บทที่ 3

วิธีการทดลอง

วิธีการดำเนินการศึกษา

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ส่วน การทดลองที่ 1 คือการศึกษาสรีรวิทยาการสืบพันธุ์เบื้องต้นของปลากระบอกหัวกลม *Valamugil cunnesius* เพื่อหาข้อมูลพื้นฐานด้านชีววิทยาสรีรวิทยา และการสืบพันธุ์ การทดลองที่ 2 คือการศึกษาผลของชนิดฮอร์โมนต่อการตกไข่และพัฒนาน้ำเชื้อของปลากระบอกหัวกลมเพื่อหาชนิดของฮอร์โมนที่ดีที่สุดในการเร่งความสมบูรณ์เพศของปลากระบอกหัวกลม การทดลองที่ 3 เป็นการทดลองเพาะพันธุ์ปลากระบอกหัวกลมโดยใช้การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนที่ดีที่สุดจากการทดลองที่ 2 เปรียบเทียบกับการทดลองเพาะพันธุ์โดยใช้พ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์เพศจากธรรมชาติและศึกษาการพัฒนาการของตัวอ่อน จากนั้นทำการทดลองอนุบาลลูกปลากระบอกหัวกลมวัยอ่อนจนถึงระยะเหมือนตัวเต็มวัย

การทดลองที่ 1 การศึกษาสรีรวิทยาการสืบพันธุ์เบื้องต้นของปลากระบอกหัวกลม

1.1 รวบรวมพันธุ์ปลากระบอกหัวกลมจากธรรมชาติ บริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ด้วยแหขนาดตา 1 ซม. จากจุดต่าง ๆ คือ ต.คลองบางนางรม อ.เมือง จ. ประจวบคีรีขันธ์ ปากแม่น้ำต.คลองวาฬ อ.เมือง จ. ประจวบคีรีขันธ์ คลองส่งน้ำและบ่อพักน้ำศูนย์พัฒนาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 300 ตัว นำมาศึกษาลักษณะทางชีววิทยาพื้นฐานดังนี้

1.1.1 อัตราส่วนเพศ (sex ratio)

ทำการเปรียบเทียบอัตราส่วนเพศผู้และเพศเมียของปลากระบอกหัวกลมที่จับได้จากธรรมชาติ โดยการผ่าท้องปลาที่จับเพื่อจำแนกเพศและนับจำนวนปลาเพศผู้และเพศเมีย เพื่อใช้ในการประมาณอัตราส่วนระหว่างเพศผู้ต่อเพศเมียของประชากรของปลากระบอกหัวกลมในธรรมชาติ

1.1.2 ความสัมพันธ์ความยาวและน้ำหนัก (length-weight relationship)

ทำการวัดความยาวมาตรฐานหน่วยเป็น (มิลลิเมตร) และชั่งน้ำหนัก (กรัม) ของปลาแต่ละตัวเพื่อใช้ในการหาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนักปลาโดยใช้สมการถดถอยแบบเส้นตรง ทั้งนี้ในการหาความสัมพันธ์ทำการหาความสัมพันธ์แบบแยกเพศตามวิธีการของ Rounsenfeel และ Evarhart (1993)

1.1.3 ดัชนีความสมบูรณ์เพศ (Gonadosomatic index, GSI%)

เมื่อทำการผ่าท้องปลากระบอกหัวกลมทำการแยกระยะปลาเพศผู้และเพศเมียโดยปลาเพศผู้แบ่งเป็น 2 ระยะ คือ immature และ mature ส่วนปลาเพศเมียแบ่งเป็น 5 ระยะ คือ virgin , developing , gravid , spwaning , spent (Kesteven, 1960) ชั่งน้ำหนักถุงน้ำเชื้อหรือรังไข่ของปลาแต่ละตัวเพื่อประมาณค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศโดยคำนวณจากสูตร

$$\text{ดัชนีความสมบูรณ์เพศ (GSI\%)} = \frac{\text{น้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์(กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัว (กรัม)}} * 100\ \%$$

โดยที่ดัชนีความสมบูรณ์เพศใช้เป็นค่าบ่งชี้ถึงความพร้อมในการสืบพันธุ์ของปลาแต่ละระยะ นอกจากนี้ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลาง (ไมครอน) ของไข่ปลาเปรียบเทียบกันในแต่ละระยะการเจริญพันธุ์

1.1.4 ความดกไข่ (Fecundity)

ทำการชั่งน้ำหนักของไข่ปลากระบอกหัวกลมที่จับได้และรังไข่อยู่ในระยะ spawning ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมจะวางไข่และเม็ดไข่แยกตัวออกจากกันแล้ว สุ่มตัวอย่างรังไข่ประมาณ 10% ของน้ำหนักรังไข่โดยสุ่มจากตำแหน่งส่วนหน้า ส่วนกลาง และส่วนท้ายจากนั้นนับจำนวนไข่แล้ว คำนวณกลับเป็นจำนวนไข่ทั้งหมดตามวิธีของอุรุพันธุ์ (2509)

$$\text{จำนวนไข่ทั้งหมด} = \frac{\text{จำนวนไข่จากตัวอย่างที่นับได้} * \text{น้ำหนักไข่ทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักตัวอย่างรังไข่ที่นำมานับ}}$$

หาความสัมพันธ์ระหว่างความดกไข่กับน้ำหนักและความยาวของแม่ปลา ตามวิธีการของ Rounsenfeel และ Evarhart (1993)

1.1.5 การเติบโตและพัฒนาการของรังไข่

ตรวจรังไข่และไข่ปลาที่รวบรวมได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบ่งระยะไข่ตามวิธี

ของ Kesteven (1960) และพัฒนาการของไข่ตามวิธีการของ Kuo (1973) ทำการศึกษามิชญวิทยาเซลสืบพันธุ์ปลากระบอกหัวกลมเพศเมียตามวิธีการของ Coolidge and Howard (1979)

1.1.6 ความสมบูรณ์เพศของเพศผู้

โดยทำการศึกษามิชญวิทยาเซลสืบพันธุ์ปลากระบอกหัวกลมเพศผู้ตามวิธีการของ Coolidge and Howard (1979) ตรวจระยะของอัณฑะปลาเพศผู้ตามวิธีของ F.A.O., (1980) ด้วยกล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบกับขนาดปลา

1.2 ฤดูกาลวางไข่ (Spawning season)

เก็บตัวอย่างทุกเดือน เดือนละ 200 ตัว เป็นระยะเวลา 1 ปี เพื่อตรวจความสมบูรณ์เพศและพัฒนาการในแต่ละเดือนจนครบ 12 เดือน เพื่อหาฤดูกาลสืบพันธุ์โดยพิจารณาจากระยะ spwaning ซึ่งเป็นระยะที่มีความพร้อมในการวางไข่และระยะ spent ซึ่งเป็นระยะที่ปลาวางไข่แล้ว

<u>การทดลองที่ 2</u> ผลของฮอร์โมนบางชนิดต่อการตกไข่และพัฒนาน้ำเชื้อของปลากระบอกหัวกลม

2.1 การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ปลา (ภาพที่ 2)

รวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลาที่มีขนาดตั้งแต่ 11 เซนติเมตรขึ้นไปซึ่งเป็นระยะที่ปลาพร้อมจะสืบพันธุ์ได้จากธรรมชาติ โดยใช้แหที่มีขนาดตาอวน 2 เซนติเมตร เพื่อจับพ่อแม่พันธุ์ปลาขนาดใหญ่ นำมาแยกเพศก่อนปรับสภาพในบ่อซีเมนต์ขนาด 2 x 5 x 1 เมตร^3 จำนวน 2 บ่อ บ่อที่หนึ่งเลี้ยงตัวผู้ความหนาแน่น 3 ตัวต่อตารางเมตร บ่อที่สองเลี้ยงตัวเมีย 3 ตัวต่อตารางเมตร เติมแพลงค์ตอนพืช *Tetraselmis sp* และ *Nanoclolopsis sp.* เพื่อพรางสีน้ำลดอาการเครียดของปลา ใช้ตาข่ายพลาสติกปิดปากบ่อเพื่อป้องกันปลากระโดดออกจากบ่อรักษาระดับความเค็มของน้ำที่ 30 ส่วนในพันส่วน ใช้ยาปฏิชีวนะ sulphamethoxazone ความเข้มข้น 3 ส่วนในล้านส่วน (ppm) และฟอร์มาลีนความเข้มข้น 200 ส่วนในล้านส่วนฆ่าเชื้อและพยาธิภายนอกก่อนเลี้ยงหรือเฉพาะตอนเป็นโรค เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ด้วยอาหารปลากินพืชสำเร็จรูปซึ่งมีคุณค่าทางอาหารดังนี้คือ โปรตีนไม่ต่ำกว่า 15.5% ไขมันไม่ต่ำกว่า 4% ความชื้นไม่มากกว่า 12% และกากไม่มากกว่า 10% เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูปและอาหารมีชีวิต เช่นเคยตาดำ (lusifer) เป็นต้น วันละ 1 ครั้ง จนปลาแข็งแรงเป็นปกติ

2.2 การทดลองกระตุ้นปลาเพศผู้ให้มีความสมบูรณ์เพศด้วยฮอร์โมนชนิดต่างๆ

ทดลองกระตุ้นความสมบูรณ์เพศปลากระบอกตัวผู้โดยใช้ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองและฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิด 17 α - methyltestosterone เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยใช้ปลาเพศผู้ที่ปรับสภาพแล้วจำนวน 12 ตัว ชั่งน้ำหนักก่อนแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัว เพื่อนำไปทดสอบด้วยฮอร์โมนชุดควบคุม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 0.5% ethylalcohol 0.5 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 ฮอร์โมนสังเคราะห์ 17 α - methyltestosterone ในอัตรา 0.1 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว100 กรัม โดยละลายฮอร์โมนใน 0.5 % ethylalcohol 0.5 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 3 ชุดควบคุม 2 0.9 % NaCl 0.5 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 ต่อมใต้สมองปลากระบอกความเข้มข้น 1 โดส ละลายใน 0.9 % NaCl 0.5 มิลลิลิตร การเตรียมฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองทำโดยนำปลาที่จะเก็บต่อมใต้สมองซึ่งมีน้ำหนักเท่ากับปลากระบอกที่ต้องการกระตุ้นให้สืบพันธุ์จากนั้นวางปลาบนเขียงจับส่วนท้องและกดให้ท้องปลาติดกับเขียงให้มั่น ใช้มีดถากตรงส่วนของกระโหลกให้เอียงไปทางตาเลยให้ถึงมุมปาก แล้วเปิดกระโหลกออก ใช้สำลีเช็ดไขมันและเลือดออกให้หมด ใช้ปากคีบดึงเอามันสมองออกจะเห็นต่อมใต้สมองซึ่งเป็นต่อมกลมขาวขนาดเล็กอยู่ใต้สมอง

ฉีดฮอร์โมนและสารละลายที่ใช้ในการละลายฮอร์โมนเข้ากล้ามเนื้อบริเวณโคนครีบหลังของปลาแต่ละกลุ่ม จากนั้นแยกปลาแต่ละกลุ่มใส่ถังทดลองไฟเบอร์กลาสขนาด 2 ตัน (1 x 2 x 1 เมตร) ให้อาหาร วันละ 1 ครั้ง ถ่ายเทน้ำตลอดเวลา เมื่อครบกำหนด 7 วัน ตรวจสอบผลของฮอร์โมนต่อการกระตุ้นความสมบูรณ์เพศของปลาโดยผ่าเอาอัณฑะออกมาทำความสะอาด ชั่งน้ำหนัก ตรวจลักษณะภายนอกและตรวจความสมบูรณ์ของน้ำเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุม

2.3 การทดสอบปลากระบอกเพศเมียด้วยฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ

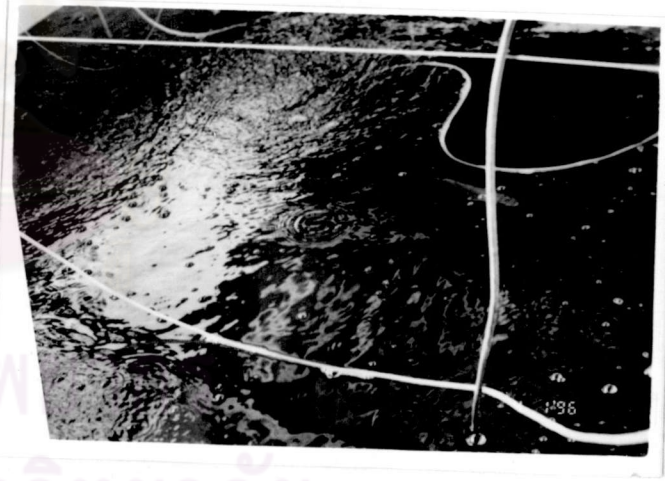
ทดสอบกระตุ้นความสมบูรณ์ของปลากระบอกหัวกลมเพศเมียด้วยฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ 3 ชนิด คือ ฮอร์โมนจากต่อมใต้สมอง ฮอร์โมนสกัด HCG ที่มีชื่อทางการค้าว่า puberogen ฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิด LHRHa ชื่อการค้า suprefact ร่วมกับ domperidone ชื่อการค้า motilium ทำการทดลองโดยสุ่มปลาเพศเมียที่ปรับสภาพแล้ว 12 ตัว ชั่งน้ำหนัก แบ่งเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 3 ตัว นำไปทดสอบฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ดังนี้

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

a

b

c



d

รูปที่ 2 การจับและปรับสภาพพ่อแม่พันธุ์ปลากระบอกหัวกลม

a. การจับปลากระบอกหัวกลมด้วยการเหวี่ยงแห b. การจับปลากระบอกโดยใช้อวนติด

c. พ่อแม่พันธุ์ปลากระบอกหัวกลมในบ่อพ่อแม่พันธุ์ขนาด 15 ตัน

d. การปรับสภาพพ่อแม่พันธุ์ปลากระบอกหัวกลมโดยใช้สาหร่ายเซลล์เดียวพรางสีน้ำ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 1 ชุดควบคุม ฉีดปลาด้วย 0.9 % NaCl 0.5 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 2 ฉีดปลาด้วยฮอร์โมนสกัด HCG ในระดับความเข้มข้น 20 IU ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม โดยละลาย HCG ใน 0.9% NaCl 0.5 มิลลิกรัม

กลุ่มที่ 3 ฉีดด้วย LHRH analogue 20 ไมโครกรัม และdomperidone 5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม โดยละลาย LHRHa และ domperidone ใน 0.9 % NaCl 0.5 มิลลิลิตร

กลุ่มที่ 4 ฉีดด้วยต่อมใต้สมองปลากระบอก 3 โดสโดยละลายต่อมใต้สมองบดใน 0.9 % NaCl 0.5 มิลลิลิตร เตรียมต่อมใต้สมองโดยวิธีการเดียวกับการเตรียมในข้อ 2.2

ฉีดฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ และ 0.9% NaCl เข้ากล้ามเนื้อบริเวณโคนครีบหลังของปลาแต่ละกลุ่ม จากนั้นแยกปลาแต่ละกลุ่มใส่ถังทดลองไฟเบอร์กลาสขนาด 2 ตัน (1x2x1 เมตร) ให้อาหารวันละ 1 ครั้ง ถ่ายเทน้ำตลอดเวลา เมื่อครบกำหนด 7 วัน ตรวจสอบผลของฮอร์โมนต่อการกระตุ้นความสมบูรณ์เพศของปลา ตรวจการตกไข่โดยผ่าเอารังไข่ออกมาชั่งน้ำหนักหาดัชนีความสมบูรณ์เพศ ตรวจระยะไข่ผ่านกล้องจุลทรรศน์เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม

2.4 การทดสอบทางสถิติ

การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอดวิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน ตรวจสอบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (อภิญญา วงศ์กิดาการ, 2531 และ จรัญ จันทลักขณา, 2534)

<u>การทดลองที่ 3</u> การทดลองเพาะพันธุ์ปลากระบอกหัวกลม

3.1 การเหนี่ยวนำให้พ่อแม่พันธุ์สมบูรณ์เพศ

คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลากระบอกที่แข็งแรงและมีความสมบูรณ์เพศจำนวนปลาเพศผู้18 ตัว เพศเมีย 6 ตัวแล้วสุ่มแบ่งเป็น 2 ชุด อัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 3 ต่อ 1 ชุดที่ 1 เป็นชุดควบคุมพ่อแม่พันธุ์สมบูรณ์เพศตามธรรมชาติโดยปลาเพศผู้อยู่ในระยะ mature ส่วนปลาเพศเมียอยู่ในระยะ spawning ชุดที่ 2 ฉีดฮอร์โมนที่เหมาะสมจากการทดลองที่ 2 แก่พ่อแม่พันธุ์ การจัดการพ่อแม่พันธุ์เหมือนใน 2.1 ตรวจความสมบูรณ์เพศทุก 7 วัน จนพ่อแม่พันธุ์มีความพร้อมที่จะผสมพันธุ์ กล่าวคือตัวเมียจะมีลักษณะท้องบวมเกล็ดใต้ท้องแยก ตัวผู้บีบเพียงเบา ๆ ก็จะมีน้ำเชื้อไหลออกมา

3.2 การทดลองผสมเทียมปลากระบอก

นำพ่อแม่พันธุ์ที่พร้อมผสมพันธุ์ใส่บ่อผสมพันธุ์ขนาด 1 ตัน (1x1x1 เมตร) อัตราการปล่อยตัวผู้ต่อตัวเมียเท่ากับ 3 ต่อ 1 ให้อากาศและถ่ายเทน้ำตลอดเวลาให้มีการผสมแบบเลียนแบบธรรมชาติ กรณีที่ไม่มีการผสมภายใน 24 ชั่วโมง ทำการรีดไข่และน้ำเชื้อผสมเทียมแบบแห้ง

3.3 การอนุบาลลูกปลากระบอกวัยอ่อน

รวบรวมไข่ที่ผสมแล้วจากข้อ 3.2 ด้วยสวิงตาถี่เพื่อฟักในถังขนาด 1 ตัน (1x1x1 เมตร) บรรจุน้ำที่มีความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน สุ่มจำนวนไข่ ตรวจการพัฒนาการของไข่และตัวอ่อนทุกระยะจนกระทั่งฟักเป็นตัวผ่านกล้องจุลทรรศน์ แยกลูกปลาที่ฟักเป็นตัวไปอนุบาลด้วยอาหารต่าง ๆ ดังตารางที่ 2

ตรวจผลการทดลองโดยทำการประมาณค่าต่อไปนี้ คือ จำนวนไข่ อัตราการผสม อัตราฟัก อัตราการรอด พัฒนาการของไข่และตัวอ่อน การทดลองนี้วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด วิเคราะห์ข้อมูลด้วยการวิเคราะห์ความแปรปรวน

ตารางที่ 2 อาหารที่ใช้อนุบาลปลากระบอกวัยอ่อน

อาหาร	อายุหลังการฟัก (วัน) 1	5	10	15	20	25	30
Tetraselmis sp.	<----------	----------	----------	----------	----------	----------	---------->
Nanoclolopsis sp	<----------	----------	----------	----------	----------	----------	---------->
โรติเฟอร์		<----------	----------	----------	----------	----------	---------->
อาร์ทีเมีย			<----------	----------	----------	----------	---------->
เคยตาดำ					<----------	----------	---------->
อาหารปลากินพืช						<----------	---------->

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย