

### บทที่ 3

#### วิธีดำเนินการ

##### 1. การเตรียมถุงปลาหม้อไทยในการทดลอง

การเตรียมถุงปลาในการทดลองทำการเพาะพันธุ์ปลาหม้อไทย โดยเตรียมบ่อคินขนาด 100 ตารางเมตร ก่อนทำการเพาะพันธุ์ปลา 3 วัน ใส่ปูยเพื่อให้เกิดแพลงก์ตอนพีช (phytoplankton) สำหรับเป็นอาหารถุงปลา จากนั้นคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีไข่และน้ำชาอ่อนนุ่ม พร้อมที่จะผสมพันธุ์ วางไข่ ใช้อัตราส่วนเพศเมีย ต่อเพศผู้ เท่ากัน 1 ต่อ 2 เมื่อคัดพ่อแม่พันธุ์ปลาได้แล้ว ใช้ซอร์โนนชูบี แฟฟกท์ ฉีดให้ตัวเมียเพื่อเร่งการวางไข่ ในอัตราความเข้มข้น 20 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม และยาเสริมฤทธิ์ ไมทิลียม-เอ็น 10 มิลลิกรัมต่อปลา 1 กิโลกรัม เพศผู้ไม่ต้องฉีดซอร์โนน จากนั้นนำพ่อแม่ปลาไปปล่อยในกระชังต่างๆ ซึ่งแขวนอยู่ในบ่อคินขนาด  $2.0 \times 2.0$  เมตร ที่มีระดับน้ำไม่น้อยกว่า 50 เซนติเมตร เพื่อให้ปลาผสมพันธุ์และวางไข่ เมื่อถุงปลา มีอายุ 3 วัน ให้อาหารเสริมสำเร็จรูปชนิดผง จนกระถังถุงปลาอายุ 8 วัน นำขึ้นจากบ่อ พักไว้ในกระชังที่แขวนอยู่ในบ่อคิน 2 วัน ก่อนทำการทดลอง



(A)

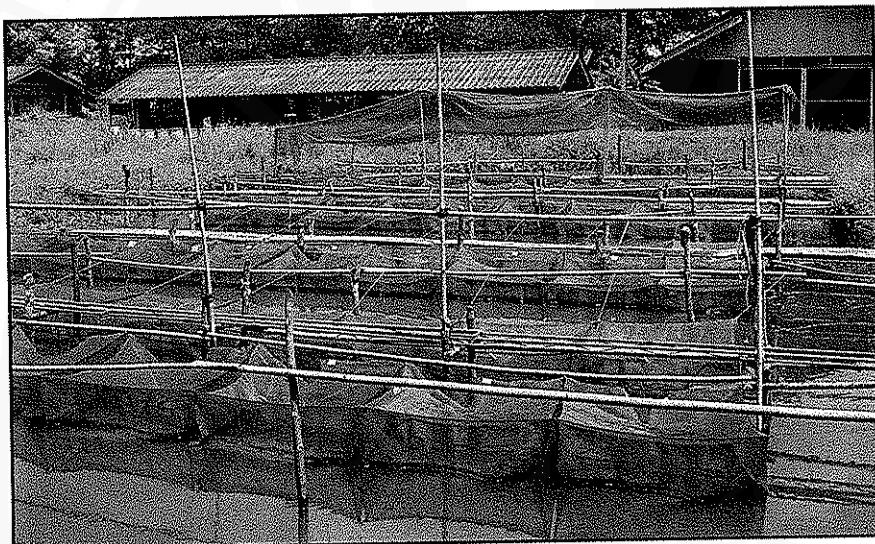


(B)

ภาพที่ 5 เตรียมบ่อคินเพาะพันธุ์ปลาหม้อไทย (A) ใส่ปูนขาว (B) เตรียมน้ำให้เกิดแพลงก์ตอน

## 2. การทดลอง

เมื่อลูกป่าหมาไทยที่พักไว้ในกระชังที่แขวนลอยในบ่อคืนมีอายุครบ 10 วัน จึงดำเนินการทดลองชุดการทดลองที่ 1 และ 2 เมื่อปลาอายุ 20 วัน จึงดำเนินการทดลองชุดการทดลองที่ 3 และ 4 และเมื่อปลาอายุ 30 วัน จึงดำเนินการทดลองชุดการทดลองที่ 5 และ 6



ภาพที่ 6 กระชังทดลองที่แขวนลอยในบ่อคืน

### 2.1 ชุดการทดลองที่ 1

การทดลองเปลี่ยนเพศป่าหมาไทยให้เป็นเพศเมีย ใช้ลูกป่าหมาไทย อายุ 10 วันโดยให้อาหารผสมฮอร์โมน 17  $\beta$ -estradiol ในอัตราส่วน 60, 100, 200 มิลลิกรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหารผสมฮอร์โมนเป็น ระยะเวลา 10 วัน พร้อมกับความคุ้ม ทำการทดลอง 3 ชั้น ทดลองในกระชัง ขนาด  $1.2 \times 1.2 \times 1.2$  เมตร ที่แขวนลอยในบ่อคืน โดยมีจำนวนลูกป่าหมาไทย เริ่มต้นที่ 50 ต่อ กระชัง เลี้ยงลูกป่าหมาไทยจนอายุครบ 3 เดือน นับตั้งแต่ฟักออกจากไข่

### 2.2 ชุดการทดลองที่ 2

การทดลองเปลี่ยนเพศป่าหมาไทยให้เป็นเพศเมีย ใช้ลูกป่าหมาไทย อายุ 10 วันโดยให้อาหารผสมฮอร์โมน 17  $\beta$ -estradiol ในอัตราส่วน 60, 100, 200 มิลลิกรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหารผสมฮอร์โมนเป็น ระยะเวลา 20 วัน พร้อมกับความคุ้ม ทำการทดลอง 3 ชั้น

ทดลองในกระชัง ขนาด  $1.2 \times 1.2 \times 1.2$  เมตร ที่แขวนลอยในบ่อคิน โดยมีจำนวนลูกปลาหม้อไทย เริ่มต้นที่ 50 ต่อ กระชัง เสียงลูกปลาหม้อไทยจนอายุครบ 3 เดือน นับตั้งแต่ฟักออกจากไข่

### 2.3 ชุดการทดลองที่ 3

การทดลองเปลี่ยนเพศปลาหม้อไทยให้เป็นเพศเมีย ใช้ลูกปลาหม้อไทย อายุ 20 วัน โดยให้อาหารพสมอร์โมน 17  $\beta$ -estradiol ในอัตราส่วน 60, 100, 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหารพสมอร์โมนเป็น ระยะเวลา 10 วัน พร้อมกับคุณภาพคุณ ทำการทดลอง 3 ขั้น ทดลองในกระชัง ขนาด  $1.2 \times 1.2 \times 1.2$  เมตร ที่แขวนลอยในบ่อคิน โดยมีจำนวนลูกปลาหม้อไทย เริ่มต้นที่ 50 ต่อ กระชัง เสียงลูกปลาหม้อไทยจนอายุครบ 3 เดือน นับตั้งแต่ฟักออกจากไข่

### 2.4 ชุดการทดลองที่ 4

การทดลองเปลี่ยนเพศปลาหม้อไทยให้เป็นเพศเมีย ใช้ลูกปลาหม้อไทย อายุ 20 วัน โดยให้อาหารพสมอร์โมน 17  $\beta$ -estradiol ในอัตราส่วน 60, 100, 200 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหารพสมอร์โมนเป็น ระยะเวลา 20 วัน พร้อมกับคุณภาพคุณ ทำการทดลอง 3 ขั้น ทดลองในกระชัง ขนาด  $1.2 \times 1.2 \times 1.2$  เมตร ที่แขวนลอยในบ่อคิน โดยมีจำนวนลูกปลาหม้อไทย เริ่มต้นที่ 50 ต่อ กระชัง เสียงลูกปลาหม้อไทยจนอายุครบ 3 เดือน นับตั้งแต่ฟักออกจากไข่

### 2.5 ชุดการทดลองที่ 5

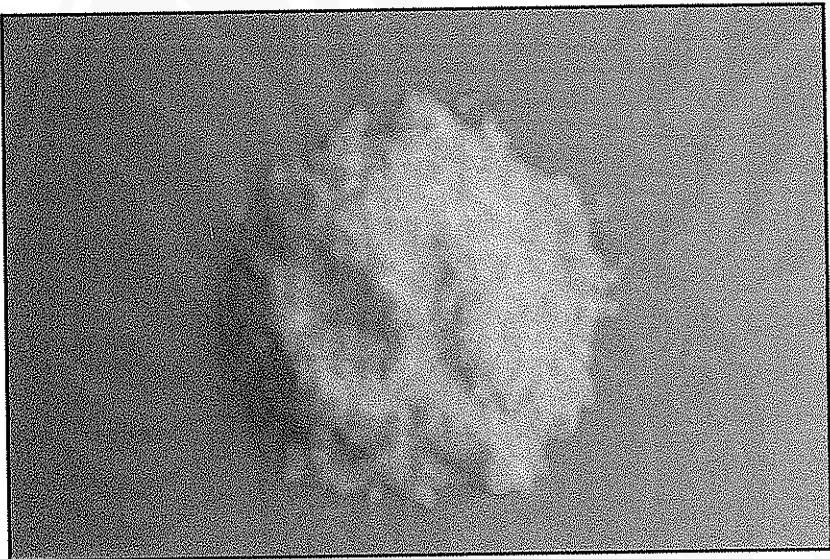
การทดลองเปลี่ยนเพศปลาหม้อไทยให้เป็นเพศเมีย ใช้ลูกปลาหม้อไทย อายุ 30 วัน โดยให้อาหารพสมอร์โมน 17  $\beta$ -estradiol ในอัตราส่วน 60, 100, 200 มิลลิกรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหารพสมอร์โมนเป็น ระยะเวลา 10 วัน พร้อมกับคุณภาพคุณ ทำการทดลอง 3 ขั้น ทดลองในกระชัง ขนาด  $1.2 \times 1.2 \times 1.2$  เมตร ที่แขวนลอยในบ่อคิน โดยมีจำนวนลูกปลาหม้อไทย เริ่มต้นที่ 50 ต่อ กระชัง เสียงลูกปลาหม้อไทยจนอายุครบ 3 เดือน นับตั้งแต่ฟักออกจากไข่

### 2.6 ชุดการทดลองที่ 6

การทดลองเปลี่ยนเพศปลาหม้อไทยให้เป็นเพศเมีย ใช้ลูกปลาหม้อไทย อายุ 30 วัน โดยให้อาหารพสมอร์โมน 17  $\beta$ -estradiol ในอัตราส่วน 60, 100, 200 มิลลิกรัม ต่อ อาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหารพสมอร์โมนเป็น ระยะเวลา 20 วัน พร้อมกับคุณภาพคุณ ทำการทดลอง 3 ขั้น ทดลองในกระชัง ขนาด  $1.2 \times 1.2 \times 1.2$  เมตร ที่แขวนลอยในบ่อคิน โดยมีจำนวนลูกปลาหม้อไทย เริ่มต้นที่ 50 ต่อ กระชัง เสียงลูกปลาหม้อไทยจนอายุครบ 3 เดือน นับตั้งแต่ฟักออกจากไข่

### 3. การเตรียมอาหารผสมอสอร์โนน

การเตรียมอาหารผสมอสอร์โนน 17  $\beta$ -estradiol จะใช้อาหารสำเร็จรูปนิคเกลด์ ที่มีระดับโปรตีนไม่ต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ โดยการนำอสอร์โนนละลายในแอลกอฮอล์ ( absolute ethylalcohol ) แล้วสเปรย์ผสมกับอาหารให้ทั่ว ตากอาหารที่ผสมอสอร์โนนจนแอลกอฮอล์ระเหยหมดจึงบรรจุอาหารลงในภาชนะที่มีฝาปิด ในกลุ่มควบคุมใช้อาหารที่ผสมกับแอลกอฮอล์อย่างเดียว



ภาพที่ 7 อาหารสำเร็จรูปที่ผสมอสอร์โนน 17  $\beta$ -estradiol

### 4. วิธีการให้อาหาร

ให้อาหารผสมอสอร์โนน 17  $\beta$ -estradiol แก่ปลาในชุดการทดลอง และอาหารผสมแอลกอฮอล์แก่ลูกปลาในกลุ่มควบคุมวันละ 3 ครั้ง คือ เช้า เที่ยง และเย็น จนกระทั่งสิ้นสุดการให้อาหารผสมอสอร์โนน จากนั้นให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปโดยน้ำ ที่มีระดับโปรตีนไม่ต่ำกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ วันละ 3 ครั้ง คือ เช้า เที่ยง และเย็น เช่นกัน จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

### 5. การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูล

โดยระหว่างการเลี้ยงและเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงจะเก็บข้อมูลต่าง ๆ เพื่อนำไปวิเคราะห์ข้อมูลต่าง ๆ คือ

### 5.1 การเจริญเติบโตของปลา

คุณภาพหมายไทยในแต่ละระยะ ๆ ละ 10 ตัว ทุก ๆ 30 วันนำชิ้นน้ำหนัก และวัดความยาวเฉลี่ย (Total length) เพื่อหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักและความยาว นำข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

### 5.2 อัตราการростดาย

ตรวจนับลูกปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลองให้อาหารผสมซอร์โว่น และนับจำนวนลูกปลาที่เหลือที่เลี้ยงในกระชัง นำข้อมูลที่ได้ทำการวิเคราะห์อัตราการростดายเป็นร้อยละ

$$\text{อัตราрост (\%)} = [\frac{\text{จำนวนปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้น}}] \times 100$$

นำข้อมูลวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย ด้วยวิธี Duncan' New Multiple Range Test โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS

### 5.3 การศึกษาอัตราส่วนเพศและดัชนีความสมบูรณ์เพศ

การศึกษาเพศปลาโดยการพิจารณาด้วยสายตาจากลักษณะภายนอกที่ปรากฏให้เห็น เช่น รูปร่างลำตัว (body shape) ลักษณะท้องปลา (belly) นำไปใช้ตรวจสอบอวัยวะภายใน โดยการผ่าตัดซ่องท้องทุกการทดลองจากนั้นเก็บตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์ของปลามาชั่งน้ำหนัก เพื่อนำไปวิเคราะห์หาดัชนีความสมบูรณ์เพศ (Gonado Somatic Index , GSI) โดยนำตัวอย่างปลาที่มีความสมบูรณ์เพศมาชั่งน้ำหนักและวัดความยาวขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ จากนั้นทำให้ปลาสลบด้วยการนำตัวอย่างปลาไปแช่เย็นแล้วผ่าตัดเอาอวัยวะสืบพันธุ์ออกมาวัดความยาว ความกว้าง และชั่งน้ำหนักเพื่อนำมาหาค่าดัชนีความล้มพันธุ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ตามวิธีของ Nikolsky (1963) โดยใช้สูตร

$$GSI = \frac{\text{น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์}}{\text{น้ำหนักปลา}} \times 100$$

และนำอวัยวะสืบพันธุ์ไปศึกษาพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ด้วยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology) โดยนำตัวอย่างรังไข่และอัณฑะที่ได้จากการผ่าตัดซ่องท้องมาแช่น้ำยาฟอร์มอลีนที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เก็บไว้ในขวดเก็บตัวอย่างเพื่อนำไปศึกษาพยาธิสภาพทางเนื้อเยื่อตามวิธีของ Hamason (1979) โดยนำรังไข่และอัณฑะแช่ใน Bouin fixative solution นาน 24 – 48 ชั่วโมง จึงนำไปเก็บในแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำรังไข่และอัณฑะแช่ที่ตัดเป็นชิ้นเล็กๆ มาพ่นกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) โดยใช้เครื่อง automatic tissue processor โดยเริ่มจากขั้นตอนที่พ่นแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์จนถึงแอลกอฮอล์เข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นพ่น

คลอโรฟอร์ม 2 ครั้ง นำตัวอย่างรังไข่และถุงน้ำเชื้อฟังในปีผึ้ง (paraplast) แล้วนำมาตัดด้วยเครื่องไมโครโลมให้มีความหนาประมาณ 5 – 6 ไมโครเมตร นำตัวอย่างรังไข่และอัณฑะที่ได้ไปลอยในน้ำที่อุณหภูมิ 45 – 50 องศาเซลเซียส ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่างที่สมบูรณ์นำไปวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ ทึ่งไว้อย่างน้อย 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปข้อมสี hematoxylin และ eosin และทำเป็นสไลด์ถาวร แล้วนำมาตรวจหาระยะไข่และเชื้อเพคผี้ ระยะพัฒนาการต่างๆ ตามแนวการจำแนกของ ชลอ(2530), Groman (1982) Htum – Han (1987) และ Billard (1982)