การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลากระเบนน้ำจืด
สายพันธุ์โมโตโร่ (*Potamotrygon motoro*)

นางสาวนิธิวดี เกษจำรัส

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย
The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2557
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EVALUATION AND PRESERVATION OF THE OCELLATE RIVER STINGRAY (*Potamotrygon motoro*) SEMEN

Miss Nitiwadee Keschumras

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Medicine
Department of Veterinary Medicine
Faculty of Veterinary Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2014

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ (*Potamotrygon motoro*)
โดย	นางสาวนิธิวดี เกษจำรัส
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันซื่อ

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.สมศักดิ์ ภัคภิญโญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นันทริกา ชันซื่อ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วีณา เคยพุดซา)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เจนจิต คูดำรงสวัสดิ์)

นิธิวดี เกษจำรัส : การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ (***Potamotrygon motoro***) (EVALUATION AND PRESERVATION OF THE OCELLATE RIVER STINGRAY (***Potamotrygon motoro***) SEMEN) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. สพ.ญ. ดร.นันทริกา ชันซื่อ, 89 หน้า.

ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ (***Potamotrygon motoro)*** จัดเป็นปลาเศรษฐกิจสวยงามชนิดหนึ่งของประเทศไทย แต่ยังขาดข้อมูลพื้นฐานด้านการวิจัยโดยเฉพาะเรื่องเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาวิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อในปลากระเบน และศึกษาลักษณะรูปร่างทางกายภาพของตัวอสุจิปลากระเบนชนิดนี้ มีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด รวมไปถึงการหาสูตรที่เหมาะสมของสารเจือจางน้ำเชื้อ อัตราส่วนของสารเจือจางน้ำเชื้อกับน้ำเชื้อต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนแบบแช่เย็น ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัวที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนแบบแช่แข็ง เพื่อประโยชน์ในการใช้น้ำเชื้อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด สามารถนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมต่อไปในอนาคตได้ การทดลองนี้ได้ทำการเก็บน้ำเชื้อจากปลากระเบนน้ำจืดเพศผู้สายพันธุ์โมโตโร่จำนวน 10 ตัว ด้วยวิธีบีบรีดจากบริเวณท้องโดยปราศจากการวางยาสลบ เพื่อนำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสดและศึกษารูปร่างของตัวอสุจิ จากนั้นทำการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่เย็นและแช่แข็ง โดยสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Calcium-Free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS), Normal Saline Solution (NSS) และ Modified Fish Ringer's Solution (MFR) และสารป้องกันการแข็งตัวที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ 5% Glycerol, 10% Glycerol, 5% (Dimethyl sulfoxide) DMSO และ 10% DMSO ผลจากการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อสดพบว่ามีสีขาวเข้ม ความหนืดคล้ายครีม ปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดได้ในแต่ละครั้ง 0.53±0.15 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 7.3±0.26 ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 2.28±0.46 $x10^9$ ตัวต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ 98.5±2.42% เปอร์เซ็นต์ของอสุจิอัดแน่น 15.4±2.88% และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิ 89.8±3.36% ขนาดความยาวของตัวอสุจิจากหัวถึงหาง 116.34±1.92 ไมโครเมตร มีลักษณะหัวเรียวยาวแหลมบิดเป็นเกลียว หางเป็นเกลียวน้อยกว่า จึงทำให้มีการว่ายแบบลักษณะหมุนควง น้ำเชื้อสดตัวอสุจิสามารถมีชีวิตอยู่ได้ 6 วัน เมื่อนำมาใส่สารเจือจางน้ำเชื้อแล้วทำการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำเชื้อผสม Ca-F HBSS ในอัตราส่วน 1:1 มีประสิทธิภาพดีที่สุด สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ 11 วัน จึงเลือกมาใช้ในกระบวนการแช่แข็งต่อไป จากนั้นศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์ เมื่อนำมาละลายและตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ พบว่าสารป้องกันการแข็งตัวที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ 5% Glycerol ซึ่งมีความแตกต่างจากกลุ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ 42.0±3.50% และมีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิ 42.9±2.85%

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ปีการศึกษา 2557

5475312031 : MAJOR VETERINARY MEDICINE
KEYWORDS: CRYOPROTECTANT / EXTENDER / FRESWEATER STINGRAY / SEMEN / SPERM

NITIWADEE KESCHUMRAS: EVALUATION AND PRESERVATION OF THE OCELLATE RIVER STINGRAY (***Potamotrygon motoro***) SEMEN. ADVISOR: ASSOC. PROF. NANTARIKA CHANSUE, Ph.D., 89 pp.

Ocellate river stingray (***Potamotrygon motoro***) is one of the ornamental fish trade in Thailand. There is no data about reproductive system. The aims of this study were to: 1) develop a method of semen collection in this species, 2) study sperm morphology, 3) evaluate fresh semen quality, 4) test the effects of some extenders and find the ratio of semen:extender during chilled storage at 4 ºC on sperm motility and viability and 5) test the effects of some extender-cryoprotectant combinations during freezing at -196 ºC on sperm motility and viability. The utilities could be used to choose a good male stingray for breeding, develop protocol of semen preservation and apply in artificial insemination for freshwater stingray in the future. Semen was collected from 10 adult male stingrays by the gloved-hand method with no anesthesia. Fresh semen was evaluated for the semen quality and sperm morphology. Then, the semen was diluted in different kinds of extender and cryoprotectant for chilled and frozen preservation. The examined extenders included Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Calcium-Free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS), Normal Saline Solution (NSS) and Modified Fish Ringer's Solution (MFR). The cryoprotectants were 5% Glycerol, 10% Glycerol, 5% (Dimethyl sulfoxide) DMSO and 10% DMSO. In this study, it was found that the fresh motoro semen was white and creamy. Semen volume was 0.53±0.15 mL. pH was 7.3±0.26. Sperm density was 2.28±0.46 $x10^9$ sperms/mL. Sperm motility was 98.5±2.42%. Spermatocrit was 15.4±2.88%. Sperm viability was 89.8±3.36%. Size of spermatozoon was 116.34±1.92 µm in length. It had twisted head with pointed anterior tip and blunted posterior end. It had spiral movement. Sperm from fresh semen was alive for 6 days. In chilled storage at 4 ºC, Ca-F HBSS was used as a basis extender at 1:1. Sperm was alive for 11 days. In freezing storage at -196 ºC, semen was preserved in liquid nitrogen for 2 weeks. After thawed in water bath, the results showed that preserved semen in 5% Glycerol had the statistically best efficacy ($P<0.05$). Sperm motility was 42.0±3.50% and Sperm viability was 42.9±2.85%.

Department: Veterinary Medicine Student's Signature .....
Field of Study: Veterinary Medicine Advisor's Signature .....
Academic Year: 2014

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รศ.ส.พญ.ดร.นันทริกา ชันซื่อ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งให้คำปรึกษาแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนให้ความช่วยเหลือในการดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท วีมาร์ค ฟาร์ม จำกัด ที่อนุเคราะห์ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ และอำนวยความสะดวกในด้านสถานที่สำหรับทำงานวิจัยในครั้งนี้ ขอบพระคุณ สพ.ญ.ชญานิศ ดาวฉาย ที่ให้ความช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างสำหรับงานวิจัย ขอบพระคุณ น.สพ.ณรงค์ ทิพธนวัฒนะ ที่ให้คำปรึกษาด้านการวิเคราะห์ตัวอย่าง ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือระหว่างทำการวิจัย ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่จากภาควิชาสูติศาสตร์ เธนุเวชวิทยา และวิทยาการสืบพันธุ์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำปรึกษาด้านการเก็บและวิเคราะห์ตัวอย่าง ขอบพระคุณเจ้าหน้าที่จากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในด้านความช่วยเหลือและความสะดวกในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ขอบพระคุณหน่วยไวรัสวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการเก็บรักษาตัวอย่าง

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ช่วยกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษาเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (the 90th Anniversary of Chulalongkorn University Fund (Ratchadaphiseksomphot Endowment Fund)) ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบิดามารดาที่คอยเป็นแรงผลักดันช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และสนับสนุนตลอดมา รวมทั้งญาติพี่น้องและเพื่อนทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัย จนทำให้ข้าพเจ้าสำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี ขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญตาราง ..... ฌ
สารบัญภาพ ..... ฎ
บทที่ 1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 4
1.3 สมมติฐานการวิจัย 4
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย 4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 5
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 6
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ (*Potamotrygon motoro)* 6
2.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลากระเบนเพศผู้ 11
2.3 โครงสร้างของตัวอสุจิ 16
2.4 ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของตัวอสุจิ 17
2.5 การรีดเก็บน้ำเชื้อ 19
2.6 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ 21
2.7 การเจือจางน้ำเชื้อ 26
2.8 การเก็บรักษาน้ำเชื้อ 27
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 31

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

หน้า

3.1 สัตว์ทดลอง 31
3.2 การเตรียมปลาสำหรับทดลอง 32
3.3 การทดลองที่ 1 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด 33
3.4 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ และอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีการแช่เย็น 38
3.5 การทดลองที่ 3 ศึกษาความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัว 40
3.6 การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของการแช่แข็งน้ำเชื้อ 41
3.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ 42
บทที่ 4 ผลการวิจัย 43
4.1 ผลการทดลองที่ 1 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด 43
4.2 ผลการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ และอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีการแช่เย็น 49
4.3 ผลการทดลองที่ 3 ศึกษาความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัว 57
4.4 ผลการทดลองที่ 4 ศึกษาผลของการแช่แข็งน้ำเชื้อ 60
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ 63
5.1 อภิปรายผลการวิจัย 63
5.2 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ 69
ภาคผนวก 71
รายการอ้างอิง 78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 89

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางเคมี (g/L) และค่าออสโมลาลิตี้ (Mosmol/Kg) และความเป็นกรดด่างของสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ 39

ตารางที่ 2 ปริมาตรของน้ำเชื้อ สารเจือจางน้ำเชื้อ และสารป้องกันการแข็งตัวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ 41

ตารางที่ 3 ปริมาตร ค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของตัวอสุจิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ เปอร์เซ็นต์ของอสุจิอัดแน่น และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิในน้ำเชื้อสดของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่เพศผู้ 44

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของน้ำเลี้ยงอสุจิในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ 46

ตารางที่ 5 ขนาดของตัวอสุจิในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ 47

ตารางที่ 6 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ 50

ตารางที่ 7 อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ 52

ตารางที่ 8 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด Ca-F HBSS ในอัตราส่วนต่างๆกัน 54

ตารางที่ 9 อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด Ca-F HBSS ในอัตราส่วนต่างๆกัน 56

ตารางที่ 10 ความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัวต่อน้ำเชื้อโดยดูจากอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ 58

ตารางที่ 11 ความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัวต่อน้ำเชื้อโดยดูจากอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ 59

ตารางที่ 12 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ หลังจากผ่านการแช่แข็ง 60

ตารางที่ 13 อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ หลังจากผ่านการแช่แข็ง..... 61

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ สังเกตได้จากสีพื้นของลำตัวเป็นสีน้ำตาล มีจุดกลมสีส้มอมเหลือง ขอบล้อมรอบด้วยสีน้ำตาลเข้มกระจายทั่วตัวไปจนถึงโคนหาง 9

ภาพที่ 2 ปลากระเบนเพศผู้จะมีอวัยวะเพศผู้ หรือ claspers 2 ท่ออยู่ใต้ลำตัวบริเวณโคนหาง (วงกลมสีแดง) 10

ภาพที่ 3 ตำแหน่งการวางตัวของระบบสืบพันธุ์ภายเพศผู้ภายในช่องท้องของปลากระเบนน้ำจืดชนิด *P. leopoldi* 12

ภาพที่ 4 ตำแหน่งของต่อมคลาสเปอร์ในอวัยวะเพศผู้ของปลากระเบนน้ำจืดชนิด *P. leopoldi* 12

ภาพที่ 5 ปลากระเบนน้ำจืดชนิด *P. leopoldi* ขณะกำลังผสมพันธุ์ เมื่อสอดอวัยวะเพศแล้วปลาเพศผู้จะพลิกไปอยู่ด้านล่างของเพศเมีย 15

ภาพที่ 6 แสดงการวัดความยาวและความกว้างลำตัว โดยสีฟ้า คือ ความยาวลำตัวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงสะโพก (Girdle length; GL) สีแดง คือ ความยาวลำตัวรวมตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายหาง (Total length; TL) และสีส้ม คือ ความกว้างลำตัว (Disc width; W) 31

ภาพที่ 7 การเตรียมปลาก่อนรีดน้ำเชื้อ (ก) มองจากด้านบน (ข) มองจากด้านข้าง 32

ภาพที่ 8 วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อ ผู้จับบังคับทำการยกหางขึ้น ผู้รีดเก็บน้ำเชื้อจะเข้าทางด้านหลังของปลา ใช้มือนวดเบาๆ บริเวณใต้ท้องปลาใกล้กับต่อมเวสซิคูล่า (seminal vesicle) และให้น้ำเชื้อไหลลงสู่หลอดสะอาดที่รอรับอยู่ใต้รูเปิดทวารรวม 33

ภาพที่ 9 น้ำเชื้อปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ที่รีดได้ในแต่ละครั้ง 34

ภาพที่ 10 นับจำนวนอสุจิในสไลด์นับเม็ดเลือด (Hemocytometer) ทั้ง 2 ด้าน (ลูกศร) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จะได้ความเข้มข้นของน้ำเชื้อในหนึ่งหน่วยปริมาตร 35

ภาพที่ 11 นับจำนวนอสุจิในช่องเล็ก 5 ช่องตามหมายเลข 1-5 แล้วมาคำนวณตามสูตร 35

ภาพที่ 12 รูปร่างตัวอสุจิปกติของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่เมื่อย้อมด้วยวิธีดิฟควิก (กำลังขยาย 1,000 เท่า) 45

ภาพที่ 13 รูปร่างตัวอสุจิที่ผิดปกติของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่เมื่อย้อมด้วยวิธีดิฟควิกพบหางมีลักษณะขดเป็นวง (กำลังขยาย 1,000 เท่า) 45

ภาพที่ 14 รูปร่างตัวอสุจิของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ลูกศรแสดงส่วนหัว (Head) ลำตัว (Mid-piece) และหาง (Tail) ตามแถบมาตราส่วน 10 ไมโครเมตร 47

ภาพที่ 15 โครงสร้างตัวอสุจิของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) N คือ นิวเคลียส ก) ภาพตัดขวางส่วนหัว ข) ภาพตัดตามยาวส่วนหัว ตามแถบมาตราส่วน (ก) 100 นาโนเมตร (ข) 0.5 ไมโครเมตร 48

ภาพที่ 16 โครงสร้างตัวอสุจิของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ภายในมีไมโตคอนเดรีย ก) ภาพตัดขวางส่วนลำตัว ข) ภาพตัดตามยาวส่วนลำตัว ตามแถบมาตราส่วน (ก) 200 นาโนเมตร (ข) 0.5 ไมโครเมตร 48

ภาพที่ 17 โครงสร้างตัวอสุจิของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ภายในมี Axoneme ก) ภาพตัดขวางส่วนหาง ข) ภาพตัดตามยาวส่วนหาง ตามแถบมาตราส่วน (ก) 200 นาโนเมตร (ข) 0.5 ไมโครเมตร 49

ภาพที่ 18 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ 51

ภาพที่ 19 อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ 53

ภาพที่ 20 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด Ca-F HBSS ในอัตราส่วนต่างๆกัน 55

ภาพที่ 21 อัตราการรอดเฉลี่ยชีวิตของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด Ca-F HBSS ในอัตราส่วนต่างๆกัน 57

ภาพที่ 22 ความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัวต่อน้ำเชื้อโดยดูจากอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ 58

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 23 ความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัวต่อน้ำเชื้อโดยดูจากอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ 59

ภาพที่ 24 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่หลังจากผ่านการแช่แข็ง 61

ภาพที่ 25 อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ 62

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลากระเบนน้ำจืดวงศ์ Potamotrygonidae จัดเป็นปลากระดูกอ่อน (Elasmobranch) ซึ่งอยู่ในกลุ่มเดียวกับฉลาม มีลักษณะลำตัวกลมแบน หางเรียวแหลม และมีเงี่ยงอยู่บริเวณหาง เพศผู้จะมีอวัยวะเพศผู้ (claspers) 2 ท่ออยู่ใต้ลำตัวบริเวณโคนหาง ปลากระเบนเป็นปลาพื้นน้ำ ออกลูกเป็นตัว กินไส้เดือนน้ำ กุ้งฝอย และปลาเป็นอาหาร (Ross and Schäfer, 2000) ปลากระเบนน้ำจืดในวงศ์นี้เป็นปลาที่มีถิ่นกำเนิดดั้งเดิมตามธรรมชาติเฉพาะบริเวณทวีปอเมริกาใต้ แบ่งได้เป็น 4 สกุล ได้แก่ *Potamotrygon*, *Plesiotrygon, Paratrygon* และ *Heliotrygon* ซึ่งมีจำนวนสายพันธุ์รวมมากกว่า 20 สปีชีส์ เบื้องต้นใช้รูปแบบของลวดลายที่ด้านบนลำตัวในการจำแนกสายพันธุ์ (Charvet-Almeida et al., 2002; Fontenelle et al., 2014) การเพาะเลี้ยงในประเทศไทยส่วนหนึ่งได้มาจากการนำเข้าจากต่างประเทศ บริเวณทวีปอเมริกาใต้แถบลุ่มน้ำอเมซอน เช่น บราซิล เปรู โคลัมเบีย เป็นต้น และอีกส่วนหนึ่งได้มาจากการทำฟาร์มเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์

ปลากระเบนน้ำจืดวงศ์ Potamotrygonidae เป็นปลากระเบนที่ตลาดมีความต้องการสูง เนื่องจากเลี้ยงดูง่าย มีลวดลายแปลกและสวยงาม อดทนแข็งแรง และบางชนิดสามารถเพาะขยายพันธุ์ในที่เลี้ยงได้ รวมทั้งอนุบาลลูกปลาได้ในฟาร์มเกษตรกรหลายแห่งในประเทศไทย ตลาดปลากระเบนน้ำจืดเชิงพาณิชย์เป็นตลาดที่เปิดกว้าง ทั้งนำส่งขายเพื่อเป็นปลาในพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำและเป็นปลาที่เลี้ยงเพื่อดูเล่น ซึ่งนอกจากตลาดภายในประเทศแล้ว ตลาดต่างประเทศเองนั้นก็มีความต้องการสูงอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะประเทศจีน ญี่ปุ่น และมาเลเซีย ที่ยังมีความต้องการไม่จำกัด ปัจจุบันปลาชนิดนี้ได้ถูกพัฒนาเป็นปลาเศรษฐกิจสวยงามชนิดหนึ่งของประเทศไทยแล้ว รูปแบบฟาร์มมีทั้งการผสมสายพันธุ์เดิมและการผสมข้ามสายพันธุ์เพื่อให้ได้ปลากระเบนสายพันธุ์ใหม่ ที่มีสีสันและลวดลายสวยงามแปลกตายิ่งขึ้น การผลิตปลากระเบนในประเทศไทยที่นิยมมี 2 กลุ่ม ได้แก่ การผลิตปลากระเบนกลุ่มโมโตโร่และลูกผสม เป็นปลาสายพันธุ์หลักที่เพาะพันธุ์ได้ปริมาณมาก ราคาส่งอยู่ในช่วง 700 - 900 บาท/ตัว สำหรับปลาขนาด 4 นิ้วขึ้นไป การผลิตปลากระเบนดำ (Black ray) กลุ่ม Black Diamond / Polkadot และลูกผสม เป็นปลากระเบนที่มีราคาสูง ราคาส่งอยู่ในช่วง 50,000 - 100,000 บาท/ตัว ขึ้นอยู่กับความสวยงาม ลวดลาย และสีสัน สำหรับปลาขนาด 5 นิ้วขึ้นไป (อรุณี รอดลอย, 2556) แต่อย่างไรก็ตามจำนวนของปลากระเบนก็ยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด

สาเหตุมาจากปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม ทำให้จำนวนของปลากระเบนในแหล่งธรรมชาติลดลงไปมาก ทั้งจากการจับมาจำหน่ายเพื่อเลี้ยงเป็นปลาสวยงามและการนำมาบริโภค กับสภาพแห้งแล้งที่เกิดขึ้นในแหล่งน้ำหลายแห่งของทวีปอเมริกาใต้ (Araújo et al., 2004) และเกิดจากข้อจำกัดทางระบบสืบพันธุ์ ปัญหาการเกิดโรค การจัดการทางด้านสุขภาพที่ไม่ดี เนื่องจากยังขาดการวางมาตรการการเฝ้าระวังโรค และการส่งเสริมการศึกษาข้อมูลพื้นฐานด้านการวิจัยที่เพียงพออันเป็นอุปสรรคที่สำคัญต่อการส่งเสริมให้ประเทศไทยมีศักยภาพในการเพาะเลี้ยง และพัฒนาสุขภาพปลากระเบนน้ำจืดเหล่านี้เพื่อการส่งออกเชิงพาณิชย์อย่างยั่งยืน การมีความรู้ความเข้าใจด้านระบบสืบพันธุ์พื้นฐานของปลากระเบนโดยเฉพาะปลากระเบนเพศผู้ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งในการสืบพันธุ์ให้ผลผลิต ทั้งในเรื่องการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อ (extender) เพื่อให้ตัวอสุจิเคลื่อนไหวได้ดี นอกจากนี้ควรมีการพัฒนาเทคนิคการเพาะพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น ด้วยการนำน้ำเชื้อมาแช่แข็งเพื่อนำมาใช้ในการผสมเทียมต่อไป ประโยชน์ของการทำน้ำเชื้อแช่แข็งคือช่วยลดต้นทุนในการเลี้ยงในส่วนของพ่อพันธุ์ และยังมีประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์พันธุ์สัตว์น้ำ สามารถเก็บน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ที่มีคุณภาพไว้ได้นาน บางครั้งอาจไม่สามารถเลี้ยงตัวผู้และตัวเมียไว้ด้วยกันได้หรือขาดพ่อแม่พันธุ์ และเสียค่าใช้จ่ายสูงในการขนส่งพ่อแม่พันธุ์ ดังนั้นการเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่แข็งจึงมีบทบาทสำคัญและเป็นวิธีหนึ่งที่จะช่วยพัฒนาการเพาะขยายพันธุ์และปรับปรุงพันธุ์ หากสามารถพัฒนาให้การใช้น้ำเชื้อปลากระเบนแบบแช่แข็ง มีประสิทธิภาพในการผสมเทียมได้ใกล้เคียงกับน้ำเชื้อสด สามารถใช้งานได้ง่ายและมีปริมาณมากพอ จะเป็นประโยชน์ต่อวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอย่างยิ่ง

การเก็บรักษาน้ำเชื้อมี 2 รูปแบบ คือ การเก็บรักษาน้ำเชื้อระยะสั้นหรือเก็บโดยวิธีการแช่เย็น (4 องศาเซลเซียส) จะใช้สารเจือจางน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาตรและเป็นแหล่งพลังงานให้กับตัวอสุจิสำหรับใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึม อีกทั้งสารเจือจางน้ำเชื้อยังช่วยยืดระยะเวลาการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิให้อยู่ได้นานขึ้นอีกด้วย การเลือกชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมควรมีค่า pH และค่าออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกับน้ำเลี้ยงอสุจิ (seminal plasma) ของน้ำเชื้อปลาที่ใช้ทำการศึกษา การเก็บรักษาน้ำเชื้อระยะยาวหรือการเก็บโดยวิธีการแช่แข็งสามารถเก็บไว้ได้นานเป็นระยะเวลาหลายปี ด้วยการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งอาศัยการทำงานของสารเจือจางน้ำเชื้อร่วมกับสารป้องกันการแข็งตัว (cryoprotectant) หน้าที่ของสารป้องกันการแข็งตัวจะช่วยป้องกันอันตรายของเซลล์ในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการละลาย การเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลาชนิดอื่นๆ แบบแช่แข็งในอดีตที่ผ่านมายังไม่ประสบผลสำเร็จเท่าที่ควรเนื่องจากมีปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความ

สมบูรณ์ของน้ำเชื้อสดที่ใช้ทำน้ำเชื้อแช่แข็ง และกระบวนการในการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง ประกอบด้วย ส่วนประกอบของสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ในการเก็บรักษาที่เหมาะสม อัตราส่วนของน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันการแข็งตัว ระยะเวลาที่ผสมสารป้องกันการแข็งตัว ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัว อัตราการลดอุณหภูมิก่อนการแช่แข็ง และเทคนิคต่างๆก่อนการแช่แข็งและการเก็บรักษา ตลอดจนวิธีการละลายและนำไปใช้ผสม ซึ่งปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับคุณภาพน้ำเชื้อในปลากระเบนน้ำจืดยังมีการศึกษาอยู่น้อยมาก ยิ่งไปกว่านั้นค่ามาตรฐานต่างๆ ในน้ำเชื้อของปลาต่างประเทศที่มีรายงานอาจจะแตกต่างกันกับปลาที่มีในประเทศไทย เนื่องจากในสัตว์เลือดเย็นมีหลายปัจจัยที่สามารถทำให้ค่าเหล่านี้เปลี่ยนแปลงได้ เช่น ชนิด อายุ เพศ ความสมบูรณ์ อุณหภูมิ ความเค็ม การจับบังคับ การวางยา วิธีการตรวจ ผู้ตรวจ วิธีการเก็บรักษาตัวอย่าง เป็นต้น (Alavi and Cosson, 2005; Alavi and Cosson, 2006) ดังนั้นการศึกษาทางการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในปลากระเบนน้ำจืดวงศ์ Potamotrygonidae และการหาสูตรน้ำยาที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อจึงมีประโยชน์สำหรับการอ้างอิงในปลากระเบนน้ำจืดของประเทศไทย และส่งผลต่อไปยังคุณภาพน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการผสมพันธุ์ด้วย

การศึกษาในครั้งนี้จึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาวิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อในปลากระเบน จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะรูปร่างทางกายภาพของตัวอสุจิปลากระเบนด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ (*Potamotrygon motoro)* ทั้งทางกายภาพและเคมีเป็นค่าอ้างอิงที่สำคัญในด้านระบบสืบพันธุ์เพศผู้ อันเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ในการประเมินคุณภาพของพ่อพันธุ์ รวมไปถึงการหาสูตรที่เหมาะสมของสารเจือจางน้ำเชื้อและอัตราส่วนของสารเจือจางน้ำเชื้อกับน้ำเชื้อต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนแบบแช่เย็น หาชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัวที่เหมาะสมเพื่อใช้ในขั้นตอนการแช่แข็ง และหาเทคนิคการเก็บรักษาและการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง เพื่อประโยชน์ในการใช้น้ำเชื้อให้มีประสิทธิภาพสูงสุด ซึ่งในปลากระเบนน้ำจืดยังมีการศึกษาอยู่เป็นจำนวนน้อยมาก และยังไม่เคยมีผู้ใดทำการศึกษามาก่อนในประเทศไทย อีกทั้งยังสามารถพัฒนาเทคนิคและวิธีการที่ได้ไปประยุกต์ใช้กับการรีดเก็บน้ำเชื้อและการเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลากลุ่มเดียวกันได้อีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อพัฒนาวิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อในปลากระเบน

2. เพื่อใช้การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเป็นข้อมูลมาตรฐานอ้างอิง ในด้านการประเมินคุณภาพพ่อพันธุ์ของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่

3. เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่างทางกายภาพของตัวอสุจิปลากระเบน ด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

4. เพื่อศึกษาสูตรที่เหมาะสมของสารเจือจางน้ำเชื้อ และอัตราส่วนของสารเจือจางน้ำเชื้อกับน้ำเชื้อต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนแบบแช่เย็น

5. เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัวที่เหมาะสมเพื่อใช้ในขั้นตอนการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนแบบแช่แข็ง

6. เพื่อศึกษาเทคนิคการเก็บรักษาและการละลายน้ำเชื้อแช่แข็งในปลากระเบนน้ำจืด

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ สามารถใช้เป็นค่าอ้างอิงของคุณภาพน้ำเชื้อพื้นฐานในปลากระเบนชนิดนี้ได้

2. ชนิดและอัตราส่วนของสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อ

3. ชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัวที่ใช้ในกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็งมีผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำเชื้อ

1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดของงานวิจัย

โครงการนี้ต้องการศึกษาคุณภาพน้ำเชื้อในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ และพัฒนาวิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อ เพื่อนำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อทั้งทางกายภาพและเคมี จากนั้นนำน้ำเชื้อส่วนหนึ่งไปใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ เพื่อศึกษาชนิดของสูตรและอัตราส่วนที่เหมาะสมของสารเจือจางน้ำเชื้อต่อน้ำเชื้อที่มีผลต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็น นำสูตรของสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมไปใช้ในกระบวนการแช่แข็งต่อไป และนำน้ำเชื้ออีกส่วนหนึ่งใส่สารเจือจางน้ำเชื้อและสารป้องกันการแข็งตัว เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัวในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่แข็ง มีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อทั้งก่อนและหลังการเก็บรักษาเพื่อดูรูปร่างการเคลื่อนที่ และอัตรารอดชีวิตของตัวอสุจิ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงลักษณะรูปร่างของของตัวอสุจิปลากระเบนวงศ์ Potamotrygonidae สายพันธุ์โมโตโร่ สามารถนำไปใช้ในการเปรียบเทียบกับปลากระดูกอ่อนชนิดอื่นที่ใกล้เคียงกันได้

2. สามารถนำค่าอ้างอิงทางการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อไปใช้ประโยชน์เกี่ยวกับการประเมินคุณภาพของพ่อพันธุ์เพื่อใช้ในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่สมบูรณ์สามารถนำไปผสมพันธุ์ได้

3. ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการรีดน้ำเชื้อ วิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อทั้งแบบแช่เย็นและแช่แข็งในปลากระเบนน้ำจืดได้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ (*Potamotrygon motoro)*

ปลากระเบนจัดเป็นปลากระดูกอ่อน (Cartilaginous fish; Chondrichthyes) ซึ่งปลากระดูกอ่อนสามารถแบ่งออกเป็นสองชนิดหลักคือ Elasmobranchii (ฉลามและกระเบน) และ Holocephali (ปลาไคมีรา) หมายถึงปลาเหล่านี้จะขาดส่วนของโครงสร้างที่เป็นกระดูกแข็งภายใน (internal skeleton bone) ประกอบด้วยกระดูกส่วนหัว กระดูกสันหลัง และกระดูกครีบ ซึ่งจะถูกแทนที่ด้วยกระดูกอ่อน อย่างไรก็ตามกระดูกอ่อนเหล่านี้มีความแข็งแรงเนื่องจากมีองค์ประกอบรองเป็นแคลเซียม (Oldfield, 2005a; Oldfield, 2005b)

สำหรับในปลาฉลามส่วน denticles จะพัฒนาเป็นเกล็ดที่ผิวหนังที่มีรูปแบบจำเพาะแบบ placoid ที่มีขนาดเล็กละเอียด ยึดติดกับผิวหนังชั้นนอก ทำให้ผิวสัมผัสหยาบเหมือนกระดาษทราย ต่างจากในปลากระเบนส่วนของ denticles ส่วนใหญ่จะไม่มีเกล็ดอย่างข้างต้น แต่จะพัฒนาเป็นเงี่ยงขนาดใหญ่ เงี่ยงจะบรรจุต่อมพิษไว้ซึ่งมีลักษณะคล้ายหนามแหลมและมีขอบเป็นหยักขึ้นมาคล้ายเล็บมือพร้อมทั้งมีเนื้อเยื่อห่อหุ้มตลอดทั่วทั้งเงี่ยงพิษนี้ด้วย เมื่อเงี่ยงพิษนี้ปักเข้าไปในเหยื่อ เยื่อหุ้มจะฉีกขาดทำให้พิษถูกปล่อยเข้าสู่ร่างกายของเหยื่อทำให้เกิดอันตรายได้ (Haddad et al., 2004) ฟันบน (maxillary teeth) ของปลากระเบนแข็งแรงมากสามารถสร้างขึ้นใหม่ได้ตลอดชีวิต ส่วนครีบอก (pectoral fin) จะมีการเปลี่ยนรูปออกไปทางด้านขนานจากลำตัว ทำให้มีรูปร่างกลมแบนเพื่อให้การทรงตัวมั่นคงและเพิ่มแรงขับเคลื่อน ปลากระดูกอ่อนทุกชนิดที่ส่วนหัวด้านหน้าสุดจะมีอวัยวะที่เรียกว่า Lorenzian ampullae สำหรับรับสัมผัสจับคลื่นไฟฟ้า ทำให้ปลาเหล่านี้มีพฤติกรรมหยั่งรู้ในปรากฏการณ์เปลี่ยนแปลงต่างๆได้ไว เหงือกในปลากระดูกอ่อนจะไม่มีแผ่นปิดเหงือก (opercular) เหมือนในปลากระดูกแข็ง แต่จะเป็นช่องเหงือก (gill slits) โดยทั่วไปจะมี 5 ช่อง บ้างอาจมี 6-7 ช่อง ช่องเหงือกคู่แรกที่มีขนาดเล็กกว่าคู่อื่นๆ อยู่ที่ใต้ตา เรียกว่า spiracle หรือ speculum ปลากระเบนจะหายใจโดยเอาน้ำเข้าทาง spiracle และปล่อยออกทางช่องเหงือกด้านล่าง จึงทำให้สัตว์สามารถหายใจเอาน้ำที่สะอาดได้เมื่ออยู่ในโคลนหรือทรายหรือบนที่สกปรก หากปลากระเบนอยู่ในน้ำสะอาดปลาก็สามารถปรับการหายใจได้โดยเอาน้ำเข้าทางปากเหมือนในปลาชนิดอื่นๆ เช่นเดียวกัน ปลากระดูกอ่อนไม่มีถุงลม การลอยตัวและพยุงตัวในน้ำจึงอาศัยไขมันในตับ การลอยตัวโดยใช้ตับทำให้

ปลาใช้พลังงานต่ำในการว่ายน้ำ อย่างไรก็ตามเมื่อปลากระดูกอ่อนหยุดว่ายน้ำตัวจะจมลงสู่พื้นน้ำ ต่างจากปลาทั่วไปที่สามารถลอยตัวเป็นอิสระได้เมื่อหยุดว่ายน้ำ (Oldfield, 2005a; Oldfield, 2005b)

ปลากระดูกอ่อนทุกชนิดปฏิสนธิภายในร่างกาย (Internal fertilization) เพศผู้จะใช้อวัยวะเพศที่พัฒนามาจากครีบท้าย (ventral fin) เรียกว่า mixopterygia หรือ clasper สอดเข้าไปในช่องเพศของเพศเมีย การออกลูกส่วนใหญ่จะเป็นตัวอย่างแท้จริง (viviparous) โดยการฟักเป็นตัวอ่อนภายในตัวแม่และได้รับสารอาหารจากแม่จนกว่าจะคลอดออกมา ซึ่งปลากระเบนจัดอยู่ในประเภทนี้ ปลากระดูกอ่อนบางชนิดจะออกลูกเป็นตัวไม่แท้จริง (ovoviviparous) คือตัวอ่อนอยู่ในไข่ได้รับสารอาหารจากไข่แดง และพร้อมที่จะฟักออกจากไข่ในท่อนำไข่ก่อนคลอดออกมาภายนอก และยังมีปลากระดูกอ่อนบางส่วนออกลูกเป็นไข่ (oviparous) คือตัวอ่อนจะอยู่ในไข่ที่มีเปลือกหนา วางไข่เป็นกลุ่มเป็นเวลานานหลายสัปดาห์หรือหลายเดือน (Conrath and Musick, 2012)

ทั้งกระเบนและฉลามส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในทะเล มีเพียง 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้นที่อาศัยอยู่ในน้ำจืด ซึ่งปลากระดูกอ่อนที่อาศัยในน้ำจืดได้มีการพัฒนามาจากชนิดที่อยู่ในทะเลกว่า 400 ล้านปีมาแล้ว ซึ่งถือได้ว่าความหลากหลายของชนิดปลาในน้ำจืดยังมีน้อยกว่าในทะเลมาก ปัจจุบันมีปลากระเบน 2 วงศ์ ที่มีวิวัฒนาการปรับตัวมาอยู่ในน้ำจืดได้อย่างถาวร ได้แก่ วงศ์ Dasyatidae บางชนิดที่ปรับตัวมาอยู่ในน้ำจืดในบางช่วงเวลาของชีวิต คือ สกุล *Dasyatis* และ สกุล *Himantura* และอีกวงศ์หนึ่ง คือ Potamotrygonidae ที่มีถิ่นกำเนิดจากอเมริกาใต้ ซึ่งปลากลุ่มนี้ไม่สามารถอาศัยอยู่ในน้ำทะเลได้อีกต่อไป เนื่องจากสูญเสียการทำงานของการควบคุมระดับยูเรียในกระแสเลือดที่จำเป็นสำหรับการควบคุมสมดุลไอออนมากมายหลายชนิดในน้ำทะเล มีการปรับตัวสำหรับการควบคุมแรงดันออสโม-ลาริตี้ได้ไม่ดีเท่าปลาทะเล และไม่มีต่อมเกลือ (rectal gland) สำหรับทำหน้าที่ขับถ่ายของเสียที่เป็นเกลือส่วนเกินออกไป (Oldfield, 2005a; Oldfield, 2005b)

ปลากระเบนวงศ์ Potamotrygonidae มีถิ่นกำเนิดในทวีปอเมริกาใต้ เฉพาะในแหล่งน้ำจืดแถบลุ่มน้ำอเมซอน เช่น บราซิล เปรู โคลัมเบีย อุรุกวัย ปารากวัย เป็นต้น มีความสวยงามของลวดลายและสีสันที่เป็นเอกลักษณ์ในแต่ละตัว และรูปแบบที่เฉพาะตัวนี้จะไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นเวลานาน ปลากระเบนวงศ์ Potamotrygonidae มีลักษณะที่คล้ายคลึงกันในแต่ละชนิดและมีความหลากหลายของรูปแบบในปลาชนิดเดียวกัน ทำให้การแบ่งชนิดทำได้ยาก ซึ่งโดยทั่วไปใช้รูปแบบของลวดลายที่ด้านบนลำตัว สัญลักษณ์ที่หาง รูปแบบของเงี่ยงบนหาง รูปแบบของหางและครีบก้น รวมทั้งขนาดและตำแหน่งของตา (เปลี่ยนแปลงได้ตามอายุ) ปัจจุบันมีการแบ่งแยกชนิดของกระเบนในวงศ์ Potamotrygonidae ออกเป็น 4 สกุล ได้แก่ *Potamotrygon*, *Plesiotrygon, Paratrygon*

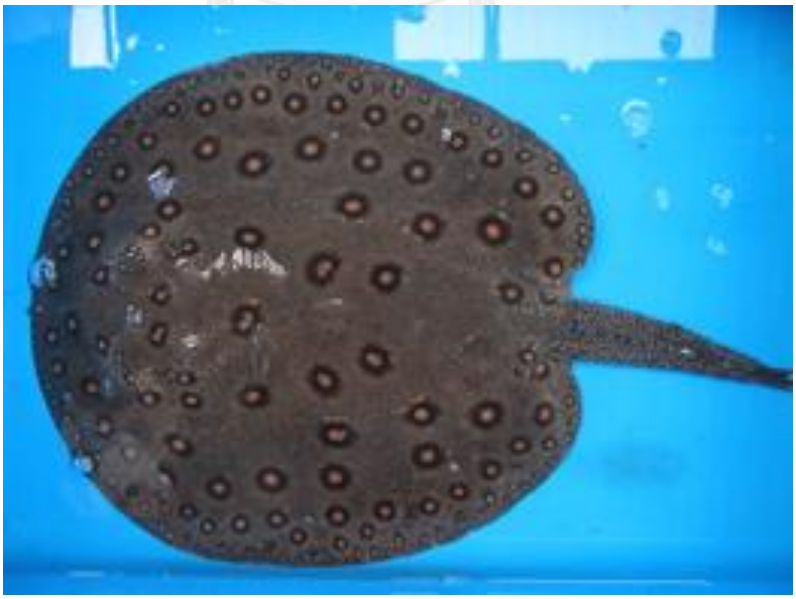
และ *Heliotrygon* ซึ่งมีจำนวนสายพันธุ์ที่จดบันทึกแล้วประมาณ 25 สปีชีส์ (Ross and Schäfer, 2000; Charvet-Almeida et al., 2002; De Carvalho and Lovejoy, 2011; Fontenelle et al., 2014)

พฤติกรรมของปลากระเบนน้ำจืดในธรรมชาติส่วนใหญ่จะใช้เวลาอยู่ที่พื้นน้ำ ซึ่งจะมีการพรางตัวอยู่ใต้พื้นดินหรือพื้นทรายของแม่น้ำ แหล่งที่อยู่อาศัยขึ้นกับขนาดตัว ความลึกของแม่น้ำ และช่วงเวลาของวัน ถ้าเป็นปลากระเบนวัยอ่อนจะชอบอยู่อาศัยในพื้นที่ที่ค่อนข้างมีทรายเยอะ ความลึกไม่เกิน 4 เมตร อยู่ได้ทั้งวัน ส่วนในปลากระเบนที่ตัวใหญ่กว่าหรือโตเต็มวัยแล้วจะมีการเคลื่อนย้ายถิ่นมากขึ้นตามระดับความลึก ช่วงเวลากลางวันจะอยู่ในที่ลึกกว่า 8 เมตร และจะเคลื่อนมาอยู่ในที่ตื้นกว่าในช่วงเวลากลางคืน ส่วนในปลากระเบนที่มีขนาดปานกลาง จะย้ายที่อยู่อาศัยไปตามแหล่งที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์กว่า เนื่องจากปลากระเบนเป็นสัตว์ที่หากินกลางคืน (Neto and Uieda, 2012) อาหารที่ปลากระเบนกินในวัยอ่อนจะเป็นพวกตัวอ่อนแมลง (insect larvae) และสัตว์จำพวกกุ้งและปูขนาดเล็ก ปลากระเบนที่โตเต็มวัยแล้วจะกินสัตว์จำพวกหอยและหมึก (mollusks) สัตว์จำพวกกุ้งและปู (crustaceans) และลูกปลากระดูกแข็งต่างๆ (teleosteans) ที่ว่ายอยู่บริเวณพื้นน้ำ รูปแบบการกินอาหารของปลากระเบนจะล่าเหยื่อโดยการแอบซุ่มอยู่ใต้พื้นทราย เมื่อเจอเหยื่อจะว่ายเข้าหาเหยื่อและดูดเหยื่อเข้าไปในปากโดยใช้ครีบของลำตัวช่วยจับเหยื่อ จากนั้นใช้ปากช่วยขยับเหยื่อให้อยู่ในทิศทางที่สามารถกินได้ง่าย แล้วจึงกัดหรือบดเหยื่อให้มีขนาดเล็กลง ส่วนที่ไม่สามารถกินได้จะคายออกมา ก่อนที่จะกลืนเหยื่อเข้าหลอดอาหาร (Shibuya et al., 2009; Shibuya et al., 2012)

ในประเทศไทยปลากระเบนวงศ์ Potamotrygonidae นับเป็นปลาที่มีมูลค่าสูง และเป็นที่นิยมในหลายสายพันธุ์ ส่วนใหญ่มาจากการนำเข้าจากต่างประเทศ เช่น กระเบนน้ำจืดโมโตโร่ *(Potamotrygon motoro)* โพลกาดอต (Polka dot: *P. leopoldi* และ *P. henlei*) ไทเกอร์ *(P. menchacai)* จากัวร์ *(P. castexi)* และกระเบนดอกไม้ *(P. schroederi)* ซึ่งมีราคาตั้งแต่หลักพันถึงหลักแสนบาทต่อคู่ และมีความต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศอยู่สูงโดยเฉพาะพันธุ์โมโตโร่และโพลกาดอต ซึ่งสามารถเพาะขยายพันธุ์ในที่เลี้ยง รวมทั้งอนุบาลลูกปลาได้ในฟาร์มเกษตรกรหลายแห่งในประเทศไทย จนปัจจุบันพัฒนาเป็นปลาสวยงามเศรษฐกิจชนิดหนึ่งของประเทศไทย ทั้งนำส่งขายเพื่อเป็นปลาในพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำ และเป็นปลาที่เลี้ยงเพื่อดูเล่นทั้งในและนอกประเทศ (กันยารัตน์ สุวรรณประทีป, 2548; อรุณี รอดลอย, 2556)

ลักษณะเฉพาะของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ สังเกตได้จากลำตัวมีลักษณะกลมคล้ายจาน สีพื้นของลำตัวเป็นสีน้ำตาล มีจุดกลมสีส้มอมเหลือง ขอบล้อมรอบด้วยสีน้ำตาลเข้ม

กระจายทั่วตัวไปจนถึงโคนหาง (ภาพที่ 1) มีเงี่ยงพิษที่มีลักษณะคล้ายหนามแหลม 1-2 เงี่ยงที่โคนหาง ขอบเป็นหยักคล้ายเล็บมือ เงี่ยงสามารถงอกใหม่ได้ตลอดชีวิต ความกว้างของโคนเงี่ยงประมาณ 6-17 เซนติเมตร ความยาวของเงี่ยงในเพศผู้ยาวประมาณ 39 เซนติเมตร และในเพศเมียยาวประมาณ 45 เซนติเมตร จำนวนรอยหยักของเงี่ยงในเพศผู้เฉลี่ย 60 หยัก และในเพศเมียเฉลี่ย 72 หยัก (Schwartz, 2009) สามารถแยกความแตกต่างระหว่างเพศผู้กับเพศเมียได้โดยเพศผู้จะมีอวัยวะเพศที่พัฒนามาจากครีบท้าย เรียกว่า อวัยวะเพศผู้ หรือ claspers จำนวน 2 ท่ออยู่ใต้ลำตัวบริเวณโคนหาง (ภาพที่ 2) มีหน้าที่ในการผสมพันธุ์โดยเพศผู้จะขับน้ำเชื้อผ่านท่อนำน้ำเชื้อเข้าไปในช่องเพศของเพศเมียระหว่างการผสมพันธุ์ ปลากระเบนออกลูกเป็นตัว ขนาดของปลากระเบนที่โตเต็มวัยและสามารถผสมพันธุ์ได้มีอายุประมาณ 3 ปีขึ้นไป เพศเมียจะมีขนาดความกว้างของลำตัว 24-32 เซนติเมตร เพศผู้มีขนาดความกว้างของลำตัว 20-25 เซนติเมตร ออกลูกได้ครั้งละ 4-11 ตัว มีระยะเวลาในการตั้งท้องประมาณ 3-6 เดือน ผนังมดลูกมีการพัฒนากลายเป็นริ้วขน เรียกว่า trophonemata มีหน้าที่เป็นแหล่งอาหารให้กับลูกที่อยู่ในท้อง ลูกแรกเกิดจะมีขนาดกว้าง 8-11 เซนติเมตร และมีความยาวถึงหาง 15-20 เซนติเมตร ปลากระเบนโมโตโร่ที่อยู่ตามธรรมชาติจะมีฤดูผสมพันธุ์ประมาณ 3-4 เดือนในช่วงฤดูฝน ส่วนปลากระเบนโมโตโร่ที่อยู่ในระบบเพาะเลี้ยงนั้นพบว่าสามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี (Araújo et al., 2004; Charvet-Almeida et al., 2005; Oldfield, 2005a; Oldfield, 2005b; Zaiden et al., 2011)



ภาพที่ 1 ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ สังเกตได้จากสีพื้นของลำตัวเป็นสีน้ำตาลมีจุดกลมสีส้มอมเหลือง ขอบล้อมรอบด้วยสีน้ำตาลเข้มกระจายทั่วตัวไปจนถึงโคนหาง

ภาพที่ 2 ปลากระเบนเพศผู้จะมีอวัยวะเพศผู้ หรือ claspers 2 ท่ออยู่ใต้ลำตัวบริเวณโคนหาง (วงกลมสีแดง)

สามารถจัดอนุกรมวิธาน (taxonomy) ของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ได้ดังนี้ (Drioli and Chiaramonte, 2005)

Domain: *Eukaryota*

Kingdom: *Animalia*

Phylum: *Chordata*

Subphylum: *Vertebrata*

Class: *Chondrichthyes*

Subclass: *Elasmobranchii*

Order: *Myliobatiformes*

Family: *Potamotrygonidae*

Genus: *Potamotrygon*

Species: *motoro*

Scientific name: *Potamotrygon motoro*

ชื่อสามัญ: Ocellate river stingray

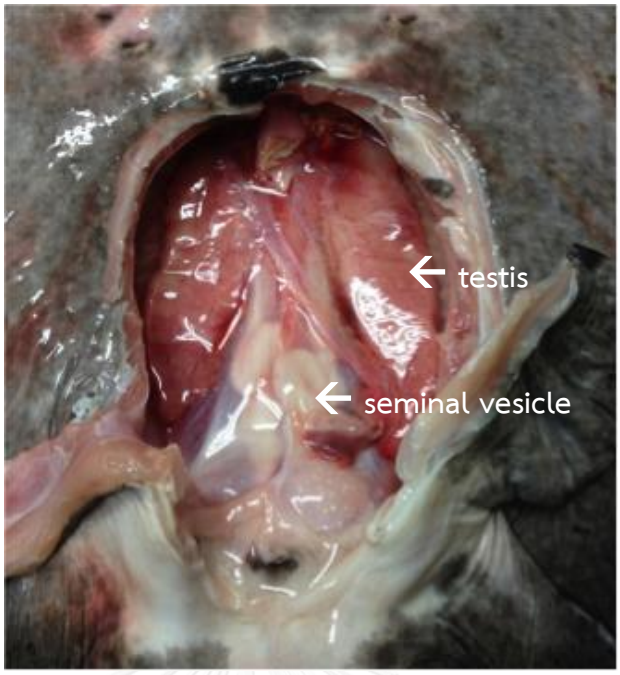
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ในปี พ.ศ. 2556 ประเทศโคลัมเบียและเอกวาดอร์ได้เสนอให้ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่เป็นสัตว์ที่ควรขึ้นทะเบียนชนิดพันธุ์หมายเลข 2 (Appendix 2) ของบัญชีอนุสัญญาไซเตส (CITES) หรือรายชื่อชนิดสัตว์ป่าและพืชป่า ที่มีการควบคุมการค้าระหว่างประเทศตามอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้สูญพันธุ์ สัตว์ในบัญชีที่ 2 นี้ หมายถึง สัตว์ที่มีสถานภาพไม่ถึงกับใกล้สูญพันธุ์จึงอนุญาตให้ค้าขายได้แต่ต้องมีการควบคุม ทั้งนี้เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้ประโยชน์ที่ไม่เหมาะสม และส่งผลกระทบต่อการอยู่รอดของชนิดพันธุ์ในธรรมชาติ แต่มติที่ประชุมภาคีอนุสัญญาฯ CITES Cop16 ที่จัดขึ้นที่ประเทศไทยนั้นไม่รับรองในข้อเสนอให้ขึ้นเป็นชนิดพันธุ์ในบัญชี Appendix 2 เนื่องจากเสียงสนับสนุนไม่ถึง 2 ใน 3 เพราะปลากระเบนชนิดนี้ประเทศไทยสามารถเพาะเลี้ยงและส่งจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศได้จำนวนมากมานานแล้ว (CITES, 2013; อรุณี รอดลอย, 2556)

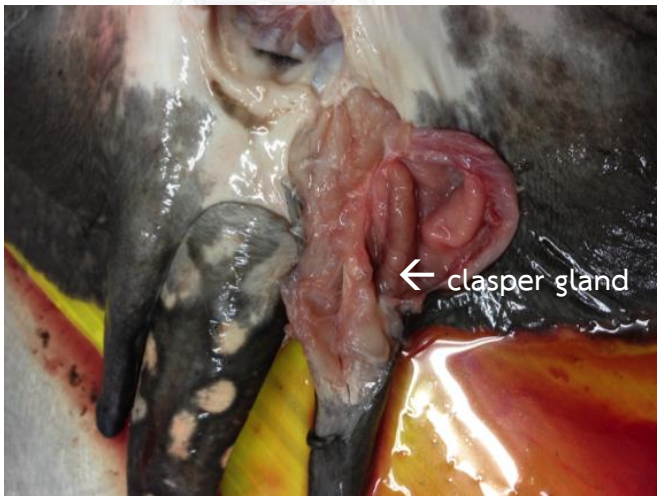
2.2 ระบบสืบพันธุ์ของปลากระเบนเพศผู้

ลักษณะภายนอกของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของปลากระเบน จะสังเกตเห็นอวัยวะเพศผู้ซึ่งเป็นส่วนที่พัฒนามาจากครีบท้าย (ventral fin) เรียกว่า mixopterygia หรือ clasper มี 2 ท่ออยู่ใต้ลำตัวบริเวณโคนหาง ส่วนลักษณะภายในจะพบอัณฑะ (testis), ต่อมเลย์ดิก (Leydig's gland), ท่อนำน้ำเชื้อ (vas deferens), ต่อมที่ช่วยผลิตน้ำเลี้ยงอสุจิ (accessory glands) ได้แก่ ต่อมเวสซิคูล่า (seminal vesicle), ต่อมอัลคาไลน์ (alkaline gland) และ ต่อมคลาสเปอร์ (clasper gland) (Hamlett, 1999; Henningsen et al., 2004) (ภาพที่ 3, 4)

ปลากระเบนมีอัณฑะขนาดใหญ่อยู่ภายในช่องท้อง หนักประมาณ 1-5% ของน้ำหนักตัว มีลักษณะเป็นพูยาว 2 พูซ้ายและขวา ฝังติดกับอวัยวะสร้างเม็ดเลือด (epigonal organ) มีหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่รูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะเป็นลักษณะสร้างเข้าสู่ศูนย์กลางท่อ (radial testis) อัณฑะเจริญดีทั้ง 2 ข้าง (Pratt Jr, 1988) ภายในอัณฑะประกอบด้วยหน่วยโครงสร้างรูปกลมที่เรียกว่า แอมพูลลา (ampullae) จำนวนมาก ซึ่งในแต่ละแอมพูลลาจะพบ spermatogenic cells ที่เจริญอยู่ในระยะเดียวกัน และเซลล์พี่เลี้ยง (Sertoli cells) แอมพูลลาที่อยู่ในระยะเดียวกันจะอยู่รวมกลุ่มกัน ระหว่างแอมพูลลาพบ interstitial cells อสุจิที่ปล่อยออกจากอัณฑะจะถูกลำเลียงผ่านไปตาม vas efferens, epididymis, vas deferens, seminal vesicle และเปิดออกที่ช่องทวารรวมตามลำดับ (Conrath and Musick, 2012; Del Mar Pedreros-Sierra and Ramírez-Pinilla, 2015) รูปแบบของอัณฑะก็มีความหลากหลายในปลา



ภาพที่ 3 ตำแหน่งการวางตัวของระบบสืบพันธุ์ภายเพศผู้ภายในช่องท้องของปลากระเบนน้ำจืดชนิด *P. leopoldi*



ภาพที่ 4 ตำแหน่งของต่อมคลาสเปอร์ในอวัยวะเพศผู้ของปลากระเบนน้ำจืดชนิด *P. leopoldi*

กระดูกอ่อน เช่น ปลาฉลามวงศ์ Carcharhinidae มีรูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็นแบบมุ่งหน้าทิศทางเดียว (diametric testis) โดยมีแนวการสร้างมาจากทางด้านข้างเคลื่อนเข้าสู่แนวกลางของลำตัว ปลากระเบนวงศ์ Gymnuridae มีขนาดอัณฑะ 2 ข้างไม่เท่ากัน ส่วนปลากระเบนชนิด Australian butterfly ray (*Gymnura australis*) มีการทำงานของอัณฑะข้างเดียว รูปแบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะเป็นแบบผสม (compound testis) คือ มีการสร้างอสุจิเข้าสู่กลางท่อบริเวณด้านล่างของอัณฑะและทั้งหมดจะถูกลำเลียงไปสู่ด้านบนเพื่อปล่อยออกสู่ vas efferens ต่อไป (Pratt Jr, 1988; Henderson et al., 2014)

การพัฒนาการสร้างอสุจิของปลากระเบนมี 2 ขั้นตอน (Hamlett, 1999; Miura and Miura, 2003; Chatchavalvanich et al., 2005b) ประกอบด้วย

1) กระบวนการสเปอร์มาโตเจเนซีส (Spermatogenesis) เริ่มตั้งแต่การพัฒนาจากเจิมเซลล์ (germ cell) ไปเป็น spermatogonia ซึ่งฝังตัวอยู่บริเวณผนังท่อสร้างอสุจิ มีการแบ่งตัวแบบไมโต-ซิส (mitosis) 4 ครั้ง ได้เซลล์ primary spermatocyte (2n) จำนวน 16 เซลล์ จากนั้นแบ่งตัวแบบไมโอซิสครั้งที่ 1 (meiosis I) เป็นการลดโครโมโซมลงเหลือครึ่งหนึ่ง จะได้เซลล์ใหม่ คือ secondary spermatocyte (n) จำนวน 2 เซลล์ จากนั้น secondary spermatocyte มีการแบ่งตัวแบบไมโอซิสครั้งที่ 2 (meiosis II) ได้เซลล์ spermatid จำนวน 2 เซลล์ สรุปคือ spermatogonia 1 เซลล์ สามารถแบ่งตัวได้ spermatid จำนวน 32 เซลล์

2) กระบวนการสเปอร์มิโอเจเนซิส (Spermiogenesis) เป็นขั้นตอนที่ spermatid มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นตัวอสุจิ (spermatozoa) โดยไม่มีการแบ่งเซลล์อีกเลย ซึ่งจะมีหัวและหาง พร้อมที่จะมีการปฏิสนธิกับไข่ได้ กระบวนการในระหว่างขั้นตอนนี้ spermatid จะเกาะตัวอยู่กับเซลล์พี่เลี้ยง (Sertoli cells) โดย spermatid มีลักษณะเป็นเซลล์รูปร่างกลม เริ่มจากส่วนของเยื่อหุ้มนิวเคลียสมีการหนาตัวขึ้นเป็นอะโครโซม (acrosome) และมีการรวมตัวของโครมาตินภายในนิวเคลียส ไซโตพลาสซึมมีการเพิ่มจำนวนของไมโตคอนเดรีย ส่วนของอะโครโซมจะมีลักษณะรูปร่างที่แบนติดไปกับด้านหนึ่งของนิวเคลียส ขณะที่เซนตริโอล (centriole) จะอยู่ด้านตรงข้ามและมีทิศทางขนานไปตามความยาวของเซลล์ ส่วนหางของอสุจิเริ่มมีการพัฒนาขึ้นจากเซนตริโอ ทำให้ spermatid เริ่มมีรูปร่างที่ยาวขึ้น ส่วนท้ายของเซลล์มีการพัฒนาของแฟลกเจลลัม (flagellum) นิวเคลียสมีขนาดยาวขึ้นและแคบลง จากนั้น spermatid มีการเคลื่อนตัวเข้ามาใกล้ภายในบริเวณท่อมีการพัฒนาขั้นสุดท้ายของตัวอสุจิ เช่น มีการเจริญของ fibrous sheath หุ้มพันรอบหางทั้งหมด และ mitochondria sheath หุ้มโดยรอบส่วนกลางของหางที่มีไมโตคอนเดรียอยู่

Epididymis เป็นท่อ vas efferens ที่ขดไปมากระจุกรวมกันและทอดไปตามความยาวตลอดภายนอกอัณฑะ แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนต้น ส่วนกลาง และส่วนท้าย หน้าที่ของ epididymis ได้แก่ (1) ขนส่งตัวอสุจิ (transportation) (2) ทำให้น้ำเชื้อเข้มข้นขึ้น (concentration) ทั้งนี้เพราะของเหลวถูกอัณฑะดูดซึมกลับผ่านทางเซลล์บุผิวของ epididymis การดูดกลับเกิดมากที่ส่วนต้นของ epididymis (3) เป็นที่เก็บน้ำเชื้อ (storage) ส่วนใหญ่ตัวอสุจิจะถูกเก็บไว้ที่ส่วนท้ายของ epididymis ซึ่งสามารถเก็บรักษาตัวอสุจิได้เป็นเวลานาน เพราะมีค่าพีเอช (pH) ต่ำ ความหนืดสูง ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สูง มีผลทำให้อัตราเมแทบอลิซึมของตัวอสุจิลดต่ำลง (4) ทำให้ตัวอสุจิสมบูรณ์ (maturation) ตัวอสุจิก่อนเข้าสู่ epididymis จะไม่สามารถเคลื่อนไหวหรือปฏิสนธิได้ (Hamlett, 1999)

น้ำเชื้อ (semen) คือของเหลวสีขาวขุ่นคล้ายน้ำนม ข้นเหนียว ซึ่งหลั่งออกมาจากอวัยวะเพศผู้ในขณะทำการผสมพันธุ์ ถ้าน้ำเชื้อมีสิ่งเจือปน เช่น เลือด ปัสสาวะ อุจจาระหรือน้ำ จะทำให้ได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพไม่ดีไม่เหมาะแก่การเก็บรักษา และเมื่อนำน้ำเชื้อสดไปผสมกับไข่ก็อาจเป็นเหตุให้มีอัตราการผสมติดต่ำ และจำนวนลูกต่ำกว่าน้ำเชื้อที่สะอาด ปริมาณของน้ำเชื้อที่รีดได้จากปลาตัวหนึ่งในแต่ละครั้ง และความหนาแน่นของตัวอสุจิจะมีความผันแปรไปตามฤดูกาลและช่วงเวลาในฤดูผสมพันธุ์ น้ำเชื้อปลาถ้านำมาปั่นแยก (centrifuge) จะแยกได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นตัวอสุจิ (spermatozoa) และส่วนที่เป็นของเหลว (seminal plasma) ซึ่งเป็นสารที่หลั่งออกมาจากต่อมที่ช่วยผลิตน้ำเลี้ยงอสุจิ (accessory glands) ต่อมผลิตน้ำเลี้ยงอสุจิมีหน้าที่สร้างสารที่มีประโยชน์สำหรับตัวอสุจิ จะช่วยปรับสภาพกรดด่างหรือทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ (buffer) ของน้ำเชื้อ รวมถึงเป็นแหล่งของอาหารและสารที่จำเป็นต่อการเคลื่อนไหวและความสมบูรณ์ของตัวอสุจิ สารนี้จะปนออกมากับตัวอสุจิในขณะที่พ่อพันธุ์หลั่งน้ำเชื้อ ซึ่งในส่วนของเหลวนี้มีบทบาทสำคัญในการพัฒนาสูตรสารสำหรับแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อปลา องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของน้ำเชื้อปลาแต่ละกลุ่ม ต้องใช้สารเคมีที่เมื่อเจือจางน้ำเชื้อแล้วให้อิออนที่เหมาะสม มีค่าพีเอชและออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อปลามากที่สุด เพื่อป้องกันการเคลื่อนไหวของอสุจิก่อนถูกกระตุ้น (Ciereszko et al., 2011) เนื่องจากตัวอสุจิของปลาจะไม่มีการเคลื่อนไหวเมื่ออยู่ในท่อนำน้ำเชื้อซึ่งแตกต่างจากในสัตว์เลี้อยคลานและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่จะเคลื่อนไหวได้ดีเมื่ออยู่ในน้ำและสารละลายที่มีความเข้มข้นใกล้เคียงกับสารละลายภายในตัวอสุจิ (Stoss, 1983) ต่อมผลิตน้ำเลี้ยงอสุจิที่สำคัญมีอยู่ 4 ต่อม ได้แก่ ต่อมเวสซิคูล่า (seminal vesicle หรือ vesicular gland) ต่อมเลดิก (Leydig's gland) ต่อมอัลคาไลน์ (alkaline gland หรือ Marshall's gland) และต่อมคลาสเปอร์ (clasper gland)

พฤติกรรมการผสมพันธุ์ในปลากระเบนมี 5 ระยะ เริ่มจาก ระยะที่ 1 ปลาเพศผู้เข้าไปว่ายประกบเพศเมียทางด้านหลัง ระยะที่ 2 ปลาเพศผู้ไล่กัดครีบของเพศเมีย จากนั้นปลาเพศผู้ค่อยๆ สอดอวัยวะเพศเข้าไปในรูเปิดทวารรวมของเพศเมีย โดยการดันเข้าไปข้างหน้า ระยะที่ 3 ปลาเพศผู้จะพลิกตัวไปอยู่ด้านล่างของเพศเมีย และใช้ด้านท้องประกบกันแล้วจึงปล่อยน้ำเชื้อเข้าสู่เพศเมียในที่สุด ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 10-33 วินาที (ภาพที่ 5) ระยะที่ 4 ระยะพักหลังจากปล่อยน้ำเชื้อเสร็จจะสังเกตเห็นเหงือกปลาเพศผู้ขยับพ่นน้ำหลายๆที ระยะที่ 5 แยกออกจากกัน (Chapman et al., 2003) ระยะที่ปลาเพศผู้พลิกตัว กล้ามเนื้อที่อยู่บริเวณเชิงกรานจะมีการหดตัว เพื่อช่วยลำเลียงน้ำเชื้อจากช่องทวารรวมของเพศผู้เข้าไปสู่อวัยวะเพศ ร่วมกับการทำงานของต่อมผลิตน้ำเลี้ยงอสุจิส่วนสุดท้าย คือ ต่อมคลาสเปอร์ ปลากระดูกอ่อนบางชนิดเรียกต่อมไซฟอน (siphon gland) จะหลั่งของเหลวที่มีลักษณะเป็นเมือกประกอบด้วยไกลโคโปรตีนและฟอสโฟลิปิด มีคุณสมบัติเป็นกรดอ่อนๆ ซึ่งอวัยวะเพศนั้นคือส่วนที่พัฒนามาจากครีบท้ายมีลักษณะม้วนซ้อนกันเป็นกลีบ ส่วนหน้าเรียกว่า apopyle ส่วนท้ายเรียกว่า hypopyle เวลาใช้งานจะคลี่ออกกลายเป็นร่องให้น้ำเชื้อไหลเข้าสู่เพศเมีย เป็นการป้องกันไม่ให้อสุจิปนเปื้อนน้ำที่อยู่รอบตัว (Babel, 1967; Hamlett, 1999)

ภาพที่ 5 ปลากระเบนน้ำจืดชนิด *P. leopoldi* ขณะกำลังผสมพันธุ์ เมื่อสอดอวัยวะเพศแล้ว ปลาเพศผู้จะพลิกไปอยู่ด้านล่างของเพศเมีย

2.3 โครงสร้างของตัวอสุจิ

ตัวอสุจิของปลาแต่ละชนิดจะมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกัน แต่ทุกชนิดจะมีส่วนประกอบที่เหมือนกัน 3 ส่วน คือ

1) ส่วนหัว (head) ประกอบด้วยนิวเคลียส (necleus) ที่มีสารถ่ายทอดพันธุกรรมอยู่ ส่วน post nuclear cap เป็นส่วนที่ปกคลุมนิวเคลียส และส่วนอะโครโซม ซึ่งมีเอ็นไซม์ที่ใช้ในการเจาะไข่เมื่อปฏิสนธิ ถ้าอะโครโซมมีรูปร่างผิดปกติจะทำให้ตัวอสุจิไม่สามารถปฏิสนธิได้

2) ส่วนลำตัว (body หรือ midpiece) ประกอบด้วยเซนโตรโซม (centrosome) และไมโตคอนเดรีย (mitochondria) ซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงาน

3) ส่วนหาง (tail) ทำหน้าที่โบกพัดเพื่อการเคลื่อนไหว ส่วนของหางทั้งหมดจะมี axial filament หรือ axoneme ซึ่งเป็นมัดของเส้นใยไฟบริล (fibril) ที่เริ่มจากเซนตริโอลส่วนต้น (proximal centriole) ทอดยาวมาตลอดส่วนหาง การบีบตัวของไฟบริลจะทำให้ส่วนหางของตัวอสุจิเคลื่อนไหวพุ่งไปข้างหน้าได้ หางส่วนต้นเป็นบริเวณที่มีความหนาอยู่ต่อจากเซนตริโอลส่วนต้น ซึ่งมีเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรียปกคลุมอยู่ ภายในจะมีเอนไซม์ที่เปลี่ยนน้ำตาลฟรักโตส และแหล่งพลังงานอื่นให้เป็นส่วนประกอบที่มีพลังงานสูงเพื่อให้ตัวอสุจินำไปใช้ได้ หางส่วนปลายแตกต่างจากส่วนอื่นตรงที่ไม่มีเยื่อหุ้ม (Conrath and Musick, 2012)

ลักษณะตัวอสุจิของปลากระเบนจะมีส่วนหัวเรียวแหลมขดเป็นเกลียวคลื่น ทำให้มีการเคลื่อนที่ในลักษณะหมุนเป็นเกลียว ส่วนหางจะเป็นเกลียวน้อยกว่า ปลายทู่ ความยาวของตัวอสุจิในปลากระเบนขาว (White-edge freshwater whipray; *Himantura signifer*) ประมาณ 147 ไมโครเมตร โดยส่วนหัวยาว 45 ไมโครเมตร ส่วนลำตัวยาว 15 ไมโครเมตร และส่วนหางยาว 87 ไมโครเมตร (Chatchavalvanich et al., 2005b) จากการศึกษาโครงสร้างของตัวอสุจิปลากระเบนขาวด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) พบว่าอสุจิส่วนหัวมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ส่วนลำตัวมี ไมโตคอนเดรียล้อมรอบแกนกลาง มีเซนตริโอล 2 อัน วางตั้งฉากกันที่รอยต่อระหว่างหางกับลำตัว สำหรับเป็นจุดเริ่มต้นในการสร้างแกนส่วนหาง หางส่วนต้นมี axoneme เรียงตัว 9+2 และมีแกนตามยาว 2 แท่งขนาบข้าง หางส่วนปลายมีแต่ axoneme (Chatchavalvanich et al., 2005b)

2.4 ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราเมแทบอลิซึม (Metabolism) ของตัวอสุจิ

อายุขัยของตัวอสุจิในปลากระดูกอ่อนมีผู้ศึกษาน้อยมาก อย่างไรก็ตามปัจจัยที่มีผลต่ออัตราเมแทบอลิซึมของตัวอสุจิ ขณะที่อยู่ในร่างกายภายใน epididymis ตัวอสุจิอาจมีชีวิตอยู่ได้เป็นเดือน แต่ในน้ำเชื้อที่หลั่งออกมาภายนอกร่างกายและทิ้งไว้เฉยๆ ตัวอสุจิจะมีชีวิตอยู่ได้เพียงไม่กี่ชั่วโมงเท่านั้น การเก็บรักษาน้ำเชื้อภายในร่างกาย (sperm storage) มีประโยชน์ในสัตว์ที่มีการปฏิสนธิภายในร่างกาย พบในสัตว์เลือดเย็นเท่านั้น สำหรับเพศผู้จะอยู่ที่บริเวณ epididymis ส่วนในต่อมเวสซิคูล่า (seminal vesicle) พบหน้าที่นี้ได้ในสัตว์บางชนิด ในปลากระดูกอ่อนพบได้ในปลาฉลามชนิด Port Jackson shark (*Heterodontus portusjacksoni*) ปลาสเก็ตชนิด Clearnose skate (*Raja eglanteria*) ปลาช้างชนิด Elephant fish (*Callorhynchus milii*) ยังไม่พบการรายงานในปลากระเบนน้ำจืด (Chatchavalvanich et al., 2005a) ภายหลังจากปล่อยน้ำเชื้อเข้าสู่เพศเมียไปแล้ว ในเพศเมียเองก็มีกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อภายในร่างกายเช่นเดียวกัน ซึ่งมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด บางชนิดอาจเก็บได้นานหลายเดือนจนถึงหลายปี ขึ้นอยู่กับวิวัฒนาการและพฤติกรรมของสัตว์ เช่น สัตว์ที่มีฤดูผสมพันธุ์จะมีการรวมฝูงกันเพื่อผสมพันธุ์ ก่อนที่จะแยกย้ายกันไป เพศเมียที่มีการเก็บน้ำเชื้อไว้ภายในร่างกายจะสามารถออกไข่หรือออกลูกได้เองเรื่อยๆ เพื่อความอยู่รอดของเผ่าพันธุ์ สำหรับในปลากระดูกอ่อนก็มีกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อภายในร่างกายของเพศเมีย เช่น ปลาฉลามชนิด Gummy shark (*Mustelus antarcticus*) สามารถเก็บได้นาน 13 เดือน ปลาฉลามชนิด Chain dogfish (*Scyliorhinus rotifer*) สามารถเก็บได้นานถึง 2 ปี ซึ่งกลไกการทำงานยังไม่ชัดเจน ยังต้องมีการศึกษาอีกมาก ส่วนในปลากระเบนน้ำจืดยังไม่พบกระบวนการเก็บรักษาน้ำเชื้อภายในร่างกายของเพศเมีย (Holt and Lloyd, 2010)

อัตราที่ตัวอสุจิสามารถใช้พลังงานในการดำรงชีวิตขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและมีผลต่อช่วงอายุของตัวอสุจิเอง ทั้งนี้การเผาผลาญพลังงานขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายประการ (Alavi and Cosson, 2005; Alavi and Cosson, 2006) ได้แก่

1) อุณหภูมิ อุณหภูมิที่สูงขึ้นทำให้อัตราการเผาผลาญพลังงานสูงขึ้นและทำให้ชีวิตของตัวอสุจิสั้นลง ถ้าอุณหภูมิสูงเกิน 50 องศาเซลเซียส ตัวอสุจิจะสูญเสียการเคลื่อนไหวอย่างถาวร ถ้าลดอุณหภูมิอย่างถูกวิธีจะช่วยลดอัตราเมแทบอลิซึม และยืดอายุของน้ำเชื้อได้ ตัวอสุจิของสัตว์ทุกชนิดจะเกิดอาการช็อกถ้าลดอุณหภูมิในการเก็บเร็วเกินไป (cold shock) ทำให้ตัวอสุจิสูญเสียความสามารถในการเคลื่อนที่อย่างถาวร ปัญหาอีกประการคือ ตัวอสุจิอาจตายเพราะการแช่แข็ง (freezing) หรือการละลาย (thawing) เนื่องจากมีการทำลายของเยื่อหุ้มตัวอสุจิ การใช้สารป้องกันการแข็งตัวใน

น้ำเชื้อจะช่วยป้องกันอันตรายดังกล่าวได้ ถึงแม้ว่าจะมีจำนวนตัวอสุจิบางตัวตายบ้างแต่น้ำเชื้อนั้นก็ยังคงใช้ผสมได้ถ้าน้ำเชื้อที่ใช้มีตัวอสุจิมากพอก่อนการแช่แข็ง แต่การใช้สารป้องกันการแข็งตัวที่มากเกินไปอาจเป็นผลเสียต่อตัวอสุจิได้ ดังนั้นเมื่อมีการป้องกันอันตรายจากความเย็นที่ดี การลดอุณหภูมิจะช่วยลดอัตราเมแทบอลิซึมของตัวอสุจิ ทำให้สามารถเก็บรักษาตัวอสุจิไว้ได้นาน ถ้าเก็บน้ำเชื้อที่ไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) อัตราเมแทบอลิซึมจะลดลงเหลือน้อยกว่า 0.02% จากปกติในร่างกาย การเก็บน้ำเชื้อที่อุณหภูมินี้สามารถรักษาความสามารถในการปฏิสนธิไว้ได้หลายปี

2) พีเอช (pH) ที่ 7.0 เป็นระดับที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของเอนไซม์ในตัวอสุจิ ดังนั้นในน้ำเชื้อที่มีพีเอชใกล้เคียง 7.0 จะมีอัตราเมแทบอลิซึมสูง ถ้าพีเอชเป็นกรดหรือด่างจะทำให้อัตราเมแทบอลิซึมลดลง แต่การเปลี่ยนระดับพีเอชต้องไม่มากเกินไปจนกระทั่งเป็นอันตรายต่อตัวอสุจิ การใช้สารเจือจางน้ำเชื้อที่มีระบบบัฟเฟอร์จะทำให้น้ำเชื้อทนต่อการเปลี่ยนแปลงของพีเอชได้ ซึ่งช่วยให้การเก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานขึ้น

3) ระดับความดันออสโมซิส (osmosis) น้ำเชื้อจะมีอัตราเมแทบอลิซึมสูงสุดถ้าเจือจางด้วยสารละลายที่มีความเข้มข้นเท่ากับน้ำเชื้อ (isotonic) แต่ถ้าเจือจางด้วยสารละลายที่เข้มข้นมากกว่า (hypertonic) หรือเจือจางน้อยกว่า (hypotonic) จะช่วยลดอัตราเมแทบอลิซึมของตัวอสุจิลงได้ แต่ไม่ช่วยยืดอายุของน้ำเชื้อเพราะเยื่อหุ้มตัวอสุจินั้นยอมให้น้ำซึมผ่านได้ (semi-permeable) แรงดันออสโมซิสที่เปลี่ยนไปจะมีผลทำให้น้ำซึมเข้าออกจากเซลล์ได้ ทำให้เซลล์แตก ดังนั้นจึงต้องใช้สารละลายที่มีความเข้มข้นเท่ากับน้ำเชื้อในทุกกรณี

4) ความเข้มข้นของตัวอสุจิ ถ้าเพิ่มจำนวนตัวอสุจิต่อปริมาณน้ำเชื้อให้สูงขึ้นกว่าปริมาณที่พบในการหลั่งแบบธรรมชาติจะทำให้อัตราเมแทบอลิซึมลดลง โพแตสเซียม (K^+) เป็นไอออนหลักในตัวอสุจิ ขณะที่โซเดียม (Na^+) เป็นไอออนหลักในน้ำเลี้ยงอสุจิ การเพิ่มจำนวนตัวอสุจิจะเป็นการเพิ่มอัตราส่วน K:Na ในน้ำเชื้อ โดยที่โพแตสเซียมเป็นตัวยับยั้งขบวนการเมแทบอลิซึม ดังนั้นการเพิ่มปริมาณโพแตสเซียมโดยการเพิ่มตัวอสุจิ จะเป็นการยับยั้งขบวนการเมแทบอลิซึมในน้ำเชื้อ การเจือจางน้ำเชื้อในระดับปานกลางก่อนการลดอุณหภูมิด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีฟรักโตส และมีความเข้มข้นเท่ากับน้ำเชื้อไม่มีผลต่ออัตราเมแทบอลิซึม แต่จะยืดอายุของน้ำเชื้อ อย่างไรก็ตามถ้าเจือจางน้ำเชื้อมากเกินไป (>1:1,000) การเคลื่อนไหวและอัตราเมแทบอลิซึมของตัวอสุจิจะลดลง

5) ฮอร์โมน ฮอร์โมนเพศผู้ เช่น เทสโทสเตอโรน (testosterone) จะลดอัตราเมแทบอลิซึม แต่ความเข้มข้นของฮอร์โมนนี้ที่พบในทางเดินระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ไม่ได้ก่อให้เกิดผลกระทบต่อตัวอสุจิ ของเหลวจากอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียจะเพิ่มปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมของตัวอสุจิ ทั้งนี้เป็นผลมาจาก

ฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen) และปัจจัยอื่นๆ การเพิ่มอัตราเมแทบอลิซึมของตัวอสุจิในทางเดินอวัยวะเพศเมีย จะเพิ่มอัตราการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิทำให้ตัวอสุจิมีโอกาสสัมผัสกับไข่ได้มากขึ้น

6) ก๊าซ ปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ที่มีความเข้มข้นต่ำ จะกระตุ้นอัตราเมแทบอลิซึมที่ไร้ออกซิเจนของตัวอสุจิ แต่ถ้าแรงดันของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกิน 5–10 % จะกดอัตราเมแทบอลิซึม ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นตัวควบคุมอัตราเมแทบอลิซึมใน epididymis ส่วนก๊าซอ๊อกซิเจน (O_2) มีความจำเป็นในขบวนการเมแทบอลิซึมแบบใช้อากาศ (aerobic) แต่ถ้ามีก๊าซอ๊อกซิเจนเข้มข้นมากไปก็จะเกิดความเป็นพิษและกดอัตราเมแทบอลิซึมได้

7) แสงสว่าง สามารถลดอัตราเมแทบอลิซึม ลดการเคลื่อนไหว และลดอัตราการผสมติดของตัวอสุจิ โดยเฉพาะในสภาพที่มีก๊าซอ๊อกซิเจนอยู่ด้วย เพราะจะเกิดปฏิกิริยาทางเคมีที่ทำให้เกิด Hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ ดังนั้นจึงไม่ควรให้น้ำเชื้อถูกแสงโดยตรงเฉพาะแสงแดด

8) ยาปฏิชีวนะ การเติมยาปฏิชีวนะบางชนิดในน้ำเชื้อ เช่น Gentamycin หรือ Pennicillin-Streptomycin เพื่อควบคุมแบคทีเรีย ยังไม่พบว่ามีผลต่ออัตราเมแทบอลิซึมของตัวอสุจิ ประโยชน์ของการเติมยาปฏิชีวนะจะเป็นการช่วยยืดอายุของน้ำเชื้อโดยการควบคุมแบคทีเรีย ซึ่งจะช่วยรักษาแหล่งพลังงานสำหรับตัวอสุจิไว้ได้

2.5 การรีดเก็บน้ำเชื้อ

จุดประสงค์ที่สำคัญของการรีดเก็บน้ำเชื้อเพื่อให้ได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพสูงที่สุดและมีปริมาณมากที่สุด กระบวนการรีดเก็บน้ำเชื้อจะมีผลโดยตรงต่อปริมาณและคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บได้ในแต่ละครั้ง หากมีการรีดเก็บน้ำเชื้อดีก็จะทำให้ได้น้ำเชื้อมีคุณภาพดีเท่าที่พ่อพันธุ์ตัวนั้นจะมีได้ หรือถ้าการรีดเก็บน้ำเชื้อมีความบกพร่องก็จะทำให้คุณภาพและปริมาณน้ำเชื้อลดลงมาตามส่วนได้เช่นกัน ดังนั้นผู้รีดเก็บน้ำเชื้อไม่จำเป็นต้องคำนึงถึงแต่การรีดเก็บน้ำเชื้อให้บ่อยที่สุดหรือมากตัวต่อชั่วโมง เนื่องจากน้ำเชื้อที่รีดเก็บได้อาจมีคุณภาพไม่ดีพอที่จะทำการเก็บรักษาหรือนำไปใช้งาน สิ่งสำคัญที่ต้องคำนึงถึงก็คือ เมื่อรีดเก็บแล้วได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีที่สุด สามารถนำไปใช้งานต่อได้ แต่ถ้าผู้รีดพยายามทำการรีดอย่างดีและได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีแต่มีปริมาณน้อยก็อาจไม่ได้ประโยชน์ เนื่องจากปริมาณน้ำเชื้อนั้นน้อยเกินกว่าที่จะนำไปดำเนินการเก็บรักษาน้ำเชื้อ (Kutzler, 2005)

วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อในสัตว์บก มี 3 วิธี (King and Macpherson, 1973; Kutzler, 2005; Curry, 2007) ได้แก่

1) การใช้มือบีบนวดบริเวณอวัยวะเพศ (gloved hand method หรือ digital manipulation) เป็นการนวดโดยตรงที่อวัยวะเพศโดยสวมถุงมือบาง มักใช้ในการรีดน้ำเชื้อสุนัขและสุกร ส่วนในสัตว์ปีก เช่น เป็ดและไก่ จะใช้การลูบเบาๆอย่างรวดเร็วที่ด้านหลังจากปีกทั้งสองข้างไปยังหาง เมื่ออวัยวะเพศพร้อมค่อยใช้มือบีบรูทวารรวม ซึ่งการรีดด้วยมือนี้อาจต้องทำการฝึกสัตว์ก่อนในระยะแรกโดยใช้สัตว์เพศเมียที่เป็นสัดเป็นตัวกระตุ้นหรือใช้ตัวล่อ นอกจากนี้อาจทำการนวดต่อมเพศในอุ้งเชิงกราน เช่น ต่อมเวสซิคูล่า หรือ ต่อมลูกหมาก (prostate gland) โดยการล้วงผ่านทางผนังทวารหนักในสัตว์ใหญ่ เช่น โค โดยที่สัตว์ต้องได้รับยาซึมก่อนเพื่อให้อวัยวะเพศโผล่ออกมาและมีความสะดวกในการทำงาน

2) การใช้ช่องคลอดประดิษฐ์ (artificial vagina; AV) เป็นวิธีที่เร็วและสะอาดที่สุด มักใช้ในการรีดน้ำเชื้อโค ม้า แกะ แพะ กระต่าย หรือ แมว ให้ความรู้สึกคล้ายช่องคลอดจริง วิธีการรีดเก็บจะใช้การเลียนแบบกระบวนการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ โดยให้เพศผู้สอดอวัยวะเพศเข้าไปในช่องคลอดประดิษฐ์ ดังนั้นอุณหภูมิ ความอ่อนนุ่มและการหล่อลื่น AV จึงเป็นสิ่งสำคัญ ตัว AV มักทำด้วยท่อยางแข็ง หลอดเก็บน้ำเชื้อต้องมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิร่างกายและต้องมีถุงหุ้ม (jacket) เพื่อช่วยรักษาอุณหภูมิและกันแสง ภายใน AV ต้องมีการหล่อลื่นก่อนการใช้งาน สารหล่อลื่นที่นิยมใช้ เช่น K-Y jelly ไม่ควรใช้สารหล่อลื่นในปริมาณที่มากเกินไปเพราะจะทำให้สารหลุดไปผสมกับน้ำเชื้อที่หลอดเก็บ และทำให้ตัวอสุจิจับกลุ่มกัน

3) การใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งด้วยไฟฟ้า (Electroejaculation) อุปกรณ์ที่ใช้ประกอบด้วย electrode ที่มี 2 ขั้ว และเครื่องควบคุมกระแสไฟฟ้า ซึ่งมีไฟขนาด 0-30 โวลต์ และกระแสไฟฟ้า 0.5-1 แอมป์ โดยสอดเข้ากระตุ้นต่อมเพศผ่านทางทวารหนัก เมื่อสอด electrode เข้าแล้วให้ทำการกระตุ้นด้วย voltage ที่ต่ำก่อน จึงค่อยๆ เพิ่ม ก่อนที่จะเพิ่มจะต้องปรับกระแสไปที่ระดับ 0 ก่อนทุกครั้ง ในการกระตุ้นควรกระตุ้นให้เป็นจังหวะ จังหวะละประมาณ 4 วินาที การปรับจังหวะให้กระทำไปอย่างต่อเนื่องจนกว่าพ่อพันธุ์จะหลั่งน้ำเชื้อออกมา น้ำเชื้อที่ได้จากการกระตุ้นด้วยไฟฟ้าจะมีปริมาตรมาก แต่มีความเข้มข้นของอสุจิต่ำกว่าเมื่อเทียบกับการใช้ช่องคลอดเทียม แต่อัตราการผสมติดไม่แตกต่างกัน มักใช้วิธีนี้ในกรณีสัตว์พิการหรือไม่สามารถขึ้นขี่ตัวล่อได้ หรือสัตว์ที่ไม่คุ้นเคยกับการรีดน้ำเชื้อ ถ้าในสัตว์ที่ดุร้ายสามารถวางยาสลบก่อนได้

วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อในสัตว์น้ำ มี 4 วิธี (Kopeika et al., 2007) ได้แก่

1) รีดโดยตรงจากตัวสัตว์ โดยกดและนวดเบาๆตรงส่วนท้อง น้ำเชื้อจะไหลออกมา อาจใช้การวางยาสลบช่วยให้สัตว์ไม่ดิ้น เช่น ปลากลุ่มปลาไน (Carp) (Horváth et al., 2003)

2) ใช้เข็มฉีดยาหรือท่อพลาสติกดูดจากช่องเปิดของน้ำเชื้อ (urogenital pore) เช่น ปลาสเตอร์เจียน ปลาบึก ปลาเทราต์ อาจใช้การวางยาสลบช่วยให้สัตว์ไม่ดิ้น วิธีนี้จะช่วยป้องกันการปนเปื้อนของน้ำเชื้อได้ดีกว่า (Glogowski et al., 2000)

3) ผ่าท้องเพื่อนำอัณฑะไปบดแยกเพื่อเอาน้ำเชื้อออกมา มักใช้กับปลาที่มีน้ำเชื้อน้อยหรือไม่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ เช่น ปลากลุ่ม Catfish แต่จะเป็นการสิ้นเปลืองพ่อพันธุ์ (Horváth and Urbányi, 2000)

4) การใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งด้วยไฟฟ้า (Electroejaculation) มักใช้ในสัตว์น้ำขนาดใหญ่ เช่น โลมาปากขวด Atlantic bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*) อย่างไรก็ตามโลมาเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีอวัยวะสืบพันธุ์คือ องคชาติ (penis) ที่หดอยู่ในร่างกาย จะแสดงออกมาเมื่อได้รับแรงกระตุ้น (Fleming et al., 1981)

ที่ผ่านมาการศึกษาเรื่องของน้ำเชื้อในปลากระดูกอ่อนมีน้อยมาก ตัวอสุจิของปลากระเบนขาว (White-edge freshwater whipray; *Himantura signifer*) ถูกนำมาศึกษาโดยใช้วิธีเปิดผ่าหน้าท้อง (Chatchavalvanich et al., 2005b)

2.6 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

ก่อนจะนำน้ำเชื้อที่รีดได้ไปใช้งานต่อ จำเป็นต้องมีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อก่อน ซึ่งจะสามารถบอกความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อที่จะนำมาเพาะพันธุ์ได้ โดยมีวิธีการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ 6 วิธี (Rakitin et al., 1999; Rurangwa et al., 2004; Agarwal and Raghuvanshi, 2009; Viveiros and Godinho, 2009; Fauvel et al., 2010; Chew and Zulkafli, 2012) ดังนี้

2.6.1 ลักษณะทางกายภาพของน้ำเชื้อ ควรสังเกตทันทีหลังจากรีดน้ำเชื้อออกมา โดยดูจาก

1) สี น้ำเชื้อที่รีดได้ อาจมีสีตั้งแต่สีเทา สีเทาเข้ม สีขาวเข้มหรือขาวเหลือง น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีจะมีสีเทาเข้ม หรือสีขาวเข้ม

2) ปริมาตร โดยปัจจัยที่ทำให้ได้น้ำเชื้อปริมาณมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับ

- อายุ สัตว์ที่มีอายุน้อยให้น้ำเชื้อมีปริมาตรน้อยกว่าสัตว์ที่มีอายุมาก
- ขนาดของสัตว์ สัตว์ขนาดเล็กให้น้ำเชื้อแต่ละครั้งน้อยกว่าสัตว์ขนาดใหญ่

- พันธุ์สัตว์ สัตว์ต่างพันธุ์กันปริมาตรน้ำเชื้อแตกต่างกัน
- จำนวนครั้งการรีดน้ำเชื้อต่อสัปดาห์ การรีดน้ำเชื้อบ่อยครั้งจะทำให้ปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดได้น้อยลง
- สภาพแวดล้อมและการเลี้ยงดูต่างกัน ปริมาตรน้ำเชื้อก็จะต่างกัน
- วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อที่ต่างกันปริมาตรน้ำเชื้อจะต่างกัน

3) ความหนืด (consistency) สามารถบอกความหนืดของน้ำเชื้อได้อย่างคร่าวๆ โดย

- ลักษณะคล้ายน้ำ (watery) มีความเข้มข้นของตัวอสุจิน้อย ไม่ควรนำไปใช้
- ไม่ทึบไม่ใส (translucent) ดีกว่าแบบน้ำ แต่คุณภาพยังต่ำอยู่
- คล้ายนม (milky) มีความหนืดเพิ่มขึ้น เป็นน้ำเชื้อมีคุณภาพดี นำไปใช้ผสมเทียม
- คล้ายครีม (creamy) มีความหนืดปานกลางคล้ายกับครีม เป็นน้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมาก นำไปใช้ผสมเทียมได้ดี
- คล้ายกาว (glue-like) มีความหนืดสูงมาก ปริมาตรน้อย ความเข้มข้นสูง แต่มักมีความผิดปกติของตัวอสุจิมาก ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้ผสมเทียมต่อไป

4) สิ่งแปลกปลอมอื่นๆ ในน้ำเชื้อที่คุณภาพไม่ดีอาจพบสิ่งแปลกปลอมปะปนได้ เช่น เลือด เศษเนื้อเยื่อ ปัสสาวะ และสารหล่อลื่น เป็นต้น

5) ความเป็นกรดเป็นด่าง หรือพีเอช อาจตรวจได้โดยใช้เครื่อง pH meter หรือใช้กระดาษลิตมัสโดยการเปรียบเทียบสี

2.6.2 การหาความเข้มข้นของน้ำเชื้อ (sperm concentration) เพื่อที่จะได้ทราบจำนวนตัวอสุจิทั้งหมดที่รีดได้แต่ละครั้งต่อหนึ่งหน่วยปริมาตร ที่สำคัญมี 3 วิธี คือ

1) การตรวจความทึบแสงโดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ช่วยในการประมาณจำนวนของตัวอสุจิ ซึ่งมีความรวดเร็วและแม่นยำ นำน้ำเชื้อที่รีดได้ไปผ่านเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ใช้หลักการแสงผ่านตัวอย่างได้มากเมื่อน้ำเชื้อเจือจาง และแสงผ่านตัวอย่างได้น้อยเมื่อน้ำเชื้อเข้มข้น หลังวัดค่าแสงได้แล้วนำมาคำนวณกลับเป็นค่าความเข้มข้นได้

2) วิธีการนับจำนวนเองโดยใช้เครื่องนับเม็ดเลือดแดง (hemocytometer) ใช้หลักการเจือจางน้ำเชื้อและนับอสุจิที่มีอยู่จริง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า ทำให้ทราบจำนวนต่อปริมาตรที่แน่นอน เมื่อคำนวณกลับก็จะได้ค่าความเข้มข้นตามต้องการ ใน 1 ตาราง

มิลลิเมตร จะมี 25 ตารางใหญ่ ในแต่ละตารางใหญ่จะมี 16 ตารางเล็ก เมื่อปิดด้วยกระจกบาง (cover glass) จะมีช่องที่น้ำเชื้ออยู่ได้ลึก 0.1 มิลลิลิตร ดังนั้นปริมาตรของตาราง 25 ช่อง จะมีปริมาตรน้ำเชื้อเจือจาง 1/10,000 มิลลิลิตร แต่ต้องทำให้ตัวอสุจิตายเสียก่อนเพื่อง่ายในการนับ แล้วเจือจางในอัตราส่วนที่แน่นอน วิธีนี้มีความแม่นยำแต่ค่อนข้างใช้เวลา

3) การประเมินความเข้มข้นของอสุจิด้วยการดู spermatocrit โดยการเก็บน้ำเชื้อใส่ microhaematocrit tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง จะเกิดตะกอนของตัวอสุจิอัดแน่นขึ้น ค่าที่อ่านได้จะเป็นเปอร์เซ็นต์ของอสุจิอัดแน่นต่อปริมาตรน้ำเชื้อที่รีดได้

2.6.3 การตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว (percentage of motile sperm) โดยหยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นสไลด์แล้วปิดด้วยกระจกบาง ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (100 เท่า) ดูเฉพาะตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าเท่านั้น ถือว่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเคลื่อนไหว แล้วให้คะแนน ส่วนใหญ่คะแนนมากมักจะหมายถึงการเคลื่อนที่ที่ดี

ลักษณะที่พบ	**คะแนน**
น้ำเชื้อเคลื่อนไหวน้อย (0-20%)	1
น้ำเชื้อเคลื่อนไหวได้ (21-40%)	2
น้ำเชื้อเคลื่อนไหวปานกลาง (41-60%)	3
น้ำเชื้อเคลื่อนไหวมาก (61-80%)	4
น้ำเชื้อเคลื่อนไหวมากที่สุด (81-100%)	5

2.6.4 การย้อมสีตัวเป็นตัวตาย (the live-dead sperm count) ทำได้โดยการย้อมสี ซึ่งสีที่ใช้ย้อมได้แก่ Eosin B-Nigrosin, Trypan blue โดยมีหลักการ คือ ตัวอสุจิที่ตาย ผนังเซลล์จะเสื่อมสภาพ ยอมให้สีซึมเข้าสู่ผนังเซลล์ได้ ซึ่งตัวอสุจิที่ตายจะติดสี ส่วนตัวอสุจิที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี จากนั้นทำการนับตัวอสุจิที่มีชีวิตในน้ำเชื้อนี้ ควรตรวจดูอสุจิจากหลาย ๆ บริเวณบนสไลด์ นับตัวอสุจิประมาณ 300 ตัว โดย ใช้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1,000 เท่า ซึ่งต้องใช้ oil emersion หยดบนแผ่นสไลด์ แล้วคิดเป็นร้อยละของตัวอสุจิที่มีชีวิต สีย้อมอื่นๆที่ใช้ย้อมเพื่อดูตัวเป็นตัวตาย เช่น Eosin B Opal Blue, Eosin B – Fast Green F C F, Eosin B – Aniline Blue, Revector Soluble Blue เป็นต้น (Hackett and Macpherson, 1965)

2.6.5 การตรวจรูปร่างของอสุจิ โดยปกติในน้ำเชื้อจะมีตัวอสุจิที่มีรูปร่างผิดปกติประมาณ 5% นอกจากนี้น้ำเชื้อที่มีตัวอสุจิผิดปกติไม่เกิน 20-25% จะไม่มีผลกระทบกระเทือนต่ออัตราการผสมติด การตรวจความผิดปกติของอสุจิที่ส่วนหัว มักนิยมย้อมสีโดยวิธีวิลเลียม (William's method) ซึ่งจะทำให้พบความผิดปกติของอสุจิได้ชัดเจน ส่วนการตรวจหาความผิดปกติของอสุจิที่ส่วนหาง นิยมทำการดองด้วยน้ำยาฟอร์มอล (Formal saline) การตรวจเซลล์ที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อ นิยมทำการย้อมด้วยสี Haematoxylin-Eosin เป็นการย้อมเพื่อตรวจดูเซลล์ที่ปะปนมาในน้ำเชื้อ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ชนิดอื่น สีย้อมอื่นๆ ที่นิยมใช้ย้อมเพื่อดูรูปร่างของอสุจิ เช่น Rose Bengal, Belling's Iron Aceto-carmine, Alkaline Methyl–Violet Solution, India Ink, Giemsa Stain และ Heidenhain's Iron Hematoxylin เป็นต้น (Hackett and Macpherson, 1965)

ยกตัวอย่างลักษณะที่ผิดปกติของอสุจิในโคพ่อพันธุ์ (Whittier and Bailey, 2000) มีดังนี้

1) ลักษณะผิดปกติปฐมภูมิ (primary abnormalities) โดยตัวอสุจิจะผิดปกติตั้งแต่อยู่ในอัณฑะ ซึ่งพบลักษณะผิดปกติที่ส่วนหัว ได้แก่ หัวกิ่วที่บริเวณที่ส่วนต่อกับส่วนลำตัว (pyriform หรือ pear-shaped) หัวกลม (round) หัวยาว (elongated หรือ slender) หัวเล็กกว่าปกติ (micocephalic หรือ small) หัวโตกว่าปกติ (macocephalic หรือ giant) มี 2 หัว (double หรือ twin) มีอะโครโซมผิดปกติ (abnormal acrosome) ลักษณะผิดปกติที่ส่วนลำตัว ได้แก่ การโค้งงอ (bent) มี 2 หาง (double) ลำตัวบวม (swollen) ตำแหน่งไม่อยู่ในศูนย์กลางของหัว (off center attachment) ลักษณะผิดปกติที่ส่วนหาง ได้แก่ หางม้วน (coiled หรือ curled) หาง 2 แฉก (double tail)

2) ลักษณะผิดปกติแบบทุติยภูมิ (secondary abnormalities) เป็นความผิดปกติที่ปรากฏภายหลังผ่านท่อผลิตอสุจิแล้ว คือความผิดปกติที่เกิดภายนอกอัณฑะ เกิดขึ้นในระบบท่อ ได้แก่ หัวขาด (detached heads) มีเม็ดตุ่มที่คอหรือที่หาง (protoplasmic droplet on the neck or tail) หางพับงอ (shock hook tail) ไม่มีอะโครโซม (loose cap from the head)

2.6.6 การตรวจการปนเปื้อนของจุลชีพในน้ำเชื้อ จุลชีพในน้ำเชื้อหมายถึง แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีอ๊อกซิเจนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในอาหารเลี้ยงเชื้อ การตรวจการปนเปื้อนของจุลชีพในน้ำเชื้อ เป็นการตรวจสุขอนามัยในการผลิตน้ำเชื้อเพื่อใช้ผสมเทียม

บ่งชี้ถึงความสะอาดของพ่อพันธุ์ บริเวณรีดเก็บน้ำเชื้อ อุปกรณ์การรีดเก็บน้ำเชื้อ การรักษาความสะอาดของผู้ทำการรีดเก็บน้ำเชื้อ กระบวนการผลิตน้ำเชื้อและความสะอาดของห้องปฏิบัติการ แม้ว่าในสารเจือจางน้ำเชื้อจะมียาปฏิชีวนะเป็นส่วนผสม แต่ถ้ากระบวนการผลิตไม่ถูกสุขอนามัยหรือมีการปนเปื้อนของจุลชีพสูง ยาปฏิชีวนะที่ใส่จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพที่ปนเปื้อนได้หมด เนื่องจากปริมาณจุลชีพในน้ำเชื้อสดที่นำมาผลิตและในน้ำเชื้อแช่แข็งมีความสัมพันธ์กัน น้ำเชื้อที่ดีจึงไม่ควรมีเชื้อจุลชีพที่อาจก่อให้ เกิดโรคปนเปื้อนอยู่

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่องตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อ (Computer Assisted Semen Analyzer, CASA) เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อที่สามารถให้รายละเอียดของคุณภาพน้ำเชื้อที่ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยสายตาในเวลารวดเร็ว เครื่องนี้ใช้ระบบกล้องถ่ายภาพที่มีความเร็วสูง 1/1000 วินาทีในการจับภาพการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิและนำมาวิเคราะห์ทิศทางการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ พร้อมกับประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ซึ่งมีโปรแกรมการตรวจวิเคราะห์คุณภาพน้ำเชื้อของสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น โค แพะ แกะ สุกร ม้า เป็นต้น ทำให้สามารถทราบความเร็วในการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (velocity) เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (motility) เปอร์เซ็นต์ของตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้า (progressive motility) ลักษณะการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ (kinetic movement) เช่น การเคลื่อนที่ตรงไปข้างหน้า การเคลื่อนที่ผิดปกติ ส่ายไปมา หมุน เป็นวง ถอยหลัง เป็นต้น นอกจากนี้ยังสามารถทราบความเข้มข้นของน้ำเชื้อ และจำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตและตายได้อีกด้วย (Verstegen et al., 2002)

การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ (Flow Cytometer) ใช้หลักการของแสงเลเซอร์ และการย้อมสีตัวอสุจิเพื่อให้ตรวจสอบได้ด้วยแสงเลเซอร์ สามารถตรวจสอบได้ว่าตัวอสุจิยังมีอะโครโซมที่สมบรูณ์ (acrosome intact) หรืออะโครโซมเสียหาย (acrosome damaged) ตรวจสอบความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มตัวอสุจิ (plasma membrane integrity) และการหดตัวของดีเอ็นเอของตัวอสุจิ (DNA condensation) การตรวจด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์จะต้องเตรียมน้ำเชื้อที่จะตรวจด้วยการย้อมสีตัวอสุจิก่อน วิธีการย้อมมีหลายวิธี เช่น วิธี double-stain ที่ใช้สีย้อมชนิด FITC-PNA/PI (Fluorescein isothiocyanate-conjugated peanut agglutinin/ Propidium iodide) หรือวิธี triple-stain ซึ่งใช้สีย้อมชนิด SYBR-14/PE-PNA/PI (Phycoerythrin-conjugated peanut agglutinin/ Propidium iodide) เป็นต้น มีรายงานเปรียบเทียบวิธีย้อมสีทั้งสองวิธีใน

น้ำเชื้อแช่แข็งโค และนำมาตรวจด้วยเครื่องโฟลไซโตมิเตอร์ พบว่าวิธี triple-stain ให้ความแม่นยำกว่าวิธี double-stain (Nagy et al., 2003)

2.7 การเจือจางน้ำเชื้อ

หลังจากทำการรีดเก็บน้ำเชื้อและทำการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อแล้ว จะเห็นว่าน้ำเชื้อมีลักษณะข้นมากและมีปริมาณน้อย จึงต้องทำการเจือจางน้ำเชื้อ เพื่อให้เพียงพอที่จะนำไปผสมกับแม่พันธุ์หลายๆ ตัว สารที่จะใส่ผสมไปกับน้ำเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อนั้น เรียกว่า สารเจือจางน้ำเชื้อ (extenders) สารเจือจางน้ำเชื้อที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ มีความดันของสารละลายใกล้เคียงกับกับน้ำเชื้อ (isotonic) หากความดันของสารละลายสูงหรือต่ำเกินไป หางตัวอสุจิจะงอ เคลื่อนที่วน และตาย ความดันดังกล่าวจะเท่ากับความเข้มข้นของเกลือในกระแสเลือดหรือของเหลวในร่างกายสัตว์ปกติด้วย ไม่เป็นพิษต่อตัวอสุจิ เตรียมได้ง่าย จัดหาง่าย ราคาไม่แพง มีสารอาหารให้อสุจิเป็นแหล่งพลังงาน ทำให้ตัวอสุจิมีชีวิตอยู่ได้นานขึ้น เก็บรักษาง่าย เตรียมไว้ใช้ได้นาน เป็นตัวปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อให้คงที่ได้ดี เพราะในขณะที่ตัวอสุจิมีการเคลื่อนไหวจะมีการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ก๊าซอ๊อกซิเจน ทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น ซึ่งกรดแลคติกที่เกิดขึ้นนี้เองจะทำให้ความเป็นกรด-ด่างของน้ำเชื้อเปลี่ยนไป ซึ่งถ้าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงมาก จะทำให้ตัวอสุจิตายได้ และเพื่อป้องกันความเสียหายแก่ตัวอสุจิระหว่างการแช่แข็ง และการทำละลายในกระบวนการการผลิตน้ำเชื้อแช่แข็ง นอกจากนี้ในสารเจือจางน้ำเชื้อมักมียาปฏิชีวนะผสมอยู่ด้วย เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของเชื้อโรคต่างๆ (Gadea, 2003)

ประเภทของสารเจือจางน้ำเชื้อ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ สารเจือจางน้ำเชื้อจากธรรมชาติ เช่น นมสด หางนม และนมผง ซึ่งก่อนการนำสารละลายไปใช้ต้องฆ่าเชื้อด้วยการพาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 92-95 องศาเซลเซียส นาน 8-10 นาที เพื่อกำจัดปัจจัยที่เป็นพิษต่อตัวอสุจิ สารเจือจางน้ำเชื้อสังเคราะห์มักจะผสมมาเป็นสูตรต่างๆ วัตถุดิบที่ใช้เป็นสารสังเคราะห์มาผสมกับวัตถุดิบธรรมชาติในอัตราส่วนต่างๆ ซึ่งในปัจจุบันมีจำนวนหลายพันสูตร และมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด สารเจือจางน้ำเชื้อที่ดีควรจะมีค่าออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกับของเหลวในน้ำเชื้อสัตว์ชนิดนั้นๆ ซึ่งปลาแต่ละกลุ่มมีค่าออสโมลาลิตี้แตกต่างกันเช่น 280–300 mOsm/kg สำหรับกลุ่มปลาน้ำจืด และ 200–300 mOsm/kg สำหรับปลาน้ำเค็ม (Wayman and Tiersch, 2011) สารที่ใช้เก็บรักษาน้ำเชื้อปลาในปัจจุบันมีหลายสูตร บางสูตรมีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดปลา บางสูตรสามารถใช้ได้กับปลาหลายชนิด เช่น สูตร 0.9 % NaCl หรือ Normal saline เหมาะกับกลุ่มปลาตะเพียน (Chew and Zulkafli, 2012) สูตร Modified Cortland (MC) เหมาะกับปลาน้ำจืดเกือบทุกชนิด (Viveiros and

Godinho, 2009) สูตร Calcium-free Hank's balanced salt solution (Ca-F HBSS) เหมาะกับกลุ่มปลาสวาย (Riley et al., 2004) สูตร Modified Zhang and Liu (MZL) เหมาะกับกลุ่มปลาไน (Ji et al., 2004) เป็นต้น ส่วนในปลากระดูกอ่อนที่ยังมีการศึกษาอยู่น้อยมาก มีรายงานการใช้ Elasmobranch ringer solution เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อใน Clearnose skate, *Raja eglanteria* (Luer et al., 2009)

2.8 การเก็บรักษาน้ำเชื้อ

การเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลามี 2 แบบ เช่นเดียวกันกับวิธีการเก็บรักษาน้ำเชื้อในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม คือ เก็บน้ำเชื้อสดไว้ในระยะเวลาสั้นๆ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส กับอีกวิธีหนึ่งเป็นการเก็บแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส

2.8.1 การเก็บรักษาแบบแช่เย็น (chilled storage หรือ Short-term storage) ตัวอย่างน้ำเชื้อต้องได้รับการเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ในน้ำแข็งหรือตู้เย็นและควบคุมไม่ให้น้ำเชื้อแข็งตัว สามารถเก็บได้นาน 3-7 วันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยผสมน้ำเชื้อกับสารเจือจางน้ำเชื้อในอัตราส่วนต่างๆ บรรจุลงในภาชนะ แล้วค่อยๆลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ ภาชนะที่บรรจุน้ำเชื้อควรมีลักษณะที่เป็นภาชนะทรงตื้น มีฝาปิด และมีออกซิเจนเพียงพอต่อตัวอสุจิขณะทำการเก็บรักษา และทำการตรวจสอบดูไม่ให้น้ำเชื้อนอนก้นอันเป็นสาเหตุให้เซลล์ที่อยู่ข้างล่างไม่ได้รับออกซิเจนอย่างพอเพียง จึงต้องทำการเขย่าเบาๆทุกวัน (Gadea, 2003; Wayman and Tiersch, 2011)

2.8.2 การเก็บรักษาแบบแช่แข็ง (Freezing หรือ Long-term storage) หลักการคือการทำให้น้ำในสภาพที่เป็นของเหลวกลายเป็นผลึกน้ำแข็ง นิยมเก็บในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายปัจจัย (Kopeika et al., 2007; Wayman and Tiersch, 2011) ดังนี้

1) สารป้องกันการแข็งตัว (Cryoprotectant) เป็นสารเคมีที่ป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเสียหายในระหว่างกระบวนการแช่แข็งและการทำให้ละลาย เนื่องจากการแข็งตัวของน้ำภายในและนอกเซลล์ ทำให้เสียคุณสมบัติการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ (permeability) ความเป็นกรด-ด่างจะเปลี่ยนแปลงไป คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของสารป้องกันการแข็งตัว จะต้องมีคุณสมบัติในการละลายน้ำและความเป็นพิษต่ำต่อเซลล์ แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ออกฤทธิ์ภายในเซลล์ (permeating cryoprotectant) ได้แก่ Dimethyl sulfoxide (DMSO), Glycerol, Methanol, Ethanol, Propylene glycol เป็นต้น สารเคมีเหล่านี้จำเป็นต้องซึมผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ เพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายไม่ให้เกิดเกล็ดน้ำแข็งขณะแช่แข็ง หาก

พิจารณาถึงความสามารถในการแพร่เข้าสู่ภายในเซลล์ สารประเภทแอลกอฮอล์จะมีอัตราการแพร่สูงสุด รองลงมา ได้แก่ DMSO และ Glycerol ตามลำดับ แต่สารเหล่านี้ก็มีความเป็นพิษต่อเซลล์และเนื้อเยื่อเช่นเดียวกัน กลุ่มที่ 2 ออกฤทธิ์ภายนอกเซลล์ (non-permeating cryoprotectant) ได้แก่ Polyvinyl pyrrolidone (PVP), Hydroxyethyl starch (HES), Dextrans, Albumin และ Polyethylene glycol เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้ไม่ได้ผ่านเข้าสู่เซลล์ แต่จะใช้ร่วมกับ permeating cryoprotectant เพื่อเป็นตัวปรับแรงดันออสโมติก และทำหน้าที่เป็นสารป้องกันการแข็งตัวร่วมกัน สารเหล่านี้มีผลต่อคุณสมบัติของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ คือ มีผลต่อแรงดันไอ (vapor pressure) จุดเยือกแข็ง (freezing point) และปรับแรงดันออสโมติกของของเหลวภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวจะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังจากการแช่แข็งได้ เพราะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภาย ในเซลล์ ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ ป้องกันอันตรายเนื่องจากความไม่สมดุลของเกลือแร่และอิเล็กโตรไลท์ คงไว้ซึ่งคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อหุ้มออร์แกเนลล์

สารป้องกันการแข็งตัวที่นิยมใช้ในการแช่แข็งน้ำเชื้อปลา ได้แก่ DMSO และ Glycerol แต่อย่างไรก็ตามพบว่าอัตราการปฏิสนธิเกิดขึ้นประมาณ 50% เท่านั้น (Urbányi et al., 1999; Horváth and Urbányi, 2000; Chereguini et al., 2001; Kwantong and Bart, 2003) การทดลองน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งพบว่า 10% DMSO เป็นสารป้องกันการแข็งตัวที่เหมาะสมให้อัตราการเคลื่อนที่และอัตราการปฏิสนธิเท่ากับ 35.2±7.1% และ 78.0±18.0% ตามลำดับ (Lahnsteiner et al., 2000; Linhart et al., 2000)

2) ช่วงเวลาปรับตัวหลังจากการผสมน้ำเชื้อกับสารป้องกันการแข็งตัวจากขบวนการแช่แข็งก่อนทำการแช่แข็ง เพื่อให้เกิดภาวะสมดุลย์ (Equilibration time)

3) อัตราการลดอุณหภูมิ (Freezing rate) ในระหว่างขบวนการแช่แข็งและการละลายจะมีการแพร่เข้าออกของน้ำระหว่างเซลล์และตัวกลาง พบว่าถ้าลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ ในระหว่างขบวนการแช่แข็งจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็ง ซึ่งเป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เซลล์ถูกทำลาย ในทางกลับกันถ้ามีการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วเซลล์อาจจะมีการช็อก (Cold shock) อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้น คืออัตราการลดอุณหภูมิที่จะป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์หรือให้เกิดน้อยที่สุด และอัตราการลดอุณหภูมิดังกล่าวจะต้องเป็นอัตราที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ อันเนื่องมาจากการสูญเสียน้ำและการตกผลึกของสารเคมีที่เป็นตัวถูกละลายภายในเซลล์ อันตรายที่เกิดจากการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ขณะทำการแช่แข็งคือการสูญเสียน้ำ

ที่จะเกิดขึ้นขณะลดอุณหภูมิจาก -15 องศาเซลเซียส ถึง -50 องศาเซลเซียส ซึ่งการลดอุณหภูมิอย่างรวดเร็วให้ผลดีกว่าการลดอุณหภูมิอย่างช้าๆ เพราะจะทำให้อสุจิมีอัตรารอดสูงขึ้น นอกจากนี้การลดอุณหภูมิแบบสองขั้นตอน (two-step freezing) คือ ขั้นแรกลดอุณหภูมิจากอุณหภูมิห้องหรือตู้เย็นลงสู่อุณหภูมิของไอไนโตรเจนเหลว (ประมาณ -50 องศาเซลเซียส ถึง -120 องศาเซลเซียส) และขั้นที่สองลดอุณหภูมิไปสู่อุณหภูมิของไนโตรเจนเหลวและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมินั้น (-196 องศาเซลเซียส) ซึ่งพบว่าได้ผลดีเช่นกัน จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าอัตราการฟักของน้ำเชื้อปลาไนแช่แข็งกับน้ำเชื้อสดแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ อยู่ที่ 52±9% และ 50±18% ตามลำดับ เมื่อใช้การลดอุณหภูมิแบบสองขั้นตอน โดยการลดอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก 4 องศาเซลเซียส ถึง -9 องศาเซลเซียส และลดอุณหภูมิที่ 11 องศาเซลเซียสต่อนาที จาก -9 องศาเซลเซียส ถึง -80 องศาเซลเซียส โดยแช่อยู่ในไอไนโตรเจนเหลว (-80 องศาเซลเซียส) รวม 6 นาที อัตราการลดอุณหภูมิในปลาแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกัน (Lahnsteiner et al., 2000; Tiersch et al., 2004b; Linhart et al., 2005)

4) อัตราการละลาย (thawing rate) อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการละลายน้ำเชื้อขึ้นกับอัตราการแช่แข็ง ความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัว องค์ประกอบของสารที่ใช้เจือจาง และ ช่วงเวลาปรับตัว (equilibration time) โดยทั่วไปจะทำการละลายน้ำเชื้อโดยแช่น้ำที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หรือทำการละลายโดยอุ่นใน Water bath ที่อุณหภูมิ 32-38 องศาเซลเซียส (Lahnsteiner et al., 2000; Wayman and Tiersch, 2011)

จะเห็นได้ว่าการศึกษาเรื่องเกี่ยวกับน้ำเชื้อในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ ยังมีการศึกษาอยู่เป็นจำนวนน้อยมากในด้านลักษณะรูปร่างทางกายภาพของตัวอสุจิปลากระเบน อีกทั้งยังไม่มีเคยมีผู้ใดศึกษามาก่อนในด้านวิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อจากสัตว์ที่ยังมีชีวิต การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ การหาสูตรที่เหมาะสมของสารเจือจางน้ำเชื้อ และอัตราส่วนของสารเจือจางน้ำเชื้อกับน้ำเชื้อต่อระยะเวลาในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนแบบแช่เย็น เนื่องจากการเลือกชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมจะช่วยยืดเวลาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้น แล้วยังสามารถใช้เจือจางเพื่อเพิ่มปริมาตรน้ำเชื้อได้ การหาชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัวที่เหมาะสมเพื่อใช้ในขั้นตอนการแช่แข็ง และการหาเทคนิคการเก็บรักษาและการละลายน้ำเชื้อแช่แข็ง กระบวนการที่กล่าวมาทั้งหมดนี้สามารถนำมาพัฒนาเทคนิค และวิธีการเพื่อนำไปประยุกต์ใช้กับการรีดเก็บน้ำเชื้อ

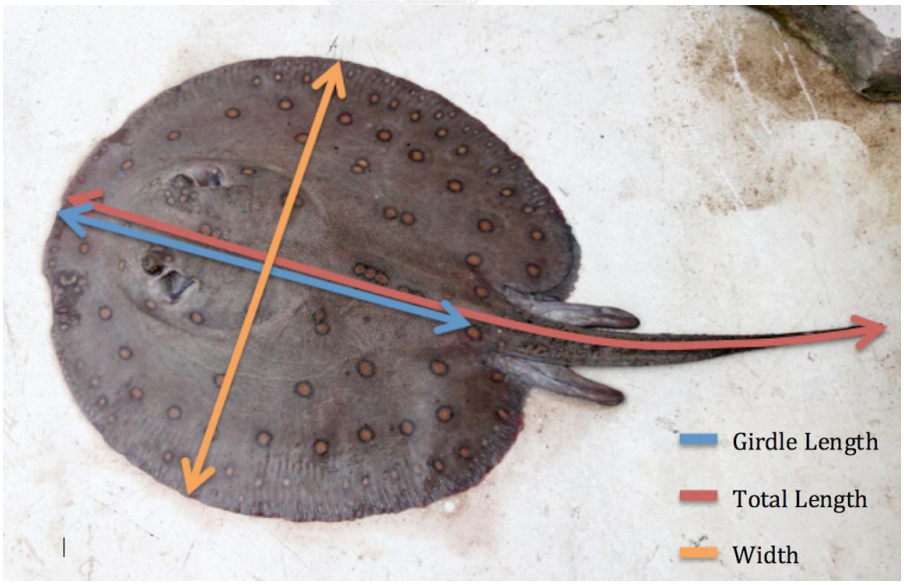
และการเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลากลุ่มเดียวกันได้อีกด้วย ซึ่งการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีการแช่แข็งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ช่วยแก้ปัญหาในปลาที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (endangered species) หรือใช้ในโปรแกรมการผสมพันธุ์ปลา และผลิตปลาข้ามสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นาน ลดพื้นที่การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ และสามารถขนส่งได้ง่ายเมื่อเทียบกับปลามีชีวิต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ทำการสุ่มปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ (*Potamotrygon motoro*) เพศผู้ที่โตเต็มวัย โดยวัดขนาดความกว้างของลำตัวอยู่ในช่วง 30 เซนติเมตรขึ้นไป จำนวน 10 ตัว จากฟาร์มเอกชนเพาะเลี้ยงปลากระเบนน้ำจืดแห่งหนึ่งในจังหวัดนนทบุรี ดูลักษณะสุขภาพปกติโดยสังเกตจากลักษณะทางกายภาพภายนอก การกินอาหาร และลักษณะพฤติกรรมที่ปกติ ซึ่งเพศผู้จะมีอวัยวะเพศ (claspers) 2 อันอยู่ใต้ลำตัวบริเวณโคนหาง ทำการบันทึกข้อมูลขนาดตัว โดยปลาที่ใช้ในการทดลองมีความยาวลำตัวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงสะโพก (Girdle length; GL) 33-42 เซนติเมตร เฉลี่ย 37±3.46 เซนติเมตร ความยาวลำตัวรวมตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายหาง (Total length; TL) 60-79 เซนติเมตร เฉลี่ย 68.4±5.83 เซนติเมตร และความกว้างลำตัวโดยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุด (Disc width; W) 34-43 เซนติเมตร เฉลี่ย 38.4±3.24 เซนติเมตร (ภาพที่ 6) มีน้ำหนักตัว (Weight)



ภาพที่ 6 แสดงการวัดความยาวและความกว้างลำตัว โดยสีฟ้า คือ ความยาวลำตัวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงสะโพก (Girdle length; GL) สีแดง คือ ความยาวลำตัวรวมตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายหาง (Total length; TL) และสีส้ม คือ ความกว้างลำตัว (Disc width; W)

2.5-5.5 กิโลกรัม เฉลี่ย 3.95±1.01 กิโลกรัม เลี้ยงรวมกันในบ่อปูนความจุ 12 ตัน ให้อากาศตลอดเวลา เปลี่ยนน้ำ 20% ทุก 3 วัน อาหารที่ให้เป็นปลาสดแช่แข็ง เช่น ปลาข้างเหลือง ปลาหลังเขียว ปลากระบอก ปริมาณ 3-5% ต่อน้ำหนักตัว ให้อาหารวันละ 1 ครั้ง คุณภาพน้ำในบ่อ วัดอุณหภูมิโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ได้ 28-30 ℃ สำหรับค่าอื่นๆ ใช้ชุดตรวจคุณภาพน้ำสำเร็จรูป (AQUA-VBC®, ประเทศไทย) โดยมีความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) 7.3 ความเป็นด่าง (alkalinity) 50-70 พีพีเอ็ม แอมโมเนีย (total ammonia) 0 พีพีเอ็ม ไนไตรท์ (nitrite) 0 พีพีเอ็ม คลอรีน (chlorine) 0 พีพีเอ็ม และความกระด้าง (hardness) 200 พีพีเอ็ม

3.2 การเตรียมปลาสำหรับทดลอง

มีการวัดขนาดตัวและชั่งน้ำหนักปลากระเบนก่อนเริ่มทำการทดลอง ถ่ายรูปปลากระเบนเพื่อดูลักษณะลายในแต่ละตัวเป็นการระบุตัวสัตว์ ทำการสวมปลอกพลาสติกคลุมเงี่ยงทุกเงี่ยงเพื่อความปลอดภัยของผู้จับบังคับสัตว์ รีดเก็บน้ำเชื้อปลากระเบนสัปดาห์ละ 1 ครั้ง โดยรีดน้ำเชื้อก่อนการให้อาหารในแต่ละวัน เพื่อป้องกันการขับถ่ายของเสียออกมาปนเปื้อน ขั้นแรกตักปลาออกมาจากบ่อเลี้ยงนำมาใส่กล่องพลาสติกขนาด 55x77x15 เซนติเมตร รองพื้นกล่องด้วยผ้าขนหนู ใส่น้ำเล็กน้อยให้พอท่วมรูหายใจ (spiracle) ทางด้านบน เอียงกล่องเพื่อให้ส่วนท้ายของลำตัวพ้นจากน้ำ (ภาพที่ 7) มีผู้จับบังคับ 1 คน และผู้รีดเก็บน้ำเชื้อ 1 คน โดยผู้จับบังคับจะทำการยกหางขึ้น ป้องกันการดิ้นและสะบัดของหาง จากนั้นผู้รีดเก็บน้ำเชื้อจะเข้าทางด้านหลังของปลาและทำการรีดเก็บน้ำเชื้อต่อไป ระยะเวลาการจับบังคับในแต่ละครั้งไม่เกิน 5 นาที เป็นการรีดน้ำเชื้อโดยปราศจากการวางยาสลบ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาพที่ 7 การเตรียมปลาก่อนรีดน้ำเชื้อ (ก) มองจากด้านบน (ข) มองจากด้านข้าง

3.3 การทดลองที่ 1 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด

3.3.1 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ

เมื่อตักปลากระเบนใส่กล่องแล้ว ทำการรีดน้ำเชื้อโดยวิธีใช้มือกระตุ้น ใช้ผ้าก็อซชุบน้ำเกลือ (normal saline solution) ทำความสะอาดบริเวณอวัยวะเพศและรูเปิดทวารรวม จากนั้นใช้มือนวดเบาๆ บริเวณใต้ท้องปลาใกล้กับต่อมเวสซิคูล่า (seminal vesicle) และให้น้ำเชื้อไหลลงสู่หลอดสะอาดที่รอรับอยู่ใต้รูเปิดทวารรวม (ภาพที่ 8) โดยขณะรีดเก็บน้ำเชื้อนั้นต้องกระทำด้วยความระมัดระวังไม่ให้มีเลือด ปัสสาวะ หรือน้ำปนเปื้อนมาในน้ำเชื้อได้ เก็บหลอดน้ำเชื้อที่ได้ใส่ลงในกล่องบรรจุน้ำแข็งอุณหภูมิ 4-6 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นทันที

ภาพที่ 8 วิธีการรีดเก็บน้ำเชื้อ ผู้จับบังคับทำการยกหางขึ้น ผู้รีดเก็บน้ำเชื้อจะเข้าทางด้านหลังของปลา ใช้มือนวดเบาๆ บริเวณใต้ท้องปลาใกล้กับต่อมเวสซิคูล่า (seminal vesicle) และให้น้ำเชื้อไหลลงสู่หลอดสะอาดที่รอรับอยู่ใต้รูเปิดทวารรวม

3.3.2 การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น (Rurangwa et al., 2004; Viveiros and Godinho, 2009; Fauvel et al., 2010)

1) เมื่อได้น้ำเชื้อมาแล้วทำการสังเกตสี (สีเทา สีเทาเขม สีขาวเขม สีขาวเหลือง หรือสีอื่นๆ) และความหนืด (แบ่งเป็น 5 ระดับจากน้อยไปมาก คือ คล้ายน้ำ (watery) ใส (translucent) คล้ายน้ำนม (milky) คล้ายครีม (creamy) และข้นหนืด (glue-like)) วัดปริมาตร (ภาพที่ 9) วัดความเป็นกรดเป็นด่างโดยใช้กระดาษลิตมัส วิธีการคือหยดน้ำเชื้อลง

บนกระดาษวัดความเป็นกรดเป็นด่าง เมื่อกระดาษเปลี่ยนสีจึงนำไปเปรียบเทียบกับตัวอย่างสีมาตรฐานบนกล่องวัดความเป็นกรดเป็นด่าง

ภาพที่ 9 น้ำเชื้อปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ที่รีดได้ในแต่ละครั้ง

2) นับจำนวนอสุจิต่อหน่วยปริมาตร (sperm concentration) โดยเจือจางน้ำเชื้อกับน้ำกลั่นหรือ Phosphate buffer saline (PBS) ในอัตราส่วนการเจือจาง 1:200 เขย่าให้เข้ากัน นำน้ำเชื้อที่เจือจางนี้ไปนับจำนวนตัวอสุจิ โดยหยดน้ำเชื้อลงบนสไลด์นับเม็ดเลือด (Hemocytometer) (Chew and Zulkafli, 2012) (ภาพที่ 10) ปิดทับด้วยแผ่นกระจกบางที่มาพร้อมสไลด์นับเม็ดเลือด ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 2 นาที เพื่อให้ตัวอสุจิหยุดลอยจะทำให้นับได้ง่ายขึ้น นับตัวอสุจิในตารางของสไลด์นับเม็ดเลือดผ่านกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 400 เท่า นับตัวอสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่มีกรอบเป็นเส้นคู่ขนาน 5 ช่อง (ภายในแต่ละ 5 ช่อง มีสี่เหลี่ยมเล็ก 16 ช่อง โดยนับช่องที่มุม 4 ช่องและช่องกลาง 1 ช่อง รวมเป็น 5 ช่อง หรือนับในแนวทะแยงมุมก็ได้) (ภาพที่ 11) การนับตัวอสุจิที่อยู่คาบเส้นคู่ ให้กำหนดว่าจะนับตัวอสุจิที่อยู่ด้านบนและด้านซ้ายของเส้นคู่ หรือจะนับนับตัวอสุจิที่อยู่ด้านขวาและด้านล่างของเส้นคู่อย่างใดอย่างหนึ่ง เพื่อมิให้นับซ้ำ เมื่อนับจำนวนตัวอสุจิใน 5 ช่องรวมกันแล้ว หาค่าเฉลี่ยของทั้งสองฝั่ง คำนวณความเข้มข้นของน้ำเชื้อ โดยมีสูตร ดังนี้

ปริมาตรของสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่เล็กสุด 1 ช่อง = กว้างxยาวxสูง (มีจำนวน 16 ช่อง)

= 1/20 มม.x1/20 มม.x1/10 มม.x16 ช่อง

= 1/250 ลบ.มม.

ปริมาตรของสี่เหลี่ยมจัตุรัสที่มีขอบเป็นเส้นคู่ 5 ช่อง

= 1/250x5 ช่อง = 1/50 ลบ.มม.

สมมติจำนวนตัวอสุจิที่นับในสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5 ช่อง คือ N

จำนวนตัวอสุจิในสี่เหลี่ยมจัตุรัส 5ช่อง = N/(1/50) ตัว/ลบ.มม.

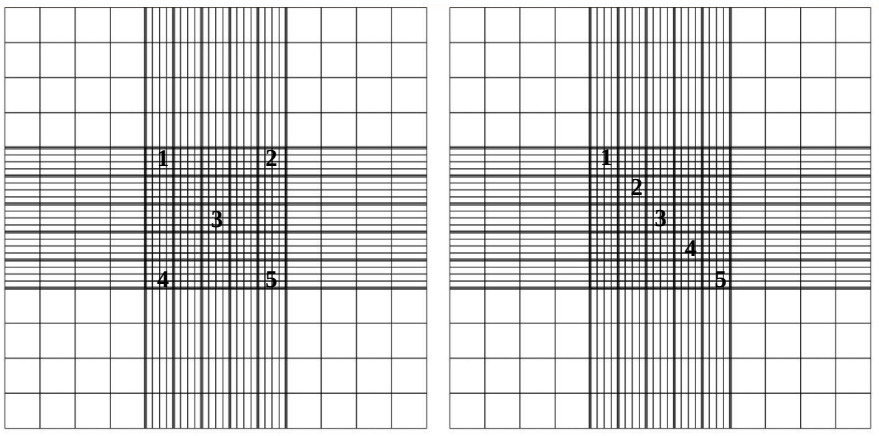
ดังนั้นจำนวนตัวอสุจิใน 1 มล. = 1000N/(1/50) ตัว/มล.

เจือจางน้ำเชื้อ 1:200 = 200 x 1000N/(1/50) ตัว/มล.

$=10Nx10^{6}$ ตัว/มล.

ภาพที่ 10 นับจำนวนอสุจิในสไลด์นับเม็ดเลือด (Hemocytometer) ทั้ง 2 ด้าน (ลูกศร) แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย จะได้ความเข้มข้นของน้ำเชื้อในหนึ่งหน่วยปริมาตร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 11 นับจำนวนอสุจิในช่องเล็ก 5 ช่องตามหมายเลข 1-5 แล้วมาคำนวณตามสูตร

3) การตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว (percentage of motile sperm) โดยหยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ (slide) เจือจางด้วยน้ำเกลือ หรือ Phosphate buffer saline แล้วปิดด้วยกระจกบาง (cover glass) ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ (400 เท่า) ดูเฉพาะตัวอสุจิที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าเท่านั้น ถือว่าเป็นเปอร์เซ็นต์ของการเคลื่อนไหว แล้วให้คะแนน (Chew and Zulkafli, 2012) ดังนี้

ลักษณะที่พบ	**คะแนน**
น้ำเชื้อเคลื่อนไหวน้อย (0-20%)	1
น้ำเชื้อเคลื่อนไหวได้ (21-40%)	2
น้ำเชื้อเคลื่อนไหวปานกลาง (41-60%)	3
น้ำเชื้อเคลื่อนไหวมาก (61-80%)	4
น้ำเชื้อเคลื่อนไหวมากที่สุด (81-100%)	5

4) การดูความหนาแน่นของตัวอสุจิ (sperm density) การประเมินความเข้มข้นของอสุจิด้วยการดูเปอร์เซ็นต์ของอสุจิอัดแน่น (spermatocrit) โดยการเก็บน้ำเชื้อใส่ microhaematocrit tube จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ 1,000 x g เป็นเวลา 30 นาที จะเกิดตะกอนของตัวอสุจิอัดแน่นขึ้น ค่าที่อ่านได้จะเป็นร้อยละของตัวอสุจิอัดแน่นต่อปริมาณน้ำเชื้อที่รีดได้ (Agarwal and Raghuvanshi, 2009)

5) การย้อมสีอสุจิเพื่อดูตัวเป็นตัวตาย วิธีการคือ ใช้น้ำเชื้อ 1 หยดเล็ก ๆ ผสมกับสีอีโอซิน บี นิโกรซิน (Eosin B-Nigrosin) ที่ 37 องศาเซลเซียส ให้หยดสีโตกว่าหยดน้ำเชื้อประมาณ 5-10 เท่า ผสมให้เข้ากันบนแผ่นสไลด์ นานประมาณ 3-5 วินาที แล้วทำการสเมียร์ (smear) โดยไถให้เป็นผิวบางๆ บนกระจกสไลด์ จากนั้นปล่อยให้แห้งเอง (air-dry) แล้วนำไปตรวจโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (1000 เท่า) ทำการนับจำนวนตัวอสุจิให้ได้อย่างน้อย 100 ตัว ตัวที่ติดสีแดงจะเป็นตัวอสุจิที่ตาย ตัวที่ไม่ติดสีจะเป็นตัวอสุจิที่ยังมีชีวิต จากนั้นเทียบเป็นเปอร์เซ็นต์ (Chew and Zulkafli, 2012)

6) การย้อมสีอสุจิเพื่อดูรูปร่างโดยใช้วิธีดิฟควิก (Diff quik) วิธีการคือใช้น้ำเชื้อ 1 หยดเล็ก ๆ ผสมกับสี Eosin จำนวน 1 หยดที่บริเวณใกล้กับหยดน้ำเชื้อ ผสมให้เข้ากันบนแผ่นสไลด์ นานประมาณ 3-5 วินาที แล้วทำการสเมียร์โดยไถให้เป็นผิวบางๆ บนกระจกสไลด์ จากนั้นปล่อยให้แห้งเอง และนำมาจุ่มในน้ำยายอมสี Methylene blue เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นล้างสีออกโดยใช้น้ำกลั่นหรือน้ำประปาเบาๆ ทิ้งไวให้แห้งก่อนนำไปศึกษารูปร่างของอสุจิต่อไป (Kruger et al., 1988; Tuset et al., 2008)

3.3.3 การหาองค์ประกอบในน้ำเลี้ยงอสุจิ นำน้ำเชื้อที่รีดได้มาปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ที่ 1000 x g เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากการปั่นเหวี่ยงจะสังเกตเห็นตัวอย่างน้ำเชื้อมีการแยกออกเป็นสองส่วน โดยส่วนล่างจะมีลักษณะสีขาวขุ่น คือ ตัวอสุจิ และส่วนบนจะมีลักษณะเป็นน้ำใส คือ น้ำเลี้ยงอสุจิ จากนั้นใช้ไมโครปิเปตดูดส่วนของน้ำเลี้ยงอสุจิใส่หลอดขนาด 1.5 มิลลิลิตร เพื่อนำมาวัดค่าออสโมลาลิตี้ โดยใช้เครื่อง osmometer ส่วนที่เหลือนำไปหาส่วนประกอบของไอออนชนิดต่างๆที่อยู่ในน้ำเชื้อปลากระเบน ได้แก่ โซเดียม (Na^{+}) โพแทสเซียม (K^{+}) แคลเซียม (Ca^{2+}) แมกนีเซียม (Mg^{2+}) และคลอไรด์ (Cl^{-}) และสารชีวเคมี ได้แก่ โปรตีนรวม (total protein) กลูโคส (glucose) และคอเลสเตอรอล (cholesterol) โดยใช้เทคนิคทาง spectrophotometry (Luer et al., 2009)

3.3.4 การศึกษาลักษณะรูปร่างของอสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เป็นการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแต่ละชนิด เพื่อดูรูปร่างและโครงสร้างของตัวอสุจิปลากระเบน โดยเก็บตัวอย่างจากน้ำเชื้อสด 3 ตัวอย่าง

1) การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) นำตัวอย่างน้ำเชื้อปลากระเบนที่เก็บได้ มาทำการตรึงด้วย 2.5% Glutaraldehyde ขั้นตอนคือ หยดน้ำเชื้อบนแผ่นสไลด์ รอให้แห้งประมาณ 1 นาที แล้วใส่แผ่นสไลด์นั้นลงในถาดหลุมที่บรรจุ Glutaraldehyde ปริมาตรครึ่งหนึ่งของหลุม แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ควรทำการเตรียมตัวอย่างให้เร็วที่สุดและควรเป็นตัวอย่างที่เก็บไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง โดยหลังจากตรึงเรียบร้อยแล้ว ทำการเตรียมตัวอย่างโดยนำตัวอย่างไปล้างในบัฟเฟอร์ และแช่ใน 0.1% Osmium tetroxide ใน 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 20 °C อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์อีกครั้ง แล้วนำไป

ผ่านการดึงน้ำออก (dehydration) โดยใช้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เริ่มจาก 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% (2 ครั้ง) ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการติดบน Metal stub เคลือบด้วยทองหนาประมาณ 20-50 นาโนเมตร เสร็จแล้วจึงนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดพร้อมบันทึกภาพ สังเกตลักษณะของอสุจิบริเวณส่วนหัว ลำตัวและหาง พร้อมทั้งวัดความยาวของส่วนหัว ลำตัวและส่วนหาง (รุจิพร ประทีปเสน, 2541)

2) การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) นำตัวอย่างน้ำเชื้อปลากระเบนที่เก็บได้ มาทำการตรึงด้วย 2.5% Glutaraldehyde ขั้นตอนคือ เตรียม 2-4 % agar โดยเตรียมละลาย agar ในน้ำอุ่นรอให้ agar อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส แล้วหยดน้ำเชื้อลงไป ผสมให้เข้ากันในหลอด microcentrifuge tube รอให้ agar แข็งแล้วใส่ 2.5% Glutaraldehyde ให้ท่วมตัวอย่าง จากนั้นใช้ฝาปิดให้สนิทแล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ควรทำการเตรียมตัวอย่างให้เร็วที่สุดและควรเป็นตัวอย่างที่เก็บไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างโดยนำตัวอย่างไปล้างในบัฟเฟอร์ และแช่ใน 0.1% Osmium tetroxide ใน 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมง ล้างด้วยบัฟเฟอร์อีกครั้งแล้วนำไปผ่านการดึงน้ำออก (dehydration) โดยใช้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เริ่มจาก 50%, 70%, 80%, 90%, 95% และ 100% (2 ครั้ง) ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการฝังลงบล็อคพลาสติก ตัด section ให้มีความบาง 60 – 90 นาโนเมตร นำไปย้อมด้วย Uranyl acetate และ Lead citrate เสร็จแล้วจึงนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านพร้อมบันทึกภาพ สังเกตและบันทึกลักษณะของอสุจิทั้งหมด ศึกษาโครงสร้างนิวเคลียส และออร์แกเนลอื่นๆ (Flegler et al., 1993)

3.4 การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ และอัตราส่วนที่แตกต่างกัน ด้วยวิธีการแช่เย็น

รีดเก็บน้ำเชื้อปลากระเบนเพศผู้สายพันธุ์โมโตโร่จำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นดังการทดลองที่ 1 แล้วนำน้ำเชื้อมาเจือจางในสารเจือจางน้ำเชื้อ โดยสารเจือจางน้ำเชื้อทุกสูตรมีการใส่ยาปฏิชีวนะชนิด 0.5% Penicillin–Streptomycin เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลชีพ สารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้ทดลองมีดังนี้ (ตารางที่ 1)

สูตรที่ 1 คือ Hank's Balanced Salt Solution (HBSS)

สูตรที่ 2 คือ Calcium-Free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS)

สูตรที่ 3 คือ Normal Saline Solution (NSS)

สูตรที่ 4 คือ Modified Fish Ringer's Solution (MFR)

กลุ่มควบคุม น้ำเชื้อสด ไม่ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อ

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางเคมี (g/L) และค่าออสโมลาลิตี้ (Mosmol/Kg) และความเป็นกรดด่างของสารเจือจางน้ำเชื้อที่ใช้

ส่วนประกอบสารเคมี (g)	**ชนิดสารเจือจางน้ำเชื้อ**			
	HBSS	**Ca-F HBSS**	**NSS**	**MFR**
$CaCl_2.2H_2O$	0.16	-	-	0.29
NaCl	8.00	8.89	9	7.50
KCl	0.40	0.44	-	0.29
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	0.22	-	-
$Na_2HPO_4.7H_2O$	0.12	0.13	-	-
KH_2PO_4	0.06	0.07	-	-
$NaHCO_3$	0.35	0.39	-	0.21
Glucose	1.00	1.11	-	-
น้ำกลั่น	1000	1000	1000	1000
Penicillin–Streptomycin	5	5	5	5
Osmolality (Mosmol/Kg)	286	320	292	275
pH	7.3	7.4	7.1	7.9

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

เก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อเป็น 1:1 สำหรับสูตร 4 สูตร โดยใช้น้ำเชื้อสำหรับทุกอัตราเจือจาง 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน microcentrifuge tube เขย่าเบาๆ ให้น้ำเชื้อกับสารเจือจางน้ำเชื้อผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนพบว่าไม่มีการเคลื่อนไหว และตรวจสอบตัวเป็นตัวตายด้วยการย้อมสี อีโอซิน บี นิโกรซิน ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลองและทุกๆ 24 ชั่วโมง ชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการเก็บน้ำเชื้อแบบแช่เย็น จะพิจารณาจากสูตรสารเจือจางน้ำเชื้อที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานที่สุด (Urbányi et al., 1999; Vuthiphandchai et al., 2009)

จากนั้นเลือกสารเจือจางน้ำเชื้อที่ได้ผลดีที่สุด มาเจือจางในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อเป็น 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 และ 1:8 โดยใช้น้ำเชื้อสำหรับทุกอัตราเจือจาง 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Microcentrifuge tube เขย่าเบาๆ ให้น้ำเชื้อกับสารเจือจางน้ำเชื้อผสมเป็นเนื้อเดียวกัน และนำไปเก็บไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจสอบการเคลื่อนที่ของอสุจิตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 และทุกๆ 24 ชั่วโมงจนพบว่าไม่มีการเคลื่อนไหว และตรวจสอบตัวเป็นตัวตายด้วยการย้อมสี อีโอซิน บี นิโกรซิน ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการทดลองและทุกๆ 24 ชั่วโมง อัตราส่วนของสารเจือจางน้ำเชื้อที่เหมาะสมในการเก็บน้ำเชื้อแบบแช่เย็นจะพิจารณาจากความสามารถในการเก็บรักษาน้ำเชื้อไว้ได้นานที่สุด

3.5 การทดลองที่ 3 ศึกษาความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัว

รีดเก็บน้ำเชื้อจากปลากระเบนเพศผู้สายพันธุ์โมโตโร่จำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นดังการทดลองที่ 1 จากนั้นเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อตามสูตรและอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 2 แล้วนำน้ำเชื้อที่รีดได้มาเจือจาง เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น (อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส)

เตรียมสารป้องกันการแข็งตัว 2 ชนิด ได้แก่ Glycerol และ DMSO ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% ของปริมาตรรวม ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยทำการเจือจางสารป้องกันการแข็งตัวในสารเจือจางน้ำเชื้อ โดยแบ่งสารเจือจางน้ำเชื้อออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน คือ ส่วนหนึ่งไม่ผสมสารป้องกันการแข็งตัว และอีกส่วนหนึ่งผสมสารป้องกันการแข็งตัวที่มีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของความเข้มข้นที่ต้องการ (ตารางที่ 2) เมื่อจะเจือจางน้ำเชื้อให้ใช้สารเจือจางน้ำเชื้อส่วนแรกผสมกับน้ำเชื้อตามอัตราส่วน เขย่าให้เข้ากันแล้วเติมสารเจือจางน้ำเชื้อส่วนที่ผสมสารป้องกันการแข็งตัวลงไปในบีกเกอร์

เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นแบ่งใส่หลอด microcentrifuge tube ที่มีขนาด 1.5 มิลลิลิตร ปิดฝาป้องกันน้ำเข้า นำเก็บรักษาในตู้เย็น (อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส)

จากนั้นนำน้ำเชื้อที่เก็บรักษาในตู้เย็นมาตรวจคุณภาพ ตามวิธีการตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวอสุจิที่เวลา 0, 30, 60 และ 120 นาที และตรวจสอบตัวเป็นตัวตายด้วยการย้อมสี อีโอซิน บี นิโกรซิน และระดับความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัวที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อจะพิจารณาจากสารละลายที่สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อให้มีเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ของอสุจิสูงสุด เป็นเวลานานที่สุด สำหรับกลุ่มควบคุมมีวิธีปฏิบัติเช่นเดียวกัน เพียงแต่ไม่ต้องเติมสารป้องกันการแข็งตัวลงไป (Urbányi et al., 1999)

ตารางที่ 2 ปริมาตรของน้ำเชื้อ สารเจือจางน้ำเชื้อ และสารป้องกันการแข็งตัวที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

ส่วนผสม	ความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัว			
	5% Glycerol	10% Glycerol	5% DMSO	10% DMSO
1. น้ำเชื้อ+สารเจือจางน้ำเชื้อ (ส่วนที่ 1)	300	300	300	300
2. สารเจือจางน้ำเชื้อ (ส่วนที่ 2) + สารป้องกันการแข็งตัว ความเข้มข้น 2 เท่า	270+30	240+60	270+30	240+60
3. ปริมาตรรวม (ไมโครลิตร)	600	600	600	600

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

3.6 การทดลองที่ 4 ศึกษาผลของการแช่แข็งน้ำเชื้อ

รีดเก็บน้ำเชื้อจากปลากระเบนเพศผู้สายพันธุ์โมโตโร่จำนวน 10 ตัวอย่าง นำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นดังการทดลองที่ 1 จากนั้นเตรียมสารเจือจางน้ำเชื้อตามสูตรและอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองที่ 2 มาผสมกับสารป้องกันการแข็งตัว 2 ชนิด ได้แก่ Glycerol และ DMSO ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% ทำการทดลอง 3 ซ้ำ สำหรับกลุ่มควบคุมมีวิธีปฏิบัติเช่นเดียวกัน เพียงแต่ไม่ต้องเติมสารป้องกันการแข็งตัวลงไป

วิธีการเตรียมสารป้องกันการแข็งตัวโดยทำวิธีเช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 3 จนผสมน้ำเชื้อเสร็จแล้วใส่ในหลอด Cryotube (Nunc®) ขนาด 1.8 มิลลิลิตร ระยะเวลาการเตรียมจนถึงผสมน้ำเชื้อ

เสร็จไม่ควรเกินระยะที่เกิดความเป็นพิษต่อตัวอสุจิ จากนั้นนำน้ำเชื้อที่เตรียมเสร็จแล้วมาลดอุณหภูมิแบบสองขั้นตอน จากอุณหภูมิห้องหรือตู้เย็นลงสู่อุณหภูมิของไอไนโตรเจนเหลว (ประมาณ -50 องศาเซลเซียส ถึง -120 องศาเซลเซียส) 7 นาที และขั้นที่สองลดอุณหภูมิไปสู่อุณหภูมิของไนโตรเจนเหลวและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมินั้น (-196 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (Linhart et al., 2005)

ภายหลังการเก็บน้ำเชื้อแช่แข็งลงในถังไนโตรเจนเหลวเป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำหลอดน้ำเชื้อแช่แข็งออกมาละลาย โดยนำน้ำเชื้อไปแกว่งละลายในอ่างปรับอุณหภูมิ (Water bath) ที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำน้ำเชื้อส่วนหนึ่งมาตรวจคุณภาพตามวิธีการตรวจเปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวอสุจิและตรวจสอบตัวเป็นตัวตายด้วยการย้อมสี อีโอซิน บี นิโกรซิน (Linhart et al., 2005)

3.7 การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

ข้อมูลตัวเลข (Quantitative data) ของการประเมินคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น ได้แก่ ปริมาตรรวมของน้ำเชื้อ ค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของตัวอสุจิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ เปอร์เซ็นต์ของอสุจิอัดแน่น เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิ ค่าออสโมลาลิตี้ องค์ประกอบในน้ำเลี้ยงอสุจิ และขนาดของอสุจิ จะนำมาวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนา (Descriptive analysis) เพื่อคำนวณค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation; SD) ค่าต่ำสุด (Minimum) ค่าสูงสุด (Maximum) ส่วนการเจือจางเพื่อแช่เย็นและแช่แข็งน้ำเชื้อ ใช้วิธีการเปรียบเทียบความแปรปรวน (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan’s new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลการทดลองที่ 1 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด

4.1.1 การรีดน้ำเชื้อโดยวิธีใช้มือกระตุ้น เริ่มจากใช้ผ้าก๊อซชุบน้ำเกลือ (normal saline solution) ทำความสะอาดบริเวณอวัยวะเพศและรูเปิดทวารรวม จากนั้นใช้มือนวดเบาๆ บริเวณใต้ท้องปลาใกล้กับต่อมเวสซิคูล่า (seminal vesicle) และให้น้ำเชื้อไหลลงสู่หลอดสะอาดที่รอรับอยู่ใต้รูเปิดทวารรวม ค่อนข้างได้ผลดี บางครั้งมีน้ำเชื้อบางส่วนที่ไหลไม่เข้าหลอด และน้ำเชื้อบางส่วนปนเปื้อนไปกับน้ำ ถ้าปลาดิ้นมากอาจทำให้น้ำเชื้อมีการหลั่งออกมาก่อนที่จะทำการเก็บ การรีดเก็บน้ำเชื้อแต่ละครั้งใช้เวลาประมาณ 1 นาทีหลังจากเริ่มนวดกระตุ้น การทดลองในครั้งนี้ผู้ทดลองได้ลองรีดเก็บน้ำเชื้อหลายวิธีด้วยกัน ทั้งการใช้อวัยวะเพศผู้สอดเข้าไปในช่องคลอดประดิษฐ์เพื่อจำลองสถานการณ์ การใช้ท่อพลาสติกสอดเข้าไปในช่องเปิดของน้ำเชื้อ และการใช้เครื่องกระตุ้นการหลั่งด้วยไฟฟ้า ปรากฏว่าทุกวิธีที่กล่าวมาไม่สามารถเก็บน้ำเชื้อได้ทันเวลา เนื่องจากปลามีการดิ้นมาก เพราะไม่ได้ทำการวางยาสลบ จึงควรกระทำทุกอย่างด้วยความระมัดระวังและรวดเร็ว นอกจากนี้ผู้ทดลองได้ทำการวางยาสลบปลากระเบนโดยใช้ Ketamine 5 mg/kg ร่วมกับ Medetomidine 0.1 mg/kg แบบฉีดเข้ากล้ามเนื้อ เพื่อให้ปลาสลบก่อนการรีดเก็บน้ำเชื้อ ปรากฏว่าขณะที่ปลาเริ่มสลบกล้ามเนื้อบริเวณอวัยวะเพศผู้มีการคลายตัวทำให้ปลาหลั่งน้ำเชื้อลงไปในน้ำทันที ไม่สามารถเก็บน้ำเชื้อได้ และระยะเวลาที่ปลาเริ่มสลบในแต่ละตัวไม่เท่ากันทำให้ไม่สามารถกำหนดเวลาที่แน่นอนในการรีดเก็บน้ำเชื้อ นอกจากนี้ควรรีดเก็บน้ำเชื้อก่อนการให้อาหารในแต่ละวัน เพราะถ้ารีดเก็บน้ำเชื้อหลังจากการให้อาหาร ปลาจะขับถ่ายของเสียออกมา เสี่ยงต่อการปนเปื้อนน้ำเชื้อ

4.1.2 ผลจากการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อสดที่รีดจากปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่เพศผู้จำนวน 10 ตัว พบว่ามีสีขาวเข้ม ความหนืดคล้ายครีม ปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดได้ในแต่ละครั้ง 0.53±0.15 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดด่าง 7.3±0.26 ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 2.28±0.46 $x10^9$ ตัวต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ 98.5±2.42% เปอร์เซ็นต์ของอสุจิอัดแน่น (spermatocrit) 15.4±2.88% และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิ 89.8±3.36 (ตารางที่ 3)

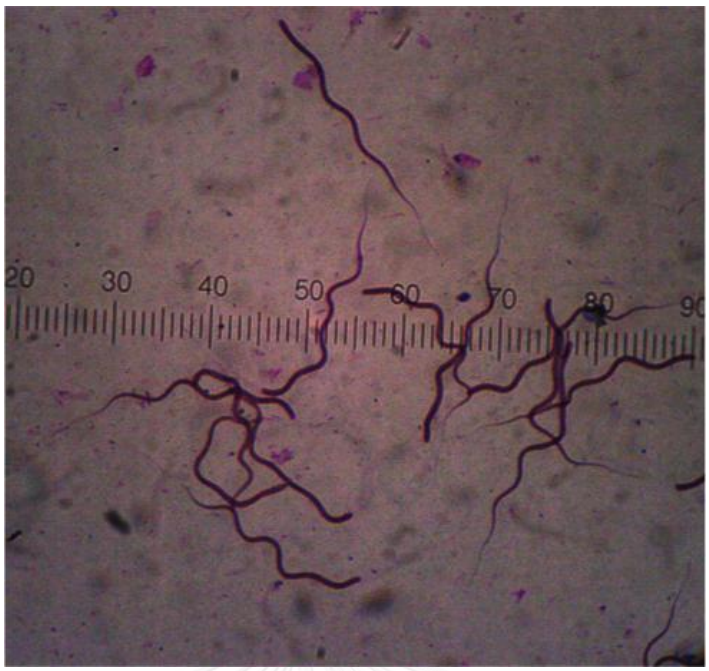
4.1.3 เมื่อนำอสุจิมาย้อมสีด้วยวิธีดิฟควิก แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างกำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าอสุจิของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ มีลักษณะหัวเรียวยาวแหลมบิดเป็น

เกลียว หางเป็นเกลียวน้อยกว่า (ภาพที่ 12) เมื่อส่องกล้องจุลทรรศน์ดูการเคลื่อนไหวพบการว่ายแบบลักษณะหมุนควง ส่วนลักษณะผิดปกติที่พบได้คือหางมีลักษณะขดเป็นวง (ภาพที่ 13)

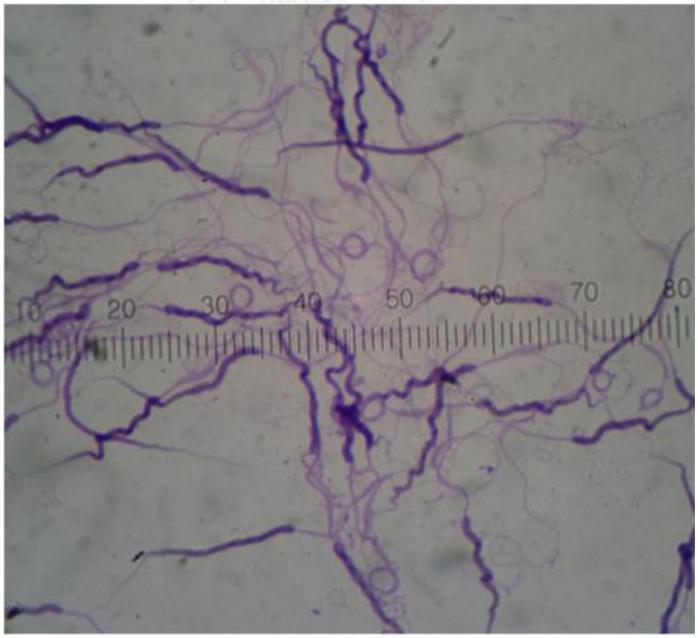
4.1.4 นำน้ำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกชั้นตัวอสุจิกับน้ำเลี้ยงอสุจิ นำไปวิเคราะห์ค่าออสโมลาลิตี้ 325.8±9.04 mOsmol/kg และหาองค์ประกอบในน้ำเลี้ยงอสุจิ ในน้ำเชื้อมีส่วนประกอบของไอออนชนิดต่างๆ ได้แก่ โซเดียม (Na^+) 81.9±3.78 mMol/L โพแทสเซียม (K^+) 51.8±3.33 mMol/L แคลเซียม (Ca^{2+}) 2.88±0.30 mMol/L แมกนีเซียม (Mg^{2+}) 1.2±0.13 mMol/L และ คลอไรด์ (Cl^-) 109.9±3.35 mMol/L และสารชีวเคมี ได้แก่ โปรตีนรวม (Total protein) 1.19±0.73 mg/dl กลูโคส (Glucose) 34.6±11.3 mg/dl และคอเลสเตอรอล (Cholesterol) 13.2±5.79 mg/dl ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 3 ปริมาตร ค่าความเป็นกรดด่าง ความเข้มข้นของตัวอสุจิ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ เปอร์เซ็นต์ของอสุจิอัดแน่น และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิในน้ำเชื้อสดของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่เพศผู้

ลักษณะที่ศึกษา	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1. ปริมาตรรวมของน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)	0.3	0.7	0.53	0.15
2. ค่าความเป็นกรดด่าง	7.0	7.5	7.3	0.26
3. ความเข้มข้นของตัวอสุจิ ($x10^9$ ตัว/มิลลิลิตร)	1.25	2.88	2.28	0.46
4. เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ	95	100	98.5	2.42
5. เปอร์เซ็นต์ของอสุจิอัดแน่น	10	20	15.4	2.88
6. เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิ	83	95	89.8	3.36



ภาพที่ 12 รูปร่างตัวอสุจิปกติของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่เมื่อย้อมด้วยวิธีดิฟควิก (กำลังขยาย 1,000 เท่า)



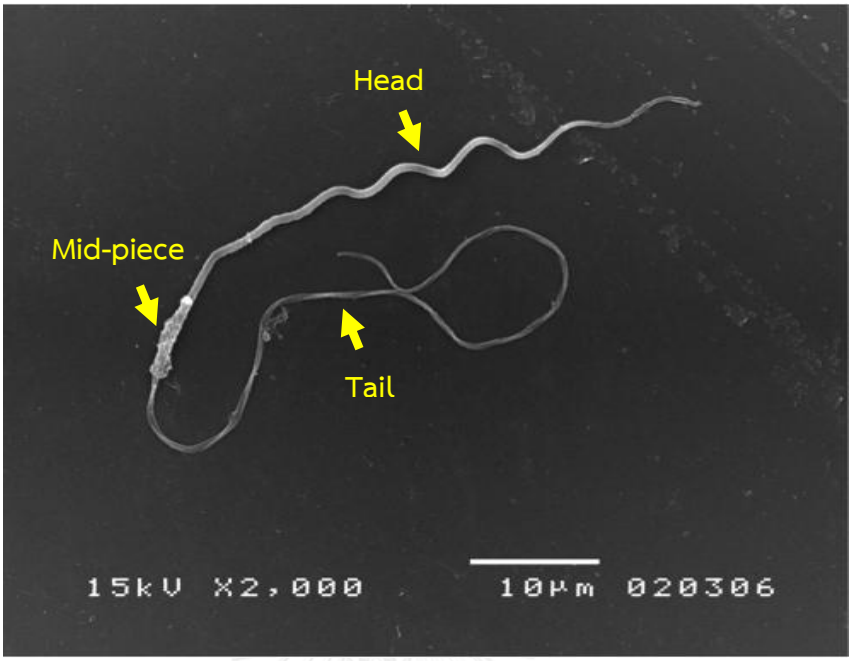
ภาพที่ 13 รูปร่างตัวอสุจิที่ผิดปกติของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อย้อมด้วยวิธีดิฟควิก พบหางมีลักษณะขดเป็นวง (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของน้ำเลี้ยงอสุจิในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่

คุณลักษณะของน้ำเลี้ยงอสุจิ	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1. ค่าออสโมลาลิตี้ (mOsmol/kg)	312	340	325.8	9.04
2. โซเดียม (mMol/L)	75	88	81.9	3.78
3. โพแทสเซียม (mMol/L)	47	57	51.8	3.33
4. แคลเซียม (mMol/L)	2.4	3.3	2.88	0.30
5. แมกนีเซียม (mMol/L)	1.0	1.4	1.2	0.13
6. คลอไรด์ (mMol/L)	105	115	109.9	3.35
7. โปรตีนรวม (mg/dl)	0.24	2.29	1.19	0.73
8. กลูโคส (mg/dl)	22	56	34.6	11.3
9.คอเลสเตอรอล (mg/dl)	5	22	13.2	5.79

4.1.5 รูปร่างของอสุจิของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) มีลักษณะหัวเรียวยาวแหลมบิดเป็นเกลียว หางเป็นเกลียวน้อยกว่า (ภาพที่ 14) และมีขนาดความยาวของตัวอสุจิจากหัวถึงหาง 116.34±1.92 ไมโครเมตร ความยาวเฉพาะส่วนหัว 42.46±1.23 ไมโครเมตร ความกว้างเฉพาะส่วนหัว 0.54±0.06 ไมโครเมตร ความยาวเฉพาะส่วนลำตัว 6.39±0.02 ไมโครเมตร ความกว้างเฉพาะส่วนลำตัว 0.69±0.04 ไมโครเมตร ความยาวเฉพาะส่วนหาง 68.01±1.06 ไมโครเมตร และความกว้างเฉพาะส่วนหาง 0.37±0.56 ไมโครเมตร ดังตารางที่ 5

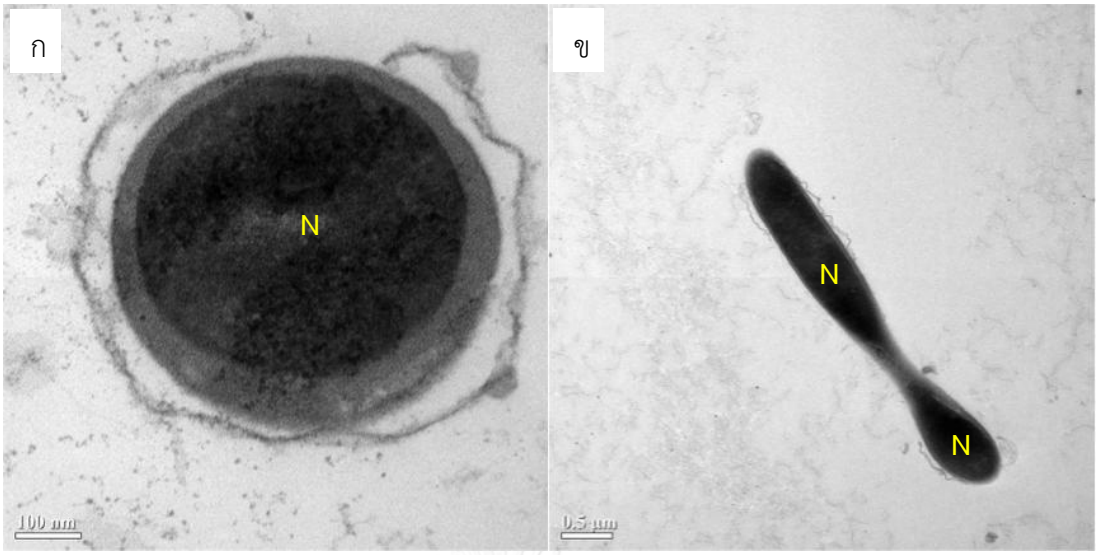
4.1.6 โครงสร้างภายในของอสุจิของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) พบส่วนหัวมีนิวเคลียสอัดแน่น และมีเยื่อหุ้ม ส่วนลำตัวมีไมโตรคอนเดรียล้อมรอบมากมาย ส่วนหางมี Axoneme และ แกนตามยาว 2 แท่งขนาบข้าง และมีเยื่อหุ้ม (ภาพที่ 15-17)



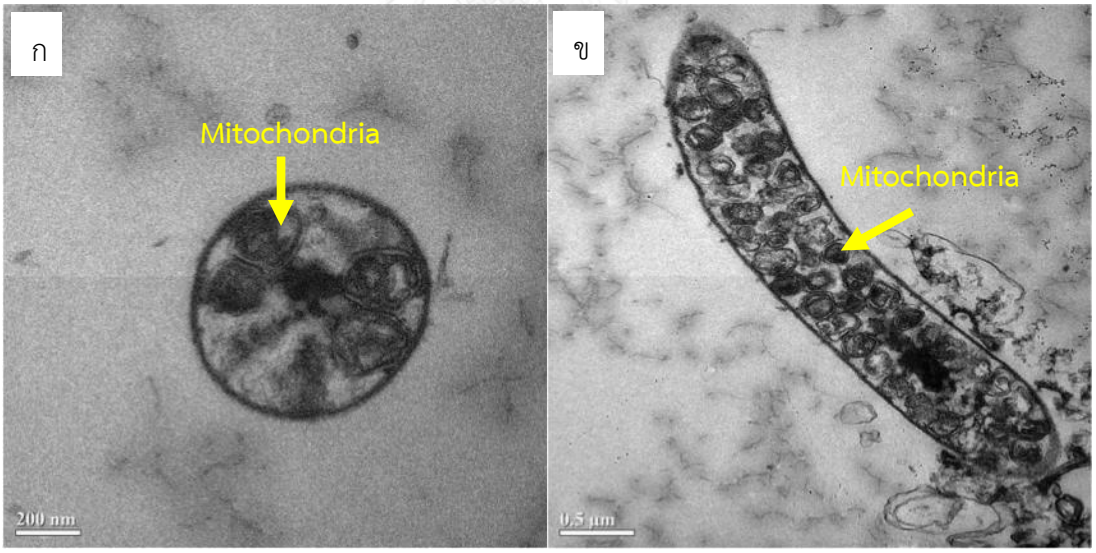
ภาพที่ 14 รูปร่างตัวอสุจิของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Scanning Electron Microscope; SEM) ลูกศรแสดงส่วนหัว (Head) ลำตัว (Mid-piece) และหาง (Tail) ตามแถบมาตราส่วน 10 ไมโครเมตร

ตารางที่ 5 ขนาดของตัวอสุจิในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่

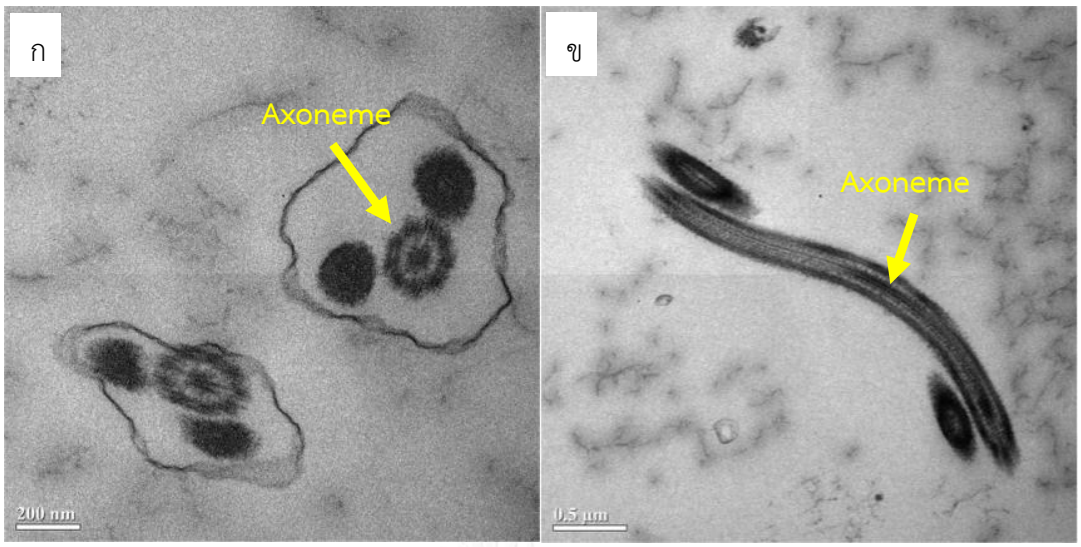
ความยาว	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน
1. ความยาวรวม (ไมโครเมตร)	114.48	118.32	116.34	1.92
2. ความยาวเฉพาะส่วนหัว (ไมโครเมตร)	41.22	43.67	42.46	1.23
3. ความกว้างเฉพาะส่วนหัว (ไมโครเมตร)	0.48	0.59	0.54	0.06
4. ความยาวเฉพาะส่วนลำตัว (ไมโครเมตร)	6.38	6.42	6.40	0.02
5. ความกว้างเฉพาะส่วนลำตัว (ไมโครเมตร)	0.65	0.73	0.69	0.04
6. ความยาวเฉพาะส่วนหาง (ไมโครเมตร)	66.84	68.90	68.01	1.06
7. ความกว้างเฉพาะส่วนหาง (ไมโครเมตร)	0.31	0.42	0.37	0.06



ภาพที่ 15 โครงสร้างตัวอสุจิของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) N คือ นิวเคลียส ก) ภาพตัดขวางส่วนหัว ข) ภาพตัดตามยาวส่วนหัว ตามแถบมาตราส่วน (ก) 100 นาโนเมตร (ข) 0.5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 16 โครงสร้างตัวอสุจิของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ภายในมีไมโตคอนเดรีย ก) ภาพตัดขวางส่วนลำตัว ข) ภาพตัดตามยาวส่วนลำตัว ตามแถบมาตราส่วน (ก) 200 นาโนเมตร (ข) 0.5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 17 โครงสร้างตัวอสุจิของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดผ่าน (Transmission Electron Microscope; TEM) ภายในมี Axoneme ก) ภาพตัดขวางส่วนหาง ข) ภาพตัดตามยาวส่วนหาง ตามแถบมาตราส่วน (ก) 200 นาโนเมตร (ข) 0.5 ไมโครเมตร

4.2 ผลการทดลองที่ 2 ศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ และอัตราส่วนที่แตกต่างกันด้วยวิธีการแช่เย็น

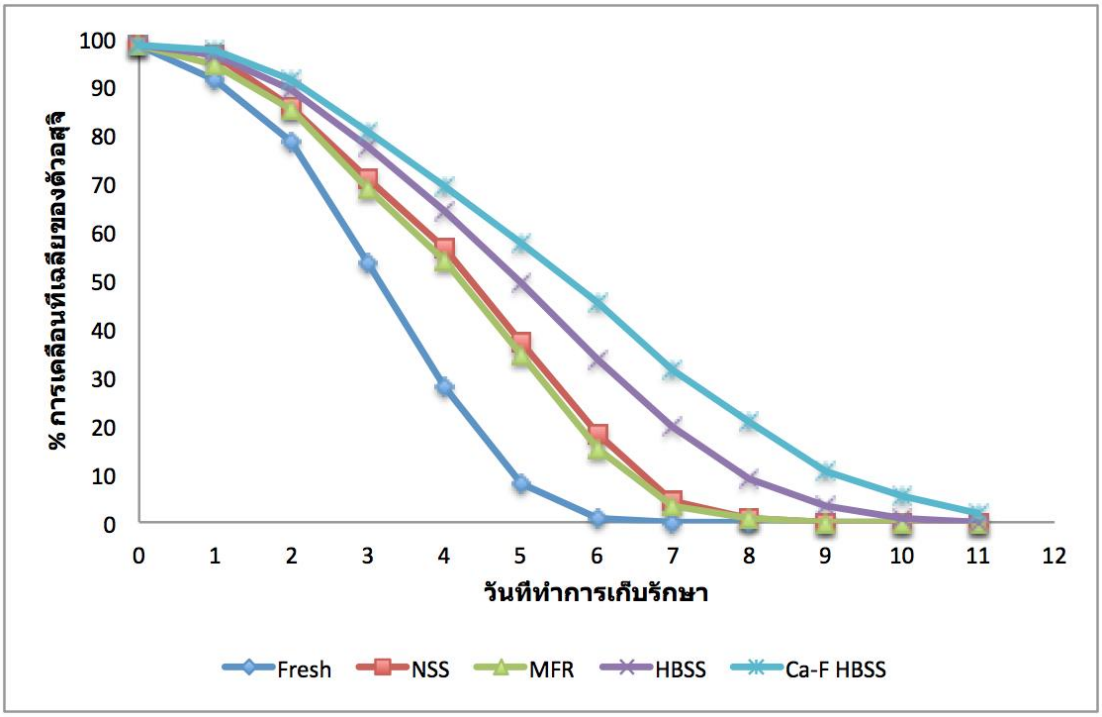
จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนสายพันธุ์โมโตโร่ ด้วยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ในสารเจือจางน้ำเชื้อ 4 ชนิด ได้แก่ Hank's Balanced Salt Solution (HBSS), Calcium-Free Hank's Balanced Salt Solution (Ca-F HBSS), Normal Saline Solution (NSS), Modified Fish Ringer's Solution (MFR) โดยมีกลุ่มควบคุมคือน้ำเชื้อสด พบว่าน้ำเชื้อสดตัวอสุจิสามารถมีชีวิตอยู่ได้ 6 วัน น้ำเชื้อผสม NSS และ MFR ตัวอสุจิมีชีวิตอยู่ได้ 8 วัน น้ำเชื้อผสม HBSS ตัวอสุจิมีชีวิตอยู่ได้ 10 วัน และ น้ำเชื้อผสม Ca-F HBSS ตัวอสุจิมีชีวิตอยู่ได้ 11 วัน (ตารางที่ 6 และ ภาพที่ 18) จึงเลือก Ca-F HBSS สำหรับใช้ในการทดลองถัดไป อัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่วันที่ 2 กลุ่มที่ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทุกสูตรมีอัตราการเคลื่อนที่ดีกว่ากลุ่มน้ำเชื้อสดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่วัน 5 เป็นต้นไป มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยอสุจิที่เก็บใน NSS และ MFR มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงใกล้เคียงกันแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) ในขณะที่อสุจิที่เก็บใน HBSS และ Ca-F HBSS มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในวันที่ 6 และ Ca-F HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นได้นานที่สุด

ตารางที่ 6 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ

จำนวนวันที่เก็บรักษา	ชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อ				
	น้ำเชื้อสด	NSS	MFR	HBSS	Ca-F HBSS
0	98.5±2.42[a]	98.5±2.42[a]	98.5±2.42[a]	98.5±2.42[a]	98.5±2.42[a]
1	91.5±5.30[a]	96.5±4.12[b]	94.5±4.38[ab]	96.5±4.74[b]	97.5±3.54[b]
2	78.5±8.51[a]	85.5±7.98[b]	85.0±7.45[ab]	89.5±6.85[b]	91.5±4.74[b]
3	53.5±11.10[a]	71.0±9.66[bc]	69.0±9.66[b]	77.5±6.77[cd]	80.5±4.97[d]
4	28.0±11.4[a]	56.5±12.0[bc]	54.0±12.4[b]	64.0±6.58[cd]	69.5±4.38[d]
5	8.0±6.75[a]	37.0±12.50[b]	34.5±10.1[b]	49.5±10.70[c]	57.5±4.86[c]
6	0.7±1.16[a]	18.0±10.30[b]	15.0±9.72[b]	33.5±9.44[c]	45.5±5.50[d]
7	0	4.5±4.38[a]	3.5±3.37[a]	19.5±8.96[b]	31.5±3.37[c]
8	0	0.6±0.97[a]	0.6±0.97[a]	8.9±5.69[b]	21.0±3.16[c]
9	0	0	0	3.6±3.03[a]	10.5±3.69[a]
10	0	0	0	0.6±0.97[a]	5.4±2.72[a]
11	0	0	0	0	1.6±2.01[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 18 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ

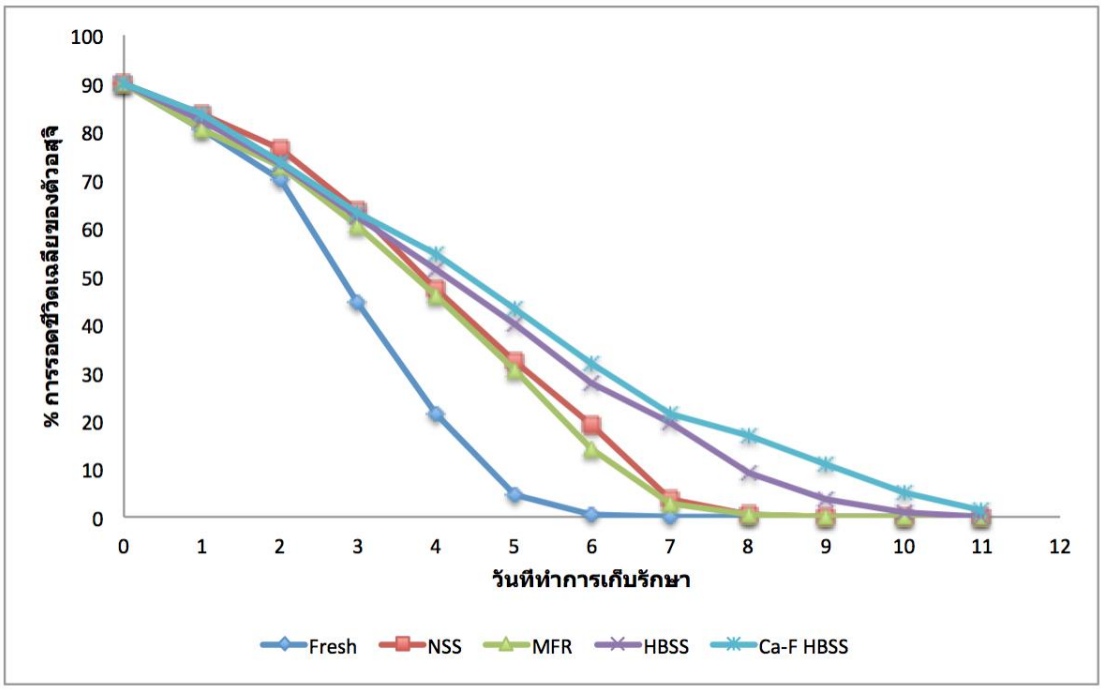
อัตราการรอดชีวิตของอสุจิในสารเจือจางน้ำเชื้อ 4 ชนิด โดยมีกลุ่มควบคุมคือน้ำเชื้อสด พบว่าอัตราการรอดชีวิตของอสุจิที่วันที่ 1 กลุ่มที่ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทุกสูตรมีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญกับกลุ่มน้ำเชื้อสด ($P>0.05$) กลุ่มที่ใส่สารเจือจางน้ำเชื้อทุกสูตรมีอัตราการรอดชีวิตดีกว่ากลุ่มน้ำเชื้อสดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ในวันที่ 3 และพบว่าอัตราการรอดชีวิตของอสุจิที่วัน 6 เป็นต้นไป มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) ระหว่างกลุ่มน้ำเชื้อสด NSS MFR HBSS และ Ca-F HBSS โดยมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ที่ 0.7±1.16%, 19.0±7.99%, 14.0±6.43%, 27.8±3.58% และ 31.9±2.96% ตามลำดับ กลุ่ม Ca-F HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นได้นานที่สุดที่ 11 วัน และมีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุด ดังตารางที่ 7 และภาพที่ 19

ตารางที่ 7 อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ

จำนวนวันที่เก็บรักษา	ชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อ				
	น้ำเชื้อสด	NSS	MFR	HBSS	Ca-F HBSS
0	89.8±3.36[a]	89.8±3.36[a]	89.8±3.36[a]	89.8±3.36[a]	89.8±3.36[a]
1	80.3±5.19[a]	83.5±3.98[a]	80.4±2.99[a]	82.5±3.57[a]	83.6±4.01[a]
2	70.0±5.54[a]	76.5±3.87[b]	72.6±3.84[a]	73.0±3.94[ab]	73.5±3.38[ab]
3	44.6±4.60[a]	63.6±4.09[b]	60.6±4.45[b]	62.1±3.35[b]	63.3±4.03[b]
4	21.3±4.50[a]	47.2±5.41[b]	45.7±4.40[b]	51.4±4.53[c]	54.4±3.84[c]
5	4.7±3.80[a]	32.3±4.57[b]	30.6±3.27[b]	40.2±4.24[c]	43.1±3.60[c]
6	0.7±1.16[a]	19.0±7.99[c]	14.0±6.43[b]	27.8±3.58[d]	31.9±2.96[d]
7	0	3.8±4.26[a]	2.9±2.81[a]	19.5±3.57[b]	21.4±3.63[b]
8	0	0.4±0.70[a]	0.6±0.97[a]	9.0±4.14[b]	16.7±2.75[c]
9	0	0	0	3.7±2.75[a]	11.0±2.71[b]
10	0	0	0	0.9±1.52[a]	5.1±2.13[b]
11	0	0	0	0	1.2±1.48[a]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 19 อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดต่างๆ

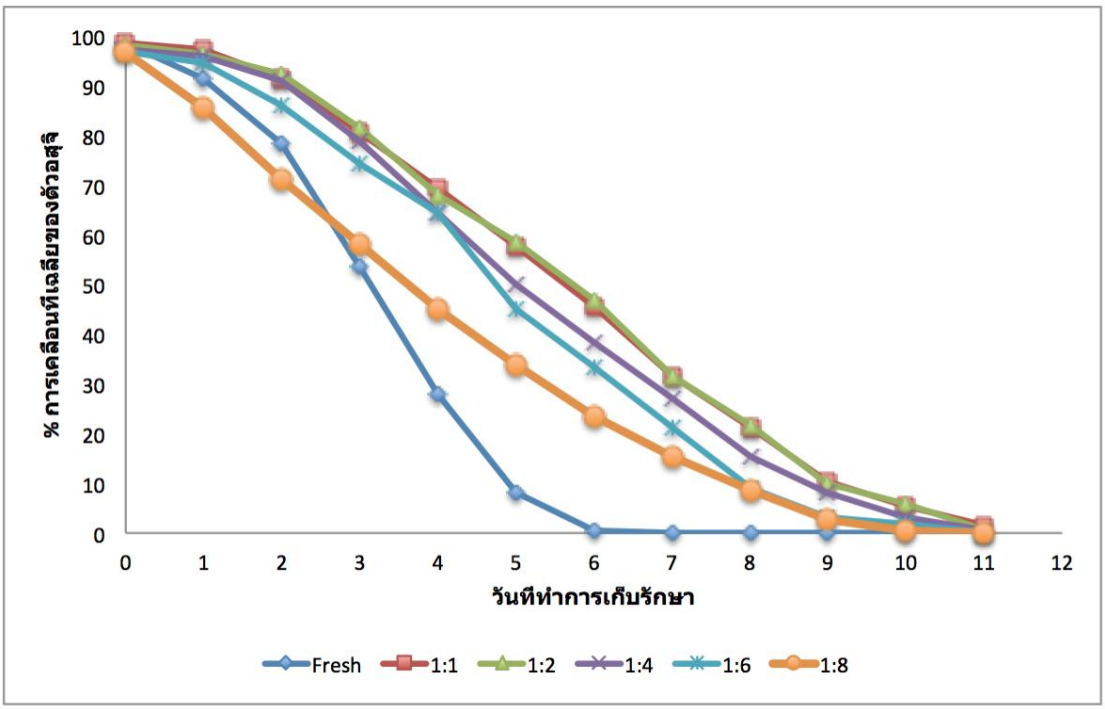
จากนั้นเมื่อได้สารเจือจางน้ำเชื้อที่ทำให้อสุจิมีอัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการรอดชีวิตมากที่สุดจากการทดลอง คือ Ca-F HBSS นำมาหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส ในอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อเป็น 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 และ 1:8 พบว่าอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในวันที่ 0 มีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญสำหรับทุกอัตราส่วน ($P>0.05$) เมื่ออัตราส่วนเจือจางที่มากขึ้นจะทำให้อัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิลดลง จะเห็นได้ชัดเจนในวันที่ 2 อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อที่ 1:1, 1:2 และ 1:4 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($P>0.05$) มีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 91.5±4.74%, 92.5±2.64% และ 91.0±3.16% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อที่ 1:6 และ 1:8 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ 86.0±3.94% และ 71.0±3.94% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามอัตราการเจือจางที่ 1:8 ทำให้เก็บน้ำเชื้อแช่เย็นได้น้อยวัน จาก 11 วัน ลดลงเหลือ 10 วัน (ตารางที่ 8 และภาพที่ 20)

ตารางที่ 8 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด Ca-F HBSS ในอัตราส่วนต่างๆกัน

จำนวนวันที่เก็บรักษา	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อชนิด Ca-F HBSS					
	น้ำเชื้อสด	1:1	1:2	1:4	1:6	1:8
0	98.5±2.42^{a}	98.5±2.42^{a}	98.0±2.58^{a}	97.5±2.64^{a}	97.0±2.58^{a}	97.0±2.58^{a}
1	91.5±5.30^{bc}	97.5±3.54^{a}	96.5±2.42^{ab}	96.0±2.11^{ab}	94.5±2.84^{b}	85.5±4.38^{c}
2	78.5±8.51^{c}	91.5±4.74^{a}	92.5±2.64^{a}	91.0±3.16^{a}	86.0±3.94^{b}	71.0±3.94^{d}
3	53.5±11.10^{d}	80.5±4.97^{a}	81.5±3.37^{a}	79.0±3.16^{a}	74.5±4.38^{b}	58.0±5.37^{c}
4	28.0±11.4^{d}	69.5±4.38^{a}	68.0±4.22^{ab}	64.5±4.38^{b}	64.5±4.97^{b}	45.0±6.24^{c}
5	8.0±6.75^{e}	57.5±4.86^{a}	58.5±4.12^{a}	50.0±3.33^{b}	45.0±5.27^{c}	34.0±7.38^{d}
6	0.7±1.16^{e}	45.5±5.50^{a}	47.0±4.83^{a}	38.5±4.74^{b}	33.5±4.74^{c}	23.5±5.30^{d}
7	0	31.5±3.37^{a}	31.5±4.12^{a}	27.0±4.22^{b}	21.0±3.94^{c}	15.5±5.50^{d}
8	0	21.0±3.16^{a}	21.5±3.37^{a}	15.5±4.38^{b}	9.0±3.16^{c}	8.5±4.12^{c}
9	0	10.5±3.69^{a}	10.0±3.33^{a}	8.0±4.22^{a}	3.4±2.17^{b}	2.8±2.04^{b}
10	0	5.4±2.72^{a}	5.7±2.45^{a}	3.2±3.16^{b}	1.9±2.28^{bc}	0.4±0.84^{c}
11	0	1.6±2.01^{a}	0.7±1.64^{ab}	0.6±1.35^{ab}	0.2±0.63^{b}	0

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 20 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด Ca-F HBSS ในอัตราส่วนต่างๆกัน

อัตราการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิให้ผลสอดคล้องกับอัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยในวันที่ 0 อัตราการรอดชีวิตมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญสำหรับทุกอัตราส่วน (P>0.05) เมื่ออัตราส่วนเจือจางที่มากขึ้นจะทำให้อัตราการรอดชีวิตของตัวอสุจิลดลง ซึ่งเห็นได้ชัดเจนในวันที่ 2 อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อที่ 1:1 และ 1:2 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (P>0.05) มีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิที่ 73.5±3.38% และ 72.9±3.07 ตามลำดับ อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อที่ 1:4 และ 1:6 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ (P>0.05) มีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิที่ 67.9±3.41% และ 67.1±3.60% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อที่ 1:8 อย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05) โดยมีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิที่ 53.9±5.61% (ตารางที่ 9 และภาพที่ 21)

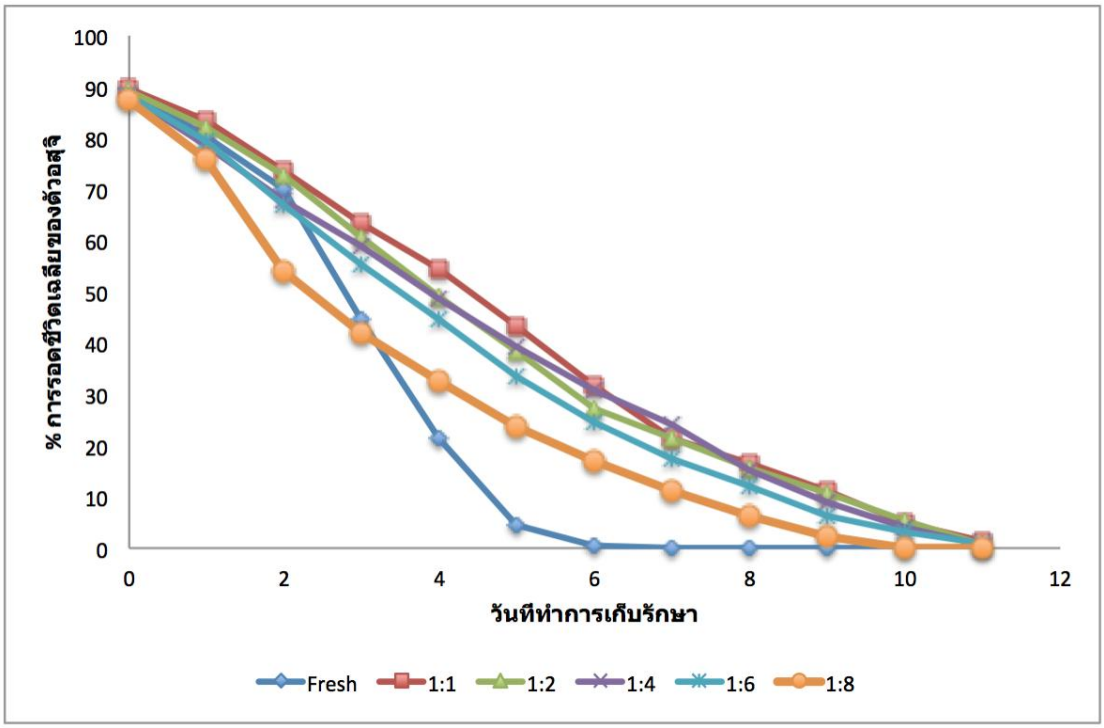
เมื่อเก็บรักษาน้ำเชื้อแบบแช่เย็นด้วยสาร Ca-F HBSS จนถึง 11 วัน พบว่าอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อ มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยอัตราส่วน 1:1 มีการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิดีที่สุด จึงเลือกใช้อัตราส่วนนี้ในการทำน้ำเชื้อแช่แข็งต่อไป

ตารางที่ 9 อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด Ca-F HBSS ในอัตราส่วนต่างๆกัน

จำนวนวันที่เก็บรักษา	อัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อชนิด Ca-F HBSS					
	น้ำเชื้อสด	1:1	1:2	1:4	1:6	1:8
0	89.8±3.36^{a}	89.8±3.36^{a}	89.2±3.01^{a}	88.2±4.69^{a}	88.2±4.16^{a}	87.4±4.93^{a}
1	80.3±5.19^{b}	83.6±4.01^{a}	82.0±3.53^{ab}	78.6±4.06^{bc}	79.3±4.47^{bc}	77.5±3.81^{c}
2	70.0±5.54^{ab}	73.5±3.38^{a}	72.9±3.07^{a}	67.9±3.41^{b}	67.1±3.60^{b}	53.9±5.61^{c}
3	44.6±4.60^{d}	63.3±4.03^{a}	60.9±4.48^{ab}	58.8±3.88^{bc}	55.5±3.24^{c}	42.0±5.327^{d}
4	21.3±4.50^{e}	54.4±3.84^{a}	49.2±4.02^{b}	48.7±4.24^{b}	44.7±2.91^{c}	32.5±4.86^{d}
5	4.7±3.80^{e}	43.1±3.60^{a}	38.5±3.57^{b}	39.3±4.00^{b}	33.3±2.87^{c}	23.7±3.68^{d}
6	0.7±1.16^{e}	31.9±2.96^{a}	27.2±2.57^{a}	31.0±4.52^{b}	24.4±3.84^{b}	17.2±4.24^{c}
7	0	21.4±3.63^{a}	21.6±2.67^{a}	24.0±5.14^{a}	17.4±3.66^{b}	11.4±3.86^{c}
8	0	16.7±2.75^{a}	15.8±1.55^{a}	15.4±4.38^{a}	12.3±2.45^{b}	6.1±3.73^{c}
9	0	11.0±2.71^{a}	10.9±2.02^{a}	8.9±4.46^{ab}	6.4±2.46^{b}	2.2±2.25^{c}
10	0	5.1±2.13^{a}	5.5±2.17^{a}	4.2±2.53^{ab}	3.2±2.25^{b}	0.2±0.63^{c}
11	0	1.2±1.48^{a}	0.7±1.34^{a}	0.6±0.84^{a}	0.8±1.32^{a}	0

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University



ภาพที่ 21 อัตราการรอดเฉลี่ยชีวิตของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ เมื่อใส่สารเจือจางน้ำเชื้อชนิด Ca-F HBSS ในอัตราส่วนต่างๆกัน

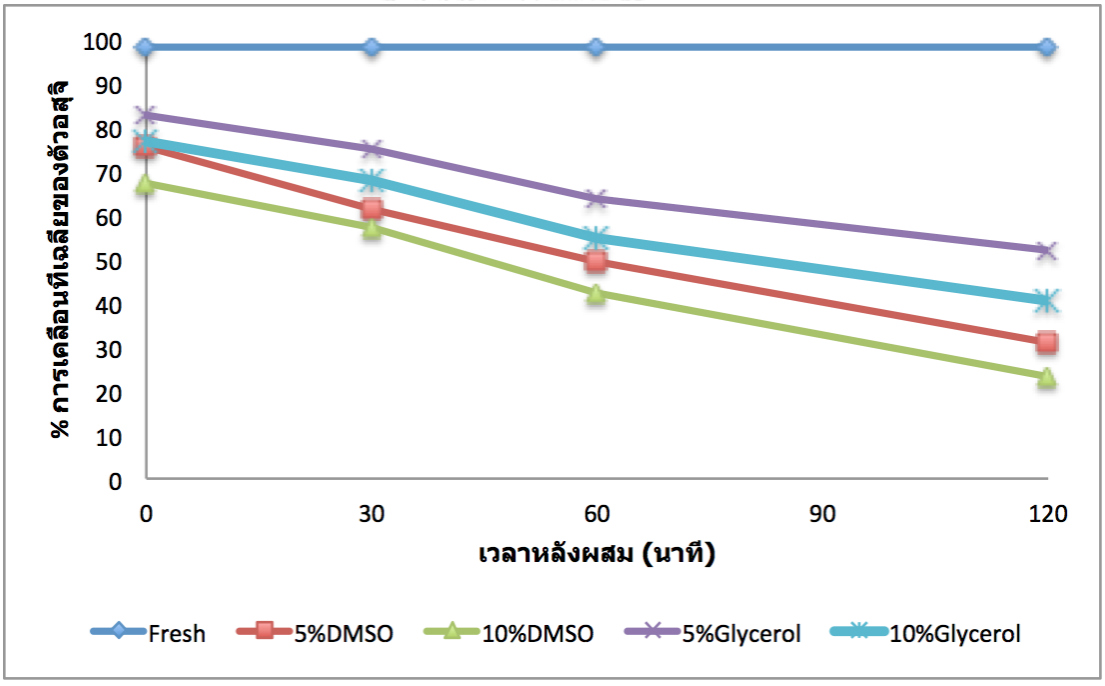
4.3 ผลการทดลองที่ 3 ศึกษาความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัว

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัวชนิด Glycerol และ DMSO ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% ของปริมาตรรวม ที่เวลา 0, 30, 60 และ 120 นาที ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนสายพันธุ์โมโตโร่ ด้วยการแช่เย็นที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส โดยมีกลุ่มควบคุมคือน้ำเชื้อสด พบว่าเมื่ออสุจิสัมผัสสารป้องกันการแข็งตัวที่เวลาเพิ่มขึ้นทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและอัตราการรอดชีวิตของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัว ทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิและอัตราการรอดชีวิตของอสุจิลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) โดยกลุ่มสารที่มีพิษกับอสุจิมากที่สุดคือ 10% DMSO, 5% DMSO, 10% Glycerol และ 5% Glycerol ตามลำดับ โดยที่เวลา 120 นาที มีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิอยู่ที่ 23.0±3.50%, 31.0±3.94%, 40.5±3.69% และ 52.0±3.50% ตามลำดับ และมีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิที่เวลา 120 นาที เป็น 27.9±2.69%, 34.9±2.33%, 40.5±3.69% และ 34.9±2.33% ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10-11 และ ภาพที่ 22-23

ตารางที่ 10 ความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัวต่อน้ำเชื้อโดยดูจากอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่

สารป้องกันการแข็งตัว	หลังผสม (0 นาที)	30 นาที	60 นาที	120 นาที
ไม่ผสมสาร	98.5±2.42[a]	98.4±2.53[a]	98.1±2.67[a]	98.3±2.33[a]
5% DMSO	75.5±3.69[c]	61.5±4.12[d]	49.5±4.38[d]	31.0±3.94[d]
10% DMSO	67.5±2.64[d]	57.0±3.50[e]	42.5±4.25[e]	23.0±3.50[e]
5% Glycerol	82.5±4.25[b]	75.0±3.33[b]	63.5±3.37[b]	52.0±3.50[b]
10% Glycerol	76.5±4.74[c]	68.0±3.50[c]	55.0±4.08[c]	40.5±3.69[c]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

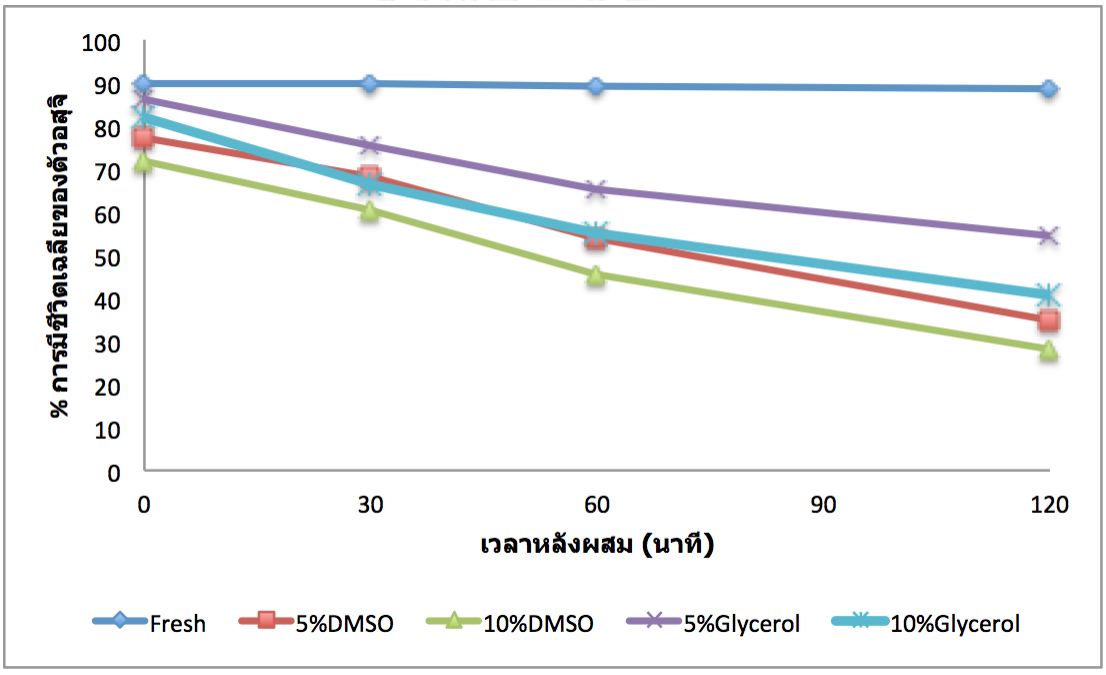


ภาพที่ 22 ความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัวต่อน้ำเชื้อโดยดูจากอัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่

ตารางที่ 11 ความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัวต่อน้ำเชื้อโดยดูจากอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่

สารป้องกันการแข็งตัว	หลังผสม (0 นาที)	30 นาที	60 นาที	120 นาที
ไม่ผสมสาร	89.8±3.36[a]	89.7±2.21[a]	89.3±3.04[a]	88.5±2.49[a]
5% DMSO	77.0±2.79[c]	68.3±2.67[c]	54.1±2.51[c]	34.9±2.33[d]
10% DMSO	71.9±2.92[d]	60.4±2.46[d]	45.5±3.14[d]	27.9±2.69[e]
5% Glycerol	86.0±3.33[ab]	75.2±3.01[b]	65.4±3.03[b]	54.3±2.50[b]
10% Glycerol	82.2±2.57[b]	66.5±3.03[c]	55.0±4.24[c]	40.5±3.54[c]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)



ภาพที่ 23 ความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัวต่อน้ำเชื้อโดยดูจากอัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่

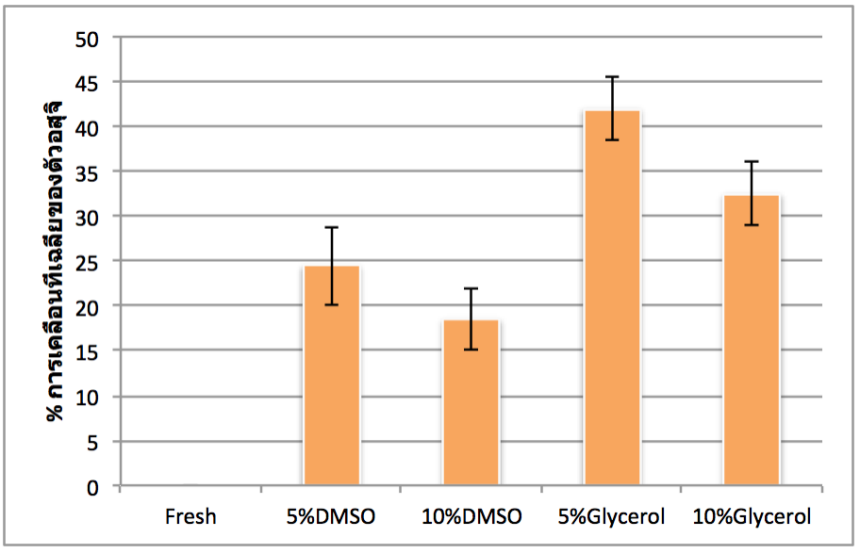
4.4 ผลการทดลองที่ 4 ศึกษาผลของการแช่แข็งน้ำเชื้อ

จากการทดลองเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนสายพันธุ์โมโตโร่ด้วยการแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อชนิด Ca-F HBSS ด้วยอัตราส่วนน้ำเชื้อต่อสารเจือจางน้ำเชื้อ 1:1 กับสารป้องกันการแข็งตัวชนิด Glycerol และ DMSO ที่ความเข้มข้น 5% และ 10% ของปริมาตรรวม นำไปแช่แข็งด้วยการลดอุณหภูมิ 2 ขั้นตอน เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นนำไปละลายโดยนำน้ำเชื้อไปแกว่งละลายในอ่างปรับอุณหภูมิ (Water bath) ที่ระดับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส พบว่า สารป้องกันการแข็งตัวที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดคือ 5% Glycerol, 10% Glycerol, 5% DMSO และ 10% DMSO ตามลำดับ โดยมีอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) อยู่ที่ 42.0±3.50%, 32.5±3.54%, 24.5±4.38% และ 18.5±3.37% ตามลำดับ และมีอัตราการรอดชีวิตของอสุจิแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) อยู่ที่ 42.9±2.85%, 34.1±2.77%, 23.7±3.20% และ 15.3±2.41% ตามลำดับ ดังตารางที่ 12-13 และ ภาพที่ 24-25

ตารางที่ 12 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ หลังจากผ่านการแช่แข็ง

สารป้องกันการแข็งตัว	อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิ (%)
ไม่ใส่สาร	0
5% DMSO	24.5±4.38[c]
10% DMSO	18.5±3.37[d]
5% Glycerol	42.0±3.50[a]
10% Glycerol	32.5±3.54[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

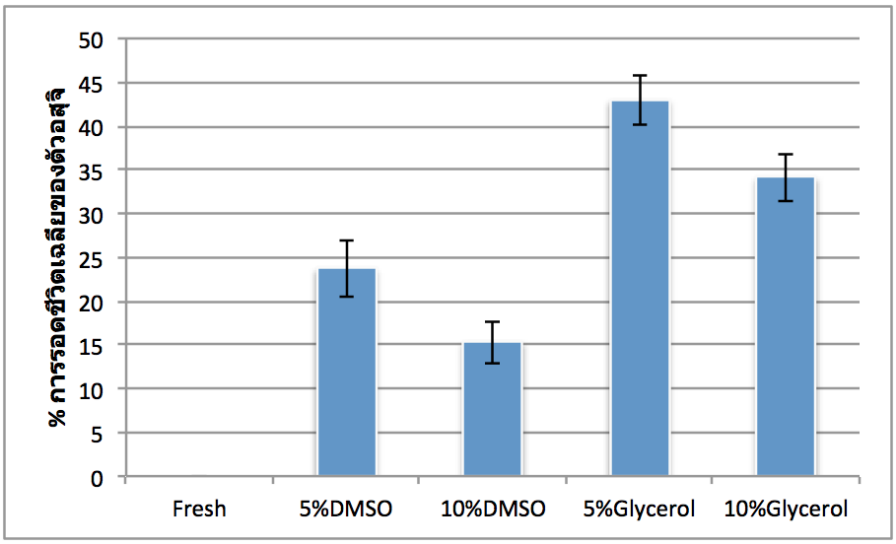


ภาพที่ 24 อัตราการเคลื่อนที่เฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ หลังจากผ่านการแช่แข็ง

ตารางที่ 13 อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ หลังจากผ่านการแช่แข็ง

สารป้องกันการแข็งตัว	อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิ (%)
ไม่ใส่สาร	0
5% DMSO	23.7±3.20[c]
10% DMSO	15.3±2.41[d]
5% Glycerol	42.9±2.85[a]
10% Glycerol	34.1±2.77[b]

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)



ภาพที่ 25 อัตราการรอดชีวิตเฉลี่ยของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

5.1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสด

การทดลองนี้เป็นการคิดค้นหาวิธีในการรีดเก็บน้ำเชื้อจากปลากระเบนขณะที่ปลายังมีชีวิตอยู่เป็นรายงานแรกที่สามารถทำได้ การศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับเรื่องระบบสืบพันธุ์เพศผู้และอสุจิในปลากระดูกอ่อนมีอยู่น้อยมาก และใช้วิธีการุณยฆาต (euthanasia) เพื่อเปิดผ่าหน้าท้องทั้งหมด เช่น ปลากระเบนขาว (White-edge freshwater whipray; *Himantura signifer*) ในประเทศไทย (Chatchavalvanich et al., 2005b; Chatchavalvanich et al., 2005a) ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์ Cururu stingray (*Potamotrygon* cf. *histrix*) ในประเทศบราซิล (Zaiden et al., 2011) ปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์ *P. magdalenae* ในประเทศโคลัมเบีย (Del Mar Pedreros-Sierra and Ramírez-Pinilla, 2015) เป็นต้น ซึ่งปลาเหล่านี้อยู่ในธรรมชาติ การจับมาเพื่อทำการศึกษาจึงเป็นการลดจำนวนประชากรในธรรมชาติลงไปอีก วิธีที่เหมาะสมที่ได้จากการทดลองนี้ คือ การรีดน้ำเชื้อโดยใช้มือกระตุ้น จับบังคับโดยปราศจากการวางยาสลบ เริ่มจากใช้ผ้าก๊อซชุบน้ำเกลือ (Normal saline solution) ทำความสะอาดบริเวณอวัยวะเพศและรูเปิดทวารรวม จากนั้นใช้มือนวดเบาๆ บริเวณใต้ท้องปลาใกล้กับต่อมเวสซิคูล่า และให้น้ำเชื้อไหลลงสู่หลอดสะอาดที่รอรับอยู่ใต้รูเปิดทวารรวม ผู้จับบังคับและผู้รีดน้ำเชื้อต้องอาศัยความชำนาญและความรวดเร็วพอสมควร เนื่องจากปลากระเบนเป็นสัตว์ที่ถูกกระตุ้นได้ง่าย เพียงแค่ใช้มือกระตุ้นก็เพียงพอในการหลั่งน้ำเชื้อแล้ว

เนื่องจากปลาจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีความหลากหลายมาก มีทั้งอาศัยในน้ำจืด อาศัยในน้ำเค็ม ปฏิสนธิภายในร่างกาย ปฏิสนธิภายนอกร่างกาย ออกลูกเป็นไข่ หรือออกลูกเป็นตัว เป็นต้น การศึกษาเรื่องระบบสืบพันธุ์และอสุจิจึงต้องทำการศึกษาในปลาชนิดนั้นๆ อย่างไรก็ตามปลาที่มาจากอันดับ (Order) หรือ วงศ์ (Family) เดียวกัน จะมีคุณสมบัติใกล้เคียงกัน สามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ เช่น ปลาในกลุ่ม catfish มีการศึกษาเรื่องการทำน้ำเชื้อแช่แข็งเพื่อจะได้ทำการผสมเทียมข้ามสายพันธุ์ (Horváth and Urbányi, 2000; Rurangwa et al., 2001; Kwantong and Bart, 2003; Linhart et al., 2005; Pan et al., 2008) แต่ยังไม่เคยมีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการประเมินคุณภาพของน้ำเชื้อสดที่รีดได้จากปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ จึงสามารถนำค่าที่ได้จากการทดลองนี้มาเป็นค่ามาตรฐานในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่ดีที่เหมาะกับการผสมพันธุ์ เนื่องจากพ่อพันธุ์ที่

ใช้ในการทดลองผ่านการคัดเลือกมาก่อนแล้ว โดยเป็นพ่อพันธุ์ที่มีการใช้งานเพื่อการผสมพันธุ์อยู่จริงในฟาร์มปลากระเบน และมีการให้ลูกอย่างต่อเนื่อง

รูปร่างของอสุจิ มีลักษณะหัวเรียวยาวแหลมบิดเป็นเกลียว หางเป็นเกลียวเล็กน้อย เมื่อส่องกล้องจุลทรรศน์ดูการเคลื่อนไหวพบการว่ายแบบลักษณะหมุนควง ซึ่งรูปร่างอสุจิมีความคล้ายคลึงกับในปลากระเบนขาว ขนาดของตัวอสุจิมีความแตกต่างกันเล็กน้อย ความยาวรวมของตัวอสุจิในปลากระเบนขาว (White-edge freshwater whipray; *H. signifer*) ประมาณ 147 ไมโครเมตร โดยส่วนหัวยาว 45 ไมโครเมตร ส่วนลำตัวยาว 15 ไมโครเมตร และส่วนหางยาว 87 ไมโครเมตร (Chatchavalvanich et al., 2005b) ส่วนในการทดลองนี้ ความยาวของตัวอสุจิในปลากระเบนโมโตโร่จากหัวถึงหางประมาณ 116 ไมโครเมตร โดยส่วนหัวยาว 42 ไมโครเมตร ส่วนลำตัวยาว 6 ไมโครเมตร และส่วนหางยาว 68 ไมโครเมตร พบว่าส่วนหัวยาวใกล้เคียงกัน ส่วนที่ยาวแตกต่างกันมากคือส่วนลำตัวและส่วนหาง ส่วนลักษณะโครงสร้างภายในเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีความคล้ายคลึงกับในปลากระเบนขาวเช่นเดียวกัน โดยส่วนหัวมีนิวเคลียสที่มีสารถ่ายทอดพันธุกรรมอยู่ ส่วนลำตัวประกอบด้วยเซนโตรโซมและไมโตคอนเดรียจำนวนมากซึ่งเป็นแหล่งให้พลังงาน และส่วนหางมี axoneme ซึ่งเป็นมัดของเส้นใยไฟบริล (fibril) ทำหน้าที่โบกพัดเพื่อการเคลื่อนไหว (Chatchavalvanich et al., 2005b) ปลากระเบนเป็นปลาที่มีการปฏิสนธิภายในร่างกายและออกลูกเป็นตัว รูปร่างของอสุจิที่พบจึงมีความคล้ายคลึงกับในปลาที่มีคุณสมบัติเช่นเดียวกันนี้ด้วย เช่น ปลาหางนกยูง (Guppy; *Poecilia reticulata*) และ ปลาสอดหางดาบเขียว (Green swordtail; *Xiphophorus helleri*) ซึ่งปลาที่มีการปฏิสนธิภายในร่างกายจะมีรูปร่างอสุจิตรงส่วนลำตัวที่ยาวเพราะต้องการใช้พลังงานมาก จึงพัฒนาให้มีไมโตคอนเดรียจำนวนมาก และมีกลไกที่สามารถอยู่รอดในระบบสืบพันธุ์ของเพศเมียได้นาน เมื่อเพศเมียได้รับการปฏิสนธิเพียงครั้งเดียว ก็สามารถออกลูกต่อไปได้อีกถึง 3-5 ครอกด้วยกัน (Huang et al., 2004b; Huang et al., 2009)

5.1.2 สารเจือจางน้ำเชื้อ และวิธีการทำน้ำเชื้อแช่เย็น

โดยปกติตัวอสุจิปลาจะไม่มีการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ใน seminal plasma หรือในอัณฑะแต่จะมีการเคลื่อนที่เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วยน้ำในขณะการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ถ้าจะเจือจางน้ำเชื้อปลาด้วยสารเจือจางน้ำเชื้อใดๆ ก็ตาม สารเจือจางน้ำเชื้อชนิดนั้นจะต้องไม่กระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ ดังนั้นการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาจึงควรมีส่วนประกอบทางเคมี ค่าออสโม-ลาลิตี้ และความเป็นกรดด่างใกล้เคียงกับ seminal plasma ของปลาชนิดนั้นๆ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการ

กระตุ้นการเคลื่อนที่ หรือการใช้พลังงานของตัวอสุจิ ตลอดจนการรักษาให้ตัวอสุจิคงรูป และมีชีวิตรอดตลอดระยะเวลาในการเก็บรักษา (Kang et al., 2004) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการใช้สารเจือจางน้ำเชื้อแต่ละชนิดมีแนวโน้มของอัตราการเคลื่อนที่และอัตราการมีชีวิตลดลง เมื่อระยะเวลาในการเก็บเพิ่มขึ้น ($P<0.05$) ทั้งนี้เนื่องจากในขณะที่ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่ จะมีการเผาผลาญพลังงานทั้งแบบใช้ก๊าซอ๊อกซิเจน และไม่ใช้ก๊าซอ๊อกซิเจน ซึ่งการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ก๊าซออกซิเจนนี้เองทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น (Lahnsteiner et al., 1999) กรดแลคติกที่เกิดขึ้นนี้เองจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเชื้อเปลี่ยนแปลงไป และเมื่อทำการเก็บรักษาในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นทำให้มีปริมาณของกรดแลคติกเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้มีค่าความเป็นกรดด่างลดลง ทำให้อัตราเมแทโบลิซึมและการเคลื่อนที่ของอสุจิลดลง นอกจากนี้ขบวนการเผาผลาญพลังงานยังส่งผลให้แหล่งพลังงานของเซลล์ได้แก่ กลูโคส หรือน้ำตาลชนิดอื่น ๆ เช่น กาแลคโทส ฟรักโทส ลดลง หรืออาจมีการใช้แหล่งพลังงานเหล่านี้หมดไปเมื่อทำการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น ส่งผลให้อัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิลดลง แต่อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าการเก็บรักษาในช่วงแรกเมื่อใช้สารเจือจางน้ำเชื้อทั้ง 4 ชนิด มีอัตราการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในช่วงเริ่มต้นของการเก็บรักษา การเผาผลาญพลังงาน ของตัวอสุจิยังเกิดขึ้นน้อย ส่งผลให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงน้อย รวมถึงแหล่งพลังงานของอสุจิยังมีปริมาณเพียงพอจึงไม่ส่งผลต่อตัวอสุจิ

HBSS มีค่าออสโมลาลิตี้ 286 mOsmol/kg และ pH 7.3 ส่วน Ca-F HBSS มีค่าออสโมลาลิตี้ 320 mOsmol/kg และ pH 7.4 ส่วน NSS มีค่าออสโมลาลิตี้ 292 mOsmol/kg และ pH 7.1 และ MFR มีค่าออสโมลาลิตี้ 275 mOsmol/kg และ pH 7.9 ซึ่งสารที่มีค่าออสโมลาลิตี้ใกล้เคียงกับ seminal plasma ของน้ำเชื้อปลากระเบนโมโตโร่ที่มีค่าออสโมลาลิตี้ 326 mOsmol/kg และค่า pH 7.3 นั่นคือ Ca-F HBSS จึงทำให้ Ca-F HBSS เก็บรักษาน้ำเชื้อได้นานที่สุด ค่าออสโมลาลิตี้มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ และอัตราการมีชีวิตของอสุจิ ในปลาน้ำจืดพบว่าสารละลายที่เป็น hypotonic คือ สารละลายนอกเซลล์มีความเข้มข้นน้อยกว่าภายในเซลล์ (ค่าออสโมลาลิตี้ของสารละลายภายนอกเซลล์ต่ำกว่าภายในเซลล์) จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิ โดยพบว่าสารละลายที่มีค่าออสโมลาลิตี้ต่ำกว่า 200 mOsmol/kg จะกระตุ้นการเคลื่อนที่ของตัวอสุจิในปลากลุ่มปลาไน และต่อมาเซลล์อสุจิจะหยุดการเคลื่อนที่ และเซลล์อาจแตกหรือถูกทำลายเนื่องจากเซลล์บวม ในทางตรงข้ามสารละลายที่เป็น hypertonic คือ สารละลายนอกเซลล์ที่มีความเข้มข้นมากกว่าภายในเซลล์ (ค่าออสโมลาลิตี้ของสารละลายภายนอกเซลล์สูงกว่าภายในเซลล์) ทำให้มีการสูญเสียน้ำส่งผลให้เซลล์เหี่ยวและเสียสภาพ ทำให้ไม่สามารถผสมกับไข่ได้ ซึ่งอสุจิของปลาน้ำจืดในปลากลุ่มปลาไนสามารถทนต่อการ

เปลี่ยนแปลงของค่าออสโมลาลิตี้ได้อยู่ในช่วง 254-346 mOsmol/kg (Alavi and Cosson, 2006) ทั้งนี้ HBSS และ Ca-F HBSS มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบจึงสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงานสำรองของอสุจิปลาได้ เพราะอสุจิของปลาสามารถใช้สารภายนอกเซลล์ในขบวนการเผาผลาญพลังงานได้ (Kruger et al., 1984; Yao et al., 1999) ในกรณีที่มีการเก็บน้ำเชื้อไว้ใช้ในระยะยาว อาจทำให้แหล่งพลังงานภายในตัวอสุจิหมดไป จึงทำให้น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย HBSS และ Ca-F HBSS ยังคงมีอัตราการมีชีวิตของอสุจิสูงกว่า NSS และ MFR ซึ่งไม่มีกลูโคสเป็นองค์ประกอบ ข้อแตกต่างระหว่าง HBSS และ Ca-F HBSS คือการมีแคลเซียมเป็นส่วนประกอบ ซึ่งแคลเซียมส่งผลต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิเช่นเดียวกัน มีการศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างระดับแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์อสุจิต่อคุณภาพน้ำเชื้อของช้างเอเชีย พบว่าเซลล์อสุจิในกลุ่มร้อยละการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าต่ำสุดจะมีค่าเฉลี่ยของร้อยละตัวตาย และระดับแคลเซียมในน้ำเลี้ยงเซลล์อสุจิสูงสุด เนื่องจากระดับแคลเซียมภายนอกเซลล์ที่มีมากจะส่งผลต่อกระบวนการส่งสัญญาณของ cAMP/protein kinase A และ calcium signaling pathway ทำให้อสุจิหยุดเคลื่อนที่ในที่สุด (Meseguer et al., 2004; Sivilaikul et al., 2010) จากการศึกษาในครั้งนี้จะเห็นได้ว่า Ca-F HBSS เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโรได้ดีที่สุด จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการใช้ Ca-F HBSS ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาแบบระยะสั้นมีหลายรายงานที่ประสบผลสำเร็จ ได้แก่ การศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลาม้าลาย (Zebrafish, *Danio rerio*) ซึ่งได้ใช้ Ca-F HBSS และ Buffered sperm motility-inhibiting solution (BSMIS) ในการเก็บรักษาแบบแช่เย็น พบว่าการใช้ Ca-F HBSS ให้ผลอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้ BSMIS (Ji et al., 2004) เช่นเดียวกับการศึกษาการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโคโลราโดไพค์มินเนา (Colorado pikeminnow, *Ptychocheilus lucius*) แบบระยะสั้นโดยใช้ Ca-F HBSS เป็นสารเจือจางน้ำเชื้อพบว่า น้ำเชื้อที่เจือจางด้วย Ca-F HBSS มีอัตราการเคลื่อนที่ 77±22% ซึ่งสูงกว่าน้ำเชื้อที่ไม่มีการเจือจางด้วย Ca-F HBSS ที่ทีอัตราการเคลื่อนที่ 12±30% (Tiersch et al., 2004a) และในปีเดียวกันได้มีศึกษาผลของสารเจือจางน้ำเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ HBSS และ 0.6% NaCl ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาคอมมอนสนุค (Common snook, *Centropomus undecimalis*) พบว่าเมื่อเจือจางน้ำเชื้อด้วย HBSS สามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อได้ยาวนานกว่าการใช้ 0.6% NaCl (Tiersch et al., 2004b)

การศึกษาอัตราส่วน ได้แก่ 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 และ 1:8 พบว่าการใช้อัตราการเจือจางในแต่ละอัตราส่วนไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิ และให้ผลไม่แตกต่างจากการใช้น้ำเชื้อสด (กลุ่มควบคุม, $P>0.05$) ที่ระยะเวลาการเก็บ 0 ชั่วโมง ทั้งนี้ในขณะที่ตัวอสุจิมีการเคลื่อนที่

จะมีการเผาผลาญพลังงานแบบไม่ใช้ก๊าซอ๊อกซิเจนทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้น (Lahnsteiner et al., 1999) ซึ่งกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างของน้ำเชื้อเปลี่ยนแปลงไป ถ้าค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงมากๆ จะทำให้ตัวอสุจิตายได้ และในขบวนการเผาผลาญพลังงานยังส่งผลให้แหล่งพลังงานของเซลล์ลดลงเช่นเดียวกัน สอดคล้องกับการศึกษาในปลาดุกด้าน (Walking catfish, *Clarias macrocephalus*) พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) การใช้อัตราการเจือจาง 1:1, 1:2, 1:4, 1:9 และ 1:19 ไม่มีผลต่ออัตราการเคลื่อนที่ (Vuthiphandchai et al., 2009) และจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าเมื่อทำการเก็บยาวนานขึ้นถึง 3 วัน และใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนสูง (1:8) ส่งผลให้มีอัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วนต่ำกว่า (1:1, 1:2, 1:4 และ 1:6) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะผลของ dilution factor ทำให้ความเข้มข้นของอสุจิลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในปลาโอเชียนเพาท์ (Ocean pout, *Macrozoarces americanus* L.) พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน เมื่อใช้อัตราการเจือจาง 1:3 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1:30 และ 1:40 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (Yao et al., 1999) และจากการศึกษาในปลาฮาลิบัตแอตแลนติก (Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*) พบว่าเมื่อใช้อัตราการเจือจาง 1:5 มีอัตราการเคลื่อนที่สูงกว่าการใช้อัตราการเจือ 1:9, 1:19, 1:49 และ 1:99 (Babiak et al., 2006) นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาในปลาคอดแอตแลนติก (Atlantic cod, *Gadus morhua*) ที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วันพบว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1:1 และ 1:3 มีอัตราการเคลื่อนที่ 49±0.24 และ 51±0.6% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการใช้อัตราการเจือจาง 1:5 และ 1:10 มีอัตราการเคลื่อนที่ 43±0.3 และ 39±5.9% ตามลำดับ (DeGraaf et al., 2004) และจากการศึกษาในปลากะพงดำ (Black sea bass, *Centropristis striata* L.) พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บ 2 วัน การใช้อัตราการเจือจาง 1:3 มีอัตราการเคลื่อนที่ (74±0.3%) ซึ่งสูงกว่าและแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) จากการใช้อัตราการเจือจาง 1:1, 1:2, 1:5 และ 1: 10 ซึ่งมีอัตราการเคลื่อนที่อยู่ระหว่าง 42-66% (DeGraaf and Berlinsky, 2004)

5.1.3 สารป้องกันการแข็งตัว และวิธีการทำน้ำเชื้อแช่แข็ง

จากการศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัว ที่มีผลต่อการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่โดยวิธีการแช่แข็ง โดยใช้สารป้องกันการแข็งตัว 2 ชนิดได้แก่ DMSO และ Glycerol ที่ระดับความเข้มข้น 5% และ 10% ร่วมกับ Ca-F HBSS เป็นสารเจือจาง

น้ำเชื้อ พบว่าเมื่อใช้ 5% Glycerol อัตราการมีชีวิตและอัตราการเคลื่อนที่ของอสุจิที่สูงกว่ากลุ่มทดลองอื่นๆที่ใช้ในการศึกษาอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ทั้งนี้อาจเนื่องจากการใช้ Glycerol ช่วยป้องกันการลดขนาดของเซลล์ และอันตรายต่อเซลล์อันเนื่องมาจากความไม่สมดุลของอิเล็คโทรไลท์ในขณะทำการแช่แข็ง ซึ่งมีรายงานว่า Glycerol ที่เติมลงไปจะเป็นตัวการที่ช่วยปรับเปลี่ยนให้เกิดความสมดุลระหว่างความเข้มข้นของโซเดียมภายในและภายนอกเซลล์ ด้วยการส่งถ่ายโซเดียมเข้าสู่ภายในเซลล์ และเนื่องจากโซเดียมไอออนมีความสามารถจับกับน้ำทำให้มีการส่งถ่ายน้ำเข้าสู่เซลล์เป็นการช่วยป้องกันการลดขนาดของเซลล์ระหว่างขบวนการแช่แข็ง (Rall et al., 1978) นอกจากนี้การใช้ Glycerol ยังช่วยป้องกันการเกิดเกล็ดน้ำแข็งภายในเซลล์ ทั้งนี้เนื่องจาก Glycerol เมื่อรวมกับน้ำจะทำให้จุดเยือกแข็งของสารละลายนั้นลดต่ำลง ทำให้ของเหลวนั้นเย็นจัดก่อนที่จะแข็งหรือก่อนการเกิดเกล็ดน้ำแข็ง หรืออีกนัยหนึ่งคือส่งผลให้ของเหลวภายในเซลล์แข็งตัวช้ากว่าปกติ และทำให้ในเซลล์มีปริมาณน้ำน้อยลง การเกิดเกล็ดน้ำแข็งก็ย่อมเกิดขึ้นน้อยตามไปด้วย ถ้าปริมาณน้ำในเซลล์มากก็จะเกิดผลึกมากซึ่งเป็นผลเสียต่อเซลล์ มีหลายรายงานที่ประสบความสำเร็จในการใช้ Glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาโดยวิธีแช่แข็ง เช่น จากการศึกษาในปลาสอดหางดาบเขียว (Green swordtail, *Xiphophorus helleri*) (Huang et al., 2004b) และจากการศึกษาในปลาสอดแพลตตี้ (Platyfish, *Xiphophorus couchianus*) (Huang et al., 2004a) ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการใช้ 5% Glycerol ให้ผลอัตราการปฏิสนธิสูงกว่าการใช้ Glycerol 10% และ 15% ทั้งนี้เนื่องจากความเข้มข้นของ Glycerol ที่สูงเกินไป ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าเมื่อใช้ Glycerol ที่ความเข้มข้น 10% และ 15% ทำให้มีการแพร่ของ Glycerol เข้าสู่เซลล์ได้เร็วกว่าที่ความเข้มข้น 5% ที่ equilibration time 10 นาทีเท่ากัน ซึ่งส่งผลให้มีปริมาณของ Glycerol สูงเกินไปจนเป็นพิษต่อเซลล์อสุจิได้ อย่างไรก็ตามสารป้องกันการแข็งตัวยังมีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของปลาโดยมีรายงานการใช้ 5% Glycerol ไม่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลาบางชนิด ได้แก่ น้ำเชื้อปลาเกล็ดเงิน (Silver carp, *Hypophthalmichthys molitrix*) โดยพบว่า เมื่อใช้ 5% Glycerol ในการเก็บรักษาน้ำเชื้อโดยวิธีการแช่แข็งทำให้มีอัตราการเคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้ 10% DMSO (Alvarez et al., 2003) เช่นเดียวกับการศึกษาในปลาคอมมอนสนุค (Common snook, *Centropomus undecimalis*) พบว่าการใช้ 5% Glycerol มีอัตราการ เคลื่อนที่ต่ำกว่าการใช้ 5% และ 10% DMSO (Tiersch et al., 2004b) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากในปลาแต่ละชนิดมีลักษณะและขนาดของตัวอสุจิที่แตกต่างกันซึ่งอาจทำให้โครงสร้างของส่วนประกอบของเซลล์เมมเบรนซึ่งได้แก่ ฟอสโฟลิปิด โปรตีน และ

คาร์โบไฮเดรต มีปริมาณแตกต่างกัน จึงอาจส่งผลให้การแลกเปลี่ยนสารระหว่างภายในและภายนอกเซลล์แตกต่างกันออกไปตามชนิดของปลา

5.2 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

5.2.1 สามารถรีดเก็บน้ำเชื้อจากปลากระเบนที่มีชีวิตได้ด้วยวิธีการรีดน้ำเชื้อโดยใช้มือกระตุ้นจับบังคับโดยปราศจากการวางยาสลบ เริ่มจากใช้ผ้าก๊อซชุบน้ำเกลือ (normal saline solution) ทำความสะอาดบริเวณอวัยวะเพศและรูเปิดทวารรวม จากนั้นใช้มือนวดเบาๆ บริเวณใต้ท้องปลาใกล้กับต่อมเวสซิคูล่า (seminal vesicle) และให้น้ำเชื้อไหลลงสู่หลอดสะอาดที่รอรับอยู่ใต้รูเปิดทวารรวม

5.2.2 การรีดเก็บน้ำเชื้อในการทดลองนี้ได้มาจากช่องทวารร่วมโดยตรง ยังไม่ผ่านอวัยวะเพศ จึงอาจมีปัจจัยของน้ำเลี้ยงเชื้อจากต่อมคลาสเปอร์เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย จึงควรมีการศึกษาต่อไป

5.2.3 ได้ค่ามาตรฐานคุณภาพน้ำเชื้อของปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโรในการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่ดีที่เหมาะกับการผสมพันธุ์ ดังนี้

ปริมาตรรวมของน้ำเชื้อ	0.53±0.15 มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรดด่าง	7.3±0.26
ความเข้มข้นของตัวอสุจิ	2.28±0.46 $\times 10^9$ ตัวต่อมิลลิลิตร
เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ	98.5±2.42%
เปอร์เซ็นต์ของอสุจิอัดแน่น	15.4±2.88%
เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของอสุจิ	89.8±3.36

และมีคุณสมบัติของน้ำเลี้ยงอสุจิ ดังนี้

ค่าออสโมลาลิตี้ (Osmolality)	325.8±9.04 mOsmol/kg
โซเดียม (Na^+)	81.9±3.78 mMol/L
โพแทสเซียม (K^+)	51.8±3.33 mMol/L
แคลเซียม (Ca^{2+})	2.88±0.30 mMol/L
แมกนีเซียม (Mg^{2+})	1.2±0.13 mMol/L
คลอไรด์ (Cl^-)	109.9±3.35 mMol/L
โปรตีนรวม (Total protein)	1.19±0.73 mg/dl
กลูโคส (Glucose)	34.6±11.3 mg/dl
คอเลสเตอรอล (Cholesterol)	13.2±5.79 mg/dl

5.2.4 ทราบถึงลักษณะรูปร่าง ขนาด และโครงสร้างของอสุจิปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ มีลักษณะหัวเรียวยาวแหลมบิดเป็นเกลียว หางเป็นเกลียวเล็กน้อย เมื่อส่องกล้องจุลทรรศน์ดูการเคลื่อนไหวพบการว่ายแบบลักษณะหมุนควง ความยาวของตัวอสุจิในปลา กระเบนโมโตโร่มีขนาดความยาวรวมจากหัวถึงหาง 116.34±1.92 ไมโครเมตร ความยาวเฉพาะส่วนหัว 42.46±1.23 ไมโครเมตร ความกว้างเฉพาะส่วนหัว 0.54±0.06 ไมโครเมตร ความยาวเฉพาะส่วนลำตัว 6.39±0.02 ไมโครเมตร ความกว้างเฉพาะส่วนลำตัว 0.69±0.04 ไมโครเมตร ความยาวเฉพาะส่วนหาง 68.01±1.06 ไมโครเมตร และความกว้างเฉพาะส่วนหาง 0.37±0.56 ไมโครเมตร โครงสร้างภายในประกอบด้วย ส่วนหัวมีนิวเคลียสอัดแน่น และมีเยื่อหุ้ม ส่วนลำตัวมีไมโตรคอนเดรียล้อมรอบมากมาย ส่วนหางมี axoneme และ แกนตามยาว 2 แท่งขนาบข้าง และมีเยื่อหุ้ม

5.2.5 จากการศึกษาชนิดของสารเจือจางน้ำเชื้อพบว่าน้ำเชื้อสดตัวอสุจิสามารถมีชีวิตอยู่ได้ 6 วัน น้ำเชื้อผสม NSS และ MFR ตัวอสุจิสามารถมีชีวิตอยู่ได้ 8 วัน น้ำเชื้อผสม HBSS ตัวอสุจิสามารถมีชีวิตอยู่ได้ 10 วัน และ น้ำเชื้อผสม Ca-F HBSS ตัวอสุจิสามารถมีชีวิตอยู่ได้ 11 วัน การใช้ Ca-F HBSS จึงเป็นสารเจือจางน้ำเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ ส่วนอัตราการเจือจาง (น้ำเชื้อ:สารเจือจางน้ำเชื้อ) พบว่ามีอิทธิพลร่วมกันระหว่างอัตราการเจือจางน้ำเชื้อกับระยะเวลาการเก็บ โดยที่ระยะเวลาการเก็บเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) การใช้อัตราการเจือจางที่อัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:4, 1:6 และ 1:8 ไม่มีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ แต่เมื่อระยะเวลาการเก็บยาวนานขึ้นเป็น 2 วัน การใช้อัตราการเจือจางที่มีอัตราส่วนเพิ่มขึ้นส่งผลให้คุณภาพของน้ำเชื้อลดลง

5.2.6 จากการศึกษาความเป็นพิษของสารป้องกันการแข็งตัว พบว่ามีภาวะปรับตัวอยู่ที่ 60 นาที ดังนั้นไม่ควรเตรียมสารนานเกินไปก่อนที่จะนำไปแช่แข็ง

5.2.7 จากการศึกษาชนิดและความเข้มของสารป้องกันการแข็งตัว พบว่ามีอิทธิพลร่วมกันระหว่างชนิดของสารป้องกันการแข็งตัวกับความเข้มข้นของสารป้องกันการแข็งตัวนั้น และพบว่า 5% Glycerol เป็นสารป้องกันการแข็งตัวที่เหมาะสมในการเก็บรักษาน้ำเชื้อปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ด้วยวิธีการแช่แข็ง

5.2.8 ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในการนำน้ำเชื้อไปผสมเทียมต่อไป เพื่อดูผลจากการเก็บรักษาน้ำเชื้อทั้งแบบแช่เย็นและแช่แข็ง ทำให้ตัวอสุจิมีประสิทธิภาพลดลงหรือไม่ โดยดูจากอัตราการผสมติด

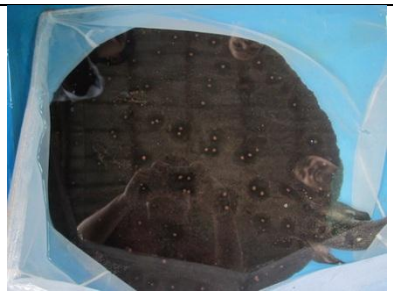
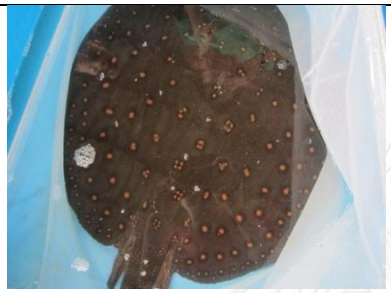
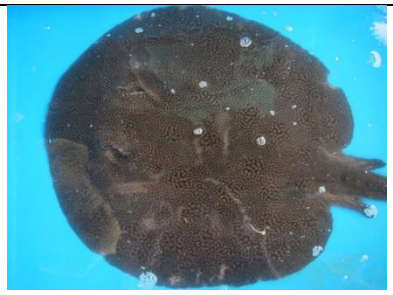
ภาคผนวก

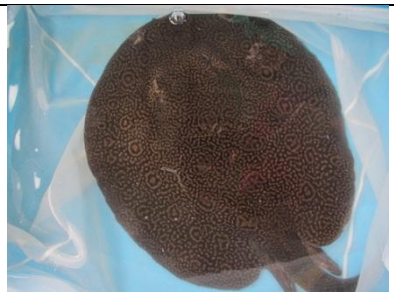
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงข้อมูลปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่เพศผู้ที่ใช้ในงานวิจัย ประกอบด้วย รหัสประจำตัวสัตว์ รูปถ่ายระบุตัวสัตว์ ความยาวลำตัวตั้งแต่ปลายจมูกจนถึงสะโพก (Girdle length หรือ GL; cm) ความยาวลำตัวรวมตั้งแต่ปลายจมูกถึงปลายหาง (Total length หรือ TL; cm) ความกว้างลำตัวโดยวัดจากส่วนที่กว้างที่สุด (Disc width หรือ W; cm) และน้ำหนักตัว (Weight; kg)

รหัสประจำตัว	รูปถ่าย	GL (cm)	TL (cm)	W (cm)	Weight (kg)
M01		39	71	40	5
M02		39	70	40	4
M03		38	69	39	4
M04		33	62	35	3

รหัสประจำตัว	รูปถ่าย	GL (cm)	TL (cm)	W (cm)	Weight (kg)
M05		38	68	40	4.5
M06		42	74	43	5.5
M07		31	60	33	2.5
M08		38	69	40	4
M09		39	79	40	4.5

รหัสประจำตัว	รูปถ่าย	GL (cm)	TL (cm)	W (cm)	Weight (kg)
M10		33	62	34	2.5

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ข

ส่วนประกอบของสีย้อม Eosin-nigrosin

ส่วนประกอบสารเคมี	**ปริมาณ**
Eosin B	1 กรัม
Nigrosin	5 กรัม
Sodium citrate dihydrate	1.5 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ที่มา: Hackett and Macpherson, 1965

วิธีการเตรียมสีย้อมสำหรับดูตัวเป็นตัวตาย

สามารถเตรียมได้ดังนี้ ชั่ง Eosin B 1 กรัม, Nigrosin 5 กรัม, Sodium citrate dehydrate 1.5กรัม ใส่ใน beaker และเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ต้องให้ความร้อนขณะเตรียมสาร เมื่อสารละลายเข้ากันดีแล้วนำไปกรองจนไม่มีตะกอนเหลืออยู่ นำสีย้อมที่เตรียมเสร็จแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาโดยเก็บที่อุณหภูมิห้อง

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ภาคผนวก ค

แสดงใบอนุญาตการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานวิจัย จากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขที่.....13310037.....

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ใบอนุญาตให้ใช้สัตว์ใน
งานวิจัย งานทดสอบ งานผลิตชีววัตถุ งานสอน และงานอื่น ๆ

ใบอนุญาตนี้ให้ไว้เพื่อแสดงว่าคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้พิจารณาโครงการวิจัย เรื่อง "การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ และการเก็บรักษาน้ำเชื้อในปลากระเบนน้ำจืดสายพันธุ์โมโตโร่ *(Potamotrygon motoro)*" ซึ่งมี รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.นันทริกา ชันซื่อ เป็นหัวหน้าหรือเจ้าของโครงการแล้วเห็นสมควรอนุญาตให้ดำเนินการตามโครงการนี้ได้ โดยมีเงื่อนไขว่าผู้ใช้สัตว์ในความรับผิดชอบของโครงการต้องปฏิบัติตามข้อมูลที่กรอกในแบบฟอร์มขออนุญาตใช้สัตว์ที่ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการวิจัยอย่างเคร่งครัด กรณีที่มีการปฏิบัติอย่างหนึ่งอย่างใด นอกเหนือจากที่ระบุในแบบฟอร์มขออนุญาตและเสนอในโครงการ คณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์จะดำเนินการงดใบอนุญาต ฯ นี้ และแจ้งหน่วยงานที่เกี่ยวข้องทราบ

ลงนาม.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.ฐานิสร์ ดำรงค์วัฒนโภคิน)
ประธานคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและ
การใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์

ลงนาม.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.เบญจมาศ ปัทมาลัย)
รองคณบดีฝ่ายวิจัย

วันที่ออกใบอนุญาต...22.....พฤษภาคม.....2556.....
วันที่หมดอายุ.....22.....พฤษภาคม.....2557.....

Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee

Certificate of Project Approval	☑ Original ☐ Renew
Animal Use Protocol No. **13310037**	**Approval No.** **13310037**
Protocol Title **EVALUATION AND PRESERVATION OF FRESHWATER STINGRAY (*POTAMOTRYGON MOTORO*) SEMEN.**	
Principal Investigator **Assoc.Prof.Dr. Nantarika Chansue**	
Certification of Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) This project has been reviewed and approved by the IACUC in accordance with university regulations and policies governing the care and use of laboratory animals. The review has followed guidelines documented in Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals for Scientific Purposes edited by the National Research Council of Thailand.	
Date of Approval **May 22, 2013**	**Date of Expiration** **May 22, 2014**
Applicant Faculty/Institution **Faculty of Veterinary Science**	
Signature of Chairperson	**Signature of Authorized Official**
Name and Title **Asst. Prof. Dr. Thanis Damrongwatanapokin** **Chairman**	**Name and Title** **Asst. Prof. Dr. Benjamas Patamalai** **Associate Dean (Research and Academic Service)**
The official signing above certifies that the information provided on this form is correct. The institution assumes that investigators will take responsibility, and follow university regulations and policies for the care and use of animals. *This approval is subjected to assurance given in the animal use protocol and may be required for future investigations and reviews.*	

รายการอ้างอิง

รายการอ้างอิง

กันยารัตน์ สุวรรณประทีป. 2548. รวมสุดยอดกระเบนน้ำจืดยอดฮิต. พิมพ์ครั้งที่ 1 ed. In: เค แอนด์ เค บุ๊ค พับลิชชิ่ง หจก, กรุงเทพฯ. 98 หน้า.

รุจิพร ประทีปเสน. 2541. การเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด. In: ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. หน้า 2-19.

อรุณี รอดลอย. 2556. "Subject: ปลากระเบนน้ำจืด สวยงาม เลี้ยงง่าย ขายคล่อง ตลาดส่งออกไม่อั้น" (online). Available: http://www.fisheries.go.th/aquaorna/web2/images/download/string%20ray.pdf.

Agarwal NK and Raghuvanshi SK. 2009. Spermatocrit and sperm density in snowtrout (*Schizothorax richardsonii*): Correlation and variation during the breeding season. Aquaculture. 291(1): 61-64.

Alavi SMH and Cosson J. 2005. Sperm motility in fishes. I. Effects of temperature and pH: a review. Cell Biol Int. 29(2): 101-110.

Alavi SMH and Cosson J. 2006. Sperm motility in fishes.(II) Effects of ions and osmolality: a review. Cell Biol Int. 30(1): 1-14.

Alvarez B, Fuentes R, Pimentel R, Abad Z, Cabrera E, Pimentel E and Arenal A. 2003. High fry production rates using post-thaw silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) spermatozoa under farming conditions. Aquaculture. 220(1): 195-201.

Araújo MLG, Charvet-Almeida P, Almeida MP and Pereira H. 2004. Freshwater stingrays (Potamotrygonidae): status, conservation and management challenges. Information document AC. 20: 1-6.

Babel JS. 1967. Reproduction, life history, and ecology of the round stingray, *Urolophus halleri* Cooper. Fish Bulletin Calif Dep Fish Game. 137: 1-104.

Babiak I, Ottesen O, Rudolfsen G and Johnsen S. 2006. Chilled storage of semen from Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L.: I: Optimizing the protocol. Theriogenology. 66(9): 2025-2035.

Chapman DD, Corcoran MJ, Harvey GM, Malan S and Shivji MS. 2003. Mating behavior of southern stingrays, *Dasyatis americana* (Dasyatidae). Environ Biol Fishes. 68(3): 241-245.

Charvet-Almeida P, Araújo MLG and Almeida MP. 2005. Reproductive aspects of freshwater stingrays (Chondrichthyes: Potamotrygonidae) in the Brazilian Amazon Basin. J Northwest Atl Fish Sci. 35: 165-171.

Charvet-Almeida P, Araújo MLG, Rosa RS and Rincón G. 2002. Neotropical freshwater stingrays: diversity and conservation status. Shark News. 14: 1-2.

Chatchavalvanich K, Thongpan A and Nakai M. 2005a. Structure of the testis and genital duct of freshwater stingray, *Himantura signifer* (Elasmobranchii: Myliobatiformes: Dasyatidae). Ichthyol Res. 52(2): 123-131.

Chatchavalvanich K, Thongpan A and Nakai M. 2005b. Ultrastructure of spermiogenesis in a freshwater stingray, *Himantura signifer*. Ichthyol Res. 52(4): 379-385.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Chereguini O, De La Banda IG, Rasines I and Fernandez A. 2001. Larval growth of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) produced with fresh and cryopreserved sperm. Aquac Res. 32(2): 133-143.

Chew PC and Zulkafli AR. 2012. Sperm cryopreservation of some freshwater fish species in Malaysia. In: Current Frontiers in Cryopreservation. 1st ed. II Katkov (ed.). Croatia: INTECH Open Access Publisher. 269-292.

Ciereszko A, Glogowski J and Dabrowski K. 2011. Biochemical characteristics of seminal plasma and spermatozoa of freshwater fishes. In: Cryopreservation in aquatic species. 2nd ed. TR Tiersch and CC Green (ed.). Louisiana: World Aquaculture. 46-79.

CITES. 2013. Consideration of proposals for amendment of appendices I and II. The 16th meeting of the conference of the parties Bangkok (Thailand). P 22 pp.

Conrath CL and Musick JA. 2012. Reproductive biology of elasmobranchs. In: Biology of sharks and their relatives. 2nd ed. JC Carrier, JA Musick, and MR Heithaus (ed.). Florida: CRC Press. 291-311.

Curry MR. 2007. Cryopreservation of mammalian semen. In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. 2nd ed. JG Day and GN Stacey (ed.). New Jersey: Humana Press. 303-311.

De Carvalho MR and Lovejoy NR. 2011. Morphology and phylogenetic relationships of a remarkable new genus and two new species of Neotropical freshwater stingrays from the Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Zootaxa. 2776: 13-48.

DeGraaf J and Berlinsky DL. 2004. Cryogenic and refrigerated storage of Atlantic cod (Gadus morhua) and haddock (*Melanogrammus aeglefinus*) spermatozoa. Aquaculture. 234(1): 527-540.

DeGraaf JD, King WV, Benton C and Berlinsky DL. 2004. Production and storage of sperm from the black sea bass *Centropristis striata* L. Aquac Res. 35(15): 1457-1465.

Del Mar Pedreros-Sierra T and Ramírez-Pinilla MP. 2015. Morphology of the reproductive tract and acquisition of sexual maturity in males of *Potamotrygon magdalenae* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). J Morphol. 276(3): 273-289.

Drioli M and Chiaramonte G. 2005. Potamotrygon motoro. The IUCN red list of threatened species. Version 2014.3. < www. iucnredlist. org >. Downloaded on 30 April 2015

Fauvel C, Suquet M and Cosson J. 2010. Evaluation of fish sperm quality. J Appl Ichthyol. 26(5): 636-643.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Flegler SL, Heckman JW and Klomparens KL. 1993. Specimen preparation for TEM. In: Scanning and transmission electron microscopy: an introduction. 1st ed. SL Flegler, JW Heckman, and KL Klomparens (ed.). New York: Oxford University Press. 97-150.

Fleming AD, Yanagimachi R and Yanagimachi H. 1981. Spermatozoa of the Atlantic bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. J Reprod Fertil. 63(2): 509-514.

Fontenelle JP, Da Silva JPC and De Carvalho MR. 2014. *Potamotrygon limai*, sp. nov., a new species of freshwater stingray from the upper Madeira River system, Amazon basin (Chondrichthyes: Potamotrygonidae). Zootaxa. 3765(3): 249-268.

Gadea J. 2003. Review: semen extenders used in the artificial inseminarion of swine. Span J Agric Res. 1(2): 17-27.

Glogowski J, Kwasnik M, Piros B, Dabrowski K, Goryczko K, Dobosz S, Kuzminski H and Ciereszko A. 2000. Characterization of rainbow trout milt collected with a catheter: semen parameters and cryopreservation success. Aquac Res. 31(3): 289-296.

Hackett AJ and Macpherson JW. 1965. Some staining procedures for spermatozoa. Can Vet J. 6(3): 55-62.

Haddad V, Neto DG, de Paula Neto JB, de Luna Marques FP and Barbaro KC. 2004. Freshwater stingrays: study of epidemiologic, clinic and therapeutic aspects based on 84 envenomings in humans and some enzymatic activities of the venom. Toxicon. 43(3): 287-294.

Hamlett WC. 1999. Male reproductive system. In: Sharks, skates, and rays: the biology of elasmobranch fishes. 1st ed. WC Hamlett (ed.). Maryland: John Hopkins University Press. 444-470.

Henderson AC, Reeve AJ and Ambu-Ali A. 2014. Microanatomy of the male and female reproductive tracts in the long-tailed butterfly ray *Gymnura poecilura*, an elasmobranch with unusual characteristics. J Fish Biol. 84(2): 297-313.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Henningsen AD, Smale MJ, Garner R and Kinnunen N. 2004. Reproduction, embryonic development, and reproductive physiology of elasmobranchs. In: The Elasmobranch Husbandry Manual: Captive Care of Sharks, Rays and Their Relatives. 1st ed. M Smith, D Warmolts, D Thoney, and R Hueter (ed.). Ohio: Ohio Biological Survey. 227-236.

Holt WV and Lloyd RE. 2010. Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: how does it work so well? Theriogenology. 73(6): 713-722.

Horváth Á, Miskolczi E and Urbányi B. 2003. Cryopreservation of common carp sperm. Aquat Living Resour. 16(05): 457-460.

Horváth Á and Urbányi B. 2000. The effect of cryoprotectants on the motility and fertilizing capacity of cryopreserved African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell 1822) sperm. Aquac Res. 31(3): 317-324.

Huang C, Dong Q and Tiersch TR. 2004a. Sperm cryopreservation of a live-bearing fish, the platyfish *Xiphophorus couchianus*. Theriogenology. 62(6): 971-989.

Huang C, Dong Q, Walter RB and Tiersch TR. 2004b. Sperm cryopreservation of green swordtail *Xiphophorus helleri*, a fish with internal fertilization. Cryobiology. 48(3): 295-308.

Huang C, Sun C, Su X, Zhao X, Miao M, Liu Y and Dong Q. 2009. Sperm cryopreservation in guppies and black mollies—a generalized freezing protocol for livebearers in Poeciliidae. Cryobiology. 59(3): 351-356.

Ji XS, Chen SL, Tian YS, Yu GC, Sha ZX, Xu MY and Zhang SC. 2004. Cryopreservation of sea perch (*Lateolabrax japonicus*) spermatozoa and feasibility for production-scale fertilization. Aquaculture. 241(1): 517-528.

Kang KH, Shao MY, Kho KH and Zhang ZF. 2004. Short-term storage and cryopreservation of *Urechis unicinctus* (Echiura: Urechidae) sperm. Aquac Res. 35(13): 1195-1201.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

King G and Macpherson J. 1973. A comparison of two methods for boar semen collection. J Anim Sci. 36(3): 563-565.

Kopeika E, Kopeika J and Zhang T. 2007. Cryopreservation of fish sperm. In: Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols. 2nd ed. JG Day and GN Stacey (ed.). New Jersey: Humana Press. 203-217.

Kruger JDW, Smit GL, Vuren JHJ and Ferreira JT. 1984. Some chemical and physical characteristics of the semen of *Cyprinus carpio* L. and Oreochromis mossambicus (Peters). J Fish Biol. 24(3): 263-272.

Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF and Oehninger S. 1988. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. Fertil Steril. 49(1): 112-117.

Kutzler MA. 2005. Semen collection in the dog. Theriogenology. 64(3): 747-754.

Kwantong S and Bart AN. 2003. Effect of cryoprotectants, extenders and freezing rates on the fertilization rate of frozen striped catfish, *Pangasius hypophthalmus* (Sauvage), sperm. Aquac Res. 34(10): 887-893.

Lahnsteiner F, Berger B, Horvath A, Urbányi B and Weismann T. 2000. Cryopreservation of spermatozoa in cyprinid fishes. Theriogenology. 54(9): 1477-1498.

Lahnsteiner F, Berger B and Weismann T. 1999. Sperm metabolism of the telost fishes *Chalcalburnus chalcoides* and *Oncorhynchus mykiss* and its relation to motility and viability. J Exp Zool. 284(4): 454-465.

Linhart O, Rodina M and Cosson J. 2000. Cryopreservation of sperm in common carp *Cyprinus carpio*: sperm motility and hatching success of embryos. Cryobiology. 41(3): 241-250.

Linhart O, Rodina M, Flajshans M, Gela D and Kocour M. 2005. Cryopreservation of European catfish *Silurus glanis* sperm: sperm motility, viability, and hatching success of embryos. Cryobiology. 51(3): 250-261.

Luer CA, Walsh CJ, Bodine AB and Wyffels JT. 2009. Normal embryonic development in the clearnose skate, *Raja eglanteria*, with experimental observations on artificial insemination. In: Biology of Skates. 1st ed. DA Ebert and JA Sulikowski (ed.). Netherlands: Springer Science. 133-149.

Meseguer M, Garrido N, Martínez-Conejero JA, Simón C, Pellicer A and Remohí J. 2004. Relationship between standard semen parameters, calcium, cholesterol contents, and mitochondrial activity in ejaculated spermatozoa from fertile and infertile males. Journal of assisted reproduction and genetics. 21(12): 445-451.

Miura T and Miura CI. 2003. Molecular control mechanisms of fish spermatogenesis. Fish Physiol Biochem. 28(1-4): 181-186.

Nagy S, Jansen J, Topper EK and Gadella BM. 2003. A triple-stain flow cytometric method to assess plasma-and acrosome-membrane integrity of cryopreserved bovine sperm immediately after thawing in presence of egg-yolk particles. Biol Reprod. 68(5): 1828-1835.

Neto DG and Uieda VS. 2012. Activity and habitat use of two species of stingrays (Myliobatiformes: Potamotrygonidae) in the upper Paraná River basin, Southeastern Brazil. Neotrop Ichthyol. 10(1): 81-88.

Oldfield RG. 2005a. Biology, husbandry, and reproduction of freshwater stingrays I. Trop Fish Hob. 53(12): 114-116.

Oldfield RG. 2005b. Biology, husbandry, and reproduction of freshwater stingrays II. Trop Fish Hob. 54(1): 110-112.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Pan J, Ding S, Ge J, Yan W, Hao C, Chen J and Huang Y. 2008. Development of cryopreservation for maintaining yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* sperm. Aquaculture. 279(1): 173-176.

Pratt Jr HL. 1988. Elasmobranch gonad structure: a description and survey. Copeia. 3: 719-729.

Rakitin A, Ferguson MM and Trippel EA. 1999. Spermatocrit and spermatozoa density in Atlantic cod (*Gadus morhua*): correlation and variation during the spawning season. Aquaculture. 170(3): 349-358.

Rall WF, Mazur P and Souzu H. 1978. Physical-chemical basis of the protection of slowly frozen human erythrocytes by glycerol. Biophys J. 23(1): 101-120.

Riley KL, Holladay CG, Chesney EJ and Tiersch TR. 2004. Cryopreservation of sperm of red snapper (*Lutjanus campechanus*). Aquaculture. 238(1): 183-194.

Ross RA and Schäfer F. 2000. Aqualog Süsswasser Rochen: Freshwater Rays. Verlag ACS, Mörfelden-Walldorf. 192 pp.

Rurangwa E, Kime DE, Ollevier F and Nash JP. 2004. The measurement of sperm motility and factors affecting sperm quality in cultured fish. Aquaculture. 234(1): 1-28.

Rurangwa E, Volckaert FAM, Huyskens G, Kime DE and Ollevier F. 2001. Quality control of refrigerated and cryopreserved semen using computer-assisted sperm analysis (CASA), viable staining and standardized fertilization in African catfish (*Clarias gariepinus*). Theriogenology. 55(3): 751-769.

Schwartz FJ. 2009. A survey of tail spine characteristics of stingrays frequenting Western Atlantic Ocean and South American freshwater rivers. J N C Acad Sci. 125(2): 47-60.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

Shibuya A, Araújo MLG and Zuanon JAS. 2009. Analysis of stomach contents of freshwater stingrays (Elasmobranchii, Potamotrygonidae) from the middle Negro River, Amazonas, Brazil. Pan-Am J Aquat Sci. 4(4): 466-475.

Shibuya A, Zuanon J and Tanaka S. 2012. Feeding behavior of the Neotropical freshwater stingray *Potamotrygon motoro* (Elasmobranchii: Potamotrygonidae). Neotrop Ichthyol. 10(1): 189-196.

Sivilaikul S, Jitprom A, Kularb A, Kornkaewrut K, Suthanmaphinuth P, Mahasawangkul S, Saikhun K, Wajjwalku W and Thongtipsiridech S. 2010. Relationship between seminal and serum calcium concentration with semen quality in the Asian elephant (*Elephas maximus*). Thai J Vet Med. 40(3): 251-255.

Stoss J. 1983. Fish gamete preservation and spermatozoan physiology. In: Fish physiology Vol. IX Reproduction, Part B. 1st ed. WS Hoar, DJ Randall, and EM Donaldson (ed.). New York: Academic press. 305-350.

Tiersch TR, Figiel Jr CR, Wayman WR, Williamson JH, Gorman OT and Carmichael GJ. 2004a. Cryopreservation of sperm from the endangered Colorado pikeminnow. N Am J Aquac. 66(1): 8-14.

Tiersch TR, Wayman WR, Skapura DP, Neidig CL and Grier HJ. 2004b. Transport and cryopreservation of sperm of the common snook, *Centropomus undecimalis* (Bloch). Aquac Res. 35(3): 278-288.

Tuset VM, Dietrich GJ, Wojtczak M, Słowiń ska M, De Monserrat J and Ciereszko A. 2008. Comparison of three staining techniques for the morphometric study of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) spermatozoa. Theriogenology. 69(8): 1033-1038.

Urbányi B, Horvath A, Varga Z, Horváth L, Magyary I and Radics F. 1999. Effect of extenders on sperm cryopreservation of African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell). Aquac Res. 30(2): 145-151.

Verstegen J, Iguer-Ouada M and Onclin K. 2002. Computer assisted semen analyzers in andrology research and veterinary practice. Theriogenology. 57(1): 149-179.

Viveiros ATM and Godinho HP. 2009. Sperm quality and cryopreservation of Brazilian freshwater fish species: a review. Fish Physiol Biochem. 35(1): 137-150.

Vuthiphandchai V, Thadsri I and Nimrat S. 2009. Chilled storage of walking catfish (*Clarias macrocephalus*) semen. Aquaculture. 296(1): 58-64.

Wayman WR and Tiersch TR. 2011. Research methods for cryopreservation of sperm. In: Cryopreservation in Aquatic Species. 2nd ed. Tiersch TR and Green CC (ed.). Louisiana: World Aquaculture. 672-683.

Whittier WD and Bailey TL. 2000. Predicting bull fertility. Vol. 400. In: Publication (Virginia Cooperative Extension). Virginia Polytechnic Institute and State University. 4 pp.

Yao Z, Richardson GF and Crim LW. 1999. A diluent for prolonged motility of ocean pout (Macrozoarces americanus L.) sperm. Aquaculture. 174(1): 183-193.

Zaiden SF, Brinn RP, Marcon JL and Urbinati EC. 2011. Testicular structure and spermatogenesis of Amazonian freshwater cururu stingray *Potamotrygon* cf. *histrix*. Zygote. 19(3): 245-253.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวนิธิวดี เกษจำรัส เกิดวันที่ 11 เดือนมิถุนายน พ.ศ.2529 จังหวัดกรุงเทพมหานคร จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนศึกษานารี เมื่อปี พ.ศ.2546 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2552 เมื่อจบการศึกษาได้เข้าทำงานในตำแหน่งสัตวแพทย์ฝ่ายวิจัย ประจำศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเวลา 1 ปี และเนื่องจากมีความสนใจในด้านสัตว์น้ำจึงเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2554

มีผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่ ได้แก่

นิธิวดี เกษจำรัส และ วีณา เคยพุดซา. 2556. ผลของการใช้ Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) ต่อปริมาณทองแดงในน้ำทะเล. วารสารการประมง 66(1): 46-51.

Daochai C, Keschumras N and Chansue N. 2015. Effect of exogenous prostaglandin on reproductive organs in captive female ocellate river stingray (Potamotrygon motoro) by ultrasonography. The 14th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC 2015); April 20-22, 2015. Royal Paragon Hall, Siam Paragon, Bangkok: 179-180.

Keschumras N, Daochai C and Chansue N. 2015. Evaluation of fresh and chilled semen form ocellate river stingray (Potamotrygon motoro). The 14th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC 2015); April 20-22, 2015. Royal Paragon Hall, Siam Paragon, Bangkok: 255-256.

Prapasarakul N, Pulsrikarn C, Vasaruchapong V, Lekcharoen P, Chanchaithong P, Lugsomya K, Keschumras N, Thanomsuksinchai N, Tanchiangsai K and Tummaruk P. 2012. Salmonella serovar distribution in cobras (Naja kaouthia), snake-food species, and farm workers at Queen Saovabha Snake Park, Thailand. J Vet Diagn Invest 24(2): 288–294.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
Chulalongkorn University