การเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน

Breeding Enhancement of Red-tail Catfish, *Hemibagrus wyckioides* (Fang and Chaux, 1949) by Using Cyclodextrin Complex

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์

Wisanuporn Ratanatrivong

ศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์น้ำอุตรดิตถ์ 34 **หมู่** 10 **ต.วังแดง อ.ตรอน จ.อุตรถิตถ์** 53140

Uttaradit Fisheries Test and Research Center34 Moo 10 Tumbon.Wangdang AmphurTron Uttaradit 53140

บทคัดย่อ

การทดลองใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินผสมกับฮอร์โมนสังเคราะห์ (LHRH-CDs) ฉีดกระตุ้นให้แม่ปลากดแก้ววางไข่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะพันธุ์ ได้ดำเนินการศึกษาในเดือนกรกฎาคม 2550 ที่ศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์น้ำอุตรดิตถ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ โดยเปรียบเทียบผลการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้พ่อแม่พันธุ์จากการเพาะเลี้ยงที่ผ่านการคัดเลือกรุ่นที่ 1 มีอายุ 3 ปี และเริ่มเจริญพันธุ์ในปีแรก ระหว่างฮอร์โมน LHRH กับฮอร์โมน LHRH-CDs แบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง แต่ละชุดการทดลองมี 6 ซ้ำ ชุดการทดลองที่ 1 ใช้ฮอร์โมน LHRH ผสมในน้ำมันอะราคิส ในอัตราความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม และชุดการทดลองที่ 2 ใช้ฮอร์โมน LHRH-CDs ผสมในน้ำมันอะราคิสในอัตราความเข้มข้น 30 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ผลการทดลองพบว่า ฮอร์โมนทั้งสองชุดการทดลองสามารถกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่และผลิตลูกปลาวัยอ่อนได้ โดยมีระยะเวลาในการวางไข่และน้ำหนักไข่ของแม่ปลาไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) แต่อัตราการผสมและอัตราการฟักของไข่ปลาชุดที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน LHRH-CDs สูงกว่าฮอร์โมน LHRH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แม่ปลาที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน LHRH และฮอร์โมน LHRH-CDs วางไข่ในเวลา 12.1$\pm$0.09 ชั่วโมง และ 12.1$\pm$0.54 ชั่วโมง มีน้ำหนักไข่เฉลี่ย 136.3$\pm$27.74 กรัม และ 136.0$\pm$31.29 กรัม มีอัตราการผสม 52.7$\pm$16.46 เปอร์เซ็นต์ และ 84.0$\pm$9.70 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการฟัก 35.0$\pm$10.35 เปอร์เซ็นต์ และ 53.8$\pm$18.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

ไข่ปลากดแก้วมีรูปร่างกลมรี มีสีเหลืองใส มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.25 มิลลิเมตร เป็นไข่จมติดวัสดุและสามารถกำจัดสารเหนียวที่ห่อหุ้มเปลือกไข่ออกได้โดยใช้เอนไซม์โปรเนสย่อยสลาย และเลี้ยงในอาหารวุ้นที่เติม embryonic medium เริ่มมีการพัฒนาของคัพภะเข้าสู่ระยะคลีเวจหลังจากผสม 45 นาที และเริ่มฟักออกเป็นตัวในเวลา 30 – 38 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิน้ำ 28 องศาเซลเซียส ลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัวมีความยาวเฉลี่ย 5.0 มิลลิเมตร ถุงไข่แดงจะยุบหมดเมื่ออายุ 3 วัน เริ่มกินอาหารและเข้าสู่ลูกปลาวัยอ่อนระยะแรกเมื่ออายุ 4 – 8 วัน ลูกปลาวัยอ่อนระยะหลังเมื่ออายุ 9 – 12 วัน และมีพัฒนาการเหมือนตัวเต็มวัยเมื่ออายุ 30 วัน มีความยาวเฉลี่ย 42.0 มิลลิเมตร

คำสำคัญ ปลากดแก้ว, การเพาะพันธุ์, สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน

Abstract

Hormonal treatment combined with Cyclodextrins complex (CDs) to induced spawning and enhancement of breeding activity in captive selective female F1 generation Red-tail catfish *Hemibagrus wyckioides*, was studied during July 2007 at Uttaradit Fisheries Test and Research Center. Brood fishes were 3 years olds and become first maturity. Two treatments and 6 replications were used as followed, Treatment 1, injected with 30 μg/kg LHRH in arachis oils combines with 10 mg/kg domperidone and treatment 2 is injected with 30 μg/kg LHRH-CDs in arachis oil combines with domperidone 10 mg/kg. The results shown that, hormone injection can induced spawning of female fishes and produced more eggs and larvae and there are non significantly difference ($p>0.05$) in spawning times and eggs weight. The spawning time of LHRH and LHRH-CDs hormones were 12.1±0.09 and 12.1±0.54 hours and eggs weight were136.3±27.74 and 136.0±31.29 grams., respectively. LHRH-CDs hormone gave a higher fertilization and hatching rate than LHRH hormone ($p<0.05$). The percentage of fertilized eggs of LHRH and LHRH-CDs hormones were 52.7±16.46% and 84.0±9.70% and the hatching rate were 35.0±10.35% and 53.8±18.91%, respectively. *Hemibagrus wyckioides* eggs are yellowish, spherical in shape, adhesive and demersal with a sticky compounds on chorion surface and can be cleared a by using enzyme pronase to digest. At 28 degree Celsius, Cleavage started at 45 minutes and hatching occurred 30 – 38 hours after fertilization. The newly hatched larvae were about 5.0 millimeter in length. Yolk sac was completely absorbed after 3 days and become larval stage in 4-8 days and post larval stage in 9-12 days. The larva are fully developed in 30 days with an average length 42.0 millimeters

Key words: Red-tail catfish, *Hemibagrus wyckioides*, Breeding, Cyclodextrins

คำนำ

ปลากดแก้ว มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Hemibagrus wyckioides* (Fang and Chaux, 1949) มีชื่อสามัญเรียกว่า Red-tail Catfish และมีชื่อไทยเรียกหลายชื่อว่า ปลากดคัง เคิง กดหางแดง เป็นปลาน้ำจืดชนิดไม่มีเกล็ดขนาดใหญ่ที่สุดในสกุลปลากดที่มีอยู่ พบแพร่กระจายอยู่ในทวีปเอเชียบริเวณตอนกลางของคาบสมุทรอินโดจีน ได้แก่ กัมพูชา ลาว และไทย (Ng and Rainboth, 1999) สำหรับในประเทศไทย พบในแหล่งน้ำขนาดใหญ่ทั่วทุกภาค เช่น แม่น้ำโขง แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำน่าน แม่น้ำตาปี แม่น้ำแม่กลอง บึงบอระเพ็ด อ่างเก็บน้ำเขื่อนสิริกิติ์ จังหวัดอุตรดิตถ์ อ่างเก็บน้ำเขื่อนรัชชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี และอ่างเก็บน้ำเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี (คีรี และคณะ, 2546 ; วิศณุพร และคณะ, 2537 ; ทัศพล, 2537 ; ชวลิต และคณะ, 2543) มีความสำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่กรมประมงเล็งเห็นความสำคัญของการเพาะเลี้ยง หลังจากประสบความสำเร็จในด้านการเพาะขยายพันธุ์และศึกษาวิจัยอย่างต่อเนื่องในรูปแบบต่าง ๆ ทุกด้าน เช่น การเพาะพันธุ์ การอนุบาล การเลี้ยง ตลอดจนการศึกษาทางด้านพันธุกรรมสัตว์น้ำ (สุภัทรา และคณะ, 2544) ปัจจุบันวิศณุพร

และคณะ (2550) สามารถเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้พ่อแม่พันธุ์ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและผ่านการคัดพันธุ์รุ่นที่ 1 แล้ว และวางแผนการปรับปรุงพันธุ์ในรุ่นต่อ ๆ ไป เพื่อเป็นแนวทางในการวางแผนการพัฒนาปลากดแก้วเพื่อการเพาะเลี้ยงอย่างยั่งยืนต่อไป

ปลากดแก้วสามารถเพาะพันธุ์ได้โดยวิธีการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่ และปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์วางไข่โดยวิธีธรรมชาติ และวิธีการผสมเทียม (วิศณุพร และคณะ, 2537 ; สมบัติ และ เจริญ, 2547) แต่มีข้อจำกัดคือ การฉีดฮอร์โมนเพาะพันธุ์สัตว์น้ำนั้นมีผลให้ระดับฮอร์โมนคงอยู่ในกระแสเลือดในระดับสูงเพียงช่วงระยะเวลาสั้น ๆ เท่านั้น ดังนั้นการหาวิธีการที่ทำให้ฮอร์โมนเหล่านี้คงอยู่ในกระแสเลือดในระยะเวลายาวนานขึ้นนอกจากจะลดผลกระทบซึ่งเกิดจากการฉีดฮอร์โมนปริมาณมากเข้าสู่ตัวปลาจากการผสมเทียมโดยวิธีปกติ ยังอาจเป็นการยืดระยะเวลาการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำให้ยาวนานขึ้นได้ ย่อมก่อให้เกิดประโยชน์ในการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำที่เพาะพันธุ์ได้ยาก การศึกษาวิธีการให้ฮอร์โมนหรือยาถูกปลดปล่อยออกมาทีละน้อยโดยใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน (Cyclodextrins, CDs) ซึ่งมีโครงสร้างโมเลกุลซึ่งส่งผลให้เกิด sustained-release ได้อย่างดีในยาและสารเคมีหลายชนิด มีผลให้ยาหรือฮอร์โมนถูกปลดปล่อยออกจากสารประกอบเชิงซ้อนทีละน้อย ๆ ในระยะเวลายาวนาน (sustanied–release formulations) ทำให้ประสิทธิภาพของยาหรือสารเคมีมีผลต่อเป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพในระยะเวลายาวนาน ไซโคลเด็กซ์ตรินที่พบโดยทั่วไปมี 3 แบบ คือ α-CDs, β-CDs และ γ-CDs ซึ่งประกอบไปด้วยน้ำตาล D-glucopyranose 6, 7 และ 8 โมเลกุล ตามลำดับ ต่อกันเป็นอนุมูล โดยแต่ละอนุมูลเชื่อมต่อกันด้วยพันธะ α-1,4 glycosidic เป็นโมเลกุลรูปวงแหวนขนาดใหญ่ ไซโคลเด็กซ์ตรินซึ่งหมู่ไฮดรอกซิลถูกเติมด้วยหมู่เอธิล (ethylation) จะทำให้ความสามารถในการละลายลดลง ไซโคลเด็กซ์ตรินที่นิยมใช้ในทางเภสัชกรรมชนิดหนึ่งคือเฮปตาคิส (Heptakis– (2,6–di–O–ethyl)–β–cyclodextrins) เป็นไซโคลเด็กซ์ตรินที่มีคุณสมบัติ sustained–release เมื่อนำไปใช้ร่วมกับยาหลายชนิด (Sinha *et al.*, 2002) จากการทดลองใช้เฮปตาคิสเป็นโมเลกุลพาหะให้กับสารบูเซอเรลิน อะซีเตท (buserelin acetate) ซึ่งเป็นอนาล็อกของฮอร์โมนลูเทียไนซิ่งฮอร์โมน รีลีสซิ่ง ฮอร์โมน (LHRHa) และมีบทบาทในการกระตุ้นการตกไข่ในคนและสัตว์ พบว่าระดับของบูเซอเรลิน อะซีเตท ที่ถูกปลดปล่อยออกจากตัวกลางคือน้ำมัน arachis ขึ้นอยู่กับสารประกอบเชิงซ้อนเฮปตาคิสอย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อทดลองฉีดสารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวในหนูทดลองพบว่าสามารถคงระดับบูเซอเรลินอะซีเตทในกระแสเลือดไว้ได้นานอย่างน้อย 1 เดือน (Uekama *et al.*, 1989) อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานว่ามีการใช้ฮอร์โมนร่วมกับโมเลกุลพาหะในปลา การศึกษาการใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินร่วมกับฮอร์โมนสังเคราะห์ในการกระตุ้นการวางไข่และเร่งการตกไข่ของแม่ปลา จะเป็นการช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วได้ต่อไป หากประสบผลสำเร็จจะเป็นนวัตกรรมในการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำ และเป็นองค์ความรู้ที่สำคัญยิ่งในการประยุกต์ใช้ในสัตว์น้ำ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของการใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินร่วมกับฮอร์โมนสังเคราะห์ต่อการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว
2. เพื่อศึกษาพัฒนาการของคัพภและลูกปลากดแก้ววัยอ่อน

อุปกรณ์และวิธีการ

<u>อุปกรณ์</u>

1. สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน (Cyclodextrins, CDs) เฮปตาคิส (Heptakis–(2,6–di–O–ethyl)–β–cyclodextrins, Fluka®)
2. ฮอร์โมนสังเคราะห์ LHRH (des-Gly10, [D-Ala6] Luteinizing Hormone Releasing hormone Ethylamide) (Sigma) และยาเสริมฤทธิ์ domperidone (Motilium®) และอุปกรณ์ที่จำเป็นในการเพาะพันธุ์ปลาโดยการผสมเทียม
3. Enzyme Pronase (เอนไซม์โปรเนส สำหรับใช้ย่อยโปรตีน) ยี่ห้อ SIGMA® รหัส P0652 ~34g/ขวด)
4. น้ำยา Embryo medium 500 มิลลิลิตร
5. กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

<u>วิธีการ</u>

1. <u>การเตรียมการทดลอง</u>

1.1 การเตรียมพ่อแม่พันธุ์ปลากดแก้ว เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลากดแก้วที่ผ่านการคัดเลือกรุ่นที่ 1 มีอายุ 3 ปี ขนาดน้ำหนักเฉลี่ย 2-3 กิโลกรัม จำนวน 50 คู่ ในบ่อดินขนาด 600 ตารางเมตร ให้กินอาหารวันละ 2 ครั้ง โดยตอนเช้าให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปโปรตีน 30% และตอนเย็นให้อาหารผสม (ประกอบด้วยปลาทะเลสด ปลาป่น กากถั่วเหลือง รำละเอียด) โปรตีนไม่ต่ำกว่า 40% ในอัตรา 3% ของน้ำหนักตัวปลา/วัน ในระหว่างการเลี้ยงเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อเดือนละครั้ง ตรวจสอบความสมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์เป็นระยะเมื่อเข้าสู่ฤดูวางไข่ คัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่มีความสมบูรณ์เพศเพื่อนำมาทดลองฉีดฮอร์โมนตามแผนการทดลอง โดยสังเกตจากแม่พันธุ์มีส่วนท้องอูมและนิ่ม ช่องเพศมีลักษณะกลมนูนสีแดง ส่วนพ่อพันธุ์มีติ่งเพศเรียวยาว

1.2 การเตรียมฮอร์โมนและสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน เตรียม สารประกอบเชิงซ้อนฯ โดย ใช้ฮอร์โมน LHRH (des-Gly10, [D-Ala6] Luteinizing Hormone Releasing hormone Ethylamide) (Sigma) และสารไซโคลเด็กซ์ตริน คือ เฮปตาคิส (Heptakis–(2,6–di–O–ethyl)–β–cyclodextrins, Fluka®) ในอัตราส่วนฮอร์โมนฯ : เฮปตาคิส เป็น 1 : 100 (w/w) ด้วยวิธี kneading ตามวิธีการของ Tsuruoka *et al.* (1989) โดยผสม LHRH 1 มก. และ เฮปตาคิส 100 มก. และเติมน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร ใช้แท่งแก้วนวดเคล้าส่วนผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันที่อุณหภูมิห้องนาน 90 นาที ปล่อยให้ส่วนผสมแห้งในสภาพมีความดันอากาศที่อุณหภูมิห้องนาน 1 วัน ป่นส่วนผสมให้เป็นผงและกรองผ่านตะแกรงขนาด 100 mesh แล้วนำไปผสมกับน้ำมัน arachis ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้ความเข้มข้นฮอร์โมนฯ เป็น 250 μg/ml

2. <u>การเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว</u>

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ๆ ละ 6 ซ้ำ แบ่งปลากดแก้วพ่อแม่พันธุ์ที่เตรียมใน 1.1 ที่มีความพร้อมในการผสมเทียมออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ ละ 12 ตัว (เพศผู้และเมียกลุ่มละ 6 ตัว)

ชุดการทดลองที่ 1 ฮอร์โมน LHRH ผสมน้ำมัน arachis

ชุดการทดลองที่ 2 ฮอร์โมน LHRH-CDs ผสมน้ำมัน arachis

การฉีดฮอร์โมนให้กับพ่อแม่พันธุ์ปลา ฉีดฮอร์โมนเข้าบริเวณกล้ามเนื้อที่ตำแหน่งโคนครีบหลังครั้งเดียวในอัตราความเข้มข้นของฮอร์โมนสังเคราะห์ 30 μg/ปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ domperidone 10 มิลลิกรัม/กิโลกรัม แล้วแยกพักพ่อแม่พันธุ์ปลาในบ่อปูนขนาด 2x2 ตารางเมตร ตรวจสอบความพร้อมของแม่พันธุ์ที่พร้อมวางไข่จึงนำมารีดไข่และผสมเทียมโดยวิธีแห้ง

3. <u>การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล</u>

3.1 ศึกษาจำนวนแม่ปลาวางไข่ ความดกของไข่ และระยะเวลาวางไข่ เมื่อแม่ปลาวางไข่ บันทึกจำนวนแม่ปลาที่วางไข่ ระยะเวลาที่แม่ปลาแต่ละตัววางไข่ และนำไข่ปลาที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเป็นกรัม

3.2 ศึกษาอัตราการผสมและอัตราการฟัก สุ่มตัวอย่างไข่ของแม่ปลาแต่ละตัวโดยวิธีการตวงจำนวน 1,000 – 2,000 ฟอง นำไปโรยในแผงฟัก ศึกษาอัตราการผสมติดโดยนับจำนวนไข่ทั้งหมดพร้อมกับนับจำนวนไข่เสียและคัดไข่ที่เสียออกจากแผงฟัก เมื่อลูกปลาฟักออกเป็นตัวนับจำนวนลูกปลาทั้งหมดเพื่อศึกษาอัตราการฟัก คำนวณค่าอัตราการผสมติดและอัตราการฟัก โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการผสม (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนไข่ที่เจริญถึงขั้น Gastrula} \times 100}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}}$$

$$\text{อัตราการฟัก (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนลูกปลาที่นับได้} \times 100}{\text{จำนวนไข่ที่ผสม}}$$

นำข้อมูลระหว่างปลา 2 กลุ่ม มาทดสอบความแตกต่างทางสถิติของข้อมูลโดยวิธี One-way analysis of variance ตรวจสอบข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์โดยการทดสอบเอกภาพของความแปรปรวน (homogeneity of variance) ด้วยวิธี Levene test ทำการแปลงข้อมูลที่มีค่าสังเกตเป็นทศนิยมและเปอร์เซ็นต์ก่อนวิเคราะห์เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายเป็นแบบปกติ (normal distribution) ด้วยวิธี angular transformation (จรัญ, 2534) เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของชุดการทดลองในแต่ละชุดข้อมูลที่นำมาวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan's new multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

<u>4. การศึกษาพัฒนาการของไข่และลูกปลาวัยอ่อน</u>

เมื่อแม่ปลาวางไข่ คัดไข่ปลากดแก้วที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วที่มีลักษณะสมบูรณ์ จำนวน 200 ฟอง โดยนำไข่ใส่ลงในเพลทวุ้น 2% agar ไม่เกิน 25 ฟอง/เพลท เติมสารละลายเอนไซม์โปรเนส ให้ท่วมไข่ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 28.5 องศาเซลเซียส นาน 1 นาที ล้างเอนไซม์โปรเนสออกจากเพลทและไข่โดยดูดเอนไซม์ ฯ ทิ้ง เติม embryo medium ในปริมาตรเท่ากันค่อย ๆ ส่ายเพลทไปมาเบาๆ นาน ประมาณ 1 นาที แล้วจึงดูดทิ้ง ทำซ้ำในขั้นตอนนี้อีก 3-4 ครั้ง เปลือกไข่จะหลุดออกมาจากตัวอ่อนหลังจากล้างในครั้งนี้ บันทึกภาพการพัฒนาการของไข่จนฟักเป็นตัวอ่อน (ทำในกล้อง stereomicroscope และไข่ต้องแช่ใน embryo medium ตลอดเวลาในห้องปฏิบัติการ

สภาพปลอดเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิห้องที่ 28 องศาเซลเซียส ตลอดการศึกษา) และศึกษาการพัฒนาการของตัวอ่อนจนมีลักษณะเหมือนตัวเต็มวัย ตามรายงานของอภิชาติ (2546)

ผลการทดลอง

1. <u>การเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว</u>

ผลการทดลองเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยวิธีฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์กระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่ โดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ เปรียบเทียบกับฮอร์โมนสังเคราะห์ผสมสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน มีดังนี้

ผลการฉีดฮอร์โมนทั้งสองชุดการทดลองให้กับแม่ปลามีความยาวเฉลี่ย 53.5 $\pm$ 3.51 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 2.3 $\pm$ 0.24 กิโลกรัม พ่อปลามีความยาวเฉลี่ย 58.4 $\pm$ 2.82 เซนติเมตร น้ำหนักเฉลี่ย 2.2 $\pm$ 0.17 กิโลกรัม แสดงในตารางที่ 1 พบว่าแม่ปลาของทั้งสองชุดการทดลองวางไข่ทุกตัว มีระยะเวลาในการวางไข่เฉลี่ย 12.1$\pm$0.09 และ 12.1$\pm$0.54 ชั่วโมง, มีน้ำหนักไข่เฉลี่ย 136.3$\pm$27.74 และ 136.0$\pm$31.29 กรัม, มีอัตราการผสมมีค่าเท่ากับ 52.7$\pm$16.46 และ 84.0$\pm$9.70 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการฟักเท่ากับ 35.0$\pm$10.35 และ 53.8$\pm$18.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าจำนวนแม่ปลาวางไข่และระยะเวลาในการวางไข่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่อัตราการผสมและอัตราการฟักแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$)

ตารางที่ 1 แสดงผลการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์และฮอร์โมนสังเคราะห์ผสมสารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตริน

ชุดการทดลองที่	ตัวที่	ความยาว (เซนติเมตร)	น้ำหนัก (กิโลกรัม)	ระยะเวลาวางไข่ (ชั่วโมง)	น้ำหนักไข่ (กรัม)	อัตราผสม (%)	อัตราการฟัก (%)
	1	54.0	2.3	12.00	80.54	70.0	36.0
	2	54.0	2.3	12.00	150.09	62.0	28.0
1	3	53.0	2.2	12.10	150.48	68.0	24.0
LHRH	4	59.0	2.5	12.10	138.64	30.0	35.0
	5	48.0	1.8	12.15	145.50	47.0	54.0
	6	53.0	2.4	12.25	152.30	39.0	33.0
เฉลี่ย		53.5+3.51	2.3+0.24	12.1+0.09 [a]	136.3+27.74 [a]	52.7+16.46 [a]	35.0+10.35 [a]
	1	54.0	2.5	12.00	129.10	77.0	44.0
	2	53.0	2.4	12.05	127.53	93.0	70.0
2	3	53.0	2.0	12.15	176.98	92.0	36.0
LHRH+CDs	4	59.0	2.4	12.25	142.82	80.0	55.0
	5	46.0	2.0	13.00	155.33	92.0	82.0
	6	54.0	2.2	11.30	84.28	70.0	36.0
เฉลี่ย		53.2+4.17	2.3+0.22	12.1+0.54 [a]	136.0+31.29 [a]	84.0+9.70 [b]	53.8+18.91 [b]

หมายเหตุ อักษรกำกับค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. การพัฒนาการของไข่และลูกปลาวัยอ่อน

2.1 ลักษณะของไข่ปลากดแก้ว ไข่ของปลากดแก้วเป็นไข่จมติด มีสารเหนียวหนาห่อหุ้มโดยรอบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.25 มิลลิเมตร มีลักษณะกลม สีเหลืองใส (ภาพที่ 1) ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิกับตัวอสุจิ แล้วจะมีสีใส ส่วนไข่ที่ไม่ได้รับการผสมจะทึบแสงและมีสีขาวขุ่น

2.2 ระยะบลาสโตเดิร์มเริ่มสูงจากผิวไข่ เริ่มระยะแรกของคลีเวจ (cleavage) เกิดหลังการปฏิสนธิของไข่ 50 นาที ไซโกต (zygote) จะทำการแบ่งเซลล์ในแบบเมอโรบลาสติก (meroblastic cleavage) คือการแบ่งเซลล์เฉพาะส่วน animal pole ของไข่แบบ mitosis บลาสโตดิสก์ จะเป็นรูปคล้ายหมวกคลอบไข่แดง หนาทึบและนูนออกมามีลักษณะใสเป็นเซลล์เดียว (ภาพที่ 2)

2.3 ระยะ 2 เซลล์ เกิดในเวลา 1 ชั่วโมง มีการแบ่งเซลล์ในแนวดิ่งตั้งฉากกับผิวของไข่ แบ่งบลาสโตดิสก์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ (blastomere) 2 เซลล์ (ภาพที่ 3)

2.4 ระยะ 4 เซลล์ เกิดในเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่สองในแนวดิ่งตั้งฉากกับแนวที่ 1 แบ่งบลาสโตดิสก์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ 4 เซลล์ (ภาพที่ 4)

2.5 ระยะ 8 เซลล์ เกิดในเวลา 1 ชั่วโมง 30 นาที มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่สาม โดยแบ่งเซลล์ในแนวดิ่ง 2 แนว ตั้งฉากกับแนวที่ 2 และขนานกับแนวแรก แบ่งบลาสโตดิสก์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ 8 เซลล์ (ภาพที่ 5)

2.6 ระยะ 16 เซลล์ เกิดในเวลา 2 ชั่วโมง มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่สี่ในแนวดิ่ง 2 แนว ขนานกับแนวที่ 2 แบ่งบลาสโตดิสก์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ 16 เซลล์ (ภาพที่ 6)

2.7 ระยะ 32 เซลล์ เกิดในเวลา 2 ชั่วโมง 15 นาที มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่ห้า โดยการแบ่งเซลล์ในแนวดิ่ง 4 แนว ขนานกับแนวที่ 2 และแนวที่ 3 แบ่งบลาสโตดิสก์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ 32 เซลล์(ภาพที่ 7)

2.8 ระยะ 64 เซลล์ เกิดในเวลา 2 ชั่วโมง 25 นาที มีการแบ่งเซลล์ครั้งที่หกในแนวราบขนานกับผิวไข่ แบ่งบลาสโตดิสก์ออกเป็นเซลล์บลาสโตเมียร์ 64 เซลล์ (ภาพที่ 8)

2.9 ระยะมอรูลา (morula) เกิดในเวลา 2 ชั่วโมง 40 นาที มีการแบ่งเซลล์อีกครั้งในแนวราบได้เซลล์บลาสโตเมียร์ 128 เซลล์ (ภาพที่ 9) เห็นเซลล์บลาสโตเมียร์ซ้อนกันหนาและเบียดกันแน่นคล้ายหมวกคลอบไข่แดง เป็นระยะสุดท้ายของคลีเวจ มีจำนวนเซลล์มากที่สุดแต่เซลล์มีขนาดเล็กลง ทำให้ปริมาตรของเซลล์ไข่ที่แบ่งคงเดิม ระยะนี้เริ่มเกิดเนื้อเยื่อ 2 ชั้น เตรียมเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะบลาสทูลา (blastula) แต่ยังไม่มีช่องว่างบลาสโตซีล (blastocoel)

2.10 ระยะบลาสทูลา เกิดในเวลา 4 ชั่วโมง ระยะนี้บลาสโตดิสก์ มีเซลล์รวมกันอยู่เป็นกลุ่มหนานูนขึ้นลักษณะทรงค่อนข้างสูง (ภาพที่ 10) เซลล์บลาสโตเมียร์จะยึดเกาะกันแน่นขึ้นและเคลื่อนตัวขึ้นไปข้างบนกลายเป็นเยื่อบุบลาสโตเดิร์ม (epithelial blastoderm) ทำให้เกิดช่องว่างระหว่างกลุ่มเซลล์ข้างบนซึ่งจะเจริญเป็นคัพภะกับแผ่นเนื้อเยื่อไซโตพลาสซึมที่ล้อมรอบไข่แดงเรียกว่าชั้น periblast หรือ trophoblast ซึ่งจะทำหน้าที่ส่งอาหารจากไข่แดงไปให้แก่คัพภะทำให้เกิดช่องว่างบลาสโตซีล (ภาพที่ 11) ในระยะบลาสทูลาขั้นตอนสุดท้ายเยื่อบุบลาสโตเดิร์มบริเวณต่าง ๆ พร้อมที่เกิดการเปลี่ยนแปลงขั้นต่อไปกลายเป็นกลุ่มเซลล์ที่เป็น

รากฐานของอวัยวะต่าง ๆ เรียก presumptive organ forming area ประกอบด้วย เอ็นโดเดิร์ม (endoderm) ถัดขึ้นมาตามแนวกึ่งกลางของบลาสโตเดิร์มเป็นส่วนพรีคอดัลเพลท (prechordal plate) โนโตคอร์ด (notochord) นิวรัล เอ็กโตเดิร์ม (neural ectoderm) และ อีปิเดอมัล เอ็กโตเดิร์ม (epidermal ectoderm) ตามลำดับ ส่วนมีโซเดิร์ม (mesoderm) จะอยู่ด้านข้างทั้งสองด้านของส่วนต่าง ๆ ส่วนเพอริบลาสต์และไข่แดงจะเป็นส่วนที่เรียกว่า เอ็กซ์ทราเอมบริโอนิกเมมเบรน (extraembryonic membrane) (ภาพที่ 12)

2.11 ระยะแกสทรูลา ระยะแรก (early gastrula) เกิดในเวลา 7 ชั่วโมง ขอบของ บลาสโตดิสก์จะหนาขึ้นทำให้เกิดลักษณะคล้ายวงแหวนล้อมรอบโยล์คเรียกว่า germ ring (ภาพที่ 13) ส่วนของ germ ring บริเวณที่จะเป็นหางของคัพภะมีเซลล์มารวมกันหนาแน่นเป็นจุดกำเนิดของคัพภะเรียกว่า เอมบริโอนิกชิลล์ (embryonic shield) เมื่อเริ่มขบวนการแกสทรูเลชั่น (gastrulation) เอ็นโดเดิร์มจะเคลื่อนเข้าไปภายในบลาสโตซีลดันให้ช่องนี้มีขนาดเล็กลงโดยมีช่องแกสโตรซีล (gastrocoel) เกิดขึ้นมาแทนซึ่งต่อไปจะเจริญเป็นช่องทางเดินอาหาร ปากช่องเปิดเรียก บลาสโตพอร์ (blastopore)

2.12 ระยะแกสทรูลา ระยะหลัง (late gastrula) เกิดในเวลา 10 ชั่วโมง บลาสโตซีลจะหายไปหมดและบลาสโตพอร์จะค่อย ๆ ปิดลง ระยะนี้เซลล์ของบลาสโตเดิร์มจะเคลื่อนตัวแผ่ลงมาด้านล่างคลุมโยล์คลงมาเรื่อย ๆ เรียกอีปิโบลี (epiboly) เซลล์ในส่วนนิวรัล เอ็กโตเดิร์ม (neural ectoderm) ซึ่งไม่ได้ม้วนตัวเข้าด้านในจะเคลื่อนเข้าสู่แนวกึ่งกลางตามแกนของคัพภะเกิดสันยาวตั้งฉากกับ germ ring ซึ่งจะจมตัวลงในแนวโนโตคอร์ด ซึ่งอยู่ด้านล่างเป็นส่วนของนิวรัล เพลท (neural plate) ในที่สุดหลังจากม้วนตัวเข้าของเอ็นโดเดิร์มบริเวณพรีคอดัล เพลท และ เอ็กโตเดิร์ม เกิดการแบ่งชั้นอย่างชัดเจนโดย โนโตคอร์ด ลักษณะเป็นแท่งกลมบริเวณกึ่งกลาง มีโซเดิร์มอยู่ด้านข้าง ด้านล่างสุดคือชั้นเอ็นโดเดิร์ม และส่วนของไข่แดงจะถูกคลุมจนหมดเหลือบริเวณแคบ ๆ เรียก yolk plug (ภาพที่ 14)

2.13 ระยะเอ็มบริโอนิกชิล (embryonic shield) เกิดในเวลา 11 ชั่วโมง ส่วนของ embryonic disc ตอนกลางจะเจริญเร็วกว่าส่วนขอบ ทำให้ยกตัวสูงขึ้นเกิดเป็นเอมบริโอ ประกอบกับส่วนของท่อประสาทเจริญไปทางด้านยาวเร็วมาก ทำให้เอมบริโอยาวเป็นรูปทรงกระบอกติดอยู่กับเอ็กซ์ทราเอมบริโอนิก โยค (extraembryonic yolk) (ภาพที่ 15) ต่อมาทางด้านหน้าและด้านท้ายของเอมบริโอจะยกตัวขึ้นเกิดเป็นปุ่มหัวและปุ่มหาง (head bud and tail bud) ซึ่งจะเจริญเติบโตเป็นส่วนหัวและหางของตัวอ่อน (ภาพที่ 16)

2.14 ระยะลำตัวเริ่มเกิดปล้อง (somite) เกิดในเวลา 13 ชั่วโมง เกิดจากเนื้อเยื่อมีโซเดิร์มบริเวณด้านข้างของตัวอ่อน (lateral body fold) และจะเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ เริ่มจากหัวไปยังหางอยู่ 2 ข้างของท่อประสาทซึ่งต่อไปจะเจริญไปเป็นกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 17)

2.15 ระยะเริ่มเกิดโอลแฟคทอรี เพลท (olfactory plate) เกิดในเวลา 17 ชั่วโมง บริเวณทางด้านหน้าของท่อประสาทจะแผ่ขยายออกไปเป็นส่วนของสมอง และผนังของสมองบริเวณ cephalic region เจริญออกไม่เท่ากัน ซึ่งจะเกิดส่วนคอด (constriction) ขึ้น 2 แนว แบ่งสมองออกเป็น 3 ส่วน คือ สมองส่วนหน้า (fore brain) เป็นส่วนแคบอยู่ปลายด้านหน้า สมองส่วนกลาง (mid brain) มีลักษณะกว้าง และสมองส่วนหลัง

(hind brain) สั้นกว่าสมองส่วนอื่นๆ สมองส่วนหน้าจะเจริญยื่นออกไปทางด้านข้างจนถึงชั้นเยื่อบุผิวด้านนอกเกิดเป็น optic vesicle ต่อไปจะเจริญเป็นลูกตา (ภาพที่ 18)

2.16 ระยะเริ่มเกิดออดิทอรี เวสสิเคิล (auditory vesicle) เกิดในเวลา 19 ชั่วโมง เกิดส่วนที่เป็นหูโดยเซลล์ที่ผิวด้านในของเยื่อบุผิวชั้นนอก บริเวณสมองส่วนที่เจริญขึ้นมามีช่องกลวงเกิดขึ้นภายใน ตัวอ่อนเริ่มเคลื่อนไหวหางยืดยาวมากขึ้นมองเห็น neural cord (ภาพที่ 19)

2.17 ระยะเริ่มเกิดคอดัล เวสสิเคิล (caudal vesicle) เกิดในเวลา 20 ชั่วโมง ปุ่มหางของตัวอ่อนจะโผล่ออกมาจากไข่แดง มีเยื่อหุ้มหาง (fin fold) เห็นชัดเจน เริ่มเกิดเลนส์ตาโดยส่วนโคนของ optic vesicle ส่วนที่ต่อกับสมองส่วนหน้าจะคอดเข้าเกิดเป็นก้านตา (optic stalk) ซึ่งต่อไปจะเจริญไปเป็นประสาทเลี้ยงตา (optic nerve) ในขณะเดียวกันผนังด้านนอกของ optic vesicle จะบางลงและบุ๋มเข้าไปข้างในเกิดเป็น optic cup เนื้อเยื่อชั้นนอกสุดตรงบริเวณ optic vesicle จะแบ่งตัวอย่างรวดเร็วและหนาขึ้นเป็น lens placode และบุ๋มเข้ามาเป็น lens rudiments แล้วหลุดจากเอ็กโตเดิร์มกลายเป็นเลนส์อยู่ในส่วนของ optic cup (ภาพที่ 20)

2.18 ระยะกล้ามเนื้อเริ่มทำงาน เกิดในเวลา 24 ชั่วโมง กล้ามเนื้อเริ่มมีการหดตัวและคลายตัว (ภาพที่ 21)

2.19 ระยะหัวใจเริ่มทำงาน เกิดในเวลา 25 ชั่วโมง หัวใจเริ่มมีการเต้นเร็วขึ้น เริ่มมีการไหลเวียนของโลหิตจากหัวใจไปยังส่วนล่างของโยล์ค เริ่มมีอวัยวะขับถ่ายเกิดขึ้น ตัวอ่อนเจริญเติบโตมากขึ้นโดยส่วนหัวและลำตัวค่อย ๆ เหยียดตรงออกมา ส่วนหางขยายกว้างและเหยียดยาวเลยจากโยล์คออกไป (ภาพที่ 22)

2.20 ระยะเกิดปุ่มหนวด เกิดในเวลา 26 ชั่วโมง เกิดปุ่มหนวด (barbel bud) 2 ปุ่ม ที่ริมฝีปากบน (maxillary barbels) (ภาพที่ 23) เวลา 27 ชั่วโมง 30 นาที ตัวอ่อนเจริญเติบโตมากขึ้น ส่วนหางยืดยาวและมีการเคลื่อนไหวโดยสะบัดไปมาเร็วและแรงขึ้น (ภาพที่ 24)

2.21 ระยะออกจากไข่ (hatched out) เกิดในเวลา 30 ชั่วโมง ลูกปลาฟักเป็นตัวออกจากไข่โดยสะบัดหางเร็วและแรงจนผนังไข่แตกออก ตัวอ่อนจะดิ้นหลุดออกมาโดยเอาส่วนหางออกมาก่อนแล้วลำตัวและส่วนหัวจึงหลุดจากเปลือกไข่ มีขนาดความยาวลำตัวอยู่ระหว่าง 5.0-6.0 มิลลิเมตร ถุงไข่แดงมีลักษณะกลมเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 2.04 มิลลิเมตร และจะใช้เวลาในการฟักออกเป็นตัวจนหมดประมาณ 38 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 25)

2.22 ลูกปลาวัยอ่อนระยะ Prolarva stage เป็นการพัฒนาของลูกปลากดแก้ววัยอ่อนระยะแรกที่ยังมีถุงอาหารสำรองปรากฏอยู่

ลูกปลาอายุ 12 ชั่วโมง มีลำตัวใสเห็นอวัยวะภายในชัดเจน มีหนวดที่ขากรรไกรบนยืดยาว บริเวณปากและตายังไม่มีเม็ดสีเกิดขึ้น และปากเริ่มแบ่งออกเป็นริมฝีปากบน (upper lip) และริมฝีปากล่าง (lower lip) แต่ยังปิดอยู่ การเจริญพัฒนาของครีบในแนวตั้งจะเป็นรูปของเยื่อหุ้มตัวในแนวตั้ง (fin fold) จะต่อกันหมดทั้งตัวทั้งด้านบน ด้านล่าง และส่วนหาง โนโตคอร์ด (notochord) เป็นแท่งยาวตลอดลำตัว ลักษณะตรงปลายโค้งขึ้นเล็กน้อย ตามลำตัวเห็นกล้ามเนื้อเป็นบั้งๆ (segment) ชัดเจน ท่อทางเดินอาหารเป็นท่อตรงสั้นและมีช่องเปิดบริเวณท้ายลำตัว ส่วนของลูกตาอยู่ระหว่างการพัฒนา (ภาพที่ 26)

ลูกปลาอายุ 1 วัน ลำตัวความยาวเฉลี่ย 8.0 มิลลิเมตร ถุงไข่แดงยุบลงมาก ลำตัวมีลักษณะกว้างขึ้น ส่วนของเยื่อหุ้มตัวเริ่มมีการคอดเว้าตอนปลายแยกออกเป็นส่วนของครีบต่าง ๆ เริ่มแบ่งส่วนของปากชัดเจน มองเห็นหนวด 2 คู่ คือ หนวดที่ริมฝีปากบนและล่าง (mandibular barbel) และปุ่มหนวดใต้คาง (chin barbel)

ลูกปลาอายุ 2 วัน ลำตัวความยาวเฉลี่ย 9.0 มิลลิเมตร ถุงไข่แดงยุบลงมาก มีลักษณะเป็นรูปรีครีบหาง (caudal fin fold) เริ่มสร้างส่วนต่าง ๆ ของครีบ ปากเปิด ตาดำ มีจุดสี (pigment) สีดำกระจายอยู่บริเวณหัวและลำตัว โดยลำตัวจะมีการแบ่งออกเป็นส่วนหัวและลำตัวชัดเจนมองเห็นหนวด 3 คู่ (ภาพที่ 28)

ลูกปลาอายุ 3 วัน ลำตัวความยาวเฉลี่ย 10.0 มิลลิเมตร ถุงไข่แดงยุบเกือบหมด ปากกว้างมากขึ้น เริ่มกินอาหารได้ ครีบหางมีก้านครีบ 2-4 ก้าน มีจุดสีดำกระจายอยู่บนส่วนหัวและลำตัวมากขึ้น และมองเห็นปุ่มหนวดคู่ที่ 4 (nasal barbels) บริเวณส่วนหัว (ภาพที่ 29)

2.23 ลูกปลาวัยอ่อนระยะ larval stage เป็นการพัฒนาของลูกปลากดแก้ววัยอ่อนระยะแรก หลังจากที่ถุงอาหารสำรองได้ยุบหมดแล้ว ปากเปิดและใช้งานได้ดี

ลูกปลาอายุ 4 วัน ลำตัวความยาวเฉลี่ย 11.05 มิลลิเมตร ส่วนของถุงไข่แดงยุบหมด ปากเปิดเริ่มกินอาหารได้ดี ครีบก้นเริ่มแยกจากครีบหางและมีก้านครีบ 6-8 ก้าน มองเห็นหนวด 4 คู่ชัดเจน (ภาพที่ 30)

ลูกปลาอายุ 5 วัน ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 12.00 มิลลิเมตร ครีบหูเจริญดี มีก้านครีบอ่อนเกิดขึ้น 4-6 ก้าน ครีบก้นแยกจากครีบหางเด็ดขาด ส่วนหัวและลำตัวมีจุดสีดำกระจายอยู่หนามากขึ้น(ภาพที่ 31)

ลูกปลาอายุ 6 วัน ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 13.00 มิลลิเมตร ครีบหูเจริญมากขึ้น มีก้านครีบ 6-8 ก้าน ครีบหลังมีก้านครีบ 8 ก้าน กระดูกปลายหาง urostyle โค้งงอขึ้น ครีบหางมีก้านครีบ 16-18 ก้าน แบ่งออกเป็นข้อชัดเจน (ภาพที่ 32)

2.24 ลูกปลาวัยอ่อนระยะ (post larval stage) เป็นการพัฒนาของลูกปลากดแก้ววัยอ่อนระยะ หลังจากที่กระดูกปลายหาง urostyle โค้งงอขึ้น

ลูกปลาอายุ 7 วัน ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 16.50 มิลลิเมตร ตัวปลามีจุดสีดำกระจายอยู่ทั่วลำตัว เริ่มมองไม่เห็นส่วนของกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 33)

ลูกปลาอายุ 8 วัน ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 16.50 มิลลิเมตร ตัวปลามีจุดสีดำกระจายอยู่ทั่วลำตัว เริ่มมองไม่เห็นส่วนของกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 34)

ลูกปลาอายุ 9 วัน ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 1.80 เซนติเมตร ตัวปลามีจุดสีดำกระจายอยู่ทั่วลำตัว เริ่มมองไม่เห็นส่วนของกล้ามเนื้อ (ภาพที่ 35)

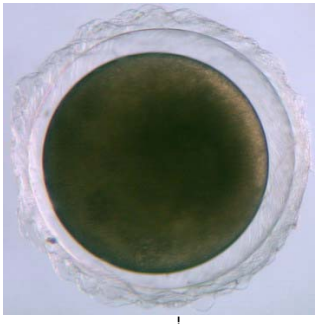
ลูกปลาอายุ 12 วัน ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 2.3 เซนติเมตร มองเห็นลูกปลาเป็นสีดำตลอดทั้งตัว มีลักษณะคล้ายตัวเต็มวัย (ภาพที่ 36)

2.25 ลูกปลาระยะ (juvenile phase) เป็นระยะลูกปลาขนาดเล็ก ที่ผ่านการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมาแล้ว ไม่มีลักษณะของลูกปลาวัยอ่อนเหลืออยู่ มีรูปร่างเหมือนกับลูกปลาที่โตเต็มวัยทุกประการ แต่มีขนาดเล็กกว่า และระบบสืบพันธุ์ยังไม่สมบูรณ์

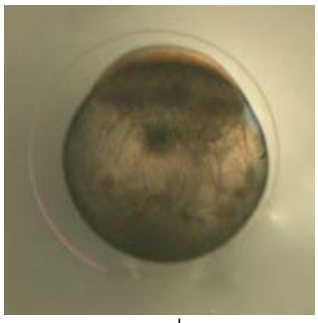
ลูกปลาอายุ 30 วัน ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 4.2 เซนติเมตร (ภาพที่ 37)

ลูกปลาอายุ 40 วัน ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 5.3 เซนติเมตร (ภาพที่ 38)

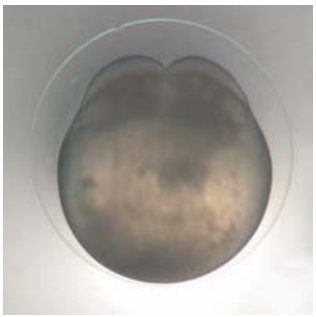
ลูกปลาอายุ 60 วัน ลำตัวมีความยาวเฉลี่ย 7.0 เซนติเมตร (ภาพที่ 39)



ภาพที่ 1

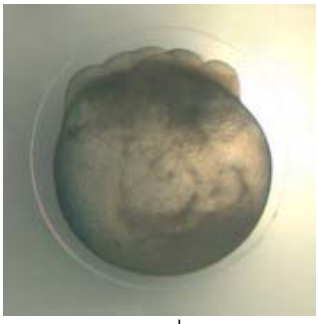


ภาพที่ 2

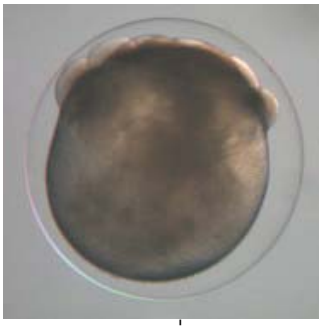


ภาพที่ 3

ภาพที่ 4

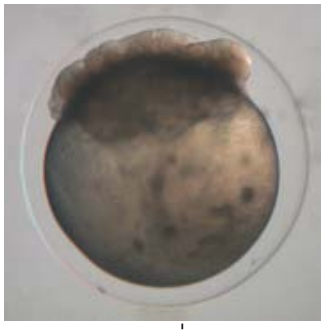


ภาพที่ 5



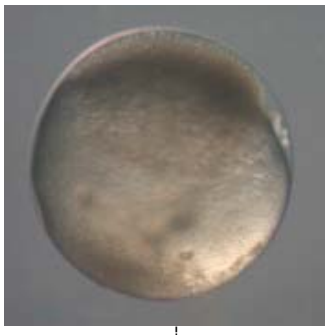
ภาพที่ 6

ภาพที่ 7

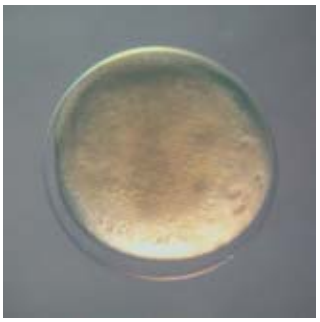


ภาพที่ 8

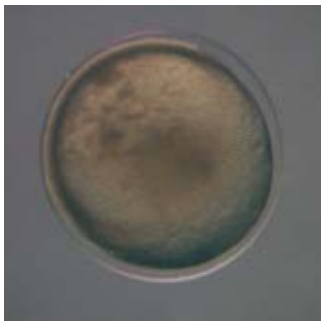
ภาพที่ 9



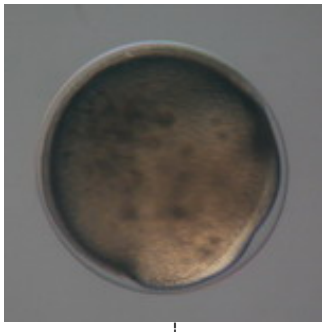
ภาพที่ 10



ภาพที่ 11



ภาพที่ 12


ภาพที่ 13

ภาพที่ 14

ภาพที่ 15

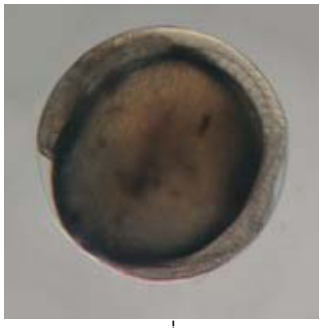
ภาพที่ 16

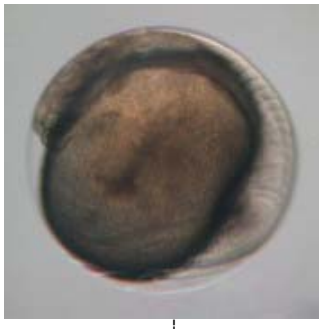
ภาพที่ 17

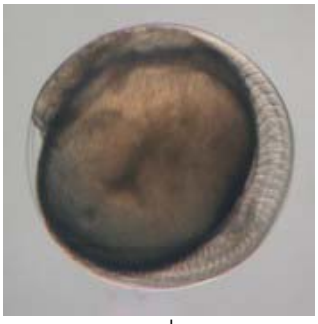
ภาพที่ 18

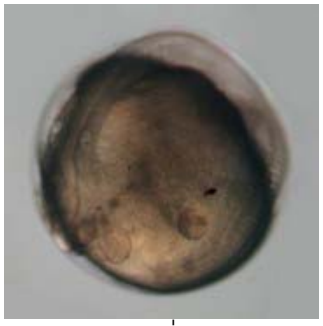
ภาพที่ 19

ภาพที่ 20


ภาพที่ 21

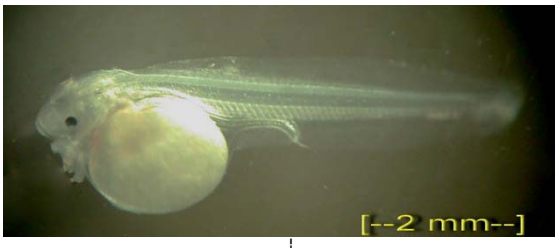

ภาพที่ 22


ภาพที่ 23


ภาพที่ 24

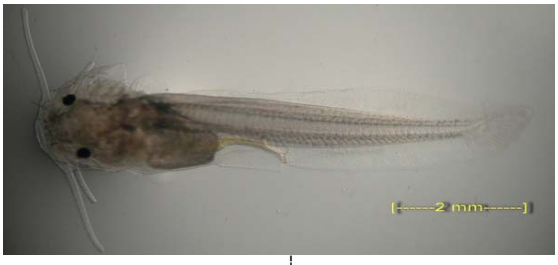
ภาพที่ 25

ภาพที่ 26

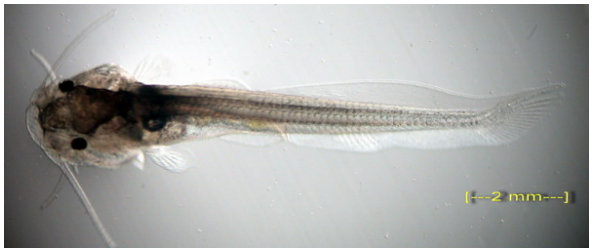


ภาพที่ 27

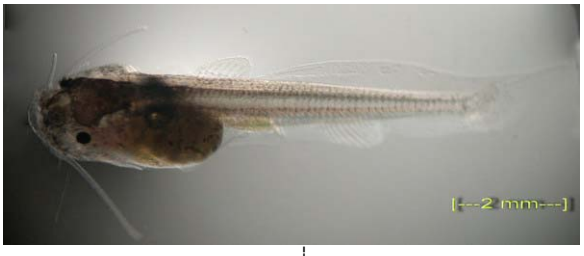
ภาพที่ 28



ภาพที่ 29



ภาพที่ 30

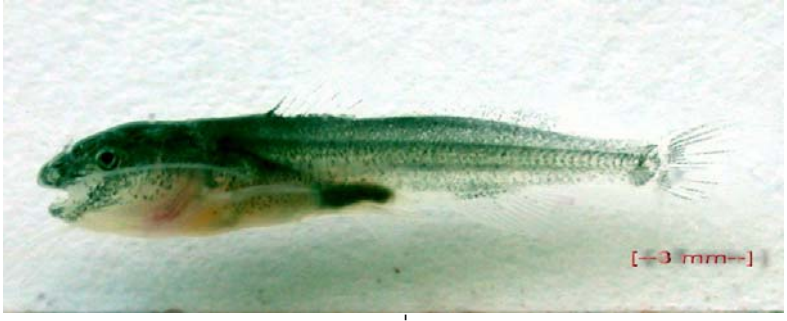


ภาพที่ 31

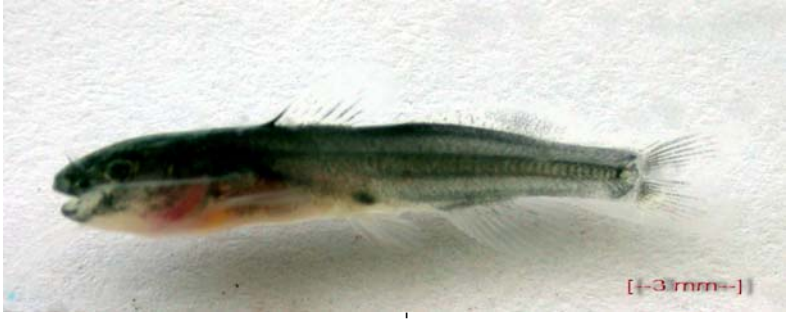
ภาพที่ 32

ภาพที่ 33

ภาพที่ 34



ภาพที่ 35



ภาพที่ 36

ภาพที่ 37

ภาพที่ 38

ภาพที่ 39

สรุปและวิจารณ์ผล

การทดลองใช้สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินผสมกับฮอร์โมนสังเคราะห์ฉีดกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว โดยใช้พ่อแม่พันธุ์จากการเพาะเลี้ยงที่ผ่านการคัดพันธุ์รุ่นที่ 1 มีอายุ 3 ปี และเริ่มเจริญพันธุ์ในปีแรก เปรียบเทียบผลการเพาะพันธุ์ระหว่างฮอร์โมน LHRH กับฮอร์โมน LHRH-CDs พบว่า ฮอร์โมนทั้งสองชุดการทดลองสามารถกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่และผลิตลูกปลาวัยอ่อนได้ โดยมีระยะเวลาในการวางไข่และน้ำหนักไข่ของแม่ปลาไม่แตกต่างกัน ($p>0.05$) อัตราการผสมติดและอัตราการฟักของไข่ปลาชุดที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน LHRH-CDs สูงกว่าฮอร์โมน LHRH อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) แม่ปลากดแก้วที่ฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน LHRH และฮอร์โมน LHRH-CDs วางไข่ในเวลา 12.1$\pm$0.09 ชั่วโมง และ 12.1$\pm$0.54 ชั่วโมง มีน้ำหนักไข่เฉลี่ย 136.3$\pm$27.74 กรัม และ 136.0$\pm$31.29 กรัม มีอัตราการผสมติดเฉลี่ย 52.7$\pm$16.46 เปอร์เซ็นต์ และ 84.0$\pm$9.70 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการฟักไข่ 35.0$\pm$10.35 เปอร์เซ็นต์ และ 53.8$\pm$18.91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าสูงกว่ารายงานของวิศณุพร และคณะ (2550) ที่เพาะพันธุ์ปลากดแก้วจากการเพาะเลี้ยงที่ผ่านการคัดพันธุ์รุ่นที่ 1 เช่นเดียวกันโดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์ buserelin acetate ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ domperidone โดยแม่ปลาชุดควบคุมและชุดคัดเลือกวางไข่ในระยะเวลา 12 – 13 ชั่วโมง มีน้ำหนักไข่เฉลี่ย 100.6 $\pm$ 42.97 กรัม และ 94.1 $\pm$ 46.46 กรัม มีอัตราการผสม 55.9 $\pm$ 23.78 เปอร์เซ็นต์ และ 54.4 $\pm$ 16.31 เปอร์เซ็นต์ และมีอัตราการฟัก 27.8 $\pm$ 18.67 เปอร์เซ็นต์ และ 30.0 $\pm$ 15.23 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าชนิดของฮอร์โมนสังเคราะห์ที่ใช้ในการเพาะพันธุ์มีผลให้ประสิทธิภาพของการเพาะพันธุ์ปลากดแก้วแตกต่างกัน โดยฮอร์โมน LHRH มีประสิทธิภาพในการเพาะพันธุ์ดีกว่าฮอร์โมนสังเคราะห์ buserelin acetate และฮอร์โมน LHRH-CDs มีประสิทธิภาพในการเพาะพันธุ์สูงกว่าฮอร์โมน LHRH และ buserelin acetate สารประกอบเชิงซ้อนไซโคลเด็กซ์ตรินจึงสามารถทำหน้าที่เป็นโมเลกุลพาหะให้กับฮอร์โมน LHRH มีผลให้ฮอร์โมนถูกปลดปล่อยออกจากสารประกอบเชิงซ้อนทีละน้อย ๆ มีประสิทธิภาพในการช่วยออกฤทธิ์ของฮอร์โมน LHRH ให้เนิ่นนาน ทำให้กระตุ้นการสังเคราะห์ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมองและหลั่งออกมาอย่างต่อเนื่องและคงอยู่ในกระแสเลือดในระยะเวลายาวนานขึ้น ทำให้การควบคุมการเจริญขั้นสุดท้ายของไข่และการตกไข่ของโกนาโดโทรปินทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น ส่วนการฉีดฮอร์โมน LHRH และ buserelin acetate ให้ค่าอัตราการผสมและอัตราการฟักต่ำกว่านั้น อุทัยรัตน์ (2538) อธิบายว่าการฉีดฮอร์โมนในอัตราสูงเกินไป (overdose) จะมีผลให้รังไข่ถูกเร่งมากเกินไป ทำให้คุณภาพของไข่ที่ได้เลวลง เนื่องจากไข่อาจหลุดจากฟอลลิเคิลโดยที่ยังเจริญขั้นสุดท้ายไม่สมบูรณ์ อย่างไรก็ตามผลการทดลองในครั้งนี้ แสดงค่าอัตราการผสมและอัตราการฟักที่ต่ำกว่ารายงานของวิศณุพร และคณะ (2537), สมบัติ และเจริญ (2547) เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ปลาที่ใช้มีความแตกต่างกันที่อายุและขนาดของพ่อแม่พันธุ์ พ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้เป็นพ่อแม่พันธุ์จากการเพาะเลี้ยงที่มีอายุแรกเริ่มเจริญพันธุ์ในปีแรก การพัฒนาของรังไข่และอัณฑะอาจจะยังไม่สมบูรณ์โดยอุทัยรัตน์ (2538) อธิบายว่าการตอบสนองต่อ LHRH และ LHRHa เปลี่ยนแปลงไปตามระยะการเจริญของรังไข่และอัณฑะโดยปลาที่มีไข่และน้ำเชื้อเจริญเต็มที่ตอบสนองต่อฮอร์โมนนี้ได้ดีกว่า

การศึกษาพัฒนาการของไข่ โดยใช้เอนไซม์โปรเนสย่อยสลายสารเหนียวที่ห่อหุ้มหนาบริเวณเปลือกไข่ออกและเลี้ยงไข่และตัวอ่อนในเพลทวุ้น 2% agar และเติม embryonic medium พบว่าไข่ปลากดแก้วมีรูปร่างกลมรี มีสีเหลืองใส เป็นไข่จมติดวัสดุ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2.25 มิลลิเมตร มีสารเหนียวห่อหุ้มหนาและไข่จะเริ่มพัฒนาเข้าสู่ระยะคลีเวจหลังจากผสม 45 นาที และเริ่มฟักออกเป็นตัวในเวลา 30 – 38 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิน้ำ 28 องศาเซลเซียส ลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัวมีความยาวเฉลี่ย 5.0 มิลลิเมตร ถุงไข่แดงจะยุบหมดเมื่ออายุ 3 วัน เริ่มกินอาหารและเข้าสู่ลูกปลาวัยอ่อนระยะแรกเมื่ออายุ 4 – 8 วัน ลูกปลาวัยอ่อนระยะหลังเมื่ออายุ 9 – 12 วัน และมีพัฒนาการเหมือนตัวเต็มวัยเมื่ออายุ 30 วัน มีความยาวเฉลี่ย 42.0 มิลลิเมตร ซึ่งมีระยะการพัฒนาของไข่และลูกปลาวัยอ่อนใกล้เคียงกับที่รายงานโดยวิศณุพร และคณะ (2537) ที่มีระยะฟักออกเป็นตัว 30-32 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิน้ำ 27-29 องศาเซลเซียส ลูกปลากดแก้วฟักออกเป็นตัวมีขนาดความยาว 4.97-6.00 มิลลิเมตร อายุ 3 วัน ถุงอาหารยุบและกินไรแดงขนาดเล็กเป็นอาหาร อายุ 4 วัน มีหนวดครบ 4 คู่ และมีลักษณะคล้ายตัวเต็มวัยเมื่ออายุ 10 วัน

เอกสารอ้างอิง

คีรี กออนันตกุล, ชวลิต วิทยานนท์, อภิชาต เติมวิชชากร, ชัยศิริ ศิริกุล และ นิพนธ์ จันทร์ประทัด. 2546. พรรณปลาในบึงบอระเพ็ด (ลุ่มน้ำเจ้าพระยา). เอกสารเผยแพร่. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

จรัญ จันทลักขณา. 2534. สถิติวิธีวิเคราะห์และวางแผนงานวิจัย. โรงพิมพ์ไทยวัฒนาพานิช. กรุงเทพฯ.

ชวลิต วิทยานนท์, อภิชาต เติมวิชชากร และ ชัยศิริ ศิริกุล. 2543. ความหลากชนิดของปลาในบึงบอระเพ็ด(ลุ่มน้ำเจ้าพระยา), น. 6-66. *ใน* คีรี กออนันตกุล, ชวลิต วิทยานนท์, อภิชาต เติมวิชชากร และ ชัยศิริ ศิริกุล (คณะผู้จัดทำ) พรรณปลาในบึงบอระเพ็ด (ลุ่มน้ำเจ้าพระยา). กองประมงน้ำจืด และ สถาบันพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

ทัศพล กระจ่างดารา. 2537. อนุกรมวิธานและชีวประวัติบางประการของปลาอ่างเก็บน้ำเขื่อนรัชชประภา จังหวัดสุราษฎร์ธานี. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์, ยงยุทธ ทักษิญ และ สุภาพ แก้วละเอียด. 2537. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้ว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 27/2537. กองประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์, สุภัทรา อุไรวรรณ์, พลชาติ ผิวเณร, ทองอยู่ อุดเลิศ, โสภิต แก้วชนะ และ รุ่งนภา หนูกล่ำ. 2550. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้วที่ผ่านการคัดเลือกรุ่นที่ 1. รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยการตอบสนองด้านการเจริญเติบโตและการรอดตายของปลากดแก้วที่ผ่านการคัดเลือก. ศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์น้ำอุตรดิตถ์ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพ ฯ.

สุภัทรา อุไรวรรณ์, วิศณุพร รัตนตรัยวงศ์ และ สุรางค์ สุมโนจิตราภรณ์. 2544. การถ่ายทอดทางพันธุกรรมของลักษณะที่สำคัญทางเศรษฐกิจของปลากดแก้ว. เอกสารวิชาการฉบับที่ 3/2544. สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.

สมบัติ สิงห์สี และ เจริญ อุดมการณ์. 2547. การเพาะพันธุ์ปลากดแก้วโดยวิธีฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์เร่งให้วางไข่ตามธรรมชาติ. เอกสารวิชาการฉบับที่ 19/2547. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง กรุงเทพฯ.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2538. การเพาะขยายพันธุ์ปลา. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อภิชาติ เติมวิชชากร. 2546. ลูกปลาน้ำจืดวัยอ่อน. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรประมงน้ำจืด สำนักวิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืด กรมประมง, กรุงเทพฯ.

Chaux, J. and P.-W. Fang. 1949. Catalogue des Siluroidei d' Indochine de la collection du Laboratoire des Peches Coloniales au Museum, avec la description de six especes nouvelles (suite et fin). Bull. Mus. Natn. Hist. Natl. (Ser 2) 194-201.

Ng, H. H. and W. J. Rainboth. 1999. The bagrid catfish genus Hemibagrus (Teleostei : Siluriformes) in central Indochina with a new species from the Mekong River. Raffles Bull. Zod 47(2): 555-576.

Sinha, V.R., A. Nanda and R. Kumria. 2002. Cyclodextrins as sustained–release carriers. Available Source: http://www.pharmtech.com/pharmtech/data/articlestandard/pharmtech/432002/36186/article.pdf., November 21, 2006.

Tsuruoka, M., T. Hashimoto, H. Seo, S. Ichimasa, O. Fujinaga, Uekama, K., H. Arima, T. Irie, K. Matsubara and T. Kuriki. 1989. Sustained release of buserelin acetate, a luteinizing hormone-releasing hormone agonist, from an injectable oily preparation utilizing ethylated β–cyclodextrin. J. Pharm. Pharmacol. 41: 874-87.

Uekama, K., Y Tahara, T. Ijitsu and T. Yamada. 1989. Sustained Release Drug Preparation. Nisshin Flour Miling Co.,Ltd., Tokyo, Japan.