สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

รายงานการวิจัย

ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการฉีดซ้ำของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลีสซิ่ง ฮอร์โมน อนาลอกซ์ (Gonadotropin Releasing Hormone Analogues) ชนิดออกฤทธิ์ นานในรูปแบบ ไมโครสเฟียร์ ต่อการวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* (Linnaeus 1758)

ภายใต้แผนงานวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามน้ำเค็ม
ในกลุ่มปลาการ์ตูนประจำปี 2546-2548

เสาวภา สวัสดิ์พีระ
ณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน
วรเทพ มุธุวรรณ

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2547-2548
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา

- 9 มี.ค. 2552
25156 1
พ.ศ. 2549
เริ่มบริการ
- 3 มิ.ย. 2552

คำชี้แจง

ตามที่คณะผู้วิจัยได้รับจัดสรรงบประมาณ เงินอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2547-2548 ในหัวข้อ เรื่อง **ระดับของ LHRHa และความถี่ในการฝังฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้มีการผสมพันธุ์วางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า (*Amphiprion polymnus*)** ภายใต้แผนงานวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามน้ำเค็มในกลุ่มปลาการ์ตูน แต่เนื่องจากเทคนิคการฝังฮอร์โมนไม่เหมาะสมกับปลาการ์ตูนอานม้าซึ่งมีขนาดเล็ก

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเอกสารเพิ่มเติม และพบว่าเทคนิคการใช้ฮอร์โมนในรูปแบบ Microspheres สามารถใช้ในการกระตุ้นให้ปลามีการผสมพันธุ์วางไข่ได้ โดยไม่ทำอันตรายต่อปลาการ์ตูนอานม้า ทางคณะผู้วิจัยจึงเปลี่ยนวิธีดำเนินการวิจัยโดยใช้ฮอร์โมน GnRHa ในรูปแบบ Microspheres รวมทั้งเปลี่ยนชื่อหัวข้อการวิจัยใหม่เป็น **ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการฉีดซ้ำของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลีสซิ่งฮอร์โมน อนาลอกซ์ (gonadotropin releasing hormone analogues) ชนิดออกฤทธิ์นานในรูปแบบไมโครสเฟียร์ ต่อการวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* (Linnaeus 1758)**

คณะผู้วิจัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยฉบับนี้ได้รับการสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัย งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2546 -2548 มหาวิทยาลัยบูรพา คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง และขอขอบคุณผู้อำนวยการแผนงานวิจัยที่ให้คำปรึกษาที่ดีเสมอมา

ขอขอบพระคุณ คุณชาญวิทย์ ศุภปัญญาพงศ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในการวิเคราะห์คุณภาพน้ำในระหว่างทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล และ เจ้าหน้าที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่านที่อำนวยความสะดวกในการใช้สถานที่ห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ และ เครื่องมือในการทดลอง ในการทำการวิจัยครั้งนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงลงได้ด้วยดี

ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาในการฉีดซ้ำของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลีสซิ่งฮอร์โมน อนาลอกซ์ (Gonadotropin Releasing Hormone Analogues) ชนิดออกฤทธิ์นานในรูปแบบไมโครสเฟียร์ ต่อการวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* (Linnaeus 1758)

โดย

เสาวภา สวัสดิ์พีระ*

ณัฐวุฒิ เหลืองอ่อน*

วรเทพ มุธุวรรณ*

บทคัดย่อ

การทดสอบระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการฉีดซ้ำของฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน รีลีสซิ่งฮอร์โมน อนาลอกซ์ (Gonadotropin Releasing Hormone Analogues) ชนิดออกฤทธิ์นานในรูปแบบไมโครสเฟียร์ ต่อการวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* ด้วยการออกแบบการทดลองแบบแฟคทอเรียล ในตู้กระจกขนาด 15 นิ้ว x 24 นิ้ว x 15 นิ้ว ที่มีระบบกรองน้ำรวม โดยใช้ระดับความหนาแน่น 1 คู่ / ตู้ ด้วยความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ คือ 0, 25, 75 และ150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม โดยมีระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ คือทุก 2 และ 3 เดือน เป็นปัจจัยร่วมเพื่อตรวจสอบการผสมพันธุ์วางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า

ผลจากการทดลองพบว่า ปลาในกลุ่มที่กำหนดฉีดฮอร์โมนซ้ำทุก 2 เดือน ปลามีการผสมพันธุ์วางไข่หลังจากฉีดฮอร์โมน 5-74 วัน จำนวน 0, 2, 3 และ1 คู่ตามลำดับ จำนวนครั้งที่วางไข่ทั้งหมด คือ 0, 6, 19 และ6 ครั้งตามลำดับ จำนวนไข่ที่วางมีค่าอยู่ระหว่าง 57-2,692 ฟองต่อครั้ง อัตราการฟักเป็นตัวมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 56.6-100 และอัตรารอดตายของลูกปลามีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 3.2-15.2 ต่อครั้ง

ส่วนปลาในกลุ่มที่กำหนดฉีดฮอร์โมนซ้ำทุก 3 เดือน เมื่อฉีดฮฮร์โมนที่ระดับ 0, 25, 75 และ150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลามีการผสมพันธุ์วางไข่หลังจากฉีดฮอร์โมน 2-108 วัน จำนวน 2, 3, 0 และ1 คู่ตามลำดับ จำนวนครั้งที่วางไข่ทั้งหมด คือ 5, 18, 0 และ8 ครั้งตามลำดับ จำนวนไข่ที่วางมีค่าอยู่ระหว่าง 336-4,031 ฟองต่อครั้ง อัตราการฟักเป็นตัวมีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 29.4-85.1 และอัตรารอดตายของลูกปลามีค่าอยู่ระหว่างร้อยละ 5.1-19.9 ต่อครั้ง

ผลของการทดลองแสดงให้เห็นว่า ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนและระยะเวลาในการฉีดซ้ำ ไม่มีผลต่อการผสมพันธุ์วางไข่, จำนวนครั้งที่วางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า, จำนวนไข่ที่วาง, อัตราการฟักเป็นตัว และอัตราการรอดตายของลูกปลาการ์ตูนอานม้า

---

* สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา อ. เมือง จ. ชลบุรี

Effect of Concentrations and Frequencies of Injections of Sustained Release Delivery Systems for Gonadotropin Releasing Hormone Analogues (GnRHa) in The Form of Microspheres on Saddleback Anemonefish (*Amphiprion polymnus* Linnaeus1758) Spawning

by

Saowapa Sawapeera*

Nattawut Luangoon*

Vorathep Muthuwan*

Abstract

The effect of concentrations (0, 25, 75 and 150 μg kg^{-1}) and frequencies of injections (every 2 or 3 months) of sustained release microspheres containing gonadotropin releasing hormone agonist (GnRHa) on saddleback anemonefish spawning were investigated for 180 days. Forty eight pairs of the fish were used in the experiment with each pair was reared individually in a 24" x 15" x 15" glass aquarium. The fish were divided into 4 experimental groups whereas each group was injected with GnRHa microsphere at 0(control), 25, 75 and 150 μg kg^{-1} at the start of the experiment. Six pairs of the fish in each group were received the second and third injection at the same dose on day 60^{th} and 120^{th} after the first injection while the six others were received only the second injection on day 90^{th}.

Spawning was obtained within 5-74 days after injection in the treatment that received injection in every 60 days. The numbers of spawning pair were 0, 2, 3 and 1 and total spawn was 0, 6, 19 and 6 for the concentrations of 0, 25, 75 and 150 μg kg^{-1}, respectively. Total number of egg varied between 57-2,692 eggs per spawn, the hatching rate was ranged between 56.6-100% and survival rate of the 4 weeks old juvenile ranged between 3.2-15.2% per spawn.

Spawning was obtained within 2-108 days after injection in the treatment that received injection every 90 days. The numbers of spawning pair was 2, 3, 0 and 1 and total spawn was 5, 18, 0 and 8 for the concentrations of 0, 25, 75 and 150 μg kg^{-1}, respectively. Total number of egg

varied between 336-2,692 eggs per spawn, the hatching rate was ranged between 29.4-85.1% and survival rate of the 4 weeks old juvenile ranged between 5.1-19.9% per spawn.

The results of the experiment demonstrated that concentrations and frequencies of injection were did not significantly effect the number of spawning pair, total spawn, number of egg, hatching rate, and survival rate of the larvae of the saddleback anemonefish.

---

*Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Muang Distrct, Chonburi Province

สารบัญ

บทคัดย่อภาษาไทย..... ค

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

สมมุติฐานการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 4

2 สำรวจเอกสาร..... 5

อนุกรมวิธานของปลาการ์ตูนอานม้า..... 5

ลักษณะทั่วไปของปลาการ์ตูนอานม้า..... 5

การแพร่กระจาย..... 5

การเพาะพันธุ์ปลาการ์ตูน..... 6

ลักษณะเด่นที่สามารถใช้ในการบ่งบอกเพศ..... 6

พฤติกรรมการวางไข่ของปลาการ์ตูน..... 7

พฤติกรรมในการเฝ้าดูแลไข่ของปลาการ์ตูน..... 9

การฟักไข่ของปลาการ์ตูน..... 10

การอนุบาลลูกปลาการ์ตูน..... 11

ฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ของปลา..... 11

รีลีสซิ่งฮอร์โมน (Releasing Hormone)..... 14

การประยุกต์ใช้ฮอร์โมนในการเพาะพันธุ์ปลา..... 15

รูปแบบของระบบควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน..... 15

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 18

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
3 วิธีดำเนินการวิจัย	23
การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า	23
การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า	24
คุณภาพน้ำและการจัดการ	24
ฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง	25
การเตรียมสารละลายฮอร์โมน	25
วิธีการฉีดสารละลายฮอร์โมน	26
ความเข้มข้นและระยะเวลาในการฉีดซ้ำของฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง	26
การอนุบาลลูกปลาการ์ตูนอานม้า	27
การบันทึกผลการทดลอง	28
การวิเคราะห์ข้อมูล	29
4 ผลการวิจัย	30
การผสมพันธุ์วางไข่	30
ระยะเวลาในการวางไข่	32
จำนวนครั้งที่วางไข่	34
จำนวนไข่ที่วาง	36
เปอร์เซ็นต์การฟัก	38
อัตรารอดตาย	40
คุณภาพน้ำระบบเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ระหว่างการทดลอง	42
5 อภิปรายและสรุปผล	43
การผสมพันธุ์วางไข่	43
คุณภาพน้ำระบบเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ระหว่างการทดลอง	46
สรุปผลการวิจัย	47
ข้อเสนอแนะ	48
บรรณานุกรม	49

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปลาการ์ตูนอานม้า (Saddleback Anemonefish) *Amphiprion polymnus* (Linnaeus, 1758) เป็นปลาขนาดเล็ก ตัวสีน้ำตาลอมดำ ส่วนหัว อก และครีบอก มีสีส้มอมเหลือง มีแถบขาว 2 แถบ แถบแรกอยู่บนหัว อีกแถบเริ่มตรงบริเวณส่วนหลังของลำตัวเป็นแถบโค้งพาดเฉียงขึ้นไปที่ครีบหลัง พบในที่ลึกตั้งแต่ 2–30 เมตร ขนาดโตที่สุดพบประมาณ 12 เซนติเมตร อาศัยอยู่กับดอกไม้ทะเล (อุ่นจิต ปาติยเสวี, 2537) โดยปลาการ์ตูนอานม้าที่รวบรวมมาจากธรรมชาติแล้วเกิดการจับคู่สามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ในที่กักขัง เช่น ภายในตู้แสดงสัตว์น้ำภายในสถานลี้ยงสัตว์น้ำเค็มและ ตู้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าในห้องปฏิบัติการ ของสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา แต่การจับคู่ผสมพันธุ์ของปลาในกลุ่มปลาการ์ตูนนี้ ต่างจากปลาอื่นทั่ว ๆ ไป เพราะนอกจากปัจจัยต่าง ๆ เช่น สภาพแวดล้อม อาหาร สิ่งเร้า ฯลฯ แล้ว โครงสร้างทางสังคมยังมีส่วนอย่างมากในการจับคู่ผสมพันธุ์และการเจริญพันธุ์ของปลาในกลุ่มเดียวกัน กล่าวคือปลาที่อาศัยอยู่ในกลุ่มเดียวกันเมื่อเจริญเติบโตถึงระยะหนึ่ง ตัวที่เด่นที่สุดในฝูงจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วและพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เป็นตัวเมีย ส่วนตัวที่มีขนาดใหญ่รองลงมาจะกลายเป็นตัวผู้และจับคู่กับตัวเมียที่โตกว่าผสมพันธุ์วางไข่ ส่วนตัวอื่น ๆ ที่อยู่ในกลุ่มจะไม่เจริญเติบโตและไม่เจริญพันธุ์

ในที่กักขังนั้นพบว่าถึงแม้จะกำจัดโครงสร้างทางสังคมออกไป โดยการเลี้ยงปลาตู้ละ 2 ตัว แล้วจะทำให้ตัวหนึ่งเจริญเติบโตกลายเป็นตัวเมีย และตัวที่เหลือจะกลายเป็นตัวผู้ แต่พบว่าปลาที่ได้จากธรรมชาติส่วนมากแล้วจะใช้เวลานานมากจึงจะผสมพันธุ์วางไข่หรืออาจจะไม่ผสมพันธุ์วางไข่เลยก็ได้ หรือถ้ามีการวางไข่ก็จะไม่สม่ำเสมอ ถึงแม้จะมีการควบคุมสิ่งแวดล้อมที่เป็นปัจจัยกระตุ้นให้มีการเจริญของรังไข่ก็ไม่ได้ผลเต็มที่ ทั้งนี้เนื่องจากความผิดปกติของขบวนการสืบพันธุ์ที่มักจะเกิดขึ้นกับปลาที่ถูกนำมาเลี้ยงในที่กักขัง ทำให้ไม่เกิดการพัฒนาของไข่และน้ำเชื้อ (Zohar & Mylonas, 2001)

การใช้ฮอร์โมนเพื่อการเพาะพันธุ์ปลาจะเป็นตัวกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปลามีความสมบูรณ์เพศมากขึ้น โดยฮอร์โมนจะไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองหลั่ง Gonadotropin (GtH) ซึ่ง GtH มีหน้าที่ต่างกันในการควบคุมการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ โดยแม่พันธุ์ปลาจะเกิดการพัฒนาการของรังไข่ในระยะแรกและการสร้างไข่แดง รวมถึงกระตุ้นให้ไข่เจริญสมบูรณ์เต็มที่และมีการตกไข่ต่อไป ส่วนพ่อพันธุ์ปลาจะเกิดการพัฒนาการของอัณฑะในระยะแรกและมีการพัฒนาการสร้างสเปิร์ม ทำให้สามารถรีดน้ำเชื้อออกมาได้มากขึ้น และสเปิร์มสามารถเคลื่อนที่ได้ (วีรพงศ์

วุฒิพันธุ์ชัย, 2546) ในปัจจุบันเราสามารถใช้ฮอร์โมนในการเพาะพันธุ์ปลาได้หลายชนิด ซึ่งในแต่ละชนิดก็มีการเพาะพันธุ์ไม่เหมือนกัน เช่น วิธีที่ให้ฮอร์โมน ประเภทของฮอร์โมนที่ใช้ ปริมาณของฮอร์โมนที่ใช้ จำนวนครั้งในการใช้ตำแหน่งที่ใช้ฮอร์โมนกระตุ้น เป็นต้น แต่ในปัจจุบันได้มีการนำเทคนิคใหม่ ๆ มาพัฒนาเพื่อกระตุ้นความสมบูรณ์เพศของปลา เช่น การใช้ระบบควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนในรูปแบบต่าง ๆ เช่น การฝังฮอร์โมน (Hormone Implantation) เป็นการนำเอาฮอร์โมนผสมลงไปในตัวกลางต่าง ๆ แล้วอัดออกมาเป็นเม็ดแล้วทำการฝังเข้าไปในตัวปลา หรือการใช้ในรูปแบบ Microspheres โดยเป็นการนำฮอร์โมนที่เราต้องการฉีดเข้าไปในตัวปลา โดยใช้ Polymer ต่าง ๆ เคลือบฮอร์โมนไว้ ซึ่งทั้งสองรูปแบบนี้ฮอร์โมนจะไปกระตุ้นต่อมใต้สมองให้หลั่ง GtH ออกมาอย่างช้า ๆ เป็นเวลานาน สามารถทำให้เกิดการวางไข่ได้ในปลาหลายชนิด เช่น ปลานวลจันทร์ทะเล (Lee et al., 1986) และ Yellowtail Flounder (Larssan, Mylonas, Zohar, & Crim, 1997) ซึ่งต่างจากการฉีดด้วยฮอร์โมนที่ไม่ได้ใช้ระบบควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน ซึ่งรูปแบบนี้สิ่งที่สำคัญก็คือ แม่พันธุ์ปลาที่จะนำมาฉีดฮอร์โมนต้องเป็นแม่พันธุ์ปลาที่ไข่แก่สมบูรณ์เพศจริงๆ ส่วนพ่อพันธุ์ปลาน้ำเชื้อต้องมีลักษณะที่ดีพอ

การใช้ระบบควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเช่น การฉีดฮอร์โมน Gonadotropin Releasing Hormone Analogue (GnRHa) ในรูปแบบ Microspheres โดยชนิดของ Co-Polymer คือ Fatty Acid Dimer และ Sebasic Acid (FAD-SA) ในอัตราส่วนเท่ากับ 25:75 Molar สามารถทำให้ GnRHa หลั่งออกมาอย่างช้า ๆ และต่อเนื่องเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 8 สัปดาห์ (Mylonas, Tabata, Langer, & Zohar, 1995) และสามารถใช้ได้กับปลาที่มีขนาดเล็ก ๆ ที่มีน้ำหนัก 2-3 กรัม ไปจนถึงปลาที่มีขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักหลายกิโลกรัม (Zohar & Mylonas, 2001) ซึ่ง GnRHa ที่หลั่งออกมาจะกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองหลั่งฮอร์โมน GtH ออกมา ซึ่ง GtH ที่หลั่งออกมามีผลทำให้พ่อแม่พันธุ์ปลามีความสมบูรณ์เพศ และเกิดการผสมพันธุ์วางไข่ได้ในปลาหลายชนิด โดยพบว่าการฉีด GnRHa ในรูปแบบ Microspheres ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่เพียง 1 เข็มให้กับแม่พันธุ์ปลาที่มีไข่แก่สมบูรณ์เพศ มีผลทำให้แม่พันธุ์ปลาเกิดการตกไข่และวางไข่ได้ในปลาหลายชนิด เช่น Atlantic Salmon (Mylonas et al., 1995); Sockeye Salmon (Swanson, 1995); White Bass (Mylonas et al., 1996); (Mylonas, Gissis, Magnus, & Zohar, 1997); Striped Bass (Mylonas et al., 1995); (Mylonas, Woods III, Thomas, & Zohar, 1998)

ซึ่งเทคนิคดังกล่าวน่าจะสามารถนำมาใช้ในการเพาะพันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า หรือปลาการ์ตูนชนิดอื่น ๆ ในแนวปะการังซึ่งมีขนาดเล็กได้ โดยนำพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าที่รวบรวมได้จากธรรมชาติ ที่มีการจับคู่กันแล้ว มาทำการทดลองโดยฉีดฮอร์โมน GnRHa ในรูปแบบ Microspheres ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาในการฉีดฮอร์โมนซ้ำแตกต่างกัน ซึ่งจะทำให้

ฮอร์โมนที่ฉีดเข้าไปค่อย ๆ หลั่งออกมาในกระแสเลือดอย่างช้า ๆ เป็นเวลานาน ทำให้เกิดการกระตุ้นการหลั่งของ GtH และส่งผลให้มีการผสมพันธุ์วางไข่ ซึ่งจะเป็นการแก้ปัญหาการขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ปลาที่พร้อมจะวางไข่ในที่กักขังได้ ถ้าสามารถพัฒนาเทคนิคการเพาะพันธุ์และการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนให้มีอัตราการรอดตายให้สูงขึ้น ก็จะเป็นการส่งเสริมให้เกิดเป็นอาชีพการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามในแนวปะการัง เพื่อช่วยลดการจับจากธรรมชาติและในอนาคตสามารถพัฒนาเป็นธุรกิจปลาสวยงามในแนวปะการังส่งออกไปยังต่างประเทศได้ต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาถึงความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ในรูปแบบ Microspheres และระยะเวลาในการฉีดซ้ำที่เหมาะสมในการกระตุ้นให้มีการผสมพันธุ์วางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า
2. เพื่อศึกษาถึงความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ในรูปแบบ Microspheres และระยะเวลาในการฉีดซ้ำที่เหมาะสม ต่อจำนวนไข่ อัตราการฟักและอัตรารอดของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อน

สมมุติฐานการวิจัย

1. การฉีดฮอร์โมน GnRHaในรูปแบบ Microspheres สามารถกระตุ้นให้ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ได้เร็วขึ้น
2. ความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ในรูปแบบ Microspheres ที่ใช้และระยะเวลาในการฉีดซ้ำที่แตกต่างกันมีผลต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า
3. ความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ในรูปแบบ Microspheres ที่ใช้และระยะเวลาในการฉีดซ้ำที่แตกต่างกันมีผลต่อจำนวนไข่ อัตราการฟักและอัตรารอดของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ในรูปแบบ Microspheres และระยะเวลาในการฉีดซ้ำที่เหมาะสม สำหรับกระตุ้นให้มีการผสมพันธุ์วางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า
2. ทราบถึงผลของเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ในรูปแบบ Microspheres และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ ต่อจำนวนไข่ อัตราการฟักและอัตรารอดของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อน

ขอบเขตการวิจัย

ทำการทดลองฉีดฮอร์โมน GnRHa ในรูปแบบ Microspheres ให้กับพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าที่ได้มาจากธรรมชาติที่ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และระยะเวลาในการฉีดซ้ำที่แตกต่างกัน 2 ระดับ คือ ฉีดซ้ำทุก 2 เดือน และ 3 เดือน เป็นระยะเวลาทั้งสิ้น 6 เดือน เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีฉีดสารละลายฮอร์โมนโดยศึกษาผลของฮอร์โมนและระยะเวลาในการฉีดซ้ำ ต่อการผสมพันธุ์วางไข่ จำนวนไข่ อัตราการฟักของปลาการ์ตูนอานม้า และอัตรารอดของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนจนถึงระยะ Metamorphosis

สำรวจเอกสาร

อนุกรมวิธานของปลาการ์ตูนอานม้า

ปลาการ์ตูนอานม้าเป็นปลาการ์ตูนที่สามารถพบได้โดยทั่วไปในอ่าวไทย มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า Saddleback Anemonefish หรือชื่อสามัญที่เรียกในประเทศไทยว่า ปลาการ์ตูนอานม้า ซึ่งเป็นปลาที่มีความน่ารักและมีสีสันที่สะดุดตา สวยงาม มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Amphiprion polymnus* (Linnaeus, 1758) จัดอยู่ในครอบครัว Pomacentridae การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน ของปลาการ์ตูนอานม้า (วิมล เหมะจันทร, 2540) สามารถจัดได้ดังนี้คือ

Phylum Chordata

Class Teleostomi

Order Perciformes

Family Pomacentridae

Subfamily Amphiprioninae

Genus *Amphiprion*

Species *Amphiprion polymnus*

ลักษณะทั่วไปของปลาการ์ตูนอานม้า

ครีบหลังของปลาการ์ตูนอานม้า จะมีครีบแข็งจำนวน 10 หรือ11 อันและก้านครีบอ่อน 13 ถึง16 อัน แต่โดยปกติจะมีประมาณ 13 อัน ที่ครีบอกมีก้านครีบอ่อน 19 อัน (บางครั้งอาจมี 18 อัน) เกล็ดบนเส้นข้างลำตัวมีตั้งแต่ 32 ถึง 41 เกล็ด ซี่เหงือกบนแกนเหงือกอันแรกอาจมีตั้งแต่ 16 ถึง 19 ซี่ ฟันคล้ายรูปกรวยอยู่บนขากรรไกรแต่ละข้างประมาณ 34 ถึง 38 ซี่ เกล็ดก่อนถึงครีบหลังมีประมาณ 10 ถึง15 เกล็ด (Allen, 1980) ความสูงของครีบหลังที่สูงที่สุดจะน้อยกว่า 1 ส่วน 3 ของความกว้างของหัว ครีบหางส่วนมากจะมีสีดำ และตามขอบจะมีสีขาวตัดอยู่โดยส่วนที่เป็นสีดำจะเรียวเล็กลงไปเรื่อย ๆ จนถึงขอบของหาง บริเวณหน้าอก หรือส่วนท้องอาจมีสีเหลืองถึงสีส้ม หรือมีสีน้ำตาลปนดำ ขนาดของลำตัวใหญ่ที่สุดยาวประมาณ 120 มิลลิเมตร (Allen & Fautin, 1992)

การแพร่กระจาย

โดยทั่วไปปลาการ์ตูนอานม้า จะอยู่ร่วมกับดอกไม้ทะเล 2 ชนิดคือ *Heteractis crispa* และ *Stichodactyla haddoni* ซึ่งจะอยู่ที่ความลึกระหว่าง 2 ถึง 30 เมตร โดยปกติจะพบปลาการ์ตูน

อานม้า อยู่เหนือพื้นโคลนหรือพื้นทรายในแอ่งน้ำใต้ทะเลในแนวปะการังหรือบริเวณที่กำบัง ซึ่งอาจจะพบเห็นเพียงตัวเดียวหรืออยู่รวมกันเป็นคู่และในบางครั้งอาจพบว่ามีลูกรวมอยู่ด้วย บริเวณที่พบปลาการ์ตูนชนิดนี้คือที่หมู่เกาะริวกิว จีน เวียดนาม ไต้หวัน ไทย มาเลเซีย อินโดนิเซีย หมู่เกาะฟิลิบปินส์ ทะเลทางตอนเหนือของออสเตรเลีย นิวกีนี และหมู่เกาะโซโลมอน (Allen & Fautin, 1992)

การเพาะพันธุ์ปลาการ์ตูน

การเพาะพันธุ์ปลาทะเลสวยงาม (Marine Ornamental Fish) ในปัจจุบันยังมีการศึกษาน้อยมาก แต่อย่างไรก็ตามก็เป็นข้อยกเว้นในกลุ่มของปลาการ์ตูน ซึ่งเป็นกลุ่มที่สามารถเพาะขยายพันธุ์ได้สำเร็จ เพียงแค่มีสภาพแวดล้อมในโรงเพาะฟักที่เหมาะสมสำหรับพ่อแม่ปลา และมีระบบจัดการในโรงเพาะฟักที่ดีและมีพ่อแม่ปลาที่สมบูรณ์ที่ทำการจับคู่กันแล้ว ซึ่งในการจับคู่กันนั้นพ่อแม่ปลาจะทำการจับคู่กันเองตามธรรมชาติจนกระทั่งสามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมเองได้ (Allen, 1980) ซึ่งสอดคล้องกับ Wilkerson (1998) กล่าวว่า ปัจจัยที่คอยสนับสนุนให้มีการจับคู่กันของปลาการ์ตูนประกอบด้วย สุขภาพที่ดี ความเป็นส่วนตัว และการปรับสภาพเข้ากับสถานที่เลี้ยงของพ่อแม่พันธุ์ แต่สำหรับปลาการ์ตูนอานม้า เป็นปลาที่ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมในที่กักขังได้ยาก โดยในขณะที่เรานำมาเลี้ยงภายในตู้แสดงสัตว์น้ำ พ่อแม่พันธุ์ปลาต้องการเวลานานหลายเดือนในการปรับตัว เพื่อสร้างความเคยชินกับสภาพแวดล้อมจนกระทั่งสามารถอยู่ได้ในสภาพแวดล้อมนั้น ๆ (ORA, 2003)

ลักษณะเด่นที่สามารถใช้ในการบ่งบอกเพศ

โดยทั่วไปปลาการ์ตูนเพศเมียจะมีขนาดใหญ่และมีลักษณะเฉพาะตัวที่มากกว่าปลาการ์ตูนเพศผู้แต่ไม่เหมือนกันหมดแล้วแต่ละชนิดของปลาการ์ตูน โดยสามารถเห็นความแตกต่างของขนาดระหว่างปลาการ์ตูนเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจน ใน Maroon Clownfish (*Premnas biaculeatus*) และTomato Clownfish (*Amphiprion frenatus*) โดยปลาเพศผู้ทั้ง 2 ชนิดตามปกติจะมีความยาวเพียงครึ่งหนึ่งของปลาเพศเมีย หรือบางครั้ง Tomato Clownfish ปลาเพศผู้อาจจะมีขนาดเท่ากับปลาเพศเมียก็ได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ Ocellaris Clownfish (*Amphiprion ocellaris*) และ Skunk Clownfish (*Amphiprion akallopisos*) จะแสดงความแตกต่างของขนาดน้อยกว่า โดยที่ปลาเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าคู่ของมันเพียง 1 ใน 4 ส่วนหรือ 1 ใน 3 ส่วนเท่านั้น (Wilkerson, 1998) ซึ่งสอดคล้องกับ Hoff (1996) กล่าวว่าขนาดเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่เป็นบรรทัดฐานในการกำหนดเพศผู้และเพศเมียในปลาการ์ตูนหลายๆชนิด ซึ่งโดยทั่วไปปลาเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าปลาเพศผู้ เช่น

Saddleback Clownfish (*A. polymnus*), Two-Band Clownfish (*Amphiprion bicinctus*), Skunk Clownfish (*A. akallopisos*), Ocellaris Clownfish (*A. ocellaris*) และ Percula Clownfish (*Amphiprion percula*) ปลาเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าคู่ของมัน

Allsop & West (2003) ได้ทำการศึกษาถึงความสัมพันธ์ระหว่างอายุกับขนาดต่อการเปลี่ยนเพศในกลุ่มปลาที่มี 2 เพศ พบว่าขนาดความยาวต่ำสุดของปลาการ์ตูนที่สามารถเปลี่ยนเพศจากเพศผู้เป็นเพศเมีย ใน Saddleback Clownfish (*A. polymnus*) เท่ากับ 92 มิลลิเมตร Skunk Clownfish (*A. akallopisos*) เท่ากับ 72 มิลลิเมตร Tomato Clownfish (*A. frenatus*) เท่ากับ 66 มิลลิเมตร Ocellaris Clownfish (*A. ocellaris*) เท่ากับ 44 มิลลิเมตร Pink Skunk Clownfish (*Amphiprion perideraion*) เท่ากับ 54 มิลลิเมตร และ Yellow Clownfish (*Amphiprion sandaracinos*) เท่ากับ 51 มิลลิเมตร

สีสันตามธรรมชาติสามารถใช้บ่งบอกถึงเพศได้ดีพอสมควรในปลาการ์ตูน ซึ่งเทคนิคนี้จะใช้ได้ดีในการบ่งบอกเพศสิ่งที่สำคัญคือปลาต้องไม่มีความเครียด มีสุขภาพที่ดี และปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมได้ เช่น Saddleback Clownfish (*A. polymnus*) ปลาเพศเมียที่บริเวณใบหน้าจะมีสีเหลืองที่สดใสขณะที่ปลาเพศผู้จะมีสีออกน้ำตาลมัว ๆ Red Saddleback Clownfish (*Amphiprion ephippium*) ปลาเพศเมียโดยทั่วไปลำตัวจะมีสีออกแดงมัว ๆ และที่บริเวณใบหน้ามีสีแดงอมขาว ขณะที่ปลาเพศผู้ลำตัวและใบหน้าจะมีสีแดงที่สดใสกว่า Skunk Clownfish (*A. akallopisos*) ปลาเพศเมียโดยปกติจะมีสีส้มอมเหลืองที่สดใสกว่าปลาเพศผู้ (Hoff, 1996) Pink Skunk Clownfish (*A. perideraion*) ปลาเพศผู้จะแตกต่างจากปลาเพศเมียโดยจะมีขอบสีชมพูที่ส่วนหลังของครีบหลังและครีบหาง (Wilkerson, 1998) ส่วน Allen & Fautin (1992) กล่าวว่า Tomato Clownfish และ Maroon Clownfish ปลาเพศผู้จะมีสีสันที่สดใสกว่าปลาเพศเมียแต่มีความแตกต่างของสีสันเพียงเล็กน้อยใน Maroon Clownfish จนกระทั่งเมื่อเลี้ยงปลาเพศเมียต่อไปอีกหลาย ๆ ปี ปลาเพศเมียจะมีสีน้ำตาลชัดเจนมากกว่าปลาเพศผู้

พฤติกรรมการวางไข่ของปลาการ์ตูน

ปลาการ์ตูนเป็นปลาที่วางไข่ติดกับวัสดุอื่น ๆ (Adhesive Egg) โดยแม่ปลาจะวางไข่ติดอยู่ตามหิน เปลือกหอย หรือวัสดุที่มีผิวเรียบ (Allen, 1972) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Moyer & Steene (1979) พบว่าปลาการ์ตูนชนิด *A. polymnus* ซึ่งพบอยู่กับดอกไม้ทะเลที่ฝังทรายขาดวัสดุที่จะวางไข่ จะดึงเอาเปลือกหอยเม่นไปใกล้กับดอกไม้ทะเลเพื่อใช้เป็นวัสดุสำหรับวางไข่ โดยไข่ปลาแต่ละฟองจะแยกออกจากกัน ลักษณะของไข่ปลาการ์ตูนเป็นรูปทรงรี คล้ายแคปซูล มีขนาดแตกต่างกันออกไปแล้วแต่ละชนิดของปลา (Allen, 1972) เช่น นิพันธ์ ทารีมุกข์ (2543) รายงานว่าไข่ปลา

การ์ตูนชนิด *A. polymnus* มีรูปร่างเป็นทรงกระบอกปลายมน มีความยาวและกว้างประมาณ 2.10 และ 0.82 มิลลิเมตร เซลล์ไข่มีลักษณะเป็นรูปวงรี และประกอบด้วยส่วนของไข่แดงเป็นส่วนใหญ่ ปลายข้างหนึ่งของฟองไข่จะมีขั้วติดอยู่กับวัตถุ ด้าน Animal Pole ของเซลล์ไข่จะอยู่ทางด้านขั้วของไข่ด้านล่าง และด้าน Vegetal Pole จะอยู่ทางด้านบนของไข่ อุ่นจิต ปาติยเสวี (2537) รายงานว่าไข่ปลาการ์ตูนชนิด *A. ocellaris* มีขนาดความยาว 2.34 มิลลิเมตรและกว้าง 1 มิลลิเมตร Allen (1972) กล่าวถึงไข่ปลาการ์ตูน Orange-Fin Clownfish (*Amphiprion chrysopterus*) ยาวประมาณ 2.4 มิลลิเมตร และกว้าง 0.9 มิลลิเมตร

ก่อนที่จะทำการวางไข่ 2-5 วัน ปลาตัวผู้จะเป็นผู้เลือกวัสดุที่จะวางไข่และจะเริ่มทำความสะอาดด้วยการใช้ปากกัดและใช้ครีบอกและครีบหางช่วยในการโบกพัดสิ่งอื่น ๆ ที่ติดอยู่กับผิวหน้าของวัสดุให้หลุดไปเสมือนกับการเตรียมวัสดุสำหรับวางไข่ ส่วนใหญ่แล้วจะเป็นสาหร่าย ตะกอน และสัตว์น้ำวัยอ่อนอื่น ๆ เช่นตัวอ่อนของดอกไม้ทะเล ซึ่งติดมากับน้ำทะเล ปลาตัวเมียจะเข้ามาช่วยทำความสะอาดเป็นครั้งคราว ปลาจะว่ายไปมาระหว่างดอกไม้ทะเลกับวัสดุที่เตรียมไว้สำหรับวางไข่ ยิ่งใกล้วันที่จะวางไข่ ปลาตัวผู้จะขะมักเขม้นในการทำความสะอาดมากขึ้น และปลาตัวเมียจะว่ายเข้ามาช่วยทำความสะอาดในวันที่จะวางไข่ (อุ่นจิต ปาติยเสวี, 2537)

การวางไข่ของปลาจะสังเกตได้ง่ายว่าปลาใกล้จะวางไข่แล้วหรือไม่ โดยสังเกตได้จากปลาตัวเมียเมื่อใกล้เวลาจะวางไข่บริเวณท้องจะเป่ง นูนกลมใหญ่กว่าปกติมากและมีท่อนำไข่ (Urogenital Papilla) รูปกรวยสีแดงจาง ๆ โผล่ออกมาจากบริเวณท้องเป็นติ่งยาวประมาณ 4- 5 มิลลิเมตร หลังจากนั้นปลาจะเริ่มวางไข่ภายใน 1 ชั่วโมง ก่อนวางไข่ประมาณ 30 นาที ปลาตัวผู้จะมีท่อขนาดเล็กสีขาวโผล่ออกมามีความยาวประมาณ 2 มิลลิเมตร ปลาทั้งคู่จะไม่อยู่นิ่งจะช่วยกันทำความสะอาดวัสดุที่จะวางไข่โดยเฉพาะตัวผู้จะเฝ้าดูแลทำความสะอาดอยู่เกือบตลอดเวลา ตัวเมียจะว่ายมาที่วัสดุที่จะวางไข่ว่ายวนไปมาทางซ้ายทีขวาที ดูแม่ปลาจะกระวนกระวายว่ายวนไปมาระหว่างดอกไม้ทะเลกับวัสดุที่จะวางไข่ การว่ายวนในระยะแรก ๆ จะยังไม่ปล่อยไข่ออกมาหลังจากว่ายวนอยู่ 2-3 รอบ จึงเริ่มปล่อยไข่ออกมา ตัวผู้จะว่ายอยู่ชิดกับตัวเมียและว่ายตามตัวเมียตลอด ขณะที่วางไข่ตัวเมียจะว่ายเกือบชิดกับวัสดุที่จะวางไข่ ฟองไข่จะหลุดออกมาจากท่อนำไข่ ขณะที่แม่ปลาเคลื่อนที่ ว่ายวนไปมาอย่างช้า ๆ อยู่เหนือวัสดุที่จะวางไข่เพียงเล็กน้อยส่วนของท่อนำไข่เกือบสัมผัสกับวัสดุที่ไข่จะไปติด ทันทีที่ไข่หลุดออกมาทางขั้วด้านล่าง (Ventral Pole) ของไข่จะมีเยื่อเหนียวใส เยื่อใสนี้เมื่อสัมผัสกับวัสดุใดก็จะยึดอยู่อย่างเหนียวแน่น แม่ปลาจะว่ายอย่างช้า ๆ และว่ายวนเป็นวง ในช่วงแรก ๆ จะว่ายวนเป็นวงแคบพร้อมทั้งวางไข่และจะว่ายวนขยายวงกว้างขึ้นไข่ที่ออกมาจะเกาะอยู่บนวัสดุพร้อมทั้งจำนวนไข่ที่เพิ่มมากขึ้น (อุ่นจิต ปาติยเสวี, 2537) พื้นที่ในการวางไข่นั้นจะมีขนาดแตกต่างกันออกไป อาจมีเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 5-10 เซนติเมตร (Allen, 1980)

ในขณะเดียวกันปลาตัวผู้จะว่ายตามตัวเมียไปติด ๆ และปล่อยน้ำเชื้อผสมกับไข่ทันที ในช่วงระหว่างการวางไข่ปลาตัวเมียจะว่ายไปพักที่ดอกไม้ทะเล บางครั้งจะมีไข่ 2-3 ฟองหลุดออกจากท่อนำไข่ ซึ่งอยู่ห่างจากรังขณะที่ยังลอยเคว้งอยู่ถ้าพ่อปลาหรือแม่ปลาเห็นก็จะเข้ากินทันที การวางไข่แต่ละครั้งใช้เวลาประมาณ 40- 60 นาที จำนวนไข่ของปลาการ์ตูนส้มขาวที่วางแต่ละครั้งอยู่ระหว่าง 145 ถึง 1,827 ฟอง แม่ปลาการ์ตูนจะวางไข่ติดวัสดุเป็นวงกลม หลังจากวางไข่แล้ว 2-3 ชั่วโมง ท่อวางไข่จะหดกลับทันทีหลังจากเสร็จสิ้นการปล่อยไข่ผสมกับน้ำเชื้อ (อุ่นจิต ปาติยเสวี, 2537) โดยการวางไข่ของปลาการ์ตูนแต่ละชนิดจะวางไข่แต่ละครั้งไม่เท่ากัน เช่น Ross (1978) ได้ประมาณจำนวนไข่ของปลาการ์ตูน Red And Black Clownfish (*Amphiprion melanopus*) ที่วางไข่แต่ละครั้งมีจำนวน 200-400 ฟอง Fishelson (1965) ได้ศึกษาปลาการ์ตูนชนิด *A. melanopus* พบว่าวางไข่ครั้งละ 600-1600 ฟอง ส่วน Bell (1976) ศึกษาในปลาการ์ตูน Clark's Clownfish (*Amphiprion clarkii*) พบว่าวางไข่ครั้งละประมาณ 500-800 ฟอง ในตู้เลี้ยง โดย Allen (1972) กล่าวว่าจำนวนไข่ขึ้นอยู่กับเวลาที่อยู่ร่วมกันของพ่อแม่ปลาโดยพ่อแม่ปลาที่อยู่กันเป็นคู่กันนานแล้วจำนวนไข่ที่วางจะมีจำนวนมากกว่าพ่อแม่ปลาคู่ที่เพิ่งจับคู่กันใหม่ ๆ

พฤติกรรมในการเฝ้าดูแลไข่ของปลาการ์ตูน

ไข่ปลาการ์ตูนต้องอาศัยพ่อแม่เฝ้าดูแลจึงจะพัฒนาและฟักออกเป็นตัวได้ ปลาตัวผู้จะเป็นผู้เฝ้าดูแลไข่ปลาตัวเมียจะเข้ามาช่วยโบกพัดเป็นครั้งคราวไข่ปลาจะได้รับการดูแลมากน้อยขึ้นอยู่กับการโบกพัดของปลาตัวผู้ การที่ปลาใช้ครีบอก (Pectoral Fin) โบกพัดไข่ติด ๆ กันหลาย ๆ ครั้ง ทำให้ไข่มีการขยับเคลื่อนไปตามทิศทางของแรงโบกพัด ขณะที่ปลาว่ายจะใช้หาง (Caudal Fin) โบกไข่แรง ๆ การโบกพัดไข่ของปลาโดยครีบหางนี้จะช่วยขจัดตะกอนและสิ่งสกปรกต่าง ๆ รวมทั้งสัตว์น้ำวัยอ่อนและตัวเบียฬต่าง ๆ ที่จะก่อให้เกิดโรคหลุดออกไป ในขณะที่โบกพัดไข่นั้นพ่อปลาจะคอยตอดกินไข่ที่เสียทันที เป็นการป้องกันการแพร่กระจายของโรคจากไข่ฟองที่เสียไปยังฟองใกล้เคียงที่อยู่ติดกันและคอยทำความสะอาด ขจัดสาหร่าย ตะไคร่น้ำที่ขึ้นอยู่ในบริเวณรังไข่หรือบริเวณที่ไข่ติดอยู่ (อุ่นจิต ปาติยเสวี, 2537) รวมทั้งเพื่อให้ไข่ได้รับออกซิเจนเพิ่มมากขึ้นด้วย (Allen, 1980) และที่สำคัญอีกอย่างก็คือคอยป้องกันมิให้ศัตรูเข้าใกล้รังไข่ เมื่อมีภัยมาใกล้ปลาทั้งคู่จะช่วยกันไล่ศัตรูให้ออกไป (อุ่นจิต ปาติยเสวี, 2537)

Allen (1980) ได้ทำการศึกษาปลาการ์ตูนชนิด *A. chrysopterus* ที่ Eniwetok Atoll รายงานว่าในระยะ 5 วันแรกของการเฝ้าดูแลไข่ปลาของตัวผู้นั้น ในช่วงกลางวันพ่อปลาใช้เวลาน้อยกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ ในการเฝ้าดูแลไข่และจะเพิ่มมากขึ้นในช่วง 2 วันหลังและวันสุดท้ายก่อนที่ไข่

ใกล้ฟักออกเป็นตัวพ่อปลาจะใช้เวลา 87 เปอร์เซ็นต์ ในการเฝ้าดูแลรังไข่ ส่วนตัวเมียจะใช้เวลาเพียง 5 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

การฟักไข่ของปลาการ์ตูน

เมื่อไข่ปลามีการพัฒนาการสร้างอวัยวะต่าง ๆ แล้วก็พร้อมที่จะฟักออกมาจากผนังเปลือกไข่ โดยการใช้หางและลำตัวกระแทกให้แตก ระยะเวลาปฏิสนธิจนถึงระยะเวลาที่ฟักออกจากเปลือกไข่แตกต่างกันไปในปลาแต่ละชนิด ลูกปลาจะใช้ถุงไข่แดงหรือถุงโยล์คเป็นแหล่งอาหารสำรองขณะที่ลูกปลาฟักออกมาใหม่ ๆ และยังอ่อนแออยู่ โดยทั่วไปลูกปลาที่ฟักออกมาจากไข่เรียกว่า Larva หรือ Fry เมื่อลูกปลาเริ่มมีขนาดโตขึ้นถุงไข่แดงหรือถุงโยล์ค จะมีขนาดลดลงจนหายไป (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) แต่มีข้อสังเกตอยู่ 2 ประการ ที่พอจะช่วยกำหนดได้ว่าจะฟักออกเป็นตัวในวันใดดูได้จากการเฝ้าดูแลโบกพัดของพ่อปลาซึ่งจะใช้เวลาอยู่กับการโบกพัดไข่เกือบตลอดเวลา หรือโดยสังเกตจากฟองไข่ตรงบริเวณลูกตาปลา จะมีแถบสีเงินแววววาวอยู่รอบ ๆ แสดงว่าใกล้เวลาที่ปลาจะฟักออกเป็นตัว ในระยะนี้ตัวอ่อนจะเจริญเติบโตจนดับปลอกที่หุ้ม ตัวปลาอยู่ในลักษณะที่ตัวงอส่วนปลายของหางมาอยู่ตรงระดับเดียวกับลูกตา เมื่อใกล้เวลาที่ปลาจะฟักออกเป็นตัวปลาจะขยับตัวตรงบริเวณส่วนของหัวปลากับหางปลาจะเกิดเป็นช่องว่างขึ้นและผนังของปลอกไข่บริเวณนี้จะถูกดันโป่งออกเล็กน้อย ปลาจะดิ้นติด ๆ กันหลายครั้งเกิดแรงดันทำให้ผนังของปลอกไข่ฉีกขาดเป็นแนวยาวจากบริเวณส่วนหัวลงมาจนถึงเกือบสุดปลายของปลอกไข่ ทันทีที่ปลอกไข่ฉีกขาดออก ปลาจะดีดยืดตัวออกและหลุดจากปลอก ช่วงการดีดออกจากปลอกจะเร็วมากและทันทีที่ปลาดีดตัวหลุดออกจากปลอกไข่ลูกปลาจะว่ายน้ำทันที โดยว่ายเคลื่อนที่ขึ้น ๆ ลง ๆ ในระยะสั้น ๆ การว่ายไม่มุ่งไปในทิศทางใดทางหนึ่ง (อุ่นจิต ปาติยเสวี, 2537)

Bell (1976) รายงานว่าระยะเวลาในการพัฒนาของไข่ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิของน้ำ เช่น ในปลาการ์ตูนชนิด *A. clarkii* ใช้เวลาเพียง 6.5 วัน ในการฟักออกเป็นตัวที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่จะใช้เวลาในการฟักนานถึง 13.5 วันในการฟักออกเป็นตัวที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส โดย Allen & Fautin (1992) รายงานว่าโดยทั่วไปแล้วลูกปลาจะฟักออกเป็นตัวในช่วงตอนเย็นของวันที่ 6 หรือ 7 หลังจากที่ปลาวางไข่ ส่วน Moyer & Bell (1976) รายงานว่าส่วนใหญ่ปลาจะฟักออกเป็นตัวในเวลากลางคืนภายหลังที่พระอาทิตย์ลับขอบฟ้าไปแล้ว 1-2 ชั่วโมง

การอนุบาลลูกปลาการ์ตูน

ลูกปลาแรกเกิดจะไม่กินอาหารที่ไม่มีชีวิต พบว่าโรติเฟอร์มีความเหมาะสมที่ใช้ในการอนุบาลลูกปลาในระยะแรก ซึ่งลูกปลาในระยะนี้จะมีลักษณะการกินอาหารแบบแรม (Ram Feeding) คืออ้าปากคอยกินเหยื่อที่ผ่านมากับน้ำเข้าปาก และเมื่อลูกปลามีอายุ 7- 8 วัน จะมีการเปลี่ยนแปลงการกินอาหารโดยมีการเปลี่ยนแปลงส่วนหัวกะโหลกและช่องปาก ลูกปลาจะเปลี่ยนไปกินอาหารโดยใช้ปากดูดเรียกว่า แบบซัคชัน (Suction Feeding) (สุภาพร สุกสีเหลือง, 2542) เช่นเดียวกับ Moe (1982) รายงานว่าการเลี้ยงลูกปลาในระยะแรกควรให้โรติเฟอร์ 3-8 ตัว ต่อน้ำที่ใช้เลี้ยง 1 มิลลิลิตร ในการทดลองได้ให้อาหารครั้งละน้อย ๆ วันละ 4 ครั้ง ซึ่งการให้ครั้งละน้อยแต่บ่อยครั้งจะดีกว่าการให้ครั้งละมาก ๆ เพียงครั้งเดียว เพราะว่าลูกปลาที่ได้โรติเฟอร์ใหม่ ๆ ซึ่งมีความแข็งแรง สมบูรณ์ และมีคุณค่าทางอาหารมากกว่าโรติเฟอร์ที่ตักมาจากตู้เลี้ยงที่นานแล้วและอดอาหาร

เริ่มให้ไรน้ำเค็มที่เพาะออกมาใหม่ ๆ การให้ในช่วงแรก ๆ มีความสำคัญมากเพราะปลาเคยชินกับการกินโรติเฟอร์ ถ้าให้ไรน้ำเค็มมากเกินไปลูกปลาจะเสียการทรงตัว ส่วนหัวตั้งขึ้นส่วนหางชี้ลง ท้องจะอูมเป่ง และมีอาการควงและจมลงตายบริเวณพื้นตู้ จึงควรเริ่มให้ไรน้ำเค็มแต่น้อย ในขณะเดียวกันก็ลดปริมาณโรติเฟอร์ให้น้อยลงจนกระทั่งลูกปลาอายุ 14 วัน จึงให้ไรน้ำเค็มเพียงอย่างเดียว จนลูกปลามีอายุ 45 วัน จะมีลักษณะเหมือนพ่อแม่ทุกประการและอยู่เป็นกลุ่มบริเวณพื้นตู้ ย้ายไปเลี้ยงในพื้นที่ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและใส่ดอกไม้ทะเล เริ่มให้อาหารประเภทโปรตีน เช่น เนื้อหอยสับ เนื้อกุ้ง ในตอนเช้าและให้ไรน้ำเค็มตัวเต็มวัยในตอนบ่าย (อุ่นจิต ปาติยเสวี, 2537)

ฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ของปลา

ฮอร์โมนจัดเป็นสารที่หลั่งออกมาจากต่อมไร้ท่อ และไปยังอวัยวะเป้าหมายทางกระแสเลือด โดยไม่มีผลต่ออวัยวะอื่นเลย (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) ฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ของปลาสร้างมาจากไฮโปทาลามัส (Hypothalamus) ต่อมใต้สมอง และต่อมเพศ โดยฮอร์โมนเหล่านี้จะทำหน้าที่ควบคุมระบบสืบพันธุ์ให้เป็นปกติ เพื่อความอยู่รอดของเผ่าพันธุ์ เช่น การพัฒนาการสร้างไข่ การพัฒนาการสร้างสเปิร์ม การควบคุมการตกไข่และการวางไข่ (Perter, Habibi, Marchant, & Nahoniak, 1987a) รวมทั้งการแสดงออกลักษณะเพศภายนอก (Secondary Sexual Character) ฮอร์โมนเหล่านี้จะทำงานได้เป็นปกติ เมื่อสภาพแวดล้อมต่าง ๆ เช่น อุณหภูมิ ฝน วัสดุการกระตุ้นการวางไข่และปัจจัยทางสังคม (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) รวมทั้งแสงแดด ระยะเวลาของการมีแสงแดด (Photoperiod) สภาพภูมิอากาศ (Liley, 1978) โดยทั่วไปแล้วขบวนการที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ของปลาหรือสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ จะเริ่มต้นเมื่อมีการกระตุ้นที่เหมาะสมจากสิ่งแวดล้อม

ภายนอก (External Factor) ส่งผ่านไปยังสมองส่วนที่เรียกว่า Hypothalamus (Internal Factor) ให้ผลิตฮอร์โมนที่เรียกว่า โกนาโดโทรปิน รีลิสซิ่งฮอร์โมน (GnRH) และ GnRH จะทำหน้าที่กระตุ้นหรือสั่งการให้ต่อมใต้สมองหลั่งฮอร์โมนที่เรียกว่าโกนาโดโทรปิน(Gonadotropin, GtH) ซึ่งGtH นี้สั่งการไปยังอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad) ให้ผลิต สเตอรอยด์ (Steroid) ซึ่งมีผลต่อการสุกของไข่และการวางไข่ และการผลิตน้ำเชื้อต่อไป (Griffin & Ojeda, 1988)

โกนาโดโทรปิน (Gonadotropin, GtH) เป็นฮอร์โมนควบคุมระบบสืบพันธุ์ที่มีความสำคัญมาก ในที่นี้หมายถึงฮอร์โมนที่เป็นสารประเภท ไกลโคโปรตีน (Glycoprotein) คือประกอบไปด้วยส่วนที่เป็นคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate) เกาะอยู่บนโมเลกุลของโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นจากต่อมใต้สมองและมีหน้าที่ในการกระตุ้นพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ (Gonad) มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 25,000-40,000 ดาลตัน (Dalton) (นฤพล สุขุมาสวิน, 2538) จากการศึกษาและการค้นพบของนักวิชาการพบว่า ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินของปลา มีลักษณะเหมือนกับฮอร์โมนโกนาโดโทรปินของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น ๆ ที่ประกอบด้วยฮอร์โมน 2 ชนิด ได้แก่ โกนาโดโทรปิน-วัน (Gonadotropin I หรือ GtH I) ซึ่งเทียบเท่าฮอร์โมนฟอลลิเคิล สติมูเลติง ฮอร์โมน (Follicle Stimulating Hormone หรือ FSH) และโกนาโดโทรปิน-ทู (Gonadotropin II หรือ GtH II) ซึ่งเทียบเท่าฮอร์โมนลูตีไนซิงฮอร์โมน (Lutenizing Hormone หรือ LH) (Suzuki, Kawauchi & Nagahama, 1993) ซึ่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่หลั่งจากต่อมใต้สมอง อันได้แก่ ฮอร์โมนเร่งการพัฒนาของไข่ (Follicle Stimulating Hormone, FSH) และฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (Luteinizing Hormone, LH) จะมีผลโดยตรงต่อความสมบูรณ์เพศ (สิรินทร์ วิโมกข์สันถว์, 2521) ทำหน้าที่กระตุ้นให้ไข่สุก และมีน้ำเชื้อพร้อมที่จะผสมพันธุ์ได้ (Pickford & Atz, 1957) ซึ่งสอดคล้องกับวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย (2546) กล่าวว่า ฮอร์โมน GtH I และฮอร์โมน GtH II ทำหน้าที่ต่างกันในการควบคุมการพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ ในปลาเพศเมียฮอร์โมน GtH I ทำหน้าที่ควบคุมการสร้างไข่แดง (Vitellogenesis) และการพัฒนาการของรังไข่ในระยะแรก (Early Ovarian Development) ในขณะที่ฮอร์โมน GtH II ทำหน้าที่กระตุ้นให้ไข่เจริญสมบูรณ์เต็มที่ (Final Oocyte Development) และมีการตกไข่ (Ovulation) สำหรับในปลาเพศผู้ ฮอร์โมน GtH I ทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาการของอัณฑะในระยะแรก (Early Testicular Development) และให้มีการพัฒนาการสร้างสเปิร์ม (Spermatogenesis) ในขณะที่ฮอร์โมน GtH II ทำหน้าที่กระตุ้นให้สเปิร์มมาโตซัว (Spermatozoa) หลุดออกมาจากเซลล์เซอโทไล (Sertoli Cell) ซึ่งเรียกขบวนการนี้ว่าสเปิร์มมิเอชัน (Spermiation) ทำให้ปลามีน้ำเชื้อ (Expressible Milt) ในปริมาณที่มากขึ้น การหลั่งฮอร์โมน GtH I และ GtH II ออกมาจากต่อมใต้สมองของปลามีความสลับซับซ้อน ถูกควบคุมด้วยปัจจัยหลายอย่างโดยเฉพาะฮอร์โมน หรือสารเคมีสื่อสารที่หลั่ง

ออกมาจากสมองส่วน Hypothalamus ซึ่งถือเป็นปัจจัยหลักในการควบคุมการหลั่งฮอร์โมน GtH I และ GtH II ของปลาโดยตรง

จากทฤษฎีดังกล่าวจึงก่อให้เกิดการผลิตหรือค้นหาสารสังเคราะห์อื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับฮอร์โมนในธรรมชาติดังกล่าวเพื่อประโยชน์ในการเพาะพันธุ์ปลาต่อไป โดยในช่วงระหว่างปี ค.ศ.1970-1975 นักวิทยาศาสตร์ 2 กลุ่มในสหรัฐอเมริกา กลุ่มแรกนำโดย Andrew Schally และอีกกลุ่มหนึ่งนำโดย Roger Guillemin ได้ศึกษาถึงโมเลกุลของฮอร์โมนจาก Hypothalamus ที่มีผลควบคุมการทำงานของต่อมใต้สมอง กลุ่มของ Schallyใช้ Hypothalamus จากหมู 250,000 ตัว และกลุ่มของ Guillemin ใช้ในสมองแกะ ซึ่งทั้งสองกลุ่มพบ LH-RH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone) ซึ่งเป็น Decapeptide ในระยะนั้นยังเรียกว่า LH-RH เพราะกระตุ้นการหลั่ง LH หลังจากนั้นก็พบ FSH-RH (Follicle Stimulation Hormone Releasing Hormone) ว่าเป็น Decapeptide ตัวเดียวกันที่กระตุ้นให้เกิดการหลั่ง LH, FSH แต่ใช้ระยะเวลาในการกระตุ้นต่างกัน ต่อมาจึงนิยมเรียก Decapeptide ตัวนี้ว่า Gonadotropin Releasing Hormone หรือ GnRH (แต่ก็มีบางคนยังเรียกLH-RH) (สมศรี งามวงศ์ชน, 2542)

บนความรู้ทางด้านชีวเคมีพบว่าโครงสร้างของ GnRH ที่ถูกค้นพบในสัตว์ต่าง ๆ รวม 6 ชนิด ดังนี้คือ ค้นพบครั้งแรกในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือ Mammalian GnRH (mGnRH) ในปี ค.ศ. 1971 โดย Matsuo et al. และBurgus et al. ในปี ค.ศ.1972 ต่อมาพบในสัตว์ปีกโดย King and Millar ในปี ค.ศ.1982 และในปี ค.ศ.1982-1984 Miyamoto et al. พบโครงสร้าง GnRH ในไก่ว่ามี 2 ฟอร์ม ที่เรียกว่า Chicken GnRH-I (cGnRH-I) และChicken GnRH-II (cGnRH-II) ต่อมาในปี ค.ศ.1983 Sherwood et al. ค้นพบ GnRHในปลาแซลมอนเรียกว่า Salmon GnRH (sGnRH) และพบ Lamprey GnRH (lGnRH) จากสมองของปลาปากกลม (Lamprey) ในปี ค.ศ.1986 ต่อมาในปี ค.ศ.1992 ค้นพบ Dogfish GnRH (dfGnRH) จากสมองปลาฉลาม (Dogfish) โดย Lovejoy et al. ในปีเดียวกันนั้นเอง Ngamvongchon et al. ก็ได้พบโครงสร้าง GnRH จากสมองปลาดุกอุยให้ชื่อว่า Catfish GnRH (cfGnRH) ซึ่งพบว่ามี 2 ฟอร์ม นอกจากนี้ยังเป็นที่คาดการณ์กันว่าจะยังมีการค้นพบโครงสร้าง จากสัตว์น้ำอื่น ๆ อีกมากมาย (สมศรี งามวงศ์ชน, 2539)

จากการค้นพบนี้ พบว่า LH-RH ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Mammalian) และ GnRH ที่พบในปลากระดูกแข็งนั้นมีโครงสร้างที่คล้ายคลึงกันกล่าวคือ เป็นฮอร์โมนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 ตัวเรียงตัวกันหรือที่เรียกว่า Decapeptide นอกจากนี้ยังทำหน้าที่เดียวกันคือกระตุ้นให้เกิดการหลั่งของ GtH จากต่อมใต้สมองเช่นกัน จึงสรุปได้ว่า Gonadotropin Releasing Hormone ที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและในปลากระดูกแข็งนั้นเป็นชนิดเดียวกันแต่มีโครงสร้างต่างกัน (Donaldson & Hunter, 1983) โดยภายหลังการค้นพบโครงสร้างของ GnRH ที่เป็น Natural Forms

ในสัตว์ต่าง ๆ ดังกล่าวแล้วนั้น ได้มีการสังเคราะห์ฮอร์โมน (Analog Forms) ดังกล่าวทางชีวเคมีกว่า 200 Analogs ที่สังเคราะห์โดยใช้รูปแบบของ Mammalian GnRH (mGnRH) และประมาณ 200 Analogs ที่สังเคราะห์โดยใช้รูปแบบของ Nonmammalian GnRH (Crim, Peter, & Van Der Kraak, 1986) เพื่อใช้ในทางการแพทย์อย่างมากมาย เพื่อกระตุ้นให้เกิดการตกไข่ในกรณีที่มีบุตรยาก และการใช้ Anti-Analogs ของ GnRH ในการคุมกำเนิด นอกจากนี้ยังใช้ GnRH Analogsในการเพิ่มผลผลิตในสัตว์เศรษฐกิจทั้งสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม สัตว์ปีก สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ และสัตว์น้ำ เช่น ปลา เป็นต้น (สมศรี งามวงศ์ชน, 2542)

รีลีสซิ่งฮอร์โมน (Releasing Hormone)

รีลีสซิ่งฮอร์โมน ซึ่งได้แก่ GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), LHRH (Luteinizing Hormone Releasing Hormone), GnRHa (Gonadotropin Releasing Hormone Analogue) และ LHRHa (Luteinizing Hormone Releasing Hhormone Analogue) เริ่มได้รับความนิยมในการเพาะพันธุ์ปลาอย่างมาก เพราะไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองให้หลั่งโกนาโดโทรปินออกมาโดยตรง โดยทั่วไปนิยมใช้ในรูปของอนาลอกซ์ (Analogue) เช่น GnRHa และ LHRHa เป็นต้น เพื่อใช้กระตุ้นการตกไข่และการวางไข่ของปลา GnRHa และ LHRHa จะมีความคงตัวและค่าครึ่งชีวิต (Half Life) นานกว่า GnRH และ LHRH เนื่องจากอนาลอกซ์ดังกล่าวจะถูกสังเคราะห์ให้มีกรดอะมิโน 9 ตัว (Nanopeptide) อยู่ในรูป D-Amino Acid ซึ่งจะคงตัวดีกว่า L-Amino Acidในธรรมชาติ อีกทั้งยังสามารถจับกับตัวรับจำเพาะ (Receptor) ที่บริเวณต่อมใต้สมองได้ดีกว่า จึงมีผลทำให้การฉีด GnRHa และ LHRHa มีแนวโน้มกระตุ้นต่อมใต้สมองให้หลั่งโกนาโดโทรปินไปยังรังไข่ หรืออัณฑะมากขึ้น และทำให้สมบูรณ์เพศมากขึ้นและประสบความสำเร็จในการเพาะพันธุ์ปลาได้ดีกว่า (Peter, Narhorniak, Shin, King, & Millar, 1987b) ในปัจจุบันได้มีการสังเคราะห์อนาลอกซ์ขึ้นมาอย่างมากมาย แต่โดยทั่วไปแล้วอนาลอกซ์ที่นิยมนำมาเพาะพันธุ์ปลามีหลายชนิด แต่ที่นิยมใช้มากได้แก่

1. LHRHa จัดเป็นอนาลอกซ์ของ LHRH โดย LHRHa มีสูตรย่อ D-Ala^{6}-Pro^{9}-LHRH-NEt ซึ่งมีกรดอะมิโน 9 ตัว โดยกรดอะมิโนในลำดับที่ 6 เป็นอะลานีน (Alanine) และจะไม่มีกรด อะมิโนในลำดับที่ 10 คือ ไกลซีน (Glycine) แต่จะเหลือกรดอะมิโนลำดับที่ 9 เป็นโปรลีน (Proline) เกาะติดกับเอทธิลลาไมด์ (Ethylamine)

2. GnRHa จัดเป็นอนาลอกซ์ของ GnRH โดยในปัจจุบัน GnRHa ได้ถูกสังเคราะห์และนำมาใช้เพาะพันธุ์ปลา 2 รูป ได้แก่ D-Arg^{6}-Pro^{9}-GnRH-NEt และD-Ala^{6}-Pro^{9}-GnRH-NEt โดย

กรดอะมิโนในลำดับที่ 6 เป็น อาร์จินีน และ อะลานีน ตามลำดับและจะไม่มีกรดอะมิโนในลำดับที่ 10 (ไกลซีน) เช่นเดียวกัน แต่จะเหลือกรดอะมิโนลำดับที่ 9 (โปรลีน) เกาะติดกับเอทธิลลาไมด์

3. Buserelin จัดเป็นอนาลอกซ์ของ LHRH มีสูตรย่อ D-Ser(t-bu)^{6}-Pro^{9}-LHRH-NEtโดยกรดอะมิโนในลำดับที่ 6 เป็น ซีรีน (Serine) และจะไม่มีกรดอะมิโนในลำดับที่ 10 (ไกลซีน) แต่จะเหลือกรดอะมิโนลำดับที่ 9 (โปรลีน) เกาะติดกับเอทธิลลาไมด์

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
LHRHa:	pyro Glu	— His	— Trp	— Ser	— Tyr	— Ala	— Leu	— Arg	— Pro — NEt
GnRHa:	pyro Glu	— His	— Trp	— Ser	— Tyr	— Arg	— Trp	— Leu	— Pro — NEt
GnRHa:	pyro Glu	— His	— Trp	— Ser	— Tyr	— Ala	— Trp	— Leu	— Pro — NEt
Buserelin:	pyro Glu	— His	— Trp	— Ser	— Tyr	— Ser (t-bu)	— Leu	— Arg	— Pro — NEt

สูตรโครงสร้างของ $LHRH_a$ และ $GnRH_a$ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536)

การประยุกต์ใช้ฮอร์โมนในการเพาะพันธุ์ปลา

การเพาะพันธุ์ปลาต้องการพ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์เพศ ซึ่งโดยทั่วไปพ่อพันธุ์จะมีการสร้างสเปิร์มที่เร็วแต่สำหรับแม่พันธุ์แล้วมักจะมีการพัฒนาการสร้างไข่ที่ช้ากว่า การเร่งการพัฒนาการของสเปิร์มและไข่สามารถเร่งได้โดยการใช้ฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ฉีดกระตุ้น ซึ่งในปัจจุบันการเพาะพันธุ์ปลาในเชิงการค้าได้นำความรู้พื้นฐานของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์มาประยุกต์ใช้อย่างแพร่หลายและประสบความสำเร็จในปลาหลายชนิด (ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, กำชัย ลาวัณยวุฒิ และสุจินต์ หนูขวัญ, 2539) ต่อมาได้มีการพัฒนารูปแบบการปล่อย GnRHa เข้าสู่ตัวปลาหลายรูปแบบและใช้ทดสอบเพาะพันธุ์ปลาเพื่อควบคุมความสมบูรณ์ของไข่ที่พร้อมปฏิสนธิ (FOM), การตกไข่ (Ovulation) และความสามารถรีดน้ำเชื้อได้ (Spermiation) (Zohar & Mylonas, 2001) เช่น การให้ GnRHa โดยใช้ระบบการย่อยสลายทางชีวภาพ พบว่าจะกระตุ้นระดับของ GtH อย่างต่อเนื่อง และชักนำให้เกิดการตกไข่และวางไข่ในปลา Gilthead Seabream, *Sparus aurata* (Zohar, 1988), (Zohar et al., 1989)

รูปแบบของระบบควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน

รูปแบบที่ 1 เป็นการเตรียมโดยใช้เปอร์เซนต์ของคอเลสเทอรอล (Cholesterol) และเซลลูโลส (Cellulose) ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน แล้วทำการฝังเข้าไปในตัวปลาทำให้มีการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเป็นไปอย่างช้า ๆ หรือเร็วได้ (Carolsfeld, Sherwood, Kreiberg, & Soawer, 1988) การฝังให้มีการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนอย่างรวดเร็วในระหว่างวันจะทำให้ระดับของ Plasma GtH

สูงขึ้นเรื่อย ๆ ไปเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 8 วัน ในขณะที่การฝังให้มีการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนอย่างช้า ๆ เป็นสัปดาห์ จะทำให้ระดับของ Plasma GtH เพิ่มขึ้นเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 8 สัปดาห์ (Crim, Sutterlin, Evans, & Weil, 1983) ซึ่งวิธีนี้จะเตรียมส่วนผสมให้เป็นของแข็งอยู่ในรูปทรงกระบอกมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร และทำการฝังเข้าไปในตัวปลาทางกล้ามเนื้อ โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Implanter หรือ Scalpel วิธีนี้จะง่ายต่อการปฏิบัติและมีราคาไม่แพงเมื่อเทียบกับวิธีอื่น (Carolsfeld et al., 1988) เช่นเดียวกับการทดลองของ Sherwood, Crim, Carolsfeld, & Walter, (1988) นำ [D-Ala^{6},Pro^{9}-Ethylamide]Mammalian GnRH (mGnRHa) 100ไมโครกรัม มาอัดเป็นเม็ดโดยใช้คอเลสเทอรอล และเซลลูโลส ผสมในอัตราส่วนต่าง ๆ กัน แล้วอัดเป็นเม็ดมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร ยาว 3 มิลลิเมตร ซึ่งพบว่าการใช้ 5 เปอร์เซ็นต์เซลลูโลส ร่วมกับ 95 เปอร์เซ็นต์คอเลสเทอรอล หรือ 100 เปอร์เซ็นต์คอเลสเทอรอลอย่างเดียว จะมีประสิทธิภาพทำให้ mGnRHa ออกฤทธิ์ออกมาอย่างช้า ๆ โดยภายใน 1 ชั่วโมงสลายไปเพียง 5-6 เปอร์เซ็นต์, 24 ชั่วโมงสลายเพียง 18-21 เปอร์เซ็นต์ และสลายไปเพียง 36-38 เปอร์เซ็นต์ ในเวลา 28 วัน เทคนิคนี้ประสบความสำเร็จในการกระตุ้นการตกไข่และการวางไข่ปลาบางชนิด เช่น ปลานวลจันทร์ทะเล (Lee et al., 1986), (Mart, Sherwood, Crim, & Havey, 1987), (Mart, Sherwood, Crim, & Tan, 1988), ปลากระพงขาว (Garcia, 1989) และปลาสลิดทะเลจุดเหลือง (Harvey, Nacario, Crim, Juario, & Marte, 1985) เป็นต้น

รูปแบบต่อมาคือ วิธีการส่ง GnRHa เข้าสู่ตัวปลาที่ทำให้อยู่ในรูป Microspheres ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-200 ไมโครเมตร โดยใช้ Co-Polymer คือ Lactic Acid และGlycolid Acid (LGA) (Lewis, 1990) ซึ่งเป็นระบบควบคุมการปล่อยตัวยาที่ทำจากโพลิเมอร์ต่าง ๆ โดยสามารถนำเข้าสู่ร่างกายได้โดยการฉีด เมื่อปล่อยตัวยาหมดแล้วโพลิเมอร์ก็สามารถถูกย่อยสลายโดยขบวนการเผาผลาญในร่างกาย (Metabolism) ไปเป็นของเสียต่าง ๆ ซึ่งจะถูกขจัดออกนอกร่างกายในภายหลัง (สิริพร โตนดแก้ว, 2539) โดย Microspheres ผลิตโดยใช้ Emulsion 2 ชนิด ด้วยวิธี Solvent Evaporation Method (Okada, Doken, Ogawa, & Toguchi, 1994a), (Okada et al., 1994b) โดยละลาย GnRHa แล้วนำไปทำให้ติดกับส่วนผสมของ LGA แล้วจึงนำ Microspheres ไปฉีดเข้าสู่กล้ามเนื้อในปลาโดยใช้เข็มฉีดยาเบอร์ 18 (Zohar & Mylonas, 2001) การออกฤทธิ์ของฮอร์โมนในรูปของ Microspheres จะออกฤทธิ์ออกมาโดยตรงและสามารถอยู่ได้นาน 2-3 เดือน ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ Lactic Acid และ Glycolid Acid และจะอยู่ได้นานมากยิ่งขึ้นตามน้ำหนักของโมเลกุลของ Polymer ที่ใช้ (Chasin & Langer, 1990)

Okada et al. (1994a) ได้ศึกษาการใช้ Leuprorelin Acetate ในรูปของ Microspheres เพื่อควบคุมการออกฤทธิ์ของตัวยาถึง 3 เดือน โดยใช้ Copolymer คือ Copoly (DL-Lactic/Glycolic Acid)

(PLGA) หรือ poly (DL-Lactic Acid) (PLA) โดยใช้วิธีทำให้แห้ง และนำไปประเมินหาค่าการออกฤทธิ์ของตัวยา พบว่าในหลอดทดลอง Microspheres ที่เตรียมด้วย PLA ที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย หรือ PLGA (75/25) น้ำหนักโมเลกุล 9,100-23,000 การออกฤทธิ์ของตัวยาค่อนข้างจะรวดเร็ว โดยจะออกฤทธิ์หมดภายใน 6-8 สัปดาห์ ส่วน Microspheres ที่เตรียมด้วย PLA ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 54,700 และ162,100 จะมีการออกฤทธิ์ของตัวยาอย่างมากในช่วงแรก 44 และ 58 เปอร์เซ็นต์ ในวันแรกตามลำดับ โดย Microspheres ที่ดีควรใช้ PLGA (90/10) และ PLA (15,700-21,500) ทำให้มีการออกฤทธิ์ของตัวยาต่อเนื่อง 12-13 สัปดาห์ ในสัตว์ทดลองพบว่า Microspheres ที่ใช้ PLGA (75/25)-15,800 มีการหลั่งของตัวยานานถึง 4 สัปดาห์ ส่วนที่เตรียมโดยใช้ PLA-53,300 จะมีการออกฤทธิ์ของของตัวยาอย่างช้า ๆ เป็นเวลาถึง 16 สัปดาห์ และที่เตรียมด้วย PLA-4,700 จะมีการออกฤทธิ์ของตัวยาอย่างรวดเร็ว สำหรับการควบคุมการออกฤทธิ์ของตัวยาในเวลาประมาณ 3 เดือน โดยพบว่า Microspheres ที่เตรียมโดยใช้ PLA-18,200, PLA-21,500 หรือ PLGA (90/10)-19,000 จะมีการออกฤทธิ์ของตัวยาอย่างต่อเนื่องในเวลาประมาณ 3 เดือน

รูปแบบอื่นของ Microspheres ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพที่ผลิตโดยใช้ Polyanhydride เป็น Co-Polymer โดยชนิดของ Co-Polymer คือ Fatty Acid Dimer และ Sebasic Acid (FAD-SA) ในอัตราส่วนเท่ากับ 25:75 Molar ซึ่ง Microspheres ชนิดนี้จะผลิตโดยใช้ Emulsion 2 ชนิด ด้วยวิธี Solvent Evaporation Process โดย Microspheres ที่บรรจุ GnRHa [D-Ala^{6},Pro^{9} NEt]-GnRH ถูกเตรียมให้อยู่ในรูปทรงกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-240 ไมโครเมตร การทดลองในหลอดทดลอง GnRHa สามารถออกฤทธิ์ออกมาเป็นเวลาไม่น้อยกว่า 90 วัน ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ส่วนการทดลองในปลาที่ฉีด Microspheres ที่บรรจุ GnRHa 150ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม โดยทำการศึกษาในปลา Striped Bass พบว่ามีความแตกต่างกันของความเข้มข้นของ Plasma GnRHa ที่เพิ่มขึ้นเป็นเวลาอย่างน้อย 8 สัปดาห์ โดยภายในเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากทำการทดลองความเข้มข้นของ Plasma GnRHa เพิ่มขึ้นสูงกว่าช่วงเวลาอื่นที่ทำการศึกษาและสูงกว่าชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัดเจน (Mylonas et al., 1995) ซึ่งข้อดีของ Biodegradable Microspheres คือสามารถใช้ได้กับปลาที่มีขนาดเล็ก ๆ ที่มีน้ำหนัก 2-3 กรัม ไปจนถึงปลาที่มีขนาดใหญ่ที่มีน้ำหนักหลายกิโลกรัม ซึ่งสามารถใช้ได้อย่างสะดวกเพราะ Microspheres จะอยู่ในส่วนผสมและเป็นการให้ฮอร์โมนโดยหลักเกณฑ์ตามปริมาตรต่อน้ำหนัก (Zohar & Mylonas, 2001)

รูปแบบสุดท้ายของการส่ง GnRHa เข้าสู่ตัวปลาที่ใช้สำหรับการชักนำให้เกิดการวางไข่จะถูกเตรียมให้อยู่ในรูปของของแข็ง โดยการฝังผลึกของแข็งที่มีรูปร่างกลมเป็นแผ่นที่ใช้ Co-Polymer ที่ย่อยสลายไม่ได้เป็น Ethylene และ Vinyl Acetate (EVAC) (Rhine, Hsieh, & Langer, 1980) โดยการฝัง EVAC จะใช้สำหรับปลาเพื่อให้มีการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน GnRHa ได้ภายใน

ระยะเวลา 2-5 สัปดาห์ (Zohar et al., 1990), (Mylonas et al., 1998) ซึ่งการฝัง EVAC จะทำให้อยู่ในรูปแผ่นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มิลลิเมตรและฝังเข้าไปในกล้ามเนื้อโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Implanter (Zohar & Mylonas, 2001) ซึ่งรูปแบบของระบบควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน สรุปตามวัสดุที่ใช้ รูปร่างและขนาดรวมทั้งระยะเวลาในการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รูปแบบของระบบควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน

รูปแบบ	วัสดุที่ใช้	รูปร่างและขนาด	วิธี	ระยะเวลาออกฤทธิ์
Implant	Cholesterol และ Cellulose	เม็ด Ø 3 มม.	ฝัง	8 วัน-8 สัปดาห์
EVAC	Ethylene และ Vinyl Acetate	แผ่นกลม Ø 2 มม.	ฝัง	2-5 สัปดาห์
Microspheres	Lactic â และ Glycolic â	ผง Ø 5-200 µm	ฉีด	2-3 เดือน
	Fatty â และ Sebasic â	ผง Ø 10-240 µm	ฉีด	หลอดทดลอง 90 วัน ปลา 8 สัปดาห์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Breton, Weil, Sambroni, & Zohar (1990) ได้ศึกษาการหลั่งของ Gonadotropin (GtH) และการตกไข่ในปลา Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss)* ในฤดูผสมพันธุ์ โดยใช้ D-Trp^{6} LH-RH 50, 25 และ12.5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมในรูปของ Microencapsulated ที่มี Polyglycolid-Polylactic เป็นส่วนผสม ผลการทดลองพบว่า LHRHa กระตุ้นให้ GtH ในเลือดเพิ่มสูงขึ้นได้นานถึง 3 สัปดาห์ทุกชุดการทดลอง โดยในเวลา 24 ชั่วโมง จะมีการเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ และเพิ่มขึ้นสูงสุด ในระหว่างวันที่ 2-8 ซึ่งในชุดที่ได้รับ LHRHa 50ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม GtH ในเลือดเพิ่มขึ้นสูงสุด 69.44± 15.2 ng/ml ในวันที่ 5 ส่วนในชุดที่ได้รับ LHRHa 25 และ12.5ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม GtH ในเลือดเพิ่มขึ้นสูงสุด เท่ากับ 53.19± 10.68 ng/ml และ 32.47± 10.31 ng/ml ในวันที่ 8 ทั้ง 2 ชุดการทดลอง รวมทั้งพบว่าในชุดที่ได้รับ LHRHa 50ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม แม่ปลาเริ่มมีการตกไข่มากขึ้นในวันที่ 5 จนถึงวันที่ 8 มีการตกไข่ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในชุดที่ได้รับ LHRHa 25 และ 12.5ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1

กิโลกรัม เกิดการตกไข่ 100 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 12 หลังจากทำการทดลอง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีการตกไข่เพียง 69 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาถึง 26 วัน

Mylonas et al. (1995) ได้ทดสอบผลของ Microspheres ที่มี Co-Polymer คือ Fatty Acid Dimer และ Sebasic Acid (FAD-SA) ในอัตราส่วนเท่ากับ 25:75 Molar ซึ่ง Microspheres จะบรรจุ GnRHa [D-Ala^{6},Pro^{9} NEt]-GnRH 50 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ในปลา Striped Bass ในระยะ Post-Vitellogenic พบว่าสามารถชักนำให้แม่ปลาเกิดการตกไข่ได้ 60 เปอร์เซนต์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการตกไข่เลย

ในการศึกษาครั้งต่อมาปลา Striped Bass ในระยะ Post-Vitellogenic เพศเมียที่ฉีดด้วย Microspheres บรรจุ GnRHa 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม แม่ปลา 100 เปอร์เซ็นต์ เกิดการตกไข่ภายในเวลา 11 วันหลังจากทำการทดลอง โดยแม่ปลาตัวแรกเกิดการตกไข่ภายในเวลา 5 วันหลังจากทำการทดลอง เปรียบเทียบกับ 21 วันหลังจากทำการทดลองในการศึกษาครั้งแรก และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีด GnRHa 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม โดยภายในระยะเวลาเท่ากันแม่ปลาเกิดการตกไข่เพียง 65 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

ส่วนในการศึกษาครั้งที่ 3 ปลา Atlantic Salmon เพศเมียในระยะ Post-Vitellogenic ที่ฉีดด้วย Microspheres บรรจุ GnRHa 75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม แม่ปลา 100 เปอร์เซ็นต์ เกิดการตกไข่ภายในเวลา 15 วันโดยเริ่มต้นตกไข่ตั้งแต่วันที่ 7 หลังจากทำการทดลอง ในขณะที่ปลา Striped Bass และปลา Atlantic Salmon เพศผู้ในระยะ Spermiating ที่ฉีดด้วย Microspheres บรรจุ GnRHa 75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม มีประสิทธิภาพทำให้ปริมาณน้ำเชื้อเพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Swanson (1995) ได้ศึกษาการชักนำให้เกิดการตกไข่ และความสามารถในการรีดน้ำเชื้อได้ในปลา Sockeye Salmon ในช่วงฤดูวางไข่ โดยใช้ Des-Gly^{10}[D-Ala^{6}]-Mammalian GnRH Ethylamide (GnRHa) ในรูป GnRHa-EVAC (Ethylene Vinyl Acetate Co-Polymer) บรรจุ GnRHa 25 และ75 ไมโครกรัมต่อเม็ด และในรูปของ GnRHa-Microspheres ที่มี Poly[Fatty Acid Dimer-Sebasic Acid] (FAD-SA) เป็น Co-Polymer บรรจุ GnRHa 25 และ 75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ผลการทดลองพบว่า แม่ปลาที่ได้รับ EVAC-75 ไมโครกรัมต่อเม็ด เกิดการวางไข่ในวันที่ 14 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่วางไข่ในวันที่ 36 หลังจากทำการทดลอง ส่วนแม่ปลาที่ได้รับ FAD-SA 25 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม จะมีประสิทธิภาพน้อยกว่า EVAC-25, 75 ไมโครกรัมต่อเม็ด หรือ FAD-SA 75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม โดยในแต่ละชุดการทดลองที่ได้รับ GnRHa ระดับ Plasma ของ LH เพิ่มขึ้นแตกต่างกันอย่างชัดเจน และน้ำหนักเฉลี่ยของไข่เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีผลต่อความดกของไข่และอัตรารอดของตัวอ่อนที่ฟัก เมื่อเปรียบเทียบกับชุด

ควบคุม ส่วนพ่อปลาที่ได้รับ FAD-SA 25 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม มีประสิทธิภาพน้อยที่สุดที่สามารถรีดน้ำเชื้อได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนจำนวนปริมาตรของน้ำเชื้อที่รีดได้ ภายใน 14 วันมีความแตกต่างกันอย่างมากทุกชุดการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Mylonas et al. (1996) ได้ทดสอบผลของ Gonadotropin Releasing Hormone Analog, D-Ala^{6},Pro^{9} [NEt]-GnRH (GnRHa) ที่อยู่ในรูปของ EVAC (Ethylene-Vinyl Acetate Co-Polymer) 50 ไมโครกรัมต่อปลา 1 ตัว (เฉลี่ยประมาณ 62 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) และ Microspheres ที่มี Poly [Fatty Acid Dimer-Sebasic Acid] (FAD-SA) เป็น Co-Polymer 40 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทำการทดลองในปลาลูกผสม White Bass กับ Striped Bass ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ถึงมีนาคม ซึ่งดูเหมือนว่าปลากำลังจะวางไข่ ผลการทดลองพบว่า การฉีด Microspheres สามารถชักนำให้แม่ปลาเกิดการตกไข่ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 70 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการฝัง EVAC ใช้เวลา 76 ชั่วโมง ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของเวลาที่ใช้ในการตกไข่หลังจากทำการทดลอง และในระหว่าง 2 ชุดการทดลองนี้ ค่าเฉลี่ยความดกของไข่ เปอร์เซ็นต์การผสมติด และเปอร์เซ็นต์อัตรารอดตายเมื่อลูกปลามีจุดสีที่บริเวณดวงตา มีค่าใกล้เคียงกัน โดยการฝัง EVAC มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การผสมติดเท่ากับ 81.2 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์อัตรารอดตายเมื่อลูกปลามีจุดสีที่บริเวณดวงตาเท่ากับ 46.5 เปอร์เซ็นต์ และความสำเร็จในการเพาะฟักเท่ากับ 45 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตรารอดตายหลังฟักจนมีอายุ 30 วัน เท่ากับ 78 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่าไข่ไม่มีความสมบูรณ์พร้อมที่จะได้รับการผสมจากน้ำเชื้อเลย

Barbaro et al. (1997) ได้ทำการศึกษาการชักนำให้เกิดการตกไข่และการวางไข่ในปลา Gilthead Seabream (*Sparus aurata)* โดยใช้ PLGA-Encapsulated Leuprolide Acetate (Des-Gly^{10}, [D-Leu^{6}]-LH-RH Ethylamide (Long-Action GnRHa) 20, 40 และ80 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ที่มี Copolymer ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ คือ DL-Lactic/Glycolid Acid ในอัตราส่วน 3:1 ผลการทดลองพบว่าแม่ปลาทุกชุดการทดลองเริ่มมีการวางไข่หลังจาก 48 ชั่วโมง โดย 40 เปอร์เซ็นต์ จะเป็นไข่ที่ถูกวางใน 10 วันแรก ซึ่งเป็นช่วงที่มีการวางไข่สูงสุดเท่ากับ 6 ถึง $10x10^{4}$ ฟองต่อกิโลกรัมเปรียบเทียบกับชุดควบคุมช่วงที่มีการวางไข่สูงสุดมีการวางไข่น้อยกว่า $5x10^{4}$ ฟองต่อกิโลกรัม

Mylonas, Gissis, Magnua, & Zohar (1997) ได้ศึกษาผลของ D-Ala^{6},Pro^{9} [NEt]-GnRH ในรูปของ Microspheres ในปลา White Bass (*Morone chrysops*) พบว่า GnRHa Microspheres สามารถชักนำให้เกิดการเพิ่มการผลิตน้ำเชื้อในวันที่ 2 และ 7 เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมโดยมีการเพิ่มของปริมาณน้ำเชื้อจาก 2.0 ± 0.1 ml kg^{-1} body weight ในวันแรกไปจนถึง 3.3 ± 0.3 ml kg^{-1} ในวันที่ 2 และ 3.6 ± 0.3 ml kg^{-1}ในวันที่ 7 โดยในชุดควบคุมปริมาณน้ำเชื้อจะคงที่อยู่ประมาณ

2.1± 0.2 ml kg^{-1} ส่วนความหนาแน่น ความสามารถในการเคลื่อนไหว และเปอร์เซ็นต์ในการปฏิสนธิ ไม่มีความแตกต่างกัน มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 52± 2x10 ^{9} Spermatozoa ml^{-1} 50± 4 เปอร์เซ็นต์ Motile Spermatozoa และ 60± 5 เปอร์เซ็นต์ Fertilized Eggs ตามลำดับ

Mylonas et al. (1998) ได้ศึกษาผลของ [D-Ala^{6},Pro^{9} NEt]-GnRH ในรูปของ GnRHa Microspheres 40 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม GnRHa Implant 40 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และ GnRHa Injection 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ในปลา Striped Bass (*Morone saxatilis)* ในฤดูวางไข่ พบว่าแม่ปลา 13 ใน 15 ตัวที่ทดสอบด้วย GnRHa Microspheres และ GnRHa Implant มีความสมบูรณ์ของไข่พร้อมปฏิสนธิ (FOM) และการตกไข่ (Ovulation) ภายในวันที่ 3 และ 10 ตามลำดับหลังจากการทดลอง ส่วนแม่ปลาที่ได้รับการทดสอบด้วย GnRHa Injection 2 เข็ม แม่ปลา 1 ตัว เริ่มมีความสมบูรณ์ของไข่พร้อมปฏิสนธิ (FOM) หลังจากฉีดเข็มแรกในวันที่ 5 และแม่ปลาทั้งหมดมีความสมบูรณ์ของไข่พร้อมปฏิสนธิ (FOM) หลังจากฉีดเข็ม 2ในวันที่ 9 แต่แม่ปลา 3ใน5 เกิดการตกไข่ (Ovulation) ต่อมาได้ศึกษาประสิทธิภาพของ GnRHa-Delivery Systemในการชักนำให้เกิดการวางไข่โดยใช้ GnRHa Implant 30-50 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม หรือ GnRHa Microspheres 40 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม พบว่าแม่ปลาเกิดการวางไข่ระหว่าง 48 และ140 ชั่วโมงหลังจากทำการทดลอง มีจำนวนไข่ประมาณ 120,000-225,000 ฟอง และเปอร์เซนต์การปฏิสนธิอยู่ระหว่าง 38-49 เปอร์เซ็นต์

Mañanós et al. (2002) ได้ศึกษาผลของ [D-Ala^{6},Pro^{9} NEt]-GnRH ในรูปของ GnRHa Injection 25ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม EVAC Fast Releasing Implant 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม EVSL Slow Releasing Implant 100 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมและ MC Biodegradable Microspheres 50ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าทุกชุดการทดลองที่ใช้ GnRHa จะกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง Luteinizing Hormone (LH)โดย GnRHa Injection ระดับของ Plasma สูงที่สุดจนถึง 2 วัน และ 2, 4, 6 สัปดาห์ใน EVAC, MC และEVSLตามลำดับซึ่งสัมพันธ์กับระยะเวลา 1, 3, 5 และ 5 สัปดาห์ที่กระตุ้นปริมาณการผลิตของน้ำเชื้อ

จากการตรวจเอกสารสามารถสรุปถึงการใช้ระบบควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนตามสูตรโครงสร้างของฮอร์โมนในรูปแบบต่าง ๆ ที่ใช้กระตุ้นความสมบูรณ์เพศทั้งในปลาเพศผู้และเพศเมียเพื่อการเพาะพันธุ์ปลา ซึ่งประสบความสำเร็จในปลาหลายชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 การใช้ระบบควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนในการเพาะพันธุ์ปลา

ชนิดปลา	เพศ	ฮอร์โมน	รูปแบบ	ผู้วิจัย
Rainbow Trout (*O. mykiss)*	เมีย	D-Trp^{6} LHRHa	Microencapsulated	Breton et al., 1990
Striped Bass (*M. saxatilis*)	เมีย	D-Ala^{6} GnRHa	Microspheres	Mylonas et al., 1995
Atlantic Salmon(*S. salar*)	เมีย/ผู้	D-Ala^{6} GnRHa	Microspheres	Mylonas et al., 1995
Sockeye Salmon	เมีย/ผู้	D-Ala^{6} GnRHa	EVAC/Microspheres	Swanson, 1995
White Bass (*M. chrysops*)	เมีย	D-Ala^{6} GnRHa	EVAC/Microspheres	Mylonas et al., 1996
Gilthead Seabream (*S.aurata*)	เมีย	D-Leu^{6}LH-RHa	Encapsulated	Barbaro et al., 1997
Striped Bass (*M. saxatilis*)	เมีย	D-Ala^{6} GnRHa	Implant/Microspheres	Mylonas et al., 1998

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า

การทดลองครั้งนี้ใช้พ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* (Linnaeus 1758) ที่รวบรวมมาจากบริเวณตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี การรวบรวมจะจับเฉพาะปลาที่เห็นว่าอาศัยอยู่ด้วยกันเป็นคู่ ความยาวของลำตัวเพศเมียมีความยาวไม่น้อยกว่า 92 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นขนาดของความยาวลำตัวต่ำสุดที่แสดงว่าเป็นเพศเมีย (Allsop & West, 2003) ส่วนปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้จะมีขนาดเล็กกว่าเพศเมีย (Hoff, 1996) โดยรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าที่จับคู่กันแล้วเท่านั้น จำนวน 60 คู่ โดยปลาการ์ตูนอานม้าเพศเมียมีความยาวเฉลี่ย 118.81± 9.27 มิลลิเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 44.69±10.90 กรัม และปลาการ์ตูนเพศผู้มีความยาวเฉลี่ย 98.93± 12.59 มิลลิเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 26.51±9.87 กรัม นำพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้ามาเลี้ยงในตู้ทดลอง เป็นเวลาอย่างน้อย 2 เดือน เพื่อให้พ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าปรับสภาพเข้ากับตู้ทดลอง สร้างความเคยชินกับสภาพแวดล้อม ยอมรับอาหาร ไม่ตื่นตกใจง่ายในขณะปฏิบัติงาน หลังจากนั้นทำการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าที่เป็นคู่กันแน่นอน โดยสังเกตพฤติกรรมการยอมรับซึ่งกันและกันของพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งปลาที่เป็นคู่กันจะไม่ทำร้ายหรือไล่กัดคู่ของมัน จำนวน 48 คู่ ทำการทดลองต่อไป

ภาพที่ 1 พ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* (Linnaeus 1758)

639.3772
ส943พ
ฉ.3
251561

การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า

นำพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าที่เตรียมไว้เลี้ยงในตู้ทดลองที่บรรจุน้ำทะเล ประมาณ 80 ลิตร ที่มีชุดระบบกรองน้ำรวม โดยใช้สาหร่ายใบเลื่อย (*Caulerpa serata*) เป็นตัวบำบัดคุณภาพน้ำ และฆ่าเชื้อโรคในน้ำด้วยเครื่องฆ่าเชื้อด้วยแสงอุลตราไวโอเลต (ภาพที่ 2) โดยภายในตู้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์มีแผ่นกระเบื้องปูพื้นขนาด 8"x 8"วางเอียงไว้เพื่อเป็นวัสดุสำหรับวางไข่ การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์จะให้ อาหาร 2 ชนิด คือ หอยลายผสมกุ้งสับอัตราส่วน 1:1 และไข่ตุ๋น โดยในตอนเช้าให้หอยลายผสมกุ้งสับเป็นอาหารในเวลาประมาณ 10.00 น. ตอนบ่ายให้ไข่ตุ๋นเป็นอาหารในเวลาประมาณ 15.00 น.การให้อาหารจะให้ทีละน้อย ๆ เมื่อปลากินหมดแล้วจึงจะให้เพิ่มอีก จะหยุดให้เมื่อปลาอิ่ม เศษอาหารบางส่วนจะตกอยู่ที่พื้นตู้ต้องดูดเศษอาหารทิ้งและเติมน้ำให้ได้ระดับเดิมทุกวัน

ภาพที่ 2 ตู้ทดลองพร้อมระบบกรองน้ำรวม

คุณภาพน้ำและการจัดการ

ก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก ๆ สัปดาห์ จะทำการตรวจสอบคุณสมบัติของน้ำที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ อุณหภูมิด้วยเครื่องวัดอุณหภูมิ, ความเป็นกรดด่างด้วยเครื่องวัด pH (HACH รุ่น 51725-18), ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO) ด้วยเครื่องวัด DO (HACH รุ่น 51850-18), ความเป็น

ด่างของน้ำ, แอมโมเนียรวม, ไนไตร์ต-ไนโตรเจน, ไนเตรต-ไนโตรเจน ตามวิธีการของ Stickland and Parson (1972)

ฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง

ฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลองมีชื่อว่า Leuprorelin Acetate ชื่อการค้า (ENANTONE® L.P. 3.75 mg) เป็นสารสังเคราะห์ประเภท Nonapeptide Analog ของ Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH หรือ LHRH) ตามธรรมชาติ มีโครงสร้างคือ Des-Gly^{10}, [D-Leu^{6}]-LH-RH Ethylamide (Long-Action GnRH$_{a}$) ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพอยู่ในรูปของ Prolong Release Microcapsulated ที่มี Biodegradable Copolymerคือ Copoly (DL-Lactic/Glycolic Acid) (PLGA) ถูกเตรียมให้อยู่ในรูปทรงกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-240 ไมโครเมตร (Mylonas, 1995) โดยผงยาอยู่ในรูปของผลึกแห้ง (Lyophilized Microcapsules) ซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นาน และสามารถละลายได้ทันทีเมื่อนำไปใช้ และเมื่อฮอร์โมนละลายแล้วสามารถเก็บไว้ได้ประมาณ 24 ชั่วโมง (ภาพที่ 3)

ภาพที่ 3 ฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง

การเตรียมสารละลายฮอร์โมน

นำผงยาฮอร์โมนมาทำเป็นสารละลายฮอร์โมนด้วยน้ำยาทำละลายฮฮร์โมนซึ่งประกอบด้วย D-Mannitol 5 %, Carboxymethyl-Cellulose Sodium Salt 0.5%, Tween 80 0.1% และน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ทำการคำนวณปริมาณความเข้มข้นสำหรับการฉีดสารละลายฮอร์โมน 4 ระดับ คือ 0, 25,

75 และ150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม แล้วนำไปฉีดให้กับพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าตัวละ 100 ไมโครลิตร

วิธีการฉีดสารละลายฮอร์โมน

ก่อนการฉีดสารละลายฮอร์โมน GnRHa พ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าถูกทำให้สลบในสารละลาย Ethyl 3-Aminobenzoat Methanesulfonate Salt (MS 222) ความเข้มข้น 150 ppm เพื่อลดการกระทบกระเทือนที่อาจเกิดขึ้นกับพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า เมื่อปลาการ์ตูนอานม้าสลบแล้ว นำไปชั่งน้ำหนักปลาการ์ตูนอานม้าแต่ละตัวก่อนการฉีดสารละลายฮอร์โมน GnRHa เพื่อนำไปคำนวณปริมาณฮอร์โมน GnRHa ที่ใช้ฉีด ทำการฉีดสารละลายฮอร์โมน GnRHa ด้วยเข็มฉีดยาเบอร์ 26G บริเวณกล้ามเนื้อเหนือเส้นข้างลำตัวใต้ครีบหลังของพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า การฉีดต้องสอดเข็มเข้าไปใต้รอยต่อระหว่างเกล็ด แล้วปักเข็มเข้ากล้ามเนื้อเล็กน้อย แล้วค่อย ๆ กดเข็มเบา ๆ พร้อมทั้งระวังไม่ให้ฮอร์โมนไหลย้อนกลับออกมา (ภาพที่ 4)

ภาพที่ 4 วิธีการฉีดฮอร์โมนเข้าสู่สัตว์ทดลอง

ความเข้มข้นและระยะเวลาในการฉีดซ้ำของฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง

ความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRHa ชนิดออกฤทธิ์นานในรูปแบบไมโครสเฟียร์ 4 ระดับ คือ 0, 25, 75 และ150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ คือทุก 2 เดือน และทุก 3 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ความเข้มข้นและระยะเวลาในการฉีดซ้ำของฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง

ระยะเวลาในการฉีดซ้ำ	ความเข้มข้นของฮอร์โมน(µg/kg)	จำนวน(คู่)	ปริมาตร(µl)
ทุก 2 เดือน	0	6	100
	25	6	100
	75	6	100
	150	6	100
ทุก 3 เดือน	0	6	100
	25	6	100
	75	6	100
	150	6	100

การอนุบาลลูกปลาการ์ตูนอานม้า

1. การจัดเตรียมตู้สำหรับเพาะฟักไข่ปลาการ์ตูนอานม้า

ใส่น้ำทะเลที่ผ่านการกรองแล้วลงในตู้อนุบาล 50 เปอร์เซ็นต์ ผสมร่วมกับน้ำทะเลจากตู้พ่อแม่พันธุ์ 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นการปรับคุณภาพน้ำและอุณหภูมิระหว่างตู้ฟักไข่ปลากับตู้พ่อแม่พันธุ์ ให้ใกล้เคียงกัน ปิดทั้ง 4 ด้านด้วยพลาสติกดำเพื่อช่วยพรางแสงให้แสงกระจายได้ทั่วตู้

2. การย้ายไข่ปลาการ์ตูนอานม้า

เมื่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าวางไข่แล้วจะปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า เฝ้าดูแลไข่จนมีอายุประมาณ 7 วัน หรือเมื่อสังเกตเห็นสีเงินแววววาวตรงบริเวณซึ่งเป็นตาของลูกปลาแต่ละตัว จึงทำการย้ายไข่ปลาออกจากตู้พ่อแม่พันธุ์ปลาไปยังตู้อนุบาล ทำการย้ายไข่ปลาในตอนเย็น โดยนำกล่องพลาสติกจุ่มลงในตู้พ่อแม่พันธุ์ ค่อย ๆ ยกวัสดุวางไข่ที่มีไข่ติดอยู่มาไว้ในกล่องพลาสติก แล้วยกกล่องพลาสติกขึ้นให้น้ำอยู่ในระดับที่ท่วมไข่ปลา นำวัสดุวางไข่ที่มีไข่ติดไปยังตู้อนุบาล ค่อย ๆ ตะแคงกล่องพลาสติกให้น้ำในตู้อนุบาลเข้าไปในกล่องพลาสติก จนอยู่ใต้ระดับน้ำในตู้อนุบาล จึงยกวัสดุวางไข่ที่มีไข่ติดออกจากกล่องพลาสติกวางลงที่พื้นตู้อนุบาล ควรตั้งวัสดุวางไข่ที่มีไข่ติดให้อยู่ลักษณะเดียวกับที่ตั้งอยู่ในตู้พ่อแม่พันธุ์ ให้ปริมาณอากาศที่เหมาะสมเช่นเดียวกับพ่อแม่พันธุ์ปลาที่ทำการโบกพัดด้วยครีบอก ลูกปลาจะฟักออกจากไข่ในเวลากลางคืนประมาณ 19.00-20.00 น. ความหนาแน่นของลูกปลาการ์ตูนอานม้าที่ใช้อนุบาลประมาณ 10 ตัว ต่อน้ำ 1 ลิตร

3. อาหารลูกปลาวัยอ่อน

อาหารที่ใช้เลี้ยงลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนในระยะแรกให้โรติเฟอร์ (*Brachionus rotundiformis*) ร่วมกับ *Nannochloropsis oculata* และ *Isochrysis galbana* ความหนาแน่นประมาณ 50,000-150,000 เซลล์ ต่อมิลลิลิตร เป็นอาหารของโรติเฟอร์ในตู้ทดลองตลอดการทดลอง อาหารลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนในระยะแรกให้โรติเฟอร์ความหนาแน่นประมาณ 10 ตัว ต่อน้ำที่ใช้เลี้ยง 1 มิลลิลิตร จนกระทั่งลูกปลามีอายุประมาณ 7-14 วัน เริ่มให้อาร์ทีเมียวัยอ่อน

4. การอนุบาลลูกปลาการ์ตูนอานม้า

ในระยะ 2-3 วันแรก ใช้วิธีเพิ่มน้ำในตู้อนุบาล หลังจากนั้นจึงทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน วันละ 20-50 เปอร์เซ็นต์ โดยก่อนให้อาหารใหม่ในแต่ละวันจะทำการดูดตะกอน รวมทั้งลูกปลาการ์ตูนอานม้าและโรติเฟอร์ที่ตายอยู่บริเวณพื้นตู้ออกไป แล้วจึงเติมน้ำทะเลใหม่เข้าไปในตู้อนุบาลที่ละน้อยอย่างเบา ๆ เพื่อลดการกระทบกระเทือนของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อน

เมื่อลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนมีอายุ 7-14 วัน เริ่มให้อาร์ทีเมียที่เพาะออกมาใหม่ ๆ เพียงเล็กน้อยในวันแรก ๆ และค่อย ๆ เพิ่มปริมาณมากขึ้นในขณะเดียวกันก็ลดปริมาณโรติเฟอร์ให้น้อยลงจนกระทั่งลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนมีอายุประมาณ 14-20 วัน จึงให้แต่อาร์ทีเมียเพียงอย่างเดียว จนลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนมีอายุประมาณ 20-30 วัน ลูกปลาการ์ตูนการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนส่วนใหญ่ก็จะมีสีสันและลักษณะเหมือนพ่อแม่ทุกประการและจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มบริเวณพื้นตู้

การบันทึกผลการทดลอง

1. การวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า

หลังจากฉีดสารละลายฮอร์โมนแล้ว ทำการตรวจสอบการผสมพันธุ์วางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้าทุกวัน เมื่อพบแม่ปลาการ์ตูนอานม้าวางไข่ บันทึกวันที่และเวลาที่พบการวางไข่, จำนวนครั้งที่วางไข่, ลักษณะของไข่ และวัสดุที่วางไข่ แล้วทำการถ่ายภาพรังไข่หลังจากแม่ปลาการ์ตูนอานม้าวางไข่เสร็จเรียบร้อยแล้วด้วยกล้องถ่ายรูปดิจิตอล แล้วนำภาพที่ได้ไปนับจำนวนไข่ที่วางทั้งหมด โดยใช้โปรแกรม Image Tool ในการช่วยนับไข่แต่ละรัง

2. เปอร์เซ็นต์การฟักไข่

หลังจากพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าดูแลไข่จนมีอายุประมาณ 7 วัน หรือเมื่อสังเกตเห็นสีเงินแววววาวบริเวณลูกตาของลูกปลาแต่ละตัว ทำการถ่ายภาพรังไข่ก่อนนำไข่ไปฟักด้วยกล้องถ่ายรูปดิจิตอลแล้วนำภาพที่ได้ไปนับจำนวนไข่ก่อนฟัก โดยใช้โปรแกรม Image Tool ในการช่วยนับไข่ก่อนฟัก เมื่อไข่ฟักออกเป็นตัวทำการนับไข่ที่เสีย บันทึกผล อาจมีไข่บางส่วนที่ไม่ฟักในวัน

แรก ทำการให้อากาศต่อไปจนไข่ฟักออกเป็นตัวจนหมดทั้งรัง ทำการนับไข่ที่เสีย นำไปรวมกับจำนวนไข่ที่เสียในวันแรกที่ย้ายไข่ไปฟัก นำไปหักออกจากจำนวนไข่ก่อนฟักทั้งหมด แล้วนำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การฟักไข่

3. อัตรารอดตายของปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนจนถึงระยะ Metamorphosis

หลังจากลูกปลาการ์ตูนอานม้าฟักแล้ว ทำการอนุบาลลูกปลาการ์ตูนวัยอ่อนจนถึงระยะ Metamorphosis หรือมีอายุประมาณ 20-30 วัน แล้วจึงนับจำนวนลูกปลาการ์ตูนอานม้าที่รอดตายทั้งหมด นำไปคิดอัตรารอดตายจากลูกปลาการ์ตูนอานม้าที่ฟักทั้งหมด

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง ได้แก่ จำนวนครั้งในการวางไข่, จำนวนไข่ที่วางทั้งหมด, เปอร์เซ็นต์การฟัก และอัตรารอดตายของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนจนถึงระยะ Metamorphosis ไปทำการวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติโปรแกรม SPSS 10.0 For Windows ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจง 2 ทาง (2-Way Analysis Of Variance) แบบ Full Factorial Model III เพื่อทดสอบอิทธิพลของปัจจัย 2 ปัจจัย คือระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ หาความแตกต่างของข้อมูลระหว่างชุดการทดลองด้วย ANOVA แล้วทดสอบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการวิจัย

การผสมพันธุ์วางไข่

จากการทดสอบอิทธิพลร่วมกันของระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ และระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น 4 ระดับ ปลาการ์ตูนอานม้ามีเปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์วางไข่เฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือน และ3 เดือน ในทุกระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น ปลาการ์ตูนอานม้ามีเปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์วางไข่เฉลี่ยเท่ากับ 0.0± 0.0 กับ40.0± 54.8, 50.0± 57.7 กับ60.0± 54.8, 75.0± 50.0 กับ0.0± 0.0 และ25.0± 50.0 กับ 20.0± 44.7 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 5)

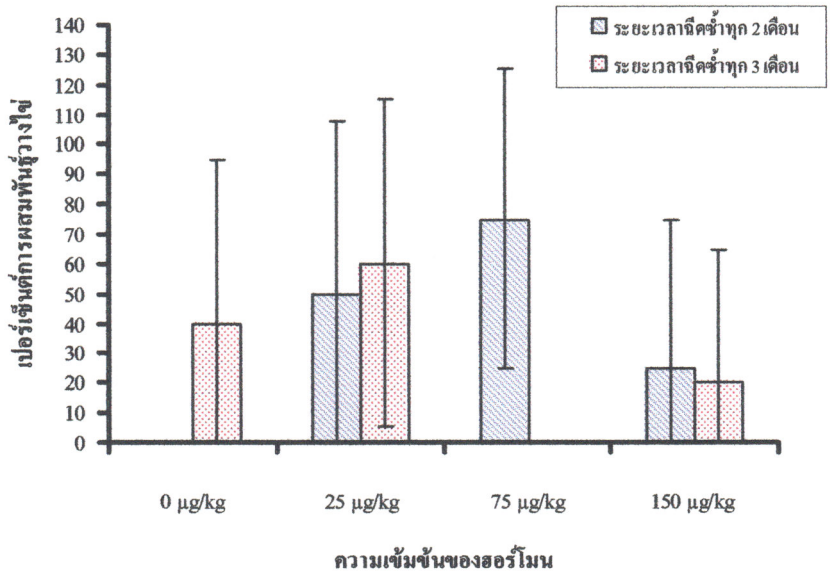
จากการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น คือ 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือน พบว่าระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์วางไข่เฉลี่ยของปลาการ์ตูนอานม้าเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีเปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์วางไข่เฉลี่ย เท่ากับ 50.0± 57.7, 75.0± 50.0 และ25.0± 50.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p > 0.05$) ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ตลอดระยะเวลาในการทดลอง (ตารางที่ 4 และภาพที่ 5)

จากการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น คือ 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 3 เดือน พบว่าระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์วางไข่เฉลี่ยของปลาการ์ตูนอานม้าเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0, 25 และ150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีเปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์วางไข่เฉลี่ย เท่ากับ 40.0± 54.8, 60± 54.7 และ20.0± 44.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p > 0.05$) ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ตลอดระยะเวลาในการทดลอง (ตารางที่ 4 และภาพที่ 5)

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์วางไข่เฉลี่ยของปลาการ์ตูนอานม้า ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ

ความเข้มข้นของฮอร์โมน	ระยะเวลาฉีดซ้ำ		
(µg/kg)	ทุก 2 เดือน	ทุก 3 เดือน	เฉลี่ย
0	0.0± 0.0 [a](4)	40.0± 54.8 [a](5)	22.2± 44.1 [a] (9)
25	50.0± 57.7 [a](4)	60.0± 54.8 [a](5)	55.6± 52.7 [a] (9)
75	75.0± 50.0 [a](4)	0.0± 0.0 [a](5)	33.3± 50.0 [a] (9)
150	25.0± 50.0 [a](4)	20.0± 44.7 [a](5)	22.2± 44.1 [a] (9)
เฉลี่ย	37.5± 50.0 [a] (16)	30.0± 47.0 [a](20)	33.3± 47.8 [a] (36)

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนข้อมูล)
อักษรที่เหมือนกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



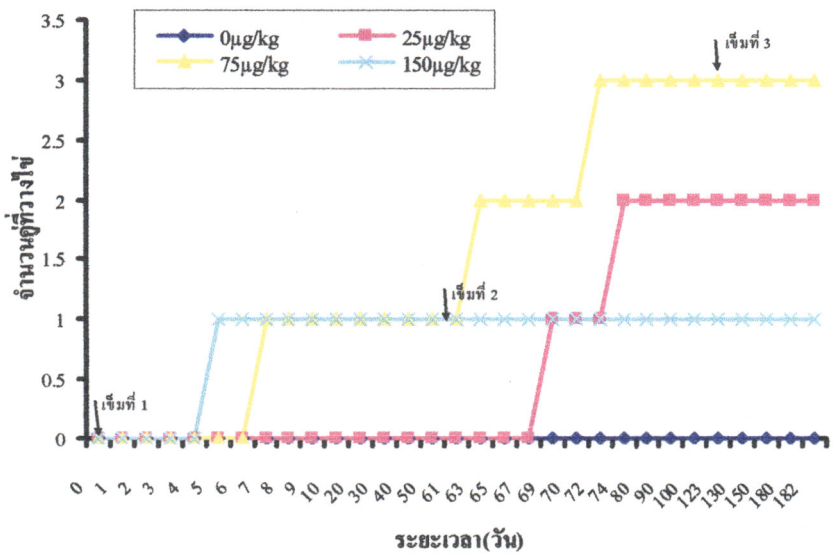
ภาพที่ 5 เปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์วางไข่เฉลี่ยของปลาการ์ตูนอานม้า ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับและระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ

ระยะเวลาในการวางไข่

1. ระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือน หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มแรก พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่จำนวน 1 คู่ หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มแรก 5 วัน และที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่จำนวน 1 คู่ หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มแรก 7 วัน เปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0 และ 25 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ภายในระยะเวลา 61 วัน ก่อนฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง (ภาพที่ 6)

หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่เพิ่มขึ้นจำนวน 2 คู่ หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง 2 วัน และ 11 วัน ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 25 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่เพิ่มขึ้นจำนวน 2 คู่ หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง 8 วัน และ 13 วัน ตามลำดับ เปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ภายในระยะเวลา 62 วัน ก่อนฉีดฮอร์โมนเข็มที่สาม (ภาพที่ 6)

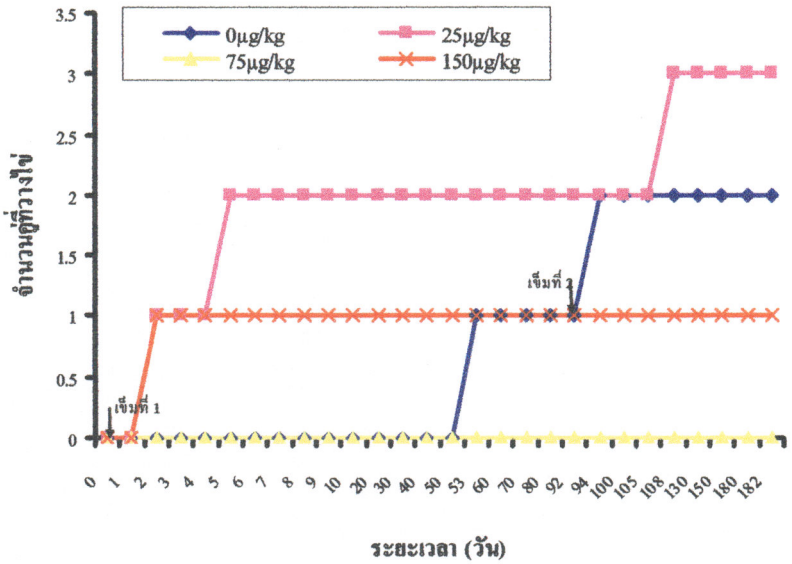
หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มที่สาม ปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่เพิ่มขึ้นภายในระยะเวลา 59 วัน จนจบการทดลอง (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ระยะเวลาวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้าที่วางไข่ ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ ระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือน

2. ระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 3 เดือน หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มแรก พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 25 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่จำนวน 2 คู่ หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มแรก 2 วัน และ 5 วัน ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่จำนวน 1 คู่ หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มแรก 2 วัน และที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่จำนวน 1 คู่ หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มแรก 53 วัน เปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ภายในระยะเวลา 92 วัน ก่อนฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง (ภาพที่ 7)

หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่เพิ่มขึ้นจำนวน 1 คู่ หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง 94 วัน และที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 25 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่เพิ่มขึ้นจำนวน 1 คู่ หลังจากฉีดฮอร์โมนเข็มที่สอง 108 วัน เปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ภายในระยะเวลา 90 วัน จนจบการทดลอง (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ระยะเวลาวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้าที่วางไข่ ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ ระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 3 เดือน

จำนวนครั้งที่วางไข่

จากการทดสอบอิทธิพลร่วมกันของระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ และระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น 4 ระดับ พบว่าจำนวนครั้งที่วางไข่เฉลี่ยของปลาการ์ตูนอานม้าไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือน และ3 เดือน ในทุกระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น จำนวนครั้งที่วางไข่เฉลี่ยของปลาการ์ตูนอานม้าเปรียบเทียบกันมีค่าเท่ากับ 0± 0 กับ3± 1, 3± 1 กับ6± 4, 6± 5 กับ0± 0 และ6± 0 กับ8± 0 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 5 และภาพที่ 8)

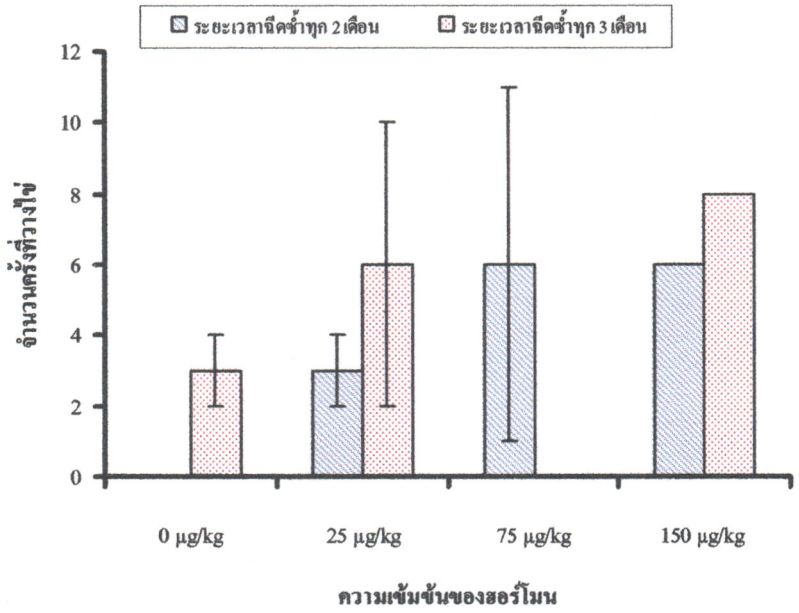
จากการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น คือ 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือน พบว่าระดับของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลทำให้จำนวนครั้งที่วางไข่เฉลี่ยของปลาการ์ตูนอานม้าเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีจำนวนครั้งที่วางไข่เฉลี่ย เท่ากับ 3± 1, 6± 5 และ6± 0 ครั้ง ตามลำดับ ($p > 0.05$) ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ตลอดระยะเวลาในการทดลอง (ตารางที่ 5 และภาพที่ 8)

จากการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น คือ 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 3 เดือน พบว่าระดับของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลทำให้จำนวนครั้งที่วางไข่เฉลี่ยของปลาการ์ตูนอานม้าเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0, 25 และ150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีจำนวนครั้งที่วางไข่เฉลี่ย เท่ากับ 3± 1, 6± 4 และ8± 0 ครั้ง ตามลำดับ ($p > 0.05$) ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ตลอดระยะเวลาในการทดลอง (ตารางที่ 5 และภาพที่ 8)

ตารางที่ 5 จำนวนครั้งที่วางไข่เฉลี่ยของปลาการ์ตูนอานม้าที่มีการผสมพันธุ์วางไข่ ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ

ความเข้มข้นของฮอร์โมน	ระยะเวลาฉีดซ้ำ		
(µg/kg)	ทุก 2 เดือน	ทุก 3 เดือน	เฉลี่ย
0	0± 0 (0)	3± 1 [a](2)	3± 1 [a](2)
25	3± 1 [a](2)	6± 4 [a](3)	5± 4 [a](5)
75	6± 5 [a](3)	0± 0 (0)	6± 5 [a](3)
150	6± 0 [a](1)	8± 0 [a](1)	7± 1 [a](2)
เฉลี่ย	5± 4 [a] (6)	5± 4 [a] (6)	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนชุดข้อมูล)
อักษรที่เหมือนกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 8 จำนวนครั้งที่วางไข่เฉลี่ยของปลาการ์ตูนอานม้าที่มีการผสมพันธุ์วางไข่ ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ

จำนวนไข่ที่วาง

จากการทดสอบอิทธิพลร่วมกันของระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ และระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น 4 ระดับ ปลาการ์ตูนอานม้ามีจำนวนไข่ที่วางเฉลี่ยต่อครั้งไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือนและ 3 เดือน ในทุกระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น จำนวนไข่ที่วางเฉลี่ยต่อครั้งของปลาการ์ตูนอานม้าเปรียบเทียบกันมีค่าเท่ากับ 0± 0 กับ1,106± 500, 1,321± 1,019 กับ1,470± 897, 939± 485 กับ0± 0 และ1,042± 328 กับ 1,427± 982 ฟอง ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และภาพที่ 9)

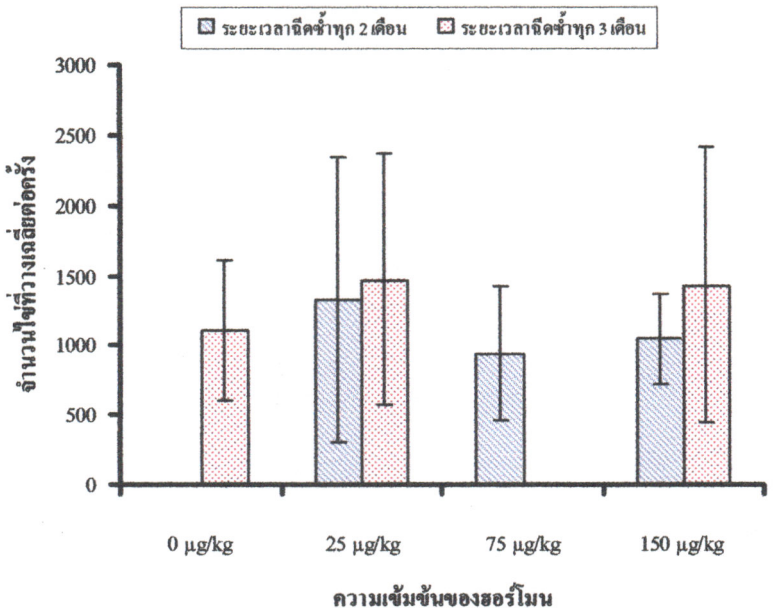
จากการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น คือ 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือน พบว่าระดับของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลทำให้จำนวนไข่ที่วางเฉลี่ยต่อครั้งของปลาการ์ตูนอานม้าเพิ่มขึ้นโดยที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 25, 75 และ150ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีจำนวนไข่ที่วางเฉลี่ยต่อครั้ง เท่ากับ 1,321± 1,019, 939± 485 และ 1,042± 328 ฟอง ตามลำดับ ($p > 0.05$) ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ตลอดระยะเวลาในการทดลอง (ตารางที่ 6 และภาพที่ 9)

จากการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น คือ 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 3 เดือน พบว่าระดับของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลทำให้จำนวนไข่ที่วางเฉลี่ยต่อครั้งของปลาการ์ตูนอานม้าเพิ่มขึ้น โดยที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0, 25 และ150ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีจำนวนไข่ที่วางเฉลี่ยต่อครั้ง เท่ากับ 1,106± 500, 1,470± 897 และ1,427± 982 ฟอง ตามลำดับ ($p > 0.05$) ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ตลอดระยะเวลาในการทดลอง (ตารางที่ 6 และภาพที่ 9)

ตารางที่ 6 จำนวนไข่ที่วางเฉลี่ยต่อครั้ง ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ

ความเข้มข้นของฮอร์โมน	ระยะเวลาฉีดซ้ำ		
(µg/kg)	ทุก 2 เดือน	ทุก 3 เดือน	เฉลี่ย
0	0± 0 (0)	1,106± 500 [a] (5)	1,106± 500 [a] (5)
25	1,321± 1,019 [a] (6)	1,470± 897 [a] (18)	1,433± 908 [a] (24)
75	939± 485 [a] (19)	0± 0 (0)	939± 485 [a] (19)
150	1,042± 328 [a] (6)	1,427± 982 [a] (8)	1,262± 775 [a] (19)
เฉลี่ย	1,033± 595 [a] (31)	1,400± 856 [a] (31)	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนชุดข้อมูล)
อักษรที่เหมือนกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 9 จำนวนไข่ที่วางเฉลี่ยต่อครั้ง ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ

เปอร์เซ็นต์การฟัก

จากการทดสอบอิทธิพลร่วมกันของระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ และระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น 4 ระดับ ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การฟักของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละครั้งที่วางไข่ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือนและ 3 เดือน ในทุกระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การฟักของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละครั้งที่วางไข่เปรียบเทียบกันมีค่า เท่ากับ 0.0± 0.0 กับ11.6± 26, 25.2± 39.9 กับ5.3± 16.8, 20.7± 36.5 กับ0.0± 0.0 และ0.0± 0.0 กับ25.2± 35.7 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 7 และภาพที่ 10)

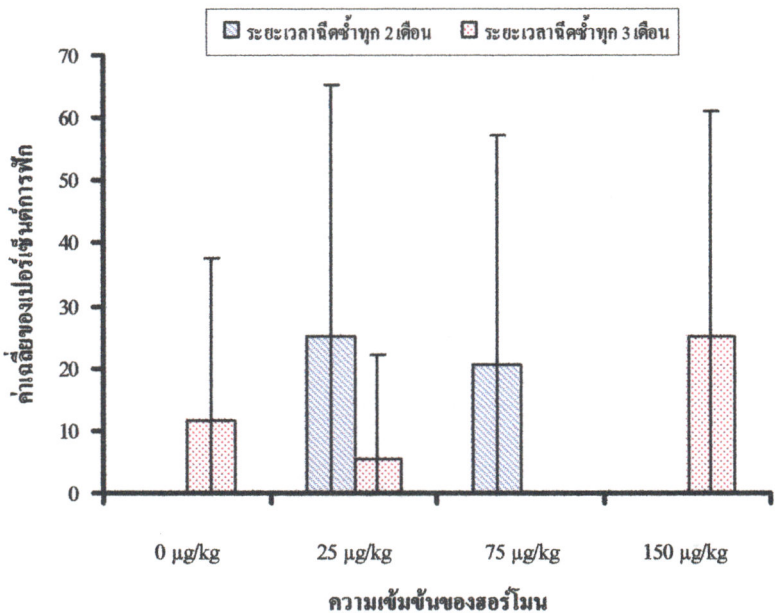
จากการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น คือ 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ตลอดระยะเวลาในการทดลอง และที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ 6 ครั้ง แต่พบว่าไข่ปลาการ์ตูนอานม้าที่วางทั้งหมดไม่มีการฟักตลอดระยะเวลาในการทดลอง ส่วนที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 25 และ75ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ 6 และ19 ครั้ง ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การฟักของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละครั้งที่วางไข่ เท่ากับ 25.2± 39.9 และ20.7± 36.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับตลอดระยะเวลาในการทดลอง ($p > 0.05$) (ตารางที่ 7 และภาพที่ 10)

จากการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น คือ 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 3 เดือน พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัมปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ตลอดระยะเวลาในการทดลอง และที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0, 25 และ150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ 5, 18 และ8 ครั้ง ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การฟักของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละครั้งที่วางไข่ เท่ากับ 11.6 ± 26.0, 5.3± 16.8 และ25.2± 35.7 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับตลอดระยะเวลาในการทดลอง ($p > 0.05$) (ตารางที่ 7 และภาพที่ 10)

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การฟักของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละครั้งที่วางไข่ ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ

ความเข้มข้นของฮอร์โมน	ระยะเวลาฉีดซ้ำ		
(µg/kg)	ทุก 2 เดือน	ทุก 3 เดือน	เฉลี่ย
0	0.0±0.0 (0)	11.6± 26.0[a] (5)	11.6± 26.0[a] (5)
25	25.2± 39.9[a] (6)	5.3± 16.8[a] (18)	10.3± 25.1[a] (24)
75	20.7± 36.5[a] (19)	0.0± 0.0(0)	20.7± 36.5[a] (19)
150	0.0± 0.0[a](6)	25.2± 35.7[a](8)	14.4± 29.2[a] (14)
เฉลี่ย	17.6± 33.8[a] (31)	11.5± 24.9[a] (31)	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนชุดข้อมูล)
อักษรที่เหมือนกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 10 ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การฟักของปลาการ์ตูนอานม้าในแต่ละครั้งที่วางไข่ ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ

อัตรารอดตาย

จากการทดสอบอิทธิพลร่วมกันของระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ และระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น 4 ระดับ เปอร์เซ็นต์รอดตายของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนในแต่ละครั้งที่มีการฟักไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) โดยระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือนและ 3 เดือน ในทุกระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น เปอร์เซ็นต์รอดตายของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนในแต่ละครั้งที่มีการฟักเปรียบเทียบกันมีค่า เท่ากับ 0.0± 0.0 กับ19.9± 0.0, 4.2± 1.3 กับ6.4± 1.7, 9.9± 3.5 กับ0.0± 0.0 และ0.0± 0.0 กับ7.9± 1.4 เปอร์เซ็นต์ ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 8 และภาพที่ 11)

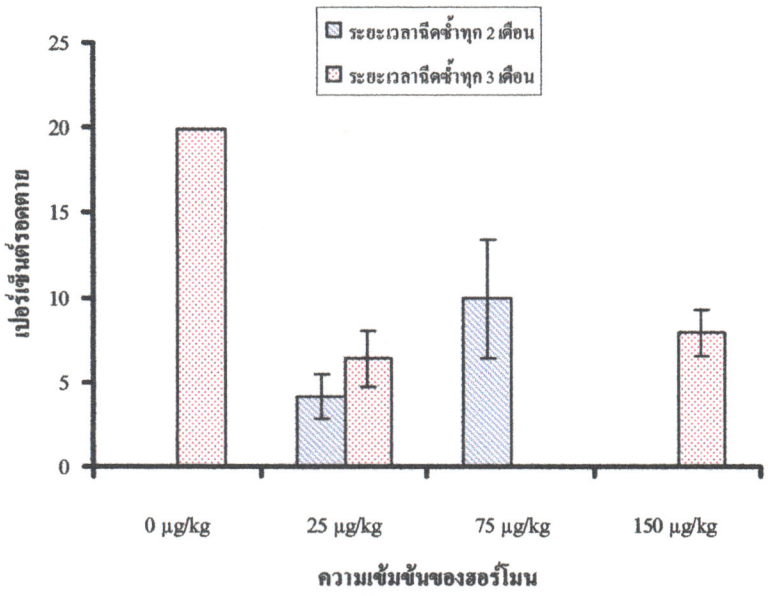
จากการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น คือ 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือน พบว่าระดับของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์รอดตายของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนในแต่ละครั้งที่มีการฟักเพิ่มขึ้น พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ตลอดระยะเวลาในการทดลอง และที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ 6 ครั้ง แต่พบว่าไข่ปลาการ์ตูนอานม้าที่วางทั้งหมดไม่มีการฟักตลอดระยะเวลาในการทดลอง โดยที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 25 และ75ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม เปอร์เซ็นต์รอดตายของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนในแต่ละครั้งที่มีการฟัก เท่ากับ 4.2± 1.3, และ9.9± 3.5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 8 และภาพที่ 11)

จากการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น คือ 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 3 เดือน พบว่าระดับของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นไม่มีผลทำให้เปอร์เซ็นต์รอดตายของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนในแต่ละครั้งที่มีการฟักเพิ่มขึ้น พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 75 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีการผสมพันธุ์วางไข่ตลอดระยะเวลาในการทดลอง และที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 0, 25 และ150ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม เปอร์เซ็นต์รอดตายของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนในแต่ละครั้งที่มีการฟัก เท่ากับ 19.9± 0.0, 6.4± 1.7 และ7.9± 1.4 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ($p > 0.05$) (ตารางที่ 8 และภาพที่ 11)

ตารางที่ 8 เปอร์เซ็นต์รอดตายของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนในแต่ละครั้งที่มีการฟัก ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ

ความเข้มข้นของฮอร์โมน	ระยะเวลาฉีดซ้ำ		
(µg/kg)	ทุก 2 เดือน	ทุก 3 เดือน	เฉลี่ย
0	0.0± 0.0 (0)	19.9± 0.0 [a](1)	19.9± 0.0 [a](1)
25	4.2± 1.3 [a](2)	6.4± 1.7 [a](2)	5.3± 1.8 [a](4)
75	9.9± 3.5 [a](5)	0.0± 0.0 (0)	9.9± 3.5 [a](5)
150	0.0± 0.0 (0)	7.9± 1.4 [a](3)	7.9± 1.4 [a](3)
เฉลี่ย	8.3± 4.0 [a] (7)	9.4± 5.3 [a] (6)	

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ย ± ค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (จำนวนชุดข้อมูล)
อักษรที่เหมือนกันแสดงว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



ภาพที่ 11 เปอร์เซ็นต์รอดตายของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนในแต่ละครั้งที่มีการฟัก ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ

คุณภาพน้ำระบบเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ระหว่างการทดลอง

จากการตรวจสอบคุณภาพน้ำระบบเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ตลอดระยะเวลาในการทดลอง พบว่าค่าที่ตรวจสอบมีค่าดังนี้ ความเค็มเฉลี่ยเท่ากับ 32.5±1.0 ส่วนในพันส่วน อุณหภูมิเฉลี่ยเท่ากับ 26.1 ± 2.0 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดด่างเฉลี่ยเท่ากับ 8.07± 0.24 ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำเฉลี่ยเท่ากับ 6.4± 0.6 ความเป็นด่างเฉลี่ยเท่ากับ 96.0± 4.1 มิลลิกรัมต่อลิตร ปริมาณแอมโมเนียรวมเฉลี่ยเท่ากับ 0.21± 0.10 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนไตร์ต-ไนโตรเจนเฉลี่ยเท่ากับ 0.06± 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ไนเตรต-ไนโตรเจนเฉลี่ยเท่ากับ 4.65± 1.94มิลลิกรัมต่อลิตร

อภิปรายและสรุปผล

การผสมพันธุ์วางไข่

1. ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ ต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า พบว่ามี 3 ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน ที่ส่งผลให้ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ คือ 25, 75 และ150 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม แต่ผลของระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น ไม่มีผลทำให้ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่เพิ่มขึ้น เมื่อเปรียบเทียบผลของความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้นจาก 25 ถึง 150 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนสูงสุด คือ 150 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม มีแนวโน้มทำให้ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ต่ำกว่า คือ 25 และ75 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ทั้งนี้ในการฉีดฮอร์โมน ฮอร์โมนจะไปกระตุ้นต่อมใต้สมองให้หลั่ง GtH ออกมาในกระแสเลือด เพื่อเป็นการกระตุ้นให้รังไข่มีการสะสมไข่แดงและกระตุ้นให้มีการวางไข่ต่อไป โดยระดับ GtH II ในเลือดที่เริ่มสูงขึ้นในระยะแรก จะมีบทบาทในการควบคุมหรือกระตุ้นความสมบรูณ์ของไข่ (Oocyte Maturation) แต่ระดับ GtH II ในเลือดที่สูงขึ้นอย่างรวดเร็วในระยะหลังจะมีบทบาทในการกระตุ้นการตกไข่ (Ovulation)โดยตรง (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2546) ดังนั้นที่ระดับของฮอร์โมนที่เหมาะสมจะทำให้รังไข่ของปลาการ์ตูนอานม้ามีการพัฒนาและมีการผสมพันธุ์วางไข่ในที่สุด แต่ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่สูงๆ เช่น 150 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ในการทดลองครั้งนี้ ทำให้เกิด Nagative Feedback ไปยับยั้งสมองและต่อมใต้สมองให้ยับยั้งการหลั่ง GtH II ออกมาหรือหลั่ง GtH II ต่ำกว่าปกติ ซึ่งการหลั่ง GtH II ของปลากระดูกแข็ง นอกจากจะถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยจากสมองและไฮโปทาลามัส ก็ยังถูกยับยั้งด้วยปัจจัยจากสมองและไฮโปทาลามัสได้เช่นกัน เช่น โดปามีน(Dopamine) และกรดอมิโนบิวไทริค (Aminobutyric Acid หรือ GABA) เป็นต้น โดยโดปามีนเป็นตัวยับยั้งหลัก (Major Inhibitory Factor) ที่ยับยั้งการหลั่ง GtH II โดยโดปามีนทำให้ฮอร์โมน GnRH ไม่สามารถกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองหลั่ง GtH II หรืออาจไปมีผลทำการหลั่ง GtH II จากต่อมใต้สมองลดต่ำลงกว่าปกติ (วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2546)

แม้การทดลองในครั้งนี้จะพบว่า ทุกระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนไม่มีผลต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า โดยทุกระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน สามารถกระตุ้นให้ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ได้ แต่จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง ทำให้ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ครั้งแรกได้เร็วขึ้น

ภายในระยะเวลา 2-16 วัน หลังจากฉีดฮอร์โมน เปรียบเทียบกับการผสมพันธุ์วางไข่ตามธรรมชาติ (0 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม) ปลาการ์ตูนอานม้าใช้เวลาในการผสมพันธุ์วางไข่ครั้งแรก 53-94 วัน หลังจากฉีดฮอร์โมน ซึ่งสอดคล้องกับ Forniés et al. (2001) รายงานว่า ปลา European Seabass (*Dicentrarchus labrax*) ที่ฉีดด้วย GnRHa ในรูปแบบของ Microspheres ความเข้มข้น 60 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม แม่ปลา 50 เปอร์เซ็นต์ มีการวางไข่อย่างต่อเนื่อง เปรียบเทียบกับชุดควบคุมไม่มีการวางไข่ภายในระยะเวลา 21 วัน เช่นเดียวกับ Barbaro et al. (1997) รายงานว่า ปลา Gilthead Seabream (*Sparus aurata)* ที่ฉีดด้วย PLGA-Encapsulated Leuprolide Acetate (Des-Gly^{10},[D-Leu^{6}]-LH-RH Ethylamide (Long-Action GnRHa) ที่ระดับความเข้มข้น 20, 40 และ80 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง แม่ปลาทุกชุดการทดลองเริ่มมีการวางไข่ โดยพบว่า 40 เปอร์เซ็นต์ของไข่ทั้งหมดถูกวางภายในระยะเวลาระหว่าง 10 วันแรก เปรียบเทียบกับชุดควบคุมแม่ปลามีการวางไข่เพียงเล็กน้อยภายใน 10 วันแรก และMylonas (1995) ยังกล่าวว่า ปลา Striped Bass ที่ฉีดด้วยGnRHa ในรูปแบบของ Microsphere ระดับความเข้มข้น 150 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และปลา Atlantic Salmon ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม สามารถชักนำให้แม่ปลาเกิดการตกไข่ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะ เวลา 11 และ 15 วัน ตามลำดับ เช่นเดียวกับ Kokokiris et al. (2005) รายงานว่า ปลา Mediterranean Red Porgy (*Pagrus pagrus*) ที่ฉีดด้วย GnRHa ในรูปแบบของ Microsphere ระดับความเข้มข้น 20 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นให้แม่ปลามีการวางไข่ภายในระยะเวลา 3-11 วัน หลังจากฉีดฮอร์โมน

ผลการทดลองครั้งนี้ยังสอดคล้องกับ การทดลองใช้ระบบควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนในรูปแบบต่าง ๆ ที่นำมาใช้ในการชักนำให้เกิดการผสมพันธุ์วางไข่ในปลาหลาย ๆ ชนิด เช่นปลานวลจันทร์ทะเล (Lee et al., 1986), (Mart et al., 1987), (Mart et al., 1988), ปลากะพงขาว (Garcia, 1989), ปลาสลิดทะเลจุดเหลือง (Harvey et al., 1985), Rainbow Trout (Breton et al., 1990) และ Striped Bass (Mylonas et al., 1998)เป็นต้น โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 12.5-200 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม สามารถกระตุ้นให้ปลามีการผสมพันธุ์วางไข่ได้เร็วกว่าและสูงกว่าชุดควบคุม ดังการศึกษาของ Mylonas (1996) ที่รายงานว่า แม่ปลา White Bass ที่ฉีดด้วย GnRHa ในรูปแบบของ Microsphere ระดับความเข้มข้น 40 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และ GnRHa-EVAC (Ethylene Vinyl Acetate Co-Polymer) ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม สามารถชักนำให้แม่ปลาเกิดการตกไข่ 100 เปอร์เซ็นต์ ภายในระยะเวลา 70 ชั่วโมง และ 76 ชั่วโมง ตามลำดับ

จากการทดลองแม้จะพบว่าไม่มีความแตกต่างของจำนวนครั้งในการวางไข่, จำนวนไข่ที่วาง, อัตราการฟักไข่ และอัตรารอดของปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนจนถึงระยะ Metamorphosis สอดคล้องกับ Arabaci (2004) รายงานว่าเปอร์เซ็นต์ฟักไข่ของปลา Rainbow Trout ที่ฉีดด้วย GnRHa-FIA ระดับความเข้มข้น 25 และ50 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ไม่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับ Mylonas (1996) รายงานว่าไข่ของแม่ปลา White Bass ที่ใช้ระบบควบคุมการออกฤทธิ์ของฮอร์โมน GnRHa คุณภาพไข่ไม่มีความแตกต่างกัน และ Kokokiris et al. (2005) รายงานว่าคุณภาพของไข่ที่ได้จากแม่ปลา Mediterranean Red Porgy (*Pagrus pagrus*) ไม่มีความแตกต่างกันกับชุดควบคุม ทั้งนี้จากการทดลองมีแนวโน้มแสดงให้เห็นว่า ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่สูงเกินไป อาจส่งผลให้อัตรารอดตายของปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนจนถึงระยะ Metamorphosis มีอัตรารอดตายลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับ Garcia (1989) ได้ทดลองฝังฮอร์โมน LHRHa ในปลา Sea Bass (*Lates carifer*) ที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน 2 ระดับ คือในระดับต่ำอยู่ระหว่าง 4.75-75 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และในระดับสูงอยู่ระหว่าง 150-300 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ผลปรากฏว่าที่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนในระดับสูงเปอร์เซ็นต์การวางไข่, เปอร์เซ็นต์การปฏิสนธิ และเปอร์เซ็นต์รอดตายของลูกปลามีค่าต่ำกว่าชุดการทดลองที่ใช้ฮอร์โมนในระดับต่ำ

2. ระยะเวลาในการฉีดซ้ำ

จากการทดลองระยะเวลาในการฉีดซ้ำทุก 2 เดือน และ3 เดือน ต่อการผสมพันธุ์วางไข่ จำนวนครั้งในการวางไข่ จำนวนไข่ที่วาง อัตราการฟัก และอัตรารอดของปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนจนถึงระยะ Metamorphosis พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากการใช้ GnRHa ในรูปแบบของ Microspheres เป็นการทำให้ฮอร์โมนค่อยๆ หลั่งเข้าไปในกระแสเลือดอย่างช้าๆ เป็นระยะเวลานาน เพื่อไปกระตุ้นให้สมองมีการหลั่งฮอร์โมนโกนาโดโทรปิน (GtH) อย่างต่อเนื่องสามารถชักนำให้ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ได้เช่นเดียวกับปลา Gilthead Seabream, *Sparus aurata* (Zohar, 1988), (Zohar et al., 1989) สอดคล้องกับ Okada et al. (1994a) พบว่าในหลอดทดลอง การออกฤทธิ์ของตัวยาในรูปแบบ microspheres จะออกฤทธิ์หมดภายใน 6-8 สัปดาห์ ส่วน Chasin, & Langer (1990) รายงานว่าการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนในรูปของ Microspheres สามารถออกฤทธิ์อยู่ได้นาน 2-3 เดือน ขึ้นอยู่กับอัตราส่วนของ Lactic Acid และ Glycolid Acid และจะอยู่ได้นานมากยิ่งขึ้นตามน้ำหนักของโมเลกุลของ Polymer ที่ใช้ เช่นเดียวกับการทดลองในครั้งนี้ที่ใช้ Leuprorelin Acetate (Des-Gly^{10}, [D-Leu^{6}]-LH-RH Ethylamide) ที่อยู่ในรูปของ Prolong Release Microcapsulated สามารถกระตุ้นให้ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ได้ภายในระยะ เวลา 2-3 เดือน

คุณภาพน้ำระบบเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ระหว่างการทดลอง

คุณภาพน้ำเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า คุณภาพน้ำที่ใช้ในการทดลองเหมาะสมกับการเลี้ยงปลาการ์ตูนอานม้าให้มีการผสมพันธุ์วางไข่ได้ โดยไม่มีความแตกต่างกัน เนื่องจากระบบที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนเป็นระบบที่พัฒนามาเพื่อใช้เลี้ยงปลาการ์ตูนในเชิงพาณิชย์ เป็นระบบปิดที่มีระบบบำบัดคุณภาพน้ำและระบบฆ่าเชื้อโรคในน้ำ จึงทำให้คุณภาพน้ำทุกตู้ทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน พบว่า ความเค็มอยู่ระหว่าง 31 - 35 ส่วนในพันส่วน, ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำมีค่าตั้งแต่ 5.2 ถึง 8.2 มิลลิกรัมต่อลิตร, ความเป็นกรด- ด่างมีค่าตั้งแต่ 7.87 ถึง 9.18, อุณหภูมิมีค่าตั้งแต่ 20.9 ถึง 30.8 องศาเซลเซียส, ความเป็นด่างของน้ำมีค่าตั้งแต่ 84 ถึง 108 มิลลิกรัมต่อลิตร, ปริมาณแอมโมเนียรวมมีค่าตั้งแต่ 0.05 ถึง 0.7 มิลลิกรัมต่อลิตร, ไนไตร์ต-ไนโตรเจนมีค่าตั้งแต่ 0.02 ถึง 0.17 มิลลิกรัมต่อลิตร, และไนเตรต-ไนโตรเจนมีค่าตั้งแต่ 0.84 ถึง 9.71 มิลลิกรัมต่อลิตร สอดคล้องกับ Hoff (1996) รายงานว่าคุณภาพน้ำที่ Instant Ocean Hatcheries (IOH) การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนในระบบปิด มีการจัดการควบคุมคุณภาพน้ำโดยอุณหภูมิอยู่ระหว่าง 21- 31 องศาเซลเซียส, ความเค็มอยู่ระหว่าง 34 - 35 ส่วนในพันส่วน, ความเป็นกรด- ด่าง อยู่ระหว่าง 8.0 - 8.3, ไนไตร์ตและแอมโมเนียไม่ควรเกิน 0.1 ppm และ ไนเตรตอยู่ระหว่าง 20 - 30 ppm

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาความเข้มข้นของฮอร์โมน 4 ระดับ ระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ และอิทธิพลร่วมระหว่างความเข้มข้นของฮอร์โมนและระยะเวลาในการฉีดซ้ำ ต่อการผสมพันธุ์วางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า พบว่า

1. ปลาการ์ตูนอานม้าทุกชุดการทดลองที่ได้รับฮอร์โมนมีการผสมพันธุ์วางไข่เร็วกว่าชุดการทดลองที่ไม่ได้รับฮอร์โมน โดยพบว่าจะมีการผสมพันธุ์วางไข่ภายในระยะเวลา 2-16 วัน หลังจากฉีดฮอร์โมน

2. ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ระยะเวลาในการฉีดซ้ำ ทุก 2 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์วางไข่เฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 75 เปอร์เซ็นต์, จำนวนครั้งในการวางไข่สูงสุด เท่ากับ 19 ครั้ง และเปอร์เซ็นต์การฟักไข่ต่อครั้งสูงสุด เท่ากับ 78.80 เปอร์เซ็นต์

3. ที่ระดับความเข้มข้น 25 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ระยะเวลาในการฉีดซ้ำ ทุก 3 เดือน จำนวนไข่ที่วางเฉลี่ยต่อครั้งสูงสุด เท่ากับ 1,470 ฟอง

4. ที่ระดับความเข้มข้น 0 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ระยะเวลาในการฉีดซ้ำ ทุก 2 เดือน อัตรารอดตายของลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนจนถึงระยะ Metamorphosis เฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 19.9 เปอร์เซ็นต์

ถึงแม้ว่าทุกชุดการทดลองจะให้ผลการทดลองที่ไม่มีความแตกต่างกัน แต่ระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ ควรใช้ที่ระดับความเข้มข้น 75 ไมโครกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ระยะเวลาในการฉีดซ้ำ ทุก 2 เดือน เนื่องจากมีค่ามีเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์วางไข่, จำนวนครั้งในการวางไข่ และ เปอร์เซ็นต์การฟักสูงกว่าทุกชุดการทดลอง และในการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงปลาการ์ตูนในเชิงพาณิชย์นั้น ปัจจัยของเปอร์เซ็นต์การผสมพันธุ์วางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้าที่นำเข้าจากธรรมชาติน่าจะมีความสำคัญมากกว่าปัจจัยอื่น

ข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้ได้นำปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติเข้ามาทดลอง ซึ่งมีข้อจำกัดในการรวบรวมให้ได้ในปริมาณมาก รวมทั้งทำการศึกษาปัจจัยพร้อมกันถึง 2 ปัจจัย จึงทำให้จำนวนซ้ำของกลุ่มประชากรที่ทำการศึกษามีจำนวนน้อยเกินไป ทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความแปรปรวนสูง เพราะฉะนั้นในการศึกษาในครั้งต่อไป จึงเห็นสมควรว่าต้องเพิ่มจำนวนซ้ำให้มากขึ้น หรือควรมีการตัดปัจจัยบางปัจจัย หรือทำการศึกษาทีละปัจจัย

2. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับผลของฮอร์โมนรูปแบบอื่น ๆ ที่ใช้ในการเพาะพันธุ์ปลา เช่น ฮอร์โมนที่ออกฤทธิ์อย่างรวดเร็ว เช่น HCG, Suprefact เปรียบเทียบกับฮอร์โมนในระบบควบคุมการหลั่งที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ที่มีการควบคุมการหลั่งของฮอร์โมนออกมาในกระแสเลือดอย่างช้า ๆ เป็นเวลานาน

บรรณานุกรม

นฤพล สุขุมาสวิน. (2538). โกนาโดโทรปินของปลากระดูกแข็ง. *การประมง, 48*(2), 139-143.

นิพันธ์ ทารีมุกข์. (2543). ศึกษาการเจริญของคัพภะปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* (Linnaeus). ปริญญานิพนธ์. สาขาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

ภาณุ เทวรัตน์มณีกุล, กำชัย ลาวัณยวุฒิ และสุจินต์ หนูขวัญ. (2539). การทดสอบประสิทธิภาพของฮอร์โมนสังเคราะห์ชนิดต่าง ๆ ในการเพาะพันธุ์ปลาน้ำจืด. ใน *รายงานการสัมมนาวิชาการ* (หน้า 97-106). กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยประมงน้ำจืด กรมประมง.

วิมล เหมะจันทร. (2540). *ชีววิทยาปลา*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2536). *การเพาะพันธุ์ปลา*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ .

วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2546). *วิทยาต่อมไร้ท่อของปลาและครัสเตเซีย (Fish and crustracean endocrinology)*. ชลบุรี: ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สมศรี งามวงศ์ชน. (2539). การใช้โกนาโดโทรปิน รีลิสซิ่ง ฮอร์โมนรูปแบบต่าง ๆ เพื่อการวางไข่ของปลาดุกอุย. ใน *เอกสารวิชาการ 21/2539* (หน้า 1-19). กรุงเทพฯ: กองประมงน้ำจืด กรมประมง.

สมศรี งามวงศ์ชน. (2542). ความเป็นมาของฮอร์โมนและงานวิจัย ปี 2000. *วารสารการประมง, 52*(4), 338-345.

สิรินทร์ วิโมกข์สันถว์. (2521). *ชีวเคมีฉบับปรับปรุงใหม่*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล.

สิริพร โตนดแก้ว. (2539). โพลิเมอร์กับวิวัฒนาการการนำตัวยาเข้าสู่ร่างกาย. *เอ็มเทค เทคโนโลยี, เมษายน-มิถุนายน 2539* (3), 25-29.

สุภาพร สุกสีเหลือง. (2542). มีนวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ.

อุ่นจิต ปาติยเสวี. (2537). ศึกษาพฤติกรรมการวางไข่และการเจริญเติบโตของปลาการ์ตูนส้มขาว *(Amphiprion ocelaris)*. ใน *รายงานการสัมมนาวิชาการ* (หน้า 393-412). ภูเก็ต: สถาบันชีววิทยาและประมงทะเล, กรมประมง.

Allen, G. R. (1972). *The Anemonefishes: their classification and biology*. New Jersey: T.F.H. Publications.

Allen, G. R. (1980). *Anemonefishes of the world: Species, care, and breeding*. Ohio, USA: Aquarium System, Mentor.

Allen, G. R., & Fautin, D. G. (1992). *Anemonefishes and their host sea anemones*. Francis Street Perth, WA 6000: Western Australian Museum Museum.

Allsop, D. J., & West, S. A. (2003). Constant relative age and size at sex change for sequentially hermaphroditic fish. *Journal of Evolutionary Biology*, 1-37. Retrieved December 15, 2003, from http://westgroup.icapb.ed.uk/DaveA/PDFS/ALLSOPINVARIANTS.pdf.

Arabaci, M., Diler, I., & Sari, M. (2004). Induction and synchronisation of ovulation in rainbmw trout, *Oncoshynchus myksis*, by administration of emulsified buserelin ($GnRH_a$) and its effects on eggs quality. *Aquaculture, 237*, 475-484.

Barbaro, A., Francescon, A., Bozzato, G., Merlin, A., Belvedere, P., & Colombo, L. (1997). Induction of spawning in gilthead seabream, *Sparus aurata* L., by a long-action GnRH agonist and its effects on egg quality and daily timing of spawning. *Aquaculture, 154*, 349-359.

Bell, L. J. (1976). Notes on the nesting success and fecundity of the anemonefish *Amphiprion clarkii* at Miyake-Jima, Japan Japanese. *Journal of Ichthyology, 22*(4), 207-211.

Breton, B., Weil, C., Sambroni, E., & Zohar, Y. (1990). Effects of acute versus sustained administration of $GnRH_a$ on GtH release and ovulation in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss. Aquaculture, 91*, 373-383.

Carolsfeld, J., Sherwood, N. M., Kreiberg, H., & Soawer, S. A. (1988). Induced sexual maturation of herring using $GnRH_a$ 'quick-release'cholesterol pellets. *Aquaculture, 70*, 169-181.

Chasin, M., & Langer, R. (1990). Biodegradable polymers as drug delivery systems. *Swarbrick, J. (Ed.)Drugs and the Pharmaceutical Sciences, 45*, 347-365.

Crim, L. W., Sutterlin, A. M., Evans, D. M., & Weil ,C. (1983). Accelerated ovulation by pelleted LHRH Analogue(LHRHa) treatment of spring-spawning rainbow trout(*Salmo gairdneri*) held at low temperature. *Aquaculture, 35*, 299-307.

Crim, L. W., Peter, R. E., & Van Der Kraak, G. (1986). The use of LHRH analogs in aquaculture. In B. H. Vickey, & J. J. Jr. Nestor (Eds.), *Contraceptive and Therapentic Application*. (pp. 489-498). Boston: MTP Press.

Donaldson, E. M., & Hunter, G. A. (1983). Induced final maturation, ovulation and spermiation inculture fish. In W. S. Hoa, D. J. Randall, & E. M. Donaldson (Esd.), *Fish Physiology* (pp. 351-390). New York: Academic Press.

Fishelson, L. (1965). Observation and experiments on the red sea anemones and their symbiotic fish *Amphiprion bicinctus*. *Bull Sea Fish, Red Stat, Haifa, 39*, 1-14.

Forniés, M. A., Mañanós, E., Carrillo, M., Rocha, A., Laureau,A., Mylonas, C. C., Zohar, Y., & Zanuy, S. (2001). Spawning induction of individual Eropean sea bass females (*Dicentrarchus labrax*) using different GnRHa-delivery sustems. *Aquaculture, 202*, 221-234.

Garcia, L. Ma. B. (1989). Dose-dependent spawning response of mature female sea bass,*Lates calrifer* (Bloch), to pelleted luteinizing hormone-releasing hormone analogue(LHRHa). *Aquaculture, 77*, 85-96.

Griffin, J. E., & Ojeda, S. R. (1988). *Textbook of endocrine physiology*. New York: Oxford University Press.

Havey, B., Nacario, J., Crim, L. W., Juario, J. V., & Marte, C. L. (1985). Induced spawning of sea bass,*Lates calcarifer*, and rabbit fish, *Siganus guttatus*, after implantation of pelleted LHRH analogue. *Aquaculture, 47*, 53-59.

Hoff, F. H. (1996). *Conditioning, spawnig and rearing of fish with emphasis on marine clownfish*. Dade City, FL33525: Aquaculture Consultants.

Kokokiris, L., Canario, A., Mylonas, C., Pavlidis, M., Kentouri, M., & Divanach, P. Induction of ovulation and spawning in the Mediterranean Red Porgy,*Pagrus pagrus*, by controlled delivery and acute injection of GnRHa. *Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh, 57*(4), 223-230.

Larssan, D. G. J., Mylonas, C. C., Zohar, Y., & Crim, L. W. (1997). Gonadotropin releasing hormone-analogue (GnRH-A) advances ovulation and improves the reproductive performance of a cold-water batch-spawning teleost, the yellowtail flounder (*Pleuronectes ferrugineus*). *Can. J. Aquat. Fish. Sci, 54*, 1957-1964.

Lee, C. S., Tamaru, C. S., Banno, J. E., Kelley, C. D., Bocek, A., & Wyban, J. A. (1986). Induced maturation and spawning of milkfish, *Chanos chanos* (Forskal) by hormone implantation. *Aquaculture, 52*, 199 – 205.

Lewis, D. H. (1990). Controlled release of bioactive materials from lactide/glycolide polymers. In M. Chasin, & R. Langer (Eds.), *Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems* (pp. 1-41). New York: Marcel Dekker.

Liley, N. R. (1978). Patterns of hormonal control in the reproductive behavior of fish and their relevance to fish management and culture programme. In *Induced fish breeding workshop*(13 pp.). Singapore and IDRC Singapore: Singapore:Ministry of National Development.

Mañanós, E., Carrillo, M., Sorbera, L. A., Mylonas, C. C., Asturiano, J. F., Bayarri, M. J., Zohar, Y., & Zanuy, S. (2002). Lutienizing hormone and sexual steroid plasma levels after treatment of Europan sea bass with sustained-release delivery systems for gonadotropin- releasing hormone analogues. *Journal of Fish Biology*, *60*, 328-339.

Marte, C. L., Sherwood, N. M., Crim, L. W., & Havey, B. (1987). Induced spawning of maturing milkfish (*Chanos chanos* Forskal) with gonadotropin releasing hormone (GnRH) analogues administered in various ways . *Aquaculture*, *60*, 303 –310.

Marte, C. L., Sherwood, N. M., Crim, L. W., & Tan, J. (1988). Induced spawning of maturing milkfish (*Chanos chanos* Forskal) using humen chorionic gonadotropin and mammalian and salmon gonadotropin releasing hormone analogues. *Aquaculture*, *73*, 333 –340.

Moyer, J. T., & Bell, L. J. (1976). Reproductive behavior of the anemonefish *Amphiprion clarkii* at Miyake-Jima. *Japan Japanese Journal of Ichthyology*, *23*(1), 23-32.

Moyer, J. T., & Steene,R. C. (1979). Nesting behavior of anemonefish *Amphiprion polymnus*. *Japanese Journal of Ichthyology*, *26*(2), 209-214.

Moe, M. A. Jr. (1982). *The marine aquarium handbook beginner to breeder*. Florida, U.S.A: Green turtle Publications Plantation.

Mylonas, C.C., Tabata, Y., Langer, R., & Zohar, Y. (1995). Preparation and evaluation of polyanhydride microspheres containing gonadotropin-releasing hormone (GnRH), for inducing ovulation and spermiation in fish. *J. Controlled. Release*, *35*, 23-34.

Mylonas, C. C., Magnus, Y., Gissis, A., Klebanov, Y., & Zohar, Y. (1996). Application of controlled-release, GnRHa-delivery systems in commercial production of white bass X striped bass hybrids (sunshine bass), using captive broodstocks. *Aquaculture, 140*, 265-280 .

Mylonas, C. C., Gissis, A., Magnus, Y., & Zohar, Y. (1997). Hormone changes in male white bass (*Morone chrysops*) and evalution of milt quality after treatment with a sustained-release GnRHa delivery system. *Aquaculture, 153*, 301-311.

Mylonas, C. C., Woods III, L. C., Thomas, P., & Zohar, Y. (1998). Endocrine profiles of female striped bass (*Morone saxatilis*) in captivity, during postvitellogenesis and induction of final oocyte maturation via controlled-release GnRHa-delivery systems. *Gen. Comp. Endocrinal, 110*, 276-289.

Okada, H., Doken, Y., Ogawa, Y., & Toguchi, H. (1994a). Preparation of three-month depot injectable microspheres of leuprolin acetate using biodegradable polymers. *Pharm. Res, 11*, 1143-1147.

Okada, H.,Yamamoto, M., Heya, T., Inoue, Y., Kamei, S., Ogawa, Y., & Toguchi, H. (1994b). Drug delivery using biodegradable microspheres. *J. Controlled. Release, 28*, 121-129.

ORA. (2003). Species list-clownfish. Retrieved December 15, 2003, from http://www.orafarm.com/clownfish.html.

Peter, R. E., Habibi, H. R., Marchant, T. A., & Nahoniak, C. S. (1987a). Vertebrate gonadotropin-releasing hormones:phylogyny and structure-function relationships. *Annals New York Acadamic Science, 519*, 299-309.

Peter, R. E., Narhorniak, C. S., Shin, S., King, J. A., & Millar, R. P. (1987b). Activity of position-8-substituted analogs of mammalian gonodotropin-releasing hormone in goldfish. *Gen. Comp. Endocrinal, 65*, 385-393.

Pickford, G. E., & Atz, J. W. (1957). *The physiology of pituitary gland of fishes*. New York : Zoological Society.

Rhine, W. D., Hsieh, D. S. T., & Langer, R. (1980). Polymers for sustained macromolecule release : procedures to fabricate reproducible delivery systems and control release kinetics. *J. Pharm. Sci, 69*, 265-269.

Ross, R. M. (1978). Reproductive behavior of the anemonefish *Amphiprion melanopus* on Guam. *Copia 1978*, 103-107.

Sherwood, N. M., Crim, L. W., Carolsfeld, J., & Walter, S. M. (1988). Sustained hormone release. I. characteristics of in vitro release of gonadotropin - releasing hormone analogues (GnRHa) from pellets. *Aquaculture*, *74*, 75-86.

Suzuki, K., Kawauchi, H., & Nagahama,Y. (1993). Isolation and characterization of two distinct gonadotropins from chum salmon pituitary glands. *General and Comparative Endocrinology*, *71*, 292-301.

Swanson, P. (1995). Induction of ovulation and spermiation in sockeye salmon using gonadotropin-releasing hormone analog (GnRHa) in controlled-release devices. Retrieved August 5, 2002, from http://www.efw.bpa.gov/Enviroment/EW/EWP/DOCS/REPORTS/HATCHERY/A55064-2.pdf.

Wilkerson, J. D. (1998). *CLOWNFISH : A guide to their captive care, breeding & natural history*. Vermont 05482: Microcosm Shelburne.

Zohar, Y., Pagelson, G., Gothilf, Y., Dickhoff, W. W., Swanson, P., Duguay, S., Gombotz, W., Kost, J., & Langer, R. (1990). Controlled release of gonadotropin releasing hormones for the manipulation of spawning in farmed fish. *Controlled Release Bioact. Mater*, *17*, 51-52.

Zohar, Y. (1988). Gonadotropin releasing hormone in spawning induction in teltost : basic and applied considerations. In Y. Zohar, & B. Breton (Eds.), *Reproduction in fish: Basic and applied in endocrinology and genetics*. (pp. 47-62). Paris: INRA Press.

Zohar, Y., Goren, A., Tosky, M., Pagelson, G., Leibovitz, D., & Koch,Y. (1989). The bioactivity of gonadotropin-releasing hormones and its regulation in the gilthead seabream, *Sparus aurata* : in vivo and vitro studies. *Fish. Physiol. Biochem*, *7*, 59-67

Zohar, Y., & Mylonas, C. C. (2001). Endocrine manipulation of spawning in cultured fish: from hormone to genes. *Aquaculture*, *197*, 99-136.