

คุณลักษณะและการเลือกสีย้อมเพื่อประเมินคุณภาพพอสุจิโลมาอิรวดี (*Orcaella brevirostris*) ใน
สถานที่เพาะเลี้ยง



นายนภกานต์ สิงห์คำ

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

สาขาวิชาอายุรศาสตร์สัตว์แพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Sperm characteristic and staining selection for quality evaluation in Irrawaddy dolphin
(*Orcaella brevirostris*) in captivity

Mr. Nopphakarn Singkhum



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 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	คุณลักษณะและการเลือกสีย้อมเพื่อประเมินคุณภาพอสุจิ
	โลมาอิรวดี (<i>Orcaella brevirostris</i>) ในสถานที่เพาะเลี้ยง
โดย	นายนภกานต์ สิงห์คำ
สาขาวิชา	อายุรศาสตร์สัตวแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. นันทริกา ชันช้อย

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. รุ่งโรจน์ ธนวงษ์นุเวช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สมศักดิ์ ภัคภิัญญ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. นันทริกา ชันช้อย)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. เกวลี ฉัตรตรงค์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ดร. อมรัตน์ เสริมวัฒนากุล)

นภกานต์ สิงห์คำ : คุณลักษณะและการเลือกสีย้อมเพื่อประเมินคุณภาพอสุจิโลมาอิรวดี (*Orcaella brevirostris*) ในสถานที่เพาะเลี้ยง (Sperm characteristic and staining selection for quality evaluation in Irrawaddy dolphin (*Orcaella brevirostris*) in captivity) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. สพ.ญ. ดร. นันทริกา ชันช้อย, 74 หน้า.

โลมาอิรวดี (*Orcaella brevirostris*) เป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมในทะเลชนิดหนึ่งที่อาศัยอยู่ในประเทศไทย โลมาอิรวดีถูก IUCN จัดให้เป็นสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ เนื่องจากการลดลงอย่างต่อเนื่องของประชากรโลมาอิรวดีในธรรมชาติ การศึกษาที่เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ของโลมามีรายงานไว้ในโลมาหลายๆสายพันธุ์ โดยการศึกษาในโลมาอิรวดีมีรายงานไม่มากนัก วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อศึกษาคุณลักษณะและรูปร่างของอสุจิในโลมาอิรวดีและหาคุณสมบัติของสีย้อมที่เหมาะสมสำหรับการตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ โดยทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อโลมาอิรวดีเพศผู้จำนวน 3 ตัวด้วยเทคนิคการกระตุ้นให้หลั่งน้ำเชื้อด้วยตัวเอง นำตัวอย่างน้ำเชื้อมาย้อมด้วยสีย้อมหลายชนิด ได้แก่ ปาปานิโคลัว, ซอร์, ดิฟฟ์ควิก, อีโอซิน, 0.1%โทลูอิดีนบลู, วิลเลียม, ฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน และอีโอซินนิโกรซิน โดยทำการประเมินตัวอย่างทั้งหมดภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าน้ำเชื้อโลมาอิรวดีมีลักษณะขุนขาวเหมือนนํ้านม มีปริมาตรน้ำเชื้อเฉลี่ย 3.42 ± 0.49 มิลลิลิตร ความเข้มข้นของตัวอสุจิ $1.44 \pm 0.586 \times 10^9$ ตัว/มิลลิลิตร บริเวณส่วนหน้าของหัวอสุจิมีรูปร่างบางแบนและเว้าเล็กน้อย ส่วนด้านหลังมีรูปร่างรียาว มีสันนูนขนานตามแนวยาวของบริเวณด้านท้ายหัวอสุจิ ส่วนคอของอสุจิยาวและหนา ขนาดหัวอสุจิมีความยาว 4.37 ± 0.18 ไมครอน กว้าง 1.61 ± 0.14 ไมครอน ความผิดปกติของดีเอ็นเอในอสุจิสามารถตรวจได้โดยการย้อมด้วยสีโทลูอิดีนบลู ส่วนการประเมินสัณฐานวิทยาของตัวอสุจิสามารถใช้สีดิฟฟ์ควิก, วิลเลียม, ฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน, ปาปานิโคลัว และสีซอร์

ภาควิชา อายุรศาสตร์ ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตว์แพทย์ ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2559

5575340631 : MAJOR VETERINARY MEDICINE

KEYWORDS: IRRAWADDY DOLPHIN / SPERMATOZOA / SEMEN COLLECTION / STAINING

NOPPHAKARN SINGKHUM: Sperm characteristic and staining selection for quality evaluation in Irrawaddy dolphin (*Orcaella brevirostris*) in captivity.

ADVISOR: ASSOC. PROF. DR. NANTARIKA CHANSUE, Ph.D., 74 pp.

Irrawaddy dolphin (*Orcaella brevirostris*) is one of the marine mammals species in Thailand. Since the continuing decline of Irrawaddy population, they have been classified by the IUCN as critically endangered species. There are many reproductive studies of several dolphin species. However, only limited studies on Irrawaddy species have been investigated. The objectives of this study were to determine the characteristics and morphology of Irrawaddy dolphin's sperm and to find the staining properties for semen quality evaluation. Three male Irrawaddy dolphins were used for semen collection by self-ejaculated technique. The semen samples were stained with Papanicolaou, Shorr's stain, Diff Quick, Eosin, 0.1% Toluidine blue, William's stain, Hematoxylin & Eosin and Eosin-nigrosin stain. All specimens were evaluated under light microscope and electron microscope. The result showed that the color of Irrawaddy dolphin's semen was milky white. The average semen volume was 3.42 ± 0.49 ml., The average sperm density was $1.44 \pm 0.586 \times 10^9$ sperm/ml. The dorsal view of sperm heads was elongated and ellipsoidal. The anterior region of sperm head was thin, flat and slightly concave. The ridges running parallel were long axis of the posterior region of these sperm heads. The neck was thick and long. The sperm length and width were 4.37 ± 0.18 μm and 1.61 ± 0.14 μm , respectively. The results indicated that sperm with DNA damage could be evaluated by Toudine blue staining. In addition, Diff Quick, William's staining, Hematoxylin & Eosin, Papanicolaou and Shorr's staining were applicable for assessing sperm morphology.

Department: Veterinary Medicine

Student's Signature

Field of Study: Veterinary Medicine

Advisor's Signature

Academic Year: 2016

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความอนุเคราะห์และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ รศ.สพ.ญ.ดร. นันทริกา ชันช้อย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งให้คำแนะนำ และข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนให้ความช่วยเหลือทางด้านดำเนินงานวิจัย

ขอขอบพระคุณ บริษัท วรพันธ์รัชต์ จำกัด ที่อนุเคราะห์สถานที่เลี้ยงโลมาอิรวดี และอำนวยความสะดวกในการทำวิจัยในครั้งนี้ ขอขอบพระคุณ นางสาวจันทร์เพ็ญ สุวิมลธีระบุตร เจ้าหน้าที่บริการวิทยาศาสตร์(ชำนาญการ) ที่ให้ความช่วยเหลือให้คำปรึกษาทางด้านเทคนิคการใช้สีย้อมตัวอสุจิ และการวิเคราะห์ตัวอย่าง ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ทุกท่านในศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือระหว่างทำวิจัย ขอขอบพระคุณภาควิชาสัตวศาสตร์ เชนูเวชวิทยา และวิทยาลัยสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความช่วยเหลือและความสะดวกในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ โอลิมปัส บีเอ็กซ์51 (Olympus bx51) ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่จากศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในด้านความช่วยเหลือและความสะดวกในการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ช่วยกรุณาชี้แนะ และให้คำปรึกษาเพื่อให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

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

ขอขอบคุณพระคุณบิดามารดาที่คอยเป็นแรงผลักดัน ช่วยเหลือ ให้กำลังใจ และสนับสนุนตลอดมา รวมทั้งญาติพี่น้อง และเพื่อนทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัย จนทำให้งานวิจัยของข้าพเจ้าสำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	4
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	4
1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดงานวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	5
2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโลมาอิรวดี	5
2.2 ระบบสืบพันธุ์ของโลมาและวาฬเพศผู้ (Male cetacean reproductive system).....	6
การสร้างตัวอสุจิ (spermatogenesis).....	7
ส่วนประกอบของตัวอสุจิ	9
2.3 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ (Semen collection).....	10
2.4 ความถี่ในการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อในโลมา.....	11
2.5 การศึกษาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในโลมาสายพันธุ์ต่างๆ	11
โลมาปากขวด (<i>Tursiops aduncus</i>)	11
โลมาไวท์ไซด์ (<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>).....	13

วาฬเพชฌฆาต (<i>Orcinus orca</i>).....	13
วาฬเบลูก้า (<i>Delphinapterus leucas</i>).....	13
การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ	15
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	21
3.1 สัตว์ทดลอง	21
3.2 การเตรียมโลมาสำหรับการทดลอง.....	22
3.3 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อโลมา.....	24
3.4 การทดลองที่ 1 ศึกษาจุลกายวิภาคของอสุจิโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy).....	26
3.4.1 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด	26
3.4.2 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน	26
3.5 การทดลองที่ 2 การย้อมสีเพื่อศึกษาลักษณะของสเปิร์ม	27
3.5.1 วิธีการย้อมด้วยสีปาปานีโคลัว (Papanicolaou) (World Health Organization, 2010).....	27
3.5.2 การย้อมด้วยวิธีชอร์ (Shorr's staining) (World Health Organization, 2010)	29
3.5.3 การย้อมสีด้วยวิธีดิฟฟ์ควิก (Diff Quick) (World Health Organization, 2010)	29
3.5.4 วิธีการย้อมสีอีโอซิน (eosin) (World Health Organization, 2010)	30
3.5.5 วิธีการย้อมสีโทลูอิดีนบลู (0.1% toluidine blue) (Aksoy et al., 2012)	30
3.5.6 การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีวิลเลียม (William's staining).....	30
3.5.7 การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีอีโอซิน นิโกรซิน (Eosin-nigrosin staining).....	30
3.5.8 การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีฮีมาทอกซิลิน อีโอซิน (haematoxylin & eosin staining) ...	31
3.6 การวิเคราะห์ผล	31
บทที่ 4 ผลการวิจัย	32

4.1	ศึกษาจุลกายวิภาคศึกษาของอสุจิโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy).....	32
4.2	ย้อมอสุจิด้วยสีปาปานิโคลัว วิธีซอร์ ดิฟฟ์ควิก อีโอซิน โทลูอิดีนบลู วิลเลียม และอีโอซินนิโกรซิน.....	40
4.2.1	สีปาปานิโคลัว.....	40
4.2.2	การย้อมด้วยวิธีซอร์	41
4.2.3	การย้อมสีด้วยวิธีดิฟฟ์ควิก	42
4.2.4	วิธีการย้อมสีอีโอซิน	43
4.1.5	วิธีการย้อมสีโทลูอิดีนบลู.....	44
4.1.6	การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีวิลเลียม	45
4.1.7	การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีอีโอซินนิโกรซิน	46
4.1.8	การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีฮีมาทอกซิลินอีโอซิน	47
บทที่ 5	อภิปรายผลการวิจัย ข้อเสนอแนะและข้อเสนอแนะ	57
5.1	อภิปรายผลการวิจัย	57
5.1.1	การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโลมาอิรวดี.....	57
5.1.2	การย้อมสีเพื่อศึกษาคุณลักษณะของสีย้อมดิฟฟ์ควิก ปาปานิโคลัว ซอร์ วิลเลียมฮีมาทอกซิลิน อีโอซิน อีโอซิน และอีโอซินนิโกรซิน.....	59
5.2	ข้อเสนอแนะและข้อเสนอแนะ	60
	รายการอ้างอิง	64
	ภาคผนวก.....	69
	ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	74

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาของโลมาอิรวดีที่ใช้ในการศึกษา	22
ตารางที่ 2	แสดงคุณภาพของน้ำเชื้อโลมาอิรวดี	32
ตารางที่ 3	แสดงค่าเฉลี่ยของขนาดตัวอสุจิในน้ำเชื้อโลมาอิรวดี	33
ตารางที่ 4	เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติตัวอสุจิที่ตรวจได้เมื่อย้อมด้วยสีปานิโคลัว	41
ตารางที่ 5	เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติตัวอสุจิที่ตรวจได้เมื่อย้อมด้วยวิธีของซอร์	42
ตารางที่ 6	เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติตัวอสุจิที่ตรวจได้เมื่อย้อมด้วยดิฟฟ์ควิก.....	43
ตารางที่ 7	การนับจำนวนตัวเป็นตัวตายของอสุจิด้วยสีย้อมอีโอซิน	44
ตารางที่ 8	ความผิดปกติของโครมาติน (Nuclear chromatin(%)).....	45
ตารางที่ 9	เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติตัวอสุจิที่ตรวจได้เมื่อย้อมด้วยสีวิลเลียม	46
ตารางที่ 10	นับจำนวนตัวเป็นตัวตายของอสุจิด้วยสีย้อมอีโอซินนิโกรซิน.....	47
ตารางที่ 11	เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติตัวอสุจิที่ตรวจได้เมื่อย้อมด้วยฮีมาทอกซิลินอีโอซิน	48
ตารางที่ 12	เปรียบเทียบการตรวจเปอร์เซ็นต์ตัวเป็นตัวตายของตัวอสุจิระหว่างสีอีโอซินและสีอีโอซินนิโกรซิน	49
ตารางที่ 13	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิระหว่างสีปานิโคลัว ซอร์ดิฟฟ์ควิก วิลเลียม และฮีมาทอกซิลินอีโอซิน ของโลมาอิรวดี 1	50
ตารางที่ 14	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิระหว่างสีปานิโคลัว ซอร์ดิฟฟ์ควิก วิลเลียม และฮีมาทอกซิลินอีโอซิน ของโลมาอิรวดี 2.....	51
ตารางที่ 15	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิระหว่างสีปานิโคลัว ซอร์ดิฟฟ์ควิก วิลเลียม และฮีมาทอกซิลินอีโอซิน ของโลมาอิรวดี 3.....	52
ตารางที่ 16	เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิระหว่างสีปานิโคลัว ซอร์ดิฟฟ์ควิก วิลเลียม และฮีมาทอกซิลินอีโอซิน ของโลมาอิรวดีทั้ง 3 ตัวเฉลี่ยกัน.....	54
ตารางที่ 17	สรุปรวมค่าเฉลี่ยของขนาดตัวอสุจิที่ได้จากการย้อมสีแล้วทำการวัดขนาด ในโลมาอิรวดีทั้ง 3 ตัว	55

ตารางที่ 18 ความแตกต่างของขนาดตัวสุจิที่วัดได้จากการย้อมสีเปรียบเทียบกับขนาดตัวสุจิที่วัดได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด	56
---	----



สารบัญภาพ

ภาพที่ 1 ตำแหน่งอวัยวะสืบพันธุ์โลมา.....	6
ภาพที่ 2 แสดง haemocytometer และช่องที่ใช้นับจำนวนอสุจิ.....	17
ภาพที่ 3 โลมาอิรวดีเพศผู้ที่ใช้ในการทดลอง.....	21
ภาพที่ 4 การฝึกโลมาเพื่อทำการตรวจสอบสุขภาพ.....	23
ภาพที่ 5 วิธีการฝึกเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ.....	25
ภาพที่ 6 น้ำเชื้อโลมาอิรวดีที่รีดได้ในแต่ละครั้ง.....	25
ภาพที่ 7 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (field emission scanning electron microscope (FESEM)(JSM-7610F;JEOL, Tokyo, Japan)).....	26
ภาพที่ 8 แสดงตัวอย่างการวัดขนาดตัวอสุจิที่ได้จากการย้อมสี.....	27
ภาพที่ 9 โครงสร้างลักษณะภายนอกของตัวอสุจิตั้งแต่หัวถึงหาง ของโลมาสายพันธุ์อิรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดด้วยกำลังขยาย 2,300 เท่า.....	34
ภาพที่ 10 โครงสร้างลักษณะภายนอกของตัวอสุจิ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดด้วยกำลังขยาย 12,000 เท่า.....	34
ภาพที่ 11 โครงสร้างลักษณะภายนอกของตัวอสุจิ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดด้วยกำลังขยาย 20,000 เท่า.....	35
ภาพที่ 12 โครงสร้างลักษณะภายนอกของตัวอสุจิในส่วนของหัวจากมุมมองด้านข้าง เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดด้วยกำลังขยาย 10,000 เท่า.....	35
ภาพที่ 13 โครงสร้างลักษณะภายนอกของตัวอสุจิ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดด้วยกำลังขยาย 30,000 เท่า.....	36
ภาพที่ 14 โครงสร้างภายในตัวอสุจิของโลมาสายพันธุ์อิรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน.....	37
ภาพที่ 15 โครงสร้างภายในตัวอสุจิของโลมาสายพันธุ์อิรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน.....	37

ภาพที่ 16 โครงสร้างภายในตัวสุจิของโลมาสายพันธุ์อิวรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน.....	38
ภาพที่ 17 โครงสร้างภายในตัวสุจิของโลมาสายพันธุ์อิวรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน แสดงลักษณะภาพตัดขวางของหาง (principal piece) ของตัวสุจิ.....	38
ภาพที่ 18 โครงสร้างภายในตัวสุจิของโลมาสายพันธุ์อิวรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน.....	39
ภาพที่ 19 โครงสร้างภายในตัวสุจิของโลมาสายพันธุ์อิวรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน แสดงภาพตัดขวางของตัวสุจิ ในส่วนของลำตัวกับส่วนของหาง	39
ภาพที่ 20 โครงสร้างภายในตัวสุจิของโลมาสายพันธุ์อิวรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน แสดงภาพตัดขวางของลำตัวสุจิ.....	40
ภาพที่ 21 แสดงลักษณะการติดสีของตัวสุจิเมื่อย้อมด้วยสีปาปานิโคลัว ศึกษาด้วยกล้อง จุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	41
ภาพที่ 22 แสดงลักษณะการติดสีของตัวสุจิเมื่อย้อมด้วยวิธีของซอร์ ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	42
ภาพที่ 23 แสดงลักษณะการติดสีของตัวสุจิเมื่อย้อมด้วยสีตีฟฟ์ควิก ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	43
ภาพที่ 24 แสดงลักษณะการติดสีของตัวสุจิเมื่อย้อมด้วยสีอีโอซิน ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ กำลังขยาย 1,000 เท่า	44
ภาพที่ 25 แสดงลักษณะการติดสีของตัวสุจิเมื่อย้อมด้วยสีโทลูอิดีนบลู ศึกษาด้วยกล้อง จุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	45
ภาพที่ 26 แสดงลักษณะการติดสีของตัวสุจิเมื่อย้อมด้วยสีวิลเลียม ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่ กำลังขยาย 1,000 เท่า	46
ภาพที่ 27 แสดงลักษณะการติดสีของตัวสุจิเมื่อย้อมด้วยสีอีโอซินนิโกรซิน ศึกษาด้วยกล้อง จุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	47
ภาพที่ 28 แสดงลักษณะการติดสีของตัวสุจิเมื่อย้อมด้วยสีมาทอซิลินอีโอซิน ศึกษาด้วยกล้อง จุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า.....	48

ภาพที่ 29 แสดงเปอร์เซ็นต์จำนวนอสุจิมี่ชีวิตเปรียบเทียบระหว่างวิธีย้อมด้วยสีอีโอซินและอีโอซินนิโกรซิน	49
ภาพที่ 30 แสดงความผิดปกติของอสุจิ จากโลมาอิรวดี 1	50
ภาพที่ 31 แสดงความผิดปกติของอสุจิ จากโลมาอิรวดี 2	51
ภาพที่ 32 แสดงความผิดปกติของอสุจิ จากโลมาอิรวดี 3	53
ภาพที่ 33 แสดงความผิดปกติของอสุจิ จากโลมาอิรวดีทั้ง 3 ตัวรวมกัน	54



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

โลมาอิรวดี (*Orcaella brevirostris*) จัดเป็นสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่อยู่ในทะเล อยู่ในวงศ์ (family) Delphinidae โลมาอิรวดีตัวเต็มวัยตัวเมียมีความยาวลำตัวประมาณ 210-220 เซนติเมตร และในตัวผู้อาจจะยาวได้ถึง 280 เซนติเมตร มีหัวลักษณะกลมมนคล้ายบาตรพระ มีครีบล้างขนาดเล็ก ลำตัวสีเทา โลมาอิรวดี กินปลา กุ้ง และสัตว์น้ำขนาดเล็กเป็นอาหาร สามารถพบเห็นได้บริเวณชายฝั่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ไปจนถึงทางตอนเหนือของออสเตรเลีย (Perrin and Wursig, 2009) แหล่งอาศัยในประเทศไทย สามารถพบเห็นได้ทั้งในทะเลฝั่งอ่าวไทยและทะเลฝั่งอันดามัน โดยพบในน้ำจืด บริเวณทะเลสาบสงขลา น้ำกร่อยบริเวณปากแม่น้ำ และน้ำเค็มตามชายฝั่งทะเล แหล่งที่พบโลมาอิรวดี เช่น อ่าวตราด จังหวัดตราด ไปจรดชายแดนกัมพูชา ปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ไปจนถึงอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ปากแม่น้ำท่าจีน อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสาคร ปากแม่น้ำบางตะบูน อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ทะเลสาบสงขลา จังหวัดพัทลุง หมู่เกาะสาหร่าย อำเภอเมือง จังหวัดสตูล (กาญจนา และก้องเกียรติ, 2557)

ในปัจจุบันโลมาสายพันธุ์อิรวดีมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่อง ทั้งยังมีรายงานการเสียชีวิตของโลมาในประเทศไทยอย่างต่อเนื่อง ไม่ว่าจะเป็นการติดอวนของชาวประมง การติดตาข่ายที่ใช้ดักปลาบึก หรือการเกยตื้นตามชายหาดที่มีสาเหตุจากโดนใบพัดเรือ โดนทำร้าย หรือกินขยะในทะเล ดังที่มีรายงานการตายของโลมาอิรวดีในทะเลสาบสงขลา ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2549 - มกราคม 2554 จำนวน 43 ตัว รวมถึงการลักลอบจับเพื่อนำมาใช้ในการแสดง ที่มีรายงานการจับบริเวณชายฝั่งประเทศไทยและประเทศกัมพูชา(มีโลมาอิรวดี 10 ตัว ถูกจับในช่วง 1983-1988 ส่งให้กับสถานแสดงโลมาแห่งหนึ่งในจังหวัดจันทบุรี มีโลมาอิรวดีอีกจำนวน 8 ตัวถูกจับในน่านน้ำกัมพูชาถูกนำไปเลี้ยงในสถานที่แสดงโลมาแห่งหนึ่งในกรุงเทพมหานคร และโลมาอิรวดีอีก 2 ตัวถูกส่งต่อให้สถานแสดงโลมาแห่งหนึ่งในประเทศญี่ปุ่น และล่าสุดในปี 2002 มีโลมาอิรวดีอีกอย่างน้อย 8 ตัวถูกจับในเขตน่านน้ำกัมพูชา เพื่อนำไปเลี้ยงในสถานแสดงที่เกาะกง ฝั่งประเทศกัมพูชา) ซึ่งจากรายงานแสดงให้เห็นว่ามีโลมาจำนวนหนึ่งถูกจับเพื่อนำไปใช้ในการแสดง และยังมีอีกจำนวนหนึ่งที่ไม่มีในรายงาน ซึ่งถือได้ว่า

เหตุเหล่านี้เป็นภัยคุกคามต่อจำนวนประชากรโลมาอิรวดีในธรรมชาติ (Curry et al., 2013) ด้วยจำนวนประชากรที่ลดลงอย่างต่อเนื่อง ทำให้บางพื้นที่เกิดปัญหาการผสมเลือดชิดกันมากขึ้น ทำให้ลักษณะด้อยเพิ่มมากขึ้น ลูกโลมามีความอ่อนแอ ในขณะที่ช่วงวงรอบของการตั้งท้องจนถึงผสมพันธุ์ได้อีกครั้ง ใช้ระยะเวลาที่ยาวนานเฉลี่ย 3 - 4 ปี ทำให้จำนวนโลมาเกิดใหม่ไม่สามารถทดแทนกับการสูญเสียโลมาในแต่ละปีไปได้ ทำให้สถานะปัจจุบันของโลมาอิรวดีเป็นสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์อย่างวิกฤต (critical endangered species) ภายใต้อำนาจของสหภาพสากลว่าด้วยการอนุรักษ์ (International Union for Conservation of Nature; IUCN) และในการประชุมอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดของสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้จะสูญพันธุ์ (the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora; CITES) ครั้งที่ 13 ในปี พ.ศ. 2547 ประเทศไทยในฐานะประเทศเจ้าภาพได้เสนอให้ที่ประชุม มีมติให้ปรับเปลี่ยนสถานภาพของโลมาอิรวดี จากเดิมที่เคยอยู่ในบัญชีหมายเลขที่สอง (Appendix II) เป็นบัญชีหมายเลขที่หนึ่ง (Appendix I) ซึ่งหมายความว่า เป็นพืชหรือสัตว์ที่มีสถานภาพใกล้สูญพันธุ์ ห้ามมิให้มีการค้าในเชิงพาณิชย์โดยเด็ดขาด ยกเว้นเพื่อการศึกษาวิจัยและการเพาะพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์เท่านั้น (Perrin and Wursig, 2009)

โลมาอิรวดีมีรายงานการเลี้ยงในที่กักขัง ทั้งในอินโดนีเซีย ไทย กัมพูชา ญี่ปุ่นและในไทยมีรายงานการเลี้ยงใน ซาฟารีเวิลด์ เขตมีนบุรี กรุงเทพมหานคร และ โอเอซีซีเวิลด์ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี (Curry et al., 2013) ส่วนในปัจจุบันที่มีการเลี้ยงโลมาอิรวดีในไทย คือ พัทยาโดลฟินเวิลด์ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี และโอเอซีซีเวิลด์ โดยที่ไม่มีรายงานการเกิดลูกโลมาอิรวดีในสถานที่เลี้ยงอย่างเป็นทางการ และยังไม่มีการศึกษาวิจัยในโลมาอิรวดีที่เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์

สถานที่เลี้ยงโลมาในหลายๆแห่ง สามารถมีลูกโลมาในสถานที่เลี้ยงได้โดยวิธีผสมพันธุ์ตามธรรมชาติ ซึ่งในปัจจุบันก็ได้เริ่มมีการศึกษาพัฒนาความรู้เกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ของโลมา จนสามารถนำองค์ความรู้ที่ได้มาใช้ในการพัฒนาเทคนิคการผสมเทียมในโลมา จนประสบความสำเร็จในการผสมเทียมในโลมาในสถานที่เลี้ยง และหลังจากนั้นก็มีการผสมเทียมโลมาในสถานที่เพาะเลี้ยงมากขึ้น แต่ส่วนใหญ่ที่พบจะเป็นการศึกษาในโลมาปากขวด โลมาแปซิฟิกไวก์ไฮด์ วาฬเพชฌฆาตและวาฬเบลูก้า (Robeck et al., 2003; Robeck et al., 2004; Robeck et al., 2005) แต่ทางด้านการศึกษาวิจัยในโลมาอิรวดี ยังไม่มีการศึกษาวิจัยที่เกี่ยวกับระบบการสืบพันธุ์ ที่จะสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการพัฒนาการเพาะขยายพันธุ์โลมาอิรวดีในสถานที่เลี้ยง ที่ในขณะนี้ยังมีจำนวนใน

ธรรมชาติลดลงเป็นอย่างมาก (นิติกร และอังสุณีย์, 2545) ดังนั้นการศึกษาเกี่ยวกับระบบการสืบพันธุ์ของโลมาอิรวดีจึงมีความจำเป็น เพื่อที่จะนำไปใช้เป็นแหล่งข้อมูลอ้างอิงในการพัฒนาเทคนิค เพื่อการเพาะขยายพันธุ์โลมาอิรวดีต่อไป

การย้อมสีเพื่อคุณภาพตัวอสุจินั้นมีการใช้คุณลักษณะในการติดสี เพื่อดูความผิดปกติต่างๆของตัวอสุจิ เช่น มีการย้อมเพื่อใช้ดูการติดสีในตัวเป็นตัวตาย (live/dead sperm count) ซึ่งสีที่ใช้ย้อมได้แก่ อีโอซิน-นีโกรซิน (Eosin nigrosin) โดยมีหลักการคือ ตัวอสุจิที่ตายจะมีผนังเซลล์เสื่อมสภาพ ยอมให้สีซึมเข้าสู่ผนังเซลล์ได้ ซึ่งตัวอสุจิที่ตายจะติดสี ส่วนตัวอสุจิที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี การตรวจรูปร่างของอสุจิ การตรวจความผิดปกติของตัวอสุจิที่ส่วนหัว มักนิยมย้อมสีโดยวิธีวิลเลียม (William's method) ซึ่งจะช่วยให้พบความผิดปกติของตัวอสุจิได้ชัดเจน การตรวจเซลล์ที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อ นิยมทำการย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลิน อีโอซิน (haematoxylin-eosin) เป็นการย้อมเพื่อตรวจดูเซลล์ที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์อื่นๆ และมีการศึกษาพบว่าในอสุจิของมนุษย์ที่ย้อมด้วยสี ฮีมาทอกซิลิน อีโอซิน โทลูอิดีนบลู (Toluidine Blue) ย้อมด้วยวิธีชอร์ (Shorr method) และ ปาปานิโคลอว์ (Papanicolaou) ที่นำมาใช้วัดขนาดอสุจิปกติจำนวน 200 ตัวและนำมาเปรียบเทียบกันพบว่า ขนาดของอสุจิที่วัดได้จะแตกต่างกันตามสีย้อมที่ใช้ (Aksoy et al., 2012)

การศึกษาคั้งนี้จึงมีแนวคิดที่จะพัฒนาเทคนิคการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อในโลมาอิรวดี เพื่อนำตัวอย่างน้ำเชื้อที่ได้มาใช้ศึกษาลักษณะรูปร่างอสุจิของโลมาอิรวดี ด้วยการย้อมอสุจิด้วยสีชนิดต่างๆ เพื่อหาสีที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาดูลักษณะภายนอก ดูความผิดปกติ และดูคุณภาพของตัวน้ำเชื้อที่เก็บมาได้ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป และการศึกษารูปร่างตัวอสุจิของโลมาอิรวดีทางจุลกายวิภาค ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทั้งแบบชนิดส่องผ่านและส่องกราด ที่จะนำมาใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง เพื่อนำไปพัฒนาทางด้านวิทยาการสืบพันธุ์ของโลมาอิรวดีต่อไปได้ในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาลักษณะรูปร่างของตัวอสุจิโลมาอิรวดีด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
2. ศึกษาชนิดสีย้อมที่เหมาะสมกับการใช้เพื่อตรวจคุณภาพน้ำเชื้อของโลมาสายพันธุ์อิรวดี

1.3 สมมติฐานการวิจัย

1. ลักษณะทางกายภาพของอสุจิของโลมาอิรวดีมีลักษณะที่เหมือนกับโลมาที่อยู่ในวงศ์เดียวกัน
2. สีที่ใช้ในการย้อมดูตัวอสุจิของโลมาอิรวดีมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน

1.4 ขอบเขตและข้อจำกัดงานวิจัย

โครงการนี้ต้องการศึกษาถึงคุณสมบัติการติดสีย้อมของอสุจิโลมาอิรวดี และพัฒนาวิธีการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อในโลมาอิรวดี เพื่อนำมาประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ และศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของอสุจิโลมาอิรวดี นำอสุจิโลมาอิรวดีที่เก็บตัวอย่างได้แยกออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่ทำการศึกษาคงสมบัติการติดสีย้อม และส่วนที่นำมาศึกษาทางจุลกายวิภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและส่องกราด เพื่อดูลักษณะรูปร่างของตัวอสุจิ และความเหมาะสมของสีย้อมที่นำมาใช้ประเมินคุณภาพตัวอสุจิ

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงลักษณะทางกายภาพของอสุจิของโลมาอิรวดี สามารถนำไปเปรียบเทียบกับโลมาสายพันธุ์อื่นๆได้
2. ทราบว่าสีย้อมที่ใช้ในการย้อมดูตัวอสุจิของโลมาอิรวดีมีคุณสมบัติแตกต่างกันอย่างไรควรจะใช้สีย้อมชนิดนั้นๆเพื่อวัตถุประสงค์อะไร
3. ทราบวิธีการเก็บน้ำเชื้อในโลมาอิรวดีเป็นข้อมูลในการใช้ในงานวิจัยอื่นๆได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับโลมาอิรวดี

โลมาสายพันธุ์อิรวดี (*Orcaella brevirostris*) ลักษณะทางกายภาพ ตัวเต็มวัยมีขนาด 2 - 2.75 เมตร ลูกแรกเกิดยาวประมาณ 1 เมตร รูปร่างหัวกลมมนคล้ายบาตรพระ มีครีบหลังขนาดเล็ก อยู่กึ่งกลางลำตัวก่อนไปด้านท้าย ต่างจากโลมาหัวบาตรหลังเรียบที่ไม่มีครีบหลัง ลำตัวสีเทาเข้มส่วนท้องมีสีเทาจาง ฟันบนมี 34 - 40 ซี่ ฟันล่างมี 30 - 36 ซี่ มีพฤติกรรมรวมกลุ่มตั้งแต่ประมาณ 2 - 10 ตัว อาหารตามธรรมชาติ ได้แก่ ปลา กุ้ง และหมึก สามารถพบได้ทั้งในทะเล น้ำกร่อย และน้ำจืด แพร่กระจายในเขตอินโดแปซิฟิก แม่น้ำอิรวดี แม่น้ำโขง และอ่าวเบงกอล (Perrin and Wursig, 2009)

แหล่งที่พบโลมาอิรวดีในประเทศไทย อ่าวตราด จังหวัดตราด ไปจรดชายแดนประเทศ กัมพูชา ปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทรา ไปจนถึงอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ปากแม่น้ำท่าจีน อำเภอมะนัง จังหวัดสมุทรสาคร ปากแม่น้ำบางตะบูน อำเภอบ้านแหลม จังหวัดเพชรบุรี ทะเลสาบสงขลา (ทะเลน้อย จังหวัดพัทลุง) และหมู่เกาะสาหร่าย อำเภอมะนัง จังหวัดสตูล (กาญจนา และ ก้องเกียรติ, 2557)

โลมาอิรวดีเป็นสัตว์ป่าคุ้มครองประเภทเลี้ยงลูกด้วยน้ำนมลำดับที่ 138 ตามพระราชบัญญัติ สงวนและคุ้มครองสัตว์ป่า ซึ่งหมายความว่า ห้ามล่า ห้ามครอบครอง หรือห้ามเพาะพันธุ์เว้นแต่จะ ได้รับอนุญาต และพระราชบัญญัติการประมง พ.ศ.2490 และฉบับแก้ไขเพิ่มเติม ได้กำหนดห้ามทำ การประมงโลมาในน่านน้ำไทยโดยเด็ดขาด เว้นแต่จะได้รับอนุญาต รวมทั้งโลมาอิรวดีได้อยู่ใน สถานภาพของสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์อย่างวิกฤต (critical endangered species) ภายใต้บัญชีของ สหภาพสากลว่าด้วยการอนุรักษ์ (International Union for Conservation of Nature; IUCN) และในการประชุมอนุสัญญาว่าด้วยการค้าระหว่างประเทศซึ่งชนิดของสัตว์ป่าและพืชป่าที่ใกล้จะ สูญพันธุ์ (CITES) ครั้งที่ 13 ในปี พ.ศ. 2547 มีมติให้ปรับเปลี่ยนสถานภาพของโลมาอิรวดี จากเดิมที่ เคยอยู่ในบัญชีที่สอง ปรับสถานภาพเป็นบัญชีที่หนึ่ง ซึ่งหมายถึงว่าเป็นพืชหรือสัตว์ที่มีสถานภาพใกล้

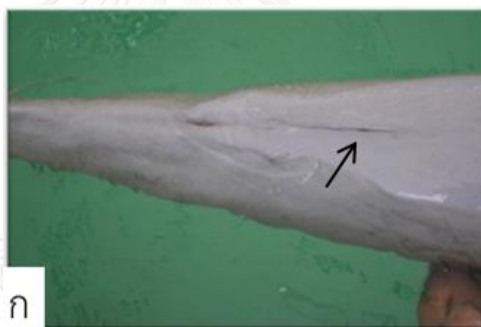
สูญพันธุ์ และเข้าข่ายห้ามมิให้มีการค้าโดยเด็ดขาด ยกเว้นเพื่อการศึกษาวิจัยและการเพาะพันธุ์เพื่อการอนุรักษ์เท่านั้น(Perrin and Wursig, 2009)

2.2 ระบบสืบพันธุ์ของโลมาและวาฬเพศผู้ (Male cetacean reproductive system)

อวัยวะสืบพันธุ์ของโลมาและวาฬเพศผู้

ลึงค์ (penis)

โดยปกติแล้วลึงค์ของวาฬและโลมาจะหดอยู่ภายในลำตัว จะแสดงออกมาเมื่อได้รับการกระตุ้น ลักษณะลึงค์ของโลมาและวาฬ คล้ายกับพวกสัตว์กีบคู่ เช่น โค สุกร ขนาดลึงค์ของโลมาและวาฬ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และความยาวลำตัว โดยปกติแล้วลึงค์ของโลมาและวาฬ จะหดเป็นรูปตัวเอสอยู่ภายในตัว แล้วมีกล้ามเนื้อที่คอยควบคุมให้อวัยวะเพศยื่นออกมาจากช่องเปิดอวัยวะเพศ (ภาพที่ 1) หรือหดกลับเข้าไปในตัววาฬและโลมา (Perrin and Wursig, 2009)



ภาพที่ 1 ตำแหน่งอวัยวะสืบพันธุ์โลมาเพศผู้ (ก) เพศเมีย (ข) วิธีแยกเพศในโลมาลูกครแสดงบริเวณช่องเปิดอวัยวะเพศในโลมาเพศผู้ช่องเปิดจะอยู่ห่างจากทวารหนักมากกว่าโลมาเพศเมีย ส่วนในโลมาอิรวดีช่องเปิดเต้านมจะสามารถพบได้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย

อัณฑะ/อพิติไดมิส (testis/epididymis)

อัณฑะเป็นโครงสร้างหลักที่สำคัญของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ เนื่องจากเป็นโครงสร้างที่ทำหน้าที่ในการผลิตอสุจิและฮอร์โมนเพศผู้ชื่อ เทสโทสเตอโรน (testosterone) อัณฑะมีลักษณะที่รียาว ติดอยู่ในผนังช่องท้องโดยเยื่ออีดิมิชอร์เซียม (mesorchium) วางอยู่ในแนวนอน อยู่ด้านท้ายของไต และมีอพิติไดมิส (epididymis) วางอยู่ทางด้านท้ายของอัณฑะ โครงสร้างภายในของอัณฑะประกอบด้วยท่อผลิตอสุจิที่ขดไปมา (seminiferous tubule) และเนื้อเยื่อข้างเคียง (interstitial tissue) ที่ประกอบไปด้วยเซลล์ชนิดต่างๆ รวมถึงหลอดเลือดและเส้นประสาท ทั้งนี้ภายในท่อผลิตอสุจิที่ขดไปมานี้มีกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างอสุจิรวมถึงเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์พี่เลี้ยงในกระบวนการสร้างอสุจิ (Harrison, 1969; Boyd et al., 1999)

อพิติไดมิส เป็นโครงสร้างที่มีความสำคัญต่อการพัฒนาโครงสร้างและหน้าที่ของอสุจิ ภายในอพิติไดมิสมีท่อที่ขดไปมา ที่หน้าที่ในการขนส่งและกักเก็บอสุจิ รวมถึงมีหน้าที่ในการทำให้อสุจิเจริญสมบูรณ์และพร้อมปฏิสนธิ (sperm maturation) โดยทั่วไปจะแบ่งอพิติไดมิสออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว(head หรือ caput eipididymis) ส่วนกลาง (body หรือ corpus of epididymis) และส่วนหาง (tail หรือ caudal epididymis) แต่ละส่วนของอพิติไดมิสมีหน้าที่ต่างกันขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่อยู่รอบอพิติไดมิส (Boyd et al., 1999)

อพิติไดมิสส่วนหัว ทำหน้าที่ในการดูดซึมกลับของเหลวที่มาจาก การนำส่งอสุจิจาก ท่อผลิตอสุจิผ่านมายังอพิติไดมิส นอกจากนี้อพิติไดมิสส่วนหัวและกลางมีหน้าที่ในการสร้างสารคัดหลั่งจากเซลล์ภายในอพิติไดมิส ที่มีความสำคัญเกี่ยวเนื่องกับการเจริญสมบูรณ์ของอสุจิ อย่างไรก็ตามอสุจิที่อยู่ในท่อของอพิติไดมิสส่วนหัวและกลางนั้น มีความสมบูรณ์ในแง่ของโครงสร้างเท่านั้นแต่ยังไม่สามารถปฏิสนธิได้ ซึ่งความสามารถในการปฏิสนธิของตัวอสุจินั้นจะพบเฉพาะในอสุจิที่อยู่ในอพิติไดมิสส่วนท้ายเท่านั้น ซึ่งอพิติไดมิสส่วนหางหรือส่วนท้ายมีความสำคัญในแง่ของการกักเก็บอสุจิที่พร้อมปฏิสนธิและสามารถนำไปใช้เพื่อการผสมเทียมได้อีกด้วย

การสร้างตัวอสุจิ (spermatogenesis)

กระบวนการสร้างอสุจิ เกิดขึ้นในท่อ seminiferous tubule ที่ขดไปมาในอัณฑะ โดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์สืบพันธุ์ จากสเปิร์มมาโตโกเนีย (spermatogonia) มาเป็นตัวอสุจิ

(spermatozoa) โดยอาศัยการแบ่งตัวแบบเพิ่มจำนวนมากขึ้น ไมโทซิส (mitosis) และการแบ่งตัวแบบไมโอซิส (meiosis) โดยลดจำนวนโครโมโซมเหลือ n เดียว

ในเพศผู้จะสามารถผลิตอสุจิจากอวัยวะได้ตลอดชีวิต โดยเริ่มต้นจากสเปิร์มมาโทโกเนียม (spermatogonium) แบ่งตัวให้เซลล์ใหม่เป็นจำนวนมาก สเปิร์มมาโทโกเนียมแต่ละตัวจะมีการพัฒนาสร้างเป็นอสุจิ (spermatozoa) ได้ 64 ตัว ขั้นตอนในการสร้างอสุจิ เริ่มต้นจากสเปิร์มมาโทโกเนียม ซึ่งมีโครโมโซมเป็น diploid number แบ่งตัวแบบไมโทซิสหลายๆ ครั้งได้สเปิร์มมาโทโกเนียม จำนวนมากซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิด A เพื่อสะสมไว้เป็นเซลล์ตั้งต้น และ ชนิด B ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงและเข้าสู่กระบวนการสร้างอสุจิ สเปิร์มมาโทโกเนียม (spermatogonium) ชนิด B เปลี่ยนแปลงเป็น primary spermatocyte โดยการสร้างดีเอ็นเอ (DNA) เพิ่มเป็น 2 เท่า จากนั้นเข้าสู่กระบวนการแบ่งตัวแบบไมโอซิสให้ secondary spermatocyte 2 ตัว แต่ละตัวจะมีโครโมโซมลดลงครึ่งหนึ่งซึ่งเป็น haploid number เมื่อเข้าสู่การแบ่งตัวแบบ meiosis ครั้งที่ 2 โครมาติด (chromatid) ของแต่ละโครโมโซม (chromosome) จะแยกจากกันให้สเปิร์มมาติด (spermatid) 4 ตัว ซึ่งแต่ละตัวมีโครโมโซม 23 อัน (ธีรวัฒน์, 2555)

การพัฒนาเป็นเชื้ออสุจิ (spermiogenesis)

สเปิร์มมาติด (spermatid) จะพัฒนาเป็นอสุจิโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า spermiogenesis มีการเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียสและไซโทพลาสซึม นิวเคลียส อัดแน่นขึ้นทำให้ นิวเคลียสมีขนาดเล็กลง มีการปล่อยไซโทพลาสซึม จากเซลล์ golgi apparatus โดยเปลี่ยนแปลงเป็นส่วนของอะโครโซม (acrosome) อยู่ที่หัว และเซนทริโอล (centrioles) จะเจริญเป็นส่วนหาง ผลของการพัฒนาทำให้ได้ตัวอสุจิมีรูปร่างยาวขึ้น ส่วนหัว ประกอบด้วยโครมาติน (chromatin) ซึ่งอัดตัวกันแน่น อะโครโซม มีเอนไซม์ทำหน้าที่ช่วยย่อยเซลล์ที่หุ้มไข่และละลายเมือกในช่องคลอด ส่วนกลางลำตัวอสุจิ (mid piece) มีไมโทคอนเดรียมากมายซึ่งเป็นแหล่งสร้างพลังงานเพื่อใช้ในการเคลื่อนไหวของตัวอสุจิ ส่วนหาง (tail) มีโครงสร้างคล้ายซีเลีย (cilia) ประกอบด้วยไมโครทิวบูล (microtubules) 11 คู่ช่วยในการพัดโบกขณะเคลื่อนไหว กระบวนการสร้างอสุจิในระยะเริ่มเจริญพันธุ์ (puberty) ต้องอาศัยเทสโทสเทอโรน และ FSH (Follicle-stimulating hormone) แต่ในสัตว์ที่สมบูรณ์พันธุ์แล้ว (maturity) กระบวนการสร้างเชื้ออสุจิอาศัยเพียงเทสโทสเทอโรนเท่านั้น

ส่วนประกอบของตัวอสุจิ

หัวของอสุจิ

หัวอสุจิถูกแบ่งย่อยออกเป็นส่วนต่างๆ ดังนี้ ส่วนระหว่างอะโครโซมส่วนหน้า (anterior acrosome) หรืออะโครโซมแคป (acrosome cap) ส่วนบริเวณอีควาโทเรียล (equatorial) และบริเวณอะโครโซมส่วนท้าย (postacrosomal region) นอกจากนี้ยังมีวงด้านหน้าที่อยู่ระหว่างอะโครโซมส่วนหน้า (anterior acrosome) กับอะโครโซมส่วนท้ายและ วงรอยสันนูน (serrated band) ที่อยู่ระหว่างอีควาโทเรียล กับบริเวณอะโครโซมส่วนท้าย ถัดมายังมีส่วนวงแหวนด้านท้าย (posterior ring) ของบริเวณอะโครโซมส่วนท้าย ที่ผนังแน่นระหว่างช่องนิวเคลียส (cytoplasmic compartments) ของหัวและหาง (Yanagimachi, 1988) หลังจากเกิดปฏิกิริยาของอะโครโซม (acrosome reaction) บริเวณเหนือบริเวณด้านหลังอะโครโซม สามารถรวมกับเยื่อหุ้มเซลล์ (olemma) ของโอโอไซต์ (oocyte) (Yanagimachi, 1994)

หางของตัวอสุจิ

หางประกอบด้วยแอกโซนิม (axoneme) ที่มีไมโครทิวบูล (microtubules) จำนวน 9 คู่ + 2 คู่ เรียงตัวอยู่ ล้อมรอบด้วยเดนส์ไฟเบอร์ (dense fibers) ไมโครทิวบูลประกอบด้วยโปรตีนชนิดหนึ่งที่เรียกว่า dynein ที่มีหน้าที่สร้างพลังงานให้เกิดการเคลื่อนไหวของแฟลกเจลลัม (flagellum) (Turner, 2003) ส่วนหน้าของหางมีชิ้นส่วนที่เชื่อมต่อกับลำตัว ส่วนหลังประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ห่อเป็นเกลียวแน่นรอบเดนส์ไฟเบอร์ และล้อมรอบด้วย ปลอกไมโทคอนเดรียล (mitochondrial sheath)

ไมโทคอนเดรีย ผลิตเอทีพี (adenosine triphosphate; ATP) เป็นแหล่งพลังงานสำหรับกิจกรรมการเผาผลาญของเซลล์และการเคลื่อนไหวของแฟลกเจลลา (Turner, 2003) ลำตัวถูกแยกออกจากหางส่วนหลัง (posterior tail) โดยแอนนูลัส (annulus) ซึ่งเป็นเส้นใยหนา (dense fibrous) รอบแอกโซนิมอลคอมเพล็กซ์ (axonemal complex)

หางส่วนหลังล้อมรอบด้วย fibrous sheath และแบ่งย่อยเป็นหางส่วนหลัก (principal piece) และส่วนปลาย (end piece) หน้าที่ของแฟลกเจลลัม มีเพื่อให้พาตัวอสุจิเคลื่อนที่ไปยัง perivitelline space ของโอโอไซต์ โดยทั่วไปพลังงานจะสร้างจากฐานโดยการขยับในรูปแบบคลื่น และคลื่นเหล่านี้จะแพร่กระจายไปตามความยาวจนถึงปลายแฟลกเจลลัม การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี

ภายในแฟลกเจลลัม เปลี่ยนแปลงรูปแบบของการเคลื่อนไหวจากการเคลื่อนที่และเป็นวงกลมไปเป็นการเคลื่อนไหวที่รวดเร็วและไปข้างหน้า (Turner, 2003)

สายพันธุ์ของสัตว์ที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นรูปแบบที่แตกต่างกันของการเคลื่อนไหวของอสุจิ อย่างไรก็ตามสัตว์หลายชนิดรวมถึงโลมา แสดงการเคลื่อนที่ที่จำเพาะต่อระบบสืบพันธุ์เพศเมีย ระหว่างการเกิดคาปาซิเตชัน (capacitation) คือกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี ที่เกิดขึ้นกับอสุจิ ก่อนเกิดปฏิกริยาของอะโครโซม (Yanagimachi, 1994)

ตัวอสุจิของโลมาและวาฬ

จากการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของอสุจิโลมาและวาฬพบว่ามึลักษณะใกล้เคียงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ (Fleming et al., 1981; Miller et al., 2002) อย่างไรก็ตามก็มีรายงานว่ามีความแตกต่างในด้านขนาด ความยาว ความกว้าง และรูปร่างของหัวอสุจิ สอดคล้องกับที่มีรายงานว่าความยาวของตัวอสุจิแปรผกผันกับขนาดตัวโลมาและวาฬ (Cummins and Woodall, 1985; Kita et al., 2001) ในวาฬขนาดใหญ่เช่น วาฬบราร์ดปีค (*Berardius bairdii*) และวาฬบรูด้า (*Balaenoptera edeni*) มีขนาดตัวอสุจิที่เล็ก จากการศึกษาทางจุลกายวิภาคของตัวอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนทั้งชนิดส่องกราดและส่องผ่านจากโลมาและวาฬ 11 สายพันธุ์ (Kita et al., 2001; Miller et al., 2002) พบว่าส่วนหัวอสุจิของวาฬเพชฌฆาต (*Orcinus orca*) พบว่าหัวมีความกว้างกว่าโลมาและวาฬสายพันธุ์อื่นๆ จากการศึกษาลักษณะภายนอกของอสุจิในตระกูลโลมาพบว่าวาฬเพชฌฆาต มีลักษณะของอสุจิแตกต่างจากสัตว์ในวงศ์เดียวกันมี ลักษณะส่วนหัวที่มีรูปร่างคล้ายกับพัดญี่ปุ่น แต่ในสายพันธุ์อื่นมีลักษณะเรียวยาวมากกว่า (Kita et al., 2001)

2.3 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ (Semen collection)

ก่อนหน้าที่จะมีวิธีเก็บตัวอย่างโดยวิธีกระตุ้นด้วยมือ การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อในโลมาใช้วิธีกระตุ้นด้วยไฟฟ้า (electroejaculation) (Seager et al., 1981) ซึ่งการควบคุมตัวสัตว์อาจส่งผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำเชื้อที่เก็บมาได้ และไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้ออย่างต่อเนื่องได้เพราะทำให้เกิดความเครียดกับตัวสัตว์ ส่วนวิธีเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อโดยการฝึกโลมาให้หลังน้ำเชื้อได้มีการฝึกเป็นผลสำเร็จในโลมาปี 1986 โดยการฝึกให้โลมาปากขวดหลังน้ำเชื้อออกมาโดยการกระตุ้นด้วยมือ (manual stimulation) (Keller, 1988) ซึ่งหลังจากนั้นก็มีการฝึกสำเร็จในโลมา

แบซิฟิกไวท์ไซด์ วาฬเพชรฆาตและวาฬเบลูก้า ได้คุณภาพน้ำเชื่อดังที่แสดงในตารางที่ 1 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อโลมาสามารถเก็บจากการฝีกโลมาโดยใช้มือกระตุ้นให้โลมาหลั่งน้ำเชื้อออกมา (hand manipulation) โดยวิธีการฝีกใช้การกระตุ้นให้โลมายื่นอวัยวะเพศ และหลั่งน้ำเชื้อออกมา ร่วมกับการเสริมแรงทางบวก (positive reinforcement) เช่น การให้ปริมาณอาหารมากขึ้นต่อ 1 คำสั่ง ในระหว่างที่ทำการฝีกโลมา (Schroeder and Keller, 1989)

2.4 ความถี่ในการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อในโลมา

การศึกษาในวัวและม้าพบว่า ความถี่ของการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อมีผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บได้ เมื่อมีการเพิ่มความถี่ในการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อพบว่า คุณภาพน้ำเชื้อที่ได้จากวัวและม้ามีคุณภาพลดลง ในด้าน ปริมาณน้ำเชื้อ จำนวนตัวอสุจิและความหนาแน่นของตัวอสุจิแต่พบว่ามีอสุจิที่เคลื่อนไหว (motility) เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจากการเก็บตัวอย่าง 5 ครั้งต่อสัปดาห์ มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบการเก็บตัวอย่าง 3 ครั้งต่อสัปดาห์ ความถี่ในการเก็บตัวอย่าง (6 ครั้งต่อสัปดาห์) ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ในวัว (Almquist, 1982) การเปรียบเทียบความแตกต่างของอสุจิที่เคลื่อนไหวหรือมีชีวิต ระหว่าง การหลัง 2 ครั้งติดต่อกัน พบว่าไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (Pickett et al., 1985)

ทั้งนี้ยังไม่มีการศึกษาผลกระทบของความถี่ในการเก็บน้ำเชื้อโลมา กับคุณภาพน้ำเชื้อแต่เชื่อได้ว่าความถี่ในการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้ออาจมีผลต่อคุณภาพของน้ำเชื้อโลมาที่เก็บได้ การเพิ่มความถี่ในการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อมีผลให้ปริมาณของน้ำเชื้อ ความเข้มข้นของตัวอสุจิลดลงกว่าปกติ

2.5 การศึกษาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในโลมาสายพันธุ์ต่างๆ

โลมาปากขวด (*Tursiops aduncus*)

จากการชันสูตรซากเพื่อดูความสมบูรณ์พันธุ์ของโลมาเพศผู้โดยศึกษาจาก น้ำหนักของอวัยวะเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดสร้างอสุจิ (seminiferous tubule) การมีอสุจิในหลอดสร้างอสุจิ และการมีน้ำอสุจิ (seminal fluid) ในท่ออพิติเดมิส พบว่าโลมาเพศผู้ในช่วงอายุ 10-13 ปีเป็นช่วงที่สมบูรณ์พันธุ์ที่สุด (Cockcroft and Ross, 1990) และจากการสังเกตลักษณะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) ที่เก็บจากโลมาปากขวดในแม่น้ำฟลอริดา พบว่าอาจเริ่มที่อายุ 9 ปีก็ได้ และมีการประมาณช่วงความสมบูรณ์พันธุ์ที่อายุ 14.5 ปีในโลมาเพศผู้ที่มาจากทางตะวันออกของแอฟริกาใต้ (Cockcroft and Ross, 1990) โดยมีการรายงานว่าในโลมาที่เลี้ยงไว้อายุ 7 ปี จะสามารถหลั่งน้ำเชื้อออกมาเป็นปกติ (Yuen et al., 2009) และโลมาที่อยู่ที่เพาะเลี้ยง ช่วงที่อายุน้อยมีโอกาสในการผสมติดอยู่

บ่อยครั้ง ส่วนสัตว์ที่อยู่ตามธรรมชาติลักษณะทางสรีรวิทยาเพศผู้จะปรากฏให้เห็นถึงความสมบูรณ์พันธุ์ในจำฝูง แต่ในความเป็นจริงแล้วอาจยังไม่สมบูรณ์พันธุ์ เพราะตัวผู้ที่จะมีผสมพันธุ์ในธรรมชาติได้สำเร็จนั้นต้องมีอายุอย่างน้อย 20 ปีขึ้นไป (Duffield and Wells, 1991)

จากการศึกษาระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ในฤดูต่างๆ ของโลมาปากขวด ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าในเดือนกันยายนถึงตุลาคม ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเพิ่มสูงขึ้น 14 - 24 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบว่าในช่วงเดือนเมษายนถึงพฤษภาคม ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนเพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นเดียวกัน ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่ขึ้นสูงสุดสัมพันธ์กับพฤติกรรมความต้องการผสมพันธุ์ของโลมา โดยวัดระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเลือดและอสุจิที่ผลิออกมาจากโลมาปากขวดอายุ 19 ปี เก็บเลือด 2 ครั้งต่อเดือน และกระตุ้นการหลั่งน้ำเชื้อ 2 ครั้งต่อสัปดาห์ เป็นระยะเวลามากกว่า 28 เดือน ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจะอยู่ในช่วง 1.1 - 54.1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร จะเพิ่มสูงขึ้นในเดือนเมษายนและขึ้นสูงสุดในเดือนกรกฎาคม ต่อเนื่องกันสองฤดูกาล และพบว่ามีความเข้มข้นของตัวอสุจิมากที่สุด ปริมาณตัวอสุจิจะลดลงในช่วงปลายเดือนสิงหาคมจนถึงตุลาคมเช่นเดียวกันกับที่ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนจะลดต่ำสุด (Harrison and Ridgwa, 1971)

นอกจากนี้ยังพบว่ามีความสัมพันธ์ของการสร้างตัวอสุจิที่เพิ่มมากขึ้น หลังจากทีระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเลือดที่มีระดับสูงสุด ผลกระทบของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่สูงขึ้นน่าจะมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดกระบวนการสร้างตัวอสุจิ

มีการศึกษารวบรวมข้อมูลของ ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ในซีรัมโลมาปากขวด โดยเก็บอาทิตย์ละ 2 ครั้ง จากโลมาเพศผู้ 5 ตัว ช่วงเวลา 6 - 24 เดือน โดยแยกลักษณะโลมาที่ยังไม่โตเต็มวัยที่กำลังเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ และตัวที่อยู่ในช่วงสมบูรณ์พันธุ์ ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ในโลมาโตเต็มวัย (อายุ 13 - 15 ปี) มีความผันแปรอยู่ที่ 2 และ 5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรเพิ่มสูงขึ้นถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในช่วงฤดูผสมพันธุ์ การประมาณว่าเพศผู้เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์โดยดูจากระดับฮอร์โมน เทสโทสเตอโรน ที่เริ่มพบครั้งแรกน้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรจนถึง 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในทางกลับกัน พบว่าระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ที่น้อยกว่า 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรในโลมาปากขวด (*Tursiops aduncus*) เพศผู้ที่โตเต็มวัย รวมถึงการใช้คลื่นความถี่สูงดูเนื้อเยื่อของอัณฑะ (testicular echo pattern) บ่งชี้ถึงการเข้าสู่ช่วงโตเต็มวัยของโลมาได้ สิ่งที่สำคัญยิ่งกว่านั้นคือ จากการศึกษาเพิ่มเติมพบว่าปัจจัยที่ส่งผลกับการผสมพันธุ์ของโลมา คือ อุณหภูมิ ส่วนเรื่องปัจจัยด้านอาหารและสภาพแวดล้อมมีความจำเป็นน้อยมาก มีการศึกษาจำนวนมากแสดงให้เห็นถึงการเพิ่มจำนวนในช่วงเวลาหนึ่งของโลมาในรอบปี ซึ่งสามารถแบ่งเป็นฤดูกาลผสมพันธุ์ได้ (Kirby, 1990)

โลมาไวท์ไฮด์ (*Lagenorhynchus obliquidens*)

เพศผู้ที่มีความสมบูรณ์พันธุ์จะมีความยาวลำตัวระหว่าง 2 - 4 เมตร และอายุอยู่ในช่วง 6 - 8 ปี งานวิจัยในญี่ปุ่น บ่งชี้ว่าโลมาแปซิฟิกไวท์ไฮด์เพศผู้ 1 ตัวมีการเก็บอสุจิได้ในช่วงเดือนพฤษภาคม ถึงกันยายน ข้อมูลประกอบด้วยระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ปริมาณอสุจิที่ผลิตได้ และความเข้มข้นของอสุจิในช่วงสูงที่สุดในเดือนมิถุนายนได้ 19.3×10^8 ตัวต่อมิลลิลิตร (เป็นค่าเฉลี่ยตั้งแต่เดือน พฤษภาคมถึงกันยายน = 19.3×10^8 ตัวต่อมิลลิลิตร ± 0.65) จนถึงช่วงที่มีการสร้างอสุจิได้น้อยสุดจากเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนเมษายน ด้วยข้อมูลที่จำกัดและข้อแตกต่างที่พบในโลมาปากขวด พบว่าช่วงฤดูผสมพันธุ์เป็นช่วงที่ระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนสูงที่สุด และพบว่าเกิดขึ้นพร้อมกันกับปริมาณอสุจิที่เพิ่มสูงขึ้นในเดือนพฤษภาคมและมิถุนายน โลมาแปซิฟิกไวท์ไฮด์มีช่วงฤดูกาลการผสมพันธุ์ที่สั้น โดยไม่ทราบกลไกทางสรีรวิทยาว่าควบคุมวงจรรอบการผสมระหว่างตัวเมียอย่างไร (Derauf and Gulland, 2001)

วาฬเพชฌฆาต (*Orcinus orca*)

มีการประเมินความสมบูรณ์พันธุ์ของวาฬเพชฌฆาต จะอยู่ในช่วงอายุประมาณ 15 - 16 ปี มีความยาวช่วงตัว 6 - 7 เมตร โดยประเมินจากระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในซีรัม มีรายงานว่า วาฬเพชฌฆาตเพศผู้สามารถผสมพันธุ์ได้ตั้งแต่อายุก่อน 10 ปี แต่ยังไม่มีการศึกษาถึงระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ในตัวเต็มวัยที่อยู่ในช่วงอายุแรกเริ่ม อย่างไรก็ตาม มีการรายงานว่าในโลมาตัวเต็มวัยที่อยู่ในช่วงอายุแรกเริ่ม จะมีความเข้มข้นของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนต่ำกว่า 1 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรจนถึงอายุ 12 ปี

การเปลี่ยนแปลงฤดูกาลไม่มีนัยสำคัญต่อระดับของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่ตรวจได้จากซีรัมของ วาฬเพชฌฆาตเพศผู้จำนวน 5 ตัวอายุ 10 ปี หรือมากกว่า แต่ค่าเฉลี่ยของระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนลดลงอย่างมีนัยสำคัญในเดือนตุลาคม ความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนที่ต่ำสุดในเดือนตุลาคม อยู่ที่ 1.4 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสูงสุดในเดือนเมษายนที่ 2.2 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตรมีระดับสูงสุดช่วงเดือนมีนาคมถึงกรกฎาคม ความเข้มข้นของอสุจิที่เก็บจากวาฬเพชฌฆาต ที่อยู่ในสถานที่เลี้ยงในฤดูกาลต่างๆ ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ วาฬเพศผู้สามารถผสมพันธุ์ได้ตลอดทั้งปีและผสมพันธุ์สูงสุดในช่วงฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อน (Derauf and Gulland, 2001)

วาฬเบลูก้า (*Delphinapterus leucas*)

มีการศึกษาว่าฤดูกาลมีผลต่อเพศผู้หรือไม่พบว่า การจัดลำดับ ขนาดฝูงที่ผสมสภาพแวดล้อม หรือ แหล่งอาหาร การเปลี่ยนแปลงของฤดูกาล อาจมีผลหรือไม่มีผลในโลมาเพศผู้ที่โตเต็มที่แล้ว

พบว่าถ้าวาฬเบลูก้าที่อยู่ในสถานที่เดียวกันแต่มาจากแหล่งที่มาคนละพื้นที่ก็จะมีช่วงเวลาผสมพันธุ์ที่แตกต่างกัน (Katsumata et al., 2012) และในช่วงฤดูหนาวจะมีการสร้างอสุจิลดลง

วาฬเบลูก้าเพศผู้อายุ 3 - 21 ปี จำนวน 11 ตัว มีค่าเฉลี่ยระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน ต่ำสุดเดือนกันยายน 0.9 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และสูงสุดเดือนมีนาคม 4.95 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน เพิ่มขึ้นตั้งแต่เดือนมกราคมถึงเดือนเมษายนโดยทั้ง 4 เดือนมีปริมาณฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนมากกว่า 3.5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร ยังไม่ทราบถึงความสัมพันธ์ของ ฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนในเลือด และการผลิตอสุจิ แต่วาฬเบลูก้า มีลักษณะทางสรีรวิทยาคลายกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่น ๆ ที่มีการผสมพันธุ์กันตามฤดูกาล และสร้างปริมาณอสุจิได้สูง 1 ถึง 2 เดือน หลังจากที่มีระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนขึ้นสูงที่สุด จึงอาจจะสันนิษฐานได้ว่าวาฬเบลูก้าเพศผู้ ที่เลี้ยงไว้จะมีการสร้างอสุจิสูงที่สุดในเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน (Calle et al., 2000)

ข้อมูลเกี่ยวกับ spermatogenesis และ sperm biology แสดงให้เห็นถึงข้อมูลพื้นฐานสำคัญที่จำเพาะต่อวาฬและโลมาในสายพันธุ์นั้นๆ ซึ่งสามารถนำมาใช้ในการประเมินสุขภาพของสัตว์ในกลุ่มวาฬและโลมา ทั้งที่อยู่ในสถานที่เลี้ยงและอยู่ในธรรมชาติได้ ถึงแม้ว่าโลมาเพศผู้จำนวนมากได้รับการฝึกให้สามารถเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ ที่ได้คุณภาพดีบ่งบอกถึงการผสมพันธุ์ตามธรรมชาติที่สามารถเก็บรวบรวมเป็นประจำหลังจากที่การพัฒนาของการฝึกอบรมและการเก็บรวบรวมวิธีการที่เหมาะสม การฝึกอบรมและการเก็บรวบรวมวิธีการต่างออกไปเล็กน้อยในสายพันธุ์ที่แตกต่างกัน แต่เทคนิคทั้งหมดจะขึ้นอยู่กับ การตอบสนองของการหลั่งน้ำเชื้อ และหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของน้ำทะเลและปัสสาวะ ผลกระทบของฤดูกาลต่อการหลั่งฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนและการผลิตอสุจิ ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์โลมาและวาฬที่ศึกษา การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อโลมาที่มีคุณภาพสามารถเก็บได้ตลอดทั้งปี จากสัตว์ในกลุ่มโลมาและวาฬที่มีการศึกษาในสถานที่เลี้ยง ยกเว้นในโลมาพันธุ์แปซิฟิกไวท์ไฮด์ ที่มีฤดูผสมพันธุ์ ที่จะสามารถเก็บน้ำเชื้อได้เฉพาะในช่วงฤดูร้อนและต้นฤดูใบไม้ร่วง (Robeck et al., 2009)

สำหรับสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มว่าฤดูการสืบพันธุ์จะส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำเชื้อเช่น วาฬเบลูก้า และโลมาปากขวด ช่วงระยะเวลาที่เหมาะสมในการเก็บตัวอย่างที่จะได้น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีที่สุดในวาฬเบลูก้าคืออยู่ในช่วงฤดูหนาวจนถึงต้นฤดูใบไม้ผลิ (O'Brien et al., 2008) ส่วนในโลมาปากขวด การเก็บน้ำเชื้อในฤดูใบไม้ผลิและฤดูร้อนจะได้จำนวนตัวอสุจิมากกว่าฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาว

ในโลมาแปซิฟิกไวท์ไฮด์ (*Lagenorhynchus obliquidens*) ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮอร์โมนเทสโทสเตอโรน จะสูงสุดในเดือนกรกฎาคมและมีค่ามากกว่าค่าเฉลี่ยจากเดือนอื่นๆ ในขณะที่

ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นของตัวอสุจิในแต่ละเดือนระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคม พบว่าเดือนกันยายนมีความเข้มข้นของตัวอสุจิ มากกว่าเดือนกรกฎาคม สิงหาคม และตุลาคมตามลำดับ (Robeck et al., 2009)

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อ

การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้น เพื่อประเมินคุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บมาได้ เป็นการประเมินประสิทธิภาพความสามารถของตัวอสุจิในการปฏิสนธิ แบ่งได้ 2 แบบ ดังนี้ 1. การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่า (macroscopic evaluation) 2. การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic evaluation)

1. การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยตาเปล่า แบ่งเป็น

1. ปริมาตร (volume)
2. สี (color)
3. ความหนืด (consistency)
4. ความหนาแน่นของตัวอสุจิ (density)
5. ความเป็นกรดต่าง (pH)

ปริมาตรของน้ำเชื้อ สี และความหนืด สามารถประเมินคุณภาพได้ในเบื้องต้นด้วยตาเปล่า เช่น ปริมาตร มีความแตกต่างกันใน ขนาด อายุ และความถี่บ่อยในการผสมพันธุ์ สี โดยปกติแล้วสีของน้ำเชื้อจะมีสีขาวขุ่นมากคล้ายสีของนํ้านม หากมีสีอื่นปนอยู่ด้วย อาจบ่งบอกถึงการบาดเจ็บ หรือ ความผิดปกติอื่นๆได้ เช่น สีแดง แสดงว่ามีเลือดเจือปน หรือมีสีเหลืองอ่อนแสดงว่ามีน้ำปัสสาวะเจือปน ความหนืด สังเกตด้วยตาเปล่าดูความหนืดของน้ำเชื้อ บันทึกรูปเป็น creamy white: เมื่อน้ำเชื้อมีสีขาวครีมคล้ายนมข้น, milk white: เมื่อน้ำเชื้อมีสีขาวนํ้านม, opalescent: เมื่อน้ำเชื้อมีสีขาวขุ่น, watery : เมื่อน้ำเชื้อมีลักษณะเหลวใส ความเป็นกรดต่าง (pH) น้ำเชื้อที่มีคุณภาพดีมักจะมีสภาพเป็นกรดเล็กน้อย และที่มีคุณภาพเริ่มไม่ดีคือมีสภาพเป็นกลางหรือต่างเล็กน้อย (Sigman and Zini, 2009; Vasan, 2011)

2.การตรวจคุณภาพน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์ เป็นการตรวจให้ทราบถึงรายละเอียด ของคุณภาพของน้ำเชื้อ โดยมีสิ่งต้องตรวจคุณภาพดังนี้ (Vasan, 2011)

2.1 การตรวจหาอสุจิที่เคลื่อนไหวหรือมีชีวิต (motility)

การเคลื่อนที่ของตัวอสุจิจะต้องตรวจการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าเท่านั้น จะไม่นับการเคลื่อนที่ที่ว่ายเป็นวงกลม การตรวจนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานของการมีชีวิตรอดของตัวอสุจิและความสามารถของตัวอสุจิที่จะเคลื่อนที่ไปปฏิสนธิกับไข่ได้

วิธีการตรวจ

หยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ ที่อุ่นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 หยดนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เมื่อต้องการดูการเคลื่อนไหวของอสุจิแบบเป็นกลุ่ม แต่ถ้าต้องการตรวจการเคลื่อนไหวแบบรายตัว หลังจากหยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นสไลด์แล้วค่อยๆ ปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 50 เท่า (Dhurvey et al., 2012)

2.2 ความเข้มข้นของตัวอสุจิในน้ำเชื้อ (concentration) sperm concentration/sperm count

วิธีการตรวจ โดย haemocytometer

ดูดน้ำเชื้อด้วย pipette สำหรับเจือจางเม็ดเลือดขาว จนถึงขีด 0.5 จากนั้นดูด 3% formal saline จนถึงขีด 11 จะทำให้น้ำเชื้อเจือจาง 50 เท่า เขย่าเบาๆ ให้เข้ากันเป็นเวลานาน 2-3 นาที หยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วทิ้งไป 3-4 หยดแรก แล้วจึงหยดน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วลงบน chamber ที่วางกระจกปิดสไลด์แล้ว นับตัวอสุจิซึ่งอยู่ในช่องสำหรับนับเม็ดเลือดแดง 5 ช่องใหญ่ ซึ่งแบ่งเป็น 80 ช่องเล็ก โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40 เท่า (ภาพที่ 2) (เกวลี และคณะ, 2535)

วิธีคำนวณ

N = จำนวนตัวอสุจิที่นับได้จาก 5 ช่องใหญ่

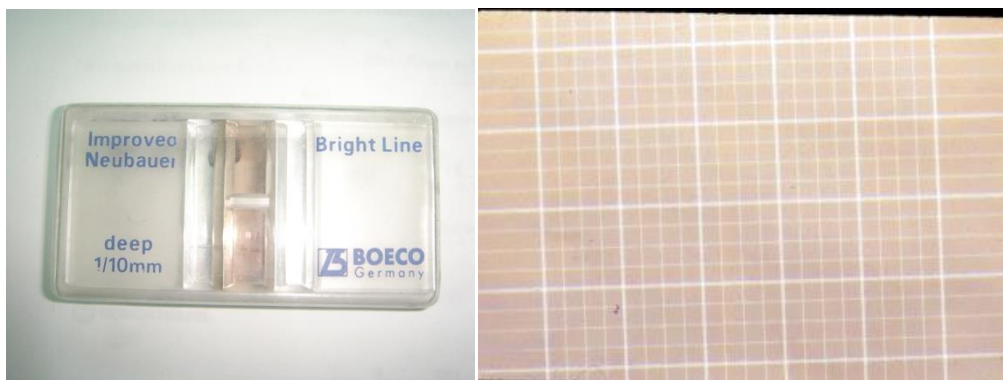
ปริมาตรน้ำเชื้อที่เจือจางใน 1 ช่องใหญ่ = $1/5 \times 1/5 \times 1/10 \text{mm}^3$

5 ช่องใหญ่ = $5 \times 1/250 \text{mm}^3$

เจือจางน้ำเชื้อ 50 เท่า = $1/50 \text{mm}^3$

น้ำเชื้อ 1mm^3 มีจำนวนอสุจิ = $N \times 50 \times 50$ ตัว

น้ำเชื้อ 1cm^3 มีจำนวนอสุจิ = $N \times 2500 \times 10^3$ ตัว



ภาพที่ 2 แสดง haemocytometer และช่องที่ใช้นับจำนวนอสุจิ

2.3 การตรวจรูปร่างของตัวอสุจิ (sperm morphology) และความผิดปกติของตัวเชื้ออสุจิ (abnormality)

การศึกษารูปร่างและความผิดปกติของตัวเชื้ออสุจิจำเป็นจะต้องย้อมสี เพื่อที่จะสามารถแยกหรือดูตัวอสุจิที่ปกติ และผิดปกติออกจากกันได้ง่าย ความผิดปกติของตัวอสุจิในสุนัขปกติที่ยอมรับได้ คือ มีความผิดปกติส่วนหัว หรือผิดปกติในส่วนหลัก (primary abnormality) ไม่เกิน 10% และผิดปกติส่วนรอง (secondary abnormality) ไม่เกิน 20% หรือมีความปกติของตัวอสุจิมากกว่า 70% ขึ้นไป

การตรวจความผิดปกติของตัวอสุจิที่ส่วนหัว มักนิยมย้อมสีโดยวิธีวิลเลียม (William's method) ซึ่งจะทำให้พบความผิดปกติของตัวอสุจิได้ชัดเจน

วิธีการตรวจ

ทำการสเมีย (smear) น้ำเชื้อเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ บนกระจกสไลด์ และทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำไปแช่ใน absolute alcohol นาน 3-4 นาที นำขึ้นมาแช่ต่อด้วย 0.5% chloramine solution นาน 1-2 นาที จนกว่าฝ้าหรือเมือกบนกระจกสไลด์หมดไป ล้างด้วยน้ำกลั่น และ 96% แอลกอฮอล์ จากนั้นย้อมสีด้วย carbol fuchsin-eosin นาน 2-10 นาที และนำไปล้างน้ำ ซับให้แห้ง เป็นอันเสร็จขั้นตอน นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ หาสิ่งผิดปกติ ซึ่งมักพบความผิดปกติที่ส่วนหัว ได้แก่ หัวเล็ก หัวที่ส่วนท้ายเล็ก หัวแหลม หัวกลม หัวใหญ่ เป็นต้น การนับจำนวนตัวอสุจิเพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติ นับจำนวนอย่างน้อย 200 ตัว (Koonjaenak, 2006)

- | | |
|--------------------|---|
| - narrow head | หมายถึง อสุจิที่มีส่วนหัวแคบกว่าปกติ |
| - small head | หมายถึง อสุจิที่มีส่วนหัวขนาดเล็กกว่าปกติ |
| - free normal head | หมายถึง อสุจิที่ไม่มีส่วนหาง |
| - broad head | หมายถึง อสุจิที่มีส่วนหัวกว้างกว่าปกติ |

- pear shape head หมายถึง อสุจิที่มีส่วนหัวลักษณะคล้ายลูกแพร์

- decapitate sperm defect หมายถึง อสุจิที่ไม่มีส่วนของ acrosome

การตรวจหาความผิดปกติของอสุจิที่ส่วนหาง (midpiece and tail sperm abnormality) นิยมทำการดองด้วยน้ำยา formal saline น้ำยา formal-saline ปริมาตร 1 ลิตร มีองค์ประกอบคือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ จำนวน 6.19 กรัม KH_2PO_4 2.54 กรัม ฟอรัมาลิน (formalin) เข้มข้น 125 ซีซี โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 5.41 กรัม เติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 1,000 ซีซี

วิธีการตรวจ

ดูดน้ำยาฟอรัมอล (formal-saline) 0.5-1 ซีซี ใส่หลอดแก้ว จากนั้นหยดน้ำเชื้อลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากัน จากนั้น นำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเฟส คอนทราสต์ (phase-contrast) สิ่งผิดปกติที่มักตรวจพบได้แก่ไซโตพลาสซึม ดรอป (cytoplasmic droplets) ความผิดปกติของหาง ส่วนกลาง (mid piece) ความผิดปกติของส่วนหางอื่น ๆ เช่น หางงอ มี 2 หาง หรือไม่มีหาง เป็นต้น นำไปนับจำนวนอสุจิที่มีความผิดปกติของส่วนกลางและส่วนหาง จำนวน 200 ตัว ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า ตามหลักเกณฑ์การแบ่งชนิดของความผิดปกติของส่วนกลางและส่วนหางของตัวอสุจิ ดังต่อไปนี้

- midpiece defect หมายถึง ความผิดปกติของส่วนกลาง

- coil tail หมายถึง ลักษณะของหางที่ม้วนเป็นวง

- bent tail หมายถึง ลักษณะของหางที่พับไปทางหัว

- proximal cytoplasmic droplets หมายถึง การมีหยดน้ำอยู่ที่ส่วนต้นของหาง

- distal cytoplasmic droplets หมายถึง การมีหยดน้ำอยู่ที่ส่วนปลายของหาง

การตรวจสอบความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอสุจิโดยวิธี hypo-osmotic swelling (HOS) test ใช้สารละลาย hypoosmosis ที่มีค่าออสโมลลาลิตี (osmolality) 150 มิลลิออสโมลต่อลิตร เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของ plasma membrane (Vasan, 2011)

การเตรียม HOS solution

HOS solution ที่มีออสโมลลาลิตี 150 mOmol/kg

Sodium citrate 7.35 กรัม

Fructose 13.51 กรัม

ละลายในน้ำกลั่น 1000 ซีซี

HOS solution ที่มีออสโมลลาลิตี 100 mOmol/kg

Sodium citrate 4.90 กรัม

Fructose	9.00	กรัม
ละลายในน้ำกลั่น	1000	ซีซี

วิธีการ

นำน้ำเชื้อ 0.1 มิลลิลิตรผสมกับสารละลาย HOS solution 1 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วตั้งทิ้งไว้ 40-60 นาที (น้ำเชื้อสดใช้สารละลายที่มีออสโมลาลิตี 100 mOsm/kg ส่วนน้ำเชื้อแช่แข็งใช้สารละลายที่มีออสโมลาลิตี 150 mOsm/kg) ดูดส่วนผสมมา 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปผสมกับสารละลาย hypotonic ที่มี 5% formaldehyde 0.5 มิลลิลิตร ดูดส่วนที่ผสมกันแล้วมาประมาณ 7 ไมโครลิตรลงบนสไลด์แล้วปิดด้วย cover glass เพื่อตรวจลักษณะของหางที่โค้งงอด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดตัดแสง (phase contrast microscope) ที่กำลังขยาย 400 เท่า โดยนับอสุจิรวมทั้งหมดจำนวน 200 ตัว แล้วคำนวณเป็นร้อยละ และบันทึกผล

- Positive หางโค้งงอ
- Negative หางตรง

การย้อมสีตัวอสุจิ

การย้อมสีตัวเป็นตัวยาย (The live-dead sperm count) ทำได้โดยการย้อมสี ซึ่งสีที่ใช้ย้อมได้แก่ อีโอซินนิโกรซิน (Eosin Nigrosin) โดยมีหลักการคือ ตัวอสุจิที่ตาย ผั่งเซลล์จะเสื่อมสภาพยอมให้สีซึมเข้าสู่ผนังเซลล์ได้ ซึ่งตัวอสุจิที่ตายจะติดสี ส่วนตัวอสุจิที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี

การตรวจรูปร่างของอสุจิ การตรวจความผิดปกติของตัวอสุจิที่ส่วนหัว มักนิยมย้อมสีโดยวิธีวิลเลียม (William's method) ซึ่งจะช่วยให้พบความผิดปกติของตัวอสุจิได้ชัดเจน การตรวจเซลล์ที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อ นิยมทำการย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลิน อีโอซิน (haematoxylin-eosin) เป็นการย้อมเพื่อตรวจดูเซลล์ที่ปะปนมาในน้ำเชื้อ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์อื่นๆ

มีการศึกษาพบว่าในอสุจิของมนุษย์ที่ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินอีโอซิน, โทลูอิดีนบลู (Toluidine Blue ;TB), ย้อมด้วยวิธีชอร์ (Shorr Method) และปาปานิโคลัว (papanicolaou) นำมาวัดขนาดอสุจิปกติจำนวน 200 ตัวและนำมาเปรียบเทียบกันพบว่า ขนาดของอสุจิที่วัดได้จะแตกต่างกันตามสีย้อมที่ใช้ (Aksoy et al., 2012)

โทลูอิดีนบลู สามารถจับกลุ่มฟอสเฟตของสายดีเอ็นเอ แสดงความผิดปกติที่เกิดกับดีเอ็นเอ โดยจะพบหัวอสุจิติดสีน้ำเงิน (Nabi et al., 2013; Sasikumar and Dakshayani, 2013) นิวเคลียสภายนอกจะมีคุณสมบัติเป็นประจุลบ onthochromatic ติดสีฟ้าและ metachromatic ติดสีม่วงเมื่อโปรตีนมีการคลายตัวมีการจับอย่างหลวมๆจะทำให้ดีเอ็นเอติดสีได้

การศึกษาขนาดความแตกต่างของหัวอสุจิมนุษย์ โดยใช้สตีดิฟฟ์ควิก (Diff Quick[®]), ปาปานิโคลัว และสเปิร์มบลู (sperm blue) เทียบกับอสุจิที่ไม่ได้ย้อมสี พบว่าขนาดของอสุจิที่ได้จากสตีดิฟฟ์ควิก มีขนาดใหญ่กว่า ลักษณะหัวอสุจิขมกว่า เมื่อเทียบกับสี ปาปานิโคลัว และสเปิร์มบลูและพบว่าสีปาปานิโคลัว มีขนาดตัวอสุจิหดเล็กลง กว่าสตีดิฟฟ์ควิก สเปิร์มบลูและอสุจิที่ไม่ได้ย้อมสี ส่วนสเปิร์มบลู ขนาดอสุจิไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอสุจิที่ไม่ได้ย้อมสี

ดังนั้นการศึกษานี้เป็นการศึกษาเพื่อหาคุณสมบัติของสีย้อมต่างๆ ว่าสีย้อมชนิดใดมีคุณสมบัติที่เหมาะสม ที่จะนำไปใช้ในการศึกษาตัวอสุจิของโลมาอิรวดี



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

ใช้โลมาเพศผู้สายพันธุ์อิรวดี (*Orcaella brevirostris*) ในสถานที่จัดแสดงโลมา พัทยา ดอลฟิน เวิลด์ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี อายุ 25 - 35 ปี จำนวน 3 ตัว โดยที่โลมาอิรวดี 1 และ โลมาอิรวดี 3 มีประวัติเคยให้ลูกโลมาในสถานที่เลี้ยง โลมาอิรวดีที่ใช้ในการศึกษา (ภาพที่ 3) เลี้ยงใน บ่อระบบปิด ขนาด 3000 ลูกบาศก์เมตร น้ำหมุนเวียนเข้าสู่โรงกรองบำบัดน้ำตลอด 24 ชั่วโมง ทำ การตรวจสอบสุขภาพและโลหิตวิทยาก่อนทำการทดลอง (ตารางที่ 1) ให้กินปลา เสริมด้วยกุ้ง และวิตามิน ร้อยละ 3 - 5 ของน้ำหนักตัวต่อวัน



ภาพที่ 3 โลมาอิรวดีเพศผู้ที่ใช้ในการทดลอง

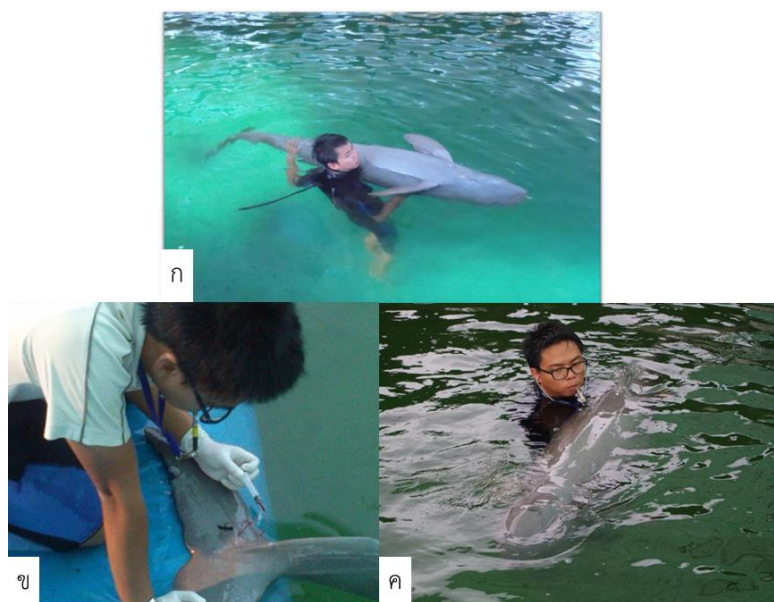
ตารางที่ 1 ผลการตรวจทางโลหิตวิทยาของโลมาอิรวดีที่ใช้ในการศึกษา

	ค่าอ้างอิง (n = 3, 32 ตัวอย่าง)	โลมาอิรวดี 1	โลมาอิรวดี 2	โลมาอิรวดี 3
จำนวนเม็ดเลือดแดง ($\times 10^6$ เซลล์/มิลลิลิตร)	3.1-6.9	3.2	3.7	3.7
ฮีโมโกลบิน(กรัม/เดซิลิตร)	10.6-6.6	10.9	12.4	12
ฮีมาโทคริต(เปอร์เซ็นต์)	35-51	37	43	39
ปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยเฉลี่ย(MCV)	59.4-166	116	116	106
ปริมาณเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดง (MCH)	19.9-44	33.4	33.2	31.8
ความเข้มข้นเฉลี่ยของฮีโมโกลบินในเม็ด เลือดแดง(MCHC)	21.4-38.1	28.9	28.7	30.1
ปริมาณเม็ดเลือดแดงตัวอ่อน(เปอร์เซ็นต์)	0-5.2	0.4	1.4	1.4
จำนวนเกล็ดเลือด(เซลล์/มิลลิลิตร)	108000-281000	185000	155000	128000
จำนวนเม็ดเลือดขาว(เซลล์/มิลลิลิตร)	5300-15800	8200	10100	7800
นิวโทรฟิล(เซลล์/มิลลิลิตร)	4505-12008	6150	8787	6396
นิวโทรฟิล(ตัวอ่อน) (เซลล์/มิลลิลิตร)	0	0	0	0
อีโอซิโนฟิล(เซลล์/มิลลิลิตร)	0-790	328	0	78
ลิมโฟไซต์(เซลล์/มิลลิลิตร)	660-3496	1640	1212	1248
โมนไซต์(เซลล์/มิลลิลิตร)	0-207	82	101	78
โปรตีนรวม(กรัม/เดซิลิตร)	5.9-85	5.9	7.4	6.9
แอลบูมิน(กรัม/เดซิลิตร)	2.2-37	2.5	2.8	
โกลบูลิน(กรัม/เดซิลิตร)	3.1-5.3	3.4	4.6	4.3
ครีตินีน(มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)	1-2.2	1.5	1.2	1.5
ยูเรียไนโตรเจนในเลือด (มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์)	44-136	52	51	55
แอสพาร์เตตอะมิโนทรานสเฟอเรส(ALT)	30-167	30	71	41
อะลานีนอะมิโนทรานสเฟอเรส(AST)	136-318	271	266	186

3.2 การเตรียมโลมาสำหรับการทดลอง

ขั้นตอนที่ 1 ทำการฝึกโลมาเพื่อทำความคุ้นเคยสำหรับการตรวจสุขภาพและการเก็บน้ำเชื้อตามลำดับขั้นตอนดังนี้ขั้นตอนที่ 1 ฝึกให้โลมาทำความคุ้นเคยกับผู้เก็บตัวอย่างทำการฝึกทำพื้นฐานเพื่อการตรวจรักษา ใช้ระยะเวลาประมาณ 6 เดือน ครั้งละ 15 นาทีต่อตัว วันละ 1 ครั้ง เช่น การฝึก

ให้โลมาอยู่นิ่งๆเพื่อทำการตรวจสุขภาพ หรือทำการเก็บตัวอย่าง เช่น การเก็บตัวอย่างจากทวารหนัก หรือช่องทางเดินหายใจ การตรวจสุขภาพเบื้องต้น และการเก็บตัวอย่างเลือดเพื่อส่งตรวจทางโลหิตวิทยา (ภาพที่ 4) วิธีการฝึกเพื่อเก็บตัวอย่างทางโลหิตวิทยา ทำการฝึกให้โลมานำหางมาวางไว้บนเบาะให้นานที่สุด โดยที่โลมาจะเลิกทำได้ก็ต่อเมื่อ มีการให้สัญญาณนกหวีดให้ไปได้ หลังจากที่โลมาสามารถนำหางมาวางได้นานมากขึ้นก็เริ่มทำการฝึกเพิ่มแรงกดที่หาง อาจจะทำให้นิ้วกดเป็นระยะๆ หลังจากนั้นพอเริ่มมั่นใจว่าโลมาไม่ตกใจแล้ว จึงเริ่มทำการเก็บตัวอย่างเลือด โดยระหว่างการฝึกต้องพิจารณาว่ามีปัจจัยอื่น ๆ ที่จะทำให้การฝึกไม่สำเร็จ เช่น สภาพอากาศ สภาพแวดล้อมรอบบ่อ โลมาตัวอื่นที่อยู่ภายในบ่อ บุคคลที่ไม่เกี่ยวข้อง ล้วนสามารถส่งผลกระทบต่อตัวโลมาให้ไม่ปฏิบัติตามคำสั่งที่เหมาะสมได้



ภาพที่ 4 การฝึกโลมาเพื่อทำการตรวจสุขภาพ (ก) ทำความคุ้นเคยกับโลมาและฝึกให้โลมานอนหงาย (ข) ฝึกให้โลมาเอามาให้สัตวแพทย์ทำการเจาะเลือด (ค) ฝึกให้โลมาคุ้นเคยกับการตรวจเบื้องต้น

ขั้นตอนที่ 2 ทำการฝึกเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อในโลมา วิธีการฝึกให้โลมารับคำสั่งให้นอนหงายโดยให้ช่องเปิดอวัยวะเพศอยู่เหนือผิวน้ำ ให้โลมานอนนิ่งให้นานที่สุดโดยให้รับคำสั่งจากสัญญาณเสียงจากผู้ฝึก คือเมื่อผู้ฝึกให้สัญญาณให้เริ่มนอนหงายจนถึงสิ้นสุด โลมาถึงจะสามารถเปลี่ยนท่าแล้วได้รับการเสริมแรงทางบวก เช่น อาหารที่มากขึ้นต่อ 1 คำสั่ง โดยหลักการให้คือ ปลา 1 ตัวสำหรับพอใช้ 2 ตัวสำหรับการปฏิบัติที่ดี ถ้าดีมากอาจจะให้ 4 ตัว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของปลาที่นำมาให้เป็นอาหาร และความเหมาะสม ความยากง่ายของท่าทางที่ใช้ฝึก โดยใช้สัญญาณนกหวีดเป็นตัวให้คำสั่งให้หยุดการปฏิบัติ หลังจากที่โลมาเริ่มนอนหงาย ได้นานมากขึ้น ก็เริ่มทำการฝึกกระตุ้นให้อวัยวะเพศออกมาจากช่องเปิดอวัยวะเพศควบคู่กับท่านอนหงาย โดยให้โลมานำปลายอวัยวะเพศแตะ

กับเป้าหมายที่เรากำหนดไว้ ในช่วงแรกโลมาจะไม่เข้าใจคำสั่ง หรือไม่ต้องการให้ผู้ฝึกสัมผัสบริเวณช่องเปิดอวัยวะเพศ ซึ่งบางครั้งจะพบว่าช่องเปิดอวัยวะเพศมีการหดเกร็ง จนไม่สามารถนำเป้าหมายไปแตะกับปลายอวัยวะเพศได้ อาจจะต้องทำการฝึกจนกว่าโลมาจะเกิดความไวใจกับตัวผู้ฝึกเอง การฝึนเพื่อเปิดช่องเปิดอวัยวะเพศจึงเป็นสิ่งที่ไม่ควรทำ เนื่องจากอาจจะเป็นอันตรายต่อตัวผู้ฝึกเอง โดยที่โลมาอาจเกิดอาการตกใจ จนทำอันตรายกับตัวผู้ฝึก ผู้ฝึกต้องทำการฝึกซ้ำๆ เป็นระยะเวลาหนึ่ง จนเมื่อโลมาเริ่มมีการพยายามขยับอวัยวะเพศจะสังเกตเห็นได้จาก พบว่ามีการหดเกร็งของกล้ามเนื้อบริเวณรอบๆ ช่องเปิดอวัยวะเพศ จนเมื่อปลายอวัยวะเพศขยับจนแตะกับเป้าหมายที่เรากำหนดไว้ ให้เรารีบให้สัญญาณเสียงจากนกหวีดโดยทันที แล้วให้การเสริมแรงทางบวก โดยพิจารณาจากการตอบสนองของโลมาที่ทำกับเป้าหมายที่เรากำหนดไว้ อาจจะใช้เกณฑ์เป็นความยาวของอวัยวะเพศที่ขยับตามเป้าหมาย หากพบว่าการขยับของอวัยวะเพศไม่ขยับออกมาจากช่องเปิดอวัยวะเพศแต่มีการยื่นมาแตะกับเป้าหมายในระยะสั้นๆ ให้ทำการหยุดการฝึกเป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ และทำการฝึกใหม่อีกครั้ง จะทำให้โลมาสามารถยื่นอวัยวะเพศออกมาได้ไกลมากขึ้น ทำการฝึกทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 20 นาทีต่อตัว ทำการฝึกเพื่อเพิ่มระยะเวลา และระยะที่อวัยวะเพศสามารถออกมาจากช่องเปิดอวัยวะเพศพร้อมกับ กระตุ้นให้มีการหลั่งน้ำเชื้อ (ejaculate) เข้าไปในภาชนะที่มีการเตรียมไว้ โดยในโลมาบางตัวจะสามารถหลั่งน้ำเชื้อออกมาทันทีที่มีการยื่นอวัยวะเพศออกนอกช่องเปิดอวัยวะเพศแต่ในกรณีที่ไม่มีการหลั่งออกมาอาจจะต้องมีการกระตุ้นบริเวณปลายอวัยวะเพศเบาๆ จนกว่าจะมีการหลั่งน้ำเชื้อ และทำการเปลี่ยนเงื่อนไขที่ใช้ในการเสริมแรงทางบวกโดยปรับเป็น ถ้ามีการยื่นอวัยวะเพศออกมาจากช่องเปิด ให้ปลา 1 ตัว และใช้ปริมาณการหลั่งเป็นเกณฑ์ในการให้อาหารที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งในระยะแรกสามารถให้ 4 ตัวต่อการหลั่งน้ำเชื้อ 1 ครั้ง โดยไม่จำเป็นต้องดูปริมาณน้ำเชื้อที่หลั่งออกมาได้ เพื่อฝึกให้โลมาเข้าใจคำสั่งว่าต้องมีการหลั่งน้ำเชื้อร่วมกับการยื่นอวัยวะเพศออกมาด้วย ใช้ระยะเวลาประมาณ 6 เดือน แล้วทำการเก็บตัวอย่างเดือนละ 2 ครั้ง โดยที่การฝึกทั้งหมดที่กล่าวมา หากโลมาไม่ปฏิบัติตามคำสั่งที่ถูกต้องก็จะมีไม่มีการให้รางวัล แต่การให้อาหารตามปกติยังมีอยู่ในปริมาณที่เพียงพอกับความต้องการของโลมา โดยให้โลมาทำกิจกรรมอื่นควบคู่กับการฝึกไปด้วย เช่น ใช้วิธีฝึกทำทางง่ายๆ อื่นๆ ที่โลมาสามารถทำตามได้โดยง่าย

3.3 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อโลมา

วิธีการ ผู้ทำการทดลองเตรียมหลอดเก็บน้ำเชื้อที่สะอาดให้พร้อม นำหลอดเก็บน้ำเชื้อใส่ในภาชนะเพื่อป้องกันแสง ทำความสะอาดบริเวณช่องเปิดอวัยวะเพศ เพื่อป้องกันไม่ให้สิ่งสกปรกปะปนกับน้ำเชื้อ ใช้คำสั่งให้โลมานอนหงาย ทำการกระตุ้นบริเวณช่องเปิดอวัยวะเพศให้คำสั่งให้ อวัยวะเพศออกมาจากช่องเปิด ให้โลมาทำการหลั่งเข้าไปในหลอดเก็บน้ำเชื้อ (ภาพที่ 5) ระหว่างที่มีการหลั่ง

น้ำเชื้อโลมาจะมีการขยับตัวเกร็งเป็นระยะๆ ให้ใช้ขาประคองให้บริเวณช่องเปิดอยู่เหนือน้ำ และป้องกันน้ำทะเลเข้าไปปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำเชื้อที่เก็บได้ หากพบว่าโลมามีการปัสสาวะออกมาให้รอจนกว่าโลมาจะปัสสาวะหมดก่อน จึงค่อยเริ่มทำการเก็บตัวอย่างใหม่อีกครั้ง โดยดูว่ามีการปนเปื้อนของปัสสาวะในน้ำเชื้อที่เก็บด้วยหรือไม่ (ภาพที่ 6) หลังจากเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อเสร็จแล้วอวัยวะเพศของโลมาจะหดกลับเข้าไปในร่างกายระยะเวลาอันรวดเร็ว



ภาพที่ 5 วิธีการฝึกเพื่อเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อ (ก) ขั้นตอนการกระตุ้นให้อวัยวะเพศออกนอกช่องเปิด อวัยวะเพศทำการกระตุ้นบริเวณรอบๆ พร้อมกับการใช้การเสริมแรงทางบวกในการฝึก (ข) ฝึกโลมาให้หลังลงในหลอดที่เก็บน้ำเชื้อ

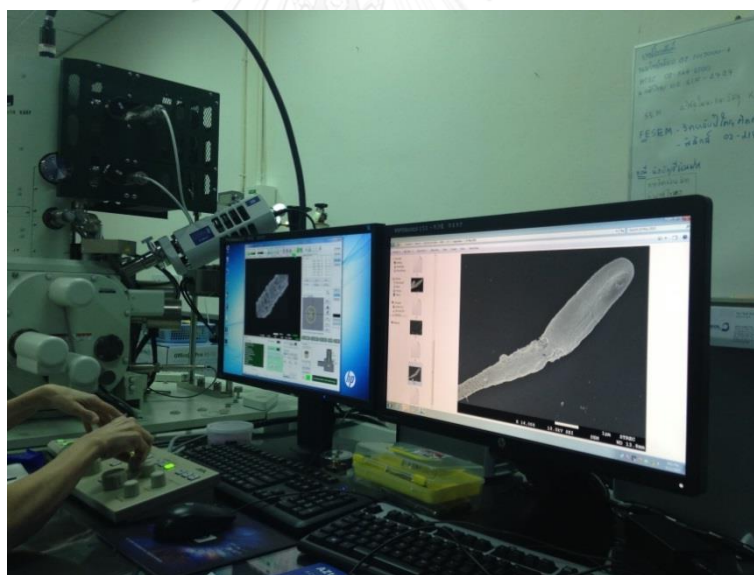


ภาพที่ 6 น้ำเชื้อโลมาอวัยวะที่รีดได้ในแต่ละครั้ง

3.4 การทดลองที่ 1 ศึกษาจุลกายวิภาคของอสุจิโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy)

3.4.1 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

นำตัวอย่างน้ำเชื้อโลมาที่เก็บได้จำนวน 3 ตัวอย่าง มาทำการตรึง(fixation)ด้วย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 โมล phosphate buffer (pH 7.4) โดยทำการหยดน้ำเชื้อบนกระจกสไลด์ แล้วแช่ใน glutaraldehyde ให้ท่วมกระจกสไลด์ประมาณ 1 เซนติเมตร แล้วแช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ควรเก็บตัวอย่างไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างตามวิธีของรุจิพร (2541) โดยหลังจากตรึงเรียบร้อยแล้ว ให้นำไปล้างในบัฟเฟอร์ และแช่ใน 0.1% osmium tetroxide ใน 0.1 โมล phosphate buffer (pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ล้างด้วยบัฟเฟอร์อีกครั้ง แล้วนำไปผ่านการดึงน้ำออกโดยใช้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (field emission scanning electron microscope (FESEM) (JSM-7610F; JEOL, Tokyo, Japan)) (ภาพที่ 7) สังเกตลักษณะของอสุจิบริเวณส่วนหัวและหาง พร้อมทั้งวัดความยาวของส่วนหัวและส่วนหางของตัวอสุจิ จำนวน 200 ตัว



ภาพที่ 7 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (field emission scanning electron microscope (FESEM)(JSM-7610F; JEOL, Tokyo, Japan))

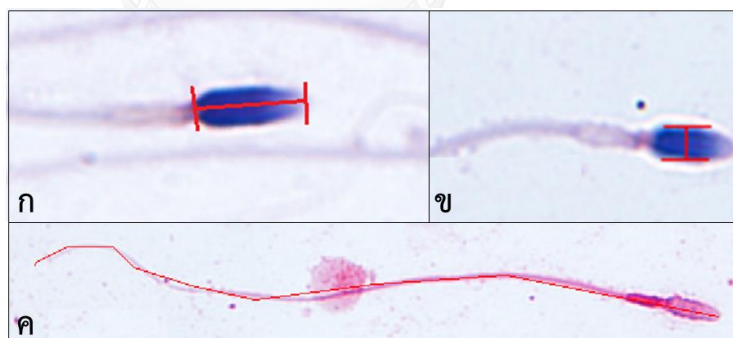
3.4.2 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

นำตัวอย่าง จำนวน 3 ตัวอย่าง ทำการแบ่งน้ำเชื้อของโลมาแต่ละตัวอย่างมาตรึงด้วย 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 โมล phosphate buffer โดยเตรียมสารละลาย agar ในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ ประมาณ 60 องศาเซลเซียส ผสมน้ำเชื้อกับ agar รอให้ agar เริ่มแข็งตัว แล้วใส่ 2.5%

glutaraldehyde ให้ท่วมตัวอย่าง เก็บให้แห้ง แล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทั้งนี้ควรทำการเตรียมตัวอย่างให้เร็วที่สุดและควรเป็นตัวอย่างที่เก็บไว้ไม่เกิน 24 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างตามวิธีของศิริเพ็ญและคณะ (2535) โดยหลังจากตรึงเรียบร้อยแล้ว ให้นำตัวอย่างไปล้างในบัฟเฟอร์ และแช่ใน 0.1% osmium tetroxide ใน 0.1 โมล phosphate buffer (pH 7.4) ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส อย่างน้อย 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยบัฟเฟอร์อีกครั้ง แล้วนำไปผ่านการดึงน้ำออกโดยใช้แอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆกัน จากนั้นนำตัวอย่างมาตัด section ให้มีความบาง 60 – 90 นาโนเมตร นำไปย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน สังเกตและบันทึกลักษณะของอสุจิทั้งหมด ศึกษาโครงสร้างนิวเคลียส และออร์แกเนลอื่นๆ

3.5 การทดลองที่ 2 การย้อมสีเพื่อศึกษาลักษณะของสเปิร์ม

หลังจากเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อจากโลมาทั้ง 3 ตัวแล้ว นำมาทำการย้อมสีตัวอสุจิเพื่อศึกษาลักษณะภายนอกของตัวอสุจิ หลังทำการย้อมสีตัวอสุจิด้วยวิธีที่จะกล่าวต่อไป จากนั้นทำการวัดขนาดของตัวอสุจิ ได้แก่ ความยาวของหัว (head length) (ภาพที่ 8ก) ความกว้างของหัว (head width) (ภาพที่ 8ข) สัดส่วนระหว่างความกว้างต่อความยาวของหัว (ratio) วัดความยาวหัวถึงหาง (total length) (ภาพที่ 8ค) และความยาวหาง (tail length) จำนวน 500 ตัว ด้วย cellSens™ microscope imaging software โดยการย้อมจะใช้สีย้อมชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 8 แสดงตัวอย่างการวัดขนาดตัวอสุจิที่ได้จากการย้อมสี

3.5.1 วิธีการย้อมด้วยสีปาปานีโคลัว (Papanicolaou) (World Health Organization, 2010)

การย้อมด้วยสีปาปานีโคลัว เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ได้ดีในการย้อมตัวอสุจิ และเซลล์ชนิดอื่นๆ โดยสีย้อมนี้จะย้อมติดบริเวณอะโครโซม (acrosome) และส่วนหัว (head) ที่มีปริมาณของไฮโดรพลาสซึมอยู่ปริมาณมาก รวมไปถึงส่วนของลำตัว (midpiece) ด้วย ดังนั้นสีย้อมนี้จึงถูกนำมาปรับใช้กับการวิเคราะห์ลักษณะภายนอกของตัวอสุจิ และในการตรวจสอบเซลล์สืบพันธุ์ที่ยังไม่เจริญเต็มที่

(immature germ cell) และเซลล์อสุจิที่มีลักษณะผิดปกติ วิธีการนี้สามารถนำมาปรับโดยไม่ใช้อีเธอร์ (ether) เป็น fixative หรือ xylene ในการทำให้เซลล์ยึดติดกับสไลด์ สไลด์ที่ใช้วิธีการย้อมด้วย ปาปานิโคลัว จะสามารถย้อมติดสีอย่างถาวรและนำไปเก็บไว้ใช้ในอนาคตได้ หากเก็บไว้ในที่มืดจะสามารถเก็บไว้ได้นานหลายเดือน หรือหลายปี

1.1 ขั้นตอนการย้อมสีปาปานิโคลัว

การย้อมด้วยสีปาปานิโคลัว สามารถทำได้โดยหลังจากที่ทำการสเมียร์ ตัวอย่างน้ำเชื้อลงบนสไลด์แล้ว นำไปจุ่มลงใน 95% ethanol นาน 15 นาทีเพื่อทำการตรึงตัวอย่าง แล้วนำสไลด์จุ่มลงใน 80% ethanol 30 วินาที ตามด้วย 50% ethanol 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า นาน 30 วินาที หลังจากนั้นนำสไลด์จุ่มลงใน Harris's haematoxylin 4 นาที แล้วล้างด้วยน้ำเปล่าอีกครั้ง นาน 30 วินาที แล้วนำสไลด์ที่ได้จุ่มลงใน acidic ethanol 4-8 ครั้ง (การจุ่ม 1 ครั้ง ใช้เวลา 1วินาที) ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่สำคัญมาก ควรเริ่มจุ่มจำนวน 4 ครั้งก่อน แล้วค่อยทำการจุ่มครั้งต่อไปจนกว่าสีที่ได้จะเหมาะสม หากจุ่มหลายครั้งเกินไปจะทำให้พื้นหลัง และตัวอสุจิเข้มมากขึ้น แล้วเปิดน้ำเย็นไหลผ่านสไลด์ นาน 5 นาที แล้วนำไปจุ่ม 50% ethanol, 80% ethanol และ 95% ethanol อีกอย่างละ 30 วินาที เรียงตามลำดับ หลังจากนั้นนำไปย้อมด้วย G-6 orange stain 1 นาที แล้วจุ่มใน 95% ethanol อีก 3 ครั้ง นานครั้งละ 30 วินาที เมื่อครบแล้วนำไปย้อมด้วย EA-50 green stain 1 นาที แล้วจุ่ม 95% ethanol อีก 2 ครั้ง นานครั้งละ 30 วินาที และ absolute ethanol 2 ครั้ง นานครั้งละ 15 วินาที

อย่างไรก็ตามวิธีการนี้มีการใช้ ethanol ในการตรึงตัวอย่าง ซึ่งวิธีการนี้จะทำให้เซลล์แห้ง ดังนั้นหลังจากการตรึงตัวอย่าง จนถึงการเริ่มต้นการย้อม ไม่ควรรอเวลานานเกินไป โดยเวลาที่เหมาะสมควรใช้เวลาเพียง 10 วินาทีเท่านั้น ในขณะที่สไลด์ที่ถูกทำให้แห้งหลังการตรึง ต้องจุ่มใน 50% ethanol นานขึ้น ประมาณ 2-3 นาที สไลด์ที่ได้หลังจากการย้อมแล้วสามารถนำไปตรวจตัวอย่างได้โดยที่จะผ่านหรือไม่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาตัวอย่างก็ได้

1.2 การเตรียมสไลด์ก่อนการเก็บรักษาตัวอย่างหลังการย้อมสี

ก่อนการเก็บรักษาตัวอย่างหลังการย้อมสีจะต้องมีการเตรียมตัวอย่างให้พร้อมสำหรับขั้นตอนการเก็บรักษา โดยใช้ของเหลวได้ 2 ชนิด คือ สารละลาย ethanol และ ethanol ที่ไม่ใช่สารละลาย

การใช้สารละลาย ethanol สามารถทำได้โดยการหยดสารละลาย ethanol mounting media ลงบนสไลด์ได้โดยตรง ในขณะที่ absolute ethanol ยังไม่แห้ง สำหรับการย้อมที่ใช้ ethanol ที่ไม่ใช่สารละลาย จะต้องเตรียมสไลด์ในตู้ดูดควัน โดยการเตรียมสไลด์นั้นจะทำต่อจากขั้นตอนการย้อมสี ทำได้โดยจุ่มสไลด์ลงในสารที่ผสมระหว่าง xylene ต่อ ethanol ใน ปริมาณ 1:2 เป็นเวลา 1 นาที แล้วจุ่มด้วย 100% xylene อีก 1 นาที

3.5.2 การย้อมด้วยวิธีชอร์ (Shorr's staining) (World Health Organization, 2010)

การย้อมด้วยวิธีนี้จะมีลักษณะที่ค่อนข้างคล้ายกับการย้อมด้วยสีปาปานีโคลัว (Papanicolaou) ทำได้โดยหลังจากตัวอย่างสเมียร์ลงบนสไลด์และรอให้แห้งแล้วทำการตรึงด้วยการนำไปจุ่มลงใน 75% ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมงแล้วจึงทำการย้อม

วิธีการย้อมด้วยวิธีชอร์ (Shorr's Staining)

หลังจากทำการตรึงแล้วนำสไลด์ที่ได้ไปจุ่มลงในน้ำเปล่าที่มีน้ำไหลผ่านประมาณ 12 - 15 ครั้ง แล้วจุ่มลงใน haematoxylin เป็นเวลา 1 - 2 นาที จากนั้นนำไปจุ่มลงในน้ำเปล่าที่มีน้ำไหลผ่านอีกครั้ง โดยจุ่มประมาณ 12 - 15 ครั้ง แล้วจุ่ม ammoniacal ethanol 10 ครั้ง จากนั้นจุ่มลงในน้ำเปล่าเช่นเดิม แล้วนำสไลด์ไปจุ่มลงใน 50% ethanol นาน 5 นาที หลังจากนั้นย้อมด้วยสี Shorr's stain 3-5 นาที แล้วทำการจุ่มลงใน 50% ethanol, 75% ethanol และ 95% ethanol เรียงตามลำดับ อย่างละ 5 นาที สไลด์ที่ได้หลังจากการย้อมแล้วสามารถนำไปตรวจตัวอย่างได้โดยที่จะผ่านหรือไม่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาตัวอย่างก็ได้ โดยวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างนั้นทำเช่นเดียวกับวิธีย้อมด้วยสี Papanicolaou (ดูในหัวข้อ 1.2 และ 1.3)

3.5.3 การย้อมสีด้วยวิธีดิฟควิก (Diff Quick) (World Health Organization, 2010)

วิธีนี้เป็นวิธีที่นิยมใช้กันทางคลินิกทั่วไปที่ต้องวิเคราะห์ผลภายในวันที่ได้รับการตรวจอย่างไรก็ตามคุณภาพในการย้อมนั้นจะแตกต่างกันออกไปตามคุณภาพของสี ซึ่งทำให้การย้อมด้วยวิธีนี้จะได้คุณภาพของการย้อมต่ำกว่าวิธีอื่นๆข้างต้น โดยสารเคมีที่ใช้นั้นประกอบด้วย Triarylmethane dye ปริมาณ 1.8 มิลลิกรัม ละลายอยู่ใน 95% methanol 1,000 มิลลิลิตร ใช้ในการตรึง (fixative reagent) และสารเคมีที่สำคัญในการย้อม 2 ชนิด คือ eosinophilic xanthene (staining solution 1) และ basophilic thiazine (staining solution 2) วิธีการย้อมทำได้โดยการนำสไลด์ที่สเมียร์แล้วจุ่มลงในสาร fixative reagent ที่เตรียมไว้เป็นเวลา 15 วินาที หรือใช้ 95% methanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำให้แห้งโดยการวางสไลด์ในแนวตั้งบนกระดาษ หลังจากนั้นจุ่มสไลด์ลงใน staining solution 1 และ staining solution 2 เป็นเวลา 10 วินาที และ 5 วินาที ตามลำดับ แล้วล้างด้วยน้ำเปล่า โดยการเปิดน้ำไหลผ่านสไลด์ และทำให้แห้งโดยการวางสไลด์ในแนวตั้งบนกระดาษที่ดูดซึมได้ สไลด์ที่ได้หลังจากการย้อมแล้วสามารถนำไปตรวจตัวอย่างได้โดยที่จะผ่านหรือไม่ผ่านกระบวนการเก็บรักษาตัวอย่างก็ได้ โดยวิธีการเก็บรักษาตัวอย่างนั้นทำเช่นเดียวกับวิธีย้อมด้วยสี Papanicolaou (ดูในหัวข้อ 1.2 และ 1.3)

3.5.4 วิธีการย้อมสีอีโอซิน (eosin) (World Health Organization, 2010)

ใช้ micropipette ดูดน้ำเชื้อสดหรือน้ำเชื้อที่เจือจางด้วยสารละลายเจือจางน้ำเชื้อ ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ที่ขอบสไลด์ ด้านหนึ่ง หยดสี eosin จำนวน 1 หยดที่บริเวณใกล้กับหยดน้ำเชื้อจากนั้น ผสมให้เข้ากัน ทำการสเมียร์แล้วปล่อยให้แห้ง นำสไลด์ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้ว มาตรวจนับและดูรูปร่างลักษณะของ ตัวอสุจิ

3.5.5 วิธีการย้อมสีโทลูอิดีนบลู (0.1% toluidine blue) (Aksoy et al., 2012)

เป็นวิธีที่ใช้ย้อมดูความผิดปกติของโครมาติน โดยที่หัวอสุจิที่มีความสมบูรณ์ของโครมาตินจะติดสีฟ้า ถ้ามีความสมบูรณ์ของโครมาตินลดลงจะติดสีม่วงเข้ม ถ้าอสุจิติดสีม่วงเข้มให้ถือว่ามีความผิดปกติ วิธีการย้อมทำการสเมียร์ ตัวอย่างน้ำเชื้อลงบนสไลด์แล้ว รอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง นำไปจุ่มลงใน 95% ethanol นาน 15 นาทีเพื่อทำการตรึง แล้วนำสไลด์จุ่มลงใน 0.1% toluidine blue นาน 5 นาที นำสไลด์ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วมาตรวจนับ

3.5.6 การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีวิลเลียม (William's staining)

เป็นการเตรียมน้ำเชื้อเพื่อตรวจความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิ ตัวอสุจิจะติดสีชมพูม่วง ทำการหยดน้ำเชื้อลงบนแผ่นกระจกสไลด์แล้วสเมียร์ ทิ้งให้แห้ง แชนส์ไลต์ใน absolute ethyl alcohol 3 - 4 นาที ทิ้งให้แห้ง แชนใน 0.5% chloramines solution 4 นาที จนกว่าฝ้า หรือเมือกบนสไลด์หมดไป ล้างในน้ำสะอาดและใน 95% ethyl alcohol ย้อมด้วยสี carbol fuchsin - eosin 8 - 10 นาที ล้างในน้ำสะอาดและปล่อยให้แห้ง ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.5.7 การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีอีโอซิน นิโกรซิน (Eosin-nigrosin staining)

เป็นวิธีเตรียมน้ำเชื้อที่ง่ายและสะดวก ใช้สำหรับการตรวจความผิดปกติของรูปร่างตัวอสุจิ และตรวจจำนวนตัวอสุจิที่มีชีวิตซึ่งไม่ติดสีและตัวอสุจิที่ตายซึ่งติดสีแดงของ eosin ส่วน nigrosin เป็นสีพื้นเข้ม วิธีการย้อม หยดสี eosin Y (1% eosin Y) 1 หยด ลงบนหยดน้ำเชื้อที่อยู่บนแผ่นกระจกสไลด์อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 30 วินาที หยดสี nigrosin (10% nigrosin) 2 หยด ผสมให้เข้ากันสเมียร์ น้ำเชื้อโดยลากทำมุม 30 องศา ให้แผ่กระจายบนสไลด์ แล้วทิ้งให้แห้ง ตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.5.8 การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีฮีมาทอกซิลิน อีโอซิน (haematoxylin & eosin staining)

เป็นการเตรียมน้ำเชื้อเพื่อที่จะใช้ตรวจหาเซลล์อื่นๆที่ปะปนมาในน้ำเชื้อ เช่น เม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อบุผนัง โดยหยดน้ำเชื้อสดลงบนแผ่นกระจกสไลด์สเมียร์ให้หนาและทิ้งให้แห้ง แขนใน methyl alcohol นาน 3 นาที จุ่มใน absolute ethyl alcohol จุ่มใน 96% ethyl alcohol แล้วจุ่มใน 70% ethyl alcohol หลังจากนั้นจุ่มในน้ำกลั่น ย้อมด้วยสี haematoxylin นาน 7 นาที แขนทิ้งไว้ในน้ำสะอาด ปล่อยให้แห้งไหลล้นออกตลอดเวลา นาน 30 นาที ย้อมด้วยสี eosin นาน 2 - 7 นาที จุ่มใน 70% ethyl alcohol จุ่มใน 96% ethyl alcohol จุ่มใน absolute ethyl alcohol อีก 2 ครั้ง จุ่มใน xylol ถ้าต้องการเก็บนาน ให้ปิดทับด้วย canada balsam หรือ DePeX (Gurr's distrene plasticizer xylene)

3.6 การวิเคราะห์ผล

นำข้อมูลที่ได้จากขั้นตอนการเก็บรวบรวมข้อมูลมาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SPSS เวอร์ชัน 22 ข้อมูลตัวเลข (quantitative data) ของคุณภาพน้ำเชื้อเบื้องต้นจะนำมาวิเคราะห์สถิติเชิงพรรณนา (descriptive analysis) เพื่อคำนวณค่าเฉลี่ย (mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation; SD) ค่าต่ำสุด (minimum) ค่าสูงสุด (maximum) เปรียบเทียบขนาดของตัวอสุจิที่ย้อมด้วยวิธีต่างๆ ร่วมกับขนาดของตัวอสุจิที่วัดได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ผลของการศึกษาขนาดของตัวอสุจิที่ย้อมด้วยวิธีต่างๆ ได้แก่ สีปาลานิคอลด์ วิธีซอร์ดิฟฟ์ควิก อีโอซิน โทลูอิดีนบลู วิธีวิลเลียม และอีโอซินนิโกรซิน เปรียบเทียบกับขนาดของตัวอสุจิที่วัดได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ด้วย One-way ANOVA

เปรียบเทียบผลการศึกษานับจำนวนตัวเป็นตัวของอสุจิ จากวิธีย้อมด้วยสีอีโอซิน และสีอีโอซินนิโกรซิน ด้วย independent sample t-test

เปรียบเทียบผลการศึกษานับความผิดปกติของอสุจิ จากวิธีย้อมด้วยวิธี วิลเลียม ซอร์ปาลานิคอลด์ ฮีมาทอกซิลินอีโอซิน และ ดิฟฟ์ควิก ด้วย one-way ANOVA

บทที่ 4 ผลการวิจัย

4.1 ศึกษาจุลกายวิภาคศึกษาของอสุจิโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscopy)

จากการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำเชื้อจากโลมาอิรวดี และได้ทำการตรวจคุณภาพเบื้องต้น ลักษณะน้ำเชื้อโลมาอิรวดีที่ได้มีลักษณะขุนขาวเหมือนนํ้านม ปริมาณน้ำเชื้อที่เก็บได้เฉลี่ย 3.42 ± 0.49 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.5 ความเข้มข้นของตัวอสุจิ 1440 ± 586.79 ล้านตัวต่อ มิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ $72 \pm 3\%$ ค่าออสโมลาลิตี้ 357 ± 7.07 ดังที่แสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงคุณภาพของน้ำเชื้อโลมาอิรวดี (n = 18)

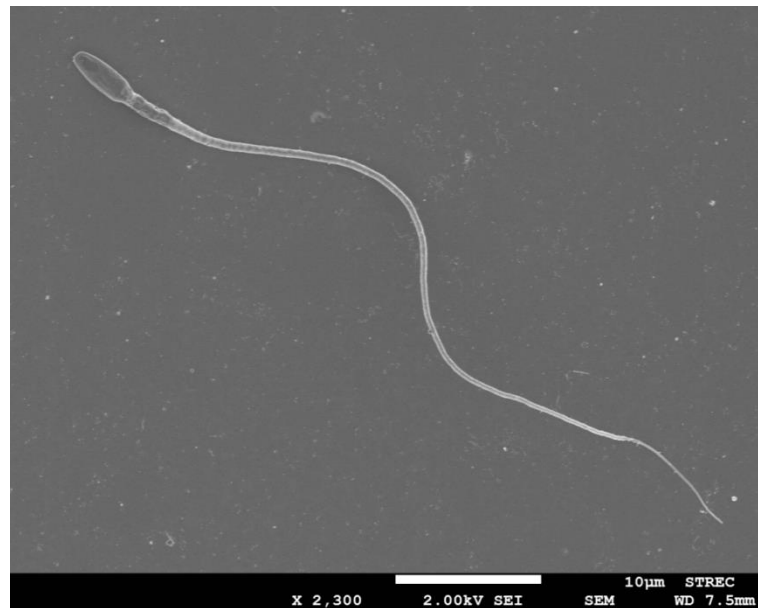
คุณลักษณะ	ค่าต่ำสุด	ค่าสูงสุด	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน
1. ปริมาณน้ำเชื้อ (มิลลิลิตร)	3	4	3.42	0.49
2. ค่าความเป็นกรด ต่าง	7.5	7.5	7.5	0.00
3. ความเข้มข้นของตัว อสุจิ ($\times 10^6$ ตัว/ มิลลิลิตร)	670	2400	1440	586.79
4. เปอร์เซ็นต์การ เคลื่อนไหวของอสุจิ	70	75	72	3
5. ค่าออสโมลาลิตี้ (mOsmol/kg)	352	362	357	7.07

รูปร่างของอสุจิของโลมาสายพันธุ์อิรวดี เมื่อนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่าหัวของอสุจิมีลักษณะทรงรีแบนและมีหางยาว (ภาพที่ 9) ตรงส่วนหน้าของอสุจิมีลักษณะเรียวยาว มีรอยเว้าลงไป ตรงขอบรอบรอยเว้าจะเรียบจนถึงกลางตัวอสุจิโดยมีรอยนูนเป็นลายด้านบนโค้งไปบนตัวอสุจิ (ภาพที่ 10และ11) เมื่อมองจากด้านข้างมีลักษณะเรียวยาวแหลมส่วนหน้ามี

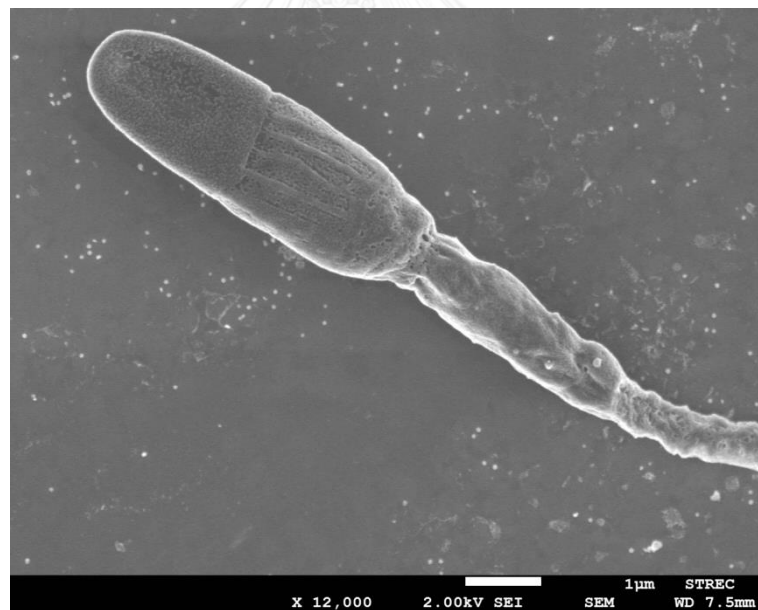
ลักษณะบางและค่อยๆหนาตัวไปทางด้านท้ายหัวสูจิจนถึงรอยเว้าด้านท้ายหัวที่เป็นรอยต่อระหว่างหัวสูจิและลำตัว (ภาพที่ 12) บริเวณลำตัวเป็นส่วนที่ประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย (ภาพที่ 13) เมื่อนำมาทำการวัดขนาดอสูจิได้ผลดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของขนาดตัวอสูจิในน้ำเชื้อโลมาอิรวดี (n = 200) (mean ± SD)

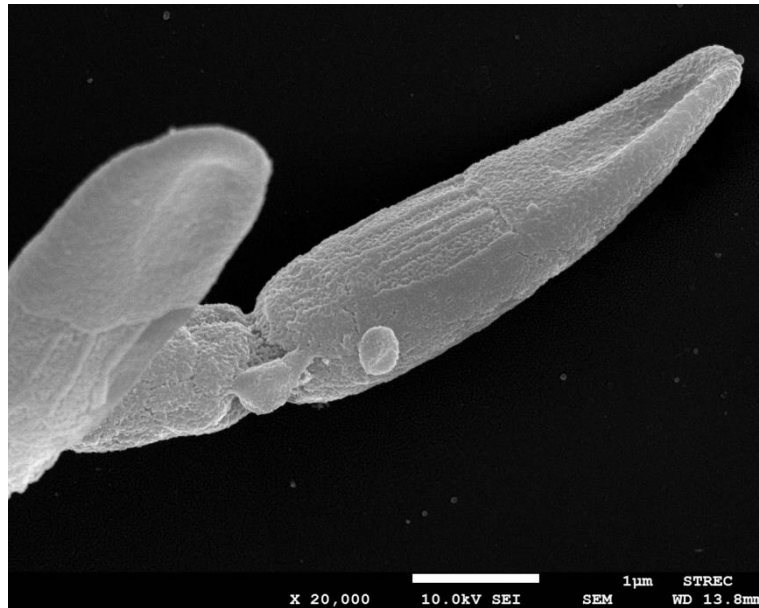
ความยาว	โลมาอิรวดี 1	โลมาอิรวดี 2	โลมาอิรวดี 3	เฉลี่ย
1. ความยาวหัว (ไมโครเมตร)	4.37±0.15	4.34±0.14	4.40±0.22	4.37±0.18
2. ความกว้างหัว (ไมโครเมตร)	1.61±0.13	1.61±0.15	1.62±0.14	1.61±0.14
3. อัตราส่วนความ กว้างต่อความยาว	0.37±0.03	0.37±0.03	0.37±0.02	0.37±0.03
4. ความยาวหัวถึงหาง (ไมโครเมตร)	59.86±3.45	60.46±3.64	59.99±3.31	60.10±3.45
5. ความยาวหาง (ไมโครเมตร)	55.49±3.43	56.12±3.68	55.59±3.24	55.73±3.44
6. เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนความยาว หัวต่อความยาวหัวถึง หาง	7.32±0.44	7.21±0.53	7.35±0.46	7.29±0.48
7. เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนความยาว หางต่อความยาวหัวถึง หาง	92.68±0.44	92.79±0.53	92.65±0.46	92.71±0.48



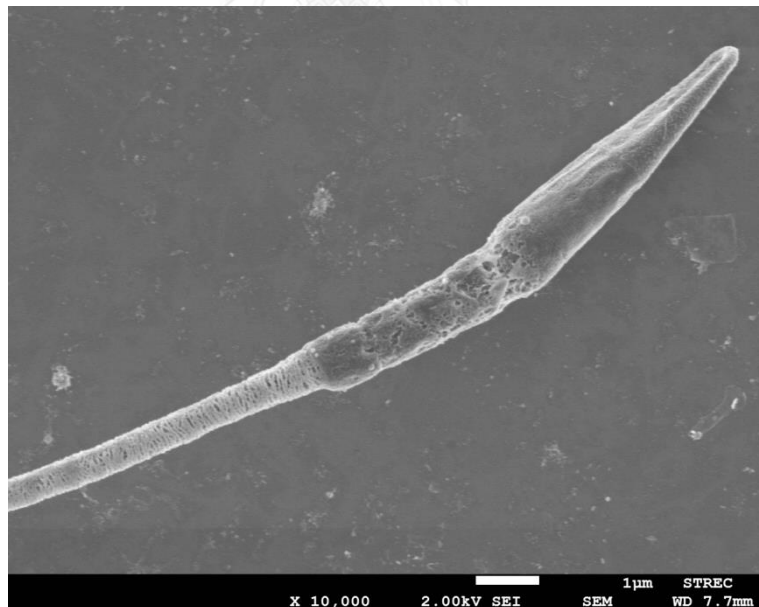
ภาพที่ 9 โครงสร้างลักษณะภายนอกของตัวอสุจิตั้งแต่หัวถึงหาง ของโลมาสายพันธุ์อิวรติ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดด้วยกำลังขยาย 2,300 เท่า



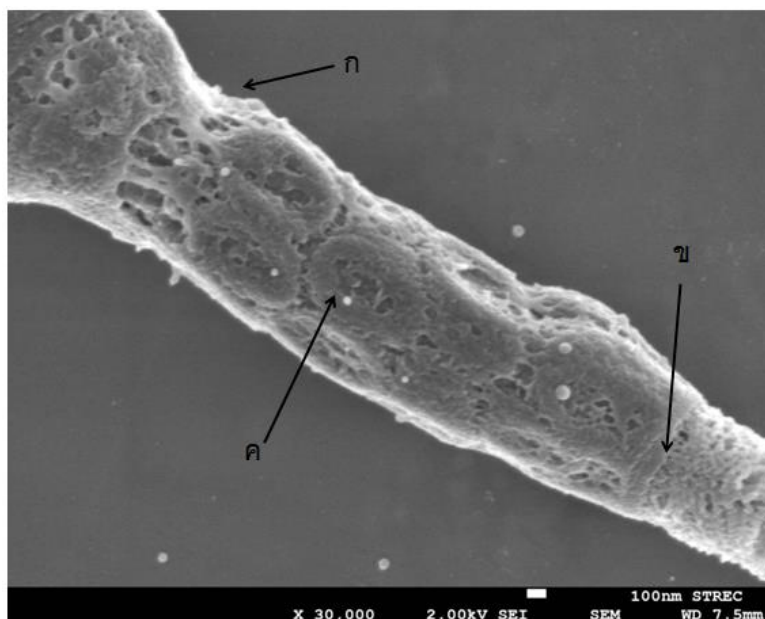
ภาพที่ 10 โครงสร้างลักษณะภายนอกของตัวอสุจิในส่วนของหัวที่เชื่อมต่อกับลำตัวแล้วต่อไปถึงส่วนของหางของโลมาสายพันธุ์อิวรติ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดด้วยกำลังขยาย 12,000 เท่า



ภาพที่ 11 โครงสร้างลักษณะภายนอกของตัวอสุจิในส่วนของหัวจากมุมมองด้านข้าง จะพบว่าส่วนหัวของอสุจิจะมีลักษณะเรียวแล้วค่อยๆหนาตัวไปทางด้านท้ายจนถึงรอยเว้าด้านท้ายที่ต่อกับลำตัว และยังเห็นรอยเว้าบริเวณด้านหน้าของส่วนหัว ของโลมาสายพันธุ์อิรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดด้วยกำลังขยาย 20,000 เท่า



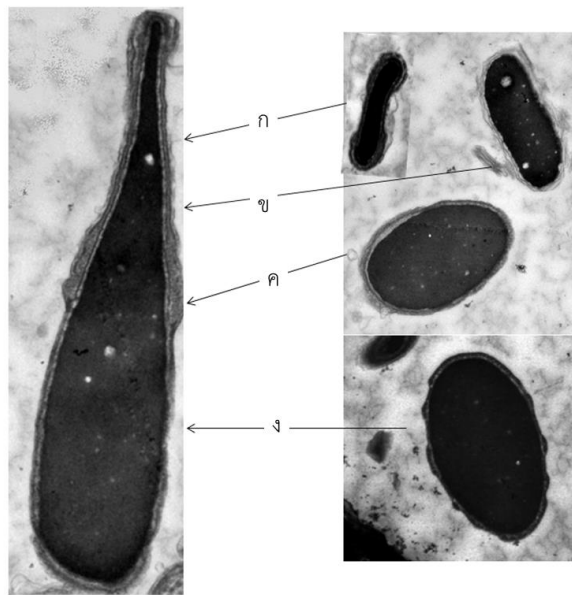
ภาพที่ 12 โครงสร้างลักษณะภายนอกของตัวอสุจิในส่วนของหัวจากมุมมองด้านข้าง จะพบว่าส่วนหัวของอสุจิจะมีลักษณะเรียวแล้วค่อยๆหนาตัวไปทางด้านท้ายจนถึงรอยเว้าด้านท้ายที่ต่อกับลำตัว และจุดที่เป็นรอยต่อระหว่างส่วนลำตัวกับส่วนหาง เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดด้วยกำลังขยาย 10,000 เท่า



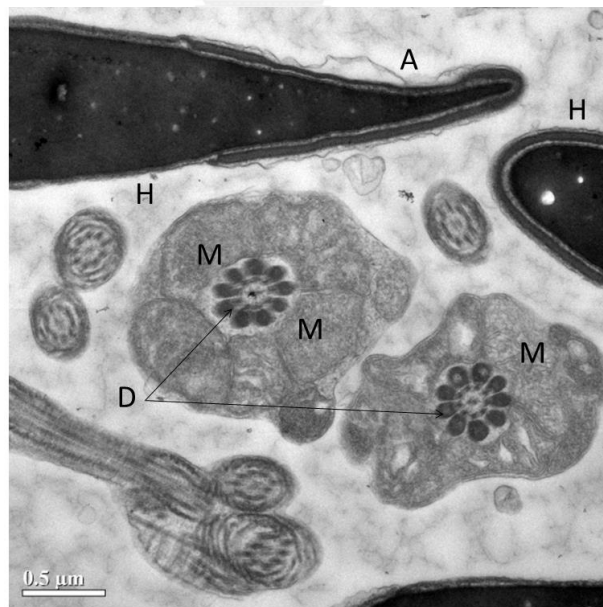
ภาพที่ 13 โครงสร้างลักษณะภายนอกของลำต้นอสุจิ บริเวณกลางภาพจะเป็นส่วนของลำต้นที่เป็นส่วนที่ประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย (ค) ซึ่งประกอบด้วยก้อนวงกลมในภาพ และเรายังเห็นจุดที่ต่อกับส่วนหัว (ก) และส่วนที่ต่อกับหาง (ข) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดด้วยกำลังขยาย 30,000 เท่า

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน โครงสร้างภายในของอสุจิโลมสาายพันธุ์อิวรติ เมื่อนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน พบว่าเมื่อตัดตามแนวยาวของตัวอสุจิ หัวของตัวอสุจิประกอบไปด้วยอะโครโซมและนิวเคลียส โดยอะโครโซมมีลักษณะบางและเรียบคลุมบริเวณนิวเคลียสด้านหน้าส่วนหนึ่งไว้ ส่วนของลำต้นมีไมโทคอนเดรียอยู่โดยมีตรงกลางของลำต้นเป็นเดนส์ไฟเบอร์ แล้วจะเห็นรอยต่อระหว่างส่วนของลำต้นและหาง แบ่งกันค่อนข้างชัดเจน (ภาพที่ 14,15,16 และ 18)

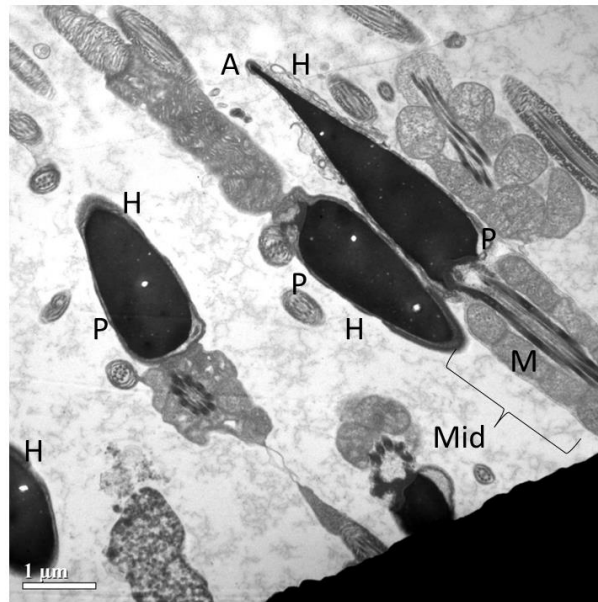
เมื่อนำตัวของตัวอสุจิมาตัดตามขวาง ส่วนหัวของอสุจิส่วนของอะโครโซม มีลักษณะที่บาง จะคลุมอยู่ด้านนอกของนิวเคลียส อยู่ก่อนมาทางด้านหน้าของหัวอสุจิ ส่วนของลำต้นของอสุจิเมื่อนำมาตัดตามขวางแล้วพบว่ามี ตรงกลางประกอบด้วยไมโครทิวบูลอยู่ตรงกลาง 2 คู่ล้อมรอบด้วยไมโครทิวบูลอีก 9 คู่ ส่วนรอบนอกล้อมรอบด้วยเดนส์ไฟเบอร์ถัดออกไปล้อมรอบด้วย ไมโทคอนเดรีย ส่วนของหางจะพบส่วนของเดนส์ไฟเบอร์ วางตัวอยู่รอบ เอ็กโซนิม เช่นเดียวกับที่พบในส่วนของลำต้นแต่จะไม่พบไมโทคอนเดรีย (ภาพที่ 15,16,17,18,19 และ 20)



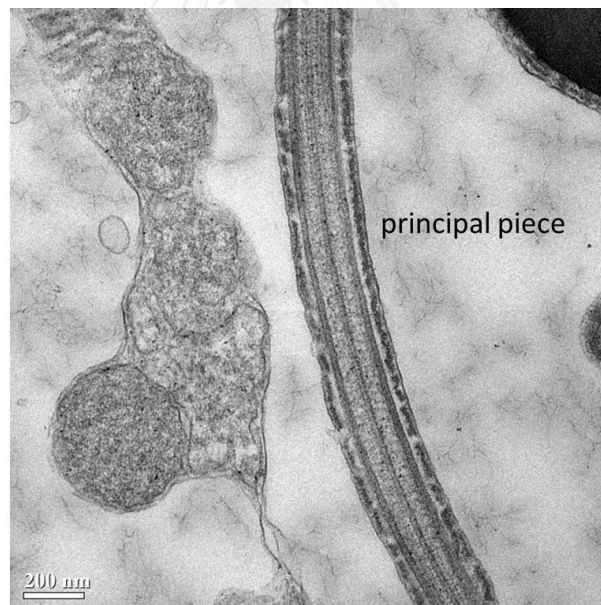
ภาพที่ 14 โครงสร้างภายในตัวของลูกระลอกไหมสายพันธุ์อิวรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน แสดงภาพหัวของลูกระลอกไหมที่ตัดขวางลำตัวในส่วนต่างๆ ลูกศร ก, ข และ ค เป็นส่วนด้านหน้าของหัวของลูกระลอกไหมจะเห็นว่ามีส่วนของอะโครโซม ติดอยู่ด้านนอกของนิวเคลียส ส่วนลูกศร ง จะเห็นว่ามีส่วนของผิวที่ล้อมรอบนิวเคลียสจะมีส่วนที่นูนขึ้นมา ซึ่งเราจะเห็นจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดเป็นแถบที่คาดตามแนวโค้งบนตัวของลูกระลอกไหม



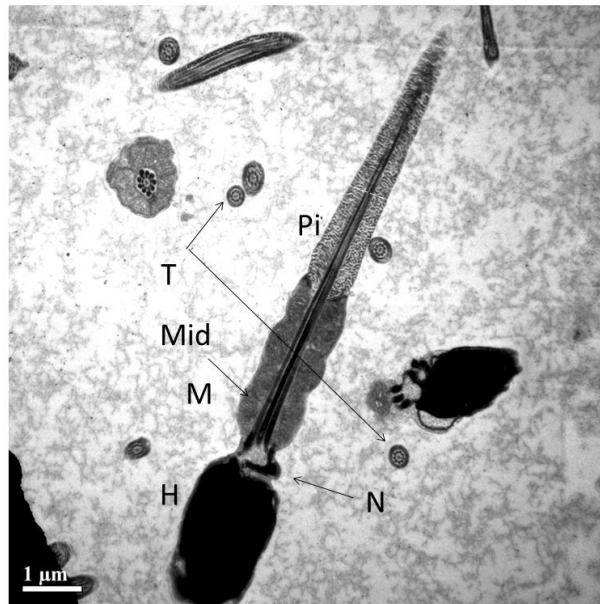
ภาพที่ 15 โครงสร้างภายในตัวของลูกระลอกไหมสายพันธุ์อิวรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน A = อะโครโซม, M = ไมโทคอนเดรีย, D = dense fiber, H = หัว



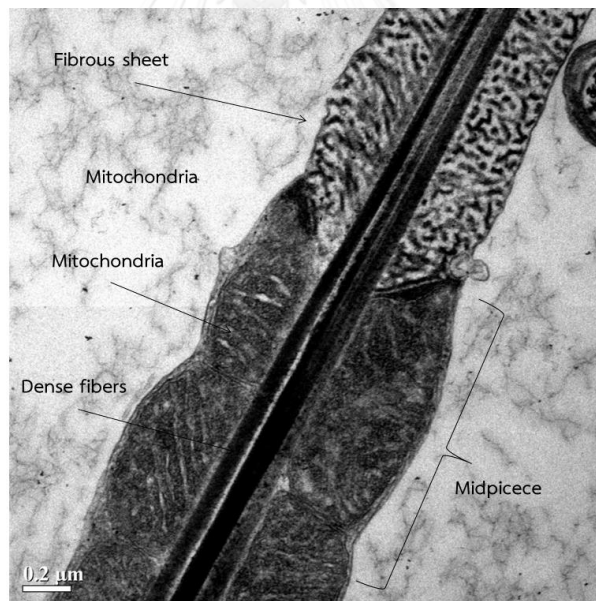
ภาพที่ 16 โครงสร้างภายในตัวอสุจิของโลมาสายพันธุ์อิวรติ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดส่องผ่าน A = อะโครโซม, M = ไมโทคอนเดรีย, D = dense fiber, H = หัว, Mid = ลำตัว, P = postacrosome



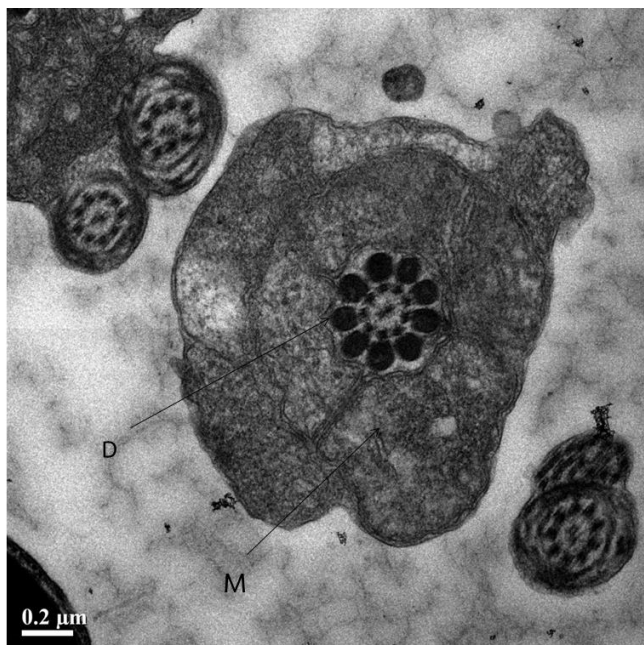
ภาพที่ 17 โครงสร้างภายในตัวอสุจิของโลมาสายพันธุ์อิวรติ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดส่องผ่าน แสดงลักษณะภาพตัดขวางของหาง (principal piece) ของตัวอสุจิ



ภาพที่ 18 โครงสร้างภายในตัวของสุจิของโลมาสายพันธุ์อิวรเวตี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดส่องผ่าน N = neck, Pi = principle piece, M = ไมโทคอนเดรีย, Mid = ลำตัว, T = terminal piece



ภาพที่ 19 โครงสร้างภายในตัวของสุจิของโลมาสายพันธุ์อิวรเวตี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ชนิดส่องผ่าน แสดงภาพตัดขวางของตัวสุจิ ในส่วนของลำตัวกับส่วนของหาง

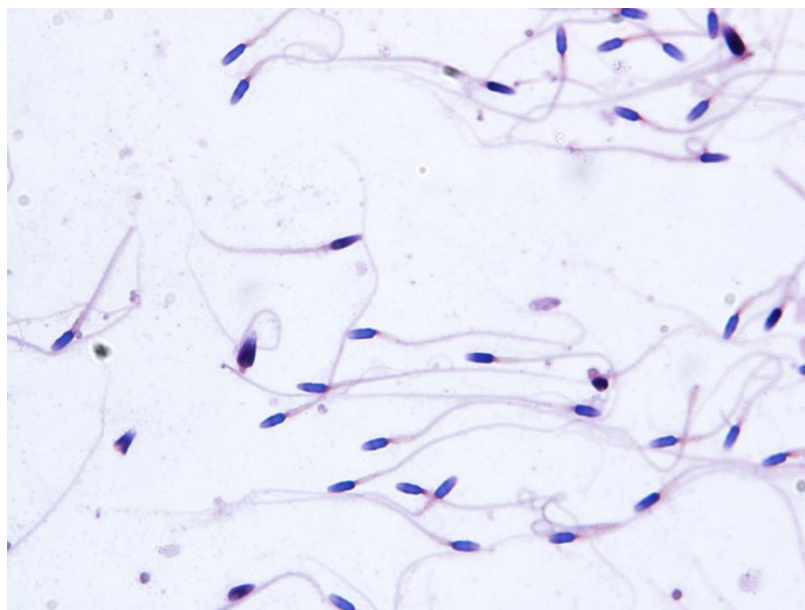


ภาพที่ 20 โครงสร้างภายในตัวอสุจิของโลมาสายพันธุ์อิรวดี เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน แสดงภาพตัดขวางของลำตัวอสุจิ ที่ประกอบด้วย D = dense fiber ที่ล้อมรอบด้วย ส่วนของ M = ไมโทคอนเดรีย

4.2 ย้อมอสุจิด้วยสีปานิโคลัว วิธีซอร์ ดิฟฟ์ควิก อีโอซิน โทลูอิดีนบลู วิลเลียม และอีโอซินนิโกรซิน

4.2.1 สีปานิโคลัว

อสุจิที่ย้อมด้วยปานิโคลัว แสดงให้เห็นว่าบริเวณส่วนของอะโครโซมจะติดสีฟ้าจางๆ ส่วนของอะโครโซมส่วนท้ายจะติดสีน้ำเงินเข้ม ส่วนลำตัวจะติดสีแดง และหางแดงจางๆ สามารถเห็นลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอสุจิได้ชัดเจน (ภาพที่ 21) เมื่อนำมาหาความผิดปกติของตัวอสุจิได้ผลแสดงในตารางที่ 4



ภาพที่ 21 แสดงลักษณะการติดสีของตัวอสุจิเมื่อย้อมด้วยสีปาปานิโคลัว ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิที่ตรวจได้เมื่อย้อมด้วยสีปาปานิโคลัว (n = 6) (mean±SD)

ความผิดปกติของตัวอสุจิ	โลมาอรรตี่1	โลมาอรรตี่2	โลมาอรรตี่3
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของอสุจิ	5.50±2.07	13.33±2.73	2.97±0.90
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หัว	2.17±0.75	4.00±1.79	1.10±0.47
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่คอกับลำตัว	1.13±0.24	3.00±1.55	1.07±0.53
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หาง	2.33±1.37	6.33±1.86	0.80±0.54

4.2.2 การย้อมด้วยวิธีชอร์

อสุจิที่ย้อมด้วยวิธีชอร์ แสดงให้เห็นว่าบริเวณส่วนของอะโครโซมจะติดสีฟ้าจางๆ ส่วนของอะโครโซมส่วนท้ายจะติดสีน้ำเงินเข้ม ส่วนลำตัวจะติดสีแดง และหางติดสีน้ำเงินหรือแดงจางๆ สามารถเห็นลักษณะสัญญาณวิทยาของตัวอสุจิได้ชัดเจน (ภาพที่ 22) เมื่อนำมาหาความผิดปกติของตัวอสุจิได้ผลแสดงในตารางที่ 5



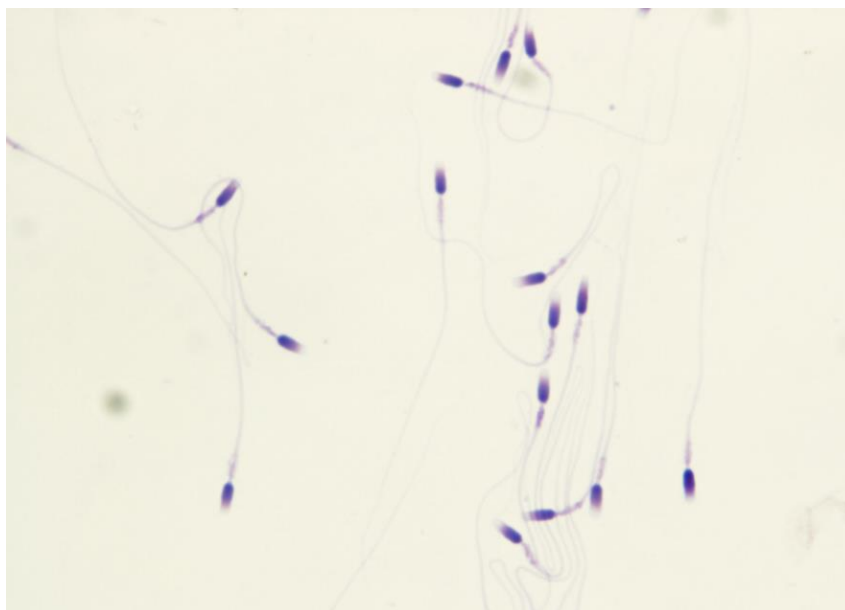
ภาพที่ 22 แสดงลักษณะการติดสีของตัวอสุจิเมื่อย้อมด้วยวิธีของซอร์ ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิที่ตรวจได้เมื่อย้อมด้วยวิธีของซอร์ (n = 6) (mean±SD)

ความผิดปกติของตัวอสุจิ	โลมาอีรวดี1	โลมาอีรวดี2	โลมาอีรวดี3
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของอสุจิ	6.67±3.33	13.83±5.18	2.33±1.97
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หัว	2.50±1.05	2.10±1.54	0.33±0.52
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่คอกับลำตัว	1.67±1.21	5.97±3.41	0.67±0.52
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หาง	2.50±2.35	5.43±2.88	1.33±1.37

4.2.3 การย้อมสีด้วยวิธีตีฟฟ์ควิก

อสุจิที่ย้อมด้วยตีฟฟ์ควิก แสดงให้เห็นว่าบริเวณส่วนของอะโครโซม จะติดสีม่วงจางๆ ส่วนอะโครโซมส่วนท้าย ส่วนลำตัวและหาง จะติดสีม่วง (ภาพที่ 23) เมื่อนำมาหาความผิดปกติของตัวอสุจิได้ผลแสดงในตารางที่ 6



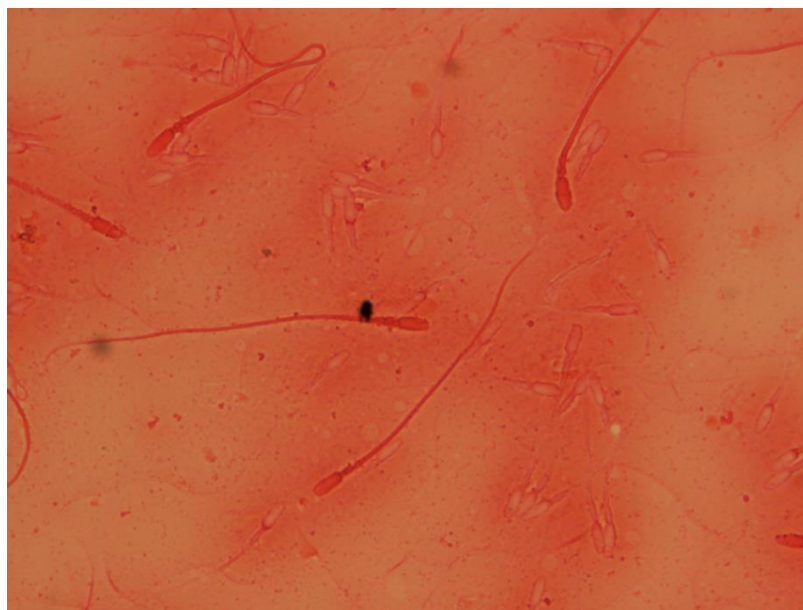
ภาพที่ 23 แสดงลักษณะการติดสีของตัวอสุจิเมื่อย้อมด้วยสตีฟโควิก ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 6 เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิที่ตรวจได้เมื่อย้อมด้วยสตีฟโควิก (n = 6) (mean±SD)

ความผิดปกติของตัวอสุจิ	โลมาอีรวดี1	โลมาอีรวดี2	โลมาอีรวดี3
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของอสุจิ	10.17± 2.32	15.23±6.32	4.67±1.97
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หัว	1.83±0.41	3.97±0.64	1.33±1.37
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่คอกับลำตัว	1.33±0.52	3.63±0.80	1.17±0.75
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หาง	7.00±2.28	7.80±5.87	2.17±1.47

4.2.4 วิธีการย้อมสีอีโอซิน

อสุจิที่ย้อมด้วยอีโอซิน สามารถใช้บอกถึงความมีชีวิตของอสุจิ โดยดูจากความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอยู่ของเซลล์ อสุจิที่ตายหัวจะติดสีแดงหรือชมพูเข้มจากในภาพที่ 24 จะพบว่าติดสีแดงทั้งตัว ส่วนตัวอสุจิที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี การสังเกตลักษณะสัญญาณวิทยาของตัวอสุจิได้ไม่ชัดเจน เมื่อนำมาหาจำนวนตัวเป็นตัวตายของอสุจิได้ผลแสดงในตารางที่ 7



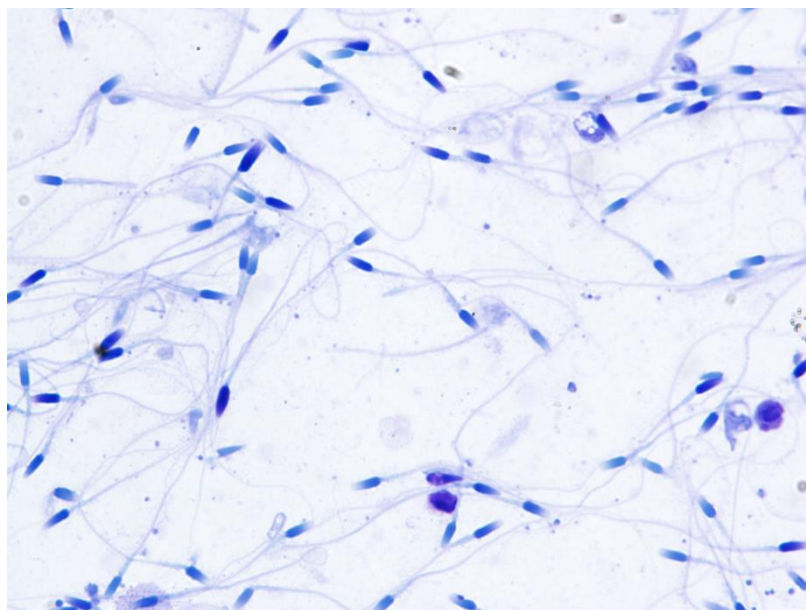
ภาพที่ 24 แสดงลักษณะการติดสีของตัวอสุจิเมื่อย้อมด้วยสีไอโอดีน ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 7 การนับจำนวนตัวเป็นตัวตายของอสุจิด้วยสีย้อมอีไอโอดีน (n = 6) (mean±SD)

โลมา	ตัวตาย (%)	ตัวเป็น (%)
โลมาอิรวดี1	9.57±1.95	90.43±1.95
โลมาอิรวดี2	19.13±7.94	80.87±7.94
โลมาอิรวดี3	3.67±1.03	96.33±1.03
เฉลี่ย	10.79±7.94	89.21±7.94

4.1.5 วิธีการย้อมสีโทลูอิดีนบลู

อสุจิที่ย้อมด้วยสีโทลูอิดีนบลู สามารถใช้บอกถึงความเสียหายของตัวอสุจิที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอ อสุจิที่เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอ หัวจะติดสีน้ำเงินเข้มหรือม่วงเข้ม ส่วนตัวที่ปกติจะพบว่าส่วนอะโครโซมส่วนท้ายจะติดสีน้ำเงิน บริเวณส่วนของอะโครโซม จะติดสีฟ้าจางๆ การสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาของตัวอสุจิได้ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 25) เมื่อนำมาหาความผิดปกติที่เกิดกับดีเอ็นเอได้ผลแสดงในตารางที่ 8



ภาพที่ 25 แสดงลักษณะการติดสีของตัวอสุจิเมื่อย้อมด้วยสีโทลูอิดีนบลู ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 8 ความผิดปกติของโครมาติน (Nuclear chromatin(%)) (n = 6) (mean±SD)

โลมา	เปอร์เซ็นต์ปกติ	เปอร์เซ็นต์ผิดปกติ
โลมาอิรวดี1	97.47±0.90	2.53±0.90
โลมาอิรวดี2	89.49±3.29	10.51±3.29
โลมาอิรวดี3	98.33±0.52	1.67±0.52

4.1.6 การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีวิลเลียม

อสุจิที่ย้อมด้วยวิลเลียม แสดงให้เห็นว่าบริเวณส่วนของอะโครโซมจะติดสีชมพูจางๆ ส่วนของอะโครโซมส่วนท้ายจะติดสีชมพูหรือแดง ส่วนลำตัวจะติดสีแดงเข้ม และหางติดสีแดง สามารถเห็นลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอสุจิได้ชัดเจน (ภาพที่ 26) เมื่อนำมาหาความผิดปกติของตัวอสุจิได้ผลแสดงในตารางที่ 9



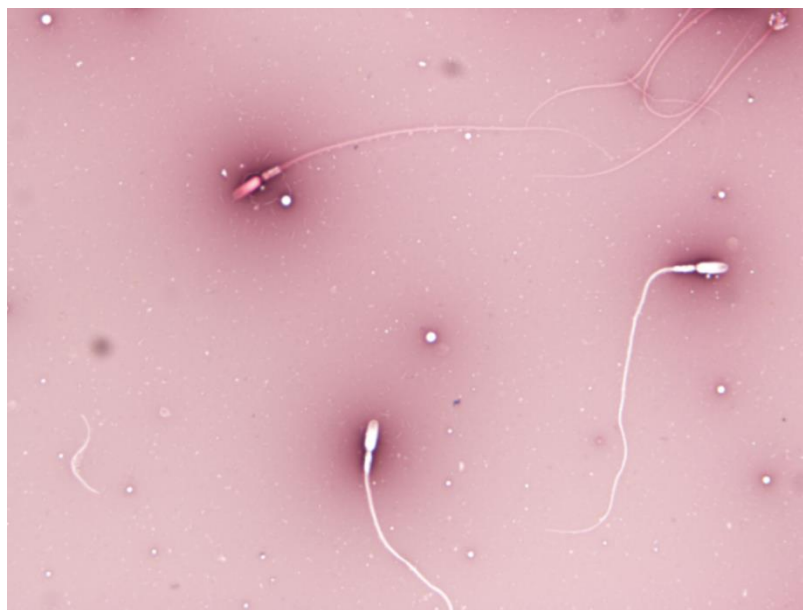
ภาพที่ 26 แสดงลักษณะการติดสีของตัวอสุจิเมื่อย้อมด้วยสีวิลเลียม ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิที่ตรวจได้เมื่อย้อมด้วยสีวิลเลียม (n = 6) (mean±SD)

ความผิดปกติของตัวอสุจิ	โลมาอีรวดี1	โลมาอีรวดี2	โลมาอีรวดี3
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของอสุจิ	2.50±1.87	8.37±2.84	3.57±1.92
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หัว	0.67±0.52	2.07±0.72	1.00±0.63
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่คอกับลำตัว	1.17±1.17	2.10±0.70	1.07±0.64
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หาง	0.67±0.52	4.20±2.30	1.50±0.84

4.1.7 การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีอีโอซินนิโกรซิน

อสุจิที่ย้อมด้วยอีโอซินนิโกรซิน สามารถใช้บอกถึงอสุจิมิชีวิต โดยดูจากความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอยู่ ของเซลล์ อสุจิที่ตายหัวจะติดสีแดงหรือชมพูเข้มจากในภาพที่ 27 ส่วนตัวอสุจิที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี การสังเกตลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอสุจิได้ไม่ชัดเจน เมื่อนำมาหาจำนวนตัวเป็นตัวตายของอสุจิได้ผลแสดงในตารางที่ 10



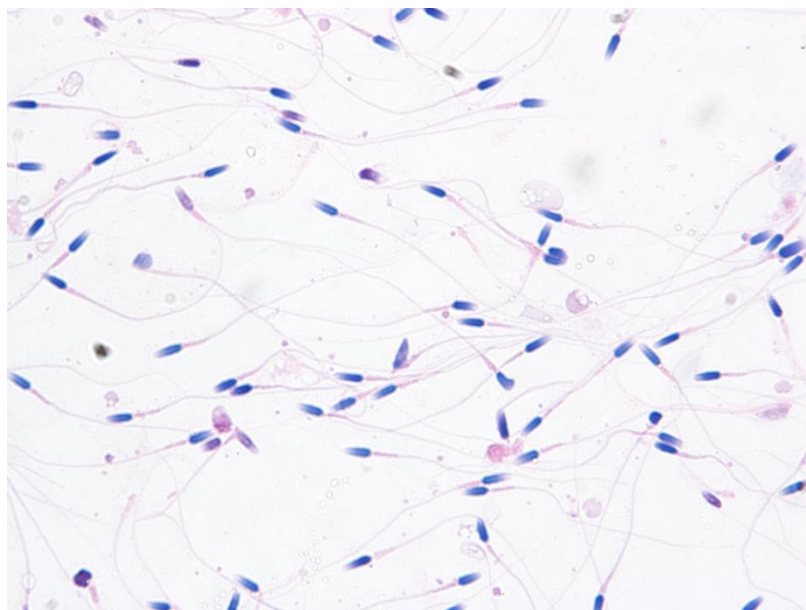
ภาพที่ 27 แสดงลักษณะการติดสีของตัวอสุจิเมื่อย้อมด้วยอีโอซินนิโกรซิน ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 10 นับจำนวนตัวเป็นตัวตายของอสุจิด้วยสีย้อมอีโอซินนิโกรซิน (n = 6) (mean±SD)

โลมา	ตัวตาย (%)	ตัวเป็น (%)
โลมาอิรวดี1	2.87±0.55	97.13±0.55
โลมาอิรวดี2	14.03±6.77	85.97±6.77
โลมาอิรวดี3	1.23±1.13	98.77±1.13
เฉลี่ย	6.04±6.94	93.96±6.94

4.1.8 การย้อมตัวอสุจิด้วยวิธีสีมาท็อกซิลินอีโอซิน

อสุจิที่ย้อมด้วยสีมาท็อกซิลินอีโอซิน แสดงให้เห็นว่าบริเวณส่วนของอะโครโซมจะติดสีม่วงหรือฟ้าจางๆ ส่วนอะโครโซมส่วนท้ายจะติดสีน้ำเงินหรือม่วงเข้ม ส่วนลำตัวจะติดชมพูหรือสีแดง และหางติดสีชมพูหรือแดง สามารถเห็นลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอสุจิได้ชัดเจน (ภาพที่ 28) เมื่อนำมาหาความผิดปกติของตัวอสุจิได้ผลแสดงในตารางที่ 11



ภาพที่ 28 แสดงลักษณะการติดสีของตัวอสุจิเมื่อย้อมด้วยสีมาทอซิลินอีโอซิน ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 11 เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิที่ตรวจได้เมื่อย้อมด้วยสีมาทอซิลินอีโอซิน (n = 6) (mean±SD)

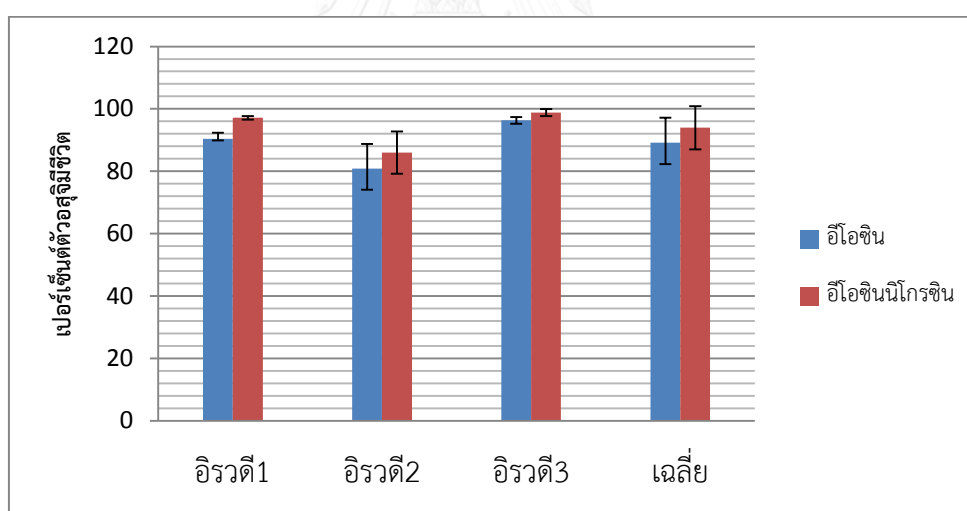
ความผิดปกติของตัวอสุจิ	โลมาอีรวดี1	โลมาอีรวดี2	โลมาอีรวดี3
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของอสุจิ	7.40±5.27	13.33±6.62	8.83±4.40
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หัว	2.73±1.90	3.33±2.66	2.20±1.81
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่คอกับลำตัว	1.53±0.82	3.83±2.32	2.53±1.53
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หาง	3.13±2.58	6.17±2.79	4.10±1.84

จากตารางที่ 12 เปรียบเทียบจำนวนตัวเป็นตัวของอสุจิที่ได้ทำการศึกษาจากโลมาทั้ง 3 ตัวทำการหาจำนวนอสุจิมิชีวิต โดยการย้อมสี 2 ชนิดคือ สีอีโอซิน และสีอีโอซินนิโกรซิน พบว่าจำนวนตัวเป็นที่วัดได้จากสีอีโอซินนิโกรซิน พบจำนวนตัวเป็นมากกว่า สีอีโอซิน และสีอีโอซิน จะพบจำนวนตัวตายของตัวอสุจิมากกว่า สีอีโอซินนิโกรซิน ดังที่แสดงในภาพที่ 29 เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์พบว่าโลมาอีรวดีตัวที่ 1 และ 3 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ส่วนโลมาตัวที่ 2 ตรวจพบจำนวนอสุจิมิชีวิตไม่แตกต่างกัน และค่าเฉลี่ยของโลมาทั้ง 3 ตัว ตรวจพบจำนวนอสุจิมิชีวิตไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 12 เปรียบเทียบการตรวจเปอร์เซ็นต์ตัวเป็นตัวของตัวสุจิระหว่างสีย้อมอีโอซินและสีย้อมไอซินนิโกรซิน (n = 6) (mean±SD)

โลมา	สีย้อม	ตัวเป็น
อรวดี1	อีโอซิน	90.43±1.95 ^a
	อีไอซินนิโกรซิน	97.13±0.55 ^b
อรวดี2	อีโอซิน	80.87±7.94 ^a
	อีไอซินนิโกรซิน	85.97±6.77 ^a
อรวดี3	อีโอซิน	96.33±1.03 ^a
	อีไอซินนิโกรซิน	98.77±1.13 ^b
เฉลี่ย	อีโอซิน	89.21±7.94 ^a
	อีไอซินนิโกรซิน	93.96±6.94 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)



ภาพที่ 29 แสดงเปอร์เซ็นต์จำนวนอสุจิมี่ชีวิตเปรียบเทียบระหว่างวิธีย้อมด้วยสีย้อมอีโอซินและอีไอซินนิโกรซิน (n = 6)

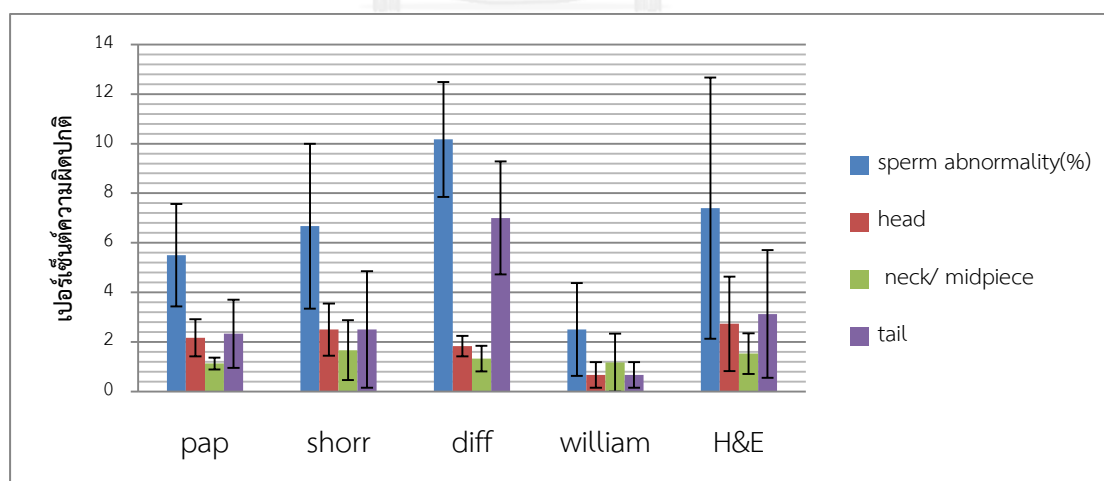
จากตารางที่ 13 และภาพที่ 30 แสดงเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ผิดปกติที่วัดจากโลมาตัวที่ 1 พบว่า ในโลมาตัวที่ 1 เปอร์เซ็นต์ตัวที่ผิดปกติรวมของสีย้อมอีโอซินและสีย้อมอีไอซินนิโกรซินได้จำนวนตัวผิดปกติที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ความผิดปกติที่ส่วน หัว พบว่าสิวิลเลียม มีความแตกต่างกับสีย้อมอีไอซินนิโกรซิน, ซอร์ และสีย้อมอีไอซินนิโกรซิน อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ส่วน

ความผิดปกติที่คอและลำตัวผลที่ได้จากสีย้อมทั้ง 5 สี ไม่มีความแตกต่างกัน และความผิดปกติที่ส่วนหาง พบว่าสีดีฟฟ์ควิก มีเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติแตกต่างกับสีอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 13 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิระหว่างสีปาปานีโคลัว ซอร์ ดีฟฟ์ควิก วิลเลียม และอีมาท็อกซิลินอีโอซิน ของโลมาอิรวดี 1 ($n = 6$) (mean \pm SD)

ความผิดปกติของ ตัวอสุจิ	ปาปานีโคลัว ($n = 6$)	ซอร์ ($n = 6$)	ดีฟฟ์ควิก ($n = 6$)	วิลเลียม ($n = 6$)	อีมาท็อกซิลิน อีโอซิน ($n = 6$)
เปอร์เซ็นต์ความ ผิดปกติของอสุจิ	5.5 \pm 2.07 ^{ab}	6.67 \pm 3.33 ^{bc}	10.17 \pm 2.32 ^c	2.5 \pm 1.87 ^a	7.4 \pm 5.27 ^{bc}
เปอร์เซ็นต์ความ ผิดปกติที่หัว	2.17 \pm 0.75 ^b	1.83 \pm 1.05 ^b	1.83 \pm 0.41 ^{ab}	0.67 \pm 0.52 ^a	2.73 \pm 1.9 ^b
เปอร์เซ็นต์ความ ผิดปกติที่คอกับลำตัว	1.13 \pm 0.24 ^a	1.67 \pm 1.21 ^a	1.33 \pm 0.52 ^a	1.17 \pm 1.17 ^a	1.53 \pm 0.82 ^a
เปอร์เซ็นต์ความ ผิดปกติที่หาง	2.33 \pm 1.37 ^{ab}	2.5 \pm 2.35 ^{ab}	7 \pm 2.28 ^c	0.67 \pm 0.52 ^a	3.13 \pm 2.58 ^b

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



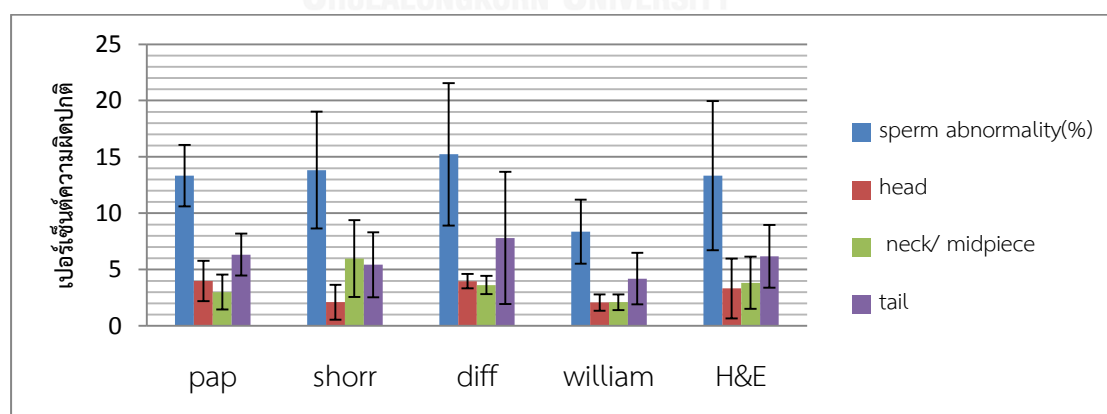
ภาพที่ 30 แสดงความผิดปกติของอสุจิ (head = ความผิดปกติที่หัวอสุจิ, neck/midpiece = ความผิดปกติที่คอหรือลำตัว, tail = ความผิดปกติที่หาง) จากโลมาอิรวดี 1 ที่วัดได้จากการย้อมสีต่างๆ (pap = สีปาปานีโคลัว, shorr = สีซอร์, diff = สีดีฟฟ์ควิก, William = สีวิลเลียม, H&E = สีอีมาท็อกซิลินอีโอซิน)

จากตารางที่ 14 และภาพที่ 31 แสดงเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ผิดปกติที่วัดจากโลมาตัวที่ 2 พบว่า ในโลมาตัวที่ 2 เปอร์เซนต์ตัวอสุจิที่ผิดปกติรวม ที่วัดได้จากสตีฟควิกมีความแตกต่างกับเปอร์เซนต์ ความผิดปกติที่วัดได้จากสีอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และความผิดปกติที่ส่วนหัวและหาง ทุกสี ไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนคอและลำตัวสีซอร์มีเปอร์เซนต์ความผิดปกติแตกต่างกับสีวิลเลียมและสี ปาปานีโคลัวอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบเปอร์เซนต์ความผิดปกติของตัวอสุจิระหว่างสีปาปานีโคลัว ซอร์ ดิฟฟ์ควิก วิลเลียม และสีมาท็อกซิลินอีโอซิน ของโลมาอิรวดี 2 ($n = 6$) (mean \pm SD)

ความผิดปกติของตัวอสุจิ	ปาปานีโคลัว	ซอร์	ดิฟฟ์ควิก	วิลเลียม	สีมาท็อกซิลินอีโอซิน
เปอร์เซนต์ความผิดปกติของอสุจิ	13.33 \pm 2.73 ^{ab}	13.83 \pm 5.18 ^{ab}	15.23 \pm 6.32 ^b	8.37 \pm 2.84 ^a	13.33 \pm 6.62 ^{ab}
เปอร์เซนต์ความผิดปกติที่หัว	4 \pm 1.79 ^a	2.1 \pm 1.54 ^a	3.97 \pm 0.64 ^a	2.07 \pm 0.72 ^a	3.33 \pm 2.66 ^a
เปอร์เซนต์ความผิดปกติที่คอกับลำตัว	3 \pm 1.55 ^a	5.97 \pm 3.41 ^b	3.63 \pm 0.8 ^{ab}	2.1 \pm 0.7 ^a	3.83 \pm 2.32 ^{ab}
เปอร์เซนต์ความผิดปกติที่หาง	6.33 \pm 1.86 ^a	5.43 \pm 2.88 ^a	7.8 \pm 5.87 ^a	4.2 \pm 2.3 ^a	6.17 \pm 2.79 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 31 แสดงความผิดปกติของอสุจิ (head = ความผิดปกติที่หัวอสุจิ , neck/midpiece = ความผิดปกติที่คอหรือลำตัว , tail = ความผิดปกติที่หาง) จากโลมาอิรวดี 2 ที่วัดได้จากการย้อมสีต่างๆ

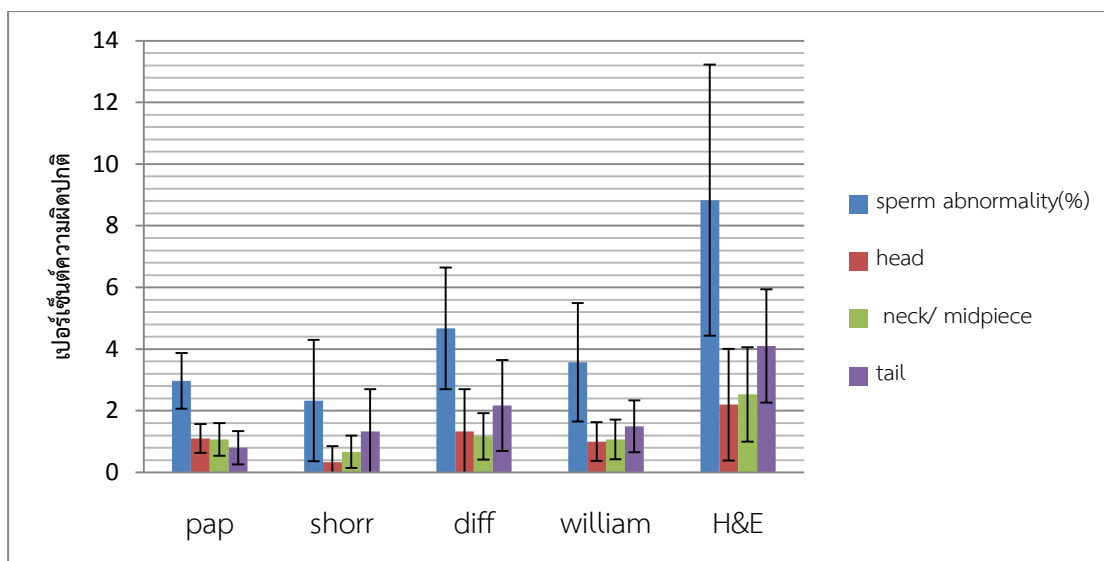
(pap = สีปาปานีโคลัว, shorr = สีชอร์, diff = สีดิฟฟ์ควิก, William = สีวิลเลียม, H&E = สีฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน) (n = 6)

จากตารางที่ 15 และภาพที่ 32 แสดงเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ผิดปกติที่วัดจากโลมาตัวที่ 3 พบว่า ในโลมาตัวที่ 3 มีเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ผิดปกติรวม ความผิดปกติที่คอ ลำตัว และความผิดปกติที่ส่วนหาง พบว่าสีฮีมาท็อกซิลินอีโอซินย่อมพบจำนวนตัวอสุจิผิดปกติมากที่สุดและมีความแตกต่างกับสีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 32) ส่วนความผิดปกติที่ส่วนหัวจะมีเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่ส่วนหัว แตกต่างกับสีชอร์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 15 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิระหว่างสีปาปานีโคลัว ชอร์ ดิฟฟ์ควิก วิลเลียม และฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน ของโลมาอิรวดี 3 (n = 6) (mean±SD)

ความผิดปกติของตัวอสุจิ	ปาปานีโคลัว	ชอร์	ดิฟฟ์ควิก	วิลเลียม	ฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของอสุจิ	2.97±0.9 ^a	2.33±1.97 ^a	4.67±1.97 ^a	3.57±1.92 ^a	8.83±4.4 ^b
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หัว	1.1±0.47 ^{ab}	0.33±0.52 ^a	1.33±1.37 ^{ab}	1±0.63 ^{ab}	2.2±1.81 ^b
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่คอกับลำตัว	1.07±0.53 ^a	0.67±0.52 ^a	1.17±0.75 ^a	1.07±0.64 ^a	2.53±1.53 ^b
เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หาง	0.8±0.54 ^a	1.33±1.37 ^a	2.17±1.47 ^a	1.5±0.84 ^a	4.1±1.84 ^a

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)



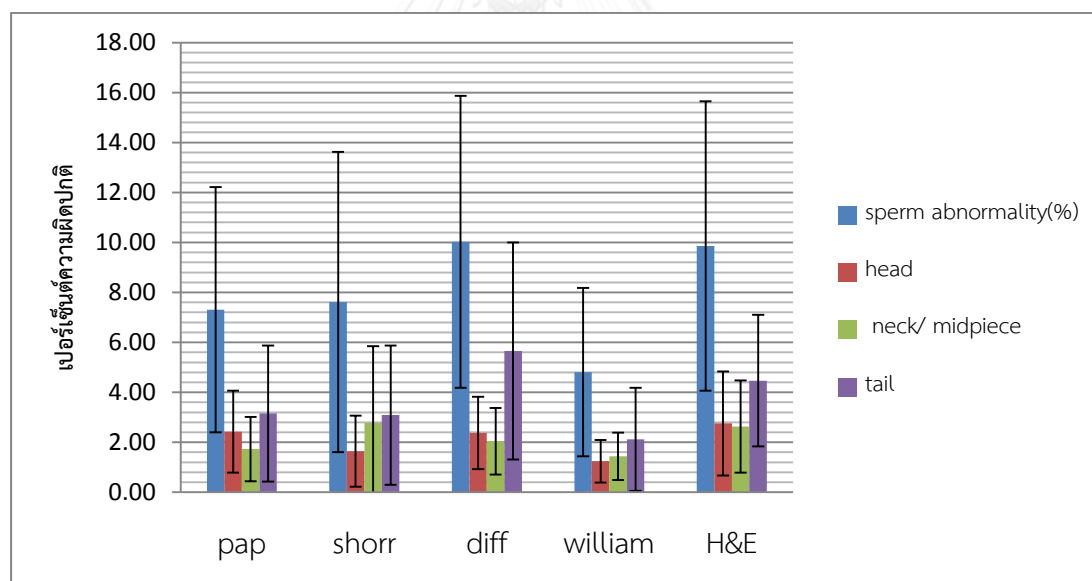
ภาพที่ 32 แสดงความผิดปกติของอสุจิ (head = ความผิดปกติที่หัวอสุจิ , neck/midpiece = ความผิดปกติที่คอหรือลำตัว , tail = ความผิดปกติที่หาง)จากโลมาอิวรวติ 3 ที่วัดได้จากการย้อมสีต่างๆ (pap = สีปานิโคลัว, shorr = สีชอร์, diff = สีดิฟฟ์ควิก, William = สีวิลเลียม, H&E = สีฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน) (n = 6)

จากตารางที่ 16 และภาพที่ 33 แสดงเปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ผิดปกติที่ตรวจจากโลมาตัวทั้ง 3 ตัวพบว่า เปอร์เซ็นต์ตัวอสุจิที่ผิดปกติรวมที่วัดได้จากสีวิลเลียม มีความแตกต่างกับสีฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน และสีดิฟฟ์ควิก อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่หัว วิลเลียมมีความผิดปกติแตกต่างกับสีฮีมาท็อกซิลินอีโอซินอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่คอและลำตัว วิลเลียมมีเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติแตกต่างกับสีชอร์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติที่ส่วนหาง พบว่าสีวิลเลียมมีเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติแตกต่างกับสีดิฟฟ์ควิกอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 16 เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ความผิดปกติของตัวอสุจิระหว่างสีปานิโคลัว ซอร์ ดิฟฟ์ควิก วิลเลียม และฮีมาทอกซิลินอีโอซิน ของโลมาอิรวดีทั้ง 3 ตัวเฉลี่ยกัน (n = 6) (mean±SD)

ความผิดปกติของ ตัวอสุจิ	ปานิโคลัว	ซอร์	ดิฟฟ์ควิก	วิลเลียม	ฮีมาทอกซิลิน อีโอซิน
เปอร์เซ็นต์ความ ผิดปกติของอสุจิ	7.26±4.91 ^{ab}	7.61±6.01 ^{ab}	10.02±5.85 ^b	4.81±3.37 ^a	9.86±5.79 ^b
เปอร์เซ็นต์ความ ผิดปกติที่หัว	2.42±1.64 ^{bc}	1.64±1.43 ^{ab}	2.38±1.45 ^{bc}	1.24±0.85 ^a	2.76±2.08 ^c
เปอร์เซ็นต์ความ ผิดปกติที่คอกับลำตัว	1.73±1.29 ^{ab}	2.77±3.09 ^b	2.04±1.33 ^{ab}	1.44±0.95 ^a	2.63±1.84 ^{ab}
เปอร์เซ็นต์ความ ผิดปกติที่หาง	3.16±2.72 ^{ab}	3.09±2.79 ^{ab}	5.66±4.34 ^c	2.12±2.06 ^a	4.47±2.63 ^{bc}

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวนอนเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)



ภาพที่ 33 แสดงความผิดปกติของอสุจิ (head = ความผิดปกติที่หัวอสุจิ , neck/midpiece = ความผิดปกติที่คอหรือลำตัว , tail = ความผิดปกติที่หาง) จากโลมาอิรวดีทั้ง 3 ตัวรวมกัน ที่วัดได้จากการย้อมสีต่างๆ (pap = สีปานิโคลัว , shorr = สีซอร์ , diff = สีดิฟฟ์ควิก , William = สีวิลเลียม , H&E = สีฮีมาทอกซิลินอีโอซิน) (n = 6)

จากตารางที่ 17 เปรียบเทียบความยาวของหัวสุจิโลมาอิรวดี 1 จาก 7 สีย้อมเปรียบเทียบ กับผลจากการวัดขนาดจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ได้แก่ สีย้อมดิฟฟ์ควิก ปาปานีโคลัว ซอร์ วิลเลียม ฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน โทลูอิดีนบลู และอีโอซิน พบว่าส่วนของความยาวหัว ทั้ง 7 สีย้อมมีความยาวแตกต่างกันกับ SEM ทุกสีย้อมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ความกว้างหัว ไม่มีความยาวแตกต่างกันกับสีย้อมดิฟฟ์ควิก ปาปานีโคลัว ฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน โทลูอิดีนบลู และอีโอซิน อัตราส่วนความกว้างหัวต่อความยาวไม่มีความแตกต่างกันกับสีย้อมวิลเลียม ปาปานีโคลัว และซอร์ ความยาว หัวถึงหางและความยาวหางมีความยาวต่างกับความยาวที่วัดได้จากสีย้อมดิฟฟ์ควิก ปาปานีโคลัว วิลเลียม ฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน โทลูอิดีนบลู และอีโอซิน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวหัวถึงหาง มีความแตกต่างกันกับทุกสีย้อมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และเปอร์เซ็นต์อัตราส่วนความยาวหางต่อความยาวหัวถึงหางไม่มีความแตกต่างกันกับสีย้อมดิฟฟ์ควิก และ สีย้อมวิลเลียม (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 17 สรุปรวมค่าเฉลี่ยของขนาดตัวสุจิที่ได้จากการย้อมสีแล้วทำการวัดขนาด ในโลมาอิรวดี ทั้ง 3 ตัว (mean±SD)

	ความยาวหัว (ไมโครเมตร)	ความกว้างหัว (ไมโครเมตร)	อัตราส่วน ความกว้างต่อ ความยาว	ความยาวหัว ถึงหาง (ไมโครเมตร)	ความยาวหาง (ไมโครเมตร)	เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน หัวต่อความ ยาวหัวถึงหาง	เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน ความยาวหาง ต่อความยาว หัวถึงหาง
Pap (n = 500)	4.68±0.52 ^b	1.66±0.17 ^{bc}	0.36±0.06 ^{bc}	50.06±5.14 ^a	45.38±5.16 ^a	9.46±1.52 ^d	90.54±1.52 ^b
Shorr (n = 500)	4.92±0.42 ^c	1.76±0.23 ^d	0.36±0.05 ^{bc}	59.63±5.48 ^d	55.57±5.57 ^d	6.86±2.51 ^c	93.14±2.51 ^c
Diff (n = 500)	5.03±0.39 ^d	1.58±0.37 ^a	0.31±0.08 ^a	62.42±6.74 ^e	57.39±6.78 ^e	8.16±1.09 ^{bc}	91.84±1.09 ^{cd}
Eosin (n = 500)	5.51±0.56 ^f	1.67±0.19 ^c	0.31±0.04 ^a	53.93±5.34 ^c	48.42±5.22 ^c	10.29±1.27 ^e	89.71±1.27 ^a
TB (n = 500)	4.72±0.42 ^b	1.6±0.23 ^{ab}	0.34±0.06 ^b	NA	NA	NA	NA
William (n = 500)	5.22±0.48 ^e	1.84±0.31 ^e	0.36±0.07 ^{bc}	65.60±2.93 ^f	60.38±2.89 ^f	7.96±0.77 ^b	92.04±0.77 ^d
H&E (n = 500)	4.83±0.33 ^c	1.66±0.21 ^{abc}	0.34±0.04 ^b	51.88±4.02 ^b	47.05±4.04 ^b	9.37±1.00 ^d	90.63±1.00 ^b
SEM (n = 200)	4.37±0.18 ^a	1.61±0.14 ^{bc}	0.37±0.03 ^c	60.10±3.45 ^d	55.73±3.44 ^d	7.29±0.48 ^a	92.71±0.48 ^d

(pap = สีปาลานีโคลัว, shorr = สีซอร์, Diff = สีดิฟฟ์ควิก, Eosin = อีโอซิน, TB = โทลูอิดีนบลู, William = สีวิลเลียม, H&E = สีฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน, SEM = วัดความยาวจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด)

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 18 ความแตกต่างของขนาดตัวอสุจิที่วัดได้จากการย้อมสีเปรียบเทียบกับขนาดตัวอสุจิที่วัดได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

ค่าที่ใช้เปรียบเทียบ	ปาปานิโคลัว	ซอร์	ดิฟฟ์ควิก	อีโอซิน	โทลูอิดีนบลู	ฮีมาท็อกซิลินอีโอซิน	วิลเลียม
1. ความยาวหัว	-	-	-	-	-	-	-
2. ความกว้างหัว	✓	-	-	✓	✓	✓	-
3. อัตราส่วนความกว้างต่อความยาวหัว	✓	✓	-	-	-	-	✓
4. ความยาวหัวถึงหาง	-	✓	-	-	-	-	-
5. ความยาวหาง	-	✓	-	-	-	-	-
6. เปอร์เซ็นต์อัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวหัวถึงหาง	-	-	-	-	-	-	-
7. เปอร์เซ็นต์อัตราส่วนความยาวหางต่อความยาวหัวถึงหาง	-	-	✓	-	-	-	✓

หมายเหตุ สัญลักษณ์ ✓ แสดงว่าขนาดอสุจิที่วัดได้จากการย้อมสีไม่มีความแตกต่างกับขนาดที่วัดได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

5.1.1 การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อโลมาอิรวดี

การทดลองนี้มีการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อของโลมาอิรวดี ซึ่งเป็นครั้งแรกที่มีการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อจากโลมาอิรวดีด้วยวิธีกระตุ้นด้วยมือ ซึ่งเป็นวิธีการเก็บที่พัฒนามาเพื่อใช้ในการเก็บน้ำเชื้อโลมาในสถานที่เลี้ยง ในปัจจุบันมีการใช้วิธีการเก็บตัวอย่างน้ำในโลมา 5 สายพันธุ์ คือ โลมาปากขวด (bottlenose และ indo-pacific bottlenose) โลมาแปซิฟิกไวด์ไซด์ วาฬเบลูก้า วาฬเพชฌฆาต (Robeck et al., 2003; Robeck et al., 2004; Robeck et al., 2005; O'Brien et al., 2008; Robeck et al., 2009; Yuen et al., 2009) ซึ่งจากการทดลองนี้ทำให้ปัจจุบันนี้มีการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อได้สำเร็จในโลมาอิรวดี เป็นสายพันธุ์ที่ 6

คุณภาพน้ำเชื้อที่เก็บได้จากโลมาอิรวดีด้วยวิธีกระตุ้นด้วยมือ พบว่าปริมาณน้ำเชื้อที่เก็บได้ประมาณ 3.42 มิลลิลิตร ค่าความเป็นกรดต่าง 7.5 ความเข้มข้นของตัวสุจิประมาณ 1,440 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิประมาณ 72% ค่าออสโมลาลิตีประมาณ 357 พบว่าปริมาณของอสุจิที่เก็บได้มีความแตกต่างกันทุกสายพันธุ์ ค่าความเป็นกรดต่างใกล้เคียงกับสายพันธุ์ปากขวด (*Tursiops truncatus*) คือ 7.6 ความเข้มข้นของตัวสุจิมีความเข้มข้นมากกว่าทุกสายพันธุ์ เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิมีการเคลื่อนไหวที่ดีกว่าวาฬเบลูก้าและโลมาปากขวด (*Tursiops truncatus*) แต่ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับพันธุ์ปากขวด วาฬเพชฌฆาต และโลมาแปซิฟิกไวด์ไซด์ ส่วนค่าออสโมลาลิตีของน้ำเชื้อมีความใกล้เคียงกับในสายพันธุ์เบลูก้า คือประมาณ 356 mOsmol/kg (Robeck et al., 2003; Robeck et al., 2004; Robeck et al., 2005; O'Brien et al., 2008; Robeck et al., 2009; Yuen et al., 2009)

เมื่อศึกษาขนาดและรูปร่างตัวสุจิทางจุลกายวิภาค ด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด พบว่า รูปร่างของตัวสุจิมีลักษณะ พบว่าหัวของอสุจิมีลักษณะทรงรีแบนและมีหางยาว ตรงส่วนหน้าของอสุจิมีลักษณะเรียวยาว มีรอยเว้าลงไป ตรงขอบรอบรอยเว้าจะเรียบจนถึงกลางตัวอสุจิโดยมีรอยนูนเป็นลายด้านบนโค้งไปบนตัวอสุจิ เมื่อมองจากด้านข้างมีลักษณะเรียวยาวแหลมส่วนหน้ามีลักษณะบางและค่อยๆหนาตัวไปทางด้านท้ายหัวอสุจินถึงรอยเว้าด้านท้ายหัวที่เป็นรอยต่อระหว่างหัวอสุจิและลำตัว พบว่าลักษณะโดยรวมคล้ายคลึงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่ (Downing Meisner et al., 2005) และมีลักษณะรูปร่างใกล้เคียงกับโลมาและวาฬที่อยู่ในตระกูลเดียวกันแต่ก็มีความแตกต่างกับ

ในโลมาและวาฬสายพันธุ์อื่นๆ บางสายพันธุ์เช่น วาฬเพชฌฆาต ที่มีลักษณะของหัวอสุจิที่มีลักษณะเป็นพืดญี่ปุ่น (Kita et al., 2001)

ทำการวัดขนาดของอสุจิโลมาอิรวดีพบว่า ความยาวหัวถึงหางยาวประมาณ 60.10 ± 3.45 ไมโครเมตร หัวอสุจิยาวประมาณ 4.37 ± 0.18 ไมโครเมตร ความยาวของหัวอสุจิของโลมาอิรวดี มีความใกล้เคียงกับโลมาและวาฬที่อยู่ในวงศ์ delphinidae ได้แก่ โลมาธรรมดาชนิดปากยาว (common dolphin) (ประมาณ 4.29 ไมโครเมตร) โลมาปากขวด (ประมาณ 4.41 ไมโครเมตร) (Kita et al., 2001; Plön and Bernard, 2006) และใกล้เคียงกับสัตว์อีกชนิดหนึ่งที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่มวาฬและโลมาคือ ฮิปโป (Hippopotamus amphibiousc) (ประมาณ 4.3-5 ไมโครเมตร) (Downing Meisner et al., 2005) แต่ก็เป็นสัตว์ที่ถูกจัดว่ามีความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการที่ใกล้เคียงกันกับสัตว์ในกลุ่มโลมาและวาฬ (Berta et al., 2005) ส่วนโลมาที่อยู่ในวงศ์ Phocoenidae มีความยาวหัวสั้นกว่าโลมาอิรวดี (ประมาณ 3.58-3.98 ไมโครเมตร) (Kita et al., 2001; Plön and Bernard, 2006)

หัวอสุจิของโลมาอิรวดีกว้างประมาณ 1.61 ± 0.14 ไมโครเมตร ความกว้างของหัวอสุจิโลมาอิรวดี มีความกว้างของหัวน้อยกว่าโลมาและวาฬ(โลมาและวาฬที่อยู่ในวงศ์ delphinidae หัวอสุจิมีความกว้างประมาณ 1.96-3.88 ไมโครเมตร (Kita et al., 2001) และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่นๆ ประมาณ 2.6-4.8 ไมโครเมตร (Downing Meisner et al., 2005)

อัตราส่วนความกว้างต่อความยาวของอสุจิโลมาอิรวดี 0.37 ± 0.03 หางตัวอสุจิยาวประมาณ 55.73 ± 3.44 ไมโครเมตร ความยาวหางของตัวอสุจิของโลมาอิรวดี มีความยาวน้อยกว่า โลมาและวาฬที่อยู่ในวงศ์ delphinidae ที่ยาวประมาณ 64.98 - 70.01 ไมโครเมตร และวงศ์ Phocoenidae ที่ยาวประมาณ 56.50 - 59.14 ไมโครเมตร แต่ก็มีมีความยาวมากกว่าวาฬในวงศ์ Balaenopteridae (วาฬ บรูค้ำ) ที่ยาวประมาณ 56.50 - 59.14 ไมโครเมตร และวาฬในวงศ์ Ziphiidae (Baird's beaked whale) ที่ยาวประมาณ 47.32 ไมโครเมตร (Kita et al., 2001)

เปอร์เซ็นต์อัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวหัวถึงหาง 7.29 ± 0.48 เปอร์เซ็นต์ เปอร์เซ็นต์อัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวหัวถึงหาง มีเปอร์เซ็นต์มากกว่ากลุ่มโลมาและวาฬที่อยู่ในวงศ์ delphinidae (ประมาณ 6.02 - 6.30 เปอร์เซ็นต์) วงศ์ Phocoenidae (ประมาณ 5.71 - 6.59 เปอร์เซ็นต์) และ วาฬในวงศ์ Balaenopteridae (ประมาณ 6.84 เปอร์เซ็นต์) แต่น้อยกว่าวาฬในวงศ์ Ziphiidae (ประมาณ 8.45 เปอร์เซ็นต์) (Kita et al., 2001)

อัตราส่วนความยาวหางต่อความยาวหัวถึงหาง 92.71 ± 0.48 เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนความยาวหางต่อความยาวหัวถึงหาง มีเปอร์เซ็นต์น้อยกว่า โลมาและวาฬที่อยู่ในวงศ์ delphinidae (ประมาณ 93.86 - 94.03 เปอร์เซ็นต์) วงศ์ Phocoenidae (ประมาณ 93.41 - 94.29 เปอร์เซ็นต์) และวาฬใน

วงศ์ Balaenopteridae (ประมาณ 93.16 เปอร์เซ็นต์) แต่มากกว่าวาฬในวงศ์ Ziphiidae (ประมาณ 91.55 เปอร์เซ็นต์) (Kita et al., 2001)

การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน โครงสร้างภายในของอสุจิโลมาสายพันธุ์อิรวดี มีองค์ประกอบภายในเหมือนกับโลมาและวาฬทั่วไป จะมีแตกต่างก็มีต่างกับในวาฬเพศเมียที่ต่างกันที่ลักษณะภายนอก ส่วนของหัวจะมีขนาดใหญ่ ตามที่สามารถดูได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Miller et al., 2002)

5.1.2 การย้อมสีเพื่อศึกษาคุณลักษณะของสีย้อมดิฟฟ์ควิก ปาปานีโคลัว ซอร์ วิลเลียม ฮีมาทอกซิลิน อีโอซิน อีโอซิน และอีโอซินนิโกรซิน

อสุจิที่ย้อมด้วยวิธีดิฟฟ์ควิก บริเวณส่วนของอะโครโซม จะติดสีม่วงจางๆ และติดสีม่วงเข้มที่ส่วนของอะโครโซมส่วนท้าย ลำตัวและหางแม้ว่าคุณภาพของการย้อมสีจะมีความชัดเจนที่น้อยกว่าเมื่อเทียบกับการย้อมปาปานีโคลัว การย้อมเพื่อใช้ดูสัณฐานวิทยาของอสุจิด้วยวิธีดิฟฟ์ควิก จะย้อมได้ง่ายกว่า

สรุปข้อดีของการย้อมดิฟฟ์ควิก ได้ดังนี้

- ก) ระยะเวลาที่ใช้ย้อมจนถึงพร้อมอ่านผลใช้เวลาสั้น
- ข) สีย้อมมีจำหน่ายในเชิงพาณิชย์มีการควบคุมคุณภาพของสีย้อม
- ค) ความสะดวกในการปฏิบัติงานที่สามารถทำซ้ำโดยไม่ต้องมีประสบการณ์ มีความน่าเชื่อถือในการวิเคราะห์คุณภาพอสุจิ (Kruger et al., 1987)

จากการศึกษาคุณสมบัติของสีย้อมพบว่า การเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบทางเคมีของสีย้อมเหนี่ยวนำให้เกิด การเปลี่ยนแปลงของลักษณะภายนอกของตัวอสุจิ ในที่นี้คือการพบลักษณะหางอมากขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับผลการทดลองที่พบความผิดปกติที่หางมากขึ้น (Root Kustritz et al., 1998)

ฮีมาทอกซิลินอีโอซินส่วนใหญ่นิยมใช้ทำการตรวจทางเซลล์วิทยา ใช้ในการตรวจดูว่ามีเซลล์อื่นๆปนเปื้อนมาในน้ำเชื้อด้วยหรือไม่ (Allery et al., 2001) การตรวจเซลล์ที่ปนเปื้อนในน้ำเชื้อ เป็นการย้อมเพื่อตรวจดูเซลล์ที่ปนเปื้อนมาในน้ำเชื้อ เช่น เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์อื่นๆ

วิธีย้อมวิลเลียม ใช้ในการตรวจรูปร่างของอสุจิ การตรวจความผิดปกติของตัวอสุจิที่ส่วนหัว มักนิยมย้อมสีโดย ซึ่งจะทำให้พบความผิดปกติของตัวอสุจิได้ชัดเจน (Aksoy et al., 2012)

การศึกษาขนาดความแตกต่างของหัวอสุจิมนุษย์ โดยใช้สีย้อมดิฟฟ์ควิก ปาปานีโคลัว และสเปิร์มบลู (Sperm blue) เทียบกับอสุจิที่ไม่ได้ย้อมสี พบว่าขนาดของอสุจิที่ได้จากสีย้อมดิฟฟ์ควิก มีขนาดใหญ่กว่า ลักษณะหัวอสุจิบวมกว่า เมื่อเทียบกับสีปาปานีโคลัว และสเปิร์มบลู และพบว่าสี

ปาปานีโคลัว มีขนาดตัวอสุจิหดเล็กลง กว่าสปีดฟัพควิก ,สเปิร์มบลู และอสุจิที่ไม่ได้ย้อมสี ส่วนขนาดของ สเปิร์มบลู ไม่มีความแตกต่างกับอสุจิที่ไม่ได้ย้อมสีอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นจากความแตกต่างของระดับออสโมลาลิตีที่อยู่ในน้ำเชื่อมกับสีย้อม หรือสารที่ใช้ตรึงตัวอสุจิ ที่อยู่ในขั้นตอนการย้อมของสีย้อมดิฟฟควิก และปาปานีโคลัว แต่น้ำเชื่อมที่ทำการศึกษาอาจมีค่าออสโมลาลิตีที่ใกล้เคียงกับสเปิร์มบลู (Maree et al., 2010) ซึ่งขนาดตัวอสุจิที่แตกต่างกันไม่ได้ส่งผลกับความผิดปกติที่ศึกษาเนื่องจากหากเกิดความผิดปกติที่หัวเช่น หัวมีขนาดใหญ่ขึ้นก็เป็นการเทียบกับในสิ่งนั้นๆ ไม่ได้นำไปเทียบกับตัวอสุจิที่ได้จากการย้อมสีอื่นๆ ซึ่งการศึกษานี้ศึกษาแค่ในส่วนของหัวของอสุจิ แต่ในการศึกษาอื่นพบว่าความแตกต่างของค่าออสโมลาลิตี ที่อยู่ในน้ำเชื่อม สีย้อม และสารที่ใช้ตรึงอสุจิ สามารถทำให้เกิดความผิดปกติที่ส่วนหางของอสุจิได้มากขึ้น เช่น ทำให้เกิดหางงอได้มากขึ้น (Root Kustritz et al., 1998)

อีโอซิน และ อีโอซินนิโกรซิน มีการศึกษาการใช้อีโอซิน กับการใช้ อีโอซินนิโกรซิน พบว่าระยะเวลาในการสัมผัส กับ อีโอซิน และระดับการเงาจางส่งผลต่อปริมาณอสุจิมีชีวิต (Viability) ซึ่งส่งผลให้ สีอีโอซินมีผลบวกเทียมมากขึ้น ซึ่งน่าจะเกิดจากระดับของ ออสโมลาลิตี ซึ่งในสีอีโอซินมีระดับออสโมลาลิตีที่ต่ำ ในภายหลัง WHO จึงแนะนำให้ใช้ในการศึกษา viability ของอสุจิโดยวิธี อีโอซินนิโกรซินมากกว่า (Björndahl et al., 2004) เนื่องจากง่ายต่อการปฏิบัติมีขั้นตอนที่น้อย แต่ไม่ได้แนะนำให้ใช้สองขั้นตอนคือแยกสี อีโอซิน และสีนิโกรซิน แนะนำให้ใช้เป็นขั้นตอนเดียวคือ ให้ใช้สีอีโอซินและสีนิโกรซินรวมกัน (Björndahl et al., 2004)

โกลูอิตินบลู มีความสามารถจับกับกลุ่มฟอสเฟตที่ประกอบอยู่ในสายดีเอ็นเอ ซึ่งจะจับได้เมื่อมีการคลายตัวหรือมีความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอ ซึ่งมีการศึกษาพบว่าตัวอสุจิที่มีการติดสีน้ำเงินเข้มสูงขึ้นหมายถึงเกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอในตัวอสุจิ (Nabi et al., 2013; Sasikumar and Dakshayani, 2013)

5.2 ข้อสรุปและข้อเสนอแนะ

5.2.1 สามารถเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อจากโลมาอิรวตี โดยใช้วิธีการฝีกโลมาเพื่อให้ทำการหลั่งน้ำเชื้อลงภายในภาชนะที่ใช้เก็บตัวอย่าง การเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อและการฝีก สภาพแวดล้อมมีผลกับการเก็บตัวอย่าง เช่น ฤดูกาล อุณหภูมิ น้ำ สภาพอากาศ ความเครียดของตัวสัตว์ ปัจจัยทางฮอร์โมน เทสโทสเทอโรนในตัวโลมาอิรวตี ซึ่งทำให้ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ หรือได้ตัวอย่างน้ำเชื้อที่มีคุณภาพที่ลดลง ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม

5.2.2 ระหว่างทำการฝึกโลมา เพื่อทำการเก็บตัวอย่างน้ำเชื้อมีช่วงเวลาที่ไม่สามารถเก็บตัวอย่างได้ หรือได้คุณภาพน้ำเชื้อที่ลดลง ซึ่งอาจเป็นผลของช่วงฤดูผสมพันธุ์ในโลมาอิรวดี ซึ่งยังไม่มีใครทำการศึกษ จึงควรทำการศึกษาเพิ่มเติม

5.2.3 ได้ค่าคุณภาพน้ำเชื้อโลมาอิรวดีเพื่อใช้เป็นค่าอ้างอิงเบื้องต้น ดังนี้

ปริมาตรน้ำเชื้อที่เก็บได้เฉลี่ย	3.42±0.49 มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรดต่าง	7.5
ความเข้มข้นของตัวอสุจิ	1,440±586.79 ล้านตัวต่อมิลลิลิตร
เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหวของอสุจิ	72±3
ค่าออสโมลาลิตี้	357±7.07 mOsmol/kg

5.2.4 ทราบถึงลักษณะทางจุลกายวิภาค ของอสุจิโลมาอิรวดี พบว่าหัวของอสุจิมีลักษณะทรงรีแบนและมีหางยาว ตรงส่วนหน้าของอสุจิมีลักษณะเรียวยาว มีรอยเว้าลงไป ตรงขอบรอบรอยเว้าจะเรียบจนถึงกลางตัวอสุจิโดยมีรอยนูนเป็นลายด้านบนโค้งไปบนตัวอสุจิ เมื่อมองจากด้านข้างมีลักษณะเรียวยาวแหลมส่วนหน้ามีลักษณะบางและค่อยๆหนาตัวไปทางด้านท้ายหัวอสุจิจนถึงรอยเว้าด้านท้ายหัวที่เป็นรอยต่อระหว่างหัวอสุจิและลำตัว

ส่วนโครงสร้างภายในของอสุจิโลมาสายพันธุ์อิรวดี พบว่าเมื่อตัดตามแนวยาวของตัวอสุจิ หัวของตัวอสุจิประกอบไปด้วยอะโครโซมและนิวเคลียส โดยอะโครโซมมีลักษณะบางและเรียบคลุมบริเวณนิวเคลียสด้านหน้าส่วนหนึ่งไว้ ส่วนของลำตัวไม่มีไมโทคอนเดรียอยู่โดยตรงกลางของลำตัวเป็นเดนส์ไฟเบอร์ แล้วจะเห็นรอยต่อระหว่างส่วนของลำตัวและหาง แบ่งกันค่อนข้างชัดเจน

เมื่อนำตัวของตัวอสุจิมาตัดตามขวาง ส่วนหัวของอสุจิส่วนของอะโครโซม มีลักษณะที่บาง จะคลุมอยู่ด้านบนของนิวเคลียส อยู่ก่อนมาทางด้านหน้าของหัวอสุจิ ส่วนของลำตัวของอสุจิเมื่อนำมาตัดตามขวางแล้วพบว่ามี ตรงกลางประกอบด้วยไมโครทิวบูลอยู่ตรงกลาง 2 คู่ล้อมรอบด้วยไมโครทิวบูลอีก 9 คู่ ส่วนรอบนอกล้อมรอบด้วยเดนส์ไฟเบอร์ ถัดออกไปล้อมรอบด้วย ไมโทคอนเดรีย ส่วนของหางจะพบส่วนของเดนส์ไฟเบอร์ วางตัวอยู่รอบ เอ็กโซนิม เช่นเดียวกับที่พบในส่วนของลำตัวแต่จะไม่พบไมโทคอนเดรีย

5.2.5 ทราบถึงคุณสมบัติการติดสีอสุจิโลมาอิรวดี

สีที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอสุจิคือสี ปาปานิโคลัว ซอร์ อีมาท็อกซิลินอีโอซิน วิลเลียม และ ดิฟฟ์ควิก

อสุจิจัวย้อมด้วยปาปานิโคลัว และ ซอร์ แสดงให้เห็นว่าบริเวณส่วนของอะโครโซมจะติดสีฟ้าจางๆ ส่วน ของอะโครโซมส่วนท้ายจะติดสีน้ำเงินเข้ม ส่วนลำตัวจะติดสีแดง และหางแดงจางๆ

สามารถเห็นลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอสุจิได้ชัดเจน แต่สีปาปานีโคลัว และ ซอร์ เป็นสีที่ใช้ระยะเวลาในการย้อมที่นานและมีขั้นตอนและสารเคมีที่ใช้มากกว่าวิธีอื่นๆ

อสุจิที่ย้อมด้วยสีมาท็อกซิลินอีโอซิน แสดงให้เห็นว่าบริเวณส่วนของอะโครโซมจะติดสีม่วงหรือฟ้าจางๆ ส่วนอะโครโซมส่วนท้ายจะติดสีน้ำเงินหรือม่วงเข้ม ส่วนลำตัวจะติดชมพูหรือสีแดง และหางติดสีชมพูหรือแดง สามารถเห็นลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอสุจิได้ชัดเจน

อสุจิที่ย้อมด้วยวิลเลียม แสดงให้เห็นว่าบริเวณส่วนของอะโครโซมจะติดสีชมพูจางๆ ส่วนของอะโครโซมส่วนท้ายจะติดสีชมพูหรือแดง ส่วนลำตัวจะติดสีแดงเข้ม และหางติดสีแดง สามารถเห็นลักษณะสัณฐานวิทยาของตัวอสุจิได้ชัดเจน

อสุจิที่ย้อมด้วยดิฟฟ์ควิก แสดงให้เห็นว่าบริเวณส่วนของอะโครโซม จะติดสีม่วงจางๆ ส่วนอะโครโซมส่วนท้าย ส่วนลำตัวและหาง จะติดสีม่วง เป็นสีที่สามารถย้อมได้ง่าย มีวิธีการและขั้นตอนที่น้อยกว่าวิธีอื่นๆ สามารถเตรียมตัวอย่างทำการทดลอง และอ่านผลได้รวดเร็วกว่าวิธีอื่นๆ

สีอีโอซิน และ อีโอซินนิโกรซิน เหมาะที่จะใช้ศึกษาความมีชีวิตของตัวอสุจิ โดยดูจากความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มอยู่ (membrane integrity) ของเซลล์ อสุจิที่ตายหัวจะติดสีแดงหรือชมพู ส่วนตัวอสุจิที่ยังมีชีวิตจะไม่ติดสี แต่สีอีโอซินจะพบจำนวนตัวตายได้มากกว่า แต่แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ไม่เหมาะที่จะใช้เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาเนื่องจากมองเห็นขอบเขตของตัวอสุจิได้ไม่ชัดเจน

อสุจิที่ย้อมด้วยสีโทลูอิดีนบลู สามารถใช้บอกถึงความเสียหายของตัวอสุจิที่เกิดขึ้นกับดีเอ็นเอ อสุจิที่เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอ หัวจะติดสีน้ำเงินเข้มหรือม่วงเข้ม ส่วนตัวที่ปกติจะพบว่าส่วนอะโครโซมส่วนท้ายจะติดสีน้ำเงิน บริเวณส่วนของอะโครโซม จะติดสีฟ้าจางๆ การสังเกตลักษณะทางสัณฐานวิทยาบริเวณส่วนหางของตัวอสุจิได้ไม่ชัดเจน

5.2.6 จากการเปรียบเทียบความยาวของหัวอสุจิโลมาอรวดี ที่ได้จากการย้อมสี 7 สีชนิด เปรียบเทียบกับผลจากการวัดขนาดจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (SEM) ได้แก่ สี ย้อมดิฟฟ์ควิก ปาปานีโคลัว ซอร์ วิลเลียม สีมาท็อกซิลินอีโอซิน โทลูอิดีนบลู และอีโอซิน พบว่าส่วนของความยาวหัว ทั้ง 7 สีย้อมมีความยาวแตกต่างกับ SEM ทุกสีย้อมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ความกว้างหัว ไม่มีความแตกต่างกับสีย้อมดิฟฟ์ควิก ปาปานีโคลัว สีมาท็อกซิลินอีโอซิน โทลูอิดีนบลู และอีโอซิน อัตราส่วนความกว้างหัวต่อความยาวไม่มีความแตกต่างกับสีวิลเลียม ปาปานีโคลัว และ ซอร์ ความยาวหัวถึงหางและความยาวหางมีความยาวต่างกับความยาวที่วัดได้จากสีย้อมดิฟฟ์ควิก ปาปานีโคลัว วิลเลียม สีมาท็อกซิลินอีโอซิน และอีโอซิน อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เปอร์เซ็นต์อัตราส่วนความยาวหัวต่อความยาวหัวถึงหาง มีความแตกต่างกับทุกสีย้อมอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

และเปอร์เซ็นต์อัตราส่วนความยาวทางต่อความยาวหัวถึงหางไม่มีความแตกต่างกับสตีฟฟ์ควิก และ สิวิลเลียม ดังนั้นจึงสรุปได้ดังนี้

ถ้าต้องการศึกษาความกว้างของหัวอสุจิในโลมาอิรวดี ควรใช้สตีฟฟ์ควิก โทลูอิดีนบลู อีมาท็อกซิลินอีโอซิน ปาปานีโคลัว และอีโอซิน หากต้องการศึกษาสัดส่วนระหว่างความกว้างต่อความยาวของหัวอสุจิโลมาอิรวดี ควรใช้สิวิลเลียม ปาปานีโคลัว และซอร์ หากต้องการศึกษาความยาวหัวถึงหางและความยาวหางของตัวอสุจิ ควรใช้สีซอร์ หากต้องการศึกษาเปอร์เซ็นต์อัตราส่วนความยาวทางต่อความยาวหัวถึงหาง ควรใช้สตีฟฟ์ควิก และสิวิลเลียม



รายการอ้างอิง

- กาญจนา อุดุลยานุโกศล และก้องเกียรติ กิตติวัฒนาวงศ์ 2557. คู่มือจำแนกชนิดโลมาและวาฬในประเทศไทย พิมพ์ลักษณ์.กรุงเทพฯ : สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งกระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม.
- เกวลี ฉัตรตรงค์ , มานิต รุ่งศรีทธาธรรม, มนคน ตริศิริโรจน์, ชัยณรงค์ โลหชิต, ปราบจัน วีรกุล และ สุตสร สิริไวยพวงศ์ 2535. การศึกษาเทคนิคการทำและประเมินคุณภาพน้ำเชื้อสุนัขแช่แข็ง. โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์ ปีการศึกษา 2535. คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 22 หน้า.
- ธีรวัฒน์ ธาราศานิต 2555. วิทยาแอนโดร เรนุเวชวิทยา และ เทคโนโลยีชีวภาพทางการสืบพันธุ์ในม้า. พิมพ์ครั้งที่ 1. เพชรภูมิการพิมพ์. เพชรบุรี. 168 หน้า.
- นิติกร ผิวพ่อง และอังสุณี ชูณหปราณ 2545. โลมาอิรวดีในทะเลสาบสงขลา. วารสารการประมง. 2555(5): 437-441.
- รุจิพร ประทีปเสน 2541. การเตรียมตัวอย่างสำหรับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- ศิริเพ็ญ เซซากาพันธ์, อรัญญา ตันติปัญญาพร และ วิรัช ธรรมวินิจฉัย 2535. คู่มือหลักสูตรจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสำหรับงานวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.
- Aksoy E, Aktan TM, Duman S, Cuce G, Aksoy E, Aktan T, Duman S and Cuce G 2012. Assessment of spermatozoa morphology under light microscopy with different histologic stains and comparison of morphometric measurements. Int J Morphol. 30(4).
- Allery J-P, Telmon N, Mieusset R, Blanc A and Rougé D 2001. Cytological detection of spermatozoa: comparison of three staining methods. Journal of Forensic Science. 46(2): 349-351.
- Almquist J 1982. Effect of long term ejaculation at high frequency on output of sperm, sexual behavior, and fertility of Holstein bulls; relation of reproductive capacity to high nutrient allowance. Journal of dairy science. 65(5): 814-823.
- Berta A, Sumich JL and Kovacs KM 2005. Marine mammals: evolutionary biology. In: Academic Press.

- Björndahl L, Söderlund I, Johansson S, Mohammadieh M, Pourian MR and Kvist U 2004. Why the WHO Recommendations for Eosin-Nigrosin Staining Techniques for Human Sperm Vitality Assessment Must Change. *Journal of andrology*. 25(5): 671-678.
- Boyd IL, Lockyer C and Marsh HD 1999. Reproduction in marine mammals.
- Calle P, Monfort S, Dunn J, Jensen E, Boehm J, Young S and Robeck T 2000. Seasonal testosterone secretion in male white whales (*Delphinapterus leucas*). *ANNUAL CONFERENCE-AMERICAN ASSOCIATION OF ZOO VETERINARIANS*:149-150.
- Cockcroft V and Ross GB 1990. Age, growth, and reproduction of bottlenose dolphins *Tursiops truncatus* from the east coast of southern Africa. *Fishery Bulletin*. 88(2): 289-302.
- Cummins J and Woodall P 1985. On mammalian sperm dimensions. *Journal of Reproduction and Fertility*. 75(1): 153-175.
- Curry BE, Ralls K and Brownell Jr RL 2013. Prospects for captive breeding of poorly known small cetacean species. *Endangered Species Research*. 19(3): 223-243.
- Dhurvey M, Gupta V, Nema S, Patidar A, Shivhare M, Singh N and Shakya V 2012. Modern semen evaluation techniques in domestic animals: a review. *DHR-IJBL*. 3: 62-83.
- Dierauf L and Gulland FM 2001. CRC handbook of marine mammal medicine: health, disease, and rehabilitation. In: CRC press.
- Downing Meisner A, Klaus AV and O'Leary MA 2005. Sperm head morphology in 36 species of artiodactylans, perissodactylans, and cetaceans (Mammalia). *Journal of Morphology*. 263(2): 179-202.
- Duffield DA and Wells RS 1991. The combined application of chromosome, protein and molecular data for the investigation of social unit structure and dynamics in *Tursiops truncatus*. In: *Genetic Ecology of Whales and Dolphins*. Rep. Int. Whal. Comm., Cambridge, UK Special.
- Fleming A, Yanagimachi R and Yanagimachi H 1981. Spermatozoa of the Atlantic bottlenosed dolphin, *Tursiops truncatus*. *Journal of reproduction and fertility*. 63(2): 509-514.

- Harrison R and Ridgwa S 1971. Gonadal activity in some bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Journal of Zoology*. 165(3): 355-366.
- Harrison RJ 1969. Reproduction and reproductive organs. *The biology of marine mammals*. 253-348.
- Katsumata E, Ueda Y, Arai K, Katsumata H, Kishimoto M, Watanabe G and Taya K 2012. Circulating testosterone and inhibin levels at different ages in the male beluga (*Delphinapterus leucas*). *Journal of Veterinary Medical Science*. 74(3): 293-300.
- Keller Jr KV 1988. Training Atlantic bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) for artificial insemination. DTIC Document.
- Kirby V 1990. Endocrinology of marine mammals. *CRC handbook of marine mammal medicine: Health, diseases, and rehabilitation*. 303-351.
- Kita S, Yoshioka M, Kashiwagi M, Ogawa S and Tobayama T 2001. Comparative external morphology of cetacean spermatozoa. *Fisheries science*. 67(3): 482-492.
- Koonjaenak S 2006. Semen and sperm characteristics of Swamp buffalo (*Bubalus bubalis*) bulls for Artificial insemination in Thailand, in relation to season. In: Uppsala Press.
- Kruger T, Ackerman S, Simmons K, Swanson R, Brugo S and Acosta A 1987. A quick, reliable staining technique for human sperm morphology. *Archives of andrology*. 18(3): 275-277.
- Maree L, Du Plessis S, Menkveld R and Van der Horst G 2010. Morphometric dimensions of the human sperm head depend on the staining method used. *Human Reproduction*. 25(6): 1369-1382.
- Miller DL, Styer E, Decker S and Robeck T 2002. Ultrastructure of the Spermatozoa from Three Odontocetes: a Killer Whale (*Orcinus orca*), a Pacific White-Sided Dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*) and a Beluga (*Delphinapterus leucas*). *Anatomia, histologia, embryologia*. 31(3): 158-168.
- Nabi A, Khalili MA, Halvaei I, Ghasemzadeh J and Zare E 2013. Seminal bacterial contaminations: Probable factor in unexplained recurrent pregnancy loss. *Iranian journal of reproductive medicine*. 11(11): 925.

- O'Brien J, Steinman K, Schmitt T and Robeck T 2008. Semen collection, characterisation and artificial insemination in the beluga (*Delphinapterus leucas*) using liquid-stored spermatozoa. *Reproduction, Fertility and Development*. 20(7): 770-783.
- Perrin WF and Wursig B 2009. *Encyclopedia of marine mammals*. In: Academic Press.
- Pickett B, Neil J and Squires E 1985. The effect of ejaculation frequency on stallion sperm output. *Proceedings of the 9th Equine and Physiology Society Symposium*:290-295.
- Plön S and Bernard R 2006. A review of spermatozoan morphology in Cetacea with new data for the genus *Kogia*. *Journal of Zoology*. 269(4): 466-473.
- Robeck T, Greenwell M, Boehm J, Yoshioka M, Tobayama T, Steinman K and Monfort S 2003. Artificial insemination using frozen-thawed semen in the pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *Proceedings International Association of Aquatic Animal Medicine*:50-54.
- Robeck T, Steinman K, Gearhart S, Reidarson T, McBain J and Monfort S 2004. Reproductive physiology and development of artificial insemination technology in killer whales (*Orcinus orca*). *Biology of Reproduction*. 71(2): 650-660.
- Robeck T, Steinman K, Greenwell M, Ramirez K, Van Bonn W, Yoshioka M, Katsumata E, Dalton L, Osborn S and O'Brien J 2009. Seasonality, estrous cycle characterization, estrus synchronization, semen cryopreservation, and artificial insemination in the Pacific white-sided dolphin (*Lagenorhynchus obliquidens*). *Reproduction*. 138(2): 391-405.
- Robeck T, Steinman K, Yoshioka M, Jensen E, O'Brien J, Katsumata E, Gili C, McBain J, Sweeney J and Monfort S 2005. Estrous cycle characterisation and artificial insemination using frozen-thawed spermatozoa in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*). *Reproduction*. 129(5): 659-674.
- Root Kustritz M, Olson P, Johnston S and Root T 1998. The effects of stains and investigators on assessment of morphology of canine spermatozoa. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 34(4): 348-352.

- Sasikumar S and Dakshayani D 2013. Assessment of sperm DNA integrity by Toluidine blue staining technique in infertile patients and its relation to cryopreservation. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci.* 2(6): 280-292.
- Schroeder JP and Keller KV 1989. Seasonality of serum testosterone levels and sperm density in *Tursiops truncatus*. *Journal of Experimental Zoology.* 249(3): 316-321.
- Seager S, Gilmartin W, Moore L, Platz C and Kirby V 1981. Semen collection (electroejaculation), evaluation and freezing in the Atlantic bottlenosed dolphin (*Tursiops truncatus*). *Proceedings of the American Association of Zoo Veterinarians*:136.
- Sigman M and Zini A 2009. Semen analysis and sperm function assays: what do they mean? *Seminars in reproductive medicine.* 27(3):115-123.
- Turner RM 2003. Tales from the tail: what do we really know about sperm motility? *Journal of andrology.* 24(6): 790-803.
- Vasan S 2011. Semen analysis and sperm function tests: How much to test? *Indian journal of urology: IJU: journal of the Urological Society of India.* 27(1): 41.
- World Health Organization D 2010. WHO laboratory manual for the Examination and processing of human sperm. World Health Organiz.
- Yanagimachi R 1994. Fertility of mammalian spermatozoa: its development and relativity. *Zygote.* 2(04): 371-372.
- Yuen QW, Brook FM, Kinoshita RE and Ying MT 2009. Semen Collection and Ejaculate Characteristics in the Indo-Pacific Bottlenose Dolphin (*Tursiops aduncus*). *Journal of andrology.* 30(4): 432-439.



ภาคผนวก ก

ตารางแสดงคุณภาพของน้ำเชื้อที่มีการศึกษาในกลุ่มโลมาและวาฬในสถานที่กักขัง

คุณลักษณะของน้ำเชื้อ	โลมาปากขวด (<i>Tursiops truncatus</i>) ¹	วาฬเพชฌฆาต (<i>Orcinus orca</i>) ²	วาฬเบลูก้า (<i>Delphinapterus leucas</i>) ³	โลมาไวท์ไซด์ (<i>Lagenorhynchus obliquidens</i>) ⁴	โลมาปากขวด (<i>Tursiops aduncus</i>) ⁵
ปริมาณน้ำเชื้อ(ml)	18.2±9.8	13.9±11.5	1.7±1.2	5.51±4.8	4.0-9.4
ค่าออสโมลาลิตี(mOsm kg-1)	344.6±6.4	-	356.3±9.4	-	-
ค่าความเป็นกรดต่าง	7.6±0.1	-	7.1±0.2	-	8.1-8.2
ความเข้มข้นของตัวอสุจิ ($\times 10^7$ ml ⁻¹)	37.3±22.0	98.8±69.7	29.5±16.3	71.3±45.9	17.0-69.7
จำนวนอสุจিরวม($\times 10^7$ ml ⁻¹)	657.7±434.9	1315±1379.1	53.7±48.6	319.1±9.1	100-260
การเคลื่อนไหวรวม	92.4±3.2	90.5±4.7	58.7±8.8	95.3±4.6	84.8-87.0
เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนไหว	95.9±1.4	94.2±3.8	44.9±5.2	98.1±1.2	52.6-81.5
เปอร์เซ็นต์อสุจิมิชีวิต	88.2±7	89.5±6.7	83±6.3	88.4±1.91	75-79
เปอร์เซ็นต์อสุจิปกติ	96 ± 2	88.4±4.8	60.3±6.3	96±3	-
ฤดูผสมพันธุ์	มีและไม่มี	ไม่มี	มี	มี	ไม่มี

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดตัวอสุจิที่ได้จากการย้อมสีแล้วทำการวัดขนาด ในโลมาอิรวดี 1 (mean±SD)

	ความยาวหัว (ไมโครเมตร)	ความกว้างหัว (ไมโครเมตร)	อัตราส่วน ความกว้างต่อ ความยาว	ความยาวหัว ถึงหาง (ไมโครเมตร)	ความยาวหาง (ไมโครเมตร)	เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน ความยาว หัวต่อความ ยาวหัวถึงหาง	เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วนความ ยาวหางต่อความ ยาวหัวถึงหาง
Pap (n = 500)	4.66±0.53 ^b	1.66±0.18 ^{ab}	0.36±0.06 ^{bc}	49.95±5.31 ^a	45.29±5.32 ^a	9.45±1.55 ^c	90.55±1.55 ^{ab}
Shorr (n = 500)	4.91±0.42 ^{cd}	1.75±0.24 ^{bc}	0.36±0.05 ^{bc}	59.56±5.40 ^c	54.65±5.3 ^c	8.29±0.89 ^b	91.71±0.89 ^c
Diff (n = 500)	5.02±0.39 ^{de}	1.57±0.38 ^a	0.31±0.08 ^a	62.50±6.71 ^d	57.48±6.76 ^d	8.13±1.11 ^b	91.87±1.11 ^c
Eosin (n = 500)	5.51±0.57 ^f	1.67±0.20 ^{ab}	0.31±0.04 ^a	53.93±5.42 ^b	48.42±5.30 ^b	10.29±1.29 ^d	89.71±1.29 ^a
TB (n = 500)	4.71±0.43 ^{bc}	1.60±0.23 ^a	0.34±0.06 ^b	NA	NA	NA	NA
William (n = 500)	5.20±0.46 ^e	1.84±0.32 ^c	0.36±0.07 ^{bc}	65.60±2.93 ^e	60.40±2.91 ^e	7.94±0.76 ^b	92.06±0.76 ^{cd}
H&E (n = 500)	4.83±0.33 ^{bc}	1.66±0.21 ^{ab}	0.34±0.04 ^b	51.90±4.07 ^{ab}	47.07±4.11 ^{ab}	9.37±1.03 ^c	90.63±1.03 ^b
SEM (n = 200)	4.37±0.15 ^a	1.61±0.13 ^a	0.37±0.03 ^c	59.86±3.45 ^c	55.49±3.43 ^c	7.32±0.44 ^a	92.68±0.44 ^d

(pap = สีปาปานีโคลัว, shorr = สีชอร์, Diff = สีดิฟฟ์ควิก, Eosin = อีโอซิน, TB = โทลูอิดีนบลู, William = สีวิลเลียม, H&E = สีฮีมาทอกซิลินอีโอซิน)

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดตัวอสุจิที่ได้จากการย้อมสีแล้วทำการวัดขนาด ในโลมาอิรวดี 2 (mean±SD)

	ความยาวหัว (ไมโครเมตร)	ความกว้างหัว (ไมโครเมตร)	อัตราส่วน ความกว้างต่อ ความยาว	ความยาวหัว ถึงหาง (ไมโครเมตร)	ความยาวหาง (ไมโครเมตร)	เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน ความยาว หัวต่อความ ยาวหัวถึงหาง	เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน ความยาวหาง ต่อความยาว หัวถึงหาง
Pap (n = 500)	4.72±0.52 ^{bc}	1.65±0.17 ^{ab}	0.35±0.05 ^{bc}	50.05±5.32 ^a	45.33±5.29 ^a	9.55±1.46 ^c	90.45±1.46 ^{ab}
Shorr (n = 500)	4.87±0.39 ^c	1.74±0.21 ^{bc}	0.36±0.05 ^{bc}	58.94±5.00 ^c	54.07±4.94 ^c	8.32±0.90 ^b	91.68±0.90 ^c
Diff (n = 500)	5.08±0.37 ^d	1.62±0.35 ^a	0.32±0.07 ^a	62.63±6.74 ^d	57.55±6.78 ^d	8.21±1.07 ^b	91.79±1.07 ^c
Eosin (n = 500)	5.54±0.55 ^f	1.67±0.21 ^{ab}	0.30±0.04 ^a	54.72±5.38 ^b	49.18±5.26 ^b	10.20±1.23 ^d	89.80±1.23 ^a
TB (n = 500)	4.66±0.41 ^b	1.62±0.25 ^a	0.35±0.07 ^{bc}	NA	NA	NA	NA
William (n = 500)	5.29±0.47 ^e	1.82±0.29 ^c	0.35±0.07 ^b	65.48±2.98 ^e	60.19±2.95 ^e	8.09±0.77 ^b	91.91±0.77 ^c
H&E (n = 500)	4.82±0.35 ^{bc}	1.67±0.22 ^{ab}	0.35±0.04 ^b	51.52±3.93 ^a	46.69±3.97 ^a	9.42±1.02 ^c	90.58±1.02 ^b
SEM (n = 200)	4.34±0.14 ^a	1.61±0.15 ^a	0.37±0.03 ^c	60.46±3.64 ^c	56.12±3.68 ^d	7.21±0.53 ^a	92.79±0.53 ^d

(pap = สีปาปานีโคลัว, shorr = สีชอร์, Diff = สีดิฟฟ์คิก, Eosin = อีโอซิน, TB = โทลูอิดีนบลู, William = สีวิลเลียม, H&E = สีฮีมาทอกซิลินอีโอซิน)

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางแสดงค่าเฉลี่ยของขนาดตัวของสูลิที่ได้จากการย้อมสีแล้วทำการวัดขนาด ในโลมาอิรวดี 3
(mean±SD)

	ความยาวหัว (ไมโครเมตร)	ความกว้างหัว (ไมโครเมตร)	อัตราส่วน ความกว้างต่อ ความยาว	ความยาวหัว ถึงหาง (ไมโครเมตร)	ความยาวหาง (ไมโครเมตร)	เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน ความยาว หัวต่อความ ยาวหัวถึงหาง	เปอร์เซ็นต์ อัตราส่วน ความยาวหาง ต่อความยาว หัวถึงหาง
Pap (n = 500)	4.65±0.53 ^b	1.68±0.18 ^{bc}	0.37±0.06 ^d	50.16±4.97 ^a	45.51±5.05 ^a	9.39±1.60 ^c	90.61±1.60 ^b
Shorr (n = 500)	4.97±0.44 ^{cd}	1.78±0.26 ^{cd}	0.36±0.06 ^{cd}	60.39±6.03 ^{cd}	55.42±5.85 ^b	8.28±0.88 ^b	91.72±0.88 ^c
Diff (n = 500)	4.99±0.40 ^{de}	1.55±0.39 ^a	0.31±0.08 ^a	62.16±6.86 ^d	57.17±6.91 ^b	8.13±1.11 ^b	91.87±1.11 ^c
Eosin (n = 500)	5.48±0.58 ^f	1.68±0.19 ^{bc}	0.31±0.04 ^a	53.14±5.27 ^b	47.66±5.16 ^a	10.38±1.31 ^d	89.62±1.31 ^a
TB (n = 500)	4.78±0.42 ^{bc}	1.57±0.20 ^{ab}	0.33±0.05 ^{ab}	NA	NA	NA	NA
William (n = 500)	5.15±0.49 ^e	1.86±0.34 ^d	0.36±0.08 ^d	65.71±2.92 ^e	60.56±2.87 ^c	7.85±0.78 ^b	92.15±0.78 ^c
H&E (n = 500)	4.84±0.32 ^{cd}	1.64±0.19 ^{ab}	0.34±0.04 ^{bc}	52.23±4.11 ^{ab}	47.39±4.12 ^a	9.32±0.98 ^c	90.68±0.98 ^b
SEM (n = 200)	4.40±0.22 ^a	1.62±0.14 ^{ab}	0.37±0.02 ^d	59.99±3.31 ^c	55.59±3.24 ^b	7.35±0.46 ^a	92.65±0.46 ^d

(pap = สีปาปานีโคลัว, shorr = สีชอร์, Diff = สีดิฟฟ์ควิก, Eosin = อีโอซิน, TB = โทลูอิดีนบลู, William = สีวิลเลียม, H&E = สีฮีมาทอกซิลินอีโอซิน)

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยในแนวตั้งเดียวกันที่มีอักษรกำกับต่างกัน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายณภกานต์ สิงห์คำ เกิดเมื่อวันที่ 14 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2529 ณ จังหวัดพะเยา จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียน พะเยาพิทยาคม เมื่อปี พ.ศ.2547 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี สาขาสัตวแพทยศาสตร์บัณฑิต จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร เมื่อจบการศึกษาได้เข้าทำงานเป็นสัตวแพทย์ประจำ โลมาโชว์พัทยา บริษัททอว์นพีทริชด์ อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี หลังจากทำงานเป็นเวลา 1 ปี เนื่องจากต้องการหาความรู้เพิ่มเติมทางด้านสัตว์น้ำจึงเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโท สาขาวิชา อายุรศาสตร์สัตวแพทย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2555 และในปี 2556 ได้รับการแต่งตั้งให้เป็นที่ปรึกษากรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง ด้านการวิจัยโลมา โดยมีหน้าที่ให้คำปรึกษาและข้อเสนอแนะแก่กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง รวมทั้งปฏิบัติงาน อื่นๆ ตามที่ได้รับมอบหมาย และปัจจุบันยังคงทำงานเป็นสัตวแพทย์ประจำโลมาโชว์พัทยา อำเภอบางละมุง จังหวัดชลบุรี

ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่ได้แก่

Singkhum N. and Chansue N. 2016. Sperm Characteristic and Staining Selection for Quality Evaluation in Irrawaddy Dolphin (*Orcaella brevirostris*) in Captivity. The 15th Chulalongkorn University Veterinary Conference (CUVC 2016); 20-22, 2016. Bangkok:321-322.