บทที่ 5
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 สามารถกระตุ้นให้

ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ได้ แต่จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลอง ทำให้ปลาการ์ตูนอานม้ามีการผสมพันธุ์วางไข่ครั้งแรกได้เร็วขึ้นภายในระยะเวลา 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 มีการวางไข่อย่างต่อเนื่องเปรียบเทียบกับชุดควบคุมไม่มีการวางไข่ภายในระยะเวลา 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) รายงานว่า คุณภาพของไข่ที่ได้จากแม่ปลา 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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

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

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University