

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า

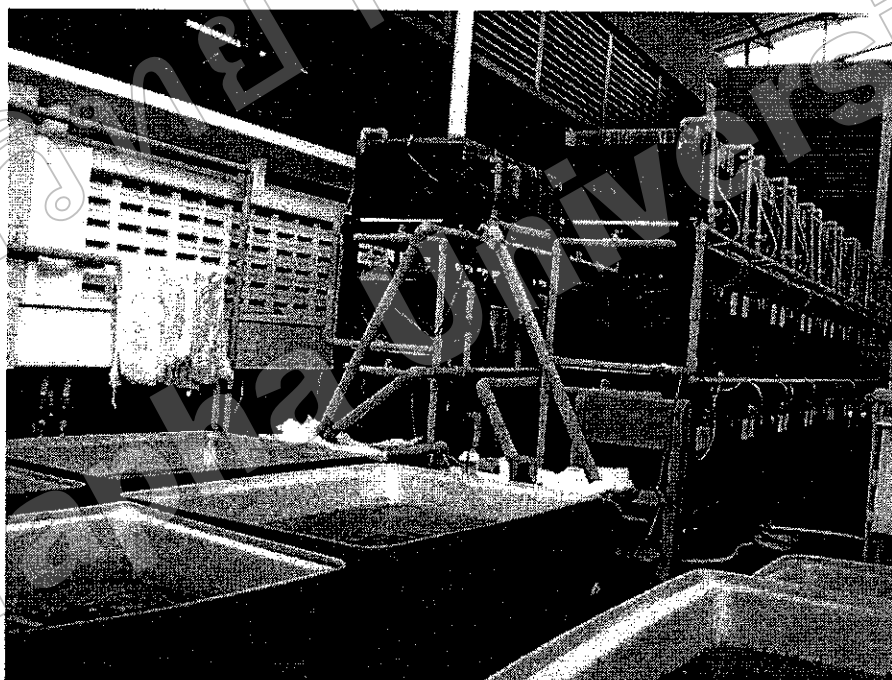
การทดลองครั้งนี้ใช้พ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* (Linnaeus 1758) ที่รวบรวมมาจากบริเวณตำบลเสมสาร อำเภอสัตตหีบ จังหวัดชลบุรี การรวบรวมจะจับเฉพาะปลาที่เห็นว่าอาศัยอยู่ด้วยกันเป็นคู่ ความยาวของลำตัวเพศเมียมีความยาวไม่น้อยกว่า 92 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นขนาดของความยาวลำตัวตัวสุดท้ายที่แสดงว่าเป็นเพศเมีย (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 ขอมรับอาหาร ไม่ตื่นตกใจง่ายในขณะปฏิบัติงาน หลังจากนั้นทำการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าที่เป็นคู่กันแน่นอน โดยสังเกตพฤติกรรมการยอมรับซึ่งกันและกันของพ่อแม่พันธุ์ ซึ่งปลาที่เป็นคู่กันจะไม่ทำร้ายหรือไล่กัดคู่ของมัน จำนวน 48 คู่ ทำการทดลองต่อไป



ภาพที่ 1 พ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* (Linnaeus 1758)

การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า

นำพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าที่เตรียมไว้เลี้ยงในตู้ทดลองที่บรรจุน้ำทะเลประมาณ 80 ลิตร ที่มีชุดระบบกรองน้ำรวม โดยใช้สาหร่ายใบเลื่อย (*Caulerpa serata*) เป็นตัวบำบัดคุณภาพน้ำ และฆ่าเชื้อโรคในน้ำด้วยเครื่องฆ่าเชื้อด้วยแสงอุลตราไวโอเล็ต (ภาพที่ 2) โดยภายในตู้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์มีแผ่นกระเบื้องปูพื้นขนาด 8" x 8" วางเรียงไว้เพื่อเป็นวัสดุสำหรับวางไข่ การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์จะให้ อาหาร 2 ชนิด คือ หอยลายผสมกุ้งสับอัตราส่วน 1:1 และไข่ตุ๋น โดยในตอนเช้าให้หอยลายผสมกุ้งสับเป็นอาหารในเวลาประมาณ 10.00 น. ตอนบ่ายให้ไข่ตุ๋นเป็นอาหารในเวลาประมาณ 15.00 น.การให้อาหารจะให้ทีละน้อยๆ เมื่อปลากินหมดแล้วจึงจะให้เพิ่มอีก จะหยุดให้เมื่อปลาอิ่มเศษอาหารบางส่วนจะตกอยู่ที่พื้นตู้ต้องดูดเศษอาหารทิ้งและเติมน้ำให้ได้ระดับเดิมทุกวัน



ภาพที่ 2 ตู้ทดลองพร้อมระบบกรองน้ำรวม

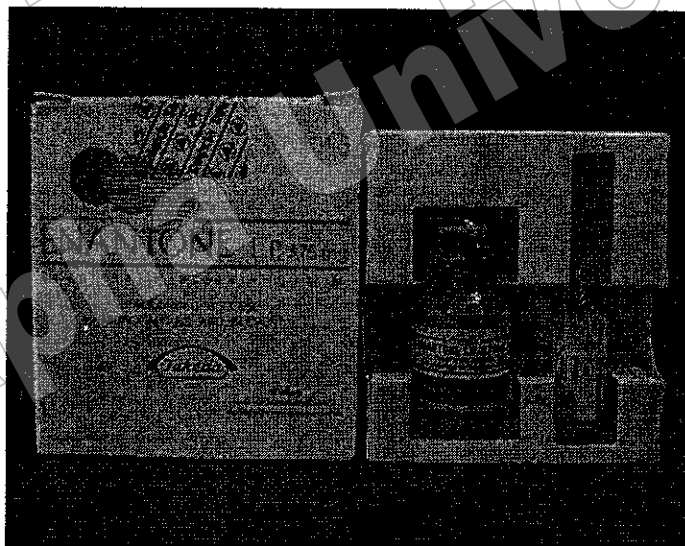
คุณภาพน้ำและการจัดการ

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

ต่างของน้ำ, แอมโมเนียม, ไนไตรต์-ไนโตรเจน, ไนเตรต-ไนโตรเจน ตามวิธีการของ Stickland and Parson (1972)

ฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง

ฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลองมีชื่อว่า Leuporelin Acetate ชื่อการค้า (ENANTONE® L.P. 3.75 mg) เป็นสารสังเคราะห์ประเภท Nonapeptide Analog ของ Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH หรือ LHRH) ตามธรรมชาติ มีโครงสร้างคือ Des-Gly¹⁰, [D-Leu⁶]-LH-RH Ethylamide (Long-Action GnRH_u) ที่ย่อยสลายได้ทางชีวภาพอยู่ในรูปของ Prolong Release Microcapsulated ที่มี Biodegradable Copolymer คือ 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

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

75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม แล้วนำไปฉีดให้กับพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าตัวละ 100 ไมโครลิตร

วิธีการฉีดสารละลายฮอร์โมน

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



ภาพที่ 4 วิธีการฉีดฮอร์โมนเข้าสู่ตัวทดลอง

ความเข้มข้นและระยะเวลาในการฉีดซ้ำของฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง

ความเข้มข้นของฮอร์โมน GnRH α ชนิดออกฤทธิ์นานในรูปแบบไมโครสเฟียร์ 4 ระดับ คือ 0, 25, 75 และ 150 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และระยะเวลาในการฉีดซ้ำ 2 ระดับ คือ ทุก 2 เดือน และทุก 3 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3. ความเข้มข้นและระยะเวลาในการฉีดซ้ำของฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง

ระยะเวลาในการฉีดซ้ำ	ความเข้มข้นของฮอร์โมน($\mu\text{g}/\text{kg}$)	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

ใต้น้ำทะเลที่ผ่านการกรองแล้วลงในตู้อนุบาล 50 เปอร์เซ็นต์ ผสมร่วมกับน้ำทะเลจากตู้พ่อแม่พันธุ์ 50 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นการปรับคุณภาพน้ำและอุณหภูมิระหว่างตู้ฟักไข่ปลากับตู้พ่อแม่พันธุ์ ให้ใกล้เคียงกัน ปิดทั้ง 4 ด้านด้วยพลาสติกดำเพื่อช่วยพรางแสงให้แสงกระจายได้ทั่วตู้

2. การย้ายไข่ปลาการ์ตูนอานม้า

เมื่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าวางไข่แล้วจะปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า เฝ้าดูแลไข่จนมีอายุประมาณ 7 วัน หรือเมื่อสังเกตเห็นสีเงินแวววาวตรงบริเวณซึ่งเป็นตาของลูกปลาแต่ละตัว จึงทำการย้ายไข่ปลาออกจากตู้พ่อแม่พันธุ์ปลาไปยังตู้อนุบาล ทำการย้ายไข่ปลาในตอนเย็น โดยนำกล่องพลาสติกจุ่มลงในตู้พ่อแม่พันธุ์ ค่อย ๆ ยกวัสดุวางไข่ที่มีไข่ติดออกมาไว้ในกล่องพลาสติก แล้วยกกล่องพลาสติกขึ้นให้น้ำอยู่ในระดับที่ท่วมไข่ปลา นำวัสดุวางไข่ที่มีไข่ติดไปยังตู้อนุบาล ค่อย ๆ ตะแคงกล่องพลาสติกให้น้ำในตู้อนุบาลเข้าไปในกล่องพลาสติกจนอยู่ได้ระดับน้ำในตู้อนุบาล จึงยกวัสดุวางไข่ที่มีไข่ติดออกจากกล่องพลาสติกวางลงที่พื้นตู้อนุบาล ควรตั้งวัสดุวางไข่ที่มีไข่ติดให้อยู่ลักษณะเดียวกับที่ตั้งอยู่ในตู้พ่อแม่พันธุ์ ให้ปริมาณอากาศที่เหมาะสม เช่นเดียวกับพ่อแม่พันธุ์ปลาที่ทำการ โบกพัดด้วยครีบอก ลูกปลาจะฟักออกจากไข่ในเวลากลางคืน ประมาณ 19.00-20.00 น. ความหนาแน่นของลูกปลาการ์ตูนอานม้าที่ใช้ตู้อนุบาลประมาณ 10 ตัว ต่อ น้ำ 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 จนกระทั่งลูกปลาที่มีอายุประมาณ 7-14 วัน เริ่มให้อาร์ทีเมียวัยอ่อน

4. การอนุบาลลูกปลาการ์ตูนอานม้า

ในระยะ 2-3 วันแรก ใช้วิธีเติมน้ำในตู้อนุบาล 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 ลูกปลาการ์ตูนอานม้าวัยอ่อนส่วนใหญ่จะมีสีส้มและลักษณะเหมือนพ่อแม่ทุกประการและจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มบริเวณพื้นตู้

การบันทึกผลการทดลอง

1. การวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า

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

2. เปอร์เซ็นต์การฟักไข่

หลังจากพ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าดูแลไข่จนมีอายุประมาณ 7 วัน หรือเมื่อสังเกตเห็นสีเงินแวววาวบริเวณลูกตาของลูกปลาแต่ละตัว ทำการถ่ายภาพรังไข่ก่อนนำไข่ไปฟักด้วยกล้องถ่ายภาพจุลทรรศน์แล้วนำภาพที่ได้ไปนับจำนวนไข่ก่อนฟัก โดยใช้โปรแกรม Image Tool ในการช่วย

นับไข่ก่อนฟัก เมื่อไข่ฟักออกเป็นตัวทำการนับไข่ที่เสีย บันทึกผล อาจมีไข่บางส่วนที่ไม่ฟักในวันแรก 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 ไปทำการวิเคราะห์โดยใช้ โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติโปรแกรม SPSS 10.0 For Windows ในการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบแจกแจง 2 ทาง (2-Way Analysis Of Variance) แบบ Full Factorial Model III เพื่อทดสอบอิทธิพลของปัจจัย 2 ปัจจัย คือระดับความเข้มข้นของฮอร์โมน และระยะเวลาในการฉีดเข้า หาความแตกต่างของข้อมูลระหว่างชุดการทดลองด้วย ANOVA แล้วทดสอบความแตกต่างระหว่างชุดการทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์