

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

- หลอดฉีดยา (syringe) ขนาด 1 มิลลิลิตร
- หลอดบดต่อมได้สอง (homogenizer)
- ลูกนับ (counter)
- หลอดเก็บน้ำเชื้อ (eppendorf vial) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร
- อุปกรณ์นับเม็ดเลือดแดง (hemacytometer) พร้อมกระจกปิด (cover glass)
- กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)
- แผ่นสไลด์ (slide) พร้อมกระจกปิด
- เครื่องปั่นสีมาโตคริต (hematocrit centrifuge)
- หลอดคาพิลลารี (capillary tube)
- ไมโครปิเปต (micro pipette) ขนาด 10 ไมโครลิตร

2. การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

- เครื่องไมโครทอม (microtome) พร้อมใบมีด
- เครื่อง Automatic Tissue Processor
- เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)
- วอเตอร์ บาธ (water bath)
- แม่พิมพ์ (mold)

สารเคมี

1. โซเดียมคลอไรด์ (sodium chloride)
2. สีอีโอซิน (eosin)
3. สีนีโกรซิน (nigrosin)
4. โซเดียม ซิเตรต (sodium citrate)

5. ฟอรัมาลิน (formalin)
6. แอลกอฮอล์ (alcohol)
7. ไชลีน (xylene)
8. พาราพลาส (paraplast)

ที่มาของพ่อแม่พันธุ์และฮอร์โมน (Source of broodstock and hormone)

ปลานิล และปลานิลลูกผสม อายุประมาณ 4-6 เดือน เป็นปลาที่เลี้ยงในฟาร์มของเกษตรกรที่เพาะเลี้ยงในบ่อดิน อำเภอพนัสนิคม จังหวัดฉะเชิงเทรา ในสภาพแวดล้อมการเลี้ยงแบบรวมเพศ (mixed sex environment) จากระยะปลานิ้ว (fingering stage) ถึงขนาดตลาด (breeder size) ประมาณ 3-4 เดือน ปลานิลมีน้ำหนักเฉลี่ย 386.03 ± 21.17 เซนติเมตร ขนาดความยาวเฉลี่ย 22.17 ± 1.77 เซนติเมตร

ส่วนปลานิลลูกผสมเกิดจากการผสมระหว่างปลานิลและปลาหมอเทศ (*Oreochromis niloticus* x *Oreochromis mossambicus*) (พรรณศรี จริโมภาส, ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, และอนุสิน อินทร์ควร, 2536) มีน้ำหนักเฉลี่ย 346.09 ± 3.66 เซนติเมตร ขนาดความยาวเฉลี่ย 21.18 ± 0.08 เซนติเมตร

ทำการคัดแยกเพศปลา แล้วลำเลียงมายังโรงเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ภาควิชาวาริชศาสตร์ นำมาพักไว้ในบ่อซีเมนต์ขนาด 1.6×3 เมตร (4.8 ต้น) ให้อาหารสำเร็จรูปสำหรับปลากินพืช ระดับโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ วันละ 2 ครั้ง ประมาณ 5 วัน จากนั้นมาซึ่งน้ำหนักและวัดขนาด แล้วติดฉลาก เพื่อเตรียมไว้สำหรับการฉีดฮอร์โมน

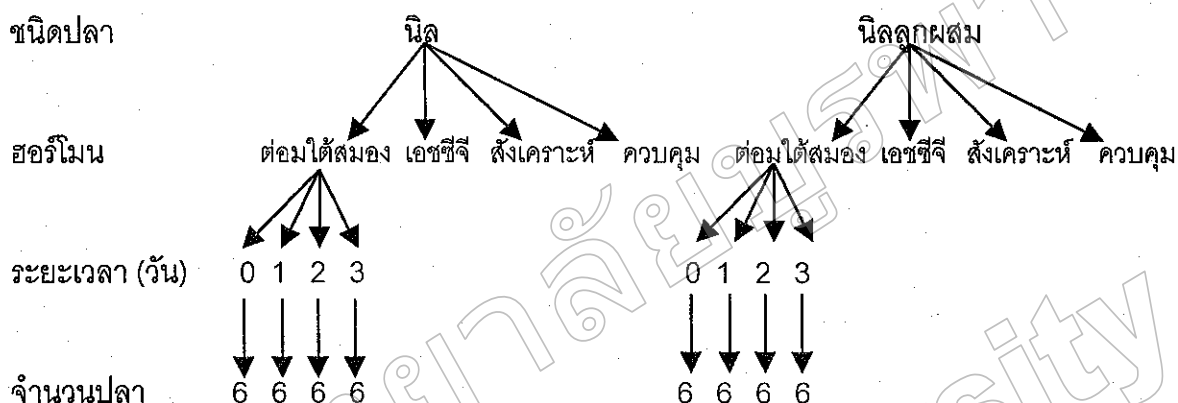
ต่อมาได้สมองปลาจีนน้ำหนักเฉลี่ยปลาต่อม 3.00 กิโลกรัม ซึ่งมาจากตลาดสดเยาวราช ซึ่งแช่ไว้ในอะซีโตน ฮอร์โมนสกัดจากปัสสาวะหญิงมีครรภ์ ชื่อของบริษัทชิกมา เคมิคัล (Sigma Chemical) จำกัด และฮอร์โมนโกนาโดโทรปินรีลีสซิงสังเคราะห์ ชื่อของบริษัทโฮชต์ แมเรียน รุสเซล (Hoechst Marion Roussel) (ประเทศไทย) จำกัด

การทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมน

การทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อของปลานิลและปลานิลลูกผสม โดยฉีดฮอร์โมน 3 ชนิด คือ ต่อมาได้สมอง อัตรา 0.5 โดส ฮอร์โมนสกัดจากปัสสาวะหญิงมีครรภ์ ความเข้มข้น 200 หน่วยสากล ต่อกิโลกรัม และซูพรีแฟกซ์ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม ร่วมกับโมทิลเลียม 5 มิลลิกรัม

ต่ออีกโลกรัม โดยฉีดฮอร์โมนบริเวณครีบหลังของปลาแต่ละกลุ่ม ๆ ละ 6 ตัว หลังจากทำการทดสอบ ฮอร์โมนแต่ละชนิดกับปลาแต่ละกลุ่ม นำผลที่ได้มาเปรียบเทียบกับปลากลุ่มควบคุม เพื่อดูผลของ ฮอร์โมนต่อคุณภาพของน้ำเชื้อ

แบบแผนการทดลอง



การประเมินคุณภาพน้ำเชื้อ

พารามิเตอร์ที่ใช้ทดสอบคุณภาพน้ำเชื้อ ได้แก่ ปริมาณน้ำเชื้อที่รีดออกมาได้ ความเข้มข้นของสเปิร์ม ผลผลิตสเปิร์มทั้งหมด เปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนที่ สเปิร์มมาโตคริต จำนวนสเปิร์มที่มีชีวิต และความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่สด

การหาปริมาณน้ำเชื้อ ทำโดยการรีดน้ำเชื้อมาใส่ในเอพเพนดรอฟ (eppendorf) ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ใช้มีอริตเบา ๆ บริเวณท้องของปลาจากส่วนหน้าถึงส่วนหลัง จะมีน้ำเชื้อไหลออกมา จากนั้นใช้หลอดฉีดยาขนาด 1 มิลลิลิตร ที่ถือไว้ในตำแหน่งใกล้เคียงเพศ ดูดน้ำเชื้อที่รีดออกมาได้ ระหว่างรีดให้ระวังอุจจาระและปัสสาวะปลานิสที่อาจปนเปื้อนในตัวอย่าง เมื่อรีดหมดแล้วให้นำเอพเพนดรอฟ มาวางแช่ในน้ำแข็ง แล้วบันทึกปริมาณน้ำเชื้อที่รีดได้ทันทีก่อนนำไปประเมินคุณภาพต่อไป

ความเข้มข้นของสเปิร์ม คือ จำนวนของสเปิร์ม (spermatozoa) ต่อปริมาตรมิลลิลิตรของน้ำเชื้อ (milt) โดยทำการนับจำนวนสเปิร์มในน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า หลังจากละลายน้ำเชื้อ 100 เท่า ด้วยน้ำกลั่น โดยดูน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร เจือจางด้วยน้ำกลั่น 0.10 มิลลิลิตร (การคำนวณค่าดูจากภาคผนวก)

ผลผลิตสเปิร์มทั้งหมด คือ จำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งหมดต่อน้ำหนักตัวกิโลกรัม คำนวณได้จากปริมาตรน้ำเชื้อที่รวบรวมได้คูณกับความเข้มข้นของสเปิร์ม

เปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่เคลื่อนที่ วัดโดยการประมาณได้กล้องกำลังขยาย 400 เท่า ด้วยการละลายน้ำเชื้อ 50 เท่า (ดัดแปลงจาก Billard & Cosson, 1992 ; Mylonas, Scott, Vermeirssen, & Zohar, 1997) ทำโดยการหยดน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร บนสไลด์แก้วที่สะอาด หยดน้ำกลั่น 0.05 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเพื่อกระตุ้นให้ สเปิร์มเคลื่อนที่ ปิดด้วยแผ่นปิดสไลด์ ทำการวัดทันทีหลังจากที่กระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่

เปอร์เซ็นต์การเคลื่อนที่ วัดจากสเปิร์มที่เคลื่อนที่ไปข้างหน้าหลังจากการถูกกระตุ้น โดยให้เกณฑ์เป็นเปอร์เซ็นต์ (Vuthiphandchai & Yohar, 1999) เช่น 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนสเปิร์มที่ไม่เคลื่อนที่ (immotile sperm) หมายถึง สเปิร์มที่ไม่มีการเคลื่อนที่ไปข้างหน้าหลังจากถูกกระตุ้น

ระยะเวลาการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม เริ่มทำการนับทันทีหลังจากเจือจางน้ำเชื้อจนกระทั่ง สเปิร์มหยุดการเคลื่อนที่ การวิเคราะห์การเคลื่อนที่ให้ทำที่อุณหภูมิห้อง และทำซ้ำ 3 ครั้ง

สเปิร์มาโตคริต คือ ปริมาณเซลล์ที่อัดแน่นต่อปริมาตรน้ำเชื้อทั้งหมด คูณด้วย 100 วัดโดยการปั่นด้วยเครื่องปั่นฮีมาโตคริต (hematocrit centrifuge) 10,000 รอบ ประมาณ 5 นาที หลังจากเจือจางน้ำเชื้อ 2 เท่า (น้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร)

การวัดเปอร์เซ็นต์ของสเปิร์มที่มีชีวิต ทำโดยนำตัวอย่างน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร ย้อมด้วย สีอีโอซิน และไนโกรซิน (eosin and nigrosin) 100 ไมโครลิตร และการคำนวณเปอร์เซ็นต์สเปิร์มที่มีชีวิต โดยการสุ่มนับสเปิร์มที่ไม่ติดสีย้อม ต่อจำนวนสเปิร์มที่สุ่มนับทั้งหมดประมาณ 200 ตัว ภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า (Fribourgh, 1966)

การวัดความสามารถในการปฏิสนธิกับไข่สด โดยรวบรวมไข่จากปลานิลเพศเมียที่ไม่ฉีดฮอร์โมนประมาณ 300-400 ฟองใส่ในขัน แล้วเทน้ำเชื้อที่รวบรวมจากเพศผู้ทั้งหมดลงไป 0.1 มิลลิลิตร ใช้ขันไคน์ให้เข้ากัน เติมน้ำลงไป 100 มิลลิลิตร คนเบา ๆ ประมาณ 2 นาทีแล้วล้างเอา น้ำเชื้อส่วนเกินออก หลังจากแบ่งไข่ออกเป็น 3 กลุ่ม ๆ ละประมาณ 100 ฟอง นำไปฟักประมาณ 8-10 ชั่วโมงเพื่อนับไข่ดี-ไข่เสีย (ไข่ดี คือไข่ที่มีการแบ่งเซลล์ และมรลักษณะไข่)

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

สุ่มตัวอย่างปลานิลทั้งสองชนิดมาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยเปิดช่องท้องของปลาออก แล้วตัดเฉพาะอวัยวะให้มีขนาดไม่เกิน 0.5 เซนติเมตร แช่ไว้ในน้ำยาหรือสารเคมี (fixation) อย่างน้อย 24 ชั่วโมง แล้วนำมาล้างน้ำประปา จากนั้นนำมาขึ้นตอนต่าง ๆ โดยใช้เครื่องมือ (Automatic Tissue Processor) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีมาตรฐานของฮิวสัน (Humason, 1979) (ภาคผนวก)

นำตัวอย่างที่ฝังในพาราฟินมาตัดด้วยเครื่องมือไมโครทอม (microtome) ให้ได้เซกชัน (section) หนาประมาณ 5-6 ไมครอน เรียกว่า paraffin section นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ใช้แผ่นสไลด์ซ้อนตัวอย่างที่สมบูรณ์ขึ้นนำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) ทิ้งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง นำสไลด์ที่มีเซกชัน มาผ่านกระบวนการละลายพาราฟิน (deparaffin) ด้วยไซลีน (xylene) จากนั้นผ่านกระบวนการคืนน้ำเข้า (hydrate) ด้วยแอลกอฮอล์ (กัลยา จำเริญวัฒนะ, 2534) จากนั้นจึงนำไปผ่านการย้อมสีด้วยสีฮีมาโตไซลีน และสีอีโอซิน (hematoxylin and eosin, H & E) หลังจากนั้นจึงผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydrate) ด้วยแอลกอฮอล์ แล้วทำให้ใส (clearing) ด้วยไซลีน แล้วจึงทำสไลด์ถาวรโดยหยดเพอร์มาท์ (permount) ลงบนสไลด์แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์ถาวรที่ได้ไปศึกษาลักษณะต่าง ๆ ทางเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ (ปวีณา กิจสวัสดิ์, 2530)

การวิเคราะห์ข้อมูล

จากแผนการทดลองข้างต้น สามารถสรุปปัจจัยที่เกี่ยวข้องได้ 2 ปัจจัย คือ ชนิดของปลา (ปัจจัยคงที่) และชนิดของฮอร์โมน (ปัจจัยคงที่)

การเก็บตัวอย่างเกี่ยวข้องกับหลายปัจจัย การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบหลายทาง โดยแบบหุ่น (model) ที่เกี่ยวข้องจะเป็นแบบปัจจัยคงที่ทั้งหมด (all fixed factors) ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบหลายปัจจัยคงที่ (analysis of variance, ANOVA model I) แผนการทดลองแบบแฟกทอเรียล (factorial) หรือออร์โธโกนอล (orthogonal) ความผันแปรที่เกิดขึ้น นอกจากจะมาจากแต่ละปัจจัยแล้ว ยังอาจจะมาจากความสัมพันธ์ระหว่างปัจจัยด้วย ทดสอบความแตกต่างด้วยเตอริกกี (turkey) โดยโปรแกรมสำเร็จรูป (statistic package for the social sciences for Window 98 version 10.0)