีวภาพมาประยุกต์ใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จึงต้องเป็นเทคโนโลยีที่ถูก ใช้สะดวก แต่มีประสิทธิภาพสูงเพื่อให้มีความคุ้มค่าในการนำเทคโนโลยีชีวภาพที่เหมาะสมมาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลา ด้วยเหตุที่การพัฒนางานวิจัยแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทย ได้มีการพัฒนางานวิจัยโดยนักวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในลักษณะวิจัยเชิงลึก วิจัยเชิงประยุกต์ และวิจัยเชิงถ่ายทอดเทคโนโลยีเชิงพาณิชย์ให้แก่ผู้ประกอบการอย่างเป็นระบบด้วยการบูรณาการองค์ความรู้ด้านเคมี ชีวเคมี จุลชีววิทยา วาริชศาสตร์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยได้วิจัยแช่แข็งและแช่เย็นน้ำเชื้อสัตว์น้ำหลายชนิดเพื่อการเพาะเลี้ยงและการอนุรักษ์ มีบทความวิจัยที่ตีพิมพ์ทั้งในวารสารวิชาการระดับนานาชาติ และระดับชาติ มาอย่างต่อเนื่องตลอดในระยะเวลาประมาณ ๑๓ ปีที่ผ่านมา โดยงานวิจัยเหล่านั้นได้แช่แข็งน้ำเชื้อสัตว์น้ำด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งการต่อยอดงานวิจัยด้วยการใช้แหล่งความเย็นที่มีราคาถูกด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งเพื่อทดแทนการใช้ไนโตรเจนเหลวที่มีราคาแพง และยิ่งหาได้ยากกว่า จะช่วยทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศไทย มีความสะดวกขึ้นในการประยุกต์ใช้ ไม่สลับซับซ้อน และมีต้นทุนการผลิตที่ไม่สูง เป็นประโยชน์ต่อการเพาะพันธุ์ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เพราะผู้ประกอบการทุกภาคส่วนสามารถเอาน้ำเชื้อปลาแช่แข็งไปใช้ได้ง่ายขึ้น และใช้ได้อย่างแพร่หลายทั่วประเทศในทุกพื้นที่ที่การเพาะพันธุ์ปลาประสบปัญหาคุณภาพน้ำเชื้อพ่อพันธุ์ อีกทั้งการถ่ายทอดเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งก็ทำได้ง่าย สามารถทำได้ทันที มีความปลอดภัยสูง และสามารถส่งเสริมการใช้ประโยชน์ได้มากขึ้นในสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ได้ต่อไป นอกจากนี้ น้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่ได้ยังสามารถเก็บรักษาต่อไปเป็นเวลานานในลักษณะของธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) โดยที่คุณภาพสเปิร์มยังดีเหมือนน้ำเชื้อสด ซึ่งเมื่อใดก็ตามที่แม่พันธุ์ปลาที่มีความพร้อม มีไข่แก่และมีการตกไข่ ก็

สามารถนำน้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่มีอยู่ในธนาคารน้ำเชื้อมาผสมเทียมกับไข่ได้ลูกปลาที่ต้องการ ด้วยเหตุที่พ่อพันธุ์ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจบางชนิด ประสบปัญหาเกี่ยวกับปริมาณ และคุณภาพน้ำเชื้อ ซึ่งน่าจะได้มีเทคนิคที่ยืดระยะเวลาที่สเปิร์มยังคงมีคุณภาพดีให้ยาวนานขึ้นด้วยการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง ซึ่งเทคโนโลยีแช่แข็งน้ำเชื้อที่มีต้นทุนต่ำ ทำได้ง่าย และไม่สลับซับซ้อน อีกทั้งการพัฒนาวิจัย เพื่อสร้างองค์ความรู้ใหม่สำหรับการใช้ประโยชน์น้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อการเพาะพันธุ์ปลาแก่ผู้ประกอบการ จำเป็นต้องพัฒนาวิธีการแช่แข็งหารูปแบบการแช่แข็งที่สะดวกไม่สลับซับซ้อน แต่มีประสิทธิภาพสูง สามารถแช่แข็งในปริมาณมาก และแช่แข็งด้วยเทคโนโลยีที่มีต้นทุนการผลิตที่ต่ำ และเก็บรักษาน้ำเชื้อคุณภาพดีได้นานเป็นปี ดังนั้นโครงการวิจัยเรื่องนี้จึงได้ถูกพัฒนาขึ้นมาเพื่อต่อยอดการวิจัย โดยอาศัยองค์ความรู้การแช่แข็งน้ำเชื้อที่ได้พัฒนาขึ้นมาก่อนหน้านี้เพื่อมาประยุกต์พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. พัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง
2. ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารโครีโอโพรเทคแทนท์ และอัตราการลดอุณหภูมิที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง
3. ศึกษาผลของอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง
4. ศึกษาผลของระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งที่มีต่อการมีชีวิต การเคลื่อนที่ และความสามารถในการปฏิสนธิของของสเปิร์มหลังการละลาย

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง โดยการศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ และสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มปลาที่แช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง โดยจะมีการแช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้ง ด้วยการใส่ภาชนะหลายๆรูปแบบ ทำการแช่แข็งที่เวลานานต่าง ๆ กัน หรืออัตราการลดอุณหภูมิต่าง ๆ กันก่อนเก็บรักษาในน้ำแข็งแห้ง หรือเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว เพื่อทราบวิธีการที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง นอกจากนี้ยังมีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้งเพื่อให้สามารถพัฒนา protocols การแช่แข็งให้มีประสิทธิภาพ โดยการประเมินคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย รวมทั้งยังมีการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง ในขั้นตอนท้ายสุดจะศึกษาผลของระยะเวลาที่เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งที่มีต่อคุณภาพสเปิร์มหลังการละลาย และทำการผสมเทียมโดยใช้คออัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟัก เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อสด

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุป ทฤษฎีและ/หรือแนวทางการคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย

น้ำเชื้อหรือเซลล์ใดๆก็ตามเมื่อเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จะเก็บรักษาได้ 200-32,000 ปี (Ashwood-Smith, 1980) เนื่องจากเมตาบอลิซึม (metabolism) ภายในเซลล์มีค่าเป็นศูนย์ ทำให้สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นานถ้าวิธีการและขั้นตอนการแช่แข็งได้พัฒนาให้เหมาะสม (optimized protocol) การเก็บรักษาน้ำเชื้อ หรือเซลล์ที่อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส ก็ทำให้ระดับเมตาบอลิซึมภายในเซลล์มีค่าใกล้เคียงกัน ซึ่งการศึกษาด้านชีวโมเลกุล

และด้านชีวเคมีต่างก็นิยมเก็บเซลล์ต่างๆที่อุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส จึงควรนำเอามาใช้เก็บรักษา น้ำเชื้อปลาแช่แข็งว่ายังคงมีคุณภาพเช่นเดียวกับการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสหรือไม่ นอกจากนี้ น้ำแข็งแห้งยังเป็นแหล่งความเย็นที่มีราคาถูกกว่าไนโตรเจนเหลว และน้ำแข็งแห้งยังหาได้ง่ายทั่วประเทศ ประกอบกับน้ำแข็งแห้งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการแช่แข็ง (cryopreservation) น้ำเชื้อได้ และสามารถเก็บรักษา (storage) น้ำเชื้อแช่แข็งได้เป็นเวลานาน จึงควรมีการพัฒนา งานวิจัยการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง เพื่อพัฒนาศักยภาพการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจให้มีความสะดวก ต้นทุนต่ำ และไม่สลับซับซ้อน

ด้วยเหตุที่น้ำแข็งแห้งมีอุณหภูมิ -79 องศาเซลเซียส ดังนั้นการนำหลอดฟาง (French straw) หรือหลอด cryotube ที่มีน้ำเชื้อร่วมกับสารละลายบัฟเฟอร์ และสารโคริโอโพรเทคแทนท์อยู่ภายใน มาลดอุณหภูมิด้วยการให้หลอดฟาง หรือหลอด cryotube นั้น หลอดทดสอบทั้งหมดต้องอยู่ใน น้ำแข็งแห้งบด (crushed dry ice) เพราะจะทำให้น้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดฟาง หรือหลอด cryotube แข็งตัว (frozen) ด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เร็วมาก ซึ่งจะทำให้สเปิร์มตายได้ ดังนั้นการใช้แหล่งความเย็นของน้ำแข็งแห้งในการแช่แข็ง จึงต้องนำหลอดฟาง หรือหลอด cryotube มาใส่ภาชนะบรรจุที่เหมาะสมอีกที เพื่อให้ความเย็นแพร่เข้ามาในหลอดฟาง หรือหลอด cryotube อย่างเหมาะสม จะทำให้น้ำเชื้อแข็งตัวในอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum freezing rate) และทำให้สเปิร์มที่แช่แข็งด้วยวิธีนี้มีชีวิตรอด และมี การเคลื่อนที่สูงเหมือนน้ำเชื้อสด นอกจากนี้ น้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง ก็ยังสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง ต่อไปได้ในระยะเวลาที่นาน โดยที่คุณภาพสเปิร์มไม่น่าจะแตกต่างกับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาใน ไนโตรเจนเหลว ซึ่งเป็นวิธีปกติของการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งทั่วไป

น้ำเชื้อแช่แข็งที่อยู่ในหลอดฟาง หรือหลอด cryotube เมื่อนำไปเก็บรักษาต่อในน้ำแข็งแห้ง หรือเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิต่างกัน เมื่อต้องการน้ำเชื้อแช่แข็งเหล่านี้มาใช้ประโยชน์ จำเป็นต้องละลายด้วยการเพิ่มอุณหภูมิเพื่อให้น้ำเชื้อกลับสู่สภาพของเหลว ดังนั้นการละลายน้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดฟาง หรือหลอด cryotube จะใช้อัตราการละลาย (thawing rate) ที่ต่างกัน เนื่องจาก ขนาดของหลอดฟาง หรือหลอด cryotube และปริมาณน้ำเชื้อที่อยู่ภายในหลอดที่มีความแตกต่างกัน เป็นตัวกำหนดอุณหภูมิที่เหมาะสมในการละลายน้ำเชื้อ (optimum thawing rate) ว่าควรเป็นเช่นไร ซึ่งต้องทดลองวิจัยต่อไปเพื่อหาสภาพที่เหมาะสม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบวิธีการที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะพันธุ์ปลา และยังสามารถนำเอาเทคโนโลยีไปถ่ายทอดให้เกษตรกร และผู้ประกอบการได้อย่างง่าย ๆ ไม่สลับซับซ้อน มีต้นทุนการผลิตต่ำ แต่มีคุณภาพสูง
2. ทำให้ทราบถึงชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ และสารโคริโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม สำหรับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง
3. ได้เทคโนโลยีที่เหมาะสมในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง เพื่อประโยชน์ในการผสมเทียมไข่ปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ โดยสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาได้ในระยะเวลาที่นานขึ้น เพื่อใช้ประโยชน์ในการผสมเทียมปลา และน้ำเชื้อปลาก็สามารถเก็บรักษาไว้ในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) ซึ่งสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้ไปยังนักวิชาการประมง และเกษตรกรผู้เพาะพันธุ์ปลา หรือผู้สนใจได้ต่อไป

4. ได้สร้างนักวิจัยรุ่นใหม่ ที่เป็นเป็นนิสิตระดับบัณฑิตศึกษา ที่ทำหน้าที่เป็นผู้ช่วยวิจัยของโครงการ ทำให้ผู้ช่วยวิจัยได้เรียนรู้ และพัฒนาศักยภาพการวิจัยการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา เพื่อนำไปใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาของประเทศต่อไป

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ได้แก่ ภาควิชาวาริชศาสตร์ ภาควิชาจุลชีววิทยา และโครงการบัณฑิตศึกษา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และหน่วยงานที่เกี่ยวข้องกับการเพาะขยายพันธุ์ปลา เช่น กรมประมง ซึ่งมีสถานีประมงน้ำจืด/ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดทั่วประเทศที่สามารถนำผลงานวิจัยที่ได้ไปประยุกต์ใช้ได้ทั้งในด้านการเพาะพันธุ์ และการอนุรักษ์พันธุ์ปลาที่ยังคงมีอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติของประเทศให้คงไว้ไม่ให้สูญพันธุ์ และสามารถทำได้ทุกที่ทั้งในฟาร์มและภาคสนาม เพราะสามารถหาน้ำแช่แข็งมาใช้แช่แข็งน้ำเชื้อปลาได้ในทุกจังหวัดของประเทศไทย ไม่เหมือนกับไนโตรเจนเหลว ที่ต้องสั่งซื้อจากบริษัทอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ที่อยู่ในเขตนิคมอุตสาหกรรมเฉพาะบางจังหวัดเท่านั้น โดยข้อมูลที่ได้จากการวิจัยนี้ยังสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการศึกษาเพิ่มเติมและงานวิจัยทั้งในระดับปริญญาโทและปริญญาเอกทางด้านวาริชศาสตร์ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และวิทยาศาสตร์ชีวภาพของมหาวิทยาลัยบูรพาต่อไปในอนาคต รวมทั้งสามารถใช้เป็น database งานวิจัยของกลุ่มวิจัยการเก็บรักษา น้ำเชื้อของสัตว์น้ำเพื่อการอนุรักษ์ และการผสมเทียมของมหาวิทยาลัยบูรพา และใช้บริหารจัดการการเพาะพันธุ์ปลา และการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาที่หาได้ยาก ใกล้สูญพันธุ์ในพื้นที่ remote area ได้ทันที โดยไม่ต้องนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งในห้องปฏิบัติการ

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ชีววิทยาการสืบพันธุ์ปลาตะเพียนขาว

ปลาตะเพียนขาว (common silver barb) เป็นปลาน้ำจืดในครอบครัว Cyprinidae มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Barbodes gonionotus* เป็นปลาท้องถิ่นของประเทศไทย โดยพบปลาตะเพียนขาวกระจายในแหล่งน้ำธรรมชาติทั่วทุกภูมิภาคในไทยทั้งในแม่น้ำ ลำคลอง หนอง บึง ที่มีกระแสน้ำไหลอ่อนๆ หรือน้ำนิ่ง และยังเป็นปลาที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงและสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ทั้งยังเจริญเติบโตในน้ำกร่อยที่มีความเค็มไม่เกิน 7 ppt อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 25-31 องศาเซลเซียส (นวลมนี พงศ์ธนา และ ทองอยู่ อุดเลิศ, 2547) และปลาตะเพียนขาวมีรสชาติดอ่อย จึงมีการเพาะเลี้ยงปลาชนิดนี้กันอย่างแพร่หลายเนื่องจากเป็นปลาที่เลี้ยงได้ง่ายชนิดหนึ่ง

ปลาตะเพียนขาวมีขนาดปานกลาง ลำตัวแบนข้าง ขอบหลังยกสูงโค้ง หัวเล็ก ปากเล็กริมฝีปากบางจะงอยปากแหลม มีหนวดเส้นเล็กสั้น 2 คู่ ลำตัวบริเวณส่วนหลังมีสีคล้ำ ส่วนท้องสีขาว ครีบหลังมีก้านครีบแข็ง 3 ก้าน โดยก้านครีบแข็งอันสุดท้ายเป็นกระดูกแข็งหยักเป็นฟันเลื่อย ด้านหลังครีบหลังและครีบหางมีสีเทาปนเหลือง ครีบกันสีเหลืองปนส้มเล็กน้อย ครีบหูสีจางหรือเหลืองอ่อน มีฟันในลำคอเป็นชนิดฟันกัดบด 3 แถว ซึ่งเหืองออกเป็นซี่เล็ก ๆ ทางเดินอาหารไม่มีกระเพาะ ลำไส้ผนังบางยาว 2.0-2.7 เท่าของความยาวลำตัว (ศักดิ์ชัย ชูโชติ, 2530) ลักษณะรูปร่างภายนอกของตัวผู้และตัวเมียมีความคล้ายคลึงกันมาก แต่เมื่อใกล้ฤดูผสมพันธุ์จะสังเกตเห็นความแตกต่างเพศได้ง่ายขึ้น โดยเพศเมียจะมีท้องอูมเป่งมากขึ้น และพื้นท้องมีลักษณะนูน เนื่องจากมีไข่ในท้อง และบริเวณช่องเพศขยายใหญ่ขึ้นโดยมีสีแดงอ่อนปลายช่องเพศ โดยถ้าแม่พันธุ์ปลามีไข่มาก ก็จะมีท้องขยายใหญ่มากขึ้น แต่เพศผู้มีพื้นท้องแคบและแข็งกว่าเพศเมีย โดยเมื่อใช้มีอกรีดเบาๆ บริเวณหน้าท้องและลำตัวปลาจะมีน้ำเชื้อสีขาว (milt) ไหลออกมาบริเวณช่องเพศ และถ้าใช้เมื่อทำการลูบบริเวณแก้มจะรู้สึกสากมือเล็กน้อยโดยสามารถเริ่มสืบพันธุ์ได้เมื่ออายุ 8 เดือนขึ้นไป ซึ่งบริเวณแก้มที่สากในปลาตะเพียนขาวเพศผู้จะเกิดขึ้นชัดเจนในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ หรือฤดูฝนอันเป็นผลจากการแสดงออกทางเพศเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเพศบางชนิด (secondary sexual characteristics; วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

การผสมพันธุ์วางไข่ของปลาตะเพียนขาวในธรรมชาติเกิดขึ้นในฤดูฝนช่วงระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนตุลาคม โดยสภาพแวดล้อมในช่วงฤดูฝนมีความเหมาะสมในการกระตุ้นให้ปลาตะเพียนขาวมีการผสมพันธุ์วางไข่ เช่นปริมาณฝนที่ตกลงมา อาหารในธรรมชาติ และคุณภาพน้ำที่เหมาะสม เป็นต้น ไข่ปลาตะเพียนขาวมีลักษณะครึ่งจมนครึ่งลอย โดยถ้าน้ำนิ่ง ไข่จะจมน้ำแต่เมื่อน้ำไหล ไข่จะลอยตามน้ำ อย่างไรก็ตามปลาตะเพียนขาวในธรรมชาติเริ่มมีน้อยลงอันเป็นผลมาจากการขยายตัวของชุมชน การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม และความต้องการบริโภคที่สูงขึ้น ทำให้มีการเพาะเลี้ยงปลาตะเพียนขาวเพื่อทดแทนปลาตะเพียนขาวในธรรมชาติ โดยทั่วไปการเลี้ยงปลาตะเพียนขาวในประเทศไทยนิยมเลี้ยงในบ่อดิน ใช้เวลาเลี้ยงประมาณ 8 เดือน ปลาจึงเริ่มมีการสร้างไข่และน้ำเชื้อ และปลาตะเพียนขาวเพศเมียมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าปลาตะเพียนขาวเพศผู้เฉลี่ย 20% (นวลมนี พงศ์ธนา และ ทองอยู่ อุดเลิศ, 2547)

การเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวในโรงเพาะฟัก สามารถเพาะพันธุ์ได้ทั้งวิธีเลียนแบบธรรมชาติ และวิธีผสมเทียม โดยการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีขนาดและอายุที่เหมาะสมมาให้ผสมพันธุ์วางไข่ในโรงเพาะฟัก โดยวิธีเลียนแบบธรรมชาติ หรือวิธีผสมเทียม การเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวด้วยวิธีเลียนแบบธรรมชาติเริ่มจากจัดระบบบ่อและระบบน้ำให้เหมาะสม แล้วปล่อยพ่อแม่พันธุ์ลงไปพร้อมการให้ฝนเทียมเพื่อให้ผสมพันธุ์วางไข่กันเองในบ่อภายหลังการฉีดฮอร์โมน Suprefact และ Motillium ไปกระตุ้นพ่อแม่พันธุ์ โดยปล่อยพ่อแม่พันธุ์ในบ่อเพาะพันธุ์ในอัตราส่วนแม่ปลา 1 ตัวต่อปลาตัวผู้ 1-2 ตัว บ่อเพาะควรมีพื้นที่ไม่ต่ำกว่า 3 ตารางเมตร ลึกประมาณ 1 เมตร ซึ่งสามารถปล่อยพ่อแม่พันธุ์ได้ประมาณ 3 ตัว แม่ปลาจะวางไข่หลังฉีดฮอร์โมนประมาณ 6-8 ชั่วโมง โดยเมื่อแม่ปลาวางไข่หมดแล้วก็ทำการรวบรวมไข่ปลาไปฟักในกรวยฟัก สำหรับการเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวด้วยวิธีผสมเทียม ทำโดยรีดไข่ผสมกับน้ำเชื้อในภาชนะที่แห้ง ผสมให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกันด้วยการใช้ช้อนไม้ เติมน้ำพอท่วมไข่เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ ทำการล้างไข่ 2-3 ครั้งจึงนำไปฟักในอุปกรณ์เพาะฟักต่อไป การเพาะพันธุ์ปลาตะเพียนขาวส่วนใหญ่ทั้งสองวิธีนี้จะทำการฉีดฮอร์โมนเพื่อกระตุ้นการสร้างไข่หรือน้ำเชื้อ โดยฉีดฮอร์โมน Gonadotropin-releasing hormone analogue (GnRH) และ Dopamine antagonist (suprefact) ให้แม่พันธุ์ในอัตราประมาณ 15-20 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และฉีดพ่อพันธุ์ในอัตรา 10-15 ไมโครกรัม/กิโลกรัม และ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัมตามลำดับ ซึ่งภายหลังฉีดฮอร์โมนแล้ว ถ้าเพาะพันธุ์ด้วยวิธีเลียนแบบธรรมชาติ ก็ปล่อยพ่อแม่พันธุ์ปลาตะเพียนขาวลงไปบ่อและรอให้ปลามีการผสมพันธุ์กันเอง แต่ถ้าเพาะพันธุ์ปลาด้วยวิธีผสมเทียม ก็ปล่อยพ่อแม่พันธุ์ปลาตะเพียนขาวไว้ในบ่อประมาณ 6-8 ชั่วโมงจึงทำการรีดไข่แม่ปลา ตะเพียนขาวออกมาผสมเทียมกับไข่ การผสมเทียมไข่ปลาตะเพียนขาวส่วนใหญ่ใช้วิธีแห้งแบบดัดแปลง (modified dry method) โดยเขี่ยลำตัวแม่พันธุ์ปลาที่พร้อมรีดไข่ให้แห้ง รีดไข่เบาๆลงในภาชนะที่แห้ง รีดน้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆจากพ่อพันธุ์ปลาผสมลงไปบนไข่ในปริมาณที่เหมาะสม ใช้ช้อนไม้คนไข่กับน้ำเชื้อจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการเติมน้ำจืดที่สะอาดเล็กน้อยพอท่วมไข่พร้อมกับผสมไข่กับน้ำเชื้อให้เข้ากันด้วยการใช้ช้อนไม้ประมาณ 1 นาที ทำการล้างไข่ 2-3 ครั้ง จึงนำไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิไปฟักในกรวยฟักไข่ต่อไป (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535)

2. คุณภาพน้ำเชื้อของปลา

โดยทั่วไปในธรรมชาติปลาผสมพันธุ์วางไข่ภายนอกร่างกาย โดยปลาเพศเมียปล่อยไข่ออกมาแล้วปลาเพศผู้ปล่อยน้ำเชื้อเข้ามาปฏิสนธิ ซึ่งคุณภาพสเปิร์มเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการขยายพันธุ์ของปลา สเปิร์มของปลามีลักษณะเช่นเดียวกับสเปิร์มสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปที่ประกอบด้วยส่วนหัว (head) ส่วนกลาง (mid piece) และส่วนหาง (tail) ส่วนหัวของสเปิร์มปลามีรูปร่างแตกต่างกันไปตามชนิดของปลา เช่นทรงกลม ทรงรี หรือรูปหยดน้ำ เป็นต้น โดยในส่วนหัวของสเปิร์มมีนิวเคลียสที่มี ดีเอ็นเอ (DNA) เป็นสารพันธุกรรม ทำหน้าที่ปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ ส่วนกลางของสเปิร์มเป็นส่วนที่อยู่ติดกับส่วนหัวมีไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมากเป็นส่วนประกอบที่ให้พลังงานแก่สเปิร์มในการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้น ส่วนหางของสเปิร์มเป็นส่วนที่มีลักษณะยาวและในส่วนหางจะมีไฟบริล (fibril) อยู่ทั้งหมด 11 คู่ อยู่ตรงกลาง 2 คู่ และอยู่โดยรอบ 9 คู่มีลักษณะเป็น microtubule ที่ช่วยทำให้หางสเปิร์มสั้นด้วยความถี่สูง (beat frequency) จากการถ่ายทอดพลังงานจากไมโทคอนเดรียเมื่อสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ ซึ่งการสั้นตัวของ microtubule ในลักษณะเช่นนี้ทำให้ส่วนหางของสเปิร์มปลาเคลื่อนที่ไปมาอย่างรวดเร็ว ทำให้สเปิร์มของปลา

เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็ว และเมื่อพลังงานจากไมโทคอนเดรียเริ่มน้อยลง สเปิร์มปลาจะเคลื่อนที่ด้วยอัตราเร็วช้าลง และหยุดเคลื่อนที่เมื่อไม่มีพลังงานจากไมโทคอนเดรีย จึงทำให้สเปิร์มปลาน้ำจืดทั่วไปเคลื่อนที่ได้ในระยะเวลาสั้นๆ มักจะไม่เกิน 1 นาทีเมื่อน้ำเชื้อปลาถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2535; Jamieson, 1995)

โดยทั่วไปสเปิร์มของปลาไม่มีอะโครโซม (acrosome) ที่บริเวณส่วนหัวสเปิร์มดังเช่นที่พบในสเปิร์มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมทั่วไปที่จำเป็นต้องมีอะโครโซมที่บริเวณปลายของหัวสเปิร์มเพื่อปฏิสนธิกับไข่ด้วยการปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยบริเวณผิวไข่ (cortical reaction) เพื่อที่สเปิร์มจะได้เข้าไปปฏิสนธิกับนิวเคลียสของไข่ สาเหตุที่สเปิร์มปลาไม่มีอะโครโซมเนื่องจาก สเปิร์มปลาจะว่ายน้ำเข้าไปในช่อง micropyle ซึ่งเป็นช่องขนาดเล็กอยู่ด้านบนของไข่ (animal pole) ได้โดยตรงในช่วงการปฏิสนธิ โดยไม่จำเป็นต้องมีการย่อยบริเวณผิวไข่ ทำให้นิวเคลียสของสเปิร์มปฏิสนธิกับนิวเคลียสไข่ได้เป็นตัวอ่อนลูกปลา (fish embryo) อย่างไรก็ตามสเปิร์มของปลาบางชนิดมีอะโครโซมบริเวณปลายหัวสเปิร์มเช่นปลา herring เป็นต้น

น้ำเชื้อของปลา (milt หรือ semen) ประกอบด้วย สเปิร์ม (sperm) และของเหลวที่หล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal fluid) สเปิร์มของปลาไม่เคลื่อนที่เมื่ออยู่ในถุงอัณฑะ (testis) หรือของเหลวที่หล่อเลี้ยงสเปิร์ม แต่สเปิร์มของปลาจะมีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วเมื่อถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยสภาพแวดล้อมภายนอก โดยสเปิร์มปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำจืด สเปิร์มจะเคลื่อนที่และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลาประมาณ 1 นาทีตามที่กล่าวมาแล้ว แต่สเปิร์มปลาทะเลเมื่อถูกกระตุ้นด้วยน้ำทะเล สเปิร์มจะเคลื่อนที่และจะหยุดเคลื่อนที่ภายในเวลานานหลายนาทีขึ้นอยู่กับชนิดปลาทะเล กลไกที่ควบคุมการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในปลาหลายๆชนิดขึ้นอยู่กับค่าแรงดันออสโมติกของสารละลาย (osmolality หรือ osmotic pressure) ซึ่งหมายถึงปริมาณของตัวถูกละลาย (solute) ที่ละลายในตัวทำละลาย (solvent) มีหน่วยวัดเป็น mOsm/kg น้ำเชื้อปลาน้ำจืดจะมีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกต่ำกว่าระดับที่พบใน seminal fluid (hypotonicity) แต่ในทางตรงกันข้ามสเปิร์มของปลาทะเลมีการเคลื่อนที่เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงมากกว่าระดับที่พบใน seminal fluid (hypertonicity) (Morisawa et al., 1983; Bobe and Labbe, 2010)

Alavi et al. (2007) ทำการประเมินเกี่ยวกับอิทธิพลของ K^+ และ Ca^{2+} ซึ่งเสมือนเป็นตัวถูกละลายที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา European Perch (*Perca fluviatilis*) ซึ่งเป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่ง พบว่า Ca^{2+} มีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยความเข้มข้นของ Ca^{2+} ที่ระดับ 2.5 mM ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าสูงขึ้น และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของ Ca^{2+} เท่ากับ 5.0 mM เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่ 2.5 mM ส่วนผลของ K^+ พบว่าความเข้มข้นของ K^+ ที่เพิ่มขึ้นมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและอัตราเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยสเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 40 mM และจะหยุดเคลื่อนที่เมื่อความเข้มข้นของ K^+ เท่ากับ 80 mM แสดงให้เห็นว่าปริมาณของ K^+ และ Ca^{2+} มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และความเร็วในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา European Perch อีกทั้งการใช้สารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกสูงกว่า 200 mOsm/kg เพื่อกระตุ้นสเปิร์มให้เคลื่อนที่จะทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม European Perch มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อใช้สารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกเท่ากับหรือมากกว่า 300 mOsm/kg ในการกระตุ้นสเปิร์ม จะทำให้สเปิร์มหยุดการ

เคลื่อนที่ทันที จากเหตุผลดังกล่าวทำให้การนำสารละลายบัฟเฟอร์มาละลายน้ำเชื้อปลาจึงต้องใช้สารละลายที่มีค่าแรงดันออสโมติกเท่ากับระดับที่พบใน seminal fluid เพื่อไม่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ระหว่างการเจือจางน้ำเชื้อสดก่อนการนำน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง (extended milt) ไปใช้ประโยชน์ในการแช่เย็นหรือการแช่แข็ง (Vuthiphandchai et al., 2009b) ดังนั้นสเปิร์มของปลาเมื่อสเปิร์มยังอยู่ในตัวปลา หรือเมื่อทำการรีดน้ำเชื้อสดออกมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ สเปิร์มของปลาจะยังไม่มีการเคลื่อนที่ (immotile) แต่เมื่อน้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำภายนอกขณะที่ปลาผสมพันธุ์วางไข่ตามธรรมชาติ หรือเมื่อนำน้ำเชื้อปลามาผสมกับหยดน้ำบนแผ่นกระจกสไลด์ จะทำให้สเปิร์มของปลาถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วอันเป็นผลเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกอย่างรวดเร็ว ด้วยเหตุที่การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาน้ำจืดเมื่อถูกกระตุ้นจะสิ้นสุดลงอย่างรวดเร็วภายในระยะเวลาไม่เกิน 1 นาที ดังนั้นการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อปลาโดยการประเมินค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percentage of sperm motility) จึงต้องรีบทำภายในทันทีที่น้ำเชื้อปลาผสมกับน้ำบนกระจกสไลด์

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อของปลาสามารถทำได้หลายวิธีทั้งทางกายภาพ ชีวภาพและเคมี โดยการประเมินน้ำเชื้อปลาที่มีความจำเป็นเมื่อต้องการนำน้ำเชื้อปลาไปใช้ในการเพาะขยายพันธุ์ปลา การประเมินลักษณะทางกายภาพเช่น สีน้ำเชื้อ และความหนืดน้ำเชื้อ สามารถใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในเบื้องต้น เพราะน้ำเชื้อปลาที่ดีเมื่อรีดออกมาจะมีสีขาว มีความหนืด และไม่มีการปนเปื้อนของปัสสาวะ เลือด เมือก หรือขี้ปลาในน้ำเชื้อที่รีดออกมา ความหนาแน่นของสเปิร์มสามารถประเมินได้จากหลากหลายวิธีเช่น Haemocytometer, spectrophotometer หรือ flow cytometry เป็นต้น การประเมินทางเคมีหรือชีวเคมีของน้ำเชื้อปลาได้เริ่มมีความสำคัญในการตรวจวัดมากขึ้นเพื่อประเมินคุณภาพสเปิร์ม เช่นการตรวจประเมินชนิดและปริมาณของแร่ธาตุ วิตามิน หรือเอนไซม์บางชนิดที่มีใน seminal plasma เป็นต้น อย่างไรก็ตามการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่นิยมแพร่หลายทั่วโลกนิยมประเมินจากการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การมีชีวิตของสเปิร์มและความสามารถในการปฏิสนธิไข่ การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มจัดเป็นวิธีที่ทำนิยมทำแพร่หลายมากที่สุด เนื่องจากทำได้ง่าย สะดวกรวดเร็ว เห็นการเคลื่อนที่ของสเปิร์มชัดเจนด้วยตา แม้ว่าการประเมินด้วยสายตา (subjective estimation) ที่ให้ความเที่ยงตรงต่ำกว่าการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยการใช้เครื่องมือวัดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (computer-assisted sperm analysis; CASA) ซึ่งมีความถูกต้องและเที่ยงตรงสูง (objective estimation) แต่เครื่องมือมีราคาสูงมาก การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาสามารถใช้ประเมินคุณภาพน้ำเชื้อปลาได้ในทั้งสภาพน้ำเชื้อสด น้ำเชื้อแช่เย็น และน้ำเชื้อแช่แข็ง โดยที่การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อสด (fresh milt) ของปลาน้ำจืดอย่างง่าย ทำโดยนำน้ำเชื้อปลาในปริมาณเล็กน้อยมาวางบนกระจกสไลด์แล้วกระตุ้นด้วยสารละลายในปริมาณที่เหมาะสมเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่ ปิดกระจกสไลด์แล้วประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มตามเกณฑ์ที่ตั้งไว้ (Vuthiphandchai and Zohar, 1999) ซึ่งไม่ต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาสูงมากนอกจากกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสามารถทำได้ในฟาร์มเพาะเลี้ยงทั่วไปโดยไม่ต้องใช้เทคโนโลยีขั้นสูง หรือประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มด้วยการใช้เครื่องมือวัดการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ซึ่งต้องใช้เครื่องมือเฉพาะราคาสูงมากในการวิเคราะห์ แต่ให้ให้ความเที่ยงตรงสูงมากเช่นกัน และสามารถเก็บข้อมูลไว้ในคอมพิวเตอร์ (CASA; Kamaruding et al., 2012) สำหรับน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งสามารถใช้หลักการประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มได้เช่นเดียวกับการประเมินคุณภาพสเปิร์มของน้ำเชื้อสด เพียงแต่ใช้สารละลายที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้สเปิร์มปลามีการ

เคลื่อนที่ในอัตราการเจริญที่เหมาะสมเช่นกัน (Vuthiphandchai et al., 2009a; Vuthiphandchai et al., 2015)

3. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา

การแช่แข็ง (cryopreservation) เป็นวิธีการลดอุณหภูมิเพื่อแช่แข็งเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะที่ต้องการแช่แข็งและทำการเก็บรักษาไว้ในไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส (Seidel, 1984) ซึ่งถ้าแช่แข็งอย่างถูกวิธีจะสามารถเก็บรักษาเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะแช่แข็งเหล่านั้นได้เป็นเวลานาน เนื่องจากในสภาวะที่เซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะอยู่ในอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงของขบวนการเมตาบอลิซึม หรือปฏิกิริยาทางเคมีหรือชีวเคมีใดๆ เกิดขึ้นภายในเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะเหล่านั้น ทำให้สามารถเก็บรักษาเซลล์ได้นานหลายสิบปี ซึ่งในทางทฤษฎีแล้วสามารถเก็บรักษาในอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส โดยคุณภาพเซลล์ยังคงเดิมได้นานถึง 2,000-32,000 ปี (Ashwood-Smith, 1980) การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาด้วยการแช่แข็งเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการเพาะพันธุ์ปลาและการอนุรักษ์พันธุ์ปลา เนื่องจากปลาบางชนิดพ่อแม่พันธุ์อาจมีความสมบูรณ์ของไข่และน้ำเชื้อในฤดูผสมพันธุ์ที่ไม่พร้อมกัน หรือปลาบางชนิดมีการกลายเพศ (sex reversal) ก็สามารถนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่เก็บรักษาไว้มาใช้ผสมเทียม อีกทั้งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลายังมีประโยชน์ในแง่ของการปรับปรุงพันธุ์และการคัดเลือกสายพันธุ์ปลาที่เจริญเติบโตเร็ว มีความต้านทานต่อโรค โดยนำน้ำเชื้อของสายพันธุ์ปลาเหล่านี้มาเก็บรักษาในลักษณะธนาคารน้ำเชื้อ (sperm bank) และยังสามารถใช้ในการผสมพันธุ์ปลาข้ามชนิดเพื่อให้ได้ปลาลูกผสม

การพัฒนาเทคนิคการแช่แข็งน้ำเชื้อปลามีมานานกว่า 60 ปีแล้วและในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีความสนใจจากหลายภาคส่วนในการประยุกต์ใช้น้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อการเพาะขยายพันธุ์ปลามากขึ้น โดยเฉพาะในปลาที่มีมูลค่าเศรษฐกิจเชิงพาณิชย์ และปลาบางชนิดที่หายากใกล้สูญพันธุ์ (endangered species) ประกอบกับการพัฒนาเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาให้ทำได้ง่ายขึ้น ไม่สลับซับซ้อน และเป็นเทคโนโลยีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีราคาถูกลง ก็จะช่วยทำให้มีความสนใจในการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมากขึ้น เนื่องจากการนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาใช้เพาะขยายพันธุ์ปลาสามารถช่วยประหยัดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลา โดยน้ำเชื้อจะถูกฉีดจากพ่อแม่พันธุ์ปลาและนำมาแช่แข็ง ทำให้ไม่ต้องเสียเวลาเลี้ยงขุนพ่อแม่พันธุ์ปลา และยังสะดวกต่อการขนส่งน้ำเชื้อแช่แข็งระหว่างโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ (กฤษณ์ มงคลปัญญา และนิศา ไชยรักษ์, 2539)

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา จัดเป็นเทคโนโลยีชีวภาพสาขาหนึ่งที่ช่วยในการเพิ่มผลผลิตหรือประสิทธิภาพการผลิตลูกปลา โดยสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในการบริหารจัดการเพาะพันธุ์ปลาทั้งเพื่อประโยชน์ทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการอนุรักษ์สัตว์น้ำ การศึกษาวิจัยด้านนี้ส่วนใหญ่นิยมศึกษาในต่างประเทศ ทั้งในปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและใกล้สูญพันธุ์ทั้งปลาน้ำจืด และปลาทะเล เช่น ปลากะพงขาว ปลากะพงแดง ปลา rainbow trout ปลา salmon ปลา channel catfish ปลา Perch ปลา sea bream ปลา cod และปลา Atlantic croaker เป็นต้น โดยในปัจจุบันได้มีรายงานความสำเร็จเกี่ยวกับการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำเชื้อสัตว์น้ำทั่วโลกมากกว่า 200 ชนิด (Martínez-Páramo et al., 2017) แต่การศึกษาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในประเทศไทยได้มีการศึกษาวิจัยมากขึ้นในระยะประมาณ 10 ปีที่ผ่านมาแม้ว่าการประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์ยังไม่ได้รับความนิยมเท่าที่ควร น้ำเชื้อปลาเมื่อถูกแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิอย่างเหมาะสม (freezing rate) ก็สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียสได้นานเป็นปี

เมื่อต้องการใช้น้ำแข็งปลาแช่แข็งที่เก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวสำหรับการผสมเทียมกับไข่ปลา ก็นำหลอดบรรจุน้ำแข็งมาละลาย (thawing) โดยการเพิ่มอุณหภูมิในอัตราที่เหมาะสม (thawing rate) แล้วนำน้ำแข็งปลาที่ถูกละลายไปผสมเทียมกับไข่ (Horváth and Urbanyi, 2000; Vuthiphandchai et al., 2009a) ดังนั้นความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำแข็งปลาขึ้นอยู่กับปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายอย่างในกระบวนการแช่แข็ง เช่น ชนิดของสารละลายบัฟเฟอร์ (Sansone et al., 2002; Irawan et al., 2010) ชนิดสารโครีโอโพรเทคแทนท์ (cryoprotectants) (Rana and McAndrew, 1989; Rideout et al., 2003; Basavaraja and Hegde, 2004) อัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แข็ง (Sansone et al., 2002; Vuthiphandchai et al., 2009a) และการเพิ่มอุณหภูมิขณะละลายน้ำแข็งแช่แข็ง (Scott and Baynes, 1980; Mansour et al., 2006; Yavas and Bozkurt, 2011) นอกจากนี้ความแปรปรวนของคุณภาพน้ำแข็งปลาที่เกิดขึ้นในฤดูผสมพันธุ์วางไข่ การปนเปื้อนของแบคทีเรียและการใช้ยาปฏิชีวนะในน้ำแช่แข็ง รวมทั้ง เทคนิคของการแช่แข็งน้ำแข็ง ต่างก็มีผลทำให้ความสำเร็จของการแช่แข็งน้ำแข็งแตกต่างกันไป (Boonthai et al., 2016a; Boonthai et al., 2016b)

การแช่แข็งน้ำแข็งปลามีความเกี่ยวข้องกับตัวแปรหลายตัวเริ่มจากการนำน้ำแข็งคุณภาพดีมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม การเลือกใช้ชนิดและความเข้มข้นของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ ระยะเวลาสมดุล การลดอุณหภูมิแช่แข็ง การเก็บรักษาน้ำแข็งแช่แข็งในไนโตรเจนเหลว และการละลายน้ำแข็งแช่แข็งมาใช้ประโยชน์ ดังนั้นความสำเร็จในการแช่แข็งและการเก็บรักษาน้ำแข็งแช่แข็งของปลาจึงต้องสามารถทราบความเหมาะสมของแต่ละปัจจัยที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแช่แข็งทั้งหมดเพื่อสามารถพัฒนาวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสม ยกตัวอย่างเช่น การลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำแข็งสามารถทำได้หลากหลายรูปแบบทั้งการแช่แข็งด้วยเครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติซึ่งอาจมีการกำหนด initial temperature หรือ final temperature ที่แตกต่างกัน และลดอุณหภูมิด้วยอัตราการลดอุณหภูมิ (cooling rate) ที่แตกต่างกัน โดยอาจลดอุณหภูมิ 1 step, 2 step หรือ 3 step ก่อนการแช่ตัวอย่างลงในไนโตรเจนเหลว (plunging) หรือการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำแข็งด้วยการใช้ไนโตรเจนเหลวก็อาจกำหนดระยะห่างการแช่แข็งเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวที่ระดับความสูงต่างๆกัน ร่วมกับระยะเวลาการให้ตัวอย่างสัมผัสไนโตรเจนเหลวต่างๆกันเพื่อจะได้ทราบ protocol ที่เหมาะสมที่สุดในการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวในกล่องโฟม หรือในถังไนโตรเจนเหลว เช่นเดียวกับการการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำแข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง ซึ่งเป็นแหล่งความเย็นอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาแช่แข็งน้ำแข็งได้ ก็จำเป็นต้องพัฒนาวิธีการแช่แข็งที่เหมาะสมเพื่อให้แช่ตัวอย่างเหมาะสมและมีชีวิตรอดระหว่างการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง เป็นต้น การแช่แข็งน้ำแข็งปลาด้วยหลากหลายรูปแบบการลดอุณหภูมิและนำมาเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ได้มีการวิจัยในปลาหลายชนิดโดยใช้เทคนิคการแช่แข็งที่สำคัญพอสรุปได้ดังนี้

Conget et al. (1996) พัฒนาการแช่แข็งน้ำแข็งปลา rainbow trout โดยเริ่มจากการทดสอบความเป็นพิษของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆกัน (propylene glycol, glycerol, DMSO และ DMSO ร่วมกับ sucrose) ที่มีต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เมื่อปล่อยทิ้งไว้ 10 นาที หรือ 30 นาที พบว่าระยะเวลาที่น้ำเจือจางอยู่ในสารละลายโครีโอโพรเทคแทนท์นานเกิน 10 นาที ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ลดลง โดยชนิดของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ที่ใช้ทดสอบมีผลต่อการเคลื่อนที่สเปิร์มปลา rainbow trout น้อยมาก จึงทำการแช่แข็งน้ำแข็งปลา rainbow trout ในหลอดฟางโดยคัดเลือกสารโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดที่เหมาะสม (glycerol, DMSO หรือ DMSO ร่วมกับ sucrose) มาเจือจางน้ำแข็งและลดอุณหภูมิด้วยการใช้เครื่องลดอุณหภูมิอัตโนมัติ โดยใช้อัตราการลดอุณหภูมิ

อย่างช้า (1 และ 10 องศาเซลเซียส/นาทีก่อน) หรือใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (30 องศาเซลเซียส/นาทีก่อน) ไปที่อุณหภูมิสุดท้าย -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่ในไนโตรเจนเหลว พบว่า การใช้ DMSO ร่วมกับ sucrose เจือจางน้ำเชื้อ และใช้อัตราการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็ว (30 องศาเซลเซียส/นาทีก่อน) ให้ผลดีที่สุดในการทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มสูงสุดหลังการละลาย (ประมาณ 63%) เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการลดอุณหภูมิต่างๆ (1 องศาเซลเซียส/นาทีก่อน และ 10 องศาเซลเซียส/นาทีก่อน) ที่สเปิร์มมีการเคลื่อนที่ต่ำหลังการละลาย (0-15%)

Gwo et al. (1991) พัฒนารูปแบบการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker (*Micropogonias undulatus*) ด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ สารโครีโอโพรเทคแทนท์ ระยะเวลาสมมูล อัตราการลดอุณหภูมิ อัตราการละลายที่แตกต่างกันในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Atlantic croaker พบว่า สารละลายบัฟเฟอร์ที่ประกอบด้วย กลีเซอรอล กลูโคส และ ซูโครส สามารถใช้เจือจางน้ำเชื้อปลาขณะทำการแช่แข็ง โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับสารละลายบัฟเฟอร์ชนิดอื่นๆที่มีความสลับซับซ้อนซึ่งมีสารเคมีหลายชนิดเป็นองค์ประกอบ โดยน้ำเชื้อที่แช่แข็งด้วยอัตราการลดอุณหภูมิตั้งแต่ 10 องศาเซลเซียส/นาทีก่อน จนถึง 150 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนไม่มีผลต่ออัตราการปฏิสนธิไข่ปลาเมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งที่ละลายมาผสมเทียมกับไข่

Glogowski et al. (2002) พัฒนารูปแบบการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) ด้วยการนำน้ำเชื้อมาเจือจางด้วยน้ำยา 3 สูตรได้แก่ 1.) tris-sucrose-KCl (30 mM Tris, 23.4 mM sucrose, 0.25 mM KCl, pH 8.0), 2.) tris-NaCl (10 mM Tris, 25 mM NaCl, pH 8.5) และ 3.) tris-sucrose (20 mM Tris, 400 mM sucrose, pH 8.0) และผสมด้วยสารโครีโอโพรเทคแทนท์ methanol ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 5% บรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ทำการลดอุณหภูมิจนแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยวิธีการใช้ไนโตรเจนเหลวโดยไม่มีระยะเวลาสมมูล โดยแช่แข็งน้ำเชื้อที่ระดับความสูง 4 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว นาน 3 นาทีจึงนำหลอดฟางมาแช่ในไนโตรเจนเหลว เปรียบเทียบกับวิธีแช่แข็งน้ำเชื้อโดยใช้เครื่องลดอุณหภูมิตั้งแต่อัตราการลดอุณหภูมิที่อัตรา 3.5 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนจากอุณหภูมิเริ่มต้น 4 องศาเซลเซียสที่อุณหภูมิสุดท้าย -15 องศาเซลเซียสโดยมีการเหนี่ยวนำให้น้ำเชื้อแข็งตัวอย่างรวดเร็ว (seeding) ที่อุณหภูมิ -7 องศาเซลเซียส และนำหลอดฟางมาวางในน้ำแข็งแห้งอีก 5 นาทีจึงแช่หลอดฟางในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า สารบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา sturgeon คือ tris-sucrose-KCl และ tris-NaCl และน้ำเชื้อที่เจือจางในสารละลายดังกล่าวเมื่อนำมาแช่แข็งด้วย protocols การแช่แข็งน้ำเชื้อทั้ง 2 วิธีที่กล่าวมาแล้วได้และเมื่อนำหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 6 วินาที ปรากฏว่าน้ำเชื้อแช่แข็งเหล่านั้นที่มีความสามารถในการปฏิสนธิไข่และให้ค่าอัตราการฟักไม่แตกต่างกับการใช้น้ำเชื้อสด

Vuthiphandchai et al. (2009a) พัฒนารูปแบบการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากระพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*) ด้วยเครื่องลดอุณหภูมิตั้งแต่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนที่ 4 ระดับความเข้มข้น โดยทำการลดอุณหภูมิต่างกัน 2 รูปแบบ โดยกำหนดให้อุณหภูมิสุดท้ายเป็น -40 หรือ -80 องศาเซลเซียสก่อนแช่แข็งน้ำเชื้อที่แข็งตัวลงไปเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว การแช่แข็งน้ำเชื้อทำในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิตั้งแต่อัตราการลดอุณหภูมิที่ 10 องศาเซลเซียส/นาทีก่อนจากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสจนถึง -40 หรือ -80 องศาเซลเซียสแล้วเก็บ

รักษาในไนโตรเจนเหลวจึงนำมาละลาย พบว่าน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่แช่แข็งด้วย protocol ที่ใช้อุณหภูมิต่ำที่สุดทำเป็น -80 องศาเซลเซียสทำให้น้ำเชื้อหลังการละลายมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (post-thaw sperm motility) และการมีชีวิตของสเปิร์ม (post-thaw sperm viability) มีค่าสูงสุด (>90%) โดยน้ำเชื้อปลากะพงแดงที่แช่แข็งสามารถปฏิสนธิไข่ปลากะพงแดงได้ค่าอัตราการปฏิสนธิไม่แตกต่างทางสถิติกับน้ำเชื้อกลุ่มควบคุมที่ใช้น้ำเชื้อสด

Irawan et al. (2010) ศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ สารโคริโอโพรเทคแทนท์และวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยการใช้สารละลายบัฟเฟอร์ 6 ชนิด และสารโคริโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด (DMSO, methanol และ propylene glycol) ด้วยการใช้อัตราการลดอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส/นาที่จากอุณหภูมิเริ่มต้น 25 องศาเซลเซียสมาที่อุณหภูมิต่ำสุดทำเป็น -40 องศาเซลเซียสก่อนเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลวโดยใช้หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร พบว่าน้ำเชื้อปลาไนที่เจือจางด้วย common carp sperm extender (CCSE2) และ DMSO มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด อีกทั้งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนอย่างง่ายด้วยการใช้ CCSE2 และ DMSO โดยนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว 2 เซนติเมตร นาน 10 นาทีมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีการเคลื่อนที่สูงกว่า 90% และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มนานที่สุดหลังถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ (105.7 ± 23.1 วินาที)

Boonthai et al. (2016c) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) ด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิตันโนมิติ เริ่มจากเจือจางน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยสารละลาย Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) และ 10% DMSO นำน้ำเชื้อแช่แข็งมาประเมินการปนเปื้อนของแบคทีเรียระหว่างการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียน โดยตรวจวัดปริมาณแบคทีเรียชนิดต่างๆเปรียบเทียบกับ animal origin และ non-animal origin ได้แก่ ครีบหาง น้ำเลี้ยงปลา น้ำเชื้อปลา ปัสสาวะ ชี้น้ำปลา ไนโตรเจนเหลว ผิวด้านนอกของหลอดฟาง อากาศที่หมุนเวียนในห้องปฏิบัติการ และถุงมือ ทั้งก่อนและหลังการแช่แข็ง พบว่า แบคทีเรีย *Aeromonas punctata* subsp. *caviae* มีการปนเปื้อนมากที่สุดในบริเวณครีบหาง ถุงมือ และน้ำเชื้อปลาก่อนการแช่แข็ง และยังพบว่า *Bacillus safensis* and *Bacillus* sp. ยังสามารถมีชีวิตรอดในถังไนโตรเจนเหลว ซึ่งการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาโดยใช้ aseptic technique มีประสิทธิภาพสูงในการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียในน้ำเชื้อแช่แข็ง และเป็นประโยชน์ต่อการจัดตั้งธนาคารน้ำเชื้อปลา

Richardson et al. (1999) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อซีกเดียวที่มีชื่อสามัญว่า yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) โดยใช้หลอดฟางที่มีขนาดต่างกัน 2 ขนาด คือ 0.25 มิลลิลิตร และ 1.7 มิลลิลิตร โดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มี 10% propylene glycol และแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลว พบว่าอัตราการปฏิสนธิเมื่อนำน้ำเชื้อสดมาผสมกับไข่เปรียบเทียบกับน้ำเชื้อแช่แข็งที่ถูกเก็บไว้ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร และหลอดฟางขนาด 1.7 มิลลิลิตร มีค่าเป็น 64.7 เปอร์เซ็นต์ 59.2 เปอร์เซ็นต์และ 54.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ และอัตราการฟักเมื่อเทียบกับน้ำเชื้อสด มีค่าเป็น 52 เปอร์เซ็นต์ 42 เปอร์เซ็นต์และ 36 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่ Zhang et al. (2003) ได้ทำการเก็บรักษาไข่ปลาคีตเดี่ยว (*Paralichthys olivaceus*) ด้วย extender 6 สูตร คือ NaCl, KCl, CaCl, MgCl, MgSO₄ และ NaHCO₃ และใช้สารโคริโอโพรเทคแทนท์ 3 ชนิด คือ DMSO, Glycerol และ methanol ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อน้ำยา เท่ากับ 1:2 โดยแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ -15, -40, -80, -110 และ -160 องศาเซลเซียสต่อนาที่ แล้วเก็บในไนโตรเจนเหลวนาน 5 นาที เมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่ 28

องศาเซลเซียส พบว่าสเปิร์มที่แช่แข็งด้วย DMSO, Glycerol และ methanol มีการเคลื่อนที่หลังการละลายเท่ากับ 60.5 ± 3.6 , 79.2 ± 4.5 และ $13.3 \pm 4.7\%$ ตามลำดับ และสามารถปฏิสนธิไข่ได้ 67.1 ± 15.1 , 76.2 ± 10.0 และ $44.9 \pm 22.6\%$ ตามลำดับ และให้ค่าอัตราการฟักเท่ากับ 37.4 ± 8.3 , 48.2 ± 25.7 และ $23.4 \pm 10.8\%$ ตามลำดับ ซึ่ง glycerol และ DMSO ให้ผลการแช่แข็งดีกว่า methanol โดย glycerol ให้ค่าเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม การปฏิสนธิไข่ และเปอร์เซ็นต์การเพาะฟักดีที่สุด

Ji et al. (2004) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch (*Lateolabrax japonicus*) ด้วยไอโซโทรเจนเหลวโดยศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ (modified plaice Ringer solution; MPRS, D-15 และ modified Mounib's medium (MMM) ชนิดของสารโครีโอโพรเทคแทนท์ (DMSO, methanol, dimethylformamide; DMF และ glycerol) และปริมาณน้ำเชื้อแช่แข็ง (0.5, 1.0 และ 1.8 มิลลิลิตร) ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย โดยในช่วงแรกนำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ทั้งสามชนิดร่วมกับ 10% DMSO ใช้ปริมาณน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง 1 มิลลิลิตรและลดอุณหภูมิเหนือผิวหน้าไอโซโทรเจนเหลวที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที พบว่า MPRS มีความเหมาะสมมากที่สุดในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch จึงนำน้ำเชื้อปลา Sea perch มาเจือจางต่อใน MPRS ที่มีสารโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดต่างๆกัน (DMSO, methanol, DMF และ glycerol) ที่ 3 ระดับความเข้มข้น (6%, 10% และ 14%) นำปริมาณน้ำเชื้อที่ถูกเจือจาง 1 มิลลิลิตรมาทำการลดอุณหภูมิเหนือผิวหน้าไอโซโทรเจนเหลวที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาทีเช่นเดิม พบว่า DMSO ให้ผลการแช่แข็งดีกว่าสารโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่นๆโดยการใช้ DMSO ที่ระดับ 6% และ 10% ให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยในขั้นตอนสุดท้ายเมื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sea perch ปริมาณต่างๆกันภายในหลอด Cryovials 1.8 มิลลิลิตร โดยเจือจางน้ำเชื้อด้วยสารละลาย MPRS ที่มี 10% DMSO ก่อนนำน้ำเชื้อในปริมาณต่างๆกัน (0.5, 1.0 และ 1.8 มิลลิลิตร) มาบรรจุใส่ในหลอด Cryovials ทำการลดอุณหภูมิเหนือผิวหน้าไอโซโทรเจนเหลวที่ระดับความสูง 6 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที พบว่า การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าไม่แตกต่างกันเมื่อปริมาณน้ำเชื้อที่แช่แข็งเพิ่มขึ้นจาก 0.5 มิลลิลิตรไปเป็น 1.0 มิลลิลิตร โดยน้ำเชื้อแช่แข็งที่ปริมาณ 1.8 มิลลิลิตร มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายต่ำกว่าน้ำเชื้อที่ถูกแช่แข็งในปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร

Horváth et al. (2010) แช่แข็งน้ำเชื้อปลา paddlefish (*Polyodon spathula*) ในปริมาณมากด้วยการใช้ไอโซโทรเจนเหลว โดยเจือจางน้ำเชื้อในสารละลาย modified Tsvetkova's extender ที่ประกอบด้วย 23.4 mM M sucrose, 0.25 mM M KCl, 30 mM M Tris (pH 8.0 ปรับโดย HCl) พร้อมทั้งใส่ methanol ให้ได้ระดับความเข้มข้นสุดท้าย 5% หรือ 10% ทำการบรรจุน้ำเชื้อลงในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาดใหญ่ 5 มิลลิลิตร (minitube) แช่แข็งน้ำเชื้อโดยทำการลดอุณหภูมิแช่แข็งด้วยการวางหลอด minitube ลงบน polystyrene frame ภายในกล่องโฟมที่ระดับความสูง 3 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไอโซโทรเจนเหลวนาน 5 หรือ 7 นาที เก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในไอโซโทรเจนเหลว และนำมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที พบว่า การใช้ 5% methanol แช่แข็งน้ำเชื้อปลา paddlefish ในไอโซโทรเจนเหลวระยะเวลา 5 นาที มีผลทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลายมีคุณภาพดี โดยให้ค่าอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักมีค่าสูงสุดเท่ากับ $48 \pm 5\%$ และ $47 \pm 10\%$ แม้ว่ามีค่าต่ำกว่าการใช้น้ำเชื้อสดผสมเทียมไปซึ่งได้ค่าอัตราการปฏิสนธิ และอัตราการฟักมีค่าสูงสุดเท่ากับ $77 \pm 6\%$ และ $66 \pm 13\%$ ตามลำดับ

Yavas and Bozkurt (2011) พัฒนาแช่แข็งน้ำเชื้อปลาเฉาฮื้อ (*Ctenopharyngodon idella*) ด้วยไอไนโตรเจนเหลว โดยศึกษาผลของอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อและการปฏิสนธิ โดยนำน้ำเชื้อปลาเฉามาเจือจางในสารละลาย 350 mM glucose, 30 mM Tris ที่มี 5% glycerol (pH 8.0) ปล่อยให้อยู่ในสภาวะสมดุลที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีภายในหลอดฟาง ขนาด 0.25 มิลลิลิตร แช่แข็งในไอไนโตรเจนเหลวภายในกล่องโฟมที่ความสูง 6 เซนติเมตรเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลว (-140 องศาเซลเซียส) นาน 10 นาที และเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว จึงนำน้ำเชื้อแช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 30, 35 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10, 20 และ 30 วินาทีรวมทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง ปรากฏว่าสเปิร์มปลาเฉาฮื้อในชุดการทดลองที่ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 30 วินาที มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูงสุด ($83.4 \pm 2.1\%$) และมีค่าเปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิที่สูงที่สุด ($85.6 \pm 2.8\%$) มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่นๆอีก 8 ชุดการทดลอง แม้ว่าการใช้น้ำเชื้อสดจะมีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและมีค่าอัตราการปฏิสนธิที่สูงกว่า ($91.6 \pm 6.4\%$ และ $94.4 \pm 4.3\%$ ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าอัตราการละลายน้ำเชื้อปลาเฉาฮื้อมีผลต่อการเคลื่อนที่ของสเปิร์มและการปฏิสนธิไข่

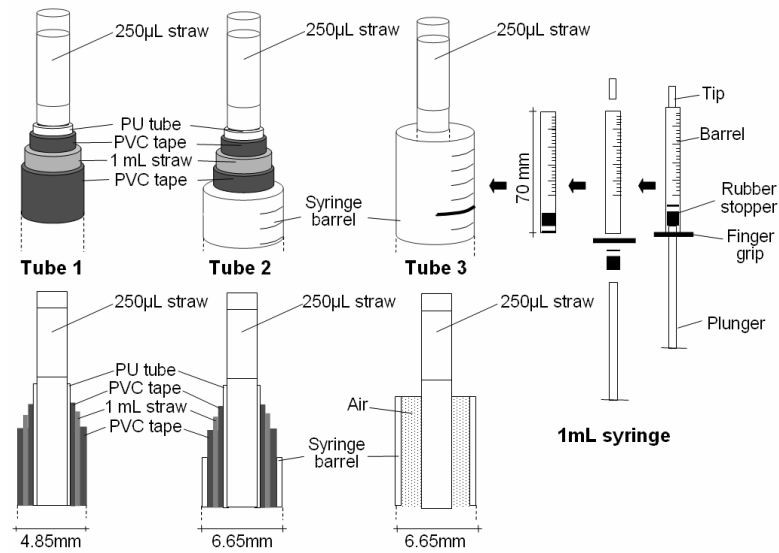
Bozkurt and Yavas (2017) แช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยไอไนโตรเจนเหลวเพื่อศึกษาผลของขนาดหลอดบรรจุน้ำเชื้อ (0.25, 0.5 และ 1.5 มิลลิลิตร) และอัตราการละลาย (ละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10, 20 และ 30 วินาที) ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายและอัตราการปฏิสนธิ โดยนำน้ำเชื้อปลาไนมาเจือจางด้วยสารละลาย 75 mM NaCl, 70 mM KCl, 2 mM CaCl_2 , 1 mM MgSO_4 and 20 mM Tris (pH 8) ที่มี 10% methanol ปล่อยให้ให้น้ำเชื้อเจือจางอยู่ในสภาวะสมดุลที่ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที และแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไนด้วยการใช้ไอไนโตรเจนเหลว 10 นาทีจึงนำไปเก็บในถังไนโตรเจนเหลว พบว่า อัตราการปฏิสนธิที่ให้ค่าสูงสุด ($68.4 \pm 2.5\%$) ได้จากชุดการทดลองที่แช่แข็งในหลอดบรรจุน้ำเชื้อขนาด 1.5 มิลลิลิตรและละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 30 วินาทีเมื่อใช้จำนวนสเปิร์มต่อไข่ (sperm to egg ratio) ในอัตราส่วน $1 \times 10^5 : 1$ ในการผสมเทียมกับไข่

Muchlisin et al. (2004) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดเหลือง (*Mystus nemurus*) ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดเหลือง โดยศึกษาผลของสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เจือจางน้ำเชื้อ (physiological saline, Ringer, saline) และผลของสารไครโอโพรเทคแทนท์ (DMSO, ethanol, glycerol หรือ methanol) ที่มีต่อคุณภาพสเปิร์ม โดยเจือจางน้ำเชื้อปลากดเหลืองในสารละลายบัฟเฟอร์ (1:20, 1:30 หรือ 1:40) และสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด (5, 10, 15 หรือ 20%) โดยการทดลองในช่วงแรกพบว่าสารละลาย Ringer มีความเหมาะสมมากที่สุดในการเจือจางน้ำเชื้อปลากดเหลืองหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -4 หรือ 23 องศาเซลเซียส จึงทำการทดลองในช่วงต่อมาโดยนำน้ำเชื้อปลากดเหลืองมาเจือจางในสารละลาย Ringer ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อ Ringer เท่ากับ 1:20 แล้วผสมสารไครโอโพรเทคแทนท์ทั้ง 4 ชนิด (DMSO, ethanol, glycerol หรือ methanol) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้าย 4 ระดับต่างกัน บรรจุน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางในหลอด Cryovials ขนาด 5 มิลลิลิตร ปล่อยให้ให้น้ำเชื้ออยู่ในสภาวะสมดุลกับสารไครโอโพรเทคแทนท์บนน้ำแข็งบด (crushed ice) นาน 5 นาที จึงทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลากดเหลืองในภาชนะที่มีน้ำแข็งแห้ง (dry ice) นาน 5 นาทีก่อนการเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 15 วัน ทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งโดยละลายหลอด Cryovials ใน water bath อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 5 นาที พบว่า

น้ำเชื้อปลากดเหลืองที่แช่แข็งด้วย 10% Methanol ได้ผลการทดลองที่ดีที่สุดโดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายเท่ากับ 58% ซึ่งสูงกว่าการใช้สารโครีโอโพรเทคแทนท์ชนิดอื่น ๆ ที่ทุกความเข้มข้น

Draper and Moens (2009) พัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาฆ่าลาย Zebrafish ในน้ำแข็งแห้ง โดยนำน้ำเชื้อปลาฆ่าลายมาเจือจางในสูตรน้ำยา Ginsberg Fish Ringers จำนวน 2 สูตร โดยสูตรที่ 1 ใช้น้ำยา Ginsburg Fish Ringers 10 มิลลิลิตร และ powdered skin milk 1.5 มิลลิกรัม ส่วนสูตรที่ 2 ใช้น้ำยา Ginsburg Fish Ringers 10 มิลลิลิตร ร่วมกับ powdered skin milk 1.5 มิลลิกรัม และ methanol 1 มิลลิลิตร นำหลอด capillary tube ขนาด 10 ไมโครลิตรมาทำเครื่องหมายปลายด้านหนึ่งให้มีปริมาตร 3.3 ไมโครลิตร (ความยาว 1.67 เซนติเมตร) ทำการเจือจางน้ำเชื้อที่ดูตมา 3.3 ไมโครลิตรในสูตรน้ำยาทั้งสองสูตรให้มีปริมาณ 10 ไมโครลิตร จึงเทน้ำเชื้อออกจากหลอด capillary tube ลงไปในหลอด cryovials ขนาด 2.0 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอด cryovials ขนาด 2.0 มิลลิลิตรใส่ลงไปใน conical tubes ขนาด 15 มิลลิลิตรอีกชั้นหนึ่ง ปิดฝาให้แน่นแล้วนำ conical tubes ไปแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งบดละเอียดนาน 20 นาทีจึงนำเอาหลอด cryovials ออกมาเพื่อนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว โดยระยะเวลาระหว่างใส่ methanol จนกระทั่งแช่หลอด cryovials ไม่ควรเกิน 30 วินาที ซึ่งผลการศึกษาในช่วงเวลาเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวนาน 8 ปี (ตั้งแต่ปี 2001-2008) นำมาละลายในอุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส 8-10 วินาที พบว่าสเปิร์มสามารถปฏิสนธิกับไข่มีค่าเฉลี่ย 30% และสามารถปฏิสนธิได้สูงถึง 62% เนื่องจากความแปรปรวนของคุณภาพสเปิร์ม

Yasui et al. (2008) ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) ด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจาง 7 เท่าในสารละลายที่ประกอบด้วย 63.5mM NaCl, 114mM KCl, 20mM Tris ร่วมกับใช้ 10% methanol เป็นสารโครีโอโพรเทคแทนท์ แล้วบรรจุน้ำเชื้อที่ถูกเจือจางในหลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร แล้วนำหลอดฟางไปใส่ในภาชนะ 3 ลักษณะที่มีความหนาห่อหุ้มต่าง ๆ กันด้วยการใช้ polyurethane pipe, vinyl adhesive tape และ syringe barrel เป็นตัวปรับให้ความหนาต่าง ๆ กัน โดยหลอดที่ 1 ใช้ polyurethane pipe, vinyl adhesive (ชั้นที่ 1), cryogenic straw tube, vinyl adhesive (ชั้นที่ 2) หลอดที่ 2 ใช้อุปกรณ์หุ้มเหมือนหลอดที่ 1 แต่เพิ่มหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร และหลอดที่ 3 ใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตรเพียงอย่างเดียว (รูปที่ 1) จากนั้นทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา loach โดยนำภาชนะเหล่านั้นที่มีหลอดฟางอยู่ภายในไปแช่แข็งในถังน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ที่บดให้เป็นผงนาน 2 นาที แล้วนำเอาหลอดฟางไปแช่ในถังไนโตรเจนเหลวนาน 3 ชั่วโมง จึงนำหลอดฟางออกมาละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที ปรากฏว่า น้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดที่ 3 (Tube 3) ซึ่งมีอัตราการลดอุณหภูมิต่ำสุด (33.3 ± 2.1 องศาเซลเซียส/นาที) มีผลทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่หลังการละลายเท่ากับ $72 \pm 3\%$ สเปิร์มมีเวลาเคลื่อนที่ 146 ± 12 วินาที และเมื่อนำน้ำเชื้อแช่แข็งไปผสมกับไข่ปลาได้ค่าเปอร์เซ็นต์การฟัก $29 \pm 4\%$ ซึ่งค่าเหล่านี้มีค่าสูงกว่าชุดการทดลองที่น้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดที่ 1 และหลอดที่ 2 (Tube 1 and 2)



รูปที่ 1 การบรรจุหลอดฟางที่มีน้ำเชื้ออยู่ภายในเข้าไปในภาชนะ 3 ลักษณะเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อปลา loach ในน้ำแข็งแห้งที่บดเป็นผง

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

วัสดุอุปกรณ์ และสารเคมี

- สายไฟฟ้า (300V. PVC/PVC 70°C VAF 2 x 1.5 SQ.MM. TABLE 2 THAI YAZAKI (W) TIS 11-2531)
- สายหลอดซิลิโคน (Dura Silicone tube)
- หลอด Centrifuge tube (Nunc ขนาด 15 มิลลิลิตร)
- หลอดฟาง (French straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร (IMV Technologies Paillette)
- กล่องโฟม (Styrofoam box)
- ปีกเกอร์ขนาดต่างๆ
- ขวดรูปชมพู่ขนาด 125, 250 และ 500 มิลลิลิตร
- ไมโครปิเปต และ pipette tip
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- เข็มเขี่ย
- พอร์เซป (Forcep)
- กระจกสไลด์และ Cover glass
- กระจกทรง
- เครื่องชั่งแบบทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
- เครื่องปั่นผสม (Vortex mixer)
- เครื่องมือลดอุณหภูมิอัตโนมัติ (Controlled-rate programmable freezer)
- กล้องจุลทรรศน์
- Haemocytometer
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิเต้า (Incubator)
- Glass micropipette ขนาด 5,10 และ 100 ไมโครลิตร
- หลอดฟาง (French straw) ขนาด 250 ไมโครลิตร
- หลอด Cryotube ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- Canister
- Aluminium canes
- Goblets
- Vial tubes
- Hot plate
- Thermometer
- Tissue culture flasks
- Thermocouple-probe thermometer (K-type, HI 91530K, Hanna Instruments Inc.)

- Water bath
- Racks
- Eppendorf tubes
- ถังเก็บไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen dewar)
- ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen)
- น้ำแข็งแห้ง (dry ice)
- พ่อแม่พันธุ์ปลาตะเพียนขาว
- สารเคมีประเภทต่างๆที่ใช้ในการแช่แข็ง และการย้อมสีน้ำเชื้อปลา

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การรวบรวมฟอพันธุ์ปลา

ฟอพันธุ์ปลาตะเพียนขาว (รูปที่ 2) ได้ถูกรวบรวมจากฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในภาคตะวันออกเฉียงใต้ของประเทศไทย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา โดยรวบรวมใส่ถุงพลาสติกอ็อกซิเจนพร้อมใส่ยาเหลืองและเกลือแกงระหว่างการลำเลียงฟอพันธุ์ปลา เพื่อป้องกันโรคพยาธิที่อาจติดมาจากฟาร์มและป้องกันไม่ให้ปลาเครียด เมื่อเดินทางมาถึงโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์ ทำการย้ายฟอพันธุ์ปลาตะเพียนขาวทั้งหมดลงไว้ในบ่อซิเมนต์ที่สะอาดขนาด 10 ตัน มีออกซิเจนเพียงพอ ให้อาหารเม็ดที่มีโปรตีน 35% วันละ 2 ครั้ง เวลาเช้าและเย็น ในปริมาณ 2-3% น้ำหนักตัว/วันตลอดระยะเวลาการทดลอง โดยทำการดูแลรักษาบ่อในบ่อทุกๆ 1-2 วัน และเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อเลี้ยงฟอพันธุ์ทุกๆ 3-5 วัน ประมาณ 20-40%

ฟอพันธุ์ปลาที่ได้ทำการปรับสภาพให้ในโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ถูกซังน้ำหนัก วัดความยาว และนำออกมาใส่ในภาชนะ (รูปที่ 3) ก่อนที่จะถูกรีดน้ำเชื้อออกมาเพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ ด้วยการสลบฟอพันธุ์ด้วยยาสลบ (2-phenoxyethanol) 15 ppm ประมาณ 5 นาที เพื่อไม่ให้ปลาเครียดระหว่างการรีดน้ำเชื้อ ทำการเช็ดบริเวณลำตัวปลาด้วยผ้าสะอาดก่อนทำการรีดน้ำเชื้อออกมา เพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามก่อนทำการรีดน้ำเชื้อปลา ได้ทำการกดบริเวณรอบๆ ช่องเพศของฟอพันธุ์เพื่อให้ปัสสาวะทั้งหมดไหลออกมาก่อนการรีดน้ำเชื้อ เนื่องจากถ้ามีปัสสาวะออกมาพร้อมน้ำเชื้อ ก็จะกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่อย่างรวดเร็ว ทำให้เมื่อนำน้ำเชื้อปลามาทดลองแช่แข็งก็จะประสบความล้มเหลว เพราะน้ำเชื้อมีคุณภาพต่ำตั้งแต่เริ่มการทดลองอันเป็นผลมาจากสเปิร์มถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ จึงไม่มีพลังงานเหลืออยู่ในการทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ได้หลังการกระตุ้น การรีดน้ำเชื้อปลาแต่ละตัวทำโดยกดบริเวณท้องอย่างเบาๆ แล้วออกแรงรีดท้องเพียงเล็กน้อยตั้งแต่บริเวณครีบอก (pectoral fin) ลงมาถึงบริเวณช่องเพศ (urogenital papillae) เพื่อให้ได้น้ำเชื้อ (semen) สีขาวขุ่นไหลออกมาบริเวณช่องเพศ (urogenital papillae) ทำการรวบรวมน้ำเชื้อที่ได้จากการรีดปลาแต่ละตัวใส่ในภาชนะที่สะอาด (รูปที่ 4) และเก็บรักษาน้ำเชื้อที่ได้ไว้บนน้ำแข็งเพื่อรักษาคุณภาพน้ำเชื้อก่อนเริ่มต้นการทดลอง สำหรับฟอพันธุ์ปลาตะเพียนขาวที่เสร็จสิ้นการรีดน้ำเชื้อ ได้นำไปพักในถังน้ำสะอาดที่มีการให้ออกซิเจนเต็มที่ประมาณ 5 นาที จึงนำกลับไปเลี้ยงขุนในบ่อฟอพันธุ์ต่อไป

น้ำเชื้อปลาที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งถูกรวบรวมจากฟอพันธุ์จำนวนหลายตัว (pooled milt) ประมาณ 8-10 ตัวเพื่อลดความแปรปรวนของคุณภาพน้ำเชื้อ (individual variation) สำหรับการทดลองในแต่ละชุดการทดลองใช้น้ำเชื้อสดที่รีดออกมาใหม่ๆ (fresh milt) ที่มีคุณภาพดีเท่านั้น โดยเลือกใช้เฉพาะน้ำเชื้อที่มีสีลักษณะขาวขุ่น ไม่มีเมือก เลือด หรือปัสสาวะเจือปน และมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่สูง (มากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้นจึงนำมาใช้ในการทดลอง น้ำเชื้อที่มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่ำกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ ไม่ถูกนำมาใช้ในการทดลองเพื่อให้มั่นใจว่าขณะเริ่มการทดลองน้ำเชื้อปลามีคุณภาพที่ดีพอ

ฟอพันธุ์ปลาที่มีน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีที่ได้ถูกรวบรวมน้ำเชื้อออกมาจากฟอพันธุ์เพื่อประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อที่สำคัญได้แก่ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (percent sperm motility) ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนที่ (sperm motile period) เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต (percent sperm viability) แรงดันออสโมติก (osmotic pressure หรือ osmolality) และความหนาแน่นของสเปิร์ม (sperm density) น้ำเชื้อสดที่มีคุณภาพดีเท่านั้นถูกนำมาใช้ในการทดลองแช่แข็ง โดยน้ำเชื้อสดที่รวบรวมได้ถูกนำมาใช้ในการทดลองในเวลาไม่เกิน 15 นาทีหลังการรวบรวมน้ำเชื้อ น้ำเชื้อที่

รวบรวมมาในระหว่างการทดลองไม่ว่าจะรวบรวมในช่วงต้นฤดู กลางฤดู หรือปลายฤดูผสมพันธุ์วางไข่ ได้ถูกประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเพื่อทราบคุณภาพน้ำเชื้อ (baseline information) ก่อนการแช่แข็ง และทราบการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อปลาที่อาจมีในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ (spawning season)

2. การประเมินคุณภาพสเปิร์มในน้ำเชื้อปลา

การประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ทำโดยการหยดตัวอย่างน้ำเชื้อสดที่รีดออกมา (5 ไมโครลิตร) ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดแล้วหยด 0.4% NaCl ลงไป 100 ไมโครลิตร พร้อมกับปิดด้วย cover glass เบาๆอย่างรวดเร็ว เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วทำการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่เคลื่อนที่ทันทีให้เสร็จภายใน 15 วินาที ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ประเมินจากจำนวนสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าอย่างรวดเร็ว เมื่อถูกกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl โดยแบ่งระดับที่สเปิร์มเคลื่อนที่ไว้ 6 ระดับ คือ สเปิร์มที่เคลื่อนไหวได้ 0, 20%, 40%, 60%, 80% และ 100% ตามวิธีการของ Vuthiphandchai and Zohar (1999) โดยทำ 3 ซ้ำ โดยในแต่ละสไลด์ยังได้สุ่มประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอีก 3 จุดในเวลาไม่เกิน 15 วินาทีต่อสไลด์ ทำให้มีจำนวนซ้ำย่อยในการประเมินการเคลื่อนที่สเปิร์มรวม 9 ซ้ำ (pseudoreplicates) การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็ง ใช้หลักการประเมินเหมือนน้ำเชื้อสด โดยหยดน้ำเชื้อแช่แข็งหลังการละลาย (post-thawed sperm) ในปริมาณ 4 ไมโครลิตร ลงบนกระจกสไลด์ที่สะอาดจึงเติม 0.4% NaCl ลงไปในปริมาณ 100 ไมโครลิตรเพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อน และประเมินการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม 9 ซ้ำย่อยตามที่ได้กล่าวมาแล้ว สำหรับการประเมินเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนที่ (sperm motile period) ไม่ว่าจะเป็น้ำเชื้อสด หรือน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำโดยบันทึกระยะเวลาที่สเปิร์มสด หรือสเปิร์มแช่แข็งหลังการละลาย ภายหลังกักกระตุ้นด้วย 0.4% NaCl ว่าสเปิร์มใช้เวลาว่ายหน้านานเท่าใดเริ่มตั้งแต่ถูกกระตุ้นให้เคลื่อนที่ด้วย 0.4% NaCl จนกระทั่งสเปิร์มหยุดเคลื่อนที่ บันทึกเวลาเป็นวินาที โดยทำการประเมิน 3 ซ้ำ

เปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต ประเมินโดยการนำเอาน้ำเชื้อสด (5 ไมโครลิตร) มาย้อมสีด้วยสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) บนกระจกสไลด์ตามวิธีการของ Friourgh (1966) แล้วจึงสุ่มนับจำนวนสเปิร์มที่มีชีวิตซึ่งจะไม่ติดสียอม (viable sperm) และจำนวนสเปิร์มที่ตายซึ่งจะติดสียอมม่วงแดง (dead sperm) โดยสุ่มนับสเปิร์มประมาณ 300 ตัว/สไลด์ และนับ 3 ซ้ำโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า แล้วจึงคำนวณเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต การประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อแช่แข็ง ได้ทำเช่นเดียวกับการประเมินเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิตของน้ำเชื้อสด โดยเมื่อทำการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งแล้ว นำน้ำเชื้อหลังการละลายในปริมาณ 5 ไมโครลิตรมาวางบนกระจกสไลด์ แล้วหยดสารละลาย eosin-nigrosin (5 ไมโครลิตร) ลงไปแล้วทำการผสมให้เข้ากัน และ smear ให้แห้งโดยเร็ว และทำการประเมิน 3 ซ้ำเช่นกัน

3. การพัฒนาวิธีการแช่แข็งและเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้ง

3.1 ศึกษาผลของอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) และอัตราการละลาย (thawing rate) ที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาด้วยน้ำแข็งแห้ง ในประเด็นการเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสม จึงต้องมีการนำหลอดฟางมาลดอุณหภูมิที่อัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกัน โดยการ

นำหลอดฟางมาบรรจุในภาชนะแบบต่างๆให้มีความหนาขึ้น แล้วนำไปใส่ลงในน้ำแข็งแห้งบดเพื่อแช่แข็งน้ำเชื้อต่อไป ก็จะได้อัตราการลดอุณหภูมิต่างๆกันตามที่ต้องการ

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในการทดลองนี้ เริ่มจากการนำเอาน้ำเชื้อปลามาเจือจางในสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และสารไครโอโพรเทคแทนท์ที่เหมาะสม (10% DMSO) แล้วปล่อยให้ให้อยู่ในภาวะสมดุลย์ (equilibration period) นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้องก่อนที่จะถูกรวบรวมไว้ในหลอดฟาง (straw) ขนาด 0.25 มิลลิลิตร (รูปที่ 5) โดยนำหลอดฟางไปใส่ในอุปกรณ์ห่อหุ้ม 4 ชนิด คือ สายหลอดซิลิโคน สายออกซิเจน หลอด Centrifuge tube และ หลอดสายไฟฟ้า จากนั้นนำน้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดเหล่านี้ไปลดอุณหภูมิแช่แข็งโดยนำไปใส่ในกล่องโฟมเก็บความเย็นที่มีน้ำแข็งแห้งบดละเอียดเป็นเวลานาน 10, 20 และ 30 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดให้นำเอาหลอดฟางบรรจุน้ำเชื้อออกจากอุปกรณ์ห่อหุ้ม แล้วนำหลอดฟางมาละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งด้วยการใช้อุณหภูมิละลายต่างกัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (น้ำเชื้อสด) ที่ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดฟางบนน้ำแข็งแห้งโดยไม่ใช้วัสดุใดๆมาห่อหุ้มหลอดฟาง สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS ประกอบไปด้วย NaCl 0.8890 g, KCl 0.0440 g, Na₂HPO₄·2H₂O 0.0130 g, NaHCO₃ 0.0390 g, KH₂PO₄ 0.0070 g, MgSO₄·7H₂O 0.0220 g, Glucose 0.1110 g, น้ำกลั่น 100 ml ปรับ pH ให้ได้ 7.6 (Vuthiphandchai et al., 2009b)

หลอดฟางในทุกชุดการทดลองหลังการแช่แข็งถูกนำมาละลายใน water bath ที่อุณหภูมิต่างๆกันตั้งแต่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส และบันทึกเวลาที่ใช้ในการทำให้น้ำเชื้อละลายในแต่ละอุณหภูมิ และบันทึกอุณหภูมิน้ำเชื้อขณะละลายด้วย thermocouple probe thermometer (type K) รวมทั้งประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของเปิร์ม และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายทันที การทดลองทั้งหมดทำ 3 ซ้ำ ในระหว่างการทดลองใช้ thermocouple probe thermometer (type K) ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิทุกๆวินาทีของหลอดฟางที่อยู่ในภาชนะบรรจุแบบต่างๆ เพื่อคำนวณอัตราการลดอุณหภูมิ (freezing rate) ที่เกิดขึ้นในหลอดฟาง

การทดลองในขั้นตอนนี้ทำให้ทราบว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในหลอดฟางด้วยน้ำแข็งแห้งควรใช้อัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่เหมาะสมอย่างไรในการทำให้สเปิร์มยังคงมีคุณภาพสูงหลังการแช่แข็งและการละลาย เนื่องจากการทดลองมีการเลือกใช้ตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับการประสบความสำเร็จของการแช่แข็งในลักษณะ factorial experimental design เพื่อได้ข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อในปริมาณมากขึ้นต่อไป

3.2 การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มหลังการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

ผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.1 ถูกนำมาใช้ในการพัฒนา protocol เพื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ทำการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และสารไครโอโพรเทคแทนท์ DMSO ความเข้มข้น 10% โดยนำหลอดฟางมาหุ้มด้วยวัสดุห่อหุ้มที่ให้ผลการประเมินดีที่สุด (หลอดสายไฟฟ้า) เพื่อทำการลดอุณหภูมิแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้งในกล่องโฟมตามวิธีการที่เหมาะสม โดยภายหลังการกระบวนกรแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวเสร็จสิ้นลง นำเอาวัสดุห่อหุ้มหลอดฟางออกให้เหลือแต่หลอดฟาง ทำการลำเลียงหลอดฟางที่มีน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาไว้ในตู้แช่แข็ง (-80 องศาเซลเซียส)

ทำการประเมินคุณภาพสเปิร์มหลังการละลายภายหลังการเก็บรักษาทุก ๆ 7 วัน จนครบ 28 วัน การละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ได้ทำการละลายโดยใช้อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 20, 15, 10, 8, 5, 4 และ 3 วินาที ตามลำดับ

4. การวิเคราะห์ทางสถิติ

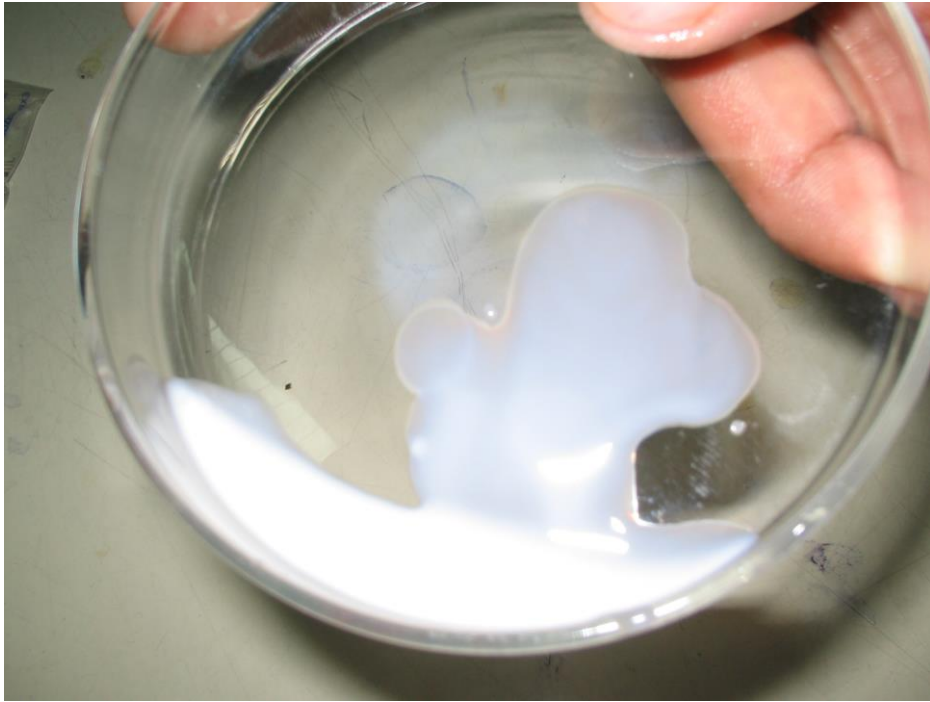
ข้อมูลเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม ระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์ม และอุณหภูมิของน้ำเชื้อหลังการละลาย ในแต่ละชุดการทดลองถูกนำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย \pm standard error และนำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธีการ Analysis of variance (ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในชุดการทดลองด้วย Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสถิติ SPSS



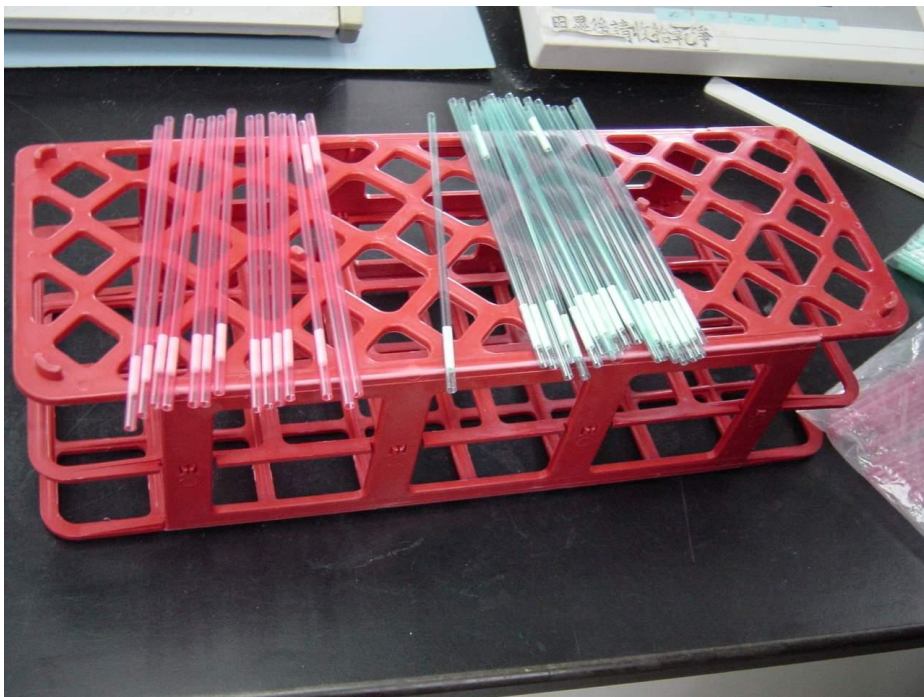
รูปที่ 2 พ่อพันธุ์ปลาทะเพียนขาว



รูปที่ 3 พ่อพันธุ์ปลาทะเพียนขาวก่อนทำการสลับ



รูปที่ 4 การรวบรวมน้ำเชื้อปลาเพื่อใช้ในการทดลอง



รูปที่ 5 หลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่ใช้ในการทดลอง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

การทดลองสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ตอนดังนี้

1. ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง
2. การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มหลังการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

4.1 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ Ca-F HBSS และ DMSO ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10% โดยนำหลอดฟางไปใส่ในอุปรกรณ์ห่อหุ้ม 4 ชนิด คือ สายหลอดซิลิโคน สายออกซิเจน หลอด Centrifuge tube และ หลอดสายไฟฟ้า จากนั้นนำหลอดฟางไปลดอุณหภูมิโดยนำไปใส่ในกล่องโฟมเก็บความเย็น (Styrofoam box) ที่มีน้ำแข็งแห้งบดละเอียด (Crushed dry ice) เป็นเวลานาน 10, 20 และ 30 นาที แล้วนำหลอดฟางมาละลายด้วยการใช้อุณหภูมิละลายที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ในเวลาละลายที่ต่างกัน จากนั้นนำหลอดฟางที่ละลายมาวัดอุณหภูมิอุณหภูมิภายในหลอดน้ำเชื้อ และประเมินคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลายเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมได้ผลการทดลองดังนี้

4.1.1 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งในหลอดฟางที่ไม่ได้ใช้อุปรกรณ์ห่อหุ้ม (Control)

การประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาที่แช่แข็งในชุดควบคุม 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)

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งในหลอดฟางในชุดควบคุม พบว่าระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มเมื่อทำการละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับอุณหภูมิ 10, 60, 70 องศาเซลเซียส แต่ไม่แตกต่างกับอุณหภูมิที่ 20, 40 และ 50 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งนาน 10, 20 และ 30 นาที ไม่มีผลทำให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 2)

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่แช่แข็งในชุดควบคุม พบว่า เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มเมื่อนำมาละลายที่ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับอุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาในการ

แช่แข็งนาน 10, 20 และ 30 นาที ไม่มีผลทำให้การมีชีวิตของสเปิร์มมีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ตารางที่ 3)

การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อที่แช่แข็งในหลอดฟางในชุดควบคุม พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อที่ 50 และ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) 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 0.25 มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาต่างกัน และละลายที่อุณหภูมิต่างๆกัน

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

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 2 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาต่างกัน และละลายที่อุณหภูมิต่างๆกัน

การละลาย น้ำแข็ง	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

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาต่างกัน และละลายที่อุณหภูมิต่างๆกัน

การละลาย น้ำแข็ง	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

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 4 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด ขนาด 0.25 มิลลิลิตร ไม่มีวัสดุห่อหุ้ม (กลุ่มควบคุม) โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

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}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

4.1.2 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน

การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาในน้ำแข็งแห้งโดยมีสายหลอดซิลิโคนเป็นอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดฟางที่บรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งไว้นาน 10, 20 และ 30 นาที ก่อนทำการละลายที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่อุณหภูมิในการละลายที่ 10, 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิที่ 50 และ 60 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามช่วงระยะเวลาในการแช่แข็งที่ 10, 20 และ 30 นาที เปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 5)

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งในหลอดฟาง ที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคนหลังจากการละลายที่อุณหภูมิต่างกัน ที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับการละลายที่ 70 องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็ง 10, 20 และ 30 นาที ไม่มีความแตกต่างต่อระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) (ตารางที่ 6)

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่แช่แข็งในหลอดฟาง ที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน มีความแตกต่างกันจากอุณหภูมิในการละลาย ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด ที่อัตราการละลายที่อุณหภูมิ 20 และ 50 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) กับอุณหภูมิ 10, 30 และ 40 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีผลให้การมีชีวิตของสเปิร์มความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับอุณหภูมิข้างต้น ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อนาน 10 และ 20 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ต่อการมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาเมื่อเปรียบเทียบกับแช่แข็งน้ำเชื้อนาน 30 นาที (ตารางที่ 7)

การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งในหลอดฟาง ที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคนที่อุณหภูมิ 50 และ 70 องศาเซลเซียสมีความแตกต่างกับอุณหภูมิที่ 40 และ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และยังแตกต่างกับอุณหภูมิหลังการละลายที่ 10, 20 และ 30 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับอุณหภูมิที่กล่าวมาในข้างต้น ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็ง 10 และ 30 นาที มีความแตกต่างของอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อที่ระยะเวลาในการแช่แข็ง 20 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 8)

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาว ที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน โดยใช้ น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาท)		
	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

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 6 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายหลอดซิลิโคน โดยใช้ น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่าง ๆ กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาท)		
	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

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 7 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ใช้แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วยสายสายหลอดซิลิโคน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	44±6.57 ^{12,a}	32±4.05 ^{12,a}	33±4.71 ^{12,b}
20°C /15S	42±4.98 ^{1,a}	47±4.33 ^{1,a}	37±2.88 ^{1,b}
30°C /10S	33±7.02 ^{12,a}	46±3.65 ^{12,a}	37±4.58 ^{12,b}
40°C /8S	36±5.65 ^{12,a}	38±4.90 ^{12,a}	29±4.45 ^{12,b}
50°C /5S	50±7.71 ^{1,a}	42±3.46 ^{1,a}	29±5.75 ^{1,b}
60°C /4S	35±5.48 ^{2,a}	40±5.78 ^{2,a}	21±3.39 ^{2,b}
70°C /3S	10±4.22 ^{3,a}	23±1.93 ^{3,a}	11±3.69 ^{3,b}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 8 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางเมื่อหุ้มด้วยสายสายหลอดซิลิโคน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	17±0.12 ^{5,a}	16±0.14 ^{5,b}	17±0.25 ^{5,a}
20°C /15S	20±0.13 ^{4,a}	17±0.04 ^{4,b}	19±0.26 ^{4,a}
30°C /10S	28±0.06 ^{3,a}	29±0.25 ^{3,b}	28±0.28 ^{3,a}
40°C /8S	30±0.40 ^{2,a}	31±0.27 ^{2,b}	31±0.21 ^{2,a}
50°C /5S	31±0.16 ^{1,a}	31±0.18 ^{1,b}	31±0.23 ^{1,a}
70°C /3S	31±0.32 ^{1,a}	31±0.25 ^{1,b}	31±0.35 ^{1,a}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

4.1.3 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจน

การประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจนนาน 10, 20 และ 30 นาที และนำมาละลายที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียสไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) (ตารางที่ 9)

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจนมีความแตกต่างกันเมื่อใช้อุณหภูมิละลายต่างกันการละลาย โดยที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับการละลายที่ 20, 30, 40, 50 และ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งการละลายที่ 20 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิที่ใช้ในการละลายที่ 30, 40 และ 50 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) อุณหภูมิที่ใช้ในการละลายที่ 10, 50 และ 70 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งที่ 10 นาที ไม่มีผลทำให้ระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) กับการแช่แข็งนาน 20 และ 30 นาที แต่เวลาในการแช่แข็งนาน 20 และ 30 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 10)

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจนมีความแตกต่างกันเมื่อละลายที่อุณหภูมิต่างกัน ทำให้เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มอุณหภูมิที่ละลาย 30 องศาเซลเซียส แตกต่างกับการละลายที่อุณหภูมิ 10, 20, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียสอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อุณหภูมิในการละลายที่ 50 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิในการละลายที่ 60 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) อุณหภูมิที่ 50 และ 70 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว 10 นาที มีผลทำให้การมีชีวิตรอดของสเปิร์มแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) กับการแช่แข็งนาน 20 และ 30 นาที (ตารางที่ 11)

การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจนที่ถูกนำไปละลาย แล้วนำมาวัดอุณหภูมิของน้ำเชื้อหลังการละลายพบว่า ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับอุณหภูมิ 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) อุณหภูมิหลังการละลายที่ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกับอุณหภูมิหลังการละลายที่ 70 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่าง ($P>0.05$) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งที่ 10 นาที เมื่อนำมาวัดอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลาย พบว่ามีความแตกต่างกับการแช่แข็งที่ระยะเวลานาน 20 และ 30 นาที อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางเมื่อห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจน โดยใช้ น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	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

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 10 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยสายออกซิเจน โดยใช้ น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	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}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่หุ้มด้วย
สายออกซิเจน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	35±8.50 ^{2,a}	27±4.77 ^{2,b}	40±4.71 ^{2,b}
20°C /15S	64±6.96 ^{2,a}	43±5.62 ^{2,b}	31± 4.78 ^{2,b}
30°C /10S	54±7.19 ^{1,a}	55±3.84 ^{1,b}	44±5.54 ^{1,b}
40°C /8S	52±3.25 ^{2,a}	44±7.21 ^{2,b}	41±4.36 ^{2,b}
50°C /5S	25±5.68 ^{3,4,a}	23±6.05 ^{3,4,b}	12±4.38 ^{3,4,b}
60°C /4S	18±2.71 ^{3,a}	22± 5.65 ^{3,b}	24±2.44 ^{3,b}
70°C /3S	17±3.35 ^{4,a}	13±1.07 ^{4,b}	7±2.89 ^{4,b}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 12 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งใน
หลอดฟางที่หุ้มด้วยสายออกซิเจน โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆ
กันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	16±0.18 ^{6,c}	16±0.12 ^{6,b}	16±0.19 ^{6,a}
20°C /15S	18±0.16 ^{5,c}	19±0.17 ^{5,b}	18±0.15 ^{5,a}
30°C /10S	28±0.20 ^{4,c}	28±0.14 ^{4,b}	29±0.12 ^{4,a}
40°C /8S	30±0.09 ^{3,c}	30±0.05 ^{3,b}	30±0.13 ^{3,a}
50°C /5S	31±0.21 ^{1,c}	31±0.15 ^{1,b}	32±0.15 ^{1,a}
60°C /4S	31±0.10 ^{2,c}	31±0.08 ^{2,b}	31±0.20 ^{2,a}
70°C /3S	30±0.12 ^{2,c}	31±0.22 ^{2,b}	31±0.41 ^{2,a}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

4.1.4 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube

การประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube เป็นอุปกรณ์ห่อหุ้มนาน 10, 20 และ 30 นาที แล้วนำไปละลายที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ที่เวลาที่ต่างกัน พบว่าอุณหภูมิในการละลายส่งผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม โดยการละลายน้ำแข็งที่ 30 องศาเซลเซียส มีผลทำให้มีการเคลื่อนที่ของสเปิร์มต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) 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 มีความแตกต่างกันกับระยะเวลาในการแช่แข็ง 10 นาที ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 13)

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งในหลอดฟาง ที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube พบว่าการละลายที่อุณหภูมิที่ 10 และ 20 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกับระยะเวลาในการเคลื่อนที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) อุณหภูมิที่ 30 และ 60 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างสำหรับเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) อุณหภูมิที่ 50 และ 70 องศาเซลเซียส ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งที่ 10 และ 20 นาที มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับแช่แข็งนาน 30 นาที (ตารางที่ 14)

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube มีความแตกต่างกันเมื่อใช้อุณหภูมิในการละลายต่างกัน เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่ทำการละลายที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) กับอุณหภูมิ 30 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)

การประเมินอุณหภูมิล้างการละลายของน้ำแข็งที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube พบว่ามีความแตกต่างกันที่อุณหภูมิที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างกันทุกอุณหภูมิกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำแข็งในน้ำแข็งแห้งนาน 20 และ 30 นาที มีผลทำให้อุณหภูมิล้างการละลายมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) การแช่แข็งนาน 10 นาที (ตารางที่ 16)

ตารางที่ 13 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	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}

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 โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	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}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)
ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 15 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอด Centrifuge tube โดยใช้ น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกัน ในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาท)		
	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}
70°C /3S	13± 3.56 ^{4,a}	3±1.84 ^{4,A}	1 ±1.11 ^{4,b}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอนแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้งแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 16 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่หลอด Centrifuge tube ห่อหุ้มในแช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร โดยใช้ น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาท)		
	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}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

4.1.5 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า

การประเมินเปอร์เซ็นต์ในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าเป็นอุปกรณ์ห่อหุ้มหลอดฟางนาน 10, 20 และ 30 นาที แล้วนำมาไปละลายที่อุณหภูมิ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อทำการละลายที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 40 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มในน้ำเชื้อแช่แข็งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่การละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิที่ 10, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) กับทุกอุณหภูมิที่กล่าวมาในข้างต้น ส่วนระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อนาน 10, 20 และ 30 นาที มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) (ตารางที่ 17)

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้ามีความแตกต่างกันเมื่อใช้อุณหภูมิละลายต่างกัน โดยการละลายน้ำเชื้อที่ 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)

การประเมินเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าพบว่า เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มที่ละลายที่อุณหภูมิ 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)

การประเมินอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ระยะเวลาในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวนาน 20 และ 30 นาที มีผลทำให้อุณหภูมิน้ำแข็งหลังการละลายมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกั้นการแช่แข็งนาน 10 นาที (ตารางที่ 20)

ตารางที่ 17 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	ระยะเวลาแช่แข็ง (นาที)		
	10	20	30
10°C /20S	60±4.7 ^{2,a}	73±3.33 ^{2,b}	62±4.01 ^{2,c}
20°C /15S	71±3.51 ^{1,a}	76±2.94 ^{1,b}	71±3.51 ^{1,c}
30°C /10S	78±2.22 ^{1,a}	76±2.94 ^{1,b}	78±2.22 ^{1,c}
40°C /8S	73±3.33 ^{1,a}	76±2.94 ^{1,b}	73±3.33 ^{1,c}
50°C /5S	76±2.94 ^{3,a}	76±2.94 ^{3,b}	22±7.03 ^{3,c}
60°C /4S	67±6.67 ^{4,a}	7±3.33 ^{4,b}	0±0.00 ^{4,c}
70°C /3S	9±3.51 ^{5,a}	7±3.33 ^{5,b}	9±3.51 ^{5,c}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 18 ระยะเวลาในเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	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

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

ตารางที่ 19 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

การละลาย น้ำแข็ง	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}
70°C /3S	5±1.92 ^{4,a}	5±2.33 ^{4,b}	6±2.26 ^{4,c}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 20 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางเมื่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้า โดยใช้น้ำแข็งแห้งที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างๆกันในการละลายน้ำเชื้อ

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}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

4.2 การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มหลังการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

การประเมินเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ภายหลังจากแช่แข็งน้ำเชื้อในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่ห่อหุ้มหลอดสายไฟฟ้าภายในกล่องโฟมด้วยน้ำแข็งแห้ง พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อที่ 20 และ 30 องศาเซลเซียส มีความแตกต่างในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) กับอุณหภูมิ 10, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส และเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวหลังการละลายในวันที่ 7 และ 14 มีความแตกต่างจากขณะเริ่มต้นการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) และวันที่ 21 และวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 21)

การประเมินระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่เก็บรักษาแบบแช่แข็งในหลอดฟางขนาด 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 22)

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 23)

การวัดอุณหภูมิหลังการละลายของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว (Post-thawed temperature) ที่บรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร หลังจากการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส พบว่าการใช้อุณหภูมิน้ำหลังการละลายที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส ทำให้มีความแตกต่างกันทางสถิติของอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลายอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) อุณหภูมิในการละลายที่ 60 และ 70 องศาเซลเซียส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) หลังการวัดอุณหภูมิน้ำเชื้อภายในหลอดฟาง ระยะในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวชุดการทดลองของชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) และวันที่ 7 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) การเก็บรักษาน้ำเชื้อวันที่ 21 ไม่มีความแตกต่างของอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลาย เมื่อ

เปรียบเทียบกับ การเก็บรักษาวันที่ 28 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) และการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวชุดการทดลองของ ชั่วโมงการเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0), วันที่ 7, 21 และ 28 มีความแตกต่างกันทางสถิติของอุณหภูมิหลังการละลายอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เปรียบเทียบกับวันที่ 14 (ตารางที่ 24)

ตารางที่ 21 เปอร์เซ็นต์ในเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง
-80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลาย น้ำแข็ง	ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
10°C /20S	51±3.51 ^{3,b}	67±4.71 ^{3,a}	73±3.33 ^{3,a}	64±5.56 ^{3,b}	53±4.71 ^{3,b}
20°C /15S	71±3.51 ^{1,b}	78±2.22 ^{1,a}	71±3.51 ^{1,a}	73±3.33 ^{1,b}	76±2.94 ^{1,b}
30°C /10S	76±2.94 ^{1,b}	78±2.22 ^{1,a}	76±2.94 ^{1,a}	73±3.33 ^{1,b}	80±0.00 ^{1,b}
40°C /8S	73±3.33 ^{2,b}	76±2.94 ^{2,a}	76±2.94 ^{2,a}	56±6.48 ^{2,b}	58±6.19 ^{2,b}
50°C /5S	16±5.56 ^{4,b}	51±3.51 ^{4,a}	69±4.84 ^{4,a}	18±2.22 ^{4,b}	18±5.21 ^{4,b}
60°C /4S	7±3.33 ^{5,b}	38±7.03 ^{5,a}	18±5.21 ^{5,a}	9±3.51 ^{5,b}	4±2.94 ^{5,b}
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}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 22 ระยะเวลาในการเคลื่อนที่ (วินาที) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำเก็บรักษาที่ตู้แช่แข็ง
-80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลาย น้ำแข็ง	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}
50°C /5S	53±18.49 ^{1,c}	107±15.10 ^{1,a}	85±11.32 ^{1,bc}	65±13.32 ^{1,b}	48±13.30 ^{1,bc}
60°C /4S	34±19.10 ^{2,c}	97±13.75 ^{2,a}	63±18.23 ^{2,bc}	52±21.15 ^{2,b}	22±16.19 ^{2,bc}
70°C /3S	11±10.78 ^{2,c}	50±22.03 ^{2,a}	32±13.34 ^{2,bc}	55±17.93 ^{2,b}	68±22.69 ^{2,bc}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 23 เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำการรักษาที่ตู้แช่แข็ง
-80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลาย น้ำแข็ง	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 ^{3,cd}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตารางที่ 24 อุณหภูมิหลังการละลาย (องศาเซลเซียส) ของสเปิร์มปลาตะเพียนขาวที่ทำการรักษาที่
ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส แช่แข็งด้วยหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร

การละลาย น้ำแข็ง	ตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส				
	ชั่วโมงที่ 0	วันที่ 7	วันที่ 14	วันที่ 21	วันที่ 28
10°C /20S	14.8±0.23 ^{6,a}	15.1±0.29 ^{6,a}	14.0±0.22 ^{6,c}	13.2±0.15 ^{6,b}	13.9±0.24 ^{6,b}
20°C /15S	18.3±0.24 ^{5,a}	17.2±0.20 ^{5,a}	16.0±0.35 ^{5,c}	15.9±0.15 ^{5,b}	17.1±0.17 ^{5,b}
30°C /10S	25.4±0.29 ^{4,a}	25.2±0.24 ^{4,a}	24.7±0.56 ^{4,c}	25.8±0.28 ^{4,b}	25.6±0.08 ^{4,b}
40°C /8S	29.1±0.26 ^{3,a}	27.6±0.26 ^{3,a}	27.2±0.43 ^{3,c}	29.3±0.16 ^{3,b}	29.1±0.22 ^{3,b}
50°C /5S	30.5±0.26 ^{2,a}	31.3±0.20 ^{2,a}	29.4±0.25 ^{2,c}	30.8±0.19 ^{2,b}	30.2±0.26 ^{2,b}
60°C /4S	30.8±0.16 ^{1,a}	32.1±0.25 ^{1,a}	31.0±0.23 ^{1,c}	30.9±0.21 ^{1,b}	30.8±0.19 ^{1,b}
70°C /3S	31.4±0.33 ^{1,a}	31.9±0.28 ^{1,a}	31.7±0.31 ^{1,c}	30.9±0.19 ^{1,b}	30.7±0.19 ^{1,b}

ตัวอักษร Superscript ที่เหมือนกันตามแนวนอน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

ตัวเลข Superscript ที่เหมือนกันตามแนวตั้ง แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

5.1 ผลของอัตราการลดอุณหภูมิ และอัตราการละลายที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มปลาที่ผ่านการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

ผลการศึกษาการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรด้วยการใช้ Ca-F HBSS ร่วมกับ DMSO มีความเป็นไปได้ในการนำมาพัฒนาเทคโนโลยีที่เหมาะสมต่อไปเพื่อการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งเป็นแหล่งความเย็นในการแช่แข็งน้ำเชื้อ จำเป็นต้องมีการควบคุมอัตราการลดอุณหภูมิ (cooling rate) แช่แข็งน้ำเชื้อให้มีความเหมาะสม เนื่องจากน้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดฟางที่บอบบางเมื่อนำไปใส่น้ำแข็งแห้งที่มีอุณหภูมิคงที่ -79 องศาเซลเซียส จะทำให้อุณหภูมิของน้ำเชื้อที่อยู่ในหลอดฟางลดลงอย่างรวดเร็ว ทำให้น้ำเชื้อแข็งตัวรวดเร็วเกินไป เนื่องจากการลดอุณหภูมิแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง ไม่สามารถปรับลดอุณหภูมิขณะแช่แข็งได้มีประสิทธิภาพเช่นเดียวกับการแช่แข็งด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิตัดโนมิติ (controlled-rated programmable freezer) ที่สามารถปรับเลือกใช้อัตราการลดอุณหภูมิได้ตามต้องการในการแช่แข็ง หรือการแช่แข็งด้วยไนโตรเจนเหลวที่ยังสามารถใช้ความสูงเหนือผิวหน้าไนโตรเจนเหลวในการแช่แข็งเป็นตัวปรับให้มีการลดอุณหภูมิต่างเหมาะสมตามต้องการ (Ashwood-Smith, 1980; Draper and Moens, 2009; Sahinoz et al., 2018) ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้มีการพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการนำวัสดุห่อหุ้มชนิดต่างๆ เพื่อมาทำหน้าที่เสมือนเป็นฉนวนในการลดอุณหภูมิ เพื่อทราบชนิดของวัสดุห่อหุ้มที่เหมาะสมที่สามารถลดอุณหภูมิต่างน้ำเชื้อปลาให้มีความเหมาะสมด้วยการใช้น้ำแข็งแห้ง เพื่อให้ได้น้ำเชื้อแช่แข็งคุณภาพดีหลังการละลาย ไม่แตกต่างกับน้ำเชื้อสด

การพัฒนาวิธีการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยนำน้ำเชื้อมาเจือจางด้วย Ca-F HBSS ที่มี 10% DMSO แล้วลดอุณหภูมิต่างน้ำเชื้อที่บรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรในชุดทดลองต่างๆ (treated groups) ที่ใช้วัสดุห่อหุ้มหลอดฟาง 4 รูปแบบได้แก่ สายหลอดซิลิโคน สายออกซิเจน หลอด Centrifuge tube และหลอดสายไฟฟ้า แล้วทำการแช่แข็งน้ำเชื้อทุกชุดการทดลองในน้ำแข็งแห้งบดละเอียดนาน 10, 20 และ 30 นาทีจึงนำวัสดุห่อหุ้มออก แล้วนำหลอดฟางไปแช่ในไนโตรเจนเหลว แล้วนำหลอดฟางมาละลายใน Water bath ที่อุณหภูมิน้ำแตกต่างกัน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่แช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้งโดยไม่ห่อหุ้มหลอดฟาง (control group) พบว่าชุดการทดลองที่แช่แข็งน้ำเชื้อด้วยการใช้หลอดสายไฟฟ้าห่อหุ้มหลอดฟาง ให้คุณภาพสเปิร์มหลังการละลายดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับอีก 3 ชุดการทดลองที่ใช้สายหลอดซิลิโคน สายออกซิเจน หรือหลอด Centrifuge tube โดยน้ำเชื้อแช่แข็งในชุดการทดลองที่ใช้หลอดสายไฟฟ้าห่อหุ้มหลอดฟางที่แช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้ง 10 นาทีและละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 3) มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายสูง ($78 \pm 2.2\%$) ไม่แตกต่างกับชุดควบคุม (แช่แข็งน้ำเชื้อในน้ำแข็งแห้งโดยไม่ห่อหุ้มหลอดฟาง) ที่มีค่าประมาณ ($86.7 \pm 6.7\%$) แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยน้ำแข็งแห้งให้มีคุณภาพดี ควรนำน้ำเชื้อที่เจือจางมาบรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่หุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าก่อนเริ่มทำการลดอุณหภูมิต่างน้ำแข็งแห้ง อย่างไรก็ตามสาเหตุที่ทำให้การแช่แข็งน้ำเชื้อด้วยน้ำแข็งแห้งได้ผลดีเมื่อนำหลอดฟางมาหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าก่อนการ

แช่แช็ง อาจมีความเกี่ยวข้องกับหลอดสายไฟฟ้าที่ได้ผลิตมาจาก PVC (Polyvinyl chloride) ที่มีความหนา 0.14 เซนติเมตร สายไฟมีค่าการนำความร้อน 0.19 W/m K (The Engineering Tool Box, 2016) ซึ่งเมื่อใช้ Thermocouple-probe thermometer type K วัดการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าขณะแช่แช็งในน้ำแช่แช็งแห่งนี้ก็สามารถคำนวณอัตราการลดอุณหภูมิขณะแช่แช็ง (Cooling rate) ได้ที่อัตราการลดอุณหภูมิ -31.8 องศาเซลเซียส/นาที่ ผลการทดลองนี้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Yasui et al. (2008) ที่นำหลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร มาเป็นวัสดุห่อหุ้มหลอดฟางขนาด 250 ไมโครลิตรเพื่อแช่แช็งน้ำเชื้อปลา loach (*M. anguillicaudatus*) โดยนำมาลดอุณหภูมิในน้ำแช่แช็งแห่งนี้ ซึ่งสามารถลดอุณหภูมิได้ในอัตรา -33.3±2.09 องศาเซลเซียส/นาที่ โดยมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มปลา loach มีค่าใกล้เคียงกันกับการเคลื่อนที่สเปิร์มปลาตะเพียนขาวในการทดลองนี้ นอกจากนี้ผลการศึกษาการแช่แช็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้น้ำแช่แช็งแห่งนี้แหล่งความเย็นในการลดอุณหภูมิซึ่งนอกจากสามารถใช้ในการแช่แช็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวให้มีคุณภาพดีหลังการละลาย ยังมีประสิทธิภาพในการแช่แช็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวได้ดีเช่นเดียวกับการแช่แช็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยการใช้เครื่องมือลดอุณหภูมิจากอัตโนมัติ (Boonthai et al., 2016c) หรือด้วยการใช้วิธีการลดอุณหภูมิด้วยไอไนโตรเจนเหลว (ปฏิญญา อ้นขวัญเมืองและคณะ, 2551) ที่ทำให้น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แช็งยังคงมีคุณภาพดีหลังการละลาย

การศึกษามูลของการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 7 ระดับ (10, 20, 30, 40, 50, 60 และ 70 องศาเซลเซียส) ที่มีต่อคุณภาพน้ำเชื้อหลังการละลาย พบว่าการละลายน้ำเชื้อที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส ทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มและระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มมีค่าลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิอื่น ๆ ที่ใช้ในการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว โดยทั่วไปการละลายน้ำเชื้อแช่แช็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร เมื่อมีการใช้อุณหภูมิในการละลายที่ 70 องศาเซลเซียส สามารถประสบความสำเร็จในปลาหลายชนิดเช่น ปลาไน (*Cyprinus carpio*; Irawan et al., 2010) ปลากระพงแดง (*Lutjanus argentimaculatus*; Vuthiphandchai et al., 2009a) เป็นต้น แต่ในการทดลองครั้งนี้กลับได้ผลไม่ดีเมื่อละลายน้ำเชื้อปลาที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในทุกชุดการทดลองที่ห่อหุ้มหลอดฟางด้วยหลอดสายไฟฟ้า สายหลอดซิลิโคน สายออกซิเจน หรือหลอด Centrifuge tube แต่ได้ผลดีเมื่อละลายที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส ซึ่งการละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แช็งในหลอดฟางที่ห่อหุ้มด้วยหลอดสายไฟฟ้าเมื่อนำมาละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที ทำให้สเปิร์มมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่สูงหลังการละลาย สาเหตุที่ทำให้การละลายน้ำเชื้อแช่แช็งที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสในการศึกษาครั้งนี้ทำให้สเปิร์มเคลื่อนที่ต่ำ อาจมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณการบรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ถูกเจือจางลงในหลอดฟาง เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้มีการบรรจุน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ถูกเจือจางลงไปเพียง 0.08 มิลลิลิตร ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นการใช้น้ำเชื้อในปริมาณน้อยเมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่มักจะใส่น้ำเชื้อปริมาณมากถึง 0.20 มิลลิลิตร ในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้เมื่อมีการใช้อุณหภูมิละลายน้ำเชื้อที่สูงกับน้ำเชื้อที่มีปริมาณน้อยจึงอาจส่งผลทำให้อุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลายภายในหลอดฟางมีค่าสูงขึ้นอย่างรวดเร็วหลังการละลาย ทำให้เซลล์สเปิร์มที่อยู่ภายในหลอดฟางได้รับความเสียหายจากความร้อนที่เพิ่มขึ้น ส่งผลให้คุณภาพน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวหลังการละลายในชุดการทดลองที่ใช้อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง ดังนั้นการละลาย

น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรหากมีการบรรจุน้ำเชื้อในปริมาณน้อยกว่า 0.80 มิลลิลิตร จึงควรใช้อุณหภูมิในการละลายที่ต่ำลง เช่น ใช้อุณหภูมิในการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งระหว่าง 10-60 องศาเซลเซียส เช่นในการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลา loach (*M. anguillicaudatus*) ได้นำน้ำเชื้อปลา loach ที่แช่แข็งมาละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที (Yasui et al. 2008) หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา Sturgeon เมื่อใช้หลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร ควรใช้อุณหภูมิเพื่อการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 8 วินาที (Yamaner et al., 2015) หรือการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาช่อนทะเลในหลอดฟาง 0.25 มิลลิลิตรซึ่งได้บรรจุน้ำเชื้อปลาช่อนทะเลลงไป 0.23 มิลลิลิตรควรใช้อุณหภูมิสำหรับการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที (นิพนธ์ เสนอินทร์ และคณะ 2555) และยังสอดคล้องกับการการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของปลากระรังหงส์ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 8 วินาที (เรณู ยาชิโร และนิพนธ์ เสนอินทร์ 2551)

5.2 การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่มีต่อคุณภาพของสเปิร์มหลังการแช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน เมื่อนำหลอดฟางมาทำการละลายที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายมีค่าสูงถึง 80 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดเฉลี่ยเท่ากับ 74 ± 4.14 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่าการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวภายในกล่องโฟมด้วยการใช้น้ำแข็งแห้งโดยการนำหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรมาห่อหุ้มหลอดสายไฟฟ้าเพื่อเป็นฉนวนแล้วนำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในหลอดฟางให้ยังคงมีคุณภาพดีอยู่ได้ 28 วัน ซึ่งการรักษาคุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งให้คงที่ได้ในระยะเวลา 28 วันยังเป็นประโยชน์ต่อการประยุกต์ใช้ในภาคการผลิต เพราะโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ไม่มีถังไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen tank) สำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็ง ก็สามารถใช้น้ำแข็งแห้งสำหรับเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งให้ยังคงมีคุณภาพดีอยู่ได้ 28 วัน เป็นประโยชน์ต่อการบริหารจัดการฟาร์มระหว่างการเพาะพันธุ์ปลาด้วยการใช้น้ำเชื้อแช่แข็งที่ได้พัฒนาวิธีการแช่แข็งและการเก็บรักษาด้วยเทคโนโลยีที่ทำได้ง่ายและไม่สลับซับซ้อน

การเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสอาจไม่สามารถหยุดยั้งกิจกรรมภายในเซลล์ (metabolism) ของเซลล์ที่ถูกแช่แข็งได้ ซึ่งการเก็บรักษาเซลล์แช่แข็งที่อุณหภูมิต่ำกว่า -130 องศาเซลเซียส จึงจะสามารถหยุดยั้งกิจกรรมภายในเซลล์ เพราะเซลล์จะไม่มีกระบวนการเปลี่ยนแปลงใดๆภายในเซลล์ (Germann et al., 2013) ดังนั้นถ้านำน้ำเชื้อแช่แข็งไปเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิต่ำมากที่สุดที่ -196 องศาเซลเซียส จะมีผลทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงใดๆระดับเซลล์ขณะอยู่ในไนโตรเจนเหลว จึงมีผลทำให้น้ำเชื้อแช่แข็งที่นำมาเก็บรักษาในถังไนโตรเจนเหลว จะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานเป็นปี ดังนั้นการพัฒนาเทคนิคการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งด้วยการเก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จึงควรศึกษาเพิ่มเติมว่าน้ำเชื้อปลาแช่แข็งที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็งที่มีอุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจะสามารถเก็บรักษาได้นานที่สุดเป็นระยะเวลานานเท่าใดก่อนที่คุณภาพน้ำเชื้อแช่แข็งจะลดต่ำลง

การละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวแช่แข็งภายในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรด้วยน้ำที่มีอุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส ทำให้ค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลายอยู่ระหว่าง 13-30

องศาเซลเซียส แต่เมื่อใช้อุณหภูมิละลายที่ 50-70 องศาเซลเซียส ทำให้ค่าเฉลี่ยอุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลายสูงขึ้นเป็น 31-32 องศาเซลเซียส ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลายที่อุณหภูมิ 50-70 องศาเซลเซียสมีค่าลดลง เพราะอุณหภูมิในตัวปลาจะอยู่ในระดับใกล้เคียงกันอุณหภูมิของน้ำ อันเนื่องจากปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น ดังนั้นการละลายน้ำเชื้อปลาที่แช่แข็งจึงต้องทำให้อุณหภูมิน้ำเชื้อหลังการละลายมีค่าใกล้เคียงหรือต่ำกว่าตัวปลา เพื่อให้สเปิร์มยังคงมีชีวิต เพราะถ้าอุณหภูมิน้ำเชื้อสูงเกินไปหลังจากการละลาย จะทำให้สเปิร์มตายมากขึ้น ประกอบกับการศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำเชื้อเพียง 0.08 มิลลิลิตร เพื่อแช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อน้ำเชื้อแช่แข็งมีปริมาณน้อยแตเมื่อนำมาละลายที่อุณหภูมิสูง จึงมีผลทำให้การเคลื่อนที่ของสเปิร์มลดลง ในทางตรงกันข้ามการทดลองแช่แข็งน้ำเชื้อปลาไน (*Cyprinus carpio*) ของ Irawan et al. (2010) ที่ได้บรรจุน้ำเชื้อปลาไนลงไป 200 ไมโครลิตร ในหลอดฟาง 0.25 มิลลิลิตรเพื่อแช่แข็ง แต่เมื่อนำน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งมาทำการละลายที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส 5 วินาทีปรากฏว่า สเปิร์มปลาไนหลังการละลายยังมีการเคลื่อนที่สูงมากประมาณ 80% ดังนั้นการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณน้ำเชื้อที่แช่แข็ง และอุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อให้ได้น้ำเชื้อแช่แข็งคุณภาพดี ควรได้มีการศึกษาเพิ่มเติมในรายละเอียดต่อไป ผลการศึกษาในครั้งนี้จึงแสดงให้เห็นว่าการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งของปลาตะเพียนขาวในปริมาณน้อย (0.08 มิลลิลิตร) ที่อยู่ในหลอดฟาง (0.25 มิลลิลิตร) ควรใช้อุณหภูมิละลายที่เหมาะสมตั้งแต่ 10-40 องศาเซลเซียส จึงจะทำให้สเปิร์มแช่แข็งยังคงมีคุณภาพดีอยู่เมื่อนำมาประเมินการเคลื่อนที่ เช่นเดียวกับการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) ที่ถูกนำมาทำการละลายที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นาน 10 วินาที (Yasui et al., 2008) หรือน้ำเชื้อปลา Sturgeon ที่แช่แข็งในหลอดฟางขนาด 0.5 มิลลิลิตร แต่ถูกนำมาละลายที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นาน 8 วินาที (Yamaner et al., 2015)

สรุปผลการทดลอง

1. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวด้วยน้ำแข็งแห้ง ควรทำโดยนำน้ำเชื้อสดมาเจือจางในสารละลาย Ca-F HBSS ที่มี DMSO ความเข้มข้นสุดท้าย 10% แล้วบรรจุในหลอดฟางขนาด 0.25 มิลลิลิตรที่ใช้หลอดสายไฟฟ้าหุ้มก่อนการแช่แข็งในน้ำแข็งแห้งบดละเอียด
2. ระยะเวลาการแช่แข็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในน้ำแข็งแห้งบดละเอียดระหว่าง 10-30 นาที ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย
3. อุณหภูมิที่ใช้ละลายน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว 10-40 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่และระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์มหลังการละลาย
4. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่แช่แข็งด้วยน้ำแข็งแห้งไว้ในตู้แช่แข็ง -80 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน ยังคงมีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของสเปิร์ม และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของสเปิร์มอยู่ในเกณฑ์ที่สูง

เอกสารอ้างอิง

- เกรียงศักดิ์ เม่งอำพัน. 2545. การเก็บน้ำเชื้อปลาแช่แข็ง. วารสารการประมง. 55(1). หน้า 65-69.
- กฤษณ์ มงคลปัญญา และนิศา ไชยรักษ์. 2539. สารโคริโอโพรเทคแทนท์กับความเป็นพิษต่ออสุจิปลา
ตุกอย. วารสารประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 34 หน้า 339-345.
- ปฎิญา อันขวัญเมือง, สุภัณฑิต นิมรัตน์ และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2551. การแช่แข็งน้ำเชื้อปลา
ตะเพียนขาว (*Barbodes gonionotus*) อย่างง่าย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย
เกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46 สาขาประมง หน้า 236-242.
- นวลมณี พงศ์ธนา และ ทองอยู่ อุดเลิศ. 2547. การปรับปรุงพันธุ์ปลาตะเพียนขาว ศูนย์วิจัยและ
ทดสอบ พันธุ์สัตว์น้ำปทุมธานี.
- นิพนธ์ เสนอินทร์, อีรวัดน์ จริตงาม และเรณู ยาชีโร. 2555. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาช่อนทะเล,
Rachycentron canadum (Linnaeus, 1766) โดยวิธีการแช่แข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่
35/2555. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง
- เรณู ยาชีโร และนิพนธ์ เสนอินทร์. 2551. การเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระรังหงส์, *Cromileptes
altivelis* (Valenciennes, 1828) โดยวิธีแช่แข็ง. เอกสารวิชาการฉบับที่ 50/2551. ศูนย์วิจัย
และพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง.
- เสน่ห์ ผลประสิทธิ์, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล และ กฤษณ์ มงคลปัญญา. 2536. การเพาะขยายพันธุ์
ปลาบึก. วารสารการประมง 46(5) : 399-415
- วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2535. การเพาะพันธุ์ปลา. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 194 หน้า.
- Ashwood-Smith M.J. 1980. Low temperature preservation of cells, tissues and organs.
In: Low Temperature Preservation in Medicine and Biology (ed. by M.J.
Ashwood-Smith & J. Farrant), pp.19-44. Pitman Medical, Tunbridge Wells, UK.
- Basavaraja, N. and Hegde, S.N. 2004. Cryopreservation of the endangered mahseer
(*Tor khudree*) spermatozoa: I. Effect of extender composition,
cryoprotectants, dilution ratio, and storage period on post-thaw viability.
Cryobiology 49: 149-156.
- Bobe, J. and Labbe, C. 2010. Egg and sperm quality in fish. General and Comparative
Endocrinology 165: 535-548.
- Alavi, S. M. H., Rodina, M., Policar, T., Kozak, P., Psenicka, M. and Linhart, O., 2007.
Semen of *Perca fluviatilis* L.: Sperm volume and density, seminal plasma
indices and effects of dilution ratio, ions and osmolality on sperm motility.
Theriogenology 68: 276-283.
- Ashwood-Smith M. J. 1980. Low temperature preservation of cells, tissues and
organs. In: Low Temperature Preservation in Medicine and Biology. edited by
M. J. Ashwood-Smith and J. Farrant. Pitman Medical, Tunbridge Wells. pp.19-
44.
- Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2016a.
Effect of antibiotic supplementation on the quality of cryopreserved fish

- sperm of silver barb (*Barbodes gonionotus*): Sperm motility and viability, bacterial quality and fertilization. *Animal Reproduction Science* 166: 36-46.
- Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Nimrat, S. and Vuthiphandchai, V. 2016b. Morphological and morphometric evaluation of silver barb, *Barbodes gonionotus* (Bleeker, 1849) sperm supplemented with antibiotics. *Journal of Applied Ichthyology* 32: 480-485.
- Boonthai, T., Khaopong, W., Sangsong, J., Sooksawat, T., Vuthiphandchai, V. and Nimrat, S. 2016c. Evaluation of the potential source of bacterial contamination during cryopreservation process of silver barb (*Barbodes gonionotus*) sperm. *Aquaculture Research* 47: 2101-2113.
- Bozkurt, Y. and Yavas, I. 2017. Effect of different straw volumes and thawing rates on post-thaw quality and fertilization ability of cryopreserved common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *LIMNOFISH-Journal of Limnology and Freshwater Fisheries Research* 3(1): 25-31.
- Büyükhathipoglu, S. and Holtz, W. 1984. Sperm output in rainbow trout (*Salmo gairdneri*)-Effect of age, timing and frequency of stripping and presence of females. *Aquaculture* 37: 63-71.
- Conget, P., Fernandez, M., Herrera, G. and Minguell, J.J. 1996. Cryopreservation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa using programmable freezing. *Aquaculture* 143: 319-329.
- Draper, B.W. and Moens, C.B. 2009. A High-throughput method for zebrafish sperm cryopreservation and in vitro fertilization. *JoVE*. 29. <http://www.jove.com/index/Details.stp?ID=1395>, doi: 10.3791/1395.
- Fribourgh, J.H. 1966. The application of a differential staining method to low-temperature studies on goldfish spermatozoa. *Progressive Fish Culturist* 28: 227-230.
- Germann, A., Oh, Y.-J., Schmidt, T., Schon, U. and Zimmerman, H. 2013. Temperature fluctuations during deep temperature cryopreservation reduce PBMC recovery, viability and T-cell function. *Cryobiology* 67: 193-200.
- Glogowski, J., Kolman, R., Szezepkowski, M., Horvath, A., Urbanyi, B., Sieczynski, P., Rzemieniecki, A., Domagala, J., Demianowicz, W., Kowalski, R., and Ciereszko, A. 2002. Fertilization rate of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*, Brandt) milt cryopreserved with methanol. *Aquaculture* 211: 367-373.
- Gwo, J.H., Strawn, K., Longnecker, M.T. and Arnold, C.R. 1991. Cryopreservation of Atlantic croaker spermatozoa. *Aquaculture* 94: 355-375.
- Horváth, A. and Urbanyi, B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved of African catfish sperm, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). *Aquaculture Research* 31: 317-324.

- Horváth, A., Urbanyi, B., Wang, C., Onders, R.J. and Mims, S. D. 2010. Cryopreservation of paddlefish sperm in 5-mL straws. *Journal of Applied Ichthyology* 26: 715-719.
- Irawan H., Vuthiphandchai, V. and Nimrat, S. 2010. The effect of extenders, cryoprotectants and cryopreservation methods on common carp (*Cyprinus carpio*) sperm. *Animal Reproduction science* 122: 236-243.
- Jamieson, B. G. M. 1991. *Fish Evolution and Systematics: Evidence from Spermatozoa. With a survey of lophophorate, echinoderm and protochordate sperm and an account of gamete cryopreservation.* Cambridge University Press, Cambridge. Xiv. 319 pp. ISBN 0-521-41304-4.
- Ji, X.S., Chen, S.L., Tian, Y.S., Yu, G.C., Sha, Z.X., Xu, M.Y. and Zhang, S.C. 2004. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. *Aquaculture* 241: 517-528.
- Kamaruding, N.A., Embong, W.K.W. and Abdullan, R.B. 2012. Frozen-thawed Sperm Motility Characteristics of African catfish (*Clarias gariepinus*) by using glycerol or DMSO based extender. *International Journal of Environmental Science and Development* 3(1): 49-55.
- Martínez-Páramo, S., Horváth, A., Labbe, C., Zhang, T., Robles, V., Herráez, P., Suquet, M., Ada, S., Viveiros, A., Tiersch, T.R. and Cabrita, E. 2017. Cryobanking of aquatic species. *Aquaculture* 472: 156-177.
- Mansour, N., Richardson, G.F. and McNiven, M.A. 2006. Effect of extender composition and freezing rate on post-thaw motility and fertility of Arctic char, *Salvelinus alpinus* (L.), spermatozoa. *Aquaculture Research* 37: 862-868.
- Mongkonpunya, K., Chairak, N., Pupipat, T. and Tiersch, T.R. 1995. Cryopreservation of Mekong giant catfish sperm. *Asian Fisheries Science* 8: 211-221.
- Muchlisin, Z.A., Hashim, R. and Chong, A.S.C. 2004. Preliminary study on the cryopreservation of tropical bagrid catfish (*Mystus nemurus*) spermatozoa; the effect of extender and cryoprotectant on the motility after short-term storage. *Theriogenology* 62: 25-34.
- Mylonas, C.C., Gisis, A., Magnus, Y. and Zohar, Y., 1997. Hormonal changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evaluation of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. *Aquaculture* 153: 301-313.
- Rana, K.J. and McAndrew, B.J. 1989. The viability of cryopreserved tilapia spermatozoa. *Aquaculture* 76: 335-345.
- Richardson, G. F., Connie, E. W., Laurence, W. C. and Yao, Z. 1999. Cryopresevation of yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*) semen in large straws. *Aquaculture* 174: 89-94.

- Rideout, R.M., Litvak, M.K. and Trippel, E.A. 2003. The development of a sperm cryopreservation protocol for winter flounder *Pseudopleuronectes americanus* (Walbaum): evaluation of cryoprotectants and diluents. *Aquaculture Research* 34: 653-659.
- Sahinoz, E., Dogu, Z. and Aral, F. 2018. The Development of optimal cryopreservation media for longspine scraper (*Capoeta trutta*) sperm. *Turkish Journal of Agriculture - Food Science and Technology* 6(3): 380-386.
- Sansone, G., Fabbrocini, A., Ieropoli, S., Langellotti, A.L., Occidente, M. and Matassino, D. 2002. Effects of extender composition, cooling rate, and freezing on the motility of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) spermatozoa after thawing. *Cryobiology* 44: 229-239.
- Scott, A.P. and Baynes, S.M. 1980. A review of the biology, handling and storage of salmonid spermatozoa. *Journal of Fish Biology* 17: 707-739.
- Seidel, G. E. 1984. Principles of cryopreservation of mammalian embryos. In: Proceeding no. 70: Bovine embryo transfer workshop. The University of Sydney, Sydney, Australia, 107-114.
- The Engineering Tool Box. 2016. Plastics-Thermal Conductivity Coefficients. เขมูถึงได้ จาก http://www.engineeringtoolbox.com/thermalconductivity-plastics-d_1786.html วันที่ค้นข้อมูล 7 พฤศจิกายน 2559
- Vuthiphandchai, V. and Zohar, Y. 1999. Age-related sperm quality of captive striped bass, *Morone saxatilis*. *Journal of the World Aquaculture Society*. 30: 65-72.
- Vuthiphandchai, V., Chomphuthawach, S. and Nimrat, S. 2009a. Cryopreservation of red snapper (*Lutjanus argentimaculatus*) sperm: effect of cryoprotectants and cooling rates on sperm motility, sperm viability and fertilization capacity. *Theriogenology* 72: 129-138.
- Vuthiphandchai, V., Thadsri, I. and Nimrat, S. 2009b. Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. *Aquaculture* 296: 58-64.
- Vuthiphandchai, V., Wilairattanadilok, K., Chomphuthawach, S., Sooksawat, T. and Nimrat, S. 2015. Sperm cryopreservation of silver barb (*Barbodes gonionotus*): cryoprotectants, cooling rate and storage time on sperm quality. *Aquaculture Research* 46: 2443-2451.
- Yamaner, G., Ekici, A., Tuncelli, G. and Memis, D. 2015. A brief overview on cryopreservation method of sturgeon sperm. *Journal of fisheries and aquatic sciences* 30(2): 14-20.
- Yasui, G.S., Arias-Rodriguez, L., Fujimoto, T. and Arai, K. 2008. Simple and inexpensive method for cryopreservation of fish sperm combining straw and powdered dry ice. *CryoLetters* 29 (5): 383-390.

- Yavas, I. and Bozkurt, Y. 2011. Effect of different thawing rates on motility and fertilizing capacity of cryopreserved grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) sperm. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. doi: 10.5504/BBEQ.2011.0018.
- Zhang, Y.Z., Zhang, S.C., Liu, X.Z., Xu, Y.Y., Wang, C.L., Sawant, M.S., Li, J. and Chen, S.L.2003. Cryopreservation of flounder (*Paralichthys olivaceus*) sperm with a practical methodology. *Theriogenology* 60(5): 989-996.

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่และหน้า)

1. อมรรัตน์ กิระวานิชย์, สุกันติต นิมรัตน์ และ วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2560. การพัฒนาเทคนิคแช่แช็งน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในหลอดฟางด้วยน้ำแช็งแช็ง. การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาครั้งที่ 2. มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม. หน้า 607-612.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

-