

อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุและอุปกรณ์

1. พ่อแม่พันธุ์ปลาทอมไทย ขนาดน้ำหนัก 100 กรัม
2. อุปกรณ์สำหรับฉีดกระตุ้นฮอร์โมน
 - 2.1 ฮอร์โมนสังเคราะห์ LHRHa (ชื่อทางการค้า Suprefact)
 - 2.2 ยาเสริมฤทธิ์ (ชื่อทางการค้า Motilium-M)
 - 2.3 โซริงค์พร้อมเข็มเบอร์ 24 ขนาด 1 มิลลิลิตร
3. บ่อซีเมนต์กลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.20 เมตร
4. บ่อซีเมนต์ขนาด 4×5 เมตร
5. ตู้กระจกขนาด 25×15×15 เซนติเมตร
6. เครื่องชั่งทศนิยม 2 และ 4 ตำแหน่ง
7. กล้อง Compound microscope ยี่ห้อ Nikon รุ่น Eclipse E200
8. เครื่อง DO meter และ pH meter ยี่ห้อ Hanna รุ่น Hi 98196
9. กล้องวัดความเค็ม Refractometer ยี่ห้อ ATC รุ่น FG201
10. อาหารสำเร็จรูปโปรตีน ไม่น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์
11. กระชังขนาด 0.5 x 0.5 x 0.5 เมตร

วิธีการทดลอง

วิธีการทดลองในครั้งนี้ ใช้สารสกัดกาวเครือขาวในการเหนี่ยวนำเพศเมียให้แก่ปลาทอมไทย ด้วยวิธีการต่างกัน 2 วิธี ได้แก่ วิธีแช่ไข่ปลาในสารสกัดหยาบกาวเครือขาว และวิธีการผสมสารสกัดหยาบกาวเครือขาวในอาหารอนุบาลลูกปลา

การทดลองเหนี่ยวนำเพศเมียให้แก่ปลาทอมไทย โดยวิธีแช่ไข่ในสารสกัดหยาบกาวเครือขาว ที่ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ

1. การเตรียมสารสกัดหยาบกาวเครือขาว

เตรียมสารสกัดหยาบกาวเครือขาว ประยุกต์วิธีการเตรียมสารสกัดหยาบจากศศิธร วุฒินิชย์ (2547 : 72 - 81) โดยนำหัวกาวเครือขาวมาหั่นเป็นชิ้นบาง ๆ นำไปอบแห้งในตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เมื่อแห้งดีแล้วจึงบดละเอียดด้วยเครื่องบด (Blender) จากนั้นชั่งผงกาวเครือขาวจำนวน 40 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer Flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำเอทิลแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ 95 ปริมาตร 150 มิลลิลิตร แล้วนำไปตั้ง

บนเครื่องเขย่าอัตโนมัติ (Automatic Shaker) นาน 72 ชั่วโมง นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง และนำเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำเก็บใส่ขวดสีชา (น้ำที่ 1) จากนั้นเติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตรในขวดรูปชมพู่อีกครั้ง แขนาน 12 ชั่วโมง กรองเอาส่วนที่เป็นน้ำเก็บใส่ขวดสีชา (น้ำที่ 2) แล้วรวบรวมผงขาวเครื่องขาวทั้งหมดในขวด รูปชมพู่ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 1 ลิตร เติมน้ำกลั่นพอท่วม ให้ความร้อน 50 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที แล้วกรองเอาแต่ส่วนที่เป็นน้ำเก็บในขวดสีชา (น้ำที่ 3) จากนั้นนำสารสกัดทั้งหมด (น้ำที่ 1 - 3) ไปตกตะกอนด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 5,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไประเหยตัวทำละลายออกด้วยเครื่องแช่เยือกแข็งแบบสูญญากาศ (Freeze Dry) จนกระทั่งสารสกัดดังกล่าวแปรรูปเป็นผงสีกดเก็บในขวดทึบแสง เก็บรักษาในตู้ดูดความชื้น

2. การเตรียมไข่ปลาทดลอง

ทำการเพาะพันธุ์ปลาหมอไทยด้วยวิธีฉีดฮอร์โมนกระตุ้นการวางไข่ โดยใช้พ่อแม่ปลาหมอไทยที่มีอายุ 1 ปี น้ำหนักเฉลี่ย 100 ± 22 กรัม ที่มีความสมบูรณ์เพศ จากสาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลตะวันออก กำหนดความเข้มข้นของฮอร์โมน LHRHa (Suprefact) ที่ฉีดให้ปลาเพศเมียในอัตรา 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ (Motilium-M) อัตรา 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ส่วนเพศผู้กำหนดฉีดฮอร์โมน LHRHa ในอัตรา 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ (Motilium-M) อัตรา 5 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม จากนั้นปล่อยให้พ่อแม่ผสมพันธุ์กันเองโดยธรรมชาติในถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 1 ตัน ที่มีระบบน้ำไหลผ่านตลอดโดยมีอัตราส่วนปลาเพศเมียต่อปลาเพศผู้เท่ากับ 1:2 หลังจากปล่อยให้ปลาผสมพันธุ์ผ่านไป 8 ชั่วโมง ใช้สวิงผ้าโอล่อนแก้วรวบรวมไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิซึ่งลอยอยู่ผิวน้ำเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิสังเกตจากลักษณะสีของไข่ปลาหมอไทยที่ได้รับการผสมกับน้ำเชื้อเพศผู้จะมีสีเหลืองอ่อนใสโปร่งแสง ส่วนลักษณะสีของไข่ปลาหมอไทยที่ไม่ได้รับการผสมกับน้ำเชื้อเพศผู้จะมีสีเหลืองอ่อนทึบแสง

3. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) ประกอบด้วย 5 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ (Replication) ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 แซ่ไข่ปลาหมอไทยในสารสกัดหยาบขาวเครื่องขาว ที่ระดับความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อลิตร (กลุ่มควบคุม)

ชุดการทดลองที่ 2 แซ่ไข่ปลาหมอไทยในสารสกัดหยาบขาวเครื่องขาว ที่ระดับความเข้มข้น 7.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 3 แช่ไข่ปลาหมอไทยในสารสกัดหยาบกวาวเครือขาว ที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 แช่ไข่ปลาหมอไทยในสารสกัดหยาบกวาวเครือขาว ที่ระดับความเข้มข้น 22.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

ชุดการทดลองที่ 5 แช่ไข่ปลาหมอไทยในสารสกัดหยาบกวาวเครือขาว ที่ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อลิตร

4. วิธีการทดลอง

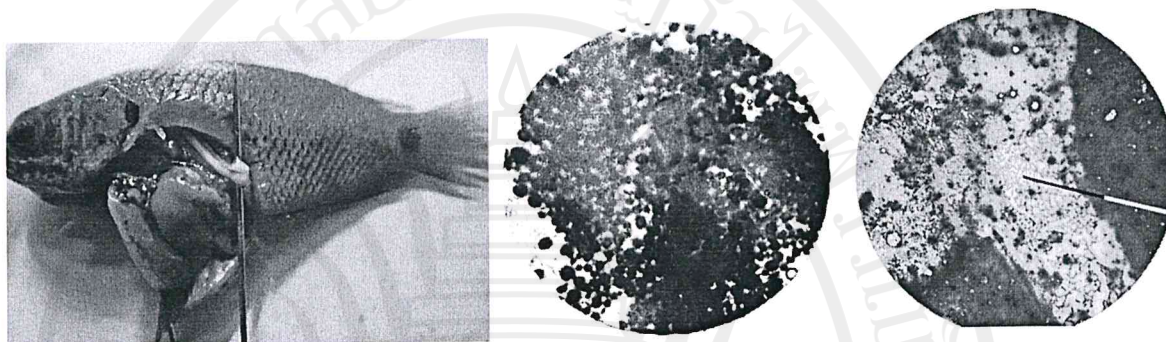
4.1 การแช่ไข่ในสารสกัดกวาวเครือขาว

สุ่มไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ ใส่ในกะละมังพลาสติกทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 45 เซนติเมตร จำนวน 15 ใบ ๆ ละ 1,000 ฟอง โดยกะละมังแต่ละใบมีปริมาตรน้ำ 10 ลิตร (ความหนาแน่นของไข่ 100 ฟองต่อลิตร) จากนั้นสุ่มชุดการทดลองให้แก่อะละมังแต่ละใบตามระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบกวาวเครือขาว 5 ระดับ ได้แก่ 0, 7.5, 15, 22.5 และ 30 มิลลิกรัมต่อลิตร แต่ละระดับทำ 3 ซ้ำ แล้วแช่ไข่ทิ้งไว้ในน้ำที่มีสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวต่าง ๆ ดังกล่าวเป็นเวลานาน 4 วันก่อนย้ายลูกปลาที่ฟักเป็นตัวไปอนุบาลต่อบ่อซีเมนต์

4.2 การอนุบาลลูกปลาและการเก็บข้อมูล

หลังจากแช่ไข่ปลาหมอไทยในสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวครบ 4 วัน ตรวจนับจำนวนลูกปลาแรกฟักเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัว จากนั้นรวบรวมลูกปลาแรกฟักไปอนุบาลในถังไฟเบอร์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เมตร จำนวน 15 ใบตามชุดการทดลอง การอนุบาลในระยะนี้ให้ลูกปลากินอาร์ทีเมียเป็นอาหารวันละ 2 ครั้ง (08.00 น. และ 17.00 น.) เมื่ออนุบาลครบ 7 วัน สุ่มลูกปลา (10 เปอร์เซ็นต์) จากแต่ละถังมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาวตัวเริ่มต้นก่อนนำไปเลี้ยงต่อบ่อคอนกรีตทรงกลมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.2 เมตรที่มีปริมาตรน้ำ 203 ลิตร จำนวน 15 บ่อตามชุดการทดลอง แต่ละบ่อมีลูกปลาหมอไทย 300 ตัว (1.5 ตัวต่อลิตร) ให้ลูกปลากินอาหารสำเร็จรูปโปรตีนไม่น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ในอัตรา 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง (08.00 น. และ 17.00 น.) ตลอดการทดลอง และเสริมไรแดงวันละ 1 ครั้งในปริมาณ 15 กรัมต่อบ่อ ระหว่างที่เลี้ยงทำการตรวจสอบคุณภาพน้ำด้านอุณหภูมิ ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำ และค่าความเป็นกรดด่างของน้ำทุกสัปดาห์ด้วยเครื่องวัดคุณภาพน้ำภาคสนาม (Hanna รุ่น HI 98196) เมื่อเลี้ยงลูกปลาจนครบ 49 วัน บันทึกผลของแต่ละชุดการทดลอง โดยนับจำนวนลูกปลาที่รอดเพื่อคำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดตาย ชั่งน้ำหนักและวัดความยาว เพื่อประเมินการเจริญเติบโต และสุ่มปลาจากแต่ละชุดการทดลอง (10 เปอร์เซ็นต์) มาเปิดช่องท้องและนำอวัยวะสืบพันธุ์ที่มีลักษณะเป็น 2 เส้น หรือ 2 พู ยึดแนบติดกับผนังช่องท้องภายใน ใช้กรรไกรผ่าตัด ตัดอวัยวะสืบพันธุ์

และใช้ปากคีบอวัยวะสืบพันธุ์ออกมาวางลงบนกระจกสไลด์แก้ว หยดสีย้อมอะซิโตนคามีน จำนวน 1 - 2 หยด ลงบนอวัยวะสืบพันธุ์ และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า (ภาพประกอบ 8)



(ก)

(ข)

(ค)

ภาพประกอบ 8 (ก) การแยกอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad) จากปลาทดลองมาตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (ข) Ovary (เพศเมีย) และ (ค) Testis (เพศผู้)

4.3 การรวบรวมข้อมูล

นำข้อมูลต่างๆ ที่บันทึกไว้ในข้อ 3.2.4.2 มาคำนวณหาค่าเฉลี่ยตามสูตรต่างๆ ดังนี้
เปอร์เซ็นต์การฟัก (Hatching %)

$$= \frac{\text{จำนวนไข่ที่ฟักเป็นตัว (ฟอง)}}{\text{จำนวนไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ (ฟอง)}} \times 100$$

เปอร์เซ็นต์การรอดตาย (Survival; %)

$$= \frac{\text{จำนวนลูกปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)}}{\text{จำนวนลูกปลาเริ่มต้น (ตัว)}} \times 100$$

น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (Weight Gain; กรัม)

$$= \text{น้ำหนักปลาเฉลี่ยสุดท้าย} - \text{น้ำหนักปลาเฉลี่ยเริ่มต้น}$$

อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific Growth Rate, SRG) (เปอร์เซ็นต์/ตัว)

$$= \frac{(\ln \text{ น้ำหนักปลาเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง} - \ln \text{ น้ำหนักปลาเริ่มต้น}) \times 100}{\text{ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)}}$$

เปอร์เซ็นต์เพศเมีย (%)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาที่เป็นเพศเมีย (ตัว)}}{\text{จำนวนปลาที่นำมาตรวจสอบเพศ (ตัว)}} \times 100$$

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลด้านการรอดตาย การเจริญเติบโต และเปอร์เซ็นต์เพศเมียที่ได้ของทุกชุดการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance; ANOVA) เพื่อหาความแตกต่างทางสถิติ และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

การทดลองเหนี่ยวนำเพศเมียให้แก่ปลาหมอไทย โดยวิธีผสมสารสกัดหยาบกวาวเครือในอาหารที่ความเข้มข้นต่างกัน 5 ระดับ

1. วางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ สุ่มตลอด (Completely Randomized Design; CRD) การทดลองประกอบด้วย 5 ชุดการทดลอง (Treatment) แต่ละชุดการทดลองมี 3 ซ้ำ (Replication) ดังนี้

- ชุดการทดลองที่ 1 สารสกัดหยาบกวาวเครือขาว 0 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 2 สารสกัดหยาบกวาวเครือขาว 100 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 3 สารสกัดหยาบกวาวเครือขาว 150 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 4 สารสกัดหยาบกวาวเครือขาว 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม
- ชุดการทดลองที่ 5 สารสกัดหยาบกวาวเครือขาว 250 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม

2. การเตรียมอาหารทดลอง

ขั้นตอนการผสมสารสกัดหยาบกวาวเครือขาวในระดับ 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ปฏิบัติดังนี้

2.1 ชั่งปลาป่น 750 กรัม และรำละเอียด 250 กรัม นำมาผสมคล้าให้เข้ากันดี จากนั้นนำไปร่อน ผ่านตะแกรงขนาดตา 0.6 มิลลิเมตร เพื่อแยกกากอาหารที่มีขนาดใหญ่ออก

2.2 ชั่งสารสกัดหยาบปริมาณ 100, 150, 200 และ 250 มิลลิกรัม ตามชุดการทดลอง

2.3 ละลายสารสกัดหยาบที่ชั่งไว้ในข้อ 2 แต่ละปริมาณ ด้วยน้ำสะอาดปริมาตร 100 มิลลิลิตร

2.4 นำสารละลายในข้อ 3 ไปผสมให้เข้ากันดีกับอาหารในข้อที่ 1 จากนั้นตากให้แห้งในที่ร่มอย่างน้อย 6 ชั่วโมง ก่อนนำไปให้ปลาทดลองกิน (อาหารสำหรับทุกชุดการทดลองจะถูกเก็บรักษาไว้ในตู้เย็น)

3. การเตรียมหน่วยทดลอง

3.1 การเตรียมอุปกรณ์ทดลอง ในช่วง 28 วันแรกของการทดลอง ภาชนะที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ ตู้กระจกขนาด $38 \times 60 \times 38$ เซนติเมตร จำนวน 15 ใบ เติมน้ำจืดสะอาดลงในแต่ละตู้ให้ได้ความสูงของน้ำ 22 เซนติเมตรเท่ากันทุกตู้ และใส่หัวทรายตู้ละ 1 หัว ให้อากาศผ่านหัวทรายเบา ๆ แต่หลังจาก 28 วันจะย้ายปลาทดลองไปเลี้ยงต่อในกระชังอวนเขียวที่มีโครงทำด้วยท่อพีวีซี ขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เมตร ซึ่งแขวนลอยอยู่ในบ่อซีเมนต์ที่มีระบบน้ำไหลผ่านตลอด

3.2 การเตรียมปลาทดลอง ปลาทดลองคือลูกปลาหมอไทยอายุ 2 สัปดาห์ จำนวน 1,500 ตัว ที่ได้มาจากการเพาะพันธุ์โดยวิธีฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้ผสมพันธุ์และวางไข่ในโรงเพาะฟักของสาขาวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรมการเกษตร ส่วนการอนุบาลในช่วงอายุ 3 - 14 วัน ให้อาหารประเภทโรติเฟอร์และไข่แดงคั้นสุกบดละเอียด ละลายน้ำสะอาดทั่วบ่ออนุบาล

4. วิธีการทดลอง

เริ่มโดยการสุ่มลูกปลา จำนวนตู้ละ 50 ตัว และให้อาหารทดลองที่เตรียมไว้ กำหนดให้ปลากินอาหารทดลองวันละ 4 ครั้ง ได้แก่ เวลา 07.00 น. 10.30 น. 14.00 น. และ 17.30 น. จนครบ 28 วัน โดยในสัปดาห์แรกให้อาหาร 30 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว สัปดาห์ที่ 2 ให้อาหาร 20 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และสัปดาห์ที่ 3 - 4 ให้อาหาร 15 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว หลังจากเสร็จสิ้นอาหารผสมฮอร์โมนแล้ว ทำการย้ายปลาในทุกชุดการทดลองไปเลี้ยงต่อในกระชังอวนเขียวที่มีโครงทำด้วยท่อพีวีซี ขนาด $0.5 \times 0.5 \times 0.5$ เมตร และแขวนลอยอยู่ในบ่อซีเมนต์ที่มีระบบน้ำไหลผ่านตลอด โดยอาหารที่ให้ในกระชัง ได้แก่ อาหารเม็ดสำเร็จรูป ในอัตรา 10 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว จนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง

5. การบันทึกข้อมูลและการวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อปลาทดลองมีอายุครบ 60 วัน ทำการนับจำนวนปลาทดลองที่เหลือทั้งหมดในแต่ละกระชังทดลอง เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดตาย แล้วสุ่มปลาจากแต่ละกระชัง จำนวน

30 เปอร์เซ็นต์ ของปลาทดลองที่เหลือในแต่ละกระชัง มาชั่งน้ำหนักและความยาวตัว เพื่อประเมินการเจริญเติบโต จากนั้นสุ่มปลาในแต่ละกระชังมา 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อตรวจสอบเพศตามวิธีที่กล่าวไว้ ส่วนการคำนวณข้อมูลด้านการรอดตาย การเจริญเติบโตด้านต่าง ๆ และเปอร์เซ็นต์ปลาเพศเมียตามวิธีที่ได้กล่าวไว้ในข้อ 4.3

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี