บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. แหล่งพ่อ-แม่พันธุ์

ดำเนินการทดลองเพื่อศึกษากระบวนการผลิตปลาหมอไทยด้วยวิธีไจโนเจเนซีส ระหว่างเดือนกรกฎาคม 2546 ถึงพฤศจิกายน 2546 โดยคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาหมอไทยอายุ 5 เดือน จากบ่อเลี้ยงของเกษตรกรในอำเภอท่าศาลา จังหวัดนครศรีธรรมราชที่มีความสมบูรณ์พันธุ์พร้อมที่จะผสมเทียมโดยเพศเมียมีท้องอูมนิ่ม ติ่งเพศมีสีชมพูเรื่อ ๆ เพศผู้เมื่อรีดเบา ๆ บริเวณช่องเพศจะมีน้ำเชื้อสีขาวขุ่นไหลออกมา นำพ่อแม่พันธุ์ปลาหมอไทยมาพักในกระชังมุ้งสีฟ้าขนาด 5x5x1.5 เมตร ในอัตราความหนาแน่นไม่เกิน 25 ตัวต่อตารางเมตร โดยกางกระชังในบ่อซีเมนต์ขนาด 10x10x1.5 เมตร ใส่น้ำลึก 1 เมตร ให้อากาศตลอดเวลา ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ในระยะเวลานานไม่เกิน 1 เดือน เพื่อให้ไข่ปลาหมอไทยในแต่ละการทดลองมีคุณภาพใกล้เคียงกัน ให้อาหารเม็ดสำหรับปลาดุก (โปรตีนไม่ต่ำกว่า 30 %) วันละ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และถ่ายน้ำสัปดาห์ละสองครั้ง ๆ ละ 25 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาในครั้งนี้ใช้น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวในการกระตุ้นไข่ปลาหมอไทย จึงนำพ่อพันธุ์ปลาตะเพียนขาวขนาดประมาณ 300–500 กรัม จำนวน 5 ตัว จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดตรัง มาเลี้ยงในถังไฟเบอร์กลาสขนาด 1.5 ตัน ให้อากาศตลอดเวลา ที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ให้อาหารเม็ดสำหรับปลาดุก (โปรตีนไม่ต่ำกว่า 30 %) วันละ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และถ่ายน้ำสัปดาห์ละสองครั้ง ๆ ละ 25 เปอร์เซ็นต์

2. การเตรียมไข่ปลาหมอไทย

เลือกแม่พันธุ์ที่มีไข่แก่เต็มที่โดยพิจารณาจาก ท้องอูมนิ่ม ติ่งเพศมีสีชมพูเรื่อ ๆ (อุทัยรัตน์, 2538) นำมากระตุ้นให้วางไข่ โดยการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ LH-RH analogue (suprefact) 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม ผสมด้วย domperidone (motilium) 1 เม็ด (10 มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนักแม่ปลา 2 กิโลกรัม โดยฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณใกล้ครีบหลัง หลังจากนั้นประมาณ 6-8 ชั่วโมง ทำการทดสอบการตกไข่ของแม่ปลา โดยกดเบา ๆ ที่ท้อง หากมีไข่หลุดร่วงออกมาโดยง่าย แสดงว่าพร้อมที่จะรีดไข่ได้ เนื่องจากในแต่ละชุดการทดลองใช้ไข่ปลาหมอไทยประมาณ

150,000-200,000 ฟอง จึงรีดไข่จากแม่ปลา 5 ตัว ลงในภาชนะที่แห้งคลุกเคล้าไข่ให้เข้ากันด้วยขนไก่ ไข่จากแม่ปลา 5 ตัว เพียงพอต่อการทดลองในแต่ละครั้ง เพราะแม่ปลาหมอไทยแต่ละตัวจะรีดไข่ได้ประมาณ 30,000-40,000 ฟอง เนื่องจากไข่ปลาหมอไทยมีคุณสมบัติเป็นไข่ลอย จึงต้องแบ่งไข่ปลาหมอไทยใส่ในถุงผ้าโอล่อนแก้ว ขนาด 5 x 10 เซนติเมตร ถุงละประมาณ 0.5 กรัม (2,000-3,000 ฟอง) ในขั้นตอนการช็อคไข่ เพื่อทำให้ไข่ปลาหมอไทยจมอยู่ในน้ำ เพื่อให้ไข่ได้รับอุณหภูมิอย่างทั่วถึงตามระดับอุณหภูมิที่กำหนด

3. การเตรียมน้ำเชื้อ

ในการทดลองใช้น้ำเชื้อจาก 2 แหล่ง คือ น้ำเชื้อจากปลาตะเพียนขาว และน้ำเชื้อจากปลาหมอไทย (ชุดควบคุม) การเตรียมน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาว เลือกปลาตะเพียนขาวที่เมื่อรีดเบา ๆ บริเวณช่องเพศแล้วมีน้ำเชื้อสีขาวขุ่นไหลออกมา รีดน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวลงภาชนะที่แห้ง แล้วเจือจางด้วย Ringer's solution ในอัตราส่วนน้ำเชื้อ ต่อ Ringer's solution โดยปริมาตรเท่ากับ 1:100 เพื่อรักษาสภาพน้ำเชื้อ (Na-Nakorn *et al*., 1993) นำน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ใน petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร แล้วนำไปฉายรังสี ultraviolet นาน 1 นาที เก็บน้ำเชื้อที่ฉายรังสีแล้วในอุณหภูมิห้อง (นวลมณี, 2537)

การเตรียมน้ำเชื้อปลาหมอไทย กระตุ้นพ่อพันธุ์ปลาหมอไทย โดยการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ LH-RH analogue (suprefact) 10 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักพ่อปลา 1 กิโลกรัม ผสมด้วย domperidone (motilium) 1 เม็ด (10 มิลลิกรัม) ต่อน้ำหนักพ่อปลา 2 กิโลกรัม หลังจากนั้นประมาณ 6 ชั่วโมง ผ่าท้องปลาเพื่อเก็บถุงน้ำเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้อง

4. การฉายรังสีน้ำเชื้อ

ใช้หลอดอัลตราไวโอเลต (ultraviolet, UV) กำลังหลอด 15 วัตต์ เป็นแหล่งให้รังสีอัลตราไวโอเลต โดยติดตั้งหลอดไว้ที่ผนังด้านบนของตู้เหล็ก ให้น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวใน petri dish กับหลอดมีระยะห่างเท่ากับ 39.5 เซนติเมตร (ปริมาณรังสี 11.8 mJ cm^{-2}) ฉายรังสีนาน 1 นาที (นวลมณี, 2537; Pongthana *et al*., 1995)

5. การผสมเทียม

นำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ฉายรังสีแล้วผสมกับไข่ปลาหมอไทยที่อยู่ในถุงผ้าโอล่อนแก้ว แล้วนำไปจุ่มลงในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 29 องศาเซลเซียส ซึ่งน้ำจะกระตุ้นให้น้ำเชื้อผสมกับไข่ โดยนับเวลาหลังผสม ณ จุดนี้เป็น 0 นาทีหลังการผสมก่อนนำไปทำการทดลองโดยการช็อค

6. อุปกรณ์ช็อคด้วยความเย็น

ใช้อ่างควบคุมความเย็น (Polyscience, USA, Model 96xx) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิได้ระหว่าง 0-40 องศาเซลเซียส

7. การฟักไข่

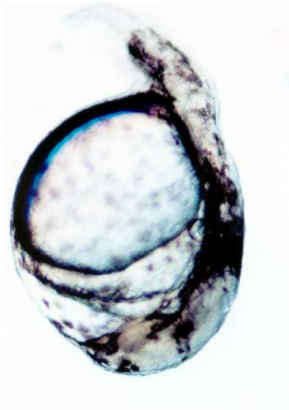
สุ่มนับไข่ที่ผสมแล้วทั้งที่ผ่านการช็อค และไม่ผ่านการช็อคจากถุงผ้าโอล่อนแก้วถุงละ 300 ฟอง มาฟักแยกกันแต่ละถุงในกะละมังพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ใส่น้ำ 300 มิลลิลิตร ไม่มีการให้อากาศระหว่างการฟักไข่เนื่องจากไข่ปลาหมอไทยเป็นไข่ลอยที่ผิวน้ำจึงได้รับออกซิเจนบางส่วนจากอากาศโดยตรงอย่างเพียงพอ

8. การตรวจสภาพการเกิดดิพลอยด์ไจโนเจเนซีส

ลูกปลาที่ได้จากการเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีสที่มีโครโมโซม 2 ชุด (รูปที่ 6) จะมีลักษณะเหมือนลูกปลาหมอไทยปกติ (รูปที่ 7) ซึ่งแตกต่างอย่างเห็นได้ชัดจากลูกปลาที่มีโครโมโซมชุดเดียว (haploid) ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากกระบวนการช็อคเพื่อเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมของไข่ไม่สมบูรณ์ โดยลูกปลาที่มีโครโมโซมชุดเดียวจะมีลักษณะผิดปกติ เช่น มีลำตัวป้อมสั้น หางกุด (รูปที่ 8) ส่วนใหญ่ตายหลังจากฟักได้ไม่นาน และตายหมดเมื่อเริ่มกินอาหาร (48 ชั่วโมงหลังจากฟักออกเป็นตัว) และลูกปลาที่เกิดจากไข่ปลาหมอไทยที่ผสมกับน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวปกติที่อาจเกิดจากการฉายรังสีไม่สมบูรณ์มีลักษณะผิดปกติ (รูปที่ 9) และตายหลังจากฟักเป็นตัว เช่นกัน

รูปที่ 6 ลูกปลาหมอไทยไจโนเจเนซีส (2n)
อายุ 48 ชั่วโมงหลังจากฟัก

รูปที่ 7 ลูกปลาหมอไทยปกติ
อายุ 48 ชั่วโมงหลังจากฟัก



รูปที่ 8 ลูกปลาหมอไทยแฮพลอยด์ (n)
อายุ 24 ชั่วโมงหลังผสม

รูปที่ 9 ลูกปลาหมอไทยผิดปกติ ที่เกิดจากการผสมระหว่างไข่ปลาหมอไทยกับน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวปกติ
อายุ 24 ชั่วโมงหลังผสม

9. การเก็บข้อมูล

หลังจากลูกปลาฟักออกเป็นตัว (24 ชั่วโมงหลังผสม) นับลูกปลาที่ฟักทั้งหมดทั้งลูกปลาแฮพลอยด์ (n) ที่เกิดจากกระบวนการช็อคไม่สมบูรณ์ และลูกปลาดิพลอยด์ไจโนเจเนซีส (2n) คำนวณอัตราการฟักรวม คิดเป็นร้อยละของไข่ที่นำมาฟัก เมื่อลูกปลามีอายุครบ 48 ชั่วโมงหลังจากฟักออกเป็นตัว นับจำนวนลูกปลาซึ่งจะเหลือเพียงลูกปลาดิพลอยด์ไจโนเจเนซีส (ลูกปลาที่เป็นแฮพลอยด์ตายหมดก่อนมีอายุครบ 48 ชั่วโมง) คำนวณอัตราการรอดคิดเป็นร้อยละของไข่ที่นำมาฟักของแต่ละซ้ำ (ถุง)

10. วิธีการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลอง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (complete randomized design)

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของระยะเวลาหลังการผสมไข่กับน้ำเชื้อก่อนทำการช็อคต่ออัตราการฟักรวม และอัตราการรอดของลูกปลาดิพลอยด์ไจโนเจเนซีส ที่ 48 ชั่วโมงหลังการฟักในปลาหมอไทย ช่วงของระยะเวลาที่ใช้ในการทดลองได้จากผลการทดลองเบื้องต้น (ภาคผนวก ตารางที่ 1)

นำไข่จากแม่ปลาหมอไทย 5 ตัวคลุกเคล้ารวมกัน แบ่งไข่ที่ได้ใส่ในถุงผ้าโอล่อนแก้ว ขนาด 5 x 10 เซนติเมตร ถุงละประมาณ 0.5 กรัม ผสมไข่กับน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต พักไข่ที่ได้รับการผสมแล้วในน้ำอุณหภูมิ 29 องศาเซลเซียส นำไข่ที่ผ่านการผสมกับน้ำเชื้อแล้วนาน 3, 3.5, 4, 4.5, 5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 และ 8 นาที (เว้นช่วงละ 30 วินาที) ไปช็อคที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที แล้วนำไข่ไปฟักในน้ำที่อุณหภูมิห้อง ทดลองปัจจัย (treatment) ละ 3 ซ้ำ (3 ถุง) เก็บข้อมูลอัตราการฟักรวม และอัตราการรอดของลูกปลาดิพลอยด์ไจโนเจเนซีสที่ 48 ชั่วโมงหลังการฟัก

การทดลองมีชุดควบคุม 2 ชุดคือ ไข่ปลาหมอไทยผสมกับน้ำเชื้อปลาหมอไทย และไข่ปลาหมอไทยผสมกับน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต แต่ไม่นำไปช็อค

นำผลการทดลองที่ได้ คือ ระยะเวลาหลังการผสมที่ได้ผลดีที่สุด ต่ออัตราการฟักรวมและอัตราการรอดของลูกปลาดิพลอยด์ไจโนเจเนซีส ที่ 48 ชั่วโมงหลังการฟัก ไปใช้ในการทดลองที่ 2

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของความเย็นที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ และระยะเวลาการช็อคต่ออัตราการฟักรวม และอัตราการรอดของลูกปลาดิพลอยด์ไจโนเจเนซีส ที่ 48 ชั่วโมง หลังการฟักในปลาหมอไทย ระดับอุณหภูมิที่ใช้ในการทดลองได้จากการทดลองเบื้องต้น (ภาคผนวก ตารางที่ 2)

จากการทดลองที่ 1 ทำให้ทราบช่วงของเวลาที่เหมาะสมหลังการผสมไข่กับน้ำเชื้อก่อนที่จะเริ่มทำการช็อค นำผลที่ได้มาใช้ในการทดลองที่ 2 โดยนำไข่จากแม่ปลาหมอไทย 5 ตัว คลุกเคล้ารวมกัน แบ่งไข่ที่ได้ใส่ในถุงผ้าโอล่อนแก้วขนาด 5 x 10 เซนติเมตร ถุงละประมาณ 0.5 กรัม ผสมกับน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต และมีช่วงของเวลาหลังการผสมที่เหมาะสมตามผลการทดลองที่ 1 มาช็อคด้วยอุณหภูมิ และระยะเวลาที่ทำการช็อคต่าง ๆ กัน คือ ที่อุณหภูมิ 3, 5, 7, 9, 11 และ 13 องศาเซลเซียส ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ช่วงเวลาที่ใช้ในการช็อคนาน 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 และ 17 นาที เนื่องจากข้อจำกัดของจำนวนเครื่องมือที่ใช้สำหรับการทดลองคืออ่างควบคุมอุณหภูมิมีเพียง 2 เครื่อง จึงแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองทำการช็อคด้วยอุณหภูมิ 2 ระดับ ได้แก่

ชุดการทดลองที่ 2.1	ช็อคที่อุณหภูมิ	3 และ 5	องศาเซลเซียส	นาน 1-6 นาที
ชุดการทดลองที่ 2.2	ช็อคที่อุณหภูมิ	7 และ 9	องศาเซลเซียส	นาน 3-8 นาที
ชุดการทดลองที่ 2.3	ช็อคที่อุณหภูมิ	11 และ 13	องศาเซลเซียส	นาน 5-10 นาที
ชุดการทดลองที่ 2.4	ช็อคที่อุณหภูมิ	7 และ 11	องศาเซลเซียส	นาน 10-17 นาที

ชุดการทดลองที่ 2.1 มีช่วงเวลาในการช็อคไม่เกิน 6 นาที เนื่องจากการทดลองเบื้องต้นพบว่าการช็อคไข่ปลาหมอไทยที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสและระยะเวลาการช็อคนานเกิน 6 นาที ทำให้ไข่ปลาหมอไทยเสียเกือบทั้งหมดระหว่างทำการช็อค สังเกตได้จากไข่มีสีขาวขุ่น

ชุดการทดลองที่ 2.4 เป็นช่วงอุณหภูมิที่ได้จากการเปรียบเทียบผลการช็อคของอุณหภูมิที่ให้อัตราการรอดของลูกปลาดิพลอยด์ไจโนเจเนซีสสูงสุดจากชุดการทดลองที่ 2.1, 2.2 และ 2.3 โดยเพิ่มระยะเวลาช็อคให้นานขึ้น

ทดลองปัจจัย (treatment) ละ 3 ซ้ำ เก็บข้อมูลอัตราการฟักรวม และอัตราการรอดของลูกปลาดิพลอยด์ไจโนเจเนซีสที่ 48 ชั่วโมงหลังการฟัก

การทดลองที่ 3 ตรวจสอบเพศของปลาหมอไทยที่ได้จากการผลิตด้วยวิธีไจโนเจเนซีส

ผลิตลูกปลาหมอไทยไจโนเจเนซีส ด้วยวิธีที่ได้จากผลการทดลองที่ 1 และ 2 และอนุบาลลูกปลาที่ได้ในตู้กระจกขนาด 0.5 x 1 x 0.3 เมตร ในน้ำที่มีความเค็ม 10 ppt เนื่องจากดำเนินการทดลองที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง ซึ่งมีที่ตั้งติดกับชายฝั่งทะเล ทำให้ไม่สามารถหาน้ำจืดในปริมาณที่เพียงพอต่อการผลิตโรติเฟอร์น้ำจืดได้ จึงจำเป็นต้องอนุบาลลูกปลาหมอไทยอายุ 1-7 วันในน้ำที่มีความเค็มประมาณ 10 ppt เพื่อใช้โรติเฟอร์น้ำกร่อยเป็นอาหารของลูกปลา เมื่อลูกปลามีอายุ 8 วัน ปรับความเค็มของน้ำให้ลดลงวันละประมาณ 3 ppt จนความเค็มเป็น 0 ppt แล้วอนุบาลโดยให้ตัวอ่อนอาร์ทีเมียเป็นอาหารจนลูกปลาได้ขนาด 1.5 เซนติเมตร จึงย้ายไปเลี้ยงในกระชังมุ้งสีฟ้าขนาด 5x5x1.5 เมตร ในบ่อดินขนาด 10x40 เมตร น้ำลึก 1 เมตร จำนวน 600 ตัว ที่ฟาร์มเพาะพันธุ์ปลาหมอไทยของเกษตรกรในจังหวัดสุราษฎร์ธานี โดยใช้อาหารปลาดุก (โปรตีนไม่ต่ำกว่า 30 %) เมื่อปลามีอายุ 200 วัน จึงผ่าท้องปลาที่ได้เพื่อตรวจสอบเพศ

11. การวิเคราะห์ผลการทดลอง

แปลงค่าอัตราการฟักรวมและอัตราการรอดด้วย arcsine เพื่อให้ข้อมูลดังกล่าวมีการกระจายแบบปกติและมีค่าความแปรปรวนเท่ากันแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี one way analysis of variance และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan’s new multiple range test (จรัญ, 2534)