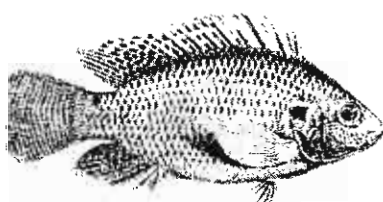




รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสถานภาพการแปลงเพศลูกปลานิล เพื่อลดต้นทุนการผลิต

Study on Status of Nile Tilapia Sex Reversal to Reduce Cost



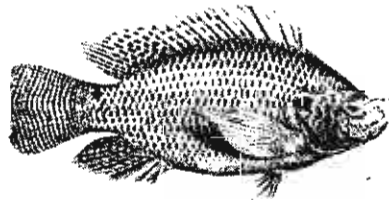
เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว

30 มิถุนายน 2546

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาสถานภาพการแปลงเพศลูกปลานิล เพื่อลดต้นทุนการผลิต

Study on Status of Nile Tilapia Sex Reversal to Reduce Cost



เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดี่ยว

ภาควิชาประมง

คณะเกษตรศาสตร์

มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

ชุดโครงการยุทธศาสตร์หมักรวมสัตว์น้ำ

สารบัญ	หน้า
Exclusive summary	1
บทคัดย่อ	4
บทนำ	5
วัตถุประสงค์	13
ระเบียบวิธีวิจัย	13
ผลการทดลองและวิจารณ์	13
การทดลองที่ 1 การศึกษาอายุปลานิลที่เหมาะสมในการแปลงเพศโดยวิธีแช่	13
การทดลองที่ 2 ระยะเวลาและความเข้มข้นของ MT ที่เหมาะสมกับการแช่แปลงเพศ	16
การทดลองที่ 3 ประสิทธิภาพการแปลงเพศโดยการแช่ที่ความหนาแน่นสูง	21
การทดลองที่ 4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ประกอบการแช่	23
การทดลองที่ 5 การทดลองภาคสนาม	26
การทดลองที่ 6 ปัญหาความเข้มข้นของสารละลาย MT	30
สรุป	31
ข้อเสนอแนะ	32
ภาคผนวก	33

Exclusive Summary

Study on Status of Nile Tilapia Sex Reversal to Reduce Cost

Problem statement and importance

Monosex male tilapia plays an important role in aquaculture of Thailand. The main method to do the monosex is orally hormonal sex reversal. The method starting by adding 17α -methyltestosterone (MT) as male steroid at 60mg into 1 kg feed. The MT feed is applied to start feeding tilapia fry at least 5 times a day for 21-30 days in order to get 87-100% male. Recently, the method to produce all male fry has been developed to use YY male broodstock. This method need to use both males and females from the same strain to obtain all male fry. The method however, has some disadvantages on identifying of the YY and keeping the same strain broodstock to avoid inbreeding problems.

In addition, the hormonal sex reversal can be applied by immersion as well. In salmonids. The use of MT at 200-400 μ g/L immersed the newly hatch larvae 2h and then repeated another 2h immersion in the following week resulted in 82-100% male (Baker et. al.,1988). Similar to Piferrer and Donaldson (1989) reported a single immersion of a salmonid in 400 μ g/L for 2h resulted in 73% male. In tilapia, the immersion age was confused. Yang Yi (1992) immersed the 26-35dpf fry in the 5mg/L MT for 3 days to get 90-94% male. While Fitzpatrick et. al.(1999) got 79.3-82% male from the immersing at 13dpf fry in 200 μ g/L methyl dihydrotestosterone for 2h. The immersion uses less hormone in a short duration. Thus it is an easy, flexible and low cost. The method for tilapia however, is unclear.

Main objective

To obtain effective commercial tilapia sex reversal by immersion technique.

Experiment 1: Study on appropriate time for tilapia to begin hormonal sex reversal by immersion technique

Tilapia eggs were collected individually (No. 8 and 9) and pooled from 10 females. They were randomly counted 35/L into plastic incubators. Next, they were immersed in 500 μ g/L MT at 2, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 23, 26, 30, 32 and 35dpf for 24h before cleaning up with well airated tapped water. The fry were fed with 28% protein until 60dpf before dissecting for sex determination by acetocarmine squash method. The results showed that the sensitive time of the fish were 2, 5 and 11dpf. The MT immersion produced 86-87% male which were significantly higher than the controls (73-79% male).

Experiment 2: Study on appropriate dose and duration of MT immersion

The 35/L density of *O. niloticus* at 2, 11 and 14dpf were randomly counted into plastic bottle incubators. They were randomly immersed in 250 and 500 μ g/L MT for 6, 12, 24, 48, 72 and 96h separately. For the controls were immersed only in ethanol at the same amount and duration. The fry were fed with 41% protein pellet and dissected in the same way as in experiment 1. The 250 and 500 μ g/L MT were significantly increased male percentages (84-87%) to be higher than the controls (66-76%). While the 6-96h durations showed no effect to produce high male.

Experiment 3: Efficiency of MT and fluoxymesterone (FLU) to reverse sex of tilapia at high density

Experiment 3.1: Effect of MT and FLU on sex reversal at high density in closed system and shaking table

The high density (20,000/L) was selected for the experiment in order to obtain commercial scale. The 2dpf were immersed in either MT or FLU at 250 and 1,000µg/L for 48h in the closed system and the shaking table (page A3-3). Both systems had no effect on egg survival. The MT and FLU produced similar male (61-73 and 67-75%, respectively) as the control (70-73%).

Experiment 3.2: Efficiency of shaking table and wheeling systems for incubating tilapia egg during immersion

The 2dpf tilapia egg were immersed either in 1,000µg/L MT or FLU on shaking table (page A3.2-2) and wheeling system (page A3.2-3) at the density of 15,652/L for 48h. All shaking and wheeling systems had no effect on egg survival rate as well as %male. The MT and FLU got 72-78 and 68% male, respectively, while the control had 85% male.

Experiment 4: Comparative efficiency of the shaking table and wheeling systems for incubating egg during immersion at high densities and concentrations

Experimental unit had been reduced from 1L to 100ml in order to compare efficiency of the shaking and wheeling systems (page A3.3-7). In addition, dosages of MT had also increased to 5-80mg/L while the immersion duration was fixed at 48h. The experiment had done twice. The reduced wheeling system size caused high egg mortality while the shaking table did not. The male percentages however, showed no significantly different from the control. The shaking system at last had been slightly changed to slow speed shaking (18-27/min) by using battery (DC 12V; page A3.3-11) in strate of AC (220V).

Experiment 5: On farm trial at Boonhome Farm I

High density immersion at 19,895-23,200/L had been carried out at Boonhome Farm for commercial purpose. The experiment had done 3 times. The on farm eggs could be immersed only 24h due to mixing egg stages between 1-4dpf. The 5mg/L MT immersion for 24h caused higher male (79.49%) than the control (59.76%). The extra MT feed 5-8 days post immersion reduced %male (50-62%) significantly compared to the single immersion. While the 21 days of the 60mg MT/1 kg feed procedure of the farm produced 97% male.

Experiment 5.2: On farm trial at Boonhome Farm II

Due to low efficacy of the high density immersion (15,000 –23,200/L), the experiment 4.2 was carried out to compare egg densities between 5,000 – 20,000/L in large scale (1L) and small scale (100-200ml). The 5mg MT immersion for 24h at 4,980/L produced highest male (63.45%) while the other higher densities had 52-45% male. For the control, there was 48% male which was similar to the MT immersion.

Experiment 5.3: On farm trial at Boonhome Farm III

Due to the 5,000 – 20,000/L in 5mg MT immersion for 24h had no effect to reverse sex of tilapia, the frequency (0-12 times/day) changing MT solution was designed to control concentration of 5mg/L MT solution. The 1 day immersion (24h with out any changing solution) caused high mortality while the 12 times changing solution (every 2 h) caused high survival. The mixing of bad egg (27.9%) and older age egg (3-4dpf = 19.7%) effected quality of the immersion solution to be high turbidity (page A4.3-5 – A4.3-8) and caused high mortality. The %male of the experiment however, showed non significant difference from the control.

Experiment 6: Problem of concentration of the MT solution

Due to the results of experiment 5.3, concentration of the 5mg/L MT solution had been questioned. Thus, only the 5mg/L MT solution and 5mg/L MT+eggs (19,068/L) had been sampled at 15, 30, 60min, 2, 3, 6, 12 and 24h after adding the MT for testosterone analysis using ¹²⁵I RIA Kit at Srinakarinth Hospital, Khonkaen. The RIA detected only 0.32% of testosterone at 15 min after adding MT. In addition, melting point which showed chemical purity had also been determined. The melting point of the MT were 152-166.6 °C (14.6 °C difference) while the melting point on the bottle was writed at 162-168 °C (6 °C difference). This indicated some contamination of the MT from Fluka.

In conclusion, the single immersion in MT alone could induce all male at the low density as 35/L. For high density (5,000 – 20,000/L) immersion in only MT solution (250µg/L - 80mg/L for 24-48h) found less effective. Thus, the project could not reach the main objective for commercial purpose. There is a possibility to increase effectiveness of the high density immersion by using physical and chemical enharncers. As Athauda (2000) succeeded to produce 91.75% male from 2h immersion in 500µg/L MT +ultrasound at 100/L density.

บทคัดย่อ

เทคนิคการแช่แปลงเพศในปลานิลนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาอายุที่เหมาะสม, ความเข้มข้น & ระยะเวลา และ ความหนาแน่น รวมทั้งอุปกรณ์ประกอบการแช่แปลงเพศปลานิล ที่มีประสิทธิภาพเชิงการค้า พบว่าอายุที่เหมาะสมสำหรับการแช่แปลงเพศคือ 2-14 วันหลังการผสม เมื่อทำการแช่ที่ความหนาแน่นต่ำคือ 35/ลิตร นาน 6-96 ชม. ในสารละลาย MT 500µg/L ได้ถูกปลาเพศผู้ 84-91% สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพศผู้ 66-76% ปริมาณเพศผู้ที่ได้จากการแช่ MT นาน 6-96 ชม. พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ การแช่ปลานิลที่ความหนาแน่นสูง (5,000 – 20,000/ลิตร) ที่ความเข้มข้น 250µg/L ถึง 80mg/L นาน 24-48 ชม. พบว่าไม่มีผลต่อการแปลงเพศ สอดคล้องกับการทดลองภาคสนามที่บุญโฮมฟาร์ม ที่ทำการทดสอบผลการแช่แปลงเพศปลานิลอย่างอุตสาหกรรมหลายครั้ง พบว่า การแช่ในสารละลาย MT เพียงอย่างเดียวไม่มีผลต่อการแปลงเพศเชิงการค้า

Abstract

The immersion techniques had been carried out in *O. niloticus* to determine appropriate age, dose&duration, densities and designed equipment for hormonal immersion. The appropriate time to masculinize the fish were 2 - 14dpf at the low density as 35/L for 6-96h in 500µg/L MT, which resulted in significantly higher male (84-91%) than the controls (66-76%). The %male from the immersion between 6-96h at the same dose however, showed no significantly difference. The MT immersion at higher densities (5,000 – 20,000/L) between 250µg/L upto 80mg/L for 24-48h had no effect to induce high male. On farm trial had been carried out several times at Boonhome Farm. The results showed that MT immersion alone could not produce all male commercially.

การศึกษาสถานภาพการแปลงเพศลูกปลานิลเพื่อลดต้นทุนการผลิต

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม มีความอุดมสมบูรณ์มาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน ดังคำที่เราได้ยินกันจนคุ้นหูว่า “ในน้ำมีปลา...ในนามีข้าว” และคำพูดที่ตกทอดปากคนไทยอยู่เสมอที่ว่า “กินข้าว...กินปลา” แสดงให้เห็นว่าปลาหรือสัตว์น้ำมีบทบาทต่อชีวิตและความเป็นอยู่ของคนไทยมาช้านาน แม้แต่โครงการเกษตรทฤษฎีใหม่ของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวฯ หรือการเกษตรแบบพอเพียง ที่ทรงชี้แนะให้เกษตรกรไทยพึ่งพาตัวเอง เลี้ยงดูและอุ้มชูครอบครัวตนเองได้แบบพอมีพอกินนั้น มีพื้นที่บ่อปลาอยู่ถึง 30% ของพื้นที่ทั้งหมด เพื่อใช้เป็นแหล่งน้ำทางการเกษตรและเป็นแหล่งผลิตอาหารโปรตีนสำหรับครอบครัว ถ้ามีผลผลิตมากเกินไป ก็จะขายเป็นรายได้เสริมให้กับครอบครัวอีกทางหนึ่ง

ประวัติความเป็นมาของปลานิล

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่มีถิ่นกำเนิดในทวีปแอฟริกา ถูกนำเข้ามาสู่ประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2508 โดยเจ้าชายอาภิโธมกุฎราชกุมารญี่ปุ่น นำมาทูลเกล้าฯ ถวายแด่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว ทรงพระกรุณาโปรดเกล้าฯ ให้เลี้ยงไว้ที่พระตำหนักจิตรลดารโหฐานพร้อมกับพระราชทานชื่อว่าปลานิล ต่อมาในปี พ.ศ. 2509 ทรงพระราชทานพันธุ์ปลานิลแก่กรมประมงให้นำไปเพาะขยายพันธุ์เพื่อแจกจ่ายแก่เกษตรกรทั่วประเทศ (ทัศนีย์, 2524) ปลานิลเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว สามารถเจริญเติบโตได้ดีในที่กักขัง กินอาหารได้ทุกชนิด (omnivore) รวมทั้งอาหารที่มีโปรตีนต่ำ แข็งแรงทนทานต่อสภาพแวดล้อมไม่ดีได้มาก เนื้อมีรสชาติดี ไม่มีก้างย่อยแทรกในเนื้อปลา เป็นที่นิยมรับประทานกันทั่วไป ตลาดมีความต้องการสูง เกษตรกรส่วนมากเลี้ยงปลานิลไว้สำหรับการบริโภคในครัวเรือนเป็นหลัก ถ้าเหลือจึงขายเป็นรายได้เสริมของครอบครัว เกษตรกรน่าจะเริ่มเลี้ยงปลานิลตั้งแต่ปี พ.ศ. 2510 แต่ข้อมูลสถิติผลผลิตการเลี้ยงปลาน้ำจืดของคนไทยเริ่มปรากฏในปี พ.ศ. 2524 มีผลผลิตปลานิล 5,500 ตันจากปริมาณสัตว์น้ำจืดจากการเพาะเลี้ยงรวม 48,100 ตัน โดยข้อมูลในปีนั้น เกษตรกรนิยมเลี้ยงปลาสดเป็นอันดับหนึ่ง รองลงมาคือปลาช่อน ปลาสวาย ปลาชุก และปลานิล คิดเป็นผลผลิตปลานิลร้อยละ 11.43 ของปริมาณสัตว์น้ำจืดที่ได้จากการเพาะเลี้ยง ปลานิลเริ่มมีผลผลิตสูงเป็นอันดับหนึ่งของประเทศในปี พ.ศ. 2529 (กองเศรษฐกิจประมง, 2545) โดยมีผลผลิตสูงถึง 18,400 ตัน คิดเป็นร้อยละ 20.6 ของผลผลิตสัตว์น้ำจืดจากการเพาะเลี้ยง หลังจากนั้นผลผลิตปลานิลเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ อยู่ในอันดับที่หนึ่งหรือสองของประเทศเรื่อยมา จากข้อมูลล่าสุดปี พ.ศ. 2543 ประเทศไทยผลิตปลานิลรวม 82,363 ตัน คิดเป็นร้อยละ 30.4 ของผลผลิตสัตว์น้ำจืดจากการเพาะเลี้ยง มีมูลค่าประมาณ 2,127 ล้านบาท (กองเศรษฐกิจการประมง, 2545) ดังนั้นถึงแม้ว่าปลานิลจะไม่ใช่อัตว์น้ำที่มีถิ่นกำเนิดในประเทศไทย แต่มีบทบาทเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจที่สำคัญชนิดหนึ่งของประเทศ

สายพันธุ์ปลานิล

ปัจจุบันปลานิลของไทยได้รับการพัฒนาและปรับปรุงพันธุ์ จากหน่วยงานของรัฐ คือ สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ กรมประมง และ บริษัทเอกชน ทำให้เกิดเป็นปลานิลสายพันธุ์ใหม่ๆ ประมาณ 5 สายพันธุ์ (กรมประมง (มปป.; เพ็ญพรรณ, 2543) ดังนี้

สายพันธุ์จิตรลดา 1 เป็นสายพันธุ์ปลานิล ที่กรมประมงทำการปรับปรุงจากปลานิลในพระตำหนักจิตรลดารโหฐาน ประมาณ 7 ชั่วโมง ทำให้ได้ปลาสายพันธุ์ใหม่ ที่มีการเจริญเติบโตเร็วกว่าสายพันธุ์เดิมประมาณ 22%

สายพันธุ์จิตรลดา 2 (Genetical male tilapia; GMT) คือลูกปลานิลเพศผู้ที่ได้จากพ่อพันธุ์ซูเปอร์เมล (YY) ซึ่งเป็นปลาที่ถูกปรับเปลี่ยนโครโมโซมเพศให้เป็น YY โดยมีวัตถุประสงค์ในเบื้องต้นที่จะใช้พ่อพันธุ์ซูเปอร์เมลไปผสมกับแม่ปลานิลทั่วไป (XX) นำที่จะให้ลูกปลาเพศผู้ล้วน (XY) แต่เมื่อทำการผลิตพ่อพันธุ์ YY ได้แล้วพบว่า ลูกปลาที่ได้จากพ่อพันธุ์ซูเปอร์เมลและแม่พันธุ์ทั่วไปไม่เป็นเพศผู้ทั้งหมด จำเป็นต้องใช้แม่พันธุ์สายพันธุ์เดียวกับพ่อพันธุ์ซูเปอร์เมล จึงจะทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ประมาณ 95.6% (Mair et. al., 1997) ประกอบกับรายงานจากสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT) พบว่าลูกปลานิลจิตรลดา 2 มีการเจริญเติบโตของว่าต่ำกว่าปลานิลเพศผู้ที่ได้จากการแปลงเพศเสียอีก (Tuan et.al., 1998) ทำให้ปลานิลจิตรลดา 2 ได้รับความนิยมในวงจำกัด

สายพันธุ์จิตรลดา 3 (Genetically Improved Farmed Tilapia line; GIFT) เป็นปลานิลที่กรมประมงทำงานร่วมกับ ICLARM องค์การความร่วมมือจากนานาชาติ ตั้งอยู่ที่ประเทศฟิลิปปินส์ ทำการปรับปรุงด้วยการคัดพันธุ์ปลานิล 8 สายพันธุ์ ประกอบด้วยปลานิลสายพันธุ์อียิปต์ กานา เคนยา สิงคโปร์ เซนาเกล อีสราเอล ไต้หวัน และไทย ประมาณ 5 ชั่วโมง จึงนำเข้ามาสู่ประเทศไทย และทำการคัดพันธุ์ต่อประมาณ 2 ชั่วโมง ได้ปลานิลที่มีหัวเล็ก ตัวกว้าง เนื้อหนา เจริญเติบโตเร็วได้ขนาด 3-4 ตัว/กิโลกรัม ภายใน 6-8 เดือน ให้ผลผลิตสูงกว่าปลาทั่วไปถึง 40%

สายพันธุ์ซีพี เป็นปลาลูกผสม 3 สายเลือด (*O. niloticus*, *O. mossambicus* และ *O. auroes*) ของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ (ซีพี) และทำการคัดพันธุ์ต่อ จนได้ปลานิลลูกผสมที่มีลำตัวกว้างเนื้อหนามาก สามารถทนความเค็มได้ในช่วงกว้าง ตั้งแต่ น้ำจืด ไปจนถึง น้ำทะเล ปลานิลสายพันธุ์ซีพีจึงถูกนำไปเลี้ยงแทนที่กึ่งกุลาดำในพื้นที่นาุ้งที่ล้มเหลว เพราะปัญหาโรคกุ้งและสภาพแวดล้อมเสื่อมโทรม ปัจจุบันปลานิลสายพันธุ์ซีพีถูกนำมาเลี้ยงรวมในนาุ้งกุลาดำระบบปิด เพื่อทำหน้าที่ควบคุมปริมาณพืชน้ำ การเลี้ยงปลานิลในน้ำเค็มมีข้อดีคือ ปลาที่เลี้ยงไม่ค่อยเป็นโรค และที่สำคัญคือ ในน้ำเค็มไม่มีแหล่งกักตุนที่ทำให้เกิดกลิ่นสาบในเนื้อปลานิลที่เลี้ยงในน้ำเค็มจึงมีเนื้อคุณภาพสูง รสชาติใกล้เคียงปลาทะเล จึงขายได้ราคาดี

สายพันธุ์ทับทิม คือปลานิลแดงที่คัดพันธุ์มาจาก 3 สายเลือด (*O. niloticus*, *O. mossambicus* และ *O. auroes*) ของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ (ซีพี) และทำการคัดพันธุ์ต่อจนได้พันธุ์ปลาที่มีความ

สามารถในการกินสูง จึงโตเร็ว สามารถทนความเค็มได้ถึง 30 ppt แต่ช่วงที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโตคือ 15-20 ppt เป็นปลาที่มีเนื้อขาว ผิวหนังขาว สามารถเลี้ยงที่ความหนาแน่นสูง จึงเหมาะกับการเลี้ยงในกระชัง ให้ผลผลิตสูงถึง 25 กิโลกรัม/ลูกบาศก์เมตร ภายในระยะเวลาเลี้ยงเพียง 3 เดือน

ปัญหาของการเลี้ยงปลานิล

ปลานิลเป็นปลาที่มีความสามารถในการแพร่ขยายพันธุ์ในบ่อเลี้ยงได้เอง ความสามารถนี้เป็นทั้งข้อดีและข้อเสีย ข้อดีคือการปล่อยพันธุ์ปลานิลลงบ่อเลี้ยงเพียงครั้งเดียว ปลานิลจะแพร่ขยายพันธุ์ทำให้มีพันธุ์ปลานิลเลี้ยงตลอดไป โดยไม่จำเป็นต้องปล่อยพันธุ์ปลานิลซ้ำอีก ข้อเสียคือปลานิลเริ่มวางไข่ตั้งแต่อายุประมาณ 3-6 เดือน (สุปราณี, 2513 และ Srisakultiew, 1993) โดยแม่ปลาขนาดเล็กที่สุดที่เริ่มวางไข่ พบว่ามีความยาวประมาณ 13 เซนติเมตร (สุปราณี, 2513) ปลานิลมีความสามารถวางไข่ได้ทุกเดือน ตลอดทั้งปี หรือปีละประมาณ 3-4 ครั้ง และมีพฤติกรรมฟักไข่และเลี้ยงคูตัวอ่อน (ทัศนีย์, 2524) ทำให้ลูกปลานิลมีอัตราการรอดตายสูง บ่อที่ทำการเลี้ยงปลานิลส่วนมาก มีแต่ปลานิลรุ่นขนาดเล็กที่ขายไม่ได้ราคาเต็มบ่อไปหมด ส่วนปลานิลขนาดใหญ่ที่ขายได้ในราคาสูง กลับมีจำนวนน้อยหรือไม่มีเลย ปลานิลที่เลี้ยงต้องแย่งอาหารกัน ทำให้มีการเจริญเติบโตช้า ต้องแย่งที่อยู่อาศัยคือบ่อซึ่งมีพื้นที่จำกัด นอกจากนี้การที่ปลานิลจำนวนมากมาอยู่รวมกันในพื้นที่บ่อแคบๆ ย่อมมีของเสียทั้งจากตัวปลาเองและจากอาหารที่ใช้ ทำให้น้ำในบ่อเลี้ยงมีคุณภาพเลวลงเรื่อยๆ จนถึงระดับที่ลดการกินอาหารของปลา ส่งผลให้ปลามีการเจริญเติบโตช้า อ่อนแอ เป็นโรค และตายในท้ายที่สุด ผลผลิตที่พึงได้ต่ำกว่าที่ควรจะเป็น มีแต่ปลาเล็กปลาน้อยที่ขายไม่ได้ราคา รายได้จากการเลี้ยงจึงน้อยหรือไม่ได้เลย เป็นต้น

การผลิตปลานิลเพศเดียว

จากข้อเสียของการเลี้ยงปลานิลเป็นต้นเหตุของการเลี้ยงปลาเพศเดียว การเลี้ยงปลาแบบนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหยุดการสืบพันธุ์วางไข่ของปลานิล โดยการใช้หลักการง่ายๆ คือ แยกปลาเพศผู้ออกจากปลาเพศเมีย แล้วปล่อยเลี้ยงคนละบ่อ ทำให้พ่อพันธุ์ปลานิลไม่พบกับแม่พันธุ์ ปลาจึงไม่สามารถสืบพันธุ์วางไข่หรือมีลูกได้ ประกอบกับปลานิลเพศผู้มีการเจริญเติบโตดีกว่าปลานิลเพศเมียที่อายุเท่ากันประมาณ 25% ทำให้การเลี้ยงปลานิลเฉพาะเพศผู้ได้รับความนิยมมากกว่าการเลี้ยงปลาเพศเมีย (Chervinski and Rothbard, 1982) การเลี้ยงปลานิลเพศเดียว ทำให้สามารถควบคุมจำนวนประชากรปลานิลในบ่อให้มีจำนวนที่เหมาะสมกับการเจริญเติบโต ปลานิลจึงมีการเจริญเติบโตดี ให้ผลผลิตสูงในระยะเวลาที่ต้องการ การผลิตปลานิลเพศเดียวจึงนิยมทำการผลิตปลานิลเพศผู้ สามารถดำเนินการได้หลายวิธี ดังนี้

การแยกเพศด้วยมือ (hand sexing) เป็นวิธีพื้นฐานของการผลิตปลานิลเพศเดียว วิธีการนี้ดูความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียจากด่างเพศของปลานิล โดยปลานิลเพศเมียจะมีช่องวางไข่

บนดั่งเพศ ในขณะที่ปลาเพศผู้ไม่มี (ทัศนีย์, 2524) วิธีการนี้ต้องใช้คนที่มีความชำนาญในการ
 คูเพศปลานิล โดยเฉพาะการคูปเพศปลานิลรุ่นอายุประมาณ 3 - 4 เดือน หรือขนาดใหญ่กว่า 30
 กรัมขึ้นไป ต้องใช้เวลาและแรงงานในการแยกเพศค่อนข้างมาก การแยกเพศด้วยมือนี้มีข้อเสีย
 พลาด 2.7-10 % เป็นความผิดพลาดของตัวบุคคลที่ทำการคัดแยกเพศ (Chervinski and Rothbard,
 1982) อย่างไรก็ตาม การผลิตปลานิลเพศผู้ด้วยวิธีการแยกเพศด้วยมือ จะได้ปลาเพศผู้เพียง 50%
 ของปลาทั้งหมด ส่วนปลาเพศเมียอาจจะนำไปแยกเลี้ยงคนละบ่อกับเพศผู้ แต่ที่ประเทศอิสรา-
 เอล ปลาเพศเมียจะถูกทิ้งไป ทำให้วิธีการแยกเพศด้วยมือนี้มีการสูญเสียประมาณ 50%ของผล
 ผลิต นอกจากนี้ที่อิสราเอลมีการพัฒนาเครื่องแยกเพศปลานิลขึ้น โดยใช้หลักการที่ว่าปลาเพศ
 ผู้มีขนาดใหญ่กว่าเพศเมีย (Pruginin and Shell, 1962) แต่ปัจจุบันนี้ไม่มีการใช้แล้ว เพราะ
 หลักการดังกล่าวใช้ได้เฉพาะปลานิลที่มีอายุเท่ากันและเลี้ยงในสภาพเดียวกัน ถ้าปลาต่างอายุ
 หรือต่างวิธีการเลี้ยงจะไม่สามารถใช้หลักการดังกล่าวได้

การผสมข้ามพันธุ์ (hybridization) คือ การผสมข้ามชนิดของปลาในตระกูลปลานิล ที่มีผล
 กระทบต่อสัดส่วนเพศของปลาลูกผสม McAndrew (1993) ได้รวบรวมรายงานการผสมข้าม
 พันธุ์ปลาชนิดต่างๆ ในตระกูลปลานิล และยกตัวอย่างกลุ่มผสมที่ให้ลูกปลาเป็นเพศผู้ทั้งหมด
 ดังนี้

Oreochromis mossambicus x *O. hornorum*

O. niloticus x *O. hornorum*

O. niloticus x *O. macrochir*

อย่างไรก็ดี การผสมข้ามพันธุ์ปลาในตระกูลปลานิลให้ผลไม่สม่ำเสมอ ถ้าเป็นปลานิลสาย
 พันธุ์เดียวกัน สัดส่วนเพศจะขึ้นกับสายพันธุ์และความบริสุทธิ์ของสายเลือดพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้
 แต่ถ้าเป็นการผสมปลาคู่เดียวกัน รุ่น (generation; F) ของลูกปลาที่จะได้ มักจะมีอิทธิพลต่อสัด-
 ส่วนเพศของลูกปลา (McAndrew, 1993) การผลิตปลานิลเพศผู้โดยวิธีนี้ จึงต้องมีการบันทึกข้อ
 มูลอย่างละเอียดและทำงานเป็นระบบ วิธีการนี้มีข้อเสียหลายอย่าง เช่น ยากที่จะควบคุมความ
 บริสุทธิ์ของสายเลือดปลาแต่ละชนิด สายพันธุ์ หรือลูกปลาแต่ละรุ่น (F) เพราะปลาลูกผสมจะ
 มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างลักษณะของพ่อแม่ ทำให้ยากที่จะดูหรือแยกชนิดปลาด้วยตาเปล่า
 จำเป็นต้องใช้การคิดเครื่องหมายหรือใช้เทคโนโลยีขั้นสูง เช่น gel electrophoresis หรือ HPLC ใน
 การแยกหาการเรียงตัวของ gene หรือ DNA เพื่อการจำแนกชนิดจากสารพันธุกรรมของปลา ทำ
 ให้ต้นทุนในการแยกชนิดปลาสูง อีกทั้งความสามารถในการวางไข่ของปลาขนาดเล็ก และ
 ความสามารถในการผสมพันธุ์ของปลา 2 เพศ (intersex) หรือปลาที่มีโครโมโซมมากกว่าปกติ
 (polyploidy) ที่อาจจะปนเปื้อนเข้ามาโดยไม่ตั้งใจ ทำให้ความบริสุทธิ์ของสายเลือดปลาลดลง
 และยากในการคาดเดาสัดส่วนเพศของลูกปลา ปัญหาดังกล่าวส่งผลให้ ต้องใช้ค่าใช้จ่ายสูงใน

การจัดการรักษาพ่อแม่พันธุ์ที่ให้ผลผลิตลูกปลานิลเพศผู้ล้วนในรุ่น F1 เพราะต้องรักษาสายพันธุ์ให้บริสุทธิ์ และระวังไม่ให้เกิดการผสมเลือดชิด ปัญหาเหล่านี้ส่งผลให้การผสมข้ามพันธุ์ได้รับความนิยมลดลงเรื่อย ๆ

การใช้ฮอร์โมนแปลงเพศ เป็นวิธีการที่นิยมใช้กันมากที่สุดในปัจจุบัน เพราะวิธีการนี้มีข้อดี (McAndrew, 1993) มากกว่าการผสมข้ามพันธุ์ ดังนี้

1. ไม่จำเป็นต้องเสียค่าใช้จ่ายในการเก็บพันธุ์ปลานิล 2 ชนิด
2. ไม่จำเป็นต้องคำนึงถึงสารพันธุกรรม (homologous, heterozygous, intersex, polyploidy, autosomal gene ฯลฯ) หรือความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ปลา ไม่ว่าปลาจะมีพันธุกรรมเช่นไร ถ้ามีวิธีการใช้ฮอร์โมนแปลงเพศที่มีประสิทธิภาพแล้ว สามารถใช้ฮอร์โมนเพศที่ต้องการเหนี่ยวนำให้ได้เพศที่ต้องการ
3. ปลาที่ผ่านขบวนการแปลงเพศไปเป็นเพศผู้แล้ว ฮอร์โมนเพศผู้จะทำให้ลูกปลาที่ผ่านการแปลงเพศมีการเจริญเติบโตเร็วกว่าปลาเพศผู้ธรรมชาติ ทำให้ปลาที่ผ่านขบวนการแปลงเพศแล้วเป็นที่นิยมของเกษตรกรผู้เลี้ยงปลาทั่วไป

วิธีการแปลงเพศปลานิลนี้สามารถทำได้ โดยการใช้ฮอร์โมนเพศที่ต้องการกับลูกปลาดังแต่ระยะที่ยังไม่ปรากฏเพศ (undifferentiated gonad) เป็นเวลานานครอบคลุมจนถึงสิ้นสุดขบวนการพัฒนาเพศ (sex differentiation; Yamamoto, 1969) ทฤษฎีนี้ถูกใช้เป็นจุดเริ่มต้นของความเป็นไปได้ในการใช้ฮอร์โมนควบคุมเพศปลาเชิงการค้าและอย่างเป็นอุตสาหกรรม วิธีการนี้ได้รับผลกระทบจากหลายปัจจัยที่ถูกควบคุมอย่างซับซ้อน นับตั้งแต่ biochemistry และ neurology ของฮอร์โมน ลักษณะกายภาพของเซลล์เนื้อเยื่อที่จะพัฒนาไปเป็นอวัยวะเพศ การปรากฏของเซลล์ตัวรับ steroid (receptors) และผลกระทบของปัจจัยแวดล้อม (environmental factor) ที่ส่งผลทำให้การแปลงเพศไม่สมบูรณ์แบบ ทำให้เกิดปลา 2 เพศ (intersex), การแปลงเพศได้ผลตรงข้ามกับความต้องการ เช่น ต้องการแปลงเพศลูกปลาเป็นตัวผู้ แต่ผลการแปลงเพศ กลับได้ลูกปลาเพศเมียจำนวนมากแทน (paradoxical effect) และการใช้วิธีการแปลงเพศแบบเดียวกันในปลาต่างชนิด ที่ให้ผลต่างกัน เป็นต้น (McAndrew, 1993)

ในปี พ.ศ. 2545 Devlin และ Nagahama (2002) ได้ทำการรวบรวมข้อมูลการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการแปลงเพศปลาในระยะ 20-30 ปีที่ผ่านมา สรุปว่าฮอร์โมน steroid มีบทบาทที่สำคัญในการเหนี่ยวนำให้ได้เพศที่ต้องการ หากมีการใช้ฮอร์โมน steroid ของเพศที่ต้องการ ในปริมาณที่เพียงพอ ในระยะที่ปลาเริ่มมีอวัยวะเพศระยะเริ่มต้นที่กำลังจะเริ่มพัฒนา (undifferentiated gonad) โดยที่ลูกปลายังไม่มีการสร้างฮอร์โมนเพศของตัวเองขึ้นมา และมีระยะการให้ฮอร์โมนนานครอบคลุมถึงระยะที่ลูกปลาเริ่มมีการพัฒนาเพศ (sex differentiation) วิธีการนี้จะทำให้ได้ลูกปลาเพศที่ต้องการ (Yamamoto, 1969) มีการทดลองศึกษาวิจัยแปลงเพศในปลาชนิดต่างๆรวม 55 ชนิดใช้ฮอร์โมน steroid รวม 18 ชนิด โดย 17 α -methyltestosterone (MT) เป็นฮอร์โมนที่ใช้ในการศึกษาวิจัยแปลงเพศปลาชนิดต่างๆ ถึง 42 ชนิด ประสิทธิภาพของการ

แปลงเพศแต่ละวิธีจะขึ้นอยู่กับ ชนิดของฮอร์โมน (type) ความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้ของฮอร์โมน (dose&duration) วิธีการใช้ (application) และอายุปลา (age) เป็นต้น (Devlin และ Nagahama, 2002) วิธีการแปลงเพศด้วยฮอร์โมนนี้ มีการใช้ฮอร์โมนได้ 2 แบบ ดังนี้

การให้ฮอร์โมนทางอ้อม วิธีการนี้มีเป้าหมายที่จะผลิตลูกปลานิลเพศผู้ที่ไม่ได้สัมผัสกับฮอร์โมนโดยตรง เพื่อการส่งออกปลานิลสู่ตลาดในประเทศกลุ่มยุโรป วิธีการนี้ต้องดำเนินการ 2 ขั้นตอน ประกอบด้วย ขั้นตอนที่ 1 ใช้ฮอร์โมนเพศเมียผสมในอาหารให้แก่ลูกปลานิลตั้งแต่เริ่มกินอาหาร เพื่อทำการเปลี่ยนเพศลูกปลานิลเป็นเพศเมีก่อน ทำการเลี้ยงลูกปลาดังกล่าวจนสมบูรณ์เพศ คัดเฉพาะแม่ปลาซึ่งจะมีโครโมโซมเพศเป็น XX, XY ทำการหาแม่ปลาที่มีโครโมโซมเพศเป็น XY โดยนำแม่ปลาทั้งหมดไปเพาะกับพ่อพันธุ์ปกติที่มีโครโมโซมเพศ XY ถ้าแม่ปลาคู่ใดให้ลูกเพศผู้ในอัตรา 3:1 แสดงว่าแม่ปลาตัวนั้นมีโครโมโซมเพศ XY ที่ต้องการ ขั้นตอนที่ 2 เลี้ยงลูกปลาเพศผู้ที่ได้จากแม่พันธุ์ XY ลูกปลาดังกล่าวจะมีโครโมโซม XY และ YY ทำการเลี้ยงลูกปลาให้สมบูรณ์เพศและนำไปผสมกับแม่ปลานิลปกติที่มีโครโมโซมเพศ XX ถ้าลูกปลาครอกใดให้ลูกปลาเพศผู้ทั้งหมด แสดงว่าพ่อพันธุ์ที่ใช้คือพ่อพันธุ์ YY หรือซูเปอร์เมล (Hunter and Donaldson, 1983) วิธีการนี้มีข้อเสียคือ เป็นวิธีการที่ค่อนข้างซับซ้อน ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง และโอกาสที่จะได้พ่อพันธุ์ซูเปอร์เมลมีเพียงร้อยละ 25 เท่านั้น นอกจากนี้ปริมาณลูกปลาเพศผู้ที่จะได้จากวิธีดังกล่าว ขึ้นกับสายเลือดของพ่อและแม่พันธุ์ปลาที่ใช้ หรือ autosomal sex modifying gene อีกด้วย การผลิตลูกปลานิลเพศผู้ด้วยวิธีดังกล่าวส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้เฉลี่ยร้อยละ 95.6 (Mair et al., 1997) นอกจากนี้การใช้พ่อแม่พันธุ์สายเลือดเดียวกัน ทำให้โอกาสการผสมเลือดชิด (inbreeding) มีสูง เป็นข้อควรระวัง เพราะการผสมเลือดชิด อาจส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโต และลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ที่อาจจะปรากฏในรุ่นลูก ปัจจุบันการผลิตลูกปลานิลเพศผู้ด้วยวิธีดังกล่าวในประเทศไทยลดความสำคัญลงมาก

การให้ฮอร์โมนทางตรง เป็นการให้ฮอร์โมนผสมในอาหาร เช่น การใช้ 17 α methyltestosterone (MT) ในอัตรา 30-60 มิลลิกรัมผสมในอาหาร 1 กิโลกรัม อนุบาลลูกปลานิล (*O. niloticus*) ตั้งแต่เริ่มกินอาหารเป็นเวลา 24 - 30 วัน ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ทั้งหมด (Tayamen and Shelton, 1978) ในฟิลิปปินส์ Guerrero (1975) ได้รวบรวมลูกปลานิล (*Tilapia aurea*) ขนาด 9-11 มิลลิเมตรจากบ่อเพาะ มาให้ฮอร์โมน MT ผสมอาหารในอัตรา 60 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลานาน 18 วัน พบว่าได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 85 วิธีการอนุบาลลูกปลานิลที่กล่าวมา เป็นการอนุบาลในตู้กระจกหรือบ่อซีเมนต์ที่ไม่มีอาหารธรรมชาติมาเกี่ยวข้อง ทำให้ต้องมีการล้างทำความสะอาดตู้หรือบ่อทุกวัน เป็นวิธีที่ใช้แรงงานในการเปลี่ยนถ่ายน้ำค่อนข้างมาก วิธีการนี้จึงถูกประยุกต์โดย Buddle (1984) ได้เปลี่ยนวิธีอุปกรณ์อนุบาลไปใช้กระชังที่กางอยู่ในบ่อดินแทน เพื่อลดปัญหาแรงงานในการทำความสะดวก โดยทดลองใช้ 17 α ethynyltestosterone (ET) ผสมในอาหารที่อัตรา 60 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม อนุบาลปลานิลลูกผสม (*O. niloticus* + *O. aureus*) ในกระชังที่กางไว้ในบ่อดิน เป็นเวลา 25-28 วัน พบว่าได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 96 ต่อมาสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT) ได้นำเทคโนโลยีนี้มาพัฒนาและประยุกต์ให้เหมาะสมกับ

ประเทศไทย เริ่มตั้งแต่การเพาะปลานิลในกระชังในล่อนสีฟ้าขนาด 120 ตารางเมตร ทำการเก็บไข่จากปากแม่ปลาทุกสัปดาห์ นำไข่ปลาที่ได้มาฟักในขวดพลาสติกและถาดอคูมิเนียมสีเหลี่ยม เมื่อลูกปลาเริ่มกินอาหารย้ายลูกปลาไปอนุบาลในกระชังในล่อนสีฟ้าขนาด 1 – 5.4 ตารางเมตร อนุบาลด้วยอาหารผสม MT ในอัตรา 60 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 21 วัน พบว่าได้ลูกปลานิลเพศผู้ทั้งหมด (Ponza et al., 1996) เมื่อมีการเผยแพร่เทคนิคผู้เกษตรกร พร้อมกับการติดตามผลการแปลงเพศลูกปลานิลของเกษตรกร พบว่าเกษตรกรสามารถทำการแปลงเพศลูกปลาเพศผู้ได้ร้อยละ 86 – 100 (Bhujel, 1998) ขึ้นกับระดับการยอมรับเทคโนโลยีของเกษตรกร (Little et. al., 1995) ปัจจุบันมีโรงเพาะฟักปลานิลของเอกชน ที่ทำการผลิตปลานิลเพศผู้ โดยขบวนการดังกล่าวทั้งขนาดใหญ่และเล็ก เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ตั้งอยู่ทั่วประเทศไทย

อนึ่ง การให้ฮอร์โมนทางตรงนี้ ยังสามารถให้ได้ด้วยวิธีการแช่ (immersion) ดังที่ Piferrer and Donaldson (1993) รายงานถึงความเป็นไปได้ที่จะควบคุมเพศลูกปลาที่ต้องการด้วยการใช้ฮอร์โมน steroid ในปริมาณน้อยๆ ในระยะเวลาสั้นๆ กับลูกปลาระยะต้นๆ ของการพัฒนาอวัยวะเพศ หรือในระยะที่เรียกว่า labile period ซึ่งเป็นระยะตั้งแต่เริ่มมีการพัฒนาของเซลล์ไปเป็นอวัยวะเพศ (gonadal development) ครอบคลุมระยะฟักไข่จนถึงระยะแรกๆ ของการเริ่มกินอาหาร ในระยะนี้เป็นระยะที่ลูกปลามีความไวต่อการให้ฮอร์โมนภายนอกเหนือกว่าเพศที่ต้องการ และให้ผลตอบสนองต่อการแปลงเพศสูง หากใช้ฮอร์โมน steroid นอกกระยะ labile period แล้ว ผลการแปลงเพศจะต่ำ วิธีการแช่นี้ให้ผลดีในการแปลงเพศปลาแซลมอน (*Oncorhynchus tshawytscha*) ด้วยการแช่ลูกปลาที่เพิ่งฟักออกมาใหม่ๆ ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/ลิตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยทิ้งช่วงห่างกัน 1 สัปดาห์ จึงแช่อีก 2 ชั่วโมง ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 82-100 (Baker et al., 1988) สอดคล้องกับผลการทดลองของ Piferrer and Donaldson (1989) ที่ทำการทดลองแช่ลูกปลาแซลมอน (*O. kisutch*) ที่อายุ 6 วันหลังฟัก ในสารละลาย MT 400 ไมโครกรัม/ลิตรนาน 2 ชั่วโมงเพียงครั้งเดียว ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 73

ส่วนการทดลองแปลงเพศโดยวิธีแช่ในปลานิลนี้ Yang Yi (1992) ได้ทำการทดลองแช่ลูกปลานิลอายุ 21-30 วันหลังฟัก (ประมาณ 26-35 วันหลังวางไข่) ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน พบว่าได้ลูกปลานิลสูงถึงร้อยละ 90 ขัดแย้งกับรายงานของ Fitzpatrick et al., (1999) ที่ทดลองแช่แปลงเพศลูกปลานิลที่อายุ 364 CTU (Celsius Temperature Unit คือค่าเฉลี่ยของอุณหภูมิ x จำนวนวัน เช่น ถ้าอุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส x จำนวนวันหลังวางไข่ คือ 13 วัน (dpv) จะทำให้ได้อายุ 364 CTU; ประมาณ 8-9 วันหลังฟัก) ในสารละลาย methylidihydrotestosterone 200 ไมโครกรัม/ลิตร นาน 2 ชั่วโมง ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 79.3 ในขณะที่การแช่ลูกปลาที่ 280 CTU (ประมาณ 10 วันหลังการวางไข่ ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เช่นกัน) กลับส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม ส่วนการแช่ 2 ครั้งที่ 280 และ 364 CTU ด้วยฮอร์โมน ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาเดียวกัน ส่งผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้เพิ่มเป็นร้อยละ

82.9 รายงานผลการแปลงเพศปลานิลด้วยวิธีแช่ มีข้อขัดแย้งกันในรายละเอียด และยังไม่มีประสิทธิภาพเท่าที่ควร

ปัญหาการปนเปื้อนของ MT สู่สิ่งแวดล้อม

การผลิตลูกปลานิลเพศผู้ของไทยปัจจุบัน นิยมใช้วิธีการผสมฮอร์โมนในอาหารให้กับลูกปลา ตั้งแต่ระยะที่เริ่มกินอาหารนาน 21-30 วัน แต่วิธีการต้องใช้ฮอร์โมนในปริมาณมากเกินไปจนมีความจำเป็น (Piferrer and Donaldson, 1993) เพราะต้องใช้ฮอร์โมนตั้งแต่ undifferentiated gonad นานครอบคลุมระยะ gonadal differentiation (Yamamoto, 1969) ด้วยอีกระยะหนึ่ง เพื่อยุทธผล และ คณะ (2544; ภาคผนวก ก) แสดงให้เห็นว่า ถ้าหากประเทศไทยมีการผลิตลูกปลานิลแปลงเพศด้วยวิธีดังกล่าวประมาณปีละ 600 ล้านตัว จะต้องใช้ MT สูงถึง 11 กิโลกรัม ที่จะถูกใส่ลงไปบ่ออนุบาลลูกปลาทั่วประเทศ บ่อเหล่านี้ต้องมีการล้างเตรียมบ่อเป็นระยะๆ การเปลี่ยนถ่ายน้ำจากบ่ออนุบาลนี้ มีความเป็นไปได้ที่ MT จะปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อม แม้ว่า MT ในน้ำจะสลายตัวภายใน 7 วันหลังจากสิ้นสุดการให้อาหาร MT แต่การเริ่มให้อาหารผสม MT แปลงเพศลูกปลาในกระชังนั้น เริ่มไม่พร้อมกัน ทำให้ระยะสิ้นสุดการให้ MT ไม่พร้อมกัน และในขั้นตอนการเตรียมบ่อที่ถูกต้องนั้น จะต้องมีการตากบ่อประมาณ 3-5 วัน แต่ในทางปฏิบัติแล้วระยะการตากบ่อจะสั้นกว่านี้ หรือไม่มีการตากบ่อเลย ทำให้ปัญหาการปนเปื้อนของ MT สู่สิ่งแวดล้อมรอบๆ ฟาร์มมีความเป็นไปได้สูง ปัญหานี้ นับเป็นปัญหาใหญ่ที่น่าจะส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิตรอบๆ ฟาร์มแต่คนส่วนมากยังไม่ได้คำนึงถึง

โครงการศึกษาสถานภาพการแปลงเพศลูกปลานิลเพื่อลดต้นทุนการผลิต

สถานะภาพการแปลงเพศปลานิลปัจจุบันพบว่า ประเทศไทยมีโรงเพาะฟักปลานิลเกิดขึ้นหลายแห่งทั่วประเทศ ที่ใช้วิธีการผลิตลูกปลานิลเพศผู้ด้วยการแปลงเพศโดยตรง คือใช้ฮอร์โมน MT 60 มิลลิกรัมผสมลงในอาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหารนี้บ่ออนุบาลลูกปลาดังแต่ระยะที่ลูกปลาเริ่มกินอาหารนานประมาณ 21 – 30 วัน จะทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 86 – 100% วิธีการนี้ใช้ฮอร์โมน MT ที่ค่อนข้างสูง และใช้ระยะเวลาที่ยาวนาน ถ้าหากทราบระยะวิกฤต (labile period) ของปลานิล หรือระยะที่ปลานิลมีความไวต่อการใช้ฮอร์โมนแปลงเพศ จะทำให้สามารถทำการแปลงเพศโดยวิธีแช่ ที่ใช้ฮอร์โมนเพียงเล็กน้อย มีหน่วยเป็นไมโครกรัมต่อลิตร ในระยะเวลาสั้นๆ เป็นชั่วโมง (Piferrer and Donaldson, 1993) หรือไม่ก็วัน แต่ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ในปริมาณที่ใกล้เคียงหรือดีกว่าวิธีการใช้ฮอร์โมนผสมในอาหาร อย่างไรก็ตาม มีรายงานถึงการแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแช่อยู่บ้างแล้ว แต่ข้อมูลอายุปลานิลที่ไวและเหมาะสมกับการใช้ฮอร์โมนแปลงเพศนั้นขัดแย้งกัน เช่น Yang Yi (1992) รายงานการแช่ลูกปลานิลที่อายุ 21 – 30 วันหลังฟัก (dph) ในสารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 3 วัน ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 90% ในขณะที่ Fitzpatrick et. al. (1999) พบว่าการแช่ลูกปลานิลที่อายุน้อยกว่าคือ 364 CTU (ประมาณ 13dph หรือ 8-9 dph ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส) ในสารละลาย MDHT 200 ไมโครกรัม/ลิตร นาน 2 ชั่วโมง ได้ลูก

ปลาเพศผู้ 79.3% จะเห็นได้ว่าข้อมูลการแปลงเพศปลาชนิดโดยวิธีแช่ยังมีความสับสน และขัดแย้งกันในหลายๆ เรื่อง โครงการนี้จึงถูกทำขึ้นเพื่อหาวิธีการที่จะทำให้การแปลงเพศปลาชนิดสามารถดำเนินการด้วยวิธีแช่อย่างมีประสิทธิภาพ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ได้วิธีการแปลงเพศปลาชนิดโดยวิธีการแช่ที่มีประสิทธิภาพเชิงการค้า
2. เพื่อให้ได้อุปกรณ์ที่เหมาะสมในการฟักไข่ปลาชนิดระหว่างการแช่ในสารละลายฮอร์โมน
3. เพื่อเผยแพร่วิธีการแปลงเพศโดยวิธีแช่สู่หน่วยราชการและฟาร์มเกษตรกรที่ผลิตพันธุ์ปลานิลจำหน่าย

ระเบียบวิธีวิจัย

ทำการทดลองหาวิธีการแปลงเพศปลาชนิดโดยวิธีแช่ที่มีประสิทธิภาพเชิงการค้า โดยแบ่งการทดลองออกเป็นทดลองย่อยๆ ดังนี้

1. การทดลองหาอายุที่เหมาะสมในการแช่แปลงเพศปลาชนิดที่ความหนาแน่นต่ำ
2. การทดลองหาความเข้มข้นและระยะเวลาของ MT ที่ใช้แช่ในการแปลงเพศปลาชนิดที่ความหนาแน่นต่ำ
3. การทดลองหาประสิทธิภาพการแปลงเพศโดยวิธีแช่ MT ที่ความหนาแน่นสูงเปรียบเทียบกับ fluoxymesterone (FLU)
4. การออกแบบอุปกรณ์ค้นแบบประกอบการแช่
5. การทดลองภาคสนาม

ในการเก็บผลการทดลอง ต้องอนุบาลลูกปลาหลังการทดลองแช่แปลงเพศแล้ว ให้มีอายุอย่างน้อย 60 dpf หรือมากกว่า จึงจะทำการเก็บผลโดยการผ่าท้องเก็บเนื้อเยื่ออวัยวะเพศมาทำการตรวจเพศโดยวิธี Acetocarmine squash method ตามวิธีของ Guerrero and Shelton (1974) ทำการตรวจแยกเพศด้วยกล้องจุลทรรศน์ (x100)

ผลการทดลองและวิจารณ์

การทดลองที่ 1 การศึกษาอายุปลาชนิดที่เหมาะสมในการแปลงเพศปลาชนิดโดยวิธีแช่

การทดลองนี้ เริ่มทำการแช่ที่อายุประมาณ 2, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 23, 26, 30, 32 และ 35 วันหลังการผสม (day post fertilization; dpf) ที่ความหนาแน่น 35 ฟอง/ลิตร ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง โดยใช้ไข่ปลาจากแม่เดียวและไข่ที่รวมจาก 10 แม่ (รายละเอียดและผลการทดลองปรากฏในภาคผนวกที่ 1) การทดลองนี้พบว่าปลาชนิดสามารถทำการแปลงเพศโดยวิธีแช่ได้ โดยมีความไวต่อการแช่แปลงเพศผันแปรตามพันธุกรรมของแม่ปลา ไข่/ลูกปลาจากบางแม่ตอบสนองต่อการแช่แปลงเพศสูง เช่น แม่ 9 การแช่ที่อายุ 2 และ 15 dpf ทำให้ได้ลูกปลา

เพศผู้ 94.78 – 95.56% สูงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$; ตารางที่ 1.2) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมมีเพศผู้ 73.38-77.93% ในขณะที่แม่ 8 แสดงความไวต่อการแช่เพียงอายุเดียวคือ 14 dpf ได้ถูกปลาเพศผู้เพียง 89.69±1.83% สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$; ตารางที่ 1.1) เมื่อเทียบกับชุดควบคุม(เพศผู้ 69.49-76.82%) อย่างไรก็ตามการทดลองที่รวมไข่ระยะเดียวกันจาก 10 แม่ นั้น เป็นการรวมความแตกต่างของสารพันธุกรรมพ่อแม่พันธุ์ไว้ด้วยกัน พบว่า ปลาชนิดตอบสนองต่อการแช่ MT ที่อายุ 2, 5 และ 11dpf ทำให้ได้ถูกปลาเพศผู้ 86.83-87.48% สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$; ตารางที่ 1.3) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพศผู้เพียง 73.85-79.77% แสดงว่าเทคนิคการแช่มีผลต่อการแปลงเพศปลานิล โดยอายุที่ไวหรือเหมาะสมต่อการแช่แปลงเพศ คือ อายุ 2, 5 และ 11dpf อายุเหล่านี้จะอยู่ในช่วงใดช่วงหนึ่งของระยะวิกฤต (labile period) ที่ Piferrer and Donaldson (1993) รายงานว่ามีความไวต่อการแช่ฮอร์โมนที่ความเข้มข้นต่ำๆ และในระยะเวลาสั้นๆ โดยระยะวิกฤตนี้ จะเริ่มตั้งแต่ระยะที่ตัวอ่อนเริ่มมีการพัฒนาของอวัยวะเพศ (gonadal development), ไข่ฟักเป็นตัว ไปจนถึงระยะที่ถูกปลาเริ่มกินอาหาร ผลการทดลองนี้ ถูกนำเสนอในการประชุมวิชาการครั้งที่ 39 ของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ปี พ.ศ. 2544 (ภาคผนวกที่ 1) ส่วนรายงานในภาคผนวกที่ 1.2 กำลังอยู่ในขั้นตอนการส่งตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

ตารางที่ 1.1 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เพศ (±SD) ลูกปลานิลที่ได้จากการแช่ MT 500 µg/l นาน 24 ชั่วโมง ที่อายุต่างๆ ของแม่ 8

Age (dpf)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival (%)	Remark
2	69.49±7.60	19.34±10.3	11.77±10.5	62.40±11.0	control
2	71.85±9.25	20.08±2.06	8.07±7.21	65.24±7.02	
5	68.79±1.89	13.29±4.28	17.07±5.78	60.95±8.46	
8	74.71±1.99	16.09±7.19	9.69±8.68	79.05±6.72	
10	80.02±8.68	6.90±6.24	13.09±3.67	84.76±6.08	
12	80.13±3.33	8.74±3.50	11.13±3.38	82.38±6.41	
14	89.69±3.17*	1.96±3.39	7.08±4.94	35.20±19.0	
17	82.11±14.5	7.90±8.37	10.00±3.15	60.50±13.3	
23	79.22±4.76	4.57±5.06	16.21±9.49	43.33±9.94	
26	75.83±17.5	1.66±2.88	22.50±19.2	37.90±13.6	
30	72.79±11.6	3.70±6.41	20.94±8.54	27.62±5.85	
32	77.56±4.30	2.56±4.43	15.27±10.3	42.38±3.12	
35	79.14±5.20	2.39±2.10	18.46±4.26	41.40±10.0	
35	76.82±7.45	5.26±9.11	17.92±14.5	28.57±1.43	control

dpf = day post fertilization; * = significantly difference from control ($P<0.05$)

ตารางที่ 1.2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เพศ ($\pm$ SD) ลูกปลานิลที่ได้จากการแช่ MT 500 μ g/l นาน 24 ชั่วโมง ที่อายุต่างๆ ของแม่ 9

Age (dpf)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival (%)	Remark
2	77.93 $\pm$ 19.6	19.51 $\pm$ 8.70	2.57 $\pm$ 4.45	52.15 $\pm$ 1.25	control
2	94.78 $\pm$ 4.40*	3.67 $\pm$ 3.86	1.55 $\pm$ 1.37	82.86 $\pm$ 13.7	
5	82.23 $\pm$ 3.19	15.07 $\pm$ 4.00	2.69 $\pm$ 1.21	72.38 $\pm$ 8.61	
11	79.39 $\pm$ 6.75	14.36 $\pm$ 6.03	5.48 $\pm$ 1.52	89.05 $\pm$ 6.44	
13	90.42 $\pm$ 6.04	7.20 $\pm$ 5.32	1.80 $\pm$ 1.75	84.76 $\pm$ 9.72	
15	95.56 $\pm$ 3.90*	2.29 $\pm$ 2.46	2.15 $\pm$ 2.01	80.50 $\pm$ 12.0	
20	92.63 $\pm$ 8.50	3.94 $\pm$ 5.33	3.44 $\pm$ 3.34	63.80 $\pm$ 33.9	
26	85.56 $\pm$ 1.92	13.33 $\pm$ 3.34	1.11 $\pm$ 1.92	80.95 $\pm$ 2.98	
30	87.02 $\pm$ 6.82	8.86 $\pm$ 3.22	2.78 $\pm$ 4.81	58.60 $\pm$ 21.3	
32	88.10 $\pm$ 4.92	6.21 $\pm$ 6.29	4.01 $\pm$ 8.75	68.33 $\pm$ 15.5	
35	85.93 $\pm$ 1.39	7.97 $\pm$ 2.18	5.49 $\pm$ 2.13	58.60 $\pm$ 17.3	
35	73.38 $\pm$ 16.2	15.90 $\pm$ 3.65	9.73 $\pm$ 10.9	75.71 $\pm$ 3.48	control

dpf = day post fertilization; * = significantly differences from the control (P<0.05)

ตารางที่ 1.3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เพศ ($\pm$ SD) ลูกปลานิลที่ได้จากการแช่ MT 500 μ g/l นาน 24 ชั่วโมง ที่อายุต่างๆ ของแม่รวม (10 แม่)

Age (dpf)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival (%)	Remark (%)
2	79.77 $\pm$ 2.93	10.98 $\pm$ 3.50	9.88 $\pm$ 1.37	87.35 $\pm$ 5.77	control
2	87.30 $\pm$ 3.07*	6.15 $\pm$ 0.29	6.55 $\pm$ 2.86	88.66 $\pm$ 3.95	
5	86.83 $\pm$ 4.50*	5.99 $\pm$ 2.30	7.17 $\pm$ 3.01	85.36 $\pm$ 7.41	
8	75.10 $\pm$ 1.37	12.55 $\pm$ 3.60	12.92 $\pm$ 5.23	90.99 $\pm$ 2.89	
10	92.59	7.41	0	96.43	remained 1 aquarium
11	87.48 $\pm$ 4.35*	4.87 $\pm$ 1.37	7.65 $\pm$ 4.38	87.75 $\pm$ 5.77	
12	82.43 $\pm$ 7.34	11.36 $\pm$ 2.36	4.55 $\pm$ 7.88	93.99 $\pm$ 1.75	
13	76.73 $\pm$ 9.37	9.18 $\pm$ 4.10	14.09 $\pm$ 10.3	94.64 $\pm$ 6.10	
14	83.76 $\pm$ 10.4	7.94 $\pm$ 9.34	8.29 $\pm$ 1.04	84.10 $\pm$ 1.89	
15	85.36 $\pm$ 7.41	6.08 $\pm$ 5.63	8.55 $\pm$ 2.22	94.44 $\pm$ 5.09	
17	75.83 $\pm$ 14.5	11.93 $\pm$ 11.6	12.24 $\pm$ 2.96	93.76 $\pm$ 2.75	
20	79.44 $\pm$ 16.0	15.12 $\pm$ 12.7	5.43 $\pm$ 3.53	81.73 $\pm$ 15.7	
23	73.25 $\pm$ 1.78	14.98 $\pm$ 4.00	10.06 $\pm$ 4.07	93.85 $\pm$ 5.91	
26	68.35 $\pm$ 9.82	15.78 $\pm$ 8.37	14.73 $\pm$ 5.40	94.01 $\pm$ 3.91	
30	79.31 $\pm$ 2.27	9.52 $\pm$ 3.19	11.17 $\pm$ 3.12	83.33 $\pm$ 5.40	
32	67.38 $\pm$ 0.31	18.98 $\pm$ 5.98	13.08 $\pm$ 5.98	90.95 $\pm$ 5.40	
35	73.57 $\pm$ 3.95	9.90 $\pm$ 0.71	15.25 $\pm$ 2.68	75.24 $\pm$ 5.77	
35	73.85 $\pm$ 5.16	16.60 $\pm$ 9.70	9.55 $\pm$ 4.80	78.50 $\pm$ 8.63	control

dpf = day post fertilization; * = significantly differences from the control

การทดลองที่ 2 ระยะเวลาและความเข้มข้นของ MT ที่เหมาะสมกับการแช่แปลงเพศ

จากผลการทดลองที่ 1 จึงเลือกทำการทดลองกับปลา 3 อายุ คือ 2, 11 และ 14dpf ในการทดลองที่ 2 โดยที่อายุ 2 และ 11dpf เป็นอายุที่ตอบสนองต่อการแช่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่อายุ 14 dpf เป็นอายุที่ได้เพศผู้สูง (83.76 $\pm$ 5.98%) แต่ไม่แสดงความแตกต่างจากชุดควบคุม รายละเอียดแผนและผลการทดลองที่ 2 ปรากฏในภาคผนวกที่ 2 ผลการทดลองสรุปได้ว่าการแช่ MT ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัม/ลิตร ที่อายุ 2 (ตารางที่ 2.1), 11 (ตารางที่ 2.2) และ 14 dpf (ตารางที่ 2.3) สามารถเหนี่ยวนำให้ปลานิลเป็นเพศผู้ได้ 84.45-87.62, 89.45-91.43 และ 84.87-87.77% ตามลำดับ สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพศผู้อยู่ 66 – 76.83% เท่านั้น ส่วน

ระยะเวลาการแช่นาน 6-96 ชั่วโมง ถึงแม้ระยะเวลาแช่ที่นานขึ้น จะทำให้ได้เพศผู้สูงขึ้น แต่ผลการแช่ MT นาน 6-96 ชั่วโมงพบว่าไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 2.1 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เพศ ($\pm$ SD) ของลูกปลานิลที่ได้จากการแช่ MT ที่อายุ 2 dpf (57.7 CTU) ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน

Dose (μ g/L)	Duration (h)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival at sexing (%)
0	6	77.35 $\pm$ 4.01	21.41 $\pm$ 4.15	1.24 $\pm$ 0.80	95.28 $\pm$ 0.81
	12	78.77 $\pm$ 5.09	21.23 $\pm$ 5.09	0	93.19 $\pm$ 3.04
	24	80.46 $\pm$ 3.59	19.12 $\pm$ 3.78	0.42 $\pm$ 0.42	95.55 $\pm$ 1.65
	48	65.64 $\pm$ 6.81	33.21 $\pm$ 5.98	1.11 $\pm$ 1.11	96.48 $\pm$ 0.24
	72	80.69 $\pm$ 4.14	17.61 $\pm$ 4.35	1.69 $\pm$ 0.98	91.11 $\pm$ 2.84
	96	71.34 $\pm$ 5.15	26.94 $\pm$ 5.54	1.72 $\pm$ 0.68	85.24 $\pm$ 5.46
	average	76.15 $\pm$ 2.02	22.82 $\pm$ 2.02	1.03 $\pm$ 0.29	92.65 $\pm$ 1.36
250	6	75.00 $\pm$ 5.84	24.61 $\pm$ 5.99	0.39 $\pm$ 0.39	97.71 $\pm$ 0.43
	12	83.44 $\pm$ 4.36	15.60 $\pm$ 3.47	0.96 $\pm$ 0.96	91.41 $\pm$ 2.45
	24	80.12 $\pm$ 3.34	19.07 $\pm$ 3.04	0.82 $\pm$ 0.82	96.44 $\pm$ 1.07
	48	91.55 $\pm$ 1.24	7.54 $\pm$ 0.93	0.91 $\pm$ 0.91	85.96 $\pm$ 6.78
	72	89.06 $\pm$ 2.73	10.94 $\pm$ 2.73	0	95.01 $\pm$ 1.39
	96	87.53 $\pm$ 2.52	12.48 $\pm$ 2.52	0	94.04 $\pm$ 1.29
	average	84.45 $\pm$ 1.76*	15.04 $\pm$ 1.71	0.51 $\pm$ 0.25	93.43 $\pm$ 1.38
500	6	82.25 $\pm$ 5.19	17.74 $\pm$ 5.19	0	95.51 $\pm$ 1.20
	12	87.28 $\pm$ 2.25	12.72 $\pm$ 2.25	0	95.12 $\pm$ 1.07
	24	88.18 $\pm$ 5.33	13.49 $\pm$ 5.40	0.83 $\pm$ 0.83	88.60 $\pm$ 5.18
	48	86.85 $\pm$ 2.66	12.66 $\pm$ 2.79	0.49 $\pm$ 0.49	92.74 $\pm$ 3.08
	72	91.47 $\pm$ 1.84	7.77 $\pm$ 1.92	0.76 $\pm$ 0.76	79.00 $\pm$ 10.1
	96	89.70 $\pm$ 2.56	9.46 $\pm$ 3.04	0.83 $\pm$ 0.83	94.15 $\pm$ 2.06
	average	87.62 $\pm$ 1.43*	12.31 $\pm$ 1.49	0.49 $\pm$ 0.23	90.86 $\pm$ 2.15

* = Significantly higher than the control (P<0.05)

ตารางที่ 2.2 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เพศ ($\pm$ SD) ของลูกปลานิลที่ได้จากการแช่ MT ที่อายุ 11dpf
(297.2 CTU) ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่ต่างกัน

Dose (μ g/L)	Duration (h)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival at sexing (%)
0	6	69.18 $\pm$ 5.62	29.57 $\pm$ 4.62	3.39 $\pm$ 1.41	73.75 $\pm$ 6.31
	12	89.38 $\pm$ 2.13	10.62 $\pm$ 2.13	10.12 $\pm$ 1.86	70.00 $\pm$ 4.68
	24	65.63 $\pm$ 4.87	31.80 $\pm$ 4.36	2.53 $\pm$ 1.02	76.56 $\pm$ 6.52
	48	83.13 $\pm$ 11.1	16.90 $\pm$ 11.1	2.19 $\pm$ 1.34	66.88 $\pm$ 5.72
	average	76.83 $\pm$ 3.94	22.22 $\pm$ 3.68	0.95 $\pm$ 0.45	71.80 $\pm$ 2.78
250	6	91.90 $\pm$ 2.51	7.46 $\pm$ 3.01	0.64 $\pm$ 0.64	65.31 $\pm$ 2.99
	12	92.56 $\pm$ 5.00	6.96 $\pm$ 4.51	0.63 $\pm$ 0.63	66.25 $\pm$ 3.75
	24	90.00 $\pm$ 4.08	8.75 $\pm$ 3.15	0	73.13 $\pm$ 6.34
	48	91.26 $\pm$ 2.99	6.24 $\pm$ 2.40	0	72.81 $\pm$ 2.36
	average	91.43 $\pm$ 1.70*	7.35 $\pm$ 1.52	0.32 $\pm$ 0.22	69.37 $\pm$ 2.08
500	6	90.99 $\pm$ 0.81	8.36 $\pm$ 0.73	0.64 $\pm$ 0.64	75.62 $\pm$ 4.58
	12	92.87 $\pm$ 2.65	15.83 $\pm$ 3.18	1.30 $\pm$ 0.75	69.06 $\pm$ 4.77
	24	95.68 $\pm$ 2.43	6.32 $\pm$ 2.43	0	80.31 $\pm$ 2.41
	48	90.25 $\pm$ 4.35	8.47 $\pm$ 4.49	1.28 $\pm$ 0.74	64.25 $\pm$ 7.89
	average	89.45 $\pm$ 1.64*	9.74 $\pm$ 1.65	0.81 $\pm$ 0.31	72.31 $\pm$ 2.85

* = Significantly higher than the control (P<0.05)

ตารางที่ 2.3 ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์เพศ ($\pm$ SD) ของลูกปลานิลที่ได้จากการแช่ MT ที่อายุ 14 dpf (404 CTU) ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาการแช่ต่างกัน

Dose (μ g/L)	Duration (h)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival at Sexing (%)
0	6	64.63 $\pm$ 5.22	31.98 $\pm$ 4.11	3.39 $\pm$ 1.41	76.64 $\pm$ 5.18
	12	63.57 $\pm$ 4.91	26.31 $\pm$ 4.84	10.12 $\pm$ 1.86	75.50 $\pm$ 2.45
	24	66.85 $\pm$ 4.45	30.67 $\pm$ 4.31	2.47 $\pm$ 0.83	79.76 $\pm$ 4.30
	48	68.95 $\pm$ 7.74	28.86 $\pm$ 7.15	2.19 $\pm$ 1.34	77.03 $\pm$ 5.47
	average	66.00 $\pm$ 2.61	29.45 $\pm$ 2.41	4.54 $\pm$ 1.05	77.23 $\pm$ 2.06
250	6	78.76 $\pm$ 4.91	18.63 $\pm$ 3.74	2.62 $\pm$ 1.68	73.74 $\pm$ 3.98
	12	84.80 $\pm$ 5.04	13.95 $\pm$ 3.83	1.25 $\pm$ 1.25	71.77 $\pm$ 7.36
	24	89.20 $\pm$ 2.69	8.41 $\pm$ 0.95	2.39 $\pm$ 1.85	75.31 $\pm$ 0.79
	48	87.62 $\pm$ 3.20	8.48 $\pm$ 1.19	3.89 $\pm$ 2.38	83.43 $\pm$ 6.21
	average	84.87 $\pm$ 2.16*	13.49 $\pm$ 1.65	2.65 $\pm$ 0.87	76.06 $\pm$ 2.60
500	6	79.66 $\pm$ 3.50	18.01 $\pm$ 3.43	2.33 $\pm$ 0.99	83.42 $\pm$ 5.58
	12	88.87 $\pm$ 2.06	7.46 $\pm$ 2.52	3.66 $\pm$ 2.12	77.69 $\pm$ 2.60
	24	91.90 $\pm$ 4.21	7.64 $\pm$ 3.76	0.46 $\pm$ 0.46	75.01 $\pm$ 0.79
	48	90.66 $\pm$ 0.56	8.51 $\pm$ 0.80	0.83 $\pm$ 0.83	83.50 $\pm$ 3.20
	average	87.77 $\pm$ 1.81*	10.40 $\pm$ 1.71	1.82 $\pm$ 0.65	79.90 $\pm$ 1.83

* = Significantly higher than the control ($P < 0.05$)

การทดลองที่ 2 นี้ แสดงให้เห็นว่าการแช่ MT ที่ความเข้มข้นต่ำ 250 – 500 ไมโครกรัม/ลิตร ที่อายุ 2, 11 และ 14 dpf มีผลเหนี่ยวนำให้ปลานิลเป็นเพศผู้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) การทดลองนี้ยังผลการทดลองที่ 1 โดยแสดงว่า การแช่ MT ที่อายุ 2 และ 11 dpf มีความไวต่อแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแท้จริง โดยช่วงอายุที่ไวต่อฮอร์โมนภายนอกนี้ยาวนานถึง 14 dpf หรืออาจจะถึง 15 dpf นั่นคือ labile period ของปลานิลอาจจะอยู่ในช่วง 1-15 dpf ขึ้นกับอุณหภูมิ น้ำ อย่างไรก็ดีการแช่ลูกปลานิลระยะหลังการฟักเป็นตัว อาจจะได้รับผลกระทบจากอุณหภูมิที่แตกต่าง หรือการคาดเดาอายุที่ผิดพลาด เพราะลูกปลานิลเมื่อเริ่มตัวดำแล้ว (ประมาณ 7-15 dpf) ถ้าไม่ทราบวันที่ปลาวางไข่ จะคาดเดายากมาก อาจส่งผลกระทบต่อความแม่นยำหรือประสิทธิภาพการแปลงเพศโดยวิธีแช่

นอกจากนี้ การทดลองที่ 2 ยังทำการทดลองแช่ที่ความหนาแน่นต่ำ เพียง 35 ฟอง/ลิตร เท่านั้น นั่นคือถึงแม้ผลการทดลองจะออกมาดี แต่วิธีการแช่ยังไม่สามารถนำไปทำการผลิตเชิงการค้า เพราะว่าถ้ารวบรวมไข่ได้วันละ 1 กิโลกรัม คิดเป็นไข่ปลานิลประมาณ 175,000 ฟอง (คำนวณจาก 175 ฟอง/

กรัม) เมื่อต้องการแช่ที่ความหนาแน่น 35 ฟอง/ลิตร ต้องมีการเตรียมน้ำสารละลาย MT ถึง 5,000 ลิตร ใช้ MT 1.250,000 ไมโครกรัม (1.25 กรัม; เมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/ลิตร) ในการนี้ ต้องมีการเตรียมบ่อสำหรับการใช้ในการแช่ฮอร์โมนแปลงเพศปลาโดยเฉพาะ อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่ตามมาคือ ไข่ปลาที่รวบรวมได้ในแต่ละครั้ง มักไม่ใช่ไข่ระยะเดียวกัน แบ่งคร่าวๆ ได้อย่างน้อย 3 ระยะ ดังนี้

1)ระยะไข่ เป็นระยะที่ไข่ยังไม่ฟักเป็นตัว อายุประมาณ 1-5 dpf การแช่ระยะนี้เป็นการแช่ไข่ปลา ต้องมีอุปกรณ์ประกอบการแช่ เพื่อทำหน้าที่ให้ไข่ปลามีการเคลื่อนที่ไปมาตลอดเวลา มิฉะนั้นไข่จะตายระหว่างการแช่ อุปกรณ์ประกอบการแช่ที่ความหนาแน่นไม่เกิน 500 ฟอง/ลิตร สามารถใช้เครื่องมือขนาดเล็กผ่านหัวทรายในภาชนะทรงกระบอกปากแคบ (ภาคผนวกที่ 1.2) แต่ถ้าความหนาแน่นมากกว่านี้ ไข่ปลาบางส่วนที่ไม่สามารถยับเคลื่อนที่ จะตายในระหว่างการแช่ รายละเอียดอุปกรณ์ประกอบการแช่ไข่ปลาที่ความหนาแน่นสูง (20,000 ฟอง/ลิตร) ปรากฏในภาคผนวกที่ 3.2 และ 3.3

2)ระยะฟัก เป็นระยะที่ไข่ฟักเป็นตัว อายุประมาณ 5-8 dpf ลูกปลาที่ฟักใหม่ๆ จะมีลำตัวสีแดงใส่มกนอนอยู่ที่พื้น เพราะยังว่ายน้ำไม่แข็งแรง น้ำค่อนข้างสกปรก โดยเฉพาะระยะที่ไข่ฟักเป็นตัว (4-6 dpf) ลูกปลาต้องการการเปลี่ยนถ่ายน้ำใหม่ค่อนข้างมาก ทั้งนี้ขึ้นกับความหนาแน่น ถ้าความหนาแน่นต่ำ (35 ฟอง/ลิตร) สามารถแช่โดยใช้เครื่องมือขนาดเล็กผ่านหัวทราย เมื่อความหนาแน่นสูงขึ้น น้ำหรือสารละลายที่ใช้แช่ จะมีสีขาวขุ่นที่เกิดจากของเสียจากไข่ปลา ควรมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำหรือสารละลายที่ใช้แช่

3)ระยะลูกปลาตัวดำ คือลูกปลาอายุประมาณ 7-15 วัน เป็นระยะที่ลูกปลามีพัฒนาการของเม็ดสีบนลำตัวเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ลูกปลาว่ายน้ำในแนวราบและแข็งแรง การแช่ลูกปลาระยะนี้สามารถแช่ในน้ำนิ่งที่มีเครื่องมือผ่านหัวทรายช่วยเพิ่มออกซิเจนระหว่างการแช่ ลูกปลาระยะนี้เริ่มกินอาหาร ถ้ามีการให้อาหารระหว่างการแช่ จะทำให้น้ำหรือสารละลายที่ใช้แช่สกปรก อาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการแช่แปลงเพศ

อย่างไรก็ดี การแช่แปลงเพศปลาโดยใช้ผลการทดลองที่ 1 และ 2 เป็นการแช่ที่ความหนาแน่นต่ำ (35 ฟอง/ลิตร) ต้องมีการเตรียมน้ำสารละลายฮอร์โมนปริมาณมาก ถึงแม้จะเป็นสารละลายฮอร์โมนที่ความเข้มข้นต่ำ เช่น 250 ไมโครกรัม/ลิตร ในการแช่แปลงเพศควรมีการแยกแช่ตามพัฒนาการของตัวอ่อนทั้ง 3 ระยะ จึงต้องมีบ่อสำหรับการแช่แปลงเพศอย่างน้อย 3 บ่อ เมื่อทำการแช่เสร็จ ต้องมีการจัดการหรือบำบัดสารละลายฮอร์โมนหลังการแช่ เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของฮอร์โมนสู่สภาพแวดล้อม รายงานผลการทดลองที่ 2 นี้ กำลังอยู่ในขั้นตอนการส่งตีพิมพ์ในวารสารต่างประเทศ

การทดลองที่ 3 ประสิทธิภาพการแปลงเพศโดยการแช่ที่ความหนาแน่นสูง

การทดลองนี้ ประสงค์ที่จะเปรียบเทียบชนิดฮอร์โมน 2 ชนิด (MT & fluoxymesterone; FLU) และความเข้มข้น (250 & 1000 ไมโครกรัม/ลิตร) ของฮอร์โมนที่มีประสิทธิภาพในการแช่ไข่ปลานิล (2 dpf) ที่ความหนาแน่นสูง (20,000 ฟอง/ลิตร) นาน 2 วัน มีการทำการทดลองหลายครั้ง ประกอบด้วย

การทดลองที่ 3.1.1 การทดลองแช่แปลงเพศที่ความหนาแน่นสูงในระบบปิด

ใช้ไข่ปลานิลจิตรลดา 3 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น เตรียมสารละลายฮอร์โมนทั้ง 2 ชนิด ที่ความเข้มข้น 250 และ 1000 ไมโครกรัม/ลิตร ลดขนาดหน่วยทดลองให้เด็กลงเหลือปริมาตร 127.75 ± 2.89 มิลลิลิตร (ความหนาแน่น 20,394 ฟอง/ลิตร; รายละเอียดและรูปภาพปรากฏในภาคผนวกที่ 3.1) ชุบน้ำจืดเฉพาะ ethanol ในปริมาณที่เท่ากับปริมาณที่ใช้ละลายฮอร์โมน แช่ไข่ปลานาน 2 วัน พบว่า ระบบปิดไม่มีผลทำให้ไข่ปลาเสีย หรือตายระหว่างการแช่ เพราะทุกระบบ (ระบบปิด & ชุบน้ำจืด) มีไข่เสียในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือ 2.04 – 3.6% แสดงว่าระบบปิดสามารถใช้เป็นอุปกรณ์ประกอบการแช่ได้ แต่การแช่ในระบบปิดไม่มีผลต่อการแปลงเพศปลานิล (ตารางที่ 3.1.1)

ตารางที่ 3.1.1 การแช่แปลงเพศปลานิลที่ความหนาแน่นสูง (20,394ฟอง/ลิตร) ในระบบปิด นาน 2 วัน

ชนิด ฮอร์โมน	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/l}$)	เปอร์เซ็นต์เพศ			อัตราการรอด (%)
		ผู้	เมีย	ผู้+เมีย	
Alcohol	0.2ml/l	70.43 ± 2.20	21.93 ± 2.16	7.63 ± 1.46	60.30 ± 9.00
MT	250	61.24 ± 4.95	29.75 ± 5.63	9.01 ± 3.24	70.02 ± 7.30
	1000	66.29 ± 6.84	22.09 ± 5.46	11.62 ± 4.39	61.95 ± 7.42
FLU	250	67.90 ± 5.40	24.08 ± 4.79	8.02 ± 2.15	58.11 ± 2.03
	1000	71.91 ± 2.85	21.64 ± 4.29	6.44 ± 2.26	71.37 ± 1.64

การทดลองที่ 3.1.2 การทดลองแช่แปลงเพศที่ความหนาแน่นสูงด้วยระบบโต๊ะเขย่า

การทดลองนี้เปรียบเทียบ MT และ FLU ที่ความเข้มข้น 250 และ 1000 $\mu\text{g/l}$ นาน 2 วัน โดยใช้ไข่จิตรลดา 3 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่นเหมือนการทดลองที่ 3.1 รายละเอียดแผนและผลการทดลองปรากฏในภาคผนวกที่ 3.1 พบว่าเปอร์เซ็นต์เพศผู้ที่ได้จากทุกชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 3.1.2) ทำให้การแช่ระบบนี้ไม่แสดงผลต่อการแปลงเพศปลานิล

ตารางที่ 3.1.2 การเปลี่ยนแปลงเพศลูกปลาที่ความหนาแน่นสูง (20,406 ฟอง/ลิตร)
ด้วยระบบโด๊ยะเขย่า 56 รอบ/นาที นาน 2 วัน

ชนิด ฮอร์โมน	ความเข้มข้น ($\mu\text{g/l}$)	เปอร์เซ็นต์เพศ $\pm$ SD			อัตราการอด (%)
		ผู้	เมีย	ผู้+เมีย	
Alcohol	0.2ml/l	73.32 $\pm$ 3.83	6.84 $\pm$ 2.58	19.60 $\pm$ 3.36	87.67 $\pm$ 6.70
MT	250	72.50 $\pm$ 3.29	5.11 $\pm$ 1.80	21.82 $\pm$ 4.19	87.69 $\pm$ 5.31
	1000	73.78 $\pm$ 3.64	5.91 $\pm$ 0.32	19.86 $\pm$ 3.80	91.06 $\pm$ 3.07
FLU	250	75.73 $\pm$ 1.56	7.08 $\pm$ 1.33	17.24 $\pm$ 2.45	86.94 $\pm$ 6.05
	1000	71.06 $\pm$ 5.12	5.48 $\pm$ 0.91	23.47 $\pm$ 4.35	92.94 $\pm$ 2.26

การทดลองที่ 3.2 อุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่แปลงเพศที่ความหนาแน่นสูงแบบโด๊ยะเขย่า และแบบใบพัด

อุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่ทั้ง 2 แบบนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะใช้ประกอบการแช่ฮอร์โมนสำหรับแปลงเพศปลาที่ความหนาแน่นสูงโดยเฉพาะ รายละเอียดของอุปกรณ์ทั้ง 2 แบบ ปรากฏในภาคผนวกที่ 3.2 การทดลองใช้อุปกรณ์ทั้งแบบโด๊ยะเขย่าและแบบใบพัดประกอบการแช่แปลงเพศปลานิลที่อายุ 2 dpf นาน 2 วัน ที่ความหนาแน่น 15,652 ฟอง/ลิตร พบว่าปริมาณไข่เสียในระบบโด๊ยะเขย่า (2.97-3.46%) และระบบใบพัด (1.96 – 3.95%) มีค่าต่ำกว่าชุดควบคุม (ความหนาแน่น 728 ฟอง/ลิตร) ที่ฟักไข่โดยใช้ลมเป่าผ่านหัวทราย (ไข่เสีย = 4.43 $\pm$ 0.73%) แสดงว่าอุปกรณ์ทั้ง 2 แบบนี้ สามารถใช้ประกอบการแช่ไข่ปลานิลที่ความหนาแน่นสูงมากกว่าชุดควบคุมถึง 21.5 เท่า โดยไม่ทำให้มีไข่เสียเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม เปอร์เซ็นต์เพศผู้ที่ได้จากการแปลงเพศด้วยระบบโด๊ยะเขย่า (68-78%) และใบพัด (68-72%) ไม่ว่าจะใช้ MT หรือ FLU พบว่ามีค่าต่ำกว่าชุดควบคุมที่ใส่ ethanol 0.2 มิลลิกรัม/ลิตร ที่มีเพศผู้ 85.25 $\pm$ 3.16% (ตารางที่ 3.2) แต่ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ผลทางสถิติ เพราะว่าการทดลองแช่ทั้ง 2 ระบบทำการทดลองเพียง 1 ซ้ำเท่านั้น

ตารางที่ 3.2 ผลการใช้อุปกรณ์ประกอบการแช่ 2 แบบแปลงเพศปลานิล (2 dpf) ที่ความหนาแน่นสูง (15,652 ฟอง/ลิตร) นาน 2 วัน ด้วยฮอร์โมน 2 ชนิดที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร

อุปกรณ์ประกอบ การแช่	ชนิดฮอร์โมน	% เพศของลูกปลา		
		ผู้	เมีย	ผู้ + เมีย
1. ระบบโต๊ะเขย่า	MT	78.00	4.00	18.00
	FLU	68.00	12.00	20.00
2. ระบบใบพัด	MT	72.34	10.64	17.02
	FLU	68.00	20.00	12.00
3. ระบบลม	Ethanol 0.2/ml	85.25±3.16	3.00±3.00	11.75±0.71

การทดลองที่ 4 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบโต๊ะเขย่าและแบบใบพัดที่ความหนาแน่นสูงและความเข้มข้นสูง

วางแผนการทดลองแบบ 2 ปัจจัย คือ ปัจจัยที่ 1) อุปกรณ์ประกอบการแช่; แบบโต๊ะเขย่าและแบบใบพัด รูปภาพและรายละเอียดปรากฏในภาคผนวกที่ 3.3 ปัจจัยที่ 2) ความเข้มข้นของ MT 5 ระดับ (5, 10, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัม/ลิตร) โดยทำการทดลอง 2 ครั้งในภาควาสตึกขนาดเล็กทดลองที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้เฉพาะน้ำที่ไม่ใส่ ethanol ใช้ไข่ปลานิลจิตรลดา 3 จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น ที่ความหนาแน่น 2,100 ฟอง/100 มิลลิลิตร (21,000 ฟอง/ลิตร) นาน 2 วัน พบว่า อุปกรณ์ประกอบการแช่แบบใบพัดที่ลดขนาดลง มักจะพัดไข่และสารละลายออกจากภาชนะแช่ นอกจากนี้ยังทำให้ไข่แตกหรือตาย (272-907 ฟอง/กล่อง) ในระหว่างการแช่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับอุปกรณ์แบบโต๊ะเขย่า (148-171 ฟอง/กล่อง) ประกอบกับไข่ที่เหลือจากการทดลองอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบใบพัด ไข่หรือตัวอ่อนทยอยตายและตายหมดในระยะต่อมา แสดงว่าอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบใบพัดที่ลดขนาดลง ไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นอุปกรณ์ประกอบการแช่ไข่ปลานิล ส่วนอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบโต๊ะเขย้านี้ พบว่าสามารถทำให้การแช่ไข่ปลานิลที่ความหนาแน่นสูงถึง 21,000 ฟอง/ลิตร นาน 2 วัน โดยมีไข่เสียเพียง 148-171 ฟอง/กล่อง (จากจำนวนเริ่มต้น 2,100 ฟอง) เท่านั้น การทดลองนี้ ทำการทดลองทั้งหมด 2 ครั้ง ผลการแปลงเพศลูกปลานิล ปรากฏในตารางที่ 4.1 และ 4.2 พบว่า การแช่ไข่ปลานิล (2 dpf นาน 2 วัน) ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5 - 80 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่มีผลทำให้ปลานิลมีเพศผู้สูงขึ้น แต่การแช่ 2 ครั้ง (2 dpf นาน 2 วัน และ 8-9 dpf นาน 1 วัน) มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยที่การแช่ครั้งที่ 2 นั้นเป็นการแช่ในระยะที่ลูกปลาเริ่มจะกินอาหาร การแช่ที่ความเข้มข้นสูงมากกว่า 20 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งผลให้ลูกปลาทาย

ตารางที่ 4.1 เพศลูกปลาเมื่อทำการแปลงเพศโดยแช่ MT ครั้งที่ 1 (2 dpf นาน 2 วัน) ครั้งที่ 2 (8 dpf นาน 1 วัน) ที่ความเข้มข้นต่างกัน ความหนาแน่นของไข่ 21,000 ฟอง/ลิตร บนอุปกรณ์แช่แบบโต๊ะเขย่า การทดลองครั้งที่ 1

ความเข้มข้นของ MT (mg/l)	เปอร์เซ็นต์เพศเฉลี่ย ($\pm$ SD)				
	male	Female	intersex	survival	abnormal
0	86.06 $\pm$ 5.84	13.96 $\pm$ 5.87	0.00	91.87 $\pm$ 1.71	10.46 $\pm$ 8.22
5	93.28 $\pm$ 0.10	7.04 $\pm$ 0.64	0.00	97.48 $\pm$ 4.36	0.85 $\pm$ 1.47
2 nd 5	81.96 $\pm$ 4.59	18.04 $\pm$ 4.61	0.00	90.29 $\pm$ 4.35	13.27 $\pm$ 9.81
10	83.84 $\pm$ 2.81	15.06 $\pm$ 2.36	0.56 $\pm$ 0.97	93.77 $\pm$ 2.75	1.49 $\pm$ 1.66
2 nd 10	69.68 $\pm$ 4.59	29.25 $\pm$ 2.52	1.08 $\pm$ 1.87	89.20 $\pm$ 5.39	3.33 $\pm$ 3.34
20	90.39 $\pm$ 2.93	9.71 $\pm$ 3.01	0.00	80.47 $\pm$ 5.67	1.16 $\pm$ 1.02
2 nd 20	77.76 $\pm$ 17.23	22.25 $\pm$ 17.23	0.00	87.71 $\pm$ 4.86	9.95 $\pm$ 11.55
40	88.31 $\pm$ 4.50	10.90 $\pm$ 3.13	0.00	93.95 $\pm$ 1.39	5.45 $\pm$ 1.06
2 nd 40 เหลือ 1 ตัว	64.52	14.75	6.45	86.67	10.34
80	86.66 $\pm$ 5.77	13.33 $\pm$ 5.78	0.00	94.87 $\pm$ 1.68	0.00
2 nd 80	ตายหมด	ตายหมด	ตายหมด	ตายหมด	ตายหมด

หมายเหตุ 2nd คือ ลูกปลาผ่านการแช่ครั้งที่ 1 แล้วนำมาแช่ครั้งที่ 2 ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้นที่กำหนด

ตารางที่ 4.2 เพศลูกปลาเมื่อทำการแปลงเพศโดยแช่ MT ครั้งที่ 1 (2 dpf นาน 2 วัน) ครั้งที่ 2 (9 dpf นาน 1 วัน) ที่ความเข้มข้นต่างกัน ความหนาแน่นของไข่ 20,980 ฟอง/ลิตร บนอุปกรณ์แช่แบบโต๊ะเขย่า การทดลองครั้งที่ 2

ความเข้มข้นของ MT (mg/l)	เปอร์เซ็นต์เพศเฉลี่ย ($\pm$ SD)				
	male	Female	Intersex	Survival	abnormal
0	83.11 $\pm$ 15.97	16.55 $\pm$ 15.43	0.00	79.30 $\pm$ 19.74	2.77 $\pm$ 0.99
5	87.70 $\pm$ 2.06	13.74 $\pm$ 1.11	0.56 $\pm$ 0.97	86.22 $\pm$ 8.76	1.08 $\pm$ 1.87
2 nd 5	72.92 $\pm$ 12.68	24.84 $\pm$ 11.36	2.24 $\pm$ 1.94	90.88 $\pm$ 9.20	1.08 $\pm$ 1.87
10	84.29 $\pm$ 5.20	13.48 $\pm$ 4.33	2.22 $\pm$ 1.92	84.86 $\pm$ 14.32	3.03 $\pm$ 3.25
2 nd 10	64.42 $\pm$ 11.78	32.25 $\pm$ 9.72	3.33 $\pm$ 5.77	85.79 $\pm$ 11.93	1.15 $\pm$ 1.99
20	87.22 $\pm$ 4.19	11.67 $\pm$ 4.42	1.11 $\pm$ 1.92	93.36 $\pm$ 5.13	0.00
2 nd 20	53.44 $\pm$ 8.83	38.09 $\pm$ 10.51	8.48 $\pm$ 4.75	88.92 $\pm$ 6.12	6.79 $\pm$ 8.75
40	85.24 $\pm$ 8.52	14.76 $\pm$ 8.52	0.00	86.51 $\pm$ 10.24	0.00
2 nd 10	51.72 $\pm$ 8.59	45.05 $\pm$ 6.46	3.23 $\pm$ 3.22	80.46 $\pm$ 12.19	3.41 $\pm$ 0.07
80	73.44 $\pm$ 8.12	25.00 $\pm$ 5.42	1.57 $\pm$ 2.72	73.90 $\pm$ 36.89	6.26 $\pm$ 5.42
2 nd 10	53.89 $\pm$ 4.09	39.69 $\pm$ 4.26	6.16 $\pm$ 0.16	97.85 $\pm$ 3.72	9.24 $\pm$ 0.26

หมายเหตุ 2nd คือ ลูกปลาผ่านการแช่ครั้งที่ 1 แล้วนำมาแช่ครั้งที่ 2 ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้นที่กำหนด

อุปกรณ์การแช่แบบโด้ะเขย่นนี้ได้ถูกทำการพัฒนาต่อ โดยรวมข้อดีของแบบโด้ะเขย่นที่สะดวกในการย้ายภาชนะแช่ไข่และสอร์โบนเข้า-ออกได้ง่าย และข้อดีของแบบใบพัดที่สามารถทำงานในสภาพที่ไฟฟ้าดับหรือไม่มีไฟฟ้าเข้าด้วยกัน เป็นอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบโด้ะ โยก รูปที่ 1 ที่มีรูปร่างคล้ายกับแบบโด้ะเขย่น แต่ความเร็วของหน้าโด้ะจะลดลงเหลือเพียง 18 รอบ/นาที ด้วยการทำงานของมอเตอร์ที่ต่อเข้ากับแบตเตอรี่ 70 แอมแปร์ พ่วงกับเครื่องชาร์ตแบตเตอรี่ขนาด 12 โวลท์ทำให้สามารถใช้ไฟฟ้าตามบ้านทั่วไป การทำงานของโด้ะ โยกนี้สามารถทำงานต่อเนื่องได้อย่างน้อย 6 ชั่วโมงในสภาพที่ใช้เฉพาะแบตเตอรี่ การใช้อุปกรณ์แบบโด้ะ โยกจึงมีความสะดวกและปลอดภัยต่อผู้ใช้ และใช้ปลาสูงกว่าการใช้อุปกรณ์แบบโด้ะเขย่น โดยโด้ะ โยกนี้ออกแบบสำหรับการวางถาดแช่ไข่ (2 dpf) ปลานิลเชิงการค้าจำนวน 6 ถาด แต่ละถาดใส่สารละลายสำหรับแช่ไข่ปลาประมาณ 1-2 ลิตร รับน้ำหนักรวมได้ 6-12 กิโลกรัม ทำงานต่อเนื่องนาน 1-2 วัน โดยไม่มีปัญหาทำให้ไข่ปลาตายหรือไฟฟ้าดับระหว่างการแช่



รูปที่ 1. อุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่แบบ โด้ะ โยก

การทดลองที่ 5. การทดลองภาคสนาม

การทดลองนี้เลือกดำเนินการที่บุญโฮมฟาร์ม อ. มัญจาคีรี จ.ขอนแก่น ที่มีกำลังการผลิตลูกปลานิลแปลงเพศเดือนละ 5 ล้านตัว จากการสอบถามวิธีการแปลงเพศลูกปลานิลของฟาร์มนี้ ทราบว่าทางฟาร์มนี้มีการให้ฮอร์โมนกับลูกปลาตั้งแต่อายุประมาณ 6-7 dpf ระหว่างที่อยู่ในโรงเพาะฟักด้วยการใช้ฮอร์โมนในโรงเพาะฟักนี้ อาจจะทำให้การตกค้างหรือปนเปื้อนของฮอร์โมนในน้ำที่ใช้ภายในโรงเพาะฟัก

คุณภาพของไข่ปลานิลที่บุญโฮมฟาร์ม

การทดลองภาคสนามนี้ ทำการทดลองภายใต้การทำงานร่วมกับบุญโฮมฟาร์ม เพื่อศึกษาความเหมาะสมของเทคนิคการแช่ในสภาพการทำงานจริง พบว่าการรวบรวมไข่ปลานิลของฟาร์มฯ มีการแบ่งไข่ตามพัฒนาการออกเป็น 5 ระยะ ดังตารางที่ 5.1.1 เมื่อโครงการฯ ทำการทดลองจะเลือกไข่ระยะ 1 และ 2 มาทำการทดลอง จากการศึกษาส่วนประกอบของไข่ปลาที่ใช้ทำการทดลอง พบว่าไข่ที่ใช้ในการทดลองภาคสนามทั้งหมดประกอบด้วยไข่ระยะต่างๆ หลายระยะ ดังปรากฏในตารางที่ 5.1.2

โดยสรุปไข่ปลานิลที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดที่บุญโฮมฟาร์มรวบรวมให้ประกอบด้วยไข่ระยะที่ 2 เป็นส่วนมาก ($38.21 \pm 16.07\%$) รองลงมาคือ ไข่ระยะที่ 1 ($24.89 \pm 15.04\%$), 3 ($14.26 \pm 13.44\%$) และ 4 ($1.31 \pm 3.71\%$) โดยมีไข่เสียปนอยู่ $25.6 \pm 17.67\%$ ไข่เสียมีผลต่อการแช่ฮอร์โมนแปลงเพศปลา คือ ทำให้น้ำหรือสารละลายที่ใช้แช่ เปลี่ยนเป็นสีขาว หรือสีเหลืองขุ่น (ภาคผนวกที่ 4.3) ความเข้มข้นของสีนี้จะขึ้นกับปริมาณไข่เสียและปริมาณไข่ที่อายุ 3dpf เพราะไข่เสียจะแตกระหว่างการแช่ ส่วนไข่อายุ 3dpf จะเริ่มฟักในวันที่ 2 ของการแช่ (4-5 dpf) การฟักของไข่ปลาส่งผลให้น้ำในถาดขุนสกปรกมากขึ้น ลูกปลาที่ฟักออกมาอาจจะขาดออกซิเจนตาย มีผลทำให้การแช่แปลงเพศปลานิลภาคสนามนี้ทำการแช่ได้เพียง 24 ชั่วโมงเท่านั้น ถ้าแช่นานกว่านี้จะทำให้ไข่หรือลูกปลตายมากหรือตายทั้งหมดอย่างใดก็ได้ ผลการทดลองภาคสนามนี้ตรงข้ามกับผลการทดลองแช่ที่ความหนาแน่นสูงในภาคผนวกที่ 3.1 และ 3.2 ที่สามารถทำการแช่ได้นาน 48 ชั่วโมงโดยไม่ทำให้ไข่เสียมาก

ตารางที่ 5.1.1 การแบ่งระยะของไข่/ลูกปลานิลตามพัฒนาการของตัวอ่อน

ระยะ	อายุ (วันหลังการผสม)	ลักษณะที่ปรากฏ	ข้อสังเกต
1	1 dpf	-ไข่เหลือง ยังไม่มีพัฒนาการใดๆ บนไข่ปลา	-มักมีไข่เสียปนอยู่ด้วย
2	2-3 dpf	-เริ่มมีจุดดำเล็กๆ กระจายที่ animal pole	-สังเกตได้ด้วยตาเปล่า
3	3-4 dpf	-ก่อนฟัก จุดดำรวมตัวกันเป็นตา เริ่มมีสีแดง	-เห็นตาชัดเจน ไข่ยังไม่ฟัก
4	5-6 dpf	-ลูกปลาฟักเป็นตัวแล้ว	-ตัวแดงๆ ขอบอยู่ที่พื้น
5	8-10 dpf	-ลูกปลาตัวดำหมด เริ่มกินอาหารได้	-ตัวดำทั้งหมดแล้ว

ตารางที่ 5.1.2 ส่วนประกอบของไข่ปลานิลจากบุญโฮมฟาร์มที่ใช้ในการทดลองภาคสนามทั้งหมด

ครั้งที่	สายพันธุ์ปลา	เปอร์เซ็นต์ไข่ปลานิลที่อายุต่างๆ				
		1 dpf	2dpf	3dpf	4dpf	ไข่เสีย
1	พื้นเมือง	0	59.45±3.11	37.82±3.54	0	2.73±1.06
2	พื้นเมือง	26.72	15.73	0	0	57.55
3	พื้นเมือง	34.79±5.25	35.10±18.0	0.13±0.08	0	29.9±16.4
4	พื้นเมือง	44.75±12.56	37.71±9.05	1.67±1.76	0	15.88±3.38
5	พื้นเมือง+จิตรลดา 3	41.00±1.14	57.47±1.04	1.53±0.31	0	ไม่มีข้อมูล
6	พื้นเมือง	11.49±4.00	46.32±7.11	27.19±7.86	0	15.01±2.34
7	พื้นเมือง	23.62±6.54	44.24±7.18	4.52±4.66	0.62±0.29	27.0±8.62
8	พื้นเมือง	31.29±3.57	34.4±4.87	20.07±1.74	0	14.24±0.92
9	พื้นเมือง+จิตรลดา 3	10.32±3.09	13.48±0.50	22.53±7.54	11.19±9.8	42.49±0.49
	เฉลี่ย	24.89±15.04	38.21±16.07	14.26±13.44	1.31±3.71	25.60±17.67

การทดลองที่ 5.2 การทดลองแช่แปลงเพศเชิงการค้าภาคสนามที่บุญโฮมฟาร์ม I

การทดลองนี้ได้ขนน้ำประปาจากมหาวิทยาลัยขอนแก่นไปใช้ที่ฟาร์ม สำหรับการทดลองระหว่างการแช่ 24 ชั่วโมง เพื่อตัดปัญหาฮอร์โมนที่อาจปนเปื้อนอยู่ในโรงเพาะฟัก เมื่อทำการแช่เสร็จแล้ว ไข่หลังการแช่จะถูกล้างทำความสะอาด ก่อนนำไปฟักในถาดอะลูมิเนียมที่ใช้น้ำระบบปิด โดยน้ำที่ใช้ในบ่อนี้จะถูกบำบัดด้วยคลอรีน 15 ppm ก่อนเริ่มทำการทดลองประมาณ 5 วัน น้ำในบ่อนี้จะถูกสูบผ่านปั๊มขนาด 1 นิ้วจำนวน 2 ตัว นำน้ำไปพ่นลงในถาดฟักไข่ปลานิลก่อนไหลกลับลงบ่อเดิม น้ำในบ่อดังกล่าวจึงไม่น่าที่จะถูกปนเปื้อนด้วยฮอร์โมนที่ใช้ภายในโรงเพาะฟัก ทำการแช่ไข่ปลานิลในสารละลาย MT 5 – 10 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง

อนึ่ง คุณสุพงษ์ วรวงศ์ เจ้าของและผู้จัดการฟาร์มประสงค์ทราบว่า การใช้อาหารผสม MT (60 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม) ให้กับลูกปลาหลังการแช่ระยะหนึ่ง จะช่วยให้ปริมาณเพศผู้สูงขึ้นหรือไม่ ดังนั้นเมื่อทำการแช่ MT ครบตามระยะเวลาที่กำหนด มีการสุ่มลูกปลาที่ผ่านการแช่เพื่อรอการเก็บผลแล้ว ยังมีลูกปลาเหลืออยู่จำนวนมาก จึงทำการสุ่มลูกปลาจำนวนหนึ่ง นำมาทดลองให้อาหาร MT เป็นเวลา 5 – 8 วัน โดยให้อาหารในโรงเพาะฟักผลปรากฏว่าการแช่ MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 79.49±5.43% สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพศผู้ 59.76±14.97% ในขณะที่การให้อาหาร MT หลังการแช่ 5 – 8 วัน พบว่า ทำให้ได้เพศผู้น้อยลง 50.84-62.85% ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเทียบกับชุดการทดลองที่แช่ MT 5 มิลลิกรัม/ลิตรอย่างเดียว แสดงว่าการให้อาหาร MT หลังการแช่อาจทำให้ลูกปลาได้รับ MT มากเกินไป จนส่งผลในทางตรงกันข้าม (paradox) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองที่ทำการแช่สารละลาย MT 2 ครั้ง (ภาคผนวกที่ 3.3) ที่พบว่าทำให้ได้เพศผู้น้อยลง ส่วนชุดควบคุมเปรียบเทียบกับที่

เป็นการแปลงเพศด้วยอาหารผสม MT ตามกรรมวิธีของบุญโฮมฟาร์ม ได้ลูกปลาเพศผู้ถึง $97.36 \pm 1.32\%$ ดังแสดงในตารางที่ 5.2.1

ตารางที่ 5.2.1 ผลการแช่แปลงเพศปลานิลเชิงการค้าภาคสนามที่บุญโฮมฟาร์มครั้งที่ 3 ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 24 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	ผลการแปลงเพศ (%)			
	เพศผู้	เพศเมีย	ผู้+เมีย	อัตราอด
1. ชุดควบคุมบนโต๊ะ โยก	59.76 ± 14.97^{ac}	38.32 ± 13.38^{ac}	1.92 ± 1.92	92.00 ± 5.21
2. แช่ MT 5 มก./ล.	79.49 ± 5.43^b	20.52 ± 5.43^b	0	84.89 ± 8.47
3. แช่ MT 10 มก./ล.	75.82 ± 5.40^{ab}	22.54 ± 4.85^{bd}	2.28 ± 0.84	91.33 ± 5.03
4. แช่ MT 5 มก./ล. + อาหาร MT 5 วัน	56.33 ± 6.03^c	40.23 ± 4.02^c	3.23 ± 1.39	97.11 ± 1.68
5. แช่ MT 5 มก./ล. + อาหาร MT 8 วัน	50.84 ± 11.34^c	46.19 ± 12.66^c	2.97 ± 1.52	87.33 ± 19.7
6. แช่ MT 10 มก./ล. + อาหาร MT 5 วัน	62.85 ± 8.23^{ac}	35.87 ± 6.18^{cd}	1.28 ± 1.28	94.89 ± 3.42
7. แช่ MT 10 มก./ล. + อาหาร MT 8 วัน	58.67 ± 13.32^{ac}	36.67 ± 11.02^{cd}	4.67 ± 1.33	95.56 ± 4.68
8. การแปลงเพศด้วยอาหาร MT	97.35 ± 1.32	2.64 ± 1.32	0	98.73

หมายเหตุ : อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวตั้งแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

การทดลองที่ 5.3 การทดลองแช่แปลงเพศเชิงการค้าภาคสนามที่บุญโฮมฟาร์ม II

การทดลองนี้ ได้ถูกวางแผนที่จะเพิ่มประสิทธิภาพการแปลงเพศโดยวิธีแช่ ด้วยการลดความหนาแน่นของไข่ปลาระหว่างการแช่ลง และทำการสุ่มล่ำเลี้ยงลูกปลานิลกลับมหาวิทยาลัยขอนแก่นที่อายุ 15-20 dpf ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยการทดลองครั้งที่ 1 ทำการแช่ MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ปริมาณ 2 ลิตร ส่วนการทดลองที่ 2 และ 3 ลดขนาดภาชนะที่ใช้ทดลองลงเหลือ 100 – 200 มิลลิลิตร และเปรียบเทียบความหนาแน่นของไข่ระหว่างการแช่ที่ 5,000 – 20,000 ฟอง/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าการแช่ที่ความหนาแน่นต่ำมีค่าเฉลี่ยของลูกปลาเพศผู้สูงกว่าการแช่ที่ความหนาแน่นสูง อย่างไรก็ตามการแช่ที่ความหนาแน่นดังกล่าว พบว่าไม่มีแสดงความแตกต่างทางสถิติต่อการแปลงเพศปลานิลแต่อย่างใด ดังแสดงในตารางที่ 5.3.1, 5.3.2 และ 5.3.3

ตารางที่ 5.3.1 ผลการแปลงเพศปลานิลเชิงการค้าในภาคใหญ่ที่ความหนาแน่น 17,050 ฟอง/ 2 ลิตร ครั้งที่ 1 (mean±SD)

ชุดการทดลอง	เพศผู้ (%)	เพศเมีย (%)	ผู้+เมีย (%)	อัตราการรอด (%)
Control -	42.19	56.25	1.56	94
Control +	44.21±15.98	51.17±16.08	4.62±1.98	98.30±1.61
MT 5mg/l	45.48±4.01	46.65±5.12	7.87±3.54	95.20±2.08

หมายเหตุ: Control - คือ ไข่ปลาที่เก็บไว้ในถาดฟักไข่ของโรงเพาะฟักที่บุญโฮมฟาร์ม

Control + คือ ไข่ปลานิลที่ใส่ alcohol ในน้ำ 0.4 มิลลิลิตร/ลิตร

ตารางที่ 5.3.2 ผลการทดลองแช่แปลงเพศปลานิลที่ความหนาแน่นของไข่ต่างกัน ในถาดทดลองขนาดเล็กปริมาตร 100-200 มิลลิลิตร (mean±SD) ครั้งที่ 2

ชุดการทดลอง	ความหนาแน่น (ฟอง/ลิตร)	เพศผู้ (%)	เพศเมีย (%)	ผู้+เมีย (%)	อัตราการรอด (%)
Control -	-	38.33	60.00	1.67	98
Control +	20,005	51.56±8.53	48.02±7.94	0.43±0.85	97.70±0.93
MT 5mg/l	5,010	45.36±5.17	53.20±5.23	0.44±0.88	98.14±2.31
MT 5mg/l	10,020	51.39±6.73	46.02±8.17	2.51±2.14	97.64±0.96
MT 5mg/l	20,050	44.17±3.08	53.26±2.68	2.54±1.70	97.63±1.91
MT 5mg/l	10,025	44.12±3.74	53.04±7.48	2.84±1.01	98.75±1.08

หมายเหตุ: Control- คือ ไข่ปลาที่เก็บไว้ในถาดฟักไข่ของโรงเพาะฟักที่บุญโฮมฟาร์ม

Control + คือ ไข่ปลานิลที่ใส่ alcohol ในน้ำ 0.4 มิลลิลิตร/ลิตร

ตารางที่ 5.3.3 ผลการทดลองแช่แปลงเพศ ทำการเปรียบเทียบความหนาแน่น ในถาดขนาดเล็กปริมาตร 100-200 มิลลิลิตร ใช้ไข่ปลานิลพันธุ์พื้นเมือง (mean±SD) ครั้งที่ 3

ชุดการทดลอง	ความหนาแน่น (ฟอง/ลิตร)	เพศผู้ (%)	เพศเมีย (%)	ผู้+เมีย (%)	อัตราการรอด (%)
Control -	-	48.28	51.72	0	90.74
Control +	19,930	55.16±9.22	48.02±7.94	1.31±1.66	96.01±1.61
MT 5mg/l	4,980	63.45±19.88	34.38±18.89	2.17±1.69	96.55±1.21
MT 5mg/l	9,970	54.34±10.0	41.57±9.07	4.09±1.01	93.96±1.20
MT 5mg/l	19,930	52.68±7.36	46.90±6.72	0.42±0.85	96.11±2.27
MT 5mg/l	9,965	54.91±1.31	42.10±2.72	2.99±2.84	95.82±1.69

หมายเหตุ : Control - คือ ไข่ปลาที่เก็บไว้ในถาดฟักไข่ของโรงเพาะฟักของบุญโฮมฟาร์ม Control + คือ

ไข่ปลานิลที่ใส่ alcohol ในน้ำ 0.4 มิลลิลิตร/ลิตร

การทดลองที่ 5.4 การทดลองแช่แปลงเพศเชิงกรดไขมันที่บุญโฮม II

จากการทดลองภาคสนามที่บุญโฮม II พบว่าการแช่แปลงเพศที่ความหนาแน่น 5,000 – 20,000 ฟอง/ลิตร ไม่มีผลต่อการแปลงเพศปลานิล คณะกรรมการติดตามผลให้ข้อสงสัยถึงปริมาณ MT ที่อยู่ในสารละลายแต่ละเวลาการแช่ตลอด 24 ชั่วโมง แต่ ณ เวลานั้นโครงการฯไม่สามารถทำการวิเคราะห์ได้ คณะกรรมการจึงแนะนำให้ทำการเปลี่ยนสารละลายฮอร์โมนเป็นระยะๆ ตลอดระยะเวลาการแช่แทนทำการทดลองแช่ MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง ในถาดขนาดใหญ่เชิงการค้า จำนวน 3 ครั้ง แต่ให้ผลที่ขัดแย้งกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะอัตราการรอดตายของการทดลองบางชุดมีค่าต่ำกว่า 50% การเปลี่ยนสารละลายทุก 2, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง ปรากฏว่า ถาดทดลองที่มีการเปลี่ยนถ่ายสารละลายบ่อย มีเพศผู้สูงกว่าชุดการทดลองอื่น โดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ (รายละเอียดปรากฏในภาคผนวกที่ 4.3)

การทดลองที่ 6. ปัญหาความเข้มข้นของสารละลาย MT

ข้อสงสัยเรื่องปริมาณความเข้มข้นของ MT ในสารละลายที่เตรียมสำหรับการทดลองแช่แปลงเพศปลานิล ทำให้มีการส่งตัวอย่างสารละลายไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณ Testosterone (T) ในสารละลายด้วยวิธี RIA ที่โรงพยาบาลศรีนครินทร์ ซึ่งที่โรงพยาบาลใช้ ชุด ^{125}I RIA Kit (ICN Pharmaceuticals, Inc.) ของ Testosterone (T) ในการวิเคราะห์ พบว่าวัดค่า T ที่เวลา 15 นาทีหลังการเติม MT ได้เพียง 15.91 นาโนกรัม/มิลลิลิตร (0.32%) จากสารละลายที่เตรียมไว้ 5000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร รายละเอียดปริมาณ T ปรากฏในตารางที่ 6.1 นอกจากนี้มีการส่งตัวอย่าง MT ของ FLUKA ที่ข้าพเจ้าใช้ในการทดลองขวดล่าสุดให้ ผศ.ดร.จุลรัตน์ คนสิลปี อาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วิเคราะห์หาความบริสุทธิ์หรือปริมาณ MT ที่มีอยู่ด้วยวิธีวัด melting point ซึ่งเป็นวิธีการอย่างง่ายๆ ในการหาการปนเปื้อนของสารเคมี โดยดูจากค่า melting point ที่เปลี่ยนไป พบว่า MT ที่ข้าพเจ้าใช้ขวดล่าสุดมี ค่า melting point อยู่ในช่วง 152-166.6°C มีค่าต่างกันถึง 14.6 องศาเซลเซียส ในขณะที่ฉลากข้างขวด MT ระบุว่า มีเกรด HPLC ความบริสุทธิ์ 97% และมี melting point อยู่ในช่วง 162-168°C ต่างกันเพียง 6 องศาเท่านั้น แสดงว่าฮอร์โมน MT ที่ใช้ในการทดลองถูกปนเปื้อนตั้งแต่ตอนที่ซื้อจาก ห.จ.ก. เอ.ซี.เอส.ซินอน ซึ่งเป็นผู้แทนจำหน่ายของ FLUKA บริษัทเดียวในประเทศไทย

ตารางที่ 6.1 ปริมาณการจับของ α ที่วัดได้ในสารละลาย MT เตรียมที่ความเข้มข้นเริ่มต้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร (5000 นาโนกรัม/มิลลิลิตร) ที่เวลาต่างๆ หลังการใส่สารละลาย MT

เวลาหลังการใส่ สารละลาย MT	MT 5000 ng/ml	MT 5000 ng/ml + ไข่ปลานิล 19,068 ฟอง/ลิตร
15 นาที	15.91	15.48
30 นาที	15.45	14.76
60 นาที	15.88	14.18
2 ชั่วโมง	15.50	13.71
3 ชั่วโมง	15.98	12.57
6 ชั่วโมง	17.49	10.41
12 ชั่วโมง	17.7	9.16
24 ชั่วโมง	19.76	8.56
Absolute ethanol (non specific binding)	0.64 ± 0.12	-
บ่อกรองน้ำ	0.00	-

สรุป

การแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแช่มีประสิทธิภาพเฉพาะที่ความหนาแน่นต่ำ (35 ฟอง/ลิตร) การแช่ในสารละลาย 250 – 500 $\mu\text{g/L}$ MT นาน 1-2 วัน สามารถแปลงเป็นเพศผู้ได้ถึง 84-91% สูงกว่าชุดควบคุมที่มีเพศผู้ 66-76% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอายุที่ไวต่อการแช่แปลงเพศหรืออายุวิกฤต (labile period) คือ 2, 5, 11 และ 14 วันหลังการวางไข่หรือการผสม แต่การแช่ที่ความหนาแน่นสูง (5,000 – 20,000 ฟอง/ลิตร) ที่ความเข้มข้นของ MT 250 $\mu\text{g/L}$ ถึง 80mg/L ทำการทดลองทั้งหมด 14 ครั้งทั้งในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม พบว่าเทคนิคการแช่แปลงเพศปลานิลยังไม่ผลเชิงการค้า

ข้อเสนอแนะ

1. การแช่แปลงเพศปลานิลเชิงการค้าที่ความหนาแน่นสูงมากกว่า 35 ฟอง/ลิตร อาจไม่สามารถทำการแช่แปลงเพศโดยถ้ำพัง จำเป็นต้องใช้ปัจจัยแวดล้อมอื่น เช่น physical หรือ chemical enhancers ช่วยเพิ่มการทำงานของฮอร์โมน อาจส่งผลให้การแช่แปลงเพศปลานิลเชิงการค้าเป็นจริงได้ ดังที่ Athauda (2000) ใช้ ultrasound ซึ่งทำหน้าที่เป็น physical enhancer ชนิดหนึ่ง ในระหว่างการแช่ลูกปลานิลที่อายุ 11dpf ความหนาแน่น 100 ตัว/ลิตร ในสารละลาย MT 500 $\mu\text{g/l}$ นาน 2 ชั่วโมง พบว่าได้ลูกปลาเพศผู้ 91.75% ในขณะที่ชุดควบคุมมีเพศผู้ 63% เท่านั้น

2. คุณภาพของฮอร์โมน MT ที่ใช้ทดลอง ถึงแม้ว่าจะมีการสั่งซื้อ MT ขวดใหม่ก่อนเริ่มการทดลองทุกครั้ง แต่พบว่า MT ที่ซื้อมาถูกปนเปื้อนมาก่อนแล้ว ควรที่จะเปลี่ยนบริษัทผลิต MT หรือเปลี่ยนชนิดของฮอร์โมนเพศที่ใช้ทำการทดลอง แต่อย่างไรก็ดี การใช้ฮอร์โมนในขั้นตอนการผลิตลูกปลาเพศผู้ เป็นข้อกีดกันทางการค้าในการส่งออกปลานิลสู่ตลาดในกลุ่มประเทศยุโรป ประกอบกับการใช้ฮอร์โมนแปลงเพศปลานิลในกระชังที่ใช้กันอยู่ปัจจุบัน มีแนวโน้มที่จะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของประเทศอย่างไม่ต้องสงสัย ดังนั้น หากสามารถหาสารเคมีที่ปลอดภัย ที่เป็นที่ยอมรับได้ทั่วไป หรือใช้ physical enhancers ที่สามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแปลงเพศปลานิลเชิงการค้า นำที่จะแก้ปัญหาการส่งออกและการปนเปื้อนของฮอร์โมนสู่สภาพแวดล้อมได้อย่างถูกต้อง

ตารางเปรียบเทียบวัตถุประสงค์ของโครงการฯ

วัตถุประสงค์	ผลการดำเนินงาน
1. เพื่อให้ได้วิธีการแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแช่ที่มีประสิทธิภาพเชิงการค้า	1. ไม่สำเร็จ การแช่เฉพาะในสารละลาย MT แปลงเพศได้เฉพาะที่ความหนาแน่นต่ำเท่านั้น
2. เพื่อให้ได้อุปกรณ์ประกอบการแช่ไข่ปลานิลระหว่างการแช่สารละลายฮอร์โมน	2. ได้โต๊ะโยกต้นแบบประกอบการแช่ไข่ปลานิลที่ความหนาแน่นสูง สามารถแช่ไข่ที่ความหนาแน่นถึง 20,000 ฟอง/ลิตร นาน 1-2 วัน โดยไม่ทำให้ไข่เสีย
3. เผยแพร่วิธีการแปลงเพศโดยวิธีแช่สู่หน่วยงานของราชการและฟาร์มเอกชน	3. ดำเนินงานแล้ว แต่วิธีการแปลงเพศโดยวิธีแช่ยังไม่มีประสิทธิภาพเชิงการค้า จึงเผยแพร่เฉพาะที่บุญโฮมฟาร์มเท่านั้น

ตารางเปรียบเทียบกิจกรรมที่ดำเนินการมาตลอดระยะเวลาโครงการฯ

กิจกรรมหลัก	2542-2543		2543-3544		2544-2545		2545-2546	
	แผน	ผล	แผน	ผล	แผน	ผล	แผน	ผล
เตรียมอุปกรณ์การทดลอง	-----	-----						
การทดลองหาอายุ	-----	-----						
การทดลองหา dose&duration	-----			-----				
การทดลองชนิด&ความเข้มข้น	-----			-----				
การทดลองความหนาแน่น			-----	-----				
ออกแบบอุปกรณ์ต้นแบบ			-----	-----				
การทดลองผลภาคสนาม			-----			-----		-----
สรุปและเขียนรายงาน			-----					-----

ภาคผนวก

ปัญหาการให้อาหารแปลงเพศปลานิลและเทคนิคการแปลงเพศโดยวิธีแช่ Problems of the Orally Tilapia Sex Inversion and Immersion Techniques

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว, วงศ์ปฐม กมลรัตน์, นฤพล สุขุมาสวิน, สมศรี งามวงศ์ชน, วัฒนะ ลีลาพัทธ์
และเมธิมศักดิ์ จารยะพันธุ์

Penpun Srisakultiew^a, Wongpathom Kamonrat^b, Naruepon Sukumasavin^b, Somsri Ngamvongchon^b,
Wattana Leelapatra^b and Padermsak Jarayabhand^c

^aDepartment of Fisheries, Faculty of Agriculture, Khonkaen University 40002;

Tel/Fax: 043-362109, E-mail: penpun_s@hotmail.com,

^bDepartment of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives;

^cAquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University; Tel.: 02-2188160

บทคัดย่อ: วิธีการแปลงเพศปลานิลของไทยในปัจจุบันนิยมใช้วิธีการให้อาหารผสม 17 α - methyltestosterone (MT 60 มิลลิกรัมในอาหาร 1 กิโลกรัม ให้อาหาร MT อนุบาลลูกปลานิลตั้งแต่วันที่ลูกปลาเริ่มกินอาหาร วันละ 5 มื้อ เป็นเวลา 21-30 วัน มีผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 86 - 100% การแปลงเพศดังกล่าวมีรายงานจากต่างประเทศว่าพบ MT ตกค้างในน้ำและดินเลน เป็นปัญหาหลักของการแปลงเพศด้วยวิธีดังกล่าว ประกอบกับขั้นตอนการจัดการบ่อของทุกฟาร์ม จำเป็นที่จะต้องเปลี่ยนถ่ายน้ำหรือการล้างทำความสะอาดบ่ออนุบาลที่ให้อาหาร MT จึงมีความเป็นไปได้ที่ MT ในน้ำและดินเลนจะถูกปล่อยออกสู่ภายนอกฟาร์ม และอาจส่งผลที่ไม่อาจคาดเดาได้ต่อสิ่งแวดล้อมในบริเวณนั้น การแปลงเพศโดยวิธีแช่เป็นทางเลือกใหม่ ที่ใช้ MT ในปริมาณเพียง 5.36% ของวิธีการกิน สามารถทำการแช่แปลงเพศเชิงการค้าที่ความหนาแน่นสูงถึง 20,000 ฟอง/ลิตร นาน 1 วัน พบว่าทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 75 - 80% เทคนิคการแปลงเพศโดยวิธีแช่เป็นวิธีการที่ง่าย สะดวกในการจัดการฟาร์ม ใช้แรงงานน้อย นอกจากนี้ยังช่วยลดต้นทุนค่า MT และ แอลกอฮอล์ลงเหลือเพียง 3.25% ของวิธีการกิน ประการสุดท้ายที่สำคัญคือวิธีการแช่นั้นสามารถควบคุมฮอร์โมนที่ใช้ได้ จึงน่าจะเป็นวิธีการมีความปลอดภัยต่อผู้ใช้ ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อม

Abstract: At present, the main method used for tilapia sex inversion of Thailand is the use of 60mg 17 α -methyltestosterone (MT) in 1 kg powder feed. The MT feed is daily fed to the started feeding fry 5 times a day for 21-30 days, which resulted in 86-100% male. This method was reported a remaining of the MT in water as well as in mud of the MT nursing pond. Due to farm pond management, either a part or all water in the MT nursing ponds might be drained or cleared up at the end of the nursing period. Therefore, the MT water and mud will be released to natural water, which may affect environment around the farm. Immersion is a new alternative technique for sex reversal. The technique used only 5.36% of the MT feed. For commercial immersion, the eggs were immersed at the high density of 20,000 egg/liter for a short duration of 1 day which resulted in 75 - 80% male. Therefore, the immersion is easy, need less labour and reduce cost of MT & alcohol to be very low as 3.25% of the orally method. Nevertheless, the immersion should be the safety technique for user, consumer as well as environment.

Keywords: Tilapia, Sex inversion, Immersion, %male

บทนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีความอุดมสมบูรณ์ ดังคำโบราณที่พูดว่า "ในน้ำมีปลาในนามีข้าว" แสดงว่าข้าวกับปลามีบทบาทต่อชีวิตและความเป็นอยู่ของคนไทยมาช้านาน ปัจจุบันเกษตรกรรมเลี้ยงปลากันมากขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการเลี้ยงเพื่อการค้าหรือการเลี้ยงเพื่อการบริโภคในครัวเรือน ปลานิลเป็นปลาที่เลี้ยงง่าย โตเร็ว เนื้อมีรสชาติดี ตลาดมีความต้องการสูง เป็นที่นิยมเลี้ยงของเกษตรกรทั่วไป ปลานิลจากการเพาะเลี้ยงจึงมีผลผลิตสูงเป็นอันดับหนึ่งเมื่อเทียบกับปลาน้ำจืดชนิดอื่น โดยมีผลผลิตประมาณ 1 ใน 3 ของผลผลิตปลาน้ำจืดจากการเพาะเลี้ยงทั้งประเทศ ดังจะเห็นได้จากสถิติปริมาณปลานิลจากการเพาะเลี้ยงในปี พ.ศ. 2540 มีปริมาณสูงถึง 67,800 ตัน คิดเป็นมูลค่า 2,016.4 ล้านบาท (ฝ่ายสารสนเทศการประมง, 2543)

เกษตรกรไทยมีความต้องการพันธุ์ปลานิลสูงมาก โดยเฉพาะปลานิลเพศผู้หรือที่ชาวบ้านเรียกกันว่าปลานิลหมัน เป็นปลาที่ผ่านกระบวนการแปลงเพศด้วยการใช้ฮอร์โมนเพศผู้เหนี่ยวนำลูกปลาดังแต่ระยะที่ไม่มีเพศ ให้กลายเป็นเพศผู้ส่วนมากหรือทั้งหมด การผลิตลูกปลาด้วยกระบวนการดังกล่าวนี้ ดำเนินการในกระชังในล่อนตาที่หลาย ๆ กระชังที่กางไว้ในบ่อดิน มีข้อมูลรายงานว่าพบการตกค้างของ MT ในน้ำและดินเลนกันบ่อที่ใช้นุบาลลูกปลานิลแปลงเพศหลังจากสิ้นสุดกระบวนการแปลงเพศ 1 ครั้ง (Fitzpatrick et al., 1997) แต่กระชังอนุบาลลูกปลานิลแปลงเพศในบ่ออนุบาล แต่ละกระชังมีการเริ่มต้นและสิ้นสุดการให้อาหารผสมฮอร์โมนที่ไม่พร้อมกัน ทำให้บ่อที่กางกระชังอนุบาลลูกปลานิลได้รับอาหารผสม MT มากกว่า 1 เดือน การเปลี่ยนถ่ายน้ำจากบ่อดังกล่าว ย่อมทำให้ MT ที่ตกค้างในน้ำและดินปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม การแปลงเพศโดยวิธีนี้ น่าจะเป็นทางเลือกใหม่ ที่ใช้ฮอร์โมนลดน้อยลง มีผลทำให้ต้นทุนต่ำ แต่ที่สำคัญคือ วิธีดังกล่าวทำให้สามารถจัดการกับฮอร์โมนที่ยังเหลืออยู่ เพื่อความปลอดภัยของผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม

วิธีการแปลงเพศปลานิลในปัจจุบัน

ประเทศไทยนิยมใช้การใช้ฮอร์โมนแปลงเพศปลานิลโดยตรง วิธีการนี้เป็นวิธีที่ใช้กันอย่างแพร่หลายที่สุดทั้งในและต่างประเทศ แหล่งความรู้ของไทยอยู่ที่สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (Asian Institute of Technology; AIT) เป็นสถาบันที่ทำการถ่ายทอดความรู้และเทคโนโลยีการผลิตลูกปลานิลแปลงเพศเชิงการค้าสู่นักวิชาการและเกษตรกรทั้งคนไทยและคนต่างชาติ ทำให้มีโรงเพาะฟักปลานิลที่ใช้เทคโนโลยีนี้กระจายอยู่ในภาคกลาง ภาคตะวันออก ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือ วิธีการนี้ถูกประยุกต์และดัดแปลงเป็นอุตสาหกรรมทั้งขนาดเล็กและขนาดใหญ่ โดยมีการดำเนินงานแบ่งเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้

1. ขั้นตอนการเพาะพันธุ์ ดำเนินการในกระชังในล่อนตาดี (ขนาดตา 20 - 22 ช่อง/นิ้ว) ขนาดใหญ่ เช่นขนาด 5 x 20 x 0.9 เมตร จำนวน 10-12 กระชัง ที่กางไว้ในบ่อดินขนาด 1 ไร่ โดยมีพื้นที่กระชังเพาะประมาณ 41.25 ถึง 75% ของพื้นที่บ่อดิน มีการมัดพื้กันกระชังไว้กับหลักไม้เพื่อกันไม่ให้พื้กระชังลอยขึ้นสู่น้ำ พ่แม่พันธุ์ที่ใช้ เป็นปลานิลที่สมบูรณ์เพศแล้ว ขนาดตั้งแต่ 100 กรัม ขึ้นไป ปล่อยพ่อแม่พันธุ์ปลาในอัตราเพศผู้ : เพศเมีย = 1 : 1 ถึง 1 : 2 ที่ความหนาแน่น 0.5 ถึง 1 ตารางเมตร/คู่ ใช้อาหารเม็ดโปรตีน 28% เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในอัตรา 0.5 - 1% ของน้ำหนักพ่อแม่พันธุ์ ทุกวัน

2. ขั้นตอนการเก็บและฟักไข่ปลา ทำการแยกไข่จากปากแม่ปลาในกระชังเพาะทุก 6-7 วัน โดยทั่วไปจะได้ทั้งไข่และลูกปลาวัยอ่อน สามารถแยกตามพัฒนาการของไข่และลูกปลาได้เป็น 5 ระยะ ดังแสดงในตารางที่ 1 นำไข่ปลาที่แยกได้ระยะ 1-4 เข้าสู่โรงเพาะฟัก ทำการฟักไข่และลูกปลานิลวัยอ่อนด้วยระบบขวดและถาดที่มีน้ำไหลวนเวียนตลอดเวลา ส่วนลูกปลาระยะที่ 5 นั้นสามารถย้ายลงถาด หรือกระชังอนุบาลในโรงเพาะฟักตามความเหมาะสม เมื่อลูกปลาเริ่มกินอาหาร (อายุประมาณ 8-9 วันหลังการวางไข่) ทำการย้ายลูกปลาลงกระชังอนุบาลในบ่อดินต่อไป

ตารางที่ 1 การแบ่งพัฒนาการของไข่และลูกปลานิลวัยอ่อนที่ได้จากการเพาะในกระชังที่กางในบ่อดิน

ระยะของไข่ปลา	พัฒนาการของไข่/ลูกปลานิล	ปริมาณที่เก็บได้ (%)
1	ไข่ปลามีสีเหลืองอ่อน ไม่ปรากฏพัฒนาการที่ชัดเจนด้วยตาเปล่า	22
2	ไข่ปลาที่มีตาปรากฏที่บนไข่	20
3	ไข่ปลาก่อนการฟัก	20
4	ลูกปลาที่มีถุงไข่ใหญ่	33
5	ลูกปลาที่มีระยะคละปนกัน	5

ที่มา: Little et. al. (1995)

3. ขั้นตอนการแปลงเพศปลา ประกอบด้วย 3 ขั้นตอนย่อย ประกอบด้วย

- ก. การเตรียมลูกปลานิลที่เริ่มกินอาหาร เมื่อลูกปลานิลวัยอ่อนสามารถว่ายน้ำขึ้นสู่ผิวน้ำ (อายุประมาณ 8-9 วันหลังวางไข่) ลูกปลาจะเริ่มกินอาหาร ให้ย้ายลูกปลาลงกระชังอนุบาล ทำการนับจำนวนโดยการชั่งน้ำหนัก ลูกปลานิลที่เริ่มกินอาหารจะมีน้ำหนักประมาณตัวละ 8 – 10 มิลลิกรัม (เฉลี่ย 9 กรัม) น้ำหนักลูกปลาที่ต้องการจะขึ้นกับขนาดกระชังที่ใช้ออนุบาล ซึ่งมีได้หลายขนาด เช่น กระชังขนาด 2 x 3 x 0.5 เมตร ควรปล่อยลูกปลานิลจากการชั่งรวม 324 กรัม หรือชั่งลูกปลารวม 291.6 กรัมสำหรับกระชังอนุบาลขนาด 3 x 1.8 x 0.5 เมตร เป็นต้น เพื่อให้ได้ลูกปลานิลที่ความหนาแน่นระหว่างการอนุบาลด้วยอาหารผสมฮอร์โมนประมาณ 12 ตัว/ลิตร (Little et. al. ,1995)
- ข. การเตรียมอาหารผสมฮอร์โมน ซึ่ง 17 α - methyltestosterone (MT) ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศผู้หนัก 60 มิลลิกรัม ละลายและเจือจางในเอทานอล 95% ประมาณ 240 มิลลิลิตร ก่อนที่จะนำไปพ่นใส่ในอาหารผงหรือปลาป่น 1 กิโลกรัมที่ผ่านการล่อนแยกกระดูกและกากออกแล้ว นำอาหารไปผึ่งหรือตากไว้ในที่ร่มประมาณ 1 วันก่อนการนำไปให้ลูกปลา
- ค. ให้อาหารผสม MT แก่ลูกปลานิลที่เตรียมไว้ในกระชังข้อ ก วันละอย่างน้อย 5 ครั้ง ทุกวัน โดยแต่ละสัปดาห์ มีการปรับปริมาณอาหารในปริมาณต่างๆ กันของน้ำหนักตัว และ%การให้อาหารของแต่ละสัปดาห์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 รายละเอียดตารางการให้อาหาร MT ปลิงเพศปลานิล และตัวอย่างปริมาณอาหาร MT ที่ให้ในกระชังขนาด 3x1.8x0.5 เมตร ปลอยลูกปลาเริ่มต้นจำนวน 32,400 ตัว

การให้อาหาร ช่วงวันที่	ปริมาณอาหาร (%น้ำหนักตัว/วัน)	การอนุบาลในกระชังขนาด 3x1.8x0.5 ม.(32,400 ตัว)		
		น้ำหนักปลา (กรัม/ตัว)	อาหาร/วัน/กระชัง	รวมอาหาร/สัปดาห์ (ก.)
1 - 7	30	0.009	87.48	612.36
8 - 14	20	0.020	136.8	957.60
15 - 21	15	0.100	486	3,402.00
รวมอาหาร MT ในการอนุบาล (กรัม)				4,971.96
จำนวนลูกปลาเริ่มต้น (ตัว)				32,400
ปริมาณ MT บริสุทธิ์ (มิลลิกรัม)				298.32
อัตราการรอดตาย (%)				48.4±12.17
ผลผลิตลูกปลานิลที่ได้เมื่อสิ้นสุดขบวนการแปลงเพศ (ตัว)				15,682

ดัดแปลงจาก : Little et. al. (1995)

ปัญหาการแปลงเพศปลานิลด้วยอาหาร

การให้อาหารผสม MT ในขบวนการแปลงเพศปลานิลนั้น ต้องมีการให้อาหารในปริมาณที่มากเกินไป เพื่อประสิทธิภาพในการแปลงเพศปลา อาหาร MT ส่วนมากจะถูกลูกปลากินเข้าไป ก่อนที่จะถูกย่อยสลาย ด้วยขบวนการ reduction และ/หรือ hydroxylation (Cravedi- et al., 1993). ในการเผาผลาญอาหารและขับถ่ายของเสียออกมสู่ภายนอก จากปริมาณการใช้ MT บริสุทธิ์ 298.32 มิลลิกรัมในการแปลงเพศปลานิลจำนวน 15,682 ตัว (ตารางที่ 2) ทำให้สามารถประมาณการใช้ MT ของทั้งประเทศในกรณีที่มีผลิตปลานิลแปลงเพศ 600 ล้านตัวว่า มีการใช้ MT บริสุทธิ์ถึง 11.4 กิโลกรัม ทำให้เป็นต้นทุนเกรงถึงผลกระทบของ MT ต่อผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 3 ประมาณการใช้ 17 α - methyltestosterone บริสุทธิ์ ที่ใช้ในการแปลงเพศปลานิลของไทย

ปริมาณลูกปลานิลแปลงเพศที่ต้องการผลิต (ตัว)	ปริมาณ MT ที่ใช้
15,682	298.32 มิลลิกรัม
1	0.019 มิลลิกรัม
1,000,000	19.000 กรัม
100,000,000	1,900.000 กรัม
600,000,000	11.400 กิโลกรัม

1. ผลกระทบของ MT ต่อผู้บริโภคนั้น Johnstone et al. (1983) และ Goudie et al. (1986) รายงานว่าเมื่อสิ้นสุดขบวนการให้ MT ในขบวนการแปลงเพศปลาแล้ว พบว่ามี MT ในตัวปลาในปริมาณที่ต่ำมากมีหน่วยเป็นนาโนกรัม หรือ ส่วนในพันล้านส่วนเท่านั้น โดย MT จะไปสะสมอยู่ที่หัวและอวัยวะภายในโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ถุงน้ำดีและตับ (Goudie et al., 1986) ที่ในตัวปลา MT จะถูกย่อยสลายตัวค่อนข้างเร็ว สามารถคำนวณหาปริมาณของ MT ในตัวปลาได้จากสมการถดถอยของ Johnstone et al., (1983) และ Goudie et al., (1986) ที่คาดว่า MT ในตัวปลานิลจะลดลงเท่ากับ 100 pg/g (100 ส่วนในหนึ่งล้านล้านส่วน) ภายในวันที่ 8 และ 40 หลังจากสิ้นสุดขบวนการให้ MT แล้วตามลำดับ นั่นคือ MT จะลดลงเหลือประมาณ 100 pg/g เมื่อปลาที่มีอายุประมาณ 1 – 2 เดือน ต้องใช้ระยะเวลาการเลี้ยงต่อไปอีกไม่ต่ำกว่า 3 – 6 เดือน จึงจะปลาน้ำหนักตัวละ 500 กรัมที่ตลาดต้องการ ทั้งนี้ขึ้นกับขนาดลูกปลาเริ่มต้น สายพันธุ์ปล และวิธีการเลี้ยง ดังนั้นปริมาณ MT ที่คงเหลืออยู่น้อยมากนี้ ย่อมจะต้องถูกย่อยสลายตัวไปภายในระยะเวลาการเลี้ยงอีก 3-6 เดือนก่อนที่ปลาดังนั้นจะถูกกินเป็นอาหาร

2. ปริมาณของ MT ที่ไม่ถูกลูกปลากินจะละลายและตกตะกอนอยู่ในดินเลน ถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียและเชื้อราในดินและน้ำ ที่สามารถย่อยสลาย MT ไปเป็น CO_2 และ H_2O (Sandor and Mehdi, 1979) อย่างไรก็ตาม Fitzpatrick และคณะ (1999) พบปริมาณของ MT ในน้ำระหว่างการอนุบาลลูกปลานิลแปลงเพศประมาณ 1 – 2 $\mu\text{g/l}$ (1-2 ส่วนในหนึ่งล้านส่วน) ในวันที่ 14 และ 21 ของการให้อาหาร MT ซึ่งปริมาณ MT ในน้ำนี้จะลดลงจนตรวจวัดไม่ได้ภายใน 7 วัน หลังจากหยุดการให้อาหารผสม MT แล้ว ส่วนในดินเลนนั้น พบว่ามีปริมาณ MT อยู่ 1.4 - 1.7 $\mu\text{g/g}$ กิโลกรัมในวันที่สิ้นสุดการให้อาหารแปลงเพศ (28 วัน) แม้ว่า MT มีความไวต่อแสงแดดและมีการสลายตัวเมื่อถูกแสงแดด แต่ยังคงพบปริมาณของ MT ในดินที่ระดับ 0.8-1.6 $\mu\text{g/g}$ กิโลกรัมในอีก 3 สัปดาห์หลังจากเสร็จสิ้นขบวนการให้อาหารแปลงเพศแล้ว การสลายตัวของ MT ในดินนี้น่าที่จะบำบัดได้ด้วยการตากบ่อ โดยทั้งช่วงการตากบ่อให้ยาวนานขึ้น แต่ระบบการจัดการบ่อของไทยส่วนมากคำนึงถึงแต่ผลผลิต ยังไม่ค่อยคำนึงถึงผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม จึงใช้ระยะเวลาในการเตรียมบ่อสั้น อาจมีการตากบ่ออย่างมากเพียง 1 – 2 วันเท่านั้น ทั้งที่บ่ออนุบาลที่ใช้กางกระชังแปลงเพศลูกปลานิลนั้น แต่ละกระชังมีการเริ่มต้นและสิ้นสุดของขบวนการให้ออร์โมนที่ไม่พร้อมกัน ดังนั้นบ่อดินอนุบาลลูกปลานิล น้ำที่จะได้รับ MT ในปริมาณที่มีมากกว่า MT ที่ใช้ในการทดลองของ Fitzpatrick และคณะ (1999) ที่ทำการทดลองในตู้กระจกและตรวจวัดน้ำและดินที่ผ่านการให้ MT เพียงครั้งเดียว จึงน่าเป็นห่วงถึงปริมาณ MT ที่อาจจะตกค้างอยู่ในดินเลนกันบ่ออนุบาล การระบายน้ำออกจากบ่อ อาจจะมี MT ปนเปื้อนไปด้วย ประกอบกับระบบน้ำในฟาร์มส่วนมากเป็นระบบใช้แล้วทิ้ง น้ำทิ้งจะออกไปสู่คลองระบายน้ำในฟาร์มที่ติดต่อกับแหล่งน้ำนอกฟาร์ม ประเทศไทยยังไม่มีกฎหมายบังคับถึงปริมาณ MT ที่ตกค้างในน้ำทิ้งก่อนปล่อยออกสู่ภายนอกฟาร์ม ในขณะที่ประเทศสหรัฐอเมริกา มีข้อบังคับให้น้ำที่ทิ้งออกจากฟาร์มแปลงเพศปลาต้องมี MT ปนเปื้อนอยู่ไม่เกิน 1 $\mu\text{g/l}$ (Green และ Teichert-Coddington, 2000) ดังนั้นฟาร์มที่ผลิตลูกปลานิลแปลงเพศของอเมริกาจึงมีบ่อบำบัดน้ำ ไม่ว่าจะเป็นการบำบัดด้วยบ่อตกตะกอน หรือบ่อฝังเพื่อลดปริมาณของ MT ในน้ำก่อนนำกลับมาใช้ภายในฟาร์มอีกครั้ง หรือทิ้งน้ำออกสู่ภายนอก ด้วยวิธีการจัดการดังกล่าว Green และ Teichert-Coddington (2000) รายงานว่าการปนเปื้อนของ MT ในน้ำยังไม่น่าที่จะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของอเมริกา

เทคนิคการแปลงเพศโดยวิธีแช่

การแปลงเพศโดยวิธีแช่เป็นเทคนิคที่ทำให้การแปลงเพศสะดวกและง่ายขึ้น ด้วยการใช้ออร์โมนเฉพาะระยะที่จำเป็นในการเหนี่ยวนำให้เกิดเพศเท่านั้น ดังนั้นการแช่จึงใช้ออร์โมนในปริมาณที่น้อยลง และทำการแช่ในระยะเวลาสั้นๆ ในหน่วยของชั่วโมงหรือวัน มีผู้ทำการวิจัยมาแล้วในปลาแซลมอน (Baker และคณะ, 1988; Piferrer และ Donaldson, 1989) และปลานิล (Yang Yi, 1992; Fitzpatrick และคณะ, 1997) ซึ่งการแช่แปลงเพศปลานิลนั้นมีผลทำให้ได้เพศผู้ 90-94% และ 79.3-82% ตามลำดับ ข้อมูลที่ได้ยังไม่ชัดเจนเท่าที่ควร ดังนั้นสกว.จึงให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ เริ่มตั้งแต่ การหาอายุที่มีความไวต่อการแปลงเพศโดยวิธีแช่ของปลานิล การหาระยะเวลาและความเข้มข้นของฮอโมนชนิดของฮอโมน ความหนาแน่นระหว่างการแช่ วิธีการแช่แปลงเพศเชิงการค้า และการทดสอบผลในภาคสนาม ผลปรากฏว่า เทคนิคการแช่สามารถทำได้ง่ายจริง อายุที่มีความไวต่อการแช่ฮอโมนแปลงเพศคืออายุ 2, 5 และ 11 วันหลังการวางไข่ (เพ็ญพรรณ และคณะ, 2544) การแช่ที่มีความหนาแน่น 40 ฟอง/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 86.8-87.5% การแช่แปลงเพศเชิงการค้าสามารถทำการแช่ที่ความหนาแน่นสูงถึง 20,000 ฟอง/ลิตร แช่นาน 1 วัน ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 75 - 80% สรุปเปรียบเทียบการแปลงเพศโดยวิธีการให้อาหารและวิธีการแช่ ตั้งแต่วิธีดำเนินการไปจนถึงต้นทุนการใช้สารเคมีของแต่ละเทคนิคแสดงไว้ในตารางที่ 4 การแปลงเพศโดยวิธีแช่เชิงการค้าใช้ฮอโมนเพียง 5.36% และมีต้นทุนค่าฮอโมนและเอท-ธานอลเพียง 3.25% ของวิธีการให้อาหารเท่านั้น

ตารางที่ 4 เปรียบเทียบวิธีและต้นทุนการแปลงเพศปลานิลโดยวิธีกินและวิธีแช่

วิธีการ	การให้อาหาร MT กระชัง 2x3x0.5 ม.	การแช่ MT 40 ฟอง/ลิตร	การแช่ MT 20,000 ฟอง/ลิตร
ไข่อายุ 2 วันหลังวางไข่	-	แช่ MT 24 ชั่วโมง ↓ ฟัก 80 %	แช่ MT 24 ชั่วโมง ↓ ไข่เสีย 30% ฟัก 80%
ลูกปลาที่เริ่มกินอาหาร	36,000 ตัว ↓ ให้อาหาร MT 21 วัน อัตรารอด 50% ↓ 18,000 ตัว	32 ตัว ↓ อัตรารอด 50% ↓ 16 ตัว	11,200 ตัว ↓ อัตรารอด 50% ↓ 5,600 ตัว
ปริมาณ MT ที่ใช้ รวม	300 มิลลิกรัม 16.67 ไมโครกรัม/ตัว 100%	250 ไมโครกรัม 15.63 ไมโครกรัม/ตัว 93.76%	5 มิลลิกรัม 0.89 ไมโครกรัม/ตัว 5.36%
ต้นทุน รวม	150 บาท	0.1 บาท	1.525 บาท
- MT (300 บาท/กรัม)	90 บาท	0.075 บาท	1.5 บาท
- เอทธานอล (50บาท/ล.)	1,200 มล./60 บาท 0.83 สต./ตัว 100%	0.5 มล./0.025 บาท 0.625 สต./ตัว 75.30%	0.5 มล./0.025 บาท 0.027 สต./ตัว 3.25%
ลูกปลาเพศผู้	86 -100%	86.8-87.5	75 - 80%

สรุปและวิจารณ์ผล

การแปลงเพศโดยวิธีแช่ เป็นขบวนการที่ใช้ระบบการเพาะและฟักไข่เหมือนกับวิธีการให้อาหาร แต่มีข้อแตกต่างที่ เทคนิคการแช่สามารถเหนี่ยวนำให้ลูกปลาเป็นเพศผู้ได้ตั้งแต่ระยะไข่ปลาที่อายุ 2 วันหลังการวางไข่ (เพ็ญพรและคณะ, 2544) ใช้ระยะเวลาการแช่เพียง 1 - 2 วันเท่านั้น โดยแช่ที่ความหนาแน่นต่ำคือ 40 ฟอง/ลิตร และความหนาแน่นสูงถึง 20,000 ฟอง/ลิตรสำหรับการแช่เชิงการค้า เมื่อสิ้นสุดขบวนการแช่แล้ว ไข่ปลาจะถูกนำมาฟักต่อในระบบเพาะฟักปลานิลทั่วไป เมื่อลูกปลาเริ่มกินอาหาร สามารถอนุบาลลูกปลาในบ่อดินโดยไม่ต้องใช้กระชัง ทำให้ประหยัดกระชังและค่าแรงในการทำความสะดวกและซ่อมแซมกระชัง สะดวกในการจัดการบ่อ มีการใช้ฮอร์โมนเพื่อการแช่เพียง 5.36% ของวิธีการให้อาหาร ทำให้ต้นทุนลดลงเหลือเพียง 3.25% ของวิธีการให้อาหาร แต่วิธีการแช่มีปัญหาเรื่องประสิทธิภาพในการแปลงเพศคือทำให้ได้เพศผู้เพียง 75 - 80% เท่านั้น ในขณะที่การแปลงเพศโดยวิธีการให้อาหารในภาสนาม ให้ลูกปลาเพศผู้ประมาณ 86-100% (Bhujel, 1998; ตารางที่ 4)

ปัญหาเรื่องการตกค้างของ MT ในสิ่งแวดล้อมรอบๆ ฟาร์มผลิตลูกปลานิลแปลงเพศของไทยนั้น ยังไม่มีผู้ใดศึกษา แต่มีข้อมูลของ Fitzpatrick และคณะ (1999) ที่ทำการตรวจวัดดินในตู้กระจกเมื่อสิ้นสุดขบวนการให้อาหารแปลงเพศ 1 ครั้ง และตรวจดินชุดเดียวกันนี้ในอีก 3 สัปดาห์ต่อมา พบว่ามี MT ในดินอยู่ 1.4 -1.7 และ 0.8-1.6 μg กิโลกรัม ตามลำดับ จึงเป็นที่น่าวิตกกังวล MT ที่ใช้ในการแปลงเพศ ซึ่งประมาณว่าน่าจะมีการใช้สูงถึง 11.4 กิโลกรัมในการแปลงเพศลูกปลานิล 600 ล้านตัวของไทยทั่วประเทศ (ตารางที่ 3) หากสามารถพัฒนาการแปลงเพศโดยวิธีแช่ให้มีประสิทธิภาพใกล้เคียงวิธีการให้อาหาร คือให้ได้ลูกปลาเพศผู้ประมาณ 90 - 95% น่าที่จะช่วยลดปริมาณการใช้ MT ลงเหลือเพียง 0.611 กิโลกรัมเท่านั้น ปัญหาผลกระทบของ MT ต่อสิ่งแวดล้อมน่าจะลดลง ประกอบกับวิธีการแช่สามารถควบคุมการใช้และการจัดการกับฮอร์โมนที่ใช้แล้ว ดังนั้นเทคนิคการแปลงเพศโดยวิธีแช่ จึงน่าจะมีความปลอดภัยลดผลกระทบของ MT ต่อสิ่งแวดล้อมที่อาจจะมียูหรือเกิดขึ้นในปัจจุบันและในอนาคตได้เป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- ฝ่ายสถิติและสารสนเทศการประมง. 2543. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย ปี พ.ศ. 2540. เอกสารฉบับที่ 5/2543. กองเศรษฐกิจการประมง. กรมประมง. หน้า 19-27.
- เพ็ญพรณ ศรีสกุลเตียว, วงศ์ปฐม กมลรัตน์, นฤพล สุขุมาสวิน, สมศรี งามวงศ์ชน, วัฒนะ ลีลาภัทร, สุชิน ทองมีและ เติมศักดิ์ จารยะพันธุ์. 2544. อายุที่เหมาะสมกับการแปลงเพศโดยวิธีแช่: ไข่จากแม่เดี่ยวและแม่รวม. การประชุมวิชาการครั้งที่ 39. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, บางเขน, กรุงเทพฯ.
- Baker, I.J., Solar, I.I. and Donaldson, E.M. 1988. Masculinization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatment using 17 α -methyltestosterone around the time of hatching. *Aquaculture*. 72:3-4:359-369.
- Bhujel, R. 1998. Fry quality in the main factor behind the success of AIT's joint venture tilapia hatchery. *AASP Newsletter*. Asian Institute of Technology (AIT): 3(2)3-4.

- Cravedi, J.P., Delous, G., Debrauwer, L. and Prome, D. 1993. Biotransformation and branchial excretion of 17α -methyltestosterone in trout. *Drug Metabolism and Disposition*. 21:377-385.
- Fitzpatrick, M.S., Contreras-Sanchez, W.M., Milston, R.H., Lucero, M., Feist, G.W. and Schreck, C.B. 1997. Steroid immersion for masculinization of tilapia. *Pond Dynamics/Aquaculture Collaborative Research Support Program. Fifteenth Annual Technical Report* 1 August 1996 to 31 July 1997. Oregon State University. pp. 29-34.
- Fitzpatrick, M.S., Contreras-Sanchez, W.M., Milston, R.H., Hornick, R., Feist, G.W. and Schreck, C.B. 1999. Detection of MT in aquarium water after treatment with MT food. In: K. McElwee, D. Burke, M. Niles and H. Egna (eds.) *Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/ Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon*, pp.81-84.
- Goudie, C.A., Shelton, W.L. and Parker, N.C. 1986. Tissue distribution and elimination of Radiolabelled methyltestosterone fed to sexually undifferentiated blue tilapia. *Aquaculture*. 358:215-226.
- Green, B.W. and Teichert-Coddington, D.R. 2000. Human food safety and environment assessment of the use of 17α -methyltestosterone to produce male tilapia in the United States. *Journal of the World Aquaculture Society*. 31:3:337-357.
- Johnstone, R., Macintosh, D.J. and Wright, R.S. 1983. Elimination of orally administered 17α -methyltestosterone by *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) and *Salmo gairdneri* (Rainbow trout) juveniles. *Aquaculture*. 35: 249-257.
- Little, D.C., Lin, C.K. and Turner, W.A. 1995. Commercial scale tilapia fry production in Thailand. *World Aquaculture*. 26(4):20-24.
- Piferrer, F. and Donaldson, E.M. 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*. 11:251-262.
- Sandor, T. and Mehdi, A.Z. 1979. Steroids and evolution. P.1-72. In: E.J.W. Barrington. Editor. *Hormone and Evolution*. Academic Press, New York. U.S.A.
- Yang Yi, 1992. Investigation into the immersion of known-age *Oreochromis niloticus* juveniles for hormone sex reversal. M.Sc. Thesis, Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand. 144pp.

โครงการนี้ได้รับการสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

อายุปลาที่ผสมที่เหมาะสมกับการเปลี่ยนเพศผู้โดยวิธีแช่ไข่จากแม่เดี่ยวและแม่รวม

Appropriate Age for Male Sex Inversion of Egg/fry from Single and Pooled Tilapia females

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดี่ยว¹ วงศ์ปฐม กมลรัตน์² นฤพน สุขุมาสวิน² สมศรี งามวงศ์ชน²

วัณณะ ลีลาพัทร² สุชิน ทองมี² และ เปตมศักดิ์ จารยะพันธุ์³

Penpun Srisakultiew¹, Wongpathom Kamonrat², Naruepon Sukumasavin², Somsri Ngamvongchon², Wattana

Leelapatra², Suchin Thongmee², and Padermsak Jarayabhand³

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ที่จะหาอายุของไข่/ปลาที่มีความไวต่อการเปลี่ยนเป็นเพศผู้โดยวิธีแช่ เริ่มจากการเลือกไข่ที่มีอายุประมาณ 1 วันหลังการผสม จากปากแม่ปลานิลจิตรลดา 3 แยกเป็นชุดแม่เดี่ยว (แม่ 8 และ แม่ 9) และชุดรวมไข่ (10 แม่) สุ่มแช่ที่อายุ 2, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 23, 26, 30, 32 และ 35 วันหลังการผสม ในสารละลาย MT 500 µg/l ที่ความหนาแน่น 35/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง อนุบาลลูกปลาด้วยอาหารโปรตีน 28% จนมีอายุครบ 2 เดือน ทำการตรวจเพศลูกปลาพบว่า ในชุดแม่เดี่ยวคือแม่ 8 ลูกปลาที่แช่ MT ที่อายุ 14 วันหลังการผสม ได้เพศผู้ 89.69±1.83% สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพศผู้ 69.49±4.39 – 76.82±4.30% ส่วนแม่ 9 การแช่ MT ที่อายุ 2 และ 15 วันหลังการผสม ได้ลูกปลาเพศผู้ 94.76±2.54 และ 95.56±2.25% ตามลำดับ เพศผู้ที่ได้สูงกว่าชุดควบคุมที่มีเพศผู้ 73.38±9.39 – 77.93±11.3% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ส่วนชุดแม่รวมการแช่ MT ที่อายุ 2, 5 และ 11 วันหลังการผสม มีผลให้ได้เพศผู้ 87.30±1.77, 86.83±2.60 และ 87.48±2.5% ตามลำดับ สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพศผู้ 74.91±3.34-79.77±1.69% อายุที่เหมาะสมต่อการแช่ MT แปลงเพศเชิงการค้าคือ อายุ 2 วันหลังการผสม

ABSTRACT

Aim of the present study was to find out sensitive age of tilapia egg/fry for male sex reverse by hormonal immersion. The 1 day post fertilized (dpf) egg batches were collected individually from the female's mouth of Chitralada 3 strain and separated into 1) single batch (No. 8 and No. 9) and 2) pooled batch (mixed eggs from 10 females). The egg/fry were randomly sampled at day 2, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 23, 26, 30, 32 and 35 dpf and then immersed in 500 µg/l MT at the density of 35/l for 24 hr. The fry were fed with 28% protein diet until 2 month old. They were then randomly sampled for sex determination by acetocamine squash method. In single batch, immersion of the No. 8 at 14 dpf resulted in 89.69±1.83% male which was significantly difference (P<0.05) from those of the controls (69.49±4.39-76.82±4.30% male). The No. 9 in comparison showed significantly (P<0.05) male when immersed at 2 and 15 dpf (94.78±2.54 and 95.56±2.25% male, respectively) while the male in the controls were 73.38±9.38-77.93±11.3%. For the pooled batch, the immersion at 2, 5 and 11 dpf resulted in 87.30±1.77, 86.83±2.60 and 87.48±2.51% male, respectively, which were significantly differences (P<0.05) when compared to those of the controls (74.91±3.34-79.77±1.69%). The appropriate age of the tilapia for commercially MT immersion was concluded at 2 dpf.

1 Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Khonkaen, Khonkaen University, Thailand

2 Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives

3 Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Thailand

สาขาประมง

คำนำ

การผลิตลูกปลานิลเฉพาะเพศผู้สามารถทำได้หลายวิธี ตั้งแต่ 1) การคัดแยกเพศด้วยมือ โดยดูความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียที่ดึ่งเพศ วิธีการนี้ต้องใช้แรงงานและคนที่มีประสบการณ์ในการแยกเพศปลานิล 2) การใช้ฮอร์โมนแปลงเพศปลา เป็นวิธีการที่นิยมใช้มากที่สุดในปัจจุบัน โดยการใช้ฮอร์โมนเพศผู้ เช่น 17 α methyltestosterone (MT) 30-60 มิลลิกรัมผสมในอาหาร 1 กิโลกรัม นำไปเลี้ยงลูกปลาตั้งแต่เริ่มกินอาหารเป็นเวลา 24-30 วัน ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 100% (Tayamen and Shelton, 1978) วิธีการนี้ต้องใช้แรงงานคนในการทำความสะอาดตู้หรือบ่อทดลองแปลงเพศมาก Buddle (1984) จึงทำการทดลองแปลงเพศปลานิลลูกผสม (O. niloticus + O. aureus) ในกระชังที่กางไว้ในบ่อดิน เป็นเวลา 25-28 วัน พบว่าได้ลูกปลาเพศผู้ 96% สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT) ได้นำวิธีการนี้มาพัฒนาต่อ โดยทำการเพาะพันธุ์ปลานิลในกระชังที่กางไว้ในบ่อดิน เก็บไข่จากปากแม่ปลาสดๆ ละ 1 ครั้ง ฟักไข่ในขวดพลาสติกและในถาดอลูมิเนียม เมื่อลูกปลาเริ่มกินอาหารจึงย้ายลูกปลาไปอนุบาลในกระชังที่กางไว้ในบ่อดิน อนุบาลด้วยอาหารผสม MT 60 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลา 21 วัน พบว่าได้ลูกปลาเพศผู้ 97-100% (Little and Turner, 1995; Ponza, 1996) บัดนี้ AIT ได้เผยแพร่เทคนิคสู่โรงเพาะฟักเอกชน พบว่าเกษตรกรสามารถผลิตลูกปลาเพศผู้ได้ 85.6-100% (Bhujel, 1998) ทั้งนี้ขึ้นกับระดับการนำเทคนิค AIT ไปปฏิบัติงานภาคสนามของแต่ละฟาร์ม (Little and Turner, 1995) แต่วิธีการแปลงลูกปลานิลในกระชังในบ่อดินนี้ จะมีฮอร์โมนเหลือและตกค้างทั้งในน้ำและเลน ดังรายงานของ Fitzpatrick et al. (1999a) ที่ทำการวิเคราะห์หาปริมาณของ MT ในน้ำที่ใช้ออนุบาลลูกปลาแปลงเพศ พบว่ามี MT อยู่ประมาณ 2 $\mu\text{g/l}$ ในวันที่ 21 ของการให้อาหารผสม MT และจะสลายตัวหมดภายใน 1 สัปดาห์หลังจากเสร็จกระบวนการให้อาหาร ส่วนในเลนกันบ่อนั้น Fitzpatrick et al. (1999a) รายงานว่าเมื่อให้อาหารผสม MT ครบ 28 วันแล้ว พบ MT อยู่ในเลนประมาณ 1.4-1.7 $\mu\text{g/kg}$ และลดลงเหลือ 0.8-1.6 $\mu\text{g/kg}$ ในอีก 3 สัปดาห์ต่อมา ซึ่งแน่นอน MT ที่ตกค้างในน้ำและเลนเหล่านี้ ย่อมส่งผลกระทบต่อผู้ที่ลงไปปฏิบัติงานในบ่อ และการเปลี่ยนถ่ายน้ำทั้งจากบ่อแปลงเพศสู่ภายนอกฟาร์มย่อมส่งผลกระทบต่อแหล่งน้ำและสิ่งแวดล้อมรอบๆ ฟาร์ม

การให้ฮอร์โมนโดยวิธีการแช่ (immersion) น่าที่จะเป็นแนวทางที่จะลดปริมาณการใช้ฮอร์โมนและง่ายในการควบคุมฮอร์โมนที่ใช้ ในการแปลงเพศลูกปลาแซลมอน (*Oncorhynchus tshawytscha*) ด้วยการแช่ลูกปลาที่เพิ่งฟักออกมาใหม่ๆ ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้นเพียง 200 $\mu\text{g/l}$ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทั้งช่วงห่างกัน 1 สัปดาห์จึงทำการแช่ซ้ำอีก 2 ชั่วโมง ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 82-100% (Baker et al., 1988) ใกล้เคียงกับผลการทดลองของ Piferrer and Donaldson (1989) ที่ทดลองแช่ลูกปลาแซลมอน (*O. kisutch*) ที่อายุ 6 วันหลังฟัก ในสารละลาย MT 400 $\mu\text{g/l}$ นาน 2 ชั่วโมงเพียงครั้งเดียว ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 73% ส่วนการแปลงเพศโดยวิธีแช่ในปลานิลนั้น Yang Yi (1992) รายงานว่าการแช่ลูกปลานิลที่อายุ 21-30 วันหลังการฟักที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ในสารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 3 วัน ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 90% ขัดแย้งกับรายงานของ Fitzpatrick et al. (1999b) ที่ทดลองแปลงเพศปลานิลด้วยวิธีแช่พร้อมกับมีการจับอุณหภูมิน้ำเทียบเป็นอายุลูกปลา (Celsius Temperature Unit : CTU = อุณหภูมิเฉลี่ยของน้ำ x จำนวนวัน) โดยแช่ลูกปลานิลอายุ 364 CTU (ประมาณ 13 วันหลังการฟัก ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส) ในสารละลาย methylidihydrotestosterone 200 $\mu\text{g/l}$ นาน 2 ชั่วโมง ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 79.3% ส่วนการแช่ที่อายุ 280 CTU (ประมาณ 10 วันหลังการผสม ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส) ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม นอกจากนี้การแช่ฮอร์โมน 2 ครั้ง ที่อายุ 280 CTU และ 364 CTU ด้วยฮอร์โมนชนิด ความเข้มข้น และระยะเวลาเดียวกัน ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 82.9% จะเห็นได้ว่าการแช่ฮอร์โมนแปลงเพศนิลที่ผ่านมานี้

สาขาประมง

ดำเนินการในช่วงอายุที่แตกต่างกัน ส่งผลให้ได้เปอร์เซ็นต์เพศผู้ต่างกัน การทดลองครั้งนี้ถูกวางแผนเพื่อหาอายุปลานิลที่เหมาะสมกับการแปลงเพศโดยวิธีเชือกอย่างมีประสิทธิภาพ

วิธีการ

อุปกรณ์

1. ไข่/ลูกปลาที่ใช้ในการทดลอง คือไข่/ลูกปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 ที่เก็บจากปากแม่ปลานิลที่เพาะในบ่อซีเมนต์ขนาด 50 ตารางเมตร (ปล่อยพ่อพันธุ์ 25 ตัว + แม่พันธุ์ 50 ตัว) ของศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น โดยทำการเก็บไข่ปลาจากแต่ละแม่แยกใส่แต่ละกะละมัง (เส้นผ่าศูนย์กลาง 8 นิ้ว) คัดเลือกเฉพาะกะละมังที่มีไข่ปลานิลอายุประมาณ 1 วันหลังการผสม (ไข่สีเหลืองอ่อน ยังไม่ปรากฏจุดสีดำๆ บนไข่ปลา) นำไปใช้ในทดลอง
2. น้ำที่ใช้ในการทดลอง คือน้ำประปาพักไว้ในถังพลาสติก 34 แกลลอน ใส่หัวทรายเป่าลม 1-3 หัว พักน้ำค้างคืนอย่างน้อย 1 คืน ก่อนนำไปใช้
3. อุปกรณ์ฟักไข่คือ ขวดน้ำดื่มพลาสติกทรงกระบอก ขนาดบรรจุน้ำ 1 ลิตร ขวดแต่ละใบมีหัวทราย 1 หัว เป่าฟองตลอดเวลา ทำให้ไข่ปลานิลขยับเคลื่อนที่จนกระทั่งไข่ฟักเป็นตัว
4. โหลอนุบาล คือ โหลพลาสติกขนาดบรรจุ 10 ลิตร มีหัวทรายโหลละ 1 หัว ใช้อนุบาลลูกปลาที่มีอายุตั้งแต่ 8-9 วันหลังการผสม เป็นเวลาประมาณ 2-4 สัปดาห์
5. ตู้อนุบาลลูกปลา เป็นตู้กระจกขนาด 15x15x30 นิ้ว แต่ละตู้มีหัวทราย 1 หัว น้ำทั้งจากแต่ละตู้ จะไหลเข้าสู่บ่อกรองน้ำที่มีระบบบำบัดทางชีวภาพ ก่อนนำกลับมาใช้อีก ใช้ตู้อนุบาลลูกปลาเป็นเวลานาน 4-6 สัปดาห์ หรือจนลูกปลาได้ขนาดที่สามารถตรวจเพศได้อย่างถูกต้อง
6. ฮอโมนเพศผู้ที่ใช้คือ 17 α methyltestosterone (MT; Fluka) ทำการเตรียมฮอโมนเริ่มต้น (stock solution) ที่ความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/ลิตร ละลายในเอทานอลบริสุทธิ์ (BDH)
7. อาหารที่ใช้อนุบาลคือ อาหารเม็ดโปรตีน 28%
8. สถานที่ทำการทดลอง ที่หมวดประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิธีการ

1. การทดลองแม่เดี่ยว ทำการคัดไข่ปลานิลระยะที่กำหนดในอุปกรณ์ข้อ 1 เลือกไข่จากแม่ปลาที่มีจำนวนไข่/แม่ประมาณ 3,500 ฟองขึ้นไป จำนวน 2 แม่ ทำการทดลองพร้อมกัน ส่วนการทดลองแม่วรวมนั้น ทำการรวมไข่ปลาระยะที่กำหนดจากแม่ปลาหลายตัวเข้าด้วยกัน ทำการทดลองคนละครั้งกับการทดลองแม่เดี่ยว เพราะมีข้อจำกัดที่จำนวนตู้ปลา
2. นำไข่ปลานิลชุดที่คัดเลือกมาสุ่มนับจำนวน 35 ฟอง/ขวดฟักไข่ การทดลอง 1 แม่ ใช้ขวดฟักไข่ 96 ใบ
3. สุ่มใส่ฮอโมน MT ที่เตรียมไว้ในอุปกรณ์ข้อ 6 จำนวน 0.25 มิลลิลิตร/ขวด จำนวน 6 ขวด/อายุ จะได้ความเข้มข้นของฮอโมนระหว่างการแช่เป็น 500 ไมโครกรัม/ลิตร ที่อายุ 2, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 23, 26, 30, 32 และ 35 วันหลังการผสม ส่วนชุดควบคุมใส่เอทานอลบริสุทธิ์ 0.25 มิลลิลิตร/ขวด ที่อายุ 2 และ 35 วันหลังการผสม
4. ทำการแช่ไข่ในฮอโมนนาน 24 ชั่วโมง จึงล้างออกด้วยน้ำสะอาด เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน จนลูกปลามีอายุ 8-9 วันหลังการผสม รวมลูกปลาจากขวดฟักไข่ 2 ใบ ย้ายลงโหลอนุบาล 1 โหล คือ 1 อายุทดลองมี 3 ข้ำ

สาขาประมง

- รักษาระดับน้ำในโหลอนุบาลไว้ที่ระดับ 2 ลิตร จนกระทั่งลูกปลานิลถูกแช่ฮอร์โมนครบทุกอายุทดลอง หลังจากนั้นค่อยๆ เพิ่มระดับน้ำในโหลขึ้นเรื่อยๆ ตามความเหมาะสมกับขนาดและความหนาแน่นของลูกปลา
5. ในสัปดาห์แรกที่ปลาเริ่มกินอาหาร ทำการอนุบาลลูกปลานิลด้วยอาหารผง สัปดาห์ที่ 2 ใช้อาหารเม็ดแช่น้ำให้นิ่ม+อาหารผง สัปดาห์ที่ 3-5 ให้อาหารเม็ดแช่น้ำ สัปดาห์ที่ 6-8 ให้อาหารเม็ดล้วนๆ ให้อาหารวันละ 3-5 ครั้งในปริมาณที่เกินพอ ทุกวัน การอนุบาลในโหลพลาสติกทำความสะอาดโหลทุกวัน ส่วนการอนุบาลในตู้กระจกนั้นทำความสะอาดตู้สัปดาห์ละครั้ง
 6. บันทึกอุณหภูมิน้ำโดยใช้เทอร์โมมิเตอร์ Max-Min อ่านค่าอุณหภูมิสูงสุด และต่ำสุดของน้ำทุกวัน
 7. เมื่อลูกปลานิลมีอายุครบ 2 เดือน ทำการสุ่มตรวจเพศปลาจำนวนตู้ละ 30 - 50 ตัว โดยวิธี Acetocarmine squash method (Guerrero and Shelton, 1974) ตรวจแยกเพศลูกปลาจากสภาพเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100 เท่า ทำการแยกเพศเป็นเพศผู้ เพศเมีย และปลา 2 เพศ(ผู้+เมีย)
 8. ทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติ โดยแปลงค่าเพศผู้ที่ได้จากแต่ละอายุ แต่ละแม่ ด้วย arcsine transformation ก่อนทำการวิเคราะห์ด้วย ANOVA ใช้โปรแกรม Minitab 10.1 สรุปข้อมูล

ผลและวิจารณ์

การทดลองแปลงเพศปลานิลในชุดแม่เดียว (single female) เป็นการศึกษาการแปลงเพศภายในสายเลือดเดียวกัน เพื่อตัดปัญหาความแตกต่างของสายเลือดหรือพันธุกรรมของพ่อ-แม่พันธุ์ ในการทดลองนี้ได้ดำเนินการในแม่ 8 และ แม่ 9 แม่ได้เลือกชุดไข่ที่มีจำนวนมากกว่า 3,500 ฟอง/แม่สำหรับเริ่มการทดลอง แต่พบว่าไข่/ลูกปลาเสียหรือตายเป็นระยะๆ ตลอดเวลาที่สุ่มแช่ฮอร์โมน ทำให้การทดลองแม่เดียวไม่สามารถสุ่มแช่ฮอร์โมนตามอายุที่กำหนด ส่วนการทดลองชุดรวมแม่ที่ได้รวมไข่ปลาระยะที่ต้องการได้ 10 แม่ นั้น มีจำนวนไข่ปลามากเกินพอ จึงสามารถสุ่มแช่ฮอร์โมนได้ตามแผนที่วางไว้ การวิเคราะห์ผลทางสถิติจึงต้องทำการเปรียบเทียบในแต่ละแม่ ไม่สามารถนำผลของแม่ 8 และ แม่ 9 มาเปรียบเทียบโดยตรงเพราะอายุที่สุ่มไม่เหมือนกันทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า แม่ 8 มีความไวต่อการแช่ MT ที่อายุ 14 วันหลังการผสม มีผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ $89.69 \pm 1.83\%$ สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่อายุ 2 วันหลังผสม ที่มีลูกปลาเพศผู้เพียง $69.49 \pm 4.39\%$ (Table 1) ส่วนแม่ 9 นั้นมีความไวต่อการแช่ MT ที่อายุ 2 และ 15 วันหลังการผสม ทำให้ได้เพศผู้ 94.78 ± 2.54 และ $95.56 \pm 2.25\%$ ตามลำดับ สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่อายุ 2 วันหลังผสม ($77.93 \pm 11.3\%$; Table 2) แสดงว่าการแช่ MT สามารถแปลงเพศปลานิลได้ ถึงแม้แม่ 8 และแม่ 9 จะแสดงความไวต่อการแช่ MT ที่ไม่เหมือนกัน

อย่างไรก็ดีการแช่แปลงเพศปลานิลเชิงการค้า ไม่สามารถทำการแช่ที่ละแม่ เมื่อพิจารณาผลการแช่ MT ในแม่รวม พบว่ามีความไวต่อการแช่ MT คล้ายกับแม่ 9 คือที่อายุ 2, 5 และ 11 วันหลังการผสม มีผลให้ได้เพศผู้ 87.30 ± 1.77 , 86.83 ± 2.60 และ $87.48 \pm 2.51\%$ ตามลำดับ สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สาขาประมง

Table 1 Sexes of tilapia fry (mean±SE) when immersed in 500 µg/l MT for 24 hr at different ages of female number 8

Age (dpf)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival (%)	Remark
2	69.49±4.39	19.34±5.93	11.77±6.05	62.40±11.0	control
2	71.85±5.34	20.08±1.19	8.07±4.16	65.24±7.02	
5	68.79±1.09	13.29±2.47	17.07±3.34	60.95±8.46	
8	74.71±1.15	16.09±4.15	9.69±5.01	79.05±6.72	
10	80.02±5.01	6.90±3.60	13.09±2.12	84.76±6.08	
12	80.13±1.92	8.74±2.02	11.13±1.95	82.38±6.41	
14	89.69±1.83*	1.96±1.96	7.08±2.85	35.20±19.0	
17	82.11±8.37	7.90±4.83	10.00±3.55	60.50±13.3	
23	79.22±2.75	4.57±2.92	16.21±5.48	43.33±9.94	
26	75.83±17.5	1.66±1.66	22.50±19.20	37.90±13.6	
30	72.79±6.67	3.70±3.70	20.94±4.93	27.62±5.85	
32	77.56±2.48	2.56±2.56	15.27±5.97	42.38±3.12	
35	79.14±3.00	2.39±1.21	18.46±2.46	41.40±10.0	
35	76.82±4.30	5.26±5.26	17.92±8.40	28.57±1.43	control

dpf = day post fertilization; * = significantly difference from control (P<0.05)

Table 2 Sexes of tilapia fry (mean±SE) when immersed in 500 µg/l MT for 24 hr at different ages of female number 9

Age (dpf)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival (%)	Remark
2	77.93±11.3	19.51±8.70	2.57±2.57	52.15±0.72	control
2	94.78±2.54*	3.67±2.23	1.55±0.79	82.86±7.87	
5	82.23±1.84	15.07±2.31	2.69±0.70	72.38±4.97	
11	79.39±3.90	14.36±3.48	5.48±0.88	89.05±3.72	
13	90.42±3.49	7.20±3.07	1.80±1.01	84.76±5.61	
15	95.56±2.25*	2.29±1.42	2.15±1.16	80.50±12.0	
20	92.63±4.91	3.94±3.08	3.44±1.93	63.80±19.6	
26	85.56±1.11	13.33±1.93	1.11±1.11	80.95±1.72	
30	87.02±3.94	8.86±1.86	2.78±2.78	58.60±12.3	
32	88.10±2.84	6.21±3.63	4.01±5.05	68.33±8.94	
35	85.93±0.80	7.97±1.26	5.49±1.23	58.60±10.0	
35	73.38±9.38	15.90±2.11	9.73±6.28	75.71±2.01	control

dpf = day post fertilization; * = significantly differences from the control (P<0.05)

Table 3 Sexes of tilapia fry (mean±SE) when immersed in 500 µg/l MT for 24 hr at different ages of pooled 10 females

Age (dpf)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival (%)	Remark
2	79.77±1.69	10.98±2.02	9.88±0.79	87.35±3.33	control
2	87.30±1.77*	6.15±0.17	6.55±1.65	88.66±2.28	
5	86.83±2.60*	5.99±1.33	7.17±1.74	85.36±4.28	
8	75.10±0.79	12.55±2.08	12.92±3.02	90.99±1.67	
10	92.59	7.41	0	96.43	remained 1 aquarium
11	87.48±2.51*	4.87±0.79	7.65±2.53	87.75±3.33	
12	82.43±4.24	11.36±1.36	4.55±4.55	93.99±1.01	
13	76.73±5.41	9.18±2.37	14.09±5.97	94.64±3.52	
14	83.76±5.98	7.94±5.39	8.29±0.60	84.10±1.09	
15	85.36±4.28	6.08±3.25	8.55±1.28	94.44±2.94	
17	75.83±8.38	11.93±6.67	12.24±1.71	93.76±1.59	
20	79.44±9.21	15.12±7.31	5.43±2.04	81.73±9.04	
23	73.25±1.03	14.98±2.31	10.06±2.35	93.85±3.41	
26	68.35±5.67	15.78±4.83	14.73±3.12	94.01±2.26	
30	79.31±1.31	9.52±1.84	11.17±1.80	83.33±3.12	
32	67.38±0.18	18.98±3.45	13.08±3.45	90.95±3.12	
35	73.57±2.28	9.90±0.41	15.25±1.55	75.24±3.33	
35	73.85±2.98	16.60±5.60	9.55±2.77	78.50±4.98	control

dpf = day post fertilization; * = significantly differences from the control

เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่อายุ 2 วันหลังการผสม (79.77±1.69%; Table 3) ดังนั้นการแปลงเพศโดยวิธีแช่แบบอุตสาหกรรม สามารถดำเนินการด้วยการรวมไข่ปลาจากหลายๆแม่เข้าด้วยกัน แม้ว่าค่าเฉลี่ยเพศผู้ที่ได้จากแม่รวมจะมีค่าต่ำกว่าเพศผู้ที่ได้จากแม่เดี่ยว ซึ่งคงเป็นเพราะแม่รวมได้รวมความแตกต่างของสายเลือดพ่อแม่พันธุ์เอาไว้ โดยมีระยะที่ไวต่อการแช่ที่อายุ 2 (อุณหภูมิน้ำ 28.25°C; 56.5CTU; ผู้=87.30±1.77%), 5 (141.25 CTU; ผู้=86.83±2.60%) และ 11 (310.75 CTU; ผู้=87.48±2.51%) วันหลังการผสม ค่าเฉลี่ยเพศผู้ที่ได้จากการทดลองนี้มีค่าสูงกว่ารายงานของ Fitzpatrick et al. (1999b) ที่ได้ลูกปลาเพศผู้เพียง 79.3% เท่านั้น ทั้งที่ทำการทดลองแช่แปลงเพศลูกปลานิลชนิดเดียวกันที่อายุ 13 วันหลังการผสม (364 CTU ที่อุณหภูมิน้ำ 28°C) ในสารละลายฮอร์โมนเพศชนิดคือ Methyl-dihydrotestosterone (MDHT) ซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศผู้ที่น่าจะมีประสิทธิภาพดีกว่า MT ความเข้มข้นที่ใช้เท่ากันคือ 500 ไมโครกรัม/ลิตร แต่ทำการแช่ระยะสั้นเพียง 2 ชั่วโมง แทนที่จะเป็น 24 ชั่วโมงดังที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ นั่นคือระยะการแช่สารละลายฮอร์โมนของ Fitzpatrick et al. (1999b) อาจจะยังไม่นานพอที่จะแปลงเพศได้อย่างมีประสิทธิภาพ ในขณะที่ Yang Yi (1992) ทำการทดลองแช่แปลงเพศปลานิลเช่นกัน แต่ทำการแช่ในลูกปลาที่อายุ 21 - 30 วันหลังการ

ฟักที่อุณหภูมิ 27°C (ประมาณ 26-35 วันหลังการผสม หรือ 567-810 CTU) ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้นสูงถึง 5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 3 วัน ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 90% ในขณะที่การแช่ MT ที่อายุ 26 และ 35 วัน หลังการผสมในชุดแม่รวมในการศึกษาครั้งนี้ พบว่ามีเพศผู้เพียง 68.35 ± 5.67 และ $73.57 \pm 2.28\%$ โดยไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ดังนั้นการแช่แปลงเพศปลาสามารถรวมไข่ปลาระยะเดียวกันจากหลายๆ แม่ มาทำการแช่พร้อมกัน ควรทำการแช่ที่อายุ 2, 5 และ 11 วันหลังการผสม เมื่อเปรียบเทียบความเหมาะสมในการแช่แปลงเพศที่อายุดังกล่าว พบว่าการแช่ที่อายุ 2 วันหลังการผสมนี้เป็นระยะของไข่ปลา ไข่ระยะนี้สามารถคัดเลือกง่าย โดยสังเกตจากจุดสีดำเล็กๆ ที่บริเวณ animal pole ทำให้สะดวกในการคัดเลือกไข่มาแช่แปลงเพศและการแช่ในระยะไข่ปลาน่าที่จะมีความเป็นไปได้ในการแช่ที่ความหนาแน่นสูงมากว่าการแช่ลูกปลา ส่วนการแช่ที่อายุ 5 วันเป็นระยะที่ไข่เริ่มฟักออกเป็นตัว ทำให้คุณภาพน้ำระหว่างการแช่มีปัญหาและมีผลต่ออัตราการรอด ในการแช่ที่อายุ 11 วันนี้ เป็นระยะที่ลูกปลาเริ่มกินอาหารแล้ว อาหารที่ให้ลูกปลาอาจทำปฏิกิริยากับสารละลาย MT ระหว่างการแช่ ที่สำคัญการประมาณอายุลูกปลาทำได้ค่อนข้างยากเพราะมีความผันแปรขึ้นกับอุณหภูมิ ถ้าไม่ได้ฟักไข่เองตั้งแต่แรกจะประมาณอายุไม่ถูก ดังนั้นอายุที่เหมาะสมกับการแช่แปลงเพศปลาโดยวิธีแช่คือ อายุ 2 วันหลังการผสม

สรุป

อายุที่เหมาะสมกับการแช่แปลงเพศปลาแซลมอนคือ อายุ 2 วันหลังการผสม

เอกสารอ้างอิง

- Baker, I.J., Solar, I.I. and Donaldson, E.M. 1988. Masculinization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatments using 17 alpha-methyltestosterone around the time of hatching. *Aquaculture*. 72:3-4:359-369.
- Bhujel, R. 1998. Fry quality is the main factor behind the success of AIT's joint venture tilapia hatchery. *AASP Newsletter*. Asian Institute of Technology (AIT):3(2)3-4.
- Buddle, C.R. 1984. Androgen-induced sex-inversion of *Oreochromis* (Trewavas) hybrid fry stocked into cages standing in an earthen pond. *Aquaculture*. 40:233-239.
- Donaldson, E.M. and Hunter, G.A. 1982. Sex control in fish with particular reference to salmonids. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 39:99-110.
- Fitzpatrick, M.S., Contreras-Sanchez, W.M., Milston, R.H., Hornick, R., Feist, G.W. and Schreck, C.B. 1999a. Detection of MT in aquarium water after treatment with MT food. In: K. McElwee, D.Burke, M.Niles and H.Egna (editors). Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA, p. 81-84.
- Fitzpatrick, M.S., Contreras-Sanchez, W.M., Milston, R.H., Lucero, M. Feist, G.W. and Schreck, C.B. 1999b. Steroid immersion for masculinization of tilapia: Immersion for tilapia fry in MDHT. In: K. McElwee, D.Burke, M.Niles and H.Egna (editors). Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA P.73-74.

- Little, D.C., Lin, C.K. and Turner, W.A. 1995. Commercial scale tilapia fry production in Thailand. *World Aquaculture*. 26(4):20-24.
- Piferrer, F. and Donaldson, E.M. 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture*. 77: 251-262.
- Ponza, P., Little, D.C. and Boonthamjinda, C. 1996. Effect of the timing of treatment onset after hatching on the efficacy of 17 α methyltestosterone for masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. In: R.L. Creswell (ed.) *World Aquaculture'96. The 1996 Annual Meeting of the World Aquaculture Society*. Bangkok, Thailand. P.315-315.
- Tayamen, M.M. and Shelton, W.L. 1978. Inducement of sex reverse in *Sarotherodon niloticus* (Linnaeus). *Aquaculture*. 14:349-354.
- Yang Yi, 1992. Investigation into the immersion of known-age *Oreochromis niloticus* juveniles for hormonal sex reversal. M.Sc. Thesis. Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand. 144p.

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

Appropriate Time for Masculinization Tilapia by 17 α -Methyltestosterone Immersion

PENPUN SRISAKULTIEW

*Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, KhonKaen University
KhonKaen Thailand 40002*

WONGPATHOM KAMONRAT, , NARUEPON SUKUMASAWIN
and SOMSRI NGAMVONGCHON

*Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives
In Kaset Campus, Jatujak, Bangkok, Thailand 10900*

SUCHIN THONGMEE

*Khonkaen Inland Fisheries Research and Development Center
Khonkaen, Thailand, 40000*

PADERMSAK JARAYABHAND

*Department of Marinescience, Faculty of Science, Chulalongkorn University
Pathumwon, Thailand*

Abstract

The study aimed to find out sensitive age of tilapia for masculinization by immersion technique. Two dpf tilapia egg were collected from 10 individual females. The eggs were randomly counted and put into 108 plastic bottle incubators (35/L; 2 bottles/replicate). The incubators were randomly added with 500 μ g/L of 17 α -methyltestosterone (MT) at about 2, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 23, 26, 30, 32 and 35 dpf for 24h (27.93 $\pm$ 0.53 $^{\circ}$ C). After treatment they were rinsed with well aerated tapped water and further incubated in the incubators until started feeding fry. The fry were fed with 28%protein diet until 60dpf. They were all dissected for gonadal sex determination under microscope. The MT immersion at 2, 5 and 11dpf had 87.30 $\pm$ 3.07, 86.83 $\pm$ 4.51 and 87.48 $\pm$ 4.35%male, respectively, which were significantly higher than those of the controls immersed in ethanol at 2 and 35dpf (73.85 $\pm$ 5.16 – 79.77 $\pm$ 2.93%male). The 2, 5 and 11dpf were the sensitive ages to MT immersion. However, the appropriate age was concluded to be the 2dpf age.

Introduction

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) had been introduced from Japan to Thailand since 1965. Production of the fish was first statistically recorded in 1981 at 5,500 tons. Then the production had gone up to be top fish production (18,400 tons =20.6%) of inland aquaculture in 1986 (Fisheries Economics Division, 2002). Up to present in 2000, the tilapia production was 82,363 tons which equaled to 30.4% of the inland aquaculture production. The production was worth about US\$ 49.5 millions (Fisheries Statistics Analysis and Research Group, 2003). Therefore, tilapia is one of the Thailand economics species which played important roles in domestic consumption and export.

As male tilapias grow faster than females. The culture of a single sex eliminates propagation of the fish which is the main problem of over population in culture. Thus, monosex male culture of tilapia is the most favoured for commercial scale (Mires,

1977; Guerrero, 1982). Production of the monosex male tilapia can be produced by manually sexing, hybridization and hormonal sex reversal (Mires, 1983). The manually sexing required experient labour on tilapia sex which eliminated 50% population after 2-3 months rearing and 2.7-10% error (Chervinski and Rothbard, 1982). For hybridization, The technique requires at least 2 or more pure lines of specific species to obtain high% male progeny. The hormonal sex reversal is the most reliable and widely used method at present. The method can be done by either direct or indirect hormonal administration. The indirect method was complicated due to producing and keeping super male (YY) to produce all male tilapia. The method however, produced about 95.6% male from the same strain of broodstock (Mair et.al., 1997). For the direct method, 17 α -methyltestosterone (MT) was added into powder feed and feed the start feeding fry for 24-30 days to obtain 100% male (Tayamen and Shelton, 1978). In commercial scales, the farmers could produce 86-100% male (Bhujel, 1998). This method however, had been applied and carried out in earthen pond due to labour intensive, which might caused MT contamination to environment (Fitzpatrick, et al. (1999a). Then, sex reversal by immersion technique had been carried out in salmonids (Baker et.al., 1988; Piferrer and Donaldson, 1989). The use of MT at 200-400 μ g/L immersed new hatched larvae 2h and then repeated 2h immersion in the following week resulted in 82-100% male (Baker et.al., 1988). Similar to Piferrer and Donaldson (1989) reported on a single immersion of 6 days post hatching *O. kisutch* in 400 μ g/L for 2h resulted in 73% male. In tilapia, age for immersing hormone was confused. Yang Yi (1992) immersed 21-30 day post-hatched tilapia fry in MT 5mg/L for 3 days resulted in 90% male. While Fitzpatrick et.al., (1999b) got 79.3% male from immersing 13dpf tilapia larvae in methyl dihydrotestosterone 200 μ g/L for 2h. The present study was aimed to study suitable age of tilapia for hormonal sex inversion by immersion technique.

Materials and Methods

Oreochromis niloticus of KhonKaen Inland Fisheries Research and Development Centre was used in the study. The Centre had 25 spawning tanks. There were 50 females and 25 males in a concrete spawning tank (50 m²). The fish were fed with 25% protein pellet at 1-2% daily and weekly removed their eggs. At the removing egg day, water in the spawning tanks were drained off. The eggs in each female mouth were removed and age of the egg were determined approximately to day after fertilization (dpf) according to their development as shown in Table 1.

Each egg batch was kept separately in a metal bowl before put into metal tray incubators. The spawned females were removed to resting tanks and replaced by new 3 wk rested females. Then spawning tanks were topped up with water again. Only pigmentation egg with tiny black spots (Fig. 1; about 2 dpf) were selected from 10 females. The eggs were pooled in a metal trays and transferred (about 5 km) from the Centre to KhonKaen University for the experiment. At KhonKaen University, the eggs were cleaned up with 100 ppm formalin for 2 min in order to avoid any external parasit. They were washed up with well airated tapped water for 2-3 times before adding into a plastic tray for the experiment.

Thirty five eggs were randomly counted and put into a cylindrical plastic bottle incubator which contained the well airated tap water 1L (Fig. 2). Each bottle had an air stone for circulating the eggs during incubation. There were 108 bottles in total which carried out under 27.93 $\pm$ 0.53 $^{\circ}$ C.

Table 1 Age determination of tilapia egg by visual details of embryo development at 25.91 ± 0.25 °C water temperature

Stage*	Visual details	Age determination (dpf)
1 Undeveloped egg	Yellowish egg , - yellow egg with out any pigment on egg	1
2 Eyed egg	Pigmentation (Fig. 1) - tiny black spots at animal pole of egg	2
	Eyed egg - groups of black spot look like eyes and start blood formation	3
3 Prehatched egg	Prehatched egg - two visible eyes, blood system, unhatched	4-5
4 Yolk sac/larvae	Hatched larvae - hatched larvae, transparent body	5-6
	Pigmented larvae - pigmented body, yolk absorbed larvae	7-12

*= stage according to Little et al. (1995)

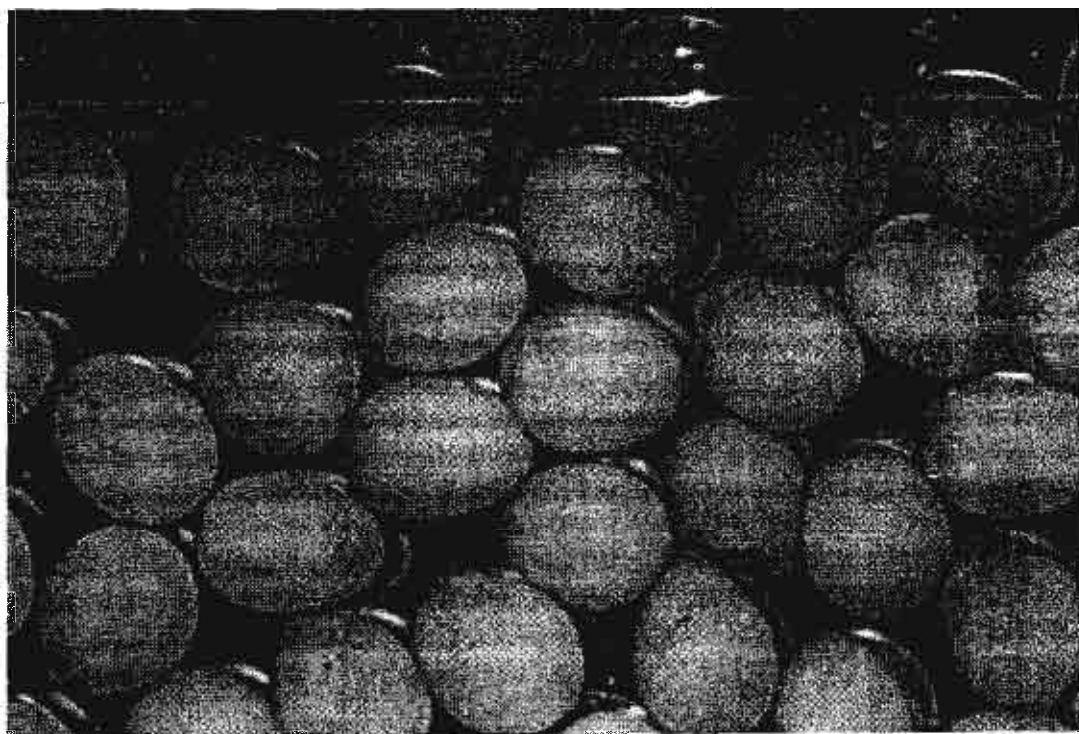


Fig. 1 Pigmentation stage (2dpf) of tilapia embryo showed tiny black sports at animal pole of the eggs (x6.7)

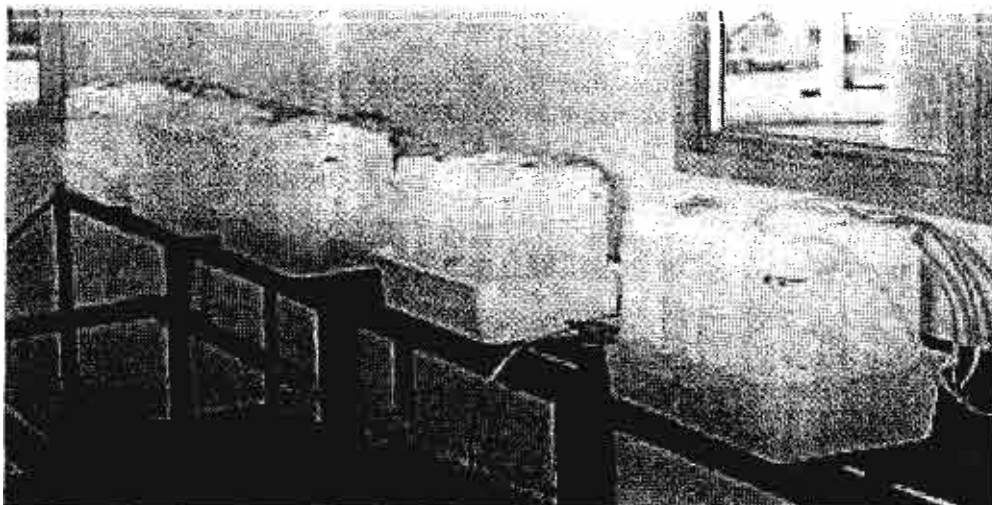


Fig. 2 Cylindrical plastic bottle incubator (1L)

Stock solution of 17α -Methyltestosterone (MT; Fluka) was prepared with ethanol (BDH) into the concentration of $2,000\mu\text{g/ml}$. The freshly prepared stock MT $250\mu\text{l}$ ($500\mu\text{g}$) was randomly added into a bottle incubator (2 bottles/replicate; 6 bottles/treatment) at the different ages of 2, 5, 8, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 20, 23, 26, 30, 32 and 35dpf. So, each treatment age had 3 replicates. There were 2 controls including of 2 and 35dpf which MT was replaced by adding only ethanol at the same amount of the MT ($=250\mu\text{l/bottle}$). The egg/fry were immersed in either MT or ethanol for 24h. Next, they were thoroughly cleaned up with the tapped water 2 – 3 times. The egg after immersion, were further incubated in the bottle incubators until hatch. Numbers of the hatched egg were counted and recorded for survival after treatment. They were transferred into 10L plastic containers which initially stocked 2L water. They were fed ad libitum with powder feed (28% protein) 3-5 times daily. The containers were cleaned up and 70% water changing everyday. Water volume in the container was slowly increased according to larvae size. They were nursed in the containers for 2 wks before transferred into glass aquaria ($15\times 15\times 30''$) which initially stocked 30L recirculated water. The water will slowly increasing according to their growth. They were nursed with 28% pellet until the fry were at least 2 month old (about 60dpf up). Numbers of the remained fry were recorded for cumulative survival at sexing. Then all of them were dissected for sex determination by Acetocarmine Squash Method (Guerrero and Shelton, 1974). Sex of the fry was examined under microscope ($\times 100$).

Data were firstly tested for Homogeneity of Variance. If the data were not normal distribution then arcsine transformation would be applied prior to ANOVA (MINITAB for WINDOWS version 10.1). The differences were considered statistically when the p-value was less than 0.05.

Results

Either tilapia egg or larvae could be immersed in $500\mu\text{g/L}$ MT at 35/L for 24h with 80.48 ± 0.83 to 100% survival after treatment. Then the larvae were nursed to approximately 60dpf before starting sex determination. Survival rate of the fry at the sexing period were 73.85 ± 5.16 to 91.43%. These survival rates were not significantly different among the treatments and control. Thus, their survival should not had any

effect on the result of %male of sex reversal by the immersion technique in the present study. When immersed tilapia at about 2, 5 and 11 dpf resulted in 87.30 ± 3.07 , 86.83 ± 4.51 and 87.48 ± 4.35 %male, which were significantly higher ($P < 0.05$) than the controls (Fig. 1; Table 1 and 2). This indicated that the tilapia egg and larvae at about 2 – 11 dpf should be the appropriate time for MT immersion technique.

Table 1 Sexes of tilapia fry (mean $\pm$ SD) when immersed in 500 μ g/L MT for 24h at different ages

Age* (dpf)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	% Survival after immersion	% Survival at sexing	Remark
2	79.77 ± 2.93	10.98 ± 3.50	9.88 ± 1.38	87.10 ± 8.70	85.35 ± 5.77	control
2	87.30* ± 3.07	6.15 ± 2.89	6.55 ± 2.86	83.33 ± 2.97	80.66 ± 3.96	
5	86.83* ± 4.51	5.99 ± 2.31	7.17 ± 3.02	89.52 ± 5.73	85.36 ± 7.41	Remained 1 aquarium
8	75.10 ± 1.37	12.55 ± 3.60	12.92 ± 5.23	89.05 ± 5.41	80.95 ± 2.90	
10	92.59	7.41	0	95.71	91.43	
11	87.48* ± 4.35	4.87 ± 1.37	7.65 ± 4.38	85.71 ± 2.37	82.86 ± 5.95	
12	82.43 ± 6.00	11.36 ± 1.93	4.55 ± 6.43	83.57 ± 3.03	78.57 ± 4.04	
13	76.73 ± 9.37	9.18 ± 4.10	14.09 ± 10.34	80.48 ± 0.83	76.87 ± 6.10	
14	83.76 ± 8.46	7.94 ± 7.62	8.29 ± 0.85	85.71 ± 2.02	84.10 ± 1.53	
15	85.36 ± 7.41	6.08 ± 5.93	8.55 ± 2.22	81.43 ± 2.48	79.44 ± 5.09	
17	75.83 ± 11.86	11.93 ± 9.43	12.24 ± 2.42	87.15 ± 8.08	83.76 ± 2.26	
20	79.44 ± 15.96	15.12 ± 12.65	5.43 ± 3.54	86.66 ± 0.83	81.73 ± 15.66	
23	73.25 ± 1.79	14.98 ± 4.00	10.06 ± 4.07	85.71 ± 8.92	83.85 ± 5.90	control
26	68.35 ± 9.81	15.78 ± 8.37	14.73 ± 5.40	94.76 ± 2.97	89.05 ± 3.60	
30	79.31 ± 2.26	9.52 ± 3.19	11.17 ± 3.11	100	83.33 ± 5.41	
32	67.38 ± 0.31	18.98 ± 5.97	13.08 ± 5.97	100	90.95 ± 5.41	
35	73.57 ± 3.95	9.90 ± 0.71	15.25 ± 2.68	100	75.24 ± 5.77	
35	73.85 ± 5.16	16.60 ± 9.70	9.55 ± 4.80	99.52 ± 0.83	78.50 ± 8.62	

dpf = approximated day post fertilization;

* = significantly difference from the control ($P < 0.05$)

Table 2 One-Way Analysis of Variance of %male after arcsin transformation of

Analysis of Variance on arcsinMale					
Source	DF	SS	MS	F	p
Age	17	991.4	58.3	2.46	0.013
Error	33	783.1	23.7		
Total	50	1774.5			

Discussions

Hormonal sex reversal is the most common used in the world wide tilapia industries. In Thailand, AIT has a commercialized process for mass production of tilapia egg and yolk-sac fry in hapas (Little, et al., 1996). The process collabolates with 17 α -methyltestosterone (MT at 60mg/1 kg feed) then administered to the first feeding fry in hapas sustained in an earthen pond for 21 days produced 100%male (Ponza, et al., 1996). When the technique had been extended to farmers, the %male depended on degree of adoption (Little, et. al., 1995) which resulted in 86-100%male (Bhujel, 1998). The farmers who adopted all the process would get high% male. Due to efficacy of the hormonal sex reversal technique, depends on aging and timing of the treatment. As Yamamoto (1969) stated that the exogenous sex hormone should be administered before sex differentiation occur and last until the process completed. The sensitivity to action of exogenous sex steroid change during ontogenesis, reaching its maximum during the critical period likely located just prior or during early stage of sex differentiation (Pifferer and Donaldson, 1993).

Sex differentiation of tilapia is species and temperature specific. For the *O. niloticus*, Alvendia-Casauay and Carino (1988) reported on set of sex differentiation by histological study occured between 30-33 days post hatch. The fish age in day post hatch (dph) was about 5 days after the day post fertilization (dpf) at 27-28 °C (Personal observation). Thus, the sex differentiation (30-33dph) of the *O. niloticus* based on Alvendia-Casauay and Carino (1988) report, should be equaled to 25-28 dpf or older due to 1-2 °C lower water temperature. In comparison, the age of the fish at 20-35 dpf (27 °C), Baroiller et al. (1996) found oogenesis proliferation of the fish which indicated sex differentiation into female completely. Thus, the 20-35dpf should be the end of the onset of sex differentiation. The period however, Yang Yi (1992) immersed *O. niloticus* at 21-30 days post hatch fry (about 26-35dpf; 27 °C) for 3 days in 5mg/L MT which resulted in 90%male.

For the beginning of the onset, Srisakultiew and Rana (1991) studied effect of stocking densities on the sex differentiation of the same species and found gonadal proliferation began as early age as 11-14 dpf at 27 $\pm$ 2 °C. These ages were similar to Baroiller et al. (1996), who reported the critical period of the fish to exogenous steroid for orally sex reversal treatment must begin between 9-13 dpf and last for 21 days (27 °C). Therefore, a protocol of 21-day oral steroid treatment had been suggested by initially begin at the 10 dpf and last to 31 dpf (Baroiller et al., 1996). The beginning treatment age at 10dpf was similar to the 10 and 11dpf of the present study. Although the study lost 2 aquaria at 10dpf but the remaining aquarium gave 92.59%male (Table 1). Thus, the 10 and 11dpf should have the similar respond to MT immersion. In addition, the 10dpf (5dph) was found undifferentiated gonad (Srisakultiew, 1993; Baroiller et al., 1996) where the exogenous steroid treatment should be begun for effectively sex inversion (Hunter and Donaldson, 1983).

For the 5dpf was the hatching period of the fish at 27-28 °C (Personal observation). This period was found primordial germ cells which is the beginning of the gonad before they developed into undifferentiated gonadal sac at about 10 dpf (Srisakultiew, 1993). The undifferentiated gonad was reported to be the labile period of coho salmon, when the fish gave maximum respond to low given dose steroid and short duration treatment (Piferrer and Donaldson, 1993). Thus, the hatching period of the fish (5dpf) was also the sensitive period to the MT treatment. The period, however, was rarely use for inducing hormonal sex inversion of the tilapia. This may be due to the after hatched larvae was very weak and high sensitive to poor water quality.

At the 2dpf, was the egg stage, where the egg developed pigmentation. One of the advantage of this period was the clearly visualize stage for determining age of the tilapia egg commercially. From the personal observation under microscope, during this period the tilapia embryo had started developing head bud and tail bud. Thus, the embryo was possibly forming germinal ridge which was the origin of the gonad (Balinsky, 1968). This stage, however, requires further embryological and histological studies for more details to explanation why the stage was sensitive to the MT immersion. The labile period (Piferrer and Donaldson, 1993) of the *O. niloticus* in the study was found to be 2 - 11dpf which possibly before 2 dpf and last up to 15dpf.

When the hormone was administered through water. In comparison to the study of Fitzpatrick et. al. (1999b) who immersed *O. niloticus* at 13dpf in 200µg/L methyl dihydrotestosterone for 2h and get 79.3% male significant higher than the control group. The present study aimed to find out appropriate time of tilapia for sex reversal by immersion technique. When the fish were immersed in 500µg/L MT for 24h at different age started from egg stage (2dpf) until fry stage (35dpf). The results showed that the immersion at 2, 5 and 11dpf were significantly raised up %male (87.30 ± 3.07 , 86.83 ± 4.51 , $87.48 \pm 4.35\%$, respectively) to be higher than the control groups. Thus, the 2, 5 and 11 dpf were the sensitive age of tilapia to MT exogenous steroid via immersion. The 11dpf is the closed age to Fitzpatrick et. al (1999b) studied at 13 dpf. The 11dpf fry had fed ordinary feed with out MT for about 3-4 days prior to the immersion. General appearance of the fry was similar to other fry aging about 9-13 dpf, which depends on water temperature. Thus the fry at this age is difficult to guess or predict their age from external characteristics. Therefore, collecting the fry for this age without knowing their spawning date will including some insensitive ages, which might cause %male. At 5dpf, the larvae was in hatching stage. The larvae should be immersed after complete the hatching. Because the hatching stage causes water quality to be poor. It might cause low survival after immersion which affected reliability of %male at the end of the experiment. For the 2dpf, this is the egg stage. The embryo at this stage was forming head-tail bud which may possibly forming primordial germ cells. The cells were sensitive to environmental factors (Nakamura et al.(1997). Thus, immersing tilapia eggs at 2dpf gave the similar result as immersing tilapia larvae at 5 and 11dpf which gave significantly higher %male than the controls. Advantages of the 2dpf is the present of the tiny black spots around both sides of the eggs (Fig 2). The spots are clearly seen by simple eye visual. Therefore, the 2dpf should be the appropriate age for hormonal sex reversal via immersion technique.

Acknowledgements

The study was funded by Thai Research Funds.

References

- Aivendia-Casauay, A. and Carino, V.S. 1988. Gonadal sex differentiation in *Oreochromis niloticus*. In: R.S.V. Pullin, T. Bhukaswan, K. Tonguthai and Maclean, J.L. (eds.). The Second International Symposium on Tilapia in Aquaculture. Department of Fisheries, Bangkok, Thailand. p.121-124.
- Baker, I.J., Solar, I.I. and Donaldson, E.M. 1988. Masculinization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatment using 17 α -methyltestosterone around the time of hatching. *Aquaculture*. 72:3-4:359-369.
- Balinsky, B.I. 1968. An introduction to embryology. Second edition. W.B.Saunders Company. Philadelphia and London. 673 p.
- Baroiller, J.F., A. Fostier, C. Cauty, X. Rognon, and B. Jalabert, 1996. Effect of high rearing temperatures on the sex ratio of progeny from sex reversed males of *Oreochromis niloticus*. p. 246-256. In R.S.V. Pullin, J. Lazard, M. Legendre, J.B. Amon Kothias and D. Pauly (eds.) The third International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conf. Proc. 41. 575p.
- Bhujel, R. 1998. Fry quality is the main factor behind the success of AIT's joint venture tilapia hatchery. AASP Newsletter. Asian Institute of Technology (AIT):3(2)3-4.
- Chervinski, J. and Rothbard, S. 1982. An aid in manually sexing tilapia. *Aquaculture*. 26:389.
- Fisheries Economics Division. 2002. Fisheries statistics of Thailand 1999. No.10/2002. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Fisheries Statistics Analysis and Research Group. 2003. Freshwater Fishfarm production 2000. Document No.1/2003. Fishery Information Technology Center. Department of Fisheries. Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Fitzpatrick, M.S., Contreras-Sanchez, W.M., Miston, R.H., Hornick, R., Feist, G.W. and Schreck, C.B. 1999a. Detection of MT in aquarium water after treatment with MT food. In: K.McElwee, D.Burke, M.Niles and H.Egna (editors). Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA. p.81-84.
- Fitzpatrick, M.S., Contreras-Sanchez, W.M., Miston, R.H., Lucero, M., Feist, G.W. and Schreck, C.B. 1999b. Steroid immersion for masculinization of tilapia: Immersion for tilapia fry in MDHT. In: K.McElwee, D.Burke, M.Niles and H.Egna (editors). Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA. p.73-74.
- Guerrero, R.D. 1982. Control of Tilapia reproduction. p. 309-316. In: R.S.V. Pullin and R.H. Lowe-McConnell (eds.) The biology and culture of tilapias. ICLARM Conf. Proc. 7.432p.
- Guerrero, R.D. and Shelton, W.L. 1974. An aceto-carmin squash method of sexing juvenile fishes. *Prog.Fish cult.* 36:56.
- Hunter, G.A. and Donaldson, E.M. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Hoar, W.S., Randall, D.S. and Donaldson, E.M. (eds.) 1983. *Fish Physiology*. Vol.9. Academic Press. New York. p. 223-303.
- Little, D.C., Lin, C.K. and Turner, W.A. 1995. Commercial scale tilapia fry production in Thailand. *World Aquaculture*. 26(4):20-24.

- Little, D.C., Macintosh, D.J. and Edwards, P. 1996. Selective broodstock exchange of *Oreochromis niloticus* in large breeding hapas suspended in earthen ponds. p. 92-99. In: R.S.V. Pullin, J.Lazad, M. Legendre, J.B.Amon Kothias and D. Pualy(eds.) The Third International Symposium on Tilapia in Aquaculture. ICLARM Conf.Proc. 41, 575p.
- Mair, G.C., Sbucay, J.S., Skibinski, D.O.F., Abella, T.A. and Beardmore, J.A. 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production on all male tilapia, *Oreochromis niloticus*. Can.J.Fish.Aqua.Sci. 54:2:396-404.
- Mires, D. 1977. Theoretical and practical aspects of the production of all-male tilapia hybrids. Bamidgeh. 29(3): 94-101.
- Mires, D. 1983. Current techniques for the mass production of tilapia hybrids as practised at Ein Hamifratz Fish Hatchery. Bamidgeh. 35:1:3-7.
- Nakamura, M., Kobayashi, T., Chang, X.T., Nagahama, Y. 1997. Gonadal sex differentiation in teleost fish. J.Exp.Zool. 281. 362-372.
- Piferrer, F. and Donaldson, E.M. 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. Aquaculture. 77:251-262.
- Piferrer, F. and Donaldson, E.M. 1993. Sex control in Pacific salmon. p. 67-77. In J.F. Muir and R.J. Roberts (eds.) Recent advances in aquaculture. Institute of Aquaculture. Oxford. Blackwell Scientific Publications. 340p.
- Ponza, P., Little, D.C. and Boonthamjinda, C. 1996. Effect of the timing of treatment onset after hatching on the efficacy of 17 α methyltestosterone for masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. In: R.L. Crewell (ed.) World Aquaculture'96. The 1996 Annual meeting of the World Aquaculture Society. Bangkok, Thailand. p.314-315.
- Srisakultiew, P. 1993. Studies of the reproductive biology of *Oreochromis niloticus* L. Ph.D Thesis. Institute of Aquaculture. University of Stirling. 310p.
- Srisakultiew, P. and K.J. Rana. 1991. Effect of stocking density on sex differentiation of *Oreochromis niloticus* (L.). p. 289. In: A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime and M.S. Rolfe (eds.) Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of East Anglia, Norwich, U.K.
- Tayamen, M.M. and Shelton, W.L. 1978. Inducement of sex reverse in *Sarotherodon niloticus* (Linnaeus). Aquaculture. 14:349-354.
- Yamamoto, T. 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W.S. and Randall, D.J. (eds.) Fish Physiology. Vol.III: Poison. Academic Press. p.117-159.
- Yang Yi. 1992. Investigation into the immersion of know-age *Oreochromis niloticus* juveniles for hormonal sex reversal. Thesis. Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand. 144p.

Appropriate Dose and Duration of 17 α -Methyltestosterone for Masculinization Tilapia via Immersion Technique

PENPUN SRISAKULTIEW

*Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, KhonKaen University
KhonKaen Thailand 40002*

WONGPATHOM KAMONRAT, NARUEPON SUKUMASAWIN

and SOMSRI NGAMVONGCHON

*Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives
In Kaset Campus, Jatujak, Bangkok, Thailand 10900*

SUCHIN THONGMEE

*Khonkaen Inland Fisheries Research and Development Center
Khonkaen, Thailand, 40000*

PADERMSAK JARAYABHAND

*Department of Marinescience, Faculty of Science, Chulalongkorn University
Pathumwon, Thailand*

Abstract

Thirty five per liter of the 2, 11 and 14dpf *Oreochromis niloticus* were randomly counted and put into plastic bottle incubators. They were immersed in 250 and 500 μ g/L 17 α -methyltestosterone (MT) for 6, 12, 24, 48, 72 and 96h separately. While the controls were immersed in only ethanol (250 μ l/L) at the same amount and duration as MT. At the end of the treatment durations, they were washed up and nursed in plastic containers (10L) and glass aquaria (100L) which stocked water according to their growth, respectively. They were fed with 41% protein pellet until at least 60dpf. Then the fish were dissected for gonadal sex determination using aceto-carmine squarsh method. The results showed that both the 250 and 500 μ g/L MT induced significantly ($P<0.05$) male (84.45 $\pm$ 1.76 - 87.62 $\pm$ 1.43, 89.45 $\pm$ 1.64 - 91.43 $\pm$ 1.70 and 84.87 $\pm$ 2.16 - 87.77 $\pm$ 1.81%) to be higher than the controls (76.15 $\pm$ 2.02, 76.83 $\pm$ 3.94 and 66 $\pm$ 2.61%) when immersed at 2, 11 and 14dpf, respectively. While the immersing duration between 6-96h of the 3 ages, however, showed no different to raise up the male percentage.

Introduction

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) had been introduced from Japan to Thailand since 1965. Production of the fish was first statistically recorded in 1981 at 5,500 tons. Then the production had gone up to be the top of fish production (18,400 tons =20.6%) of inland aquaculture in 1986. Up to 2000, the tilapia production was 82,363 tons which equaled to 30.4% of the inland aquaculture production. The production was worth about US\$ 49.5 millions (Fisheries Statistics Analysis and Research Group, 2003). Therefore, tilapia is one of the Thailand economics freshwater species which played an important roles in domestic consumption and export.

Due to male tilapias grow faster than females and culture of a single sex stop the fish propagation. Then the main problem of over population is under control. Thus, monosex male culture is the most favoured for tilapia commercial scale (Mires, 1977;

Guerrero, 1982). Production of the monosex male tilapia can be produced by manually sexing, hybridization and hormonal sex reversal (Mires, 1983). The manually sexing required experient labour on tilapia sex which 50% population was eliminated as unwanted female after 2-3 months rearing with 2.7-10% error (Chervinski and Rothbard, 1982). For hybridization, the technique requires at least 2 or more pure lines of specific species and known generation in order to obtain high%male progeny. The hormonal sex reversal is the most reliable and widely used method at present. The method can be done by either direct or indirect hormonal administration. The indirect method was complicated due to producing and keeping super male (YY) to produce all male tilapia. This method however, produced approximately 95.6% male from the same strain of broodstock (Mair et.al., 1997). For the direct method, 17 α -methyltestosterone (MT) was added into powder feed and feed the start feeding fry for 24-30 days to obtain 100% male (Tayamen and Shelton, 1978). In commercial scales of Thailand, the farmers could produce 86-100% male (Bhujel, 1998). This method however, had applied and carried out in hapas suspended in earthen pond due to labour intensive of cement tanks. In addition, the sex inversion in earthen pond might cause MT contamination to natural water resources subrounded the pond and the farms. Then, sex reversal by immersion technique had been carried out in salmonids (Baker et.al., 1988; Piferrer and Donaldson, 1989). The use of MT at 200-400 μ g/L immersed new hatched larvae for 2h and then repeated another 2h immersion in the following week resulted in 82-100% male (Baker et.al., 1988). Similar to Piferrer and Donaldson (1989) reported on a single immersion of 6 days post hatching *Oncorhynchus kisutch* in 400 μ g/L for 2h resulted in 73% male. In tilapia, Yang Yi (1992) immersed 21-30 day post-hatched tilapia fry in MT 5mg/L for 3 days resulted in 90% male. While Fitzpatrick et.al., (1999a) got 79.3% male from immersing 13dpf tilapia larvae in methyl dihydrotestosterone 200 μ g/L for 2h. Dosage and duration of hormone immersing tilapia are a lots different between 200 μ g/L to 5mg/L and 2h to 3 days. The present study was aimed to study lowest dose and duration of MT for tilapia sex inversion by immersion technique.

Materials and Methods

Experimental fish

Oreochromis niloticus of KhonKaen Inland Fisheries Research and Development Centre was used in the study. The Centre had 25 spawning tanks. There were 50 females and 25 males which added into a concrete spawning tank (50 m²). The fish were fed with 25% protein pellet at 1-2% daily and robbed their eggs weekly. At the robbing egg period, water in the spawning tanks were drained off. The eggs in each female mouth were removed and age of the egg/fry were identified according to their development. Each egg batch was kept separately in different metal bowl before kept into metal tray incubators. Only pigmentation egg (about 2 day post fertilization; Srisakultiew et al., in press) from 13-15 females were selected and kept together in a metal tray for the experiment. The selected eggs were tranferred (about 5 km) from the Centre to KhonKaen University for the experiment.

At KhonKaen University, the eggs were cleaned up with 100 ppm formalin for 2 min in order to avoid any external parasits. They were washed up with well aired tap water for 2-3 times before adding to a plastic tray for the experiment. Next, 35 eggs were randomly counted and put into a plastic bottle incubator which contained well aired tap water (1L). Each bottle incubator had an air stone for circulating the eggs during immersion. The study was carried out under 27.47 $\pm$ 1.23 $^{\circ}$ C water temperature.

Experimental design

Two way analysis of variance was designed for the study including of dosages of 17 α -methyltestosterone (0, 250 and 500 μ g/L) and immersing durations (6, 12, 24, 48, 72 and 96h). Each treatment had 4 replicates. There were 2 batches of egg from 13 and 15 females, were collected for 3 experiments in the study. The first batch was immersed either at pigmentation (2 dpf) or larval (14 dpf) stage. The latter batch was immersed at only 11 dpf. For the immersing at 11 and 14 dpf, immersing duration were reduced to 6, 12, 24 and 48h because limited of facilities.

Hormonal preparation

17 α -Methyltestosterone (MT; Fluka) was weighed into 0.015 and 0.030g. Then each was dissolved with 15ml absolute ethanol (BDH). Thus, the MT concentrations were 1000 and 2000 μ g/ml, respectively. At the beginning of the experiment, 250 μ l of each stock was added into a bottle incubator (48 bottles). Thus, the MT concentration in the bottles were 250 and 500 μ g/L, respectively. For the control, 250 μ l absolute ethanol was replaced the MT stocks.

Eight bottle incubators from each concentration were randomly removed at 6, 12, 24, 48, 72 and 96h after adding MT. They were rinsed thoroughly with the tap water and further incubated in the same bottle incubators until hatched. During this period, the bottle incubators were replaced with new well aerated tap water everyday. When the larvae start feeding at about 8-9 dpf, 2 bottles were drained into a 10L plastic container which initially stocked 2L water. They were fed to excess with powder feed (40% protein) 3-5 times daily. The containers were cleaned up everyday. Water volume in the container was slowly increased according to growth of the larvae. They were nursed in the containers for 2 wks before transferred into glass aquaria which initially stocked 30L water. The water will slowly increasing according to their growth. They were nursed with 40% pellet to at least 2 month old (approximately 60 dpf). Then all the fish were dissected for gonadal sex determination by Acetocarmine Squash Method (Guerrero and Shelton, 1974). Sex of the fry was examined under microscope (x100).

Percentages of male in each treatment were computed using MINITAB for Windows version 10.1. Data from each replicate were analysed and checked homogeneity of variance prior analysis of variance. Arcsine transformation was applied when necessary. The differences were considered statistically when the p-value was less than 0.05.

Results

MT dosage

The trial had been carried out 3 experiments from 2 batches of egg. The first egg batch was immersed either at 2 or 14 dpf while the latter batch was immersed at 11 dpf. At the end of the experiments, survival rate of the fry ranged between 85.24-97.71, 64.25-80.31 and 71.11-83.50% when immersed at 2, 11 and 14dpf, respectively. There were no significant difference among the fry survival in each experiment. Thus, these fry survival should not have any effect on the male percentages.

Results of the immersion experiments were shown in Table 1-3. Dosages of MT either at 250 or 500 μ g/L significantly ($P < 0.05$; Table 4) raised up male percentages (average

of $84.45 \pm 1.76 - 87.62 \pm 1.43$, $89.45 \pm 1.64 - 91.43 \pm 1.70$ and $84.87 \pm 2.16 - 87.77 \pm 1.81\%$) to be higher than those of the controls (average of 76.15 ± 2.02 , 76.83 ± 3.94 and $66.00 \pm 2.61\%$) when immersed at 2, 11 and 14 dpf, respectively. This indicated that MT solution induced sex inversion of tilapia via immersion technique.

Duration

Duration of MT immersion, the male percentages were slightly increased with longer duration. In Table 1, the 6h immersion in $250 \mu\text{g/L}$ MT at 2 dpf had only $75.0 \pm 5.84\%$ male. The male percentage increased to 83.44 ± 4.36 , 80.12 ± 3.34 and $91.55 \pm 1.24\%$ in the 12, 24 and 48h immersion. Next, these percentage slightly dropped to 89.06 ± 2.73 and $87.53 \pm 2.52\%$ when immersed at 72 and 96h, respectively (Table 1). In the $500 \mu\text{g/L}$ MT, the male percentage peaked to $91.47 \pm 1.84\%$ in the 72h immersion of the same age. Trend of the male percentage were similar to the immersing at 11 and 14 dpf which peaked between 12 and 24h immersion (Table 1-3). However, statistical result in Table 4 showed that immersion in both 250 and $500 \mu\text{g/L}$ MT were significantly raised up male percentage to be higher than the controls. While the durations of MT immersion either at 6-96 or 6-48h had no effect to increase the male percentage in every immersing age.

Table 1 Average percentage ($\pm$ SD) of tilapia sex immersed in different dose and duration of MT solution at pigmentation stage (2dpf= 57.7 CTU)

Dose ($\mu\text{g/L}$)	Duration (h)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival at sexing (%)
0	6	77.35 ± 4.01	21.41 ± 4.15	1.24 ± 0.80	95.28 ± 0.81
	12	78.77 ± 5.09	21.23 ± 5.09	0	93.19 ± 3.04
	24	80.46 ± 3.59	19.12 ± 3.78	0.42 ± 0.42	95.55 ± 1.65
	48	65.64 ± 6.81	33.21 ± 5.98	1.11 ± 1.11	96.48 ± 0.24
	72	80.69 ± 4.14	17.61 ± 4.35	1.69 ± 0.98	91.11 ± 2.84
	96	71.34 ± 5.15	26.94 ± 5.54	1.72 ± 0.68	85.24 ± 5.46
	average	76.15 ± 2.02	22.82 ± 2.02	1.03 ± 0.29	92.65 ± 1.36
250	6	75.00 ± 5.84	24.61 ± 5.99	0.39 ± 0.39	97.71 ± 0.43
	12	83.44 ± 4.36	15.60 ± 3.47	0.96 ± 0.96	91.41 ± 2.45
	24	80.12 ± 3.34	19.07 ± 3.04	0.82 ± 0.82	96.44 ± 1.07
	48	91.55 ± 1.24	7.54 ± 0.93	0.91 ± 0.91	85.96 ± 6.78
	72	89.06 ± 2.73	10.94 ± 2.73	0	95.01 ± 1.39
	96	87.53 ± 2.52	12.48 ± 2.52	0	94.04 ± 1.29
	average	$84.45 \pm 1.76^*$	15.04 ± 1.71	0.51 ± 0.25	93.43 ± 1.38
500	6	82.25 ± 5.19	17.74 ± 5.19	0	95.51 ± 1.20
	12	87.28 ± 2.25	12.72 ± 2.25	0	95.12 ± 1.07
	24	88.18 ± 5.33	13.49 ± 5.40	0.83 ± 0.83	88.60 ± 5.18
	48	86.85 ± 2.66	12.66 ± 2.79	0.49 ± 0.49	92.74 ± 3.08
	72	91.47 ± 1.84	7.77 ± 1.92	0.76 ± 0.76	79.00 ± 10.1
	96	89.70 ± 2.56	9.46 ± 3.04	0.83 ± 0.83	94.15 ± 2.06
	average	$87.62 \pm 1.43^*$	12.31 ± 1.49	0.49 ± 0.23	90.86 ± 2.15

* = Significantly higher than the control ($P < 0.05$)

Table 2 Average percentage($\pm$ SD) of tilapia sex immersed in different dose and duration of MT solution at larval stage (11dpf= 297.2 CTU)

Dose (μ g/L)	Duration (h)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival at sexing (%)
0	6	69.18 $\pm$ 5.62	29.57 $\pm$ 4.62	3.39 $\pm$ 1.41	73.75 $\pm$ 6.31
	12	89.38 $\pm$ 2.13	10.62 $\pm$ 2.13	10.12 $\pm$ 1.86	70.00 $\pm$ 4.68
	24	65.63 $\pm$ 4.87	31.80 $\pm$ 4.36	2.53 $\pm$ 1.02	76.56 $\pm$ 6.52
	48	83.13 $\pm$ 11.1	16.90 $\pm$ 11.1	2.19 $\pm$ 1.34	66.88 $\pm$ 5.72
	average	76.83 $\pm$ 3.94	22.22 $\pm$ 3.68	0.95 $\pm$ 0.45	71.80 $\pm$ 2.78
250	6	91.90 $\pm$ 2.51	7.46 $\pm$ 3.01	0.64 $\pm$ 0.64	65.31 $\pm$ 2.99
	12	92.56 $\pm$ 5.00	6.96 $\pm$ 4.51	0.63 $\pm$ 0.63	66.25 $\pm$ 3.75
	24	90.00 $\pm$ 4.08	8.75 $\pm$ 3.15	0	73.13 $\pm$ 6.34
	48	91.26 $\pm$ 2.99	6.24 $\pm$ 2.40	0	72.81 $\pm$ 2.36
	average	91.43 $\pm$ 1.70*	7.35 $\pm$ 1.52	0.32 $\pm$ 0.22	69.37 $\pm$ 2.08
500	6	90.99 $\pm$ 0.81	8.36 $\pm$ 0.73	0.64 $\pm$ 0.64	75.62 $\pm$ 4.58
	12	82.87 $\pm$ 2.65	15.83 $\pm$ 3.18	1.30 $\pm$ 0.75	69.06 $\pm$ 4.77
	24	93.68 $\pm$ 2.43	6.32 $\pm$ 2.43	0	80.31 $\pm$ 2.41
	48	90.25 $\pm$ 4.35	8.47 $\pm$ 4.49	1.28 $\pm$ 0.74	64.25 $\pm$ 7.89
	average	89.45 $\pm$ 1.64*	9.74 $\pm$ 1.65	0.81 $\pm$ 0.31	72.31 $\pm$ 2.85

* = Significantly higher than the control (P<0.05)

Table 3 Average percentage($\pm$ SD) of tilapia sex immersed in different dose and duration of MT solution at larval stage (14dpf= 404 CTU)

Dose (μ g/L)	Duration (h)	Male (%)	Female (%)	Intersex (%)	Survival at sexing (%)
0	6	64.63 $\pm$ 5.22	31.98 $\pm$ 4.11	3.39 $\pm$ 1.41	76.64 $\pm$ 5.18
	12	63.57 $\pm$ 4.91	26.31 $\pm$ 4.84	10.12 $\pm$ 1.86	75.50 $\pm$ 2.45
	24	66.85 $\pm$ 4.45	30.67 $\pm$ 4.31	2.47 $\pm$ 0.83	79.76 $\pm$ 4.30
	48	68.95 $\pm$ 7.74	28.86 $\pm$ 7.15	2.19 $\pm$ 1.34	77.03 $\pm$ 5.47
	average	66.00 $\pm$ 2.61	29.45 $\pm$ 2.41	4.54 $\pm$ 1.05	77.23 $\pm$ 2.06
250	6	78.76 $\pm$ 4.91	18.63 $\pm$ 3.74	2.62 $\pm$ 1.68	73.74 $\pm$ 3.98
	12	84.80 $\pm$ 5.04	13.95 $\pm$ 3.83	1.25 $\pm$ 1.25	71.77 $\pm$ 7.36
	24	89.20 $\pm$ 2.69	8.41 $\pm$ 0.95	2.39 $\pm$ 1.85	75.31 $\pm$ 0.79
	48	87.62 $\pm$ 3.20	8.48 $\pm$ 1.19	3.89 $\pm$ 2.38	83.43 $\pm$ 6.21
	average	84.87 $\pm$ 2.16*	13.49 $\pm$ 1.65	2.65 $\pm$ 0.87	76.06 $\pm$ 2.60
500	6	79.66 $\pm$ 3.50	18.01 $\pm$ 3.43	2.33 $\pm$ 0.99	83.42 $\pm$ 5.58
	12	88.87 $\pm$ 2.06	7.46 $\pm$ 2.52	3.66 $\pm$ 2.12	77.69 $\pm$ 2.60
	24	91.90 $\pm$ 4.21	7.64 $\pm$ 3.76	0.46 $\pm$ 0.46	75.01 $\pm$ 0.79
	48	90.66 $\pm$ 0.56	8.51 $\pm$ 0.80	0.83 $\pm$ 0.83	83.50 $\pm$ 3.20
	average	87.77 $\pm$ 1.81*	10.40 $\pm$ 1.71	1.82 $\pm$ 0.65	79.90 $\pm$ 1.83

* = Significantly higher than the control (P<0.05)

Table 4 Analysis of Variance for %male tilapia after immersion in different MT dosages and duration at 2, 11 and 14dpf

Immersion at 2dpf

MTB > GLM 'Male' = Dose Duratn Dose* Duratn.

General Linear Model of the immersion at 2 dpf

Factor Levels Values

Dose 3 0 250 500
Duratn 6 6 12 24 48 72 96

Analysis of Variance for Male 2dpf

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Dose	2	1700.64	1824.25	912.13	14.52	0.000
Duratn	5	467.56	475.00	95.00	1.51	0.202
Dose*Duratn	10	1159.60	1159.60	115.96	1.85	0.075
Error	53	3330.05	3330.05	62.83		
Total	70	6657.86				

General Linear Model of the Immersion at 11dpf

Factor Levels Values

Dose11 3 0 250 500
Dura11 4 6 12 24 48

Analysis of Variance for Male11dpf

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Dose11	2	1143.79	1143.79	571.90	6.64	0.004
Dura11	3	92.85	92.85	30.95	0.36	0.783
Dose11*Dura11	6	1174.76	1174.76	195.79	2.27	0.058
Error	36	3101.89	3101.89	86.16		
Total	47	5513.30				

General Line Model of the Immersion at 14dpf

Factor Levels Values

Dose14 3 0 250 500
Dura14 4 6 12 24 48

Analysis of Variance for Male14dpf

Source	DF	Seq SS	Adj SS	Adj MS	F	P
Dose14	2	4526.93	4526.93	2263.47	29.23	0.000
Dura14	3	533.35	533.35	177.78	2.30	0.094
Dose14*Dura14	6	147.13	147.13	24.52	0.32	0.924
Error	36	2787.68	2787.68	77.44		
Total	47	7995.09				

Discussion

Application of exogenous steroid for inducing sex reversal, should be started at undifferentiated gonad and continued until past the sex differentiation process (Yamamoto, 1969). This is the first principal of orally exogenous steroid sex inversion. Based of this principal, either a male or a female steroid is applied at an adequate dose and duration to the fish at the right time or the labile period (Pifferer and Donaldson, 1993) which depended on fish species. For immersion, is one of exogenous steroid treatment for producing monosex. Advantages of the technique were using very low dose of steroid and shortly at the critical labile period but resulted in greatest response (Pifferer and Donaldson, 1993), which should be the easiest and the main target of monosex production. Thus, exogenous steroid would be applied at the critical and effective period, i.e., period of sex differentiation, present of cells, receptors or enzymes involved in steroid production (Devlin and Nagahama, 2002).

17 α methyltestosterone (MT) is the most commercial synthetic androgen used effectively for masculinization of fishes more than 42 species (Devlin and Nagahama (2002). In addition, the MT is commercially used in tilapia hatcheries world wide including Thailand. Therefore, the MT was used in the present study in order to find out efficacy of MT immersion based on dose and duration in the sensitive ages suggested by Srisakultiew et. al. in press. The oral MT required higher dosage ranged 5-500mg/kg feed (Devlin and Nagahama, 2002) or 60mg/kg feed in all male tilapia standard protocol (Little et. al., 1995). When compared the immersion at 250 – 500 μ g/L in the present study with the oral MT (60mg/kg feed) standard protocol, the immersion dosage used only 1/240 – 1/1000 MT of the oral technique and resulted in significantly 84.45-91.43% male compared to controls (66-76.15%; Table 1-3) in all 3 ages. These indicated that MT masculinized the fish statistically via immersion technique.

In the oral administration, the first feeding tilapia fry (about 8-9 dpf; Personal observation) will be treated with the MT standard protocol (60 mg/kg feed; Little et. al., 1995) for 21 days (between 8-29 dpf), resulted in 86-100% male (Ponza et al., 1996 and Bhujel, 1998). This method used more MT (costly) and longer duration (labour cost), which effected higher cost sex reversal fry. Srisakultiew et. al. (2001) calculated the cost of MT immersion at different densities (35/L and 20,000/L) with the oral MT administration. They found the immersions costed only 75.3 and 3.25% of the oral treatment and resulted in 86-88 and 75-80% male, respectively. Although the immersion at the high density (20,000/L) had low cost (3.25% of the oral), which was suitable for commercial scale, but the method had low efficacy (75-80% male). The result, however was similar to Fitzpatrick et. al. (1999b) who reported %male was affected by higher density during immersion. Thus, a future experiment should be carried out for increasing efficiency of higher density immersion for a commercially tilapia hatchery production.

In the present study, the male percentages of the MT immersion at 2 and 11 dpf confirmed the sensitive ages of the fish reported by Srisakultiew et. al. (in press). While the 14 dpf showed the sensitive age only in the present study but not in the Srisakultiew et. al. (in press). This indicated unconsistant efficacy of MT immersion at the older age of 14 dpf, which different water temperature might affect earlier or late onset of the sex differentiation. The immersion, however, could produce higher male in the wide range of age starting from egg stage (2 dpf) up to larvae stage (5 – 14 dpf). The %male of the current study, however, were higher than Fitzpatrick, et. al. (1999a) who immersed the same species at 13 dpf in a higher effective nonaromatase androgen (17 α -methyl dihydrotestosterone; MDHT) at 500 μ g/L for 2h,

but resulted in only 79.3% male. This may be due to longer immersing duration (6-96h) of the present study compared to only 2h of Fitzpatrick et.al., (1999a). In comparison to salmonid, a shorter duration of MT (200-400µg/L) immersed at newly hatched larvae for 2h and then repeated another 2h immersion in the following week resulted in 82-100% male (Baker et.al., 1988). The result was similar to Piferrer and Donaldson (1989) reported on a single immersion of 6 days post hatching *Oncorhynchus kisutch* in 400µg/L MT for 2h resulted in 73% male. Therefore, the immersing duration require a further study to find out a shortage significant period to obtain effective sex inversion.

Acknowledgements

The study was funded by Thai Research Funds.

Literature Cited

- Baker, I.J., Solar, I.I. and Donaldson, E.M. 1988. Masculinization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) by immersion treatment using 17alpha-methyltestosterone around the time of hatching. *Aquaculture*. 72:3-4:359-369.
- Bhujel, R. 1998. Fry quality is the main factor behind the success of AIT's joint venture tilapia hatchery. *AASP Newsletter*. Asian Institute of Technology (AIT):3(2)3-4.
- Chervinski, J. and Rothbard, S. 1982. An aid in manually sexing tilapia. *Aquaculture*. 26:389.
- Devlin, R.H. and Nagahama, Y. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological and environmental influences. *Aquaculture*. 208:191-364.
- Fisheries Economics Division. 2002. Fisheries statistics of Thailand 1999. No.10/2002. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives.
- Fisheries Statistics Analysis and Research Group. 2003. Freshwater fishfarm production 2000. No.1/2003. Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives. 65p.
- Fitzpatrick, M.S., Contreras-Sanchez, W.M., Miston, R.H., Lucero, M., Feist, G.W. and Schreck, C.B. 1999a. Steroid immersion for masculinization of tilapia: Immersion for tilapia fry in MDHT. In: K.McElwee, D.Burke, M.Niles and H.Egna (editors). Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA. P.73-74.
- Fitzpatrick, M.S., Contreras-Sanchez, W.M., Miston, R.H., Hornick, R., Feist, G.W. and Schreck, C.B. 1999b. Effect of fish density on efficacy of masculinization by immersion in MDHT. In: K.McElwee, D.Burke, M.Niles and H.Egna (editors). Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA. P.75-77.
- Guerrero, R.D. 1982. Control of Tilapia reproduction. p. 309-316. In: R.S.V. Pullin and R.H. Lowe-McConnell (eds.) The biology and culture of tilapias. ICLARM Conf. Proc. 7.432p.
- Guerrero, R.D. and Shelton, W.L. 1974. An aceto-carmin squash method of sexing juvenile fishes. *Prog.Fish cult.* 36:56.
- Little, D.C., Lin, C.K. and Turner, W.A. 1995. Commercial scale tilapia fry production in Thailand. *World Aquaculture*. 26(4):20-24.

- Mair, G.C., Sbucay, J.S., Skibinski, D.O.F., Abella, T.A. and Beardmore, J.A. 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production on all male tilapia, *Oreochromis niloticus*. *Can.J.Fish.Aqua.Sci.* 54:2:396-404.
- Mires, D. 1977. Theoretical and practical aspects of the production of all-male tilapia hybrids. *Bamidgeh.* 29(3): 94-101.
- Mires, D. 1983. Current techniques for the mass production of tilapia hybrids as practised at Ein Hamifratz Fish Hatchery. *Bamidgeh.* 35:1:3-7.
- Piferrer, F. and Donaldson, E.M. 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. *Aquaculture.* 77:251-262.
- Piferrer, F. and Donaldson, E.M. 1993. Sex control in Pacific salmon. In: Muir, J.F. and Roberts, R.J. (eds.) *Recent Advances in Aquaculture.* Institute of Aquaculture. Blackwell Science Publications. P.67-77.
- Ponza, P., Little, D.C. and Boonthamjinda, C. 1996. Effect of the timing of treatment onset after hatching on the efficacy of 17α methyltestosterone for masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. In: R.L. Crewell (ed.) *World Aquaculture'96. The 1996 Annual meeting of the World Aquaculture Society.* Bangkok, Thailand. p.314-315.
- Srisakultiew, P., Kamonrat, W., Sukumasavin, N., Ngamvongchon, S., Leelapatra, W., and Jarayabhand, P. 2001. Problems of the orally tilapia sex inversion and immersion technique. *Symposium of Aquatic Resources and Environment: Integrated Management and Utilization.* Chulalongkorn University. P. II:157-164. (Thai)
- Srisakultiew, P., Kamonrat, W., Sukumasavin, N., Ngamvongchon, S., Thongmee, S. and Jarayabhand, P. in press. Appropriate time for masculinization tilapia by 17α -Methyltestosterone immersion.
- Tayamen, M.M. and Shelton, W.L. 1978. Inducement of sex reverse in *Sarotherodon niloticus* (Linnaeus). *Aquaculture.* 14:349-354.
- Yamamoto, T. 1969. Sex differentiation. In: Hoar, W.S. and Randall, D.J. (eds.) *Fish Physiology.* Vol.III: Poison. Academic Press. p.117-159.
- Yang Yi. 1992. Investigation into the immersion of know-age *Oreochromis niloticus* juveniles for hormonal sex reversal. M.Sc. Thesis. Asian Institute of Technology, Bangkok, Thailand. 144p.

ภาคผนวกที่ 3.1

ประสิทธิภาพของฮอร์โมน 17 α methyltestosterone และ fluoxymesterone ในการแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแช่ที่ความหนาแน่นสูง

คำนำ

การทดลองที่ 3 นี้ประสงค์ที่จะศึกษาชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนที่มีประสิทธิภาพในการแปลงเพศโดยวิธีแช่ ที่ความหนาแน่นของไข่ปลานิลสูงๆ เพื่อประโยชน์ต่อการแปลงเพศเชิงการค้า โดยเลือกดำเนินการแช่ไข่ปลานิลที่อายุ 2 วันหลังการผสม เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยฮอร์โมน 2 ชนิด คือ 17 α methyltestosterone (MT) และ fluoxymesterone (FLU) ที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 250 และ 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร แต่การแช่ไข่ปลานิลในฮอร์โมนที่ความหนาแน่นสูงประมาณ 20,000 ฟอง/ลิตรนี้ ไม่สามารถดำเนินการด้วยการใช้ระบบลมเป่าให้ไข่ปลาขยับเคลื่อนที่เท่าที่จำเป็น จำเป็นต้องมีการใช้อุปกรณ์ประกอบการฟักไข่ ในการทดลองที่ 3 นี้ ได้ทำการทดลองใน 2 ระบบ คือ 3.1 การทดลองแช่แปลงเพศในระบบปิด และ 3.2 การแช่แปลงเพศด้วยระบบโต้ะเขย่า

วิธีการ

3.1 การทดลองแช่แปลงเพศปลานิลที่ความหนาแน่นสูงในระบบปิด

3.1.1 การเตรียมภาชนะสำหรับการแช่ไข่ปลานิลระบบปิด

ก. ภาชนะสำหรับแช่ไข่ปลานิล ใช้กล่องพลาสติกใสแบบกลมขนาดความจุประมาณ 500 มิลลิลิตร ทำการเจาะด้านข้างของภาชนะเป็นช่องขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร 2 ด้าน ด้านละ 3 ช่อง รวมเป็น 6 ช่อง/กล่อง เพื่อใช้เป็นช่องระบายน้ำออกเมื่อมีน้ำเข้าสู่ภาชนะเกินระดับที่กำหนด (100 มิลลิลิตร) ใช้ผ้าตาฟริกไทปิดช่องระบายน้ำเพื่อกันไข่ปลานิลไม่ให้ไหลออกไปพร้อมกับน้ำล้น แต่เมื่อเปิดน้ำเข้าสู่ภาชนะแช่ไข่แต่ละใบปรากฏว่าระดับการเก็บกักน้ำที่กำหนดไว้ 100 มิลลิลิตร ถูกยกกระด้นขึ้นเพราะแรงดึงดูดของน้ำที่บริเวณผ้าตาฟริกไทที่ปิดช่องระบายน้ำ มีผลให้ภาชนะแต่ละใบเก็บกักน้ำที่ระดับต่างๆกัน เมื่อทำการวัดปริมาตรของน้ำในภาชนะแต่ละใบพบว่าโดยเฉลี่ยจะเก็บกักน้ำอยู่ที่ 127.75 ± 2.89 มิลลิลิตร เตรียมภาชนะสำหรับใส่ไข่ปลาจำนวน 20 ใบ

ข. ภาชนะสำหรับบรรจุสารละลายฮอร์โมน ใช้กะละมังพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 20 นิ้ว สามารถบรรจุน้ำได้ประมาณ 50 ลิตร ทำเครื่องหมายการเก็บกักน้ำที่ระดับ 30 ลิตร ใช้กะละมังรวม 5 ใบ กะละมัง 4 ใบบรรจุสารละลายฮอร์โมน MT และ FLU ที่ความเข้มข้น 250 และ 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร ใบละ 1 ชนิด และ 1 ความเข้มข้น ส่วนใบที่ 5 เป็นกะละมังชุดควบคุมจึงใส่เฉพาะ ethanol ในปริมาณที่เท่ากับ ethanol ที่ใช้ในสารละลายฮอร์โมน ด้านบนของปากกะละมัง

ทุกใบ ใช้ตาแครงลวดสังกะสีขนาดตา 1 นิ้วที่มีน้ำหนักประมาณ 8 นิ้ว วางพาดปากกะละมัง ทำการยัดตาข่ายไว้กับปากกะละมัง ที่ตาข่ายนี้มีสายยางพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร ดูดน้ำจากกันกะละมังด้านหนึ่งขึ้นมาที่ปากกะละมัง ก่อนที่จะทอดสายไปบนตาแครงบนปากกะละมัง สายยางนี้ต่อกับปั๊มขนาดเล็กที่จมอยู่ที่กันกะละมัง น้ำจะผ่านสายยางก่อนพ่นน้ำผ่านหัวพลาสติกพ่นน้ำ ที่มีการตั้งทิศทางหัวพ่นน้ำให้ไหลวนไขปลานิลได้อย่างเหมาะสม (ดูภาพที่ 3.1) เสียบปลั๊กไฟฟ้าให้เครื่องปั๊มน้ำทำการพ่นน้ำหรือสารละลายยฮอร์โมนผ่านภาชนะฟักไข่ตลอดเวลา เตรียมกะละมังทั้ง 5 ใบให้เรียบร้อยก่อนเริ่มการทดลองประมาณ 1 ชั่วโมง

3.1.2 รวบรวมไขปลานิล ทำการรวบรวมไขปลานิลจากปากแม่ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 จากศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น เลือกเฉพาะไขปลาที่มีอายุประมาณ 2 วันหลังการผสม จำนวน 15 แม่ รวมน้ำหนักไข่ได้ 292 กรัม คิดเป็นไขปลาประมาณ 51,100 ฟอง

3.1.3 คละไข่จากทุกแม่เข้าด้วยกันให้ทั่ว ทำการสุ่มซึ่งไข่ 14.3 กรัม(ไข่ 1 กรัมมีจำนวนประมาณ 182.19 ± 5.16 ฟอง ดังนั้นมีจำนวนประมาณ 2,605.32 ฟอง) ใส่ในภาชนะฟักไข่ 1 ใบ (127.75 ± 2.89 มิลลิลิตร = 20,394 ฟอง/ลิตร) ด้วยเครื่องซึ่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ทำการสุ่มซึ่งไขปลานิลใส่ภาชนะฟักไข่จำนวน 20 ใบ นำไข่และภาชนะที่เตรียมไว้ไปสู่วางบนปากกะละมังจำนวน 4 ใบ/กะละมัง (4 ซ้ำ/ชุดการทดลอง) ที่บริเวณใต้หัวพ่นน้ำสารละลายจากแต่ละกะละมังปล่อยให้ น้ำพ่นเข้าในภาชนะแช่ไข่ทุกใบและล้นออกเมื่อถึงระดับรูที่เจาะไว้ระบายน้ำออก ปั๊มน้ำขนาดเล็กจึงทำหน้าที่ดูดน้ำสารละลายในกะละมังมาพ่นผ่านภาชนะแช่/ฟักไขปลานิล ทำให้น้ำในภาชนะมีการหมุนเวียนอยู่ในระบบแบบปิดตลอดเวลา

3.1.4 ทำการแช่ไขปลานิลเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลาที่กำหนดย้ายภาชนะแช่ฟักไขออกจากระบบ ล้างไข่ปลาด้วยน้ำสะอาด และย้ายไข่ปลาไปฟักต่อในขวดฟักไข่พลาสติกที่มีระบบน้ำไหลผ่านจากด้านล่างสู่ด้านบนของขวดตลอดเวลา จำนวน 4 ขวด/ชุดการทดลอง จนกระทั่งไข่ฟักเป็นตัว จึงเทลูกปลาลงในถาดอคูมินิยมแบบสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีน้ำพ่นเข้าถาดตลอดเพื่อช่วยการไหลเวียนของน้ำ เมื่อลูกปลาเริ่มกินอาหาร (อายุประมาณ 9 วันหลังการผสม) จึงย้ายลูกปลาจากถาดอคูมินิยมมาใส่ในโหลพลาสติกขนาด 10 ลิตร ที่บรรจุน้ำเริ่มต้น 4 ลิตร ชุดการทดลองละ 4 โหล

3.1.5 อนุบาลลูกปลาในโหลพลาสติกด้วยอาหารโปรตีน 40% การให้อาหารลูกปลาทุกครั้งจะให้ในปริมาณที่เกินพอ วันละ 3-5 ครั้ง ทุกวัน โดยในสัปดาห์แรกบดอาหารเป็นผงให้แก่ลูกปลา หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นอาหารเม็ดโปรตีน 40% ที่แช่น้ำให้นิ่ม ใช้อาหารเม็ดแช่น้ำอนุบาลลูกปลาต่อเป็นเวลาอีก 1 สัปดาห์ ระหว่างการอนุบาลมีการเพิ่มระดับน้ำในโหลตามความเหมาะสมกับขนาดและความหนาแน่นของลูกปลา



ภาพที่ 3.1 การแช่ไขปลานิลในระบบปิด แสดงภาชนะสำหรับแช่ไขปลานิล 4 ใบ/ชุดการทดลอง ที่วางอยู่บนตะแกรงพาดบนปากกะละมังบรรจุสารละลาย 30 ลิตร



ภาพที่ 3.2 การแช่ไขปลานิลบนระบบโต๊ะเขย่า แสดงภาชนะที่ใช้บรรจุไขปลานิลระหว่างการแช่ และอุปกรณ์ของระบบโต๊ะเขย่า

3.1.6 ย้ายลูกปลาจากโหลพลาสติกเข้าตู้กระจกขนาด 100 ลิตรที่บรรจุน้ำเริ่มต้น 30 ลิตร ด้วยการสูบน้ำจำนวนลูกปลาไหลละ 150 ตัวใส่ลงในตู้ อนุบาลลูกปลาต่อด้วยอาหารโปรตีน 40% ในปริมาณที่มากเกินไป วันละ 3-5 ครั้ง ทุกวัน มีการเพิ่มระดับน้ำตามความเหมาะสมกับขนาดของลูกปลา อนุบาลลูกปลาในตู้กระจกนี้จนกระทั่งปลามีอายุครบ 2 เดือน ทำการสูบลูกปลาคู่ละ 50 ตัวมาตรวจเช็คเพศด้วย Acetocarmine Squash Method (Guerrero and Shelton, 1974) ส่วนลูกปลาที่เหลือจากการทดลองนี้ นำไปอนุบาลต่อในกระชังในล่อนสีฟ้าขนาดตา 16 ช่อง/นิ้ว ขนาด 1-2 ตารางเมตร จำนวน 20 ใบ ที่แขวนในบ่อดิน 1 บ่อ

3.2 การทดลองเปลี่ยนแปลงเพศปลานิลที่ความหนาแน่นสูงด้วยระบบไต่เขย่า

3.2.1 การเตรียมระบบไต่เขย่า ทำไต่โครงเหล็กที่มีหน้าไต่ที่แกว่งเขย่าในแนวราบ การเขย่าหน้าไต่นี้ใช้มอเตอร์ขนาด $\frac{1}{4}$ แรงม้า ที่มีจำนวนรอบการหมุน 1,450 รอบ/นาที มาต่อเชื่อมกับเฟืองตัวทดเกลียวตัวหนอนเพื่อลดจำนวนรอบลงเหลือ 56 รอบ/นาที ต่อเชื่อมแกนหมุนจากเฟืองตัวทอนี้ไปที่หน้าไต่ เพื่อทำการเขย่าหรือแกว่งหน้าไต่ เมื่อต้องการแช่ในสารละลายฮอร์โมน นำภาชนะบรรจุไข่และสารละลายฮอร์โมนมาวางบนหน้าไต่นี้ เสียบปลั๊กไฟฟ้าให้มอเตอร์ทำงาน ส่งผลให้หน้าไต่ขยับเคลื่อนที่ไป-มาในแนวราบ ไข่ปลานิลที่อยู่ในสารละลายจะเคลื่อนที่ไปด้วย ทำให้ไข่ปลาไม่เสียดระหว่างการแช่ฮอร์โมน (ภาพที่ 3.2)

3.2.2 ภาชนะที่ใช้พักไข่ปลานิลในการทดลองนี้ใช้กล่องพลาสติกใสแบบสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดบรรจุประมาณ 250 มิลลิลิตร บรรจุน้ำหรือสารละลายฮอร์โมนประมาณ 50 มิลลิลิตร เตรียมภาชนะดังกล่าวสำหรับการทดลองจำนวน 20 ใบ

3.2.3 การเตรียมสารละลายฮอร์โมนสำหรับแช่ไข่ปลานิล ใช้น้ำประปาที่พักไว้ 2-3 คืนในถังพลาสติกขนาด 35 แกลลอน ระหว่างการพักมีการเป่าลมผ่านหัวทรายลงในน้ำตลอดเวลา ตวงน้ำดังกล่าวจำนวน 1 ลิตรใส่ลงในกระปุกพลาสติกขนาดความจุ 1.5 ลิตร จำนวน 5 กระปุก เตรียมสารละลาย MT และ FLU ที่ความเข้มข้น 1,250 และ 5,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สุ่มดูดฮอร์โมนที่เตรียมไว้ความเข้มข้นละ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ลงในกระปุกน้ำ 1 ลิตรที่เตรียมไว้รวม 4 กระปุก ส่วนกระปุกสุดท้ายดูด ethanol จำนวน 0.2 มิลลิลิตรใส่ลงในน้ำ 1 ลิตรใช้เป็นชุดควบคุมการทดลอง

3.2.4 การรวบรวมไข่ปลานิล ดำเนินการเหมือนข้อ 3.1.2 คัดเลือกไข่ปลาที่มีอายุ 2 วันหลังการผสมได้เพียง 8 แม่ รวมน้ำหนักไข่ 176 กรัม ทำการคละไข่ปลาที่ได้ให้ผสมกันอย่างทั่วถึง สุ่มชั่งน้ำหนักไข่ด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ชั่งไข่ปลา 5.6 กรัม (1,020.3 ฟอง)/ภาชนะพักไข่ 1 ใบ สุ่มเติมสารละลายที่เตรียมไว้ในข้อ 3.2.3 ลงในภาชนะพักไข่ที่เตรียมไว้ชนิดละ 4 ใบ ใบละ 50 มิลลิลิตร ดังนั้นความหนาแน่นระหว่างการแช่จึงเป็น 982 ฟอง/50 มิลลิลิตร (= 20,406 ฟอง/ลิตร)

3.2.5 นำภาชนะที่ใส่ไข่ปลานิลพร้อมสารละลายแช่ไข่ทั้ง 20 ใบ วางบนโต๊ะเขย่า เลียบปลั๊กไฟฟ้าให้มอเตอร์ทำงาน ระหว่างการแช่มีการบันทึกจำนวนไข่ปลาที่ดีและเสียในภาชนะแต่ละใบ พร้อมทั้งแยกไข่เสียทิ้งไป แช่ไข่ในสารละลายฮอร์โมนบนโต๊ะเขย่านี้เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จึงล้างไข่ด้วยน้ำสะอาด ย้ายไข่ไปฟักต่อในขวดพลาสติก อนุบาลลูกปลาในโหลพลาสติก ตู้กระจก และตรวจเพศเช่นเดียวกับข้อ 3.1.4, 3.1.5 และ 3.1.6

3.3 วิเคราะห์ข้อมูลและเขียนรายงาน

ผลการทดลอง

ในการศึกษาคุณภาพของระบบการฟักไข่ปลานิลทั้ง 2 ระบบคือ ระบบปิดและระบบโต๊ะเขย่านั้น พบว่า แต่ละระบบทำให้ไข่ปลานิลที่แช่ในแต่ละชุดการทดลอง มีจำนวนไข่เสียต่างกัน การแช่ไข่ปลานิลในระบบปิด พบว่ามีไข่เสียที่เกิดขึ้นระหว่างการแช่ในสารละลายแอลกอฮอล์มีค่าเฉลี่ยเป็น 53.75 ± 2.78 ฟอง ใกล้เคียงกับจำนวนไข่เสียที่ได้จากชุดการทดลองที่แช่ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/ลิตร (50.75 ± 3.75 ฟอง) โดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) ในขณะที่การแช่ไข่ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร และสารละลาย FLU ที่ความเข้มข้น 250 และ 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร มีผลให้ไข่ปลานิลที่แช่มีจำนวนไข่เสียมากขึ้นเป็น 88.0 ± 8.67 , 72.75 ± 5.74 และ 68.75 ± 5.75 ฟอง ตามลำดับ ปริมาณไข่เสียนี้สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$; ตารางที่ 3.1) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนไข่เสียที่เกิดขึ้นในชุดที่แช่แอลกอฮอล์ และชุดที่แช่ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/ลิตร

ส่วนการแช่ไข่ปลานิลบนระบบโต๊ะเขย่า พบว่าไข่เสียของแต่ละชุดการทดลองมีปริมาณที่ตรงข้ามกับระบบปิด คือ จำนวนไข่เสียที่พบในชุดการทดลองแช่ชุดควบคุมที่ใส่แอลกอฮอล์ (91.6 ± 5.89 ฟอง) และชุดที่แช่ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/ลิตร (76.81 ± 3.79 ฟอง; ตารางที่ 2) มีจำนวนไข่เสียสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่แช่ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร และสารละลาย FLU ที่ความเข้มข้น 250 และ 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร ซึ่งมีจำนวนไข่เสียรวม 62.18 ± 3.26 , 60.06 ± 4.59 และ 66.22 ± 2.20 ฟอง ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2)

เมื่อสิ้นสุดการทดลองของการแช่ไข่ปลานิลในระบบปิดและระบบโต๊ะเขย่า พบว่าเปอร์เซ็นต์ลูกปลาเพศผู้ที่ได้จากแต่ละชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$; ตารางที่ 3.3; 3.5 และ ตารางที่ 3.4; 3.6)

ตารางที่ 3.1 ปริมาณไข่ดี/เสียเมื่อสิ้นสุดระยะการแช่ 2 วัน ของแต่ละชุดการทดลองเมื่อแช่ไข่ที่ความหนาแน่นสูง ในระบบปิด

Type	Dose	จำนวนไข่ (ฟอง)			
		เริ่มต้น	ไข่ดี	ไข่เสีย	%ไข่เสีย
Air	0	687	673	14	2.04
Alc	0	2,443±31	2,184	53.75±2.78a	2.20
MT	250	2,443±31	2,190	50.75±3.75a	2.08
	1,000	2,443±31	2,137	88.00±8.67b	3.60
FLU	250	2,443±31	2,237	72.75±5.74b	2.98
	1,000	2,443±31	2,176	68.75±5.75b	2.81

หมายเหตุ

Air = การฟักไข่ปลาในด้วยระบบลมผ่านหัวทรายใช้ความหนาแน่นต่ำกว่าฟักในระบบปิด
ตัวอักษร a,b ที่ต่างกันในแถวตั้งของ %ไข่เสีย แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3.2 ปริมาณไข่ดี/เสียเมื่อสิ้นสุดระยะการแช่ 2 วัน ของแต่ละชุดการทดลองเมื่อแช่ไข่ที่ความหนาแน่นสูง บนระบบโต้ะเขย่า

Type	Dose	จำนวนไข่ (ฟอง)			
		เริ่มต้น	ไข่ดี	ไข่เสีย	%ไข่เสีย
Air	0	657.67±3.63	571	71	10.81
Alc	0	944±3.93	834±7.7	91.60±5.89a	9.70
MT	250	944±3.93	878.6±3.25	76.81±3.79a	8.14
	1,000	944±3.93	884.7±8.47	62.18±3.26b	6.59
FLU	250	944±3.93	872.4±13.10	60.06±4.59b	6.36
	1,000	944±3.93	892.82±5.54	66.22±2.20b	7.01

หมายเหตุ

Air = การฟักไข่ปลาในด้วยระบบลมผ่านหัวทรายใช้ความหนาแน่นต่ำกว่าฟักในระบบปิด
ตัวอักษร a,b ที่ต่างกันในแถวตั้งของ %ไข่เสีย แสดงว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

ตารางที่ 3.3 ผลการเปลี่ยนแปลงเพศลูกปลานิลที่ความหนาแน่นสูง ด้วย MT และ FLU ในระบบปิด เป็นเวลานาน 2 วัน

Type	dose	อัตราส่วนเพศ (%)			อัตราการรอด (%)
	µg/l	ผู้	เมีย	ผู้+เมีย	
Alcohol	-	70.43±2.20	21.93±2.16	7.63±1.46	60.30±9.00
MT	250	61.24±4.95	29.75±5.63	9.01±3.24	70.12±7.30
	1,000	66.29±6.84	22.09±5.46	11.62±4.39	61.95±7.42
FLU	250	67.90±5.40	24.08±4.79	8.02±2.15	58.11±2.03
	1,000	71.91±2.85	21.64±4.29	6.44±2.26	71.37±1.64

ตารางที่ 3.4 ผลการเปลี่ยนแปลงเพศลูกปลานิลที่ความหนาแน่นสูงด้วย MT และ FLU บนระบบโต๊ะเขย่า เป็นเวลานาน 2 วัน

Type	dose	อัตราส่วนเพศ (%)			อัตราการรอด (%)
	µg/l	ผู้	เมีย	ผู้+เมีย	
Alcohol	-	73.32±3.83	6.84±2.58	19.60±3.36	87.67±6.70
MT	250	72.50±3.29	5.11±1.80	21.82±4.19	87.59±5.31
	1,000	73.78±3.64	5.91±0.32	19.86±3.80	91.06±3.07
FLU	250	75.73±1.56	7.08±1.33	17.24±2.45	86.94±6.05
	1,000	71.06±5.12	5.48±0.91	23.47±4.35	92.94±2.26

ตารางที่ 3.5 ผลการวิเคราะห์การแปลงเพศโดยวิธีแซ่ไข่ปลาชนิดที่อายุ 2 วันหลังการผสมในสารละลาย MT และ FLU ที่ความเข้มข้น 250 และ 1,000 ไมโครกรัม นาน 48 ชั่วโมงในระบบปิด ด้วยโปรแกรม MINITAB 10.1

General Linear Model for male

Source	Df	Seq.SS	Adj.SS	Adj.MS	F	P
Type	1	150.9	150.9	150.9	1.39	0.261
Dose	1	82.1	82.1	82.1	0.76	0.402
Type x dose	1	1.1	1.1	1.1	0.01	0.923
Error	12	1303.7	1303.7	108.6		
Total	15	1537.8				

General Linear Model for female

Source	Df	Seq.SS	Adj.SS	Adj.MS	F	P
Type	1	37.4	37.4	34.4	0.36	0.557
Dose	1	102.0	102.0	102.0	0.99	0.339
Type x dose	1	27.2	27.2	27.2	0.26	0.616
Error	12	1233.3	1233.3	102.0		
Total	15	1399.9				

General Linear Model for intersex

Source	Df	Seq.SS	Adj.SS	Adj.MS	F	P
Type	1	38.07	38.07	38.07	0.96	0.346
Dose	1	1.07	1.07	1.07	0.03	0.872
Type x dose	1	17.56	17.56	17.56	0.44	0.518
Error	12	474.52	474.52	39.54		
Total	15	531.21				

General Linear Model for survival

Source	Df	Seq.SS	Adj.SS	Adj.MS	F	P
Type	1	6.7	6.7	6.7	0.06	0.814
Dose	1	25.9	25.9	25.9	0.23	0.644
Type x dose	1	459.5	459.5	459.5	3.99	0.069
Error	12	1380.8	1380.8	115.1		
Total	15	1872.8				

ตารางที่ 3.6 ผลการวิเคราะห์การแปลงเพศโดยวิธีแช่ไข่ปลาบิตที่อายุ 2 วันหลังการผสมในสารละลาย MT และ FLU ที่ความเข้มข้น 250 และ 1,000 ไมโครกรัม นาน 48 ชั่วโมง บนโต๊ะเขย่า ด้วยโปรแกรม MINITAB 10.1

General Linear Model for male

Source	Df	Seq.SS	Adj.SS	Adj.MS	F	P
Type	1	0.26	0.26	0.26	0.00	0.946
Dose	1	11.59	11.59	11.59	0.22	0.648
Type x dose	1	35.34	35.34	35.34	0.67	0.429
Error	12	633.00	633.00	52.75		
Total	15	680.20				

General Linear Model for female

Source	Df	Seq.SS	Adj.SS	Adj.MS	F	P
Type	1	2.349	2.349	2.349	0.39	0.542
Dose	1	0.644	0.644	0.644	0.11	0.748
Type x dose	1	5.748	5.748	5.748	0.96	0.346
Error	12	71.561	71.561	5.963		
Total	15	80.301				

General Linear Model for intersex

Source	Df	Seq.SS	Adj.SS	Adj.MS	F	P
Type	1	0.95	0.95	0.95	0.02	0.900
Dose	1	18.34	18.34	18.34	0.32	0.581
Type x dose	1	66.95	66.95	66.95	1.18	0.299
Error	12	683.05	683.05	56.92		
Total	15	769.28				

General Linear Model for survival

Source	Df	Seq.SS	Adj.SS	Adj.MS	F	P
Type	1	1.51	1.51	1.51	0.02	0.892
Dose	1	89.59	89.59	89.59	1.13	0.309
Type x dose	1	6.45	6.45	6.45	0.08	0.780
Error	12	952.01	952.01	79.33		
Total	15	1049.56				

สรุปและวิจารณ์

ในการทดลองที่ 2 การใช้ MT ที่ความเข้มข้น 250-500 ไมโครกรัม/ลิตร มีผลทำให้การแปลงเพศของปลานิลเป็นเพศผู้สูงกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่การทดลองที่ 2 นี้ใช้ความหนาแน่นระหว่างการแช่เพียง 40 ฟอง/ลิตร เป็นความหนาแน่นที่น้อยมาก และคงจะไม่สะดวกหรือขาดความเหมาะสมในการแปลงเพศปลานิลเชิงการค้า ดังนั้นการทดลองที่ 3 นี้ จึงถูกวางแผนเพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของการแปลงเพศโดยวิธีแช่ที่ความหนาแน่นสูง ประมาณ 20,372 - 20,406 ฟอง/ลิตร ซึ่งเป็นความหนาแน่นที่ใกล้เคียงกับความหนาแน่นที่ใช้ฟักและอนุบาลลูกปลานิลของโรงเพาะฟักปลานิลในปัจจุบัน พร้อมกับมีการเพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ใช้เป็น 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร

การทดลองที่ 3 ได้ทำการแช่ไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสม (53.5-56.3 CTU) ปรากฏว่าเปอร์เซ็นต์เพศผู้ของลูกปลาที่ได้ในทุกชุดการทดลองของระบบปิด (ตารางที่ 3.3) และระบบโต๊ะเขย่า (ตารางที่ 3.4) มีค่าใกล้เคียงกันโดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) แสดงว่าทั้งชนิดและความเข้มข้นของฮอร์โมนที่ใช้ในการทดลองที่ 3 นี้ ไม่มีผลต่อการแปลงเพศของปลานิลเมื่อแช่ที่ความหนาแน่นสูงแต่อย่างใด ทั้งที่ผลการทดลองที่ 2 ที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าฮอร์โมน MT มีผลต่อการแปลงเพศโดยวิธีแช่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในการทดลองที่ 3 มีการเพิ่มความหนาแน่นของไข่ปลาระหว่างการแช่จาก 40 ฟอง/ลิตร เป็น 20,372 - 20,406 ฟอง/ลิตร คือมีความหนาแน่นสูงขึ้นถึง 510 เท่าจากการทดลองที่ 2 ความหนาแน่นที่สูงขึ้นนี้ Srisakultiew และ Rana (1991) รายงานว่ามีผลให้ลูกปลาพัฒนาเพศเร็วขึ้น นั่นคือ ขบวนการ sex differentiation จะเกิดขึ้นเร็วกว่าปกติประมาณ 3 วัน แต่ในพัฒนาการของไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสม นี้ จากการสังเกตพบว่าตัวอ่อนปลานิลมีพัฒนาการในระยะ organogenesis ที่ยังไม่ถึงระยะ sex differentiation แต่อย่างใด ระยะ organogenesis ที่อายุ 2 วันหลังการผสม (53.5-56.3 CTU) นี้ อาจเป็นระยะที่เซลล์บางเซลล์พัฒนาไปเป็น primordial germ cells ก่อนที่จะพัฒนาไปเป็น gonad ต่อไป การแช่ฮอร์โมนในระยะนี้จึงมีผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (การทดลองที่ 2) แต่ในการทดลองที่ 3 มีการเพิ่มความหนาแน่นสูงขึ้นถึง 510 เท่า ในขณะที่ความเข้มข้นของฮอร์โมนสูงขึ้นเพียง 2-4 เท่า จึงเป็นไปได้ที่ว่าปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนที่แช่ในการทดลองที่ 3 นั้น อาจจะไม่เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้ปลานิลเปลี่ยนเป็นเพศผู้สอดคล้องกับรายงานของ Fitzpatrick และ คณะ (1999) ที่รายงานว่าความหนาแน่นระหว่างการแช่ที่สูงขึ้นจาก 33 เป็น 66 และ 100 ตัว/ลิตร มีผลให้การแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแช่ด้วย MDHT ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/ลิตร นาน 3 ชั่วโมง ได้เปอร์เซ็นต์ลูกปลาเพศผู้ลดจาก 80.3% (33 ตัว/ลิตร) เหลือเพียง 71.7% (66 และ 100 ตัว/ลิตร) เท่านั้น แสดงว่าความหนาแน่นหรือจำนวนไข่/ลูกปลามีผลต่อการแปลงเพศโดยวิธีแช่ นั่นคือ ไข่หรือลูกปลาแต่ละใบ/ตัว ย่อมมีการดูดซึมฮอร์โมน

เข้าไปในไข่/ตัวปลาปริมาณหนึ่ง เมื่อจำนวนไข่เพิ่มมากขึ้น การดูดซับฮอร์โมนไปใช้จึงมีมากขึ้น จนอาจทำให้ฮอร์โมนในน้ำมีไม่เพียงพอที่จะเหนี่ยวนำไข่/ลูกปลาที่เหลือให้เป็นเพศผู้ที่ต้องการได้ ทำให้เปอร์เซ็นต์เพศผู้ลดลง ดังที่ปรากฏในผลการทดลองที่ 3 ตารางที่ 3.3 และ 3.4

เมื่อความหนาแน่นเป็นปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการแปลงเพศของปลานิลโดยวิธีแช่ ในขณะเดียวกันการแปลงเพศปลานิลเชิงการค้าไม่สามารถดำเนินการที่ความหนาแน่นต่ำๆ เพียง 33-40 ฟอง(ตัว)/ลิตร จึงทำให้เทคนิคนี้ขาดความเหมาะสมในการแปลงเพศปลานิลเชิงการค้า และการใช้สารละลายฮอร์โมนปริมาณมากๆ ถึงแม้ว่าจะเป็นความเข้มข้นต่ำๆ เพียง 250 - 500 ไมโครกรัม/ลิตร วิธีการนี้ย่อมทำให้เปลืองพื้นที่และวัสดุสำหรับการจัดการฮอร์โมนที่อาจเหลืออยู่ในสารละลายน้ำนั้น และแน่นอนการทิ้งสารละลายดังกล่าวสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ย่อมมีผลให้สิ่งมีชีวิตบริเวณนั้นได้รับการปนเปื้อนจากฮอร์โมนที่ใช้ด้วย ดังนั้นควรศึกษาการแช่ไข่ปลานิลที่ความหนาแน่นสูงที่เหมาะสมสำหรับการแปลงเพศโดยวิธีแช่ที่มีประสิทธิภาพเชิงการค้า ด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมนให้สูงขึ้น แต่อย่างไรก็ตามการใช้ฮอร์โมนที่ความเข้มข้นที่สูงมากเกินไป อาจส่งผลในทางตรงกันข้าม หรืออาจส่งผลเชิงลบคืออาจทำให้อัตราการรอดตายและอัตราความผิดปกติของลูกปลาส่งขึ้นด้วย

เอกสารอ้างอิง

- Fitzpatrick, M.S., W.M.Contreras Sanchez, R.H. Milston, R. Hornick, G.W. Feist and C.B.Schreck. 1999. Effect of fish density on efficacy of masculinization by immersion in MDHT. p.75-77. In: K. McElwee, D. Bruke, M.Niles and H. Eгна (eds), Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon.
- Srisakultiew, P. and K.J. Rana. 1991. Effect of stocking density on sex differentiation of *Oreochromis niloticus* (L.). p.289. In: A.P. Scott, J.P. Sumpter, D.E. Kime and M.S. Rolfe (eds) Proceedings of the Fourth International Symposium on the Reproductive Physiology of Fish. University of East Anglia, Norwich, U.K. 7-12 July 1991.

ภาคผนวกที่ 3.2

4. อุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแก้ไขปลานิลแปลงเพศ

คำนำ

ปลานิลเป็นปลาที่มีขนาดใหญ่ มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2-3 มิลลิเมตร เป็นไข่ประเภทไข่จม โดยธรรมชาติไข่จะถูกฟักอยู่ในอุ้งปากของแม่ปลา การขยับปากและกระดุกปิดเหงือกเพื่อการหายใจ มีผลให้ไข่ในปากแม่ปลายับเคลื่อนที่ไปมา ใช้เวลาประมาณ 5-8 วันไข่จึงจะฟักเป็นตัว แต่ยังคงอาศัยอยู่ภายในปากของแม่ปลาอยู่จนกระทั่งอายุประมาณ 9-10 วันจึงจะว่ายน้ำแข็งแรงและว่ายน้ำออกจากปากแม่เพื่อกินอาหาร การฟักไข่ปลานิลในโรงเพาะปลานิลแปลงเพศ มีอุปกรณ์ฟักไข่ปลานิลหลายแบบ เริ่มตั้งแต่ 1)การฟักไข่ในขวดน้ำอัดลมพลาสติกที่มีก้นมนแบบครึ่งวงกลมของมหาวิทยาลัย Stirling, สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT), มูลนิธิอุดรพัฒนา จ. อุดรธานี และ ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดอุดรธานี 2)การฟักไข่ในขวดให้น้ำไก่ที่หงายขวดขึ้น ของบุญโฮมฟาร์ม อ. มัญจาคีรี จ. ขอนแก่น และ 3)การฟักไข่ในถาดอลูมิเนียมสีเหลี่ยมทรงสูงของศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น ระหว่างการฟักไข่มีการเปิดท่อน้ำค้ำน้ำ ให้ไหลไปกระทบส่วนโค้งมนของก้นขวด แรงและทิศทางของน้ำจะช่วยซัดไข่ปลาที่กองอยู่ที่ก้นขวดให้มีการขยับเคลื่อนที่ ไข่จึงไม่เสียและสามารถฟักออกเป็นตัวได้ แต่การแก้ไขปลาในสารละลายฮอร์โมนเพื่อการแปลงเพศปลา ไม่สามารถทำการฟักและแก้ไขในระบบฟักไขดังกล่าวได้ เพราะจะทำให้เปลือกฮอร์โมนและยากในการป้องกันและจัดการกับฮอร์โมนไม่ให้ปนเปื้อนสู่ผู้เลี้ยงและสิ่งแวดล้อมของฟาร์ม ดังนั้นอุปกรณ์ต้นแบบประกอบการฟักไข่ปลา จึงมีบทบาทในการช่วยฟักไข่ปลานิลระหว่างการแก้ไขฮอร์โมนแปลงเพศ โดยใช้สารละลายฮอร์โมนน้อยที่สุด แก้ไขปลาจำนวนมากได้ ทำให้ต้นทุนค่าฮอร์โมนลดต่ำลง แต่สามารถแปลงเพศได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยไม่ส่งผลกระทบต่อผู้ใช้และสภาพแวดล้อม

วิธีการ

1. ออกแบบอุปกรณ์ต้นแบบประกอบการฟักไข่แบบโต๊ะเขย่า ทำโต๊ะโครงเหล็กให้มีหน้าโต๊ะที่กว้างเขย่าในแนวราบ การเขย่าหน้าโต๊ะนี้ใช้มอเตอร์ขนาด $\frac{1}{4}$ แรงม้า ที่มีจำนวนรอบการหมุน 1,450 รอบ/นาที มาต่อเชื่อมกับเฟืองตัวทดเกลียวตัวหนอนเพื่อลดจำนวนรอบลงเหลือ 56 รอบ/นาที ต่อเชื่อมแกนหมุนจากเฟืองตัวทอดนี้ไปที่หน้าโต๊ะ เพื่อทำการเขย่าหรือแกว่งหน้าโต๊ะในแนวราบ เมื่อต้องการแก้ไขในสารละลายฮอร์โมน นำภาชนะบรรจุไข่และสารละลายฮอร์โมนมาวางบนหน้าโต๊ะนี้ เสียบปลั๊กไฟฟ้าให้มอเตอร์ทำงาน ส่งผลให้น้ำโต๊ะขยับเคลื่อนที่ไป-มาในแนวราบ ไข่ปลานิลที่อยู่ในสารละลายจะเคลื่อนที่ไปด้วย ทำให้ไข่ปลาไม่เสียระหว่างการแก้ไขฮอร์โมน (ภาพที่ 3.2.1ก และ 3.2.1ข)



ภาพที่ 3.2.1ก อุปกรณ์ต้นแบบประกอบการเลี้ยงปลาชนิดแบบโต้ะเขย่า (ด้านข้าง) แสดงให้เห็นมอเตอร์ ขนาด 1/4 แรงม้า และเฟืองตัวทดเกสียตัวหนอน พร้อมสวิทช์ควบคุม



ภาพที่ 3.2.1ข อุปกรณ์ต้นแบบประกอบการเลี้ยงปลาชนิดแบบโต้ะเขย่า (ด้านบน) แสดงให้เห็นความหนาแน่นและการกระจายของไข่ปลาในถาดระหว่างการเลี้ยง



ภาพที่ 3.2.2 อุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่แบบไฮโดรโปนิกส์ แสดงให้เครื่องชาร์ตไฟที่ติดกับแบตเตอรี่ขนาด 70 แอมแปร์ ที่ส่งไฟ DC 12 โวลต์ ให้กับมอเตอร์ปั้มน้ำฝนที่ทำหน้าที่หมุนแกนแป้นเหล็กที่ยึดไฮโดรโปนิกส์ 2 ใบ

2. ออกแบบอุปกรณ์ต้นแบบประกอบการปักไข่แบบใบพัด ใช้มอเตอร์ปั้มน้ำฝนที่มีจำนวนรอบประมาณ 18-24 รอบ/นาที ต่อเชื่อมกับแกนเหล็กแป้นขนาด 4 นิ้วที่ต่อทอดยาวไปบนโต๊ะประมาณ 1 เมตร ปลายอีกด้านของแกนถูกยึดไว้ด้วยตุ๊กตา ทำให้แกนนี้สูงจากพื้นโต๊ะ 18 เซนติเมตร ที่แกนมีที่ยึดติดใบพัดเป็นระยะๆ แต่ละจุดสามารถติดใบพัดได้ 2 ใบ ส่วนของใบพัดทำด้วยพลาสติกคอกขวดน้ำอัดลมขนาดกว้าง 4.5 เซนติเมตร ยาว 9 เซนติเมตร ยึดส่วนของใบพัดเข้ากับก้านใบพัดยาว 15 เซนติเมตร ติดใบพัดโดยให้ใบหนึ่งหันไปทางซ้าย ส่วนอีกใบหันไปทางขวา เมื่อใบพัดหมุนส่วนของใบพัดจะกวาดไข่ที่พื้นภาวด้านซ้ายและด้านขวาสลับกันเป็นระยะ ทำให้ไข่ปลามีการขยับเคลื่อนที่ได้อย่างทั่วถึงตลอดทั้งภาด (ภาพที่ 3.2.2) ไข่ปลาจึงไม่เสียระหว่างการแช่ฮอร์โมนและไข่ปลาสามารถฟักออกเป็นตัวได้

การทำงานของมอเตอร์ปั้มน้ำฝนซึ่งใช้ไฟฟ้ากระแสตรง ถูกควบคุมด้วยแบตเตอรี่รถยนต์ แต่เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดไฟในแบตเตอรี่หมด จึงต่อแบตเตอรี่เชื่อมเข้ากับเครื่องชาร์จแบตเตอรี่ขนาดเล็กที่สามารถใช้ไฟบ้าน 220 V ได้

3. รวบรวมไข่ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 อายุ 2 วันหลังการผสมจากศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น จำนวน 19 แม่ รวมน้ำหนักไข่ปลา 407 กรัม ($\times 182$ ฟอง/กรัม = 74,074 ฟอง)

4. เตรียมสารละลายฮอร์โมน 17α methyltestosterone (MT; Fluka) และ fluoxymesterone (FLU; Halotestin 5mg/tablet; Pharmacia & Upjohn, USA) ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร จำนวน 10 ลิตร ในน้ำสะอาด ที่ใช้น้ำประปาพักค้างคืนประมาณ 2-3 วันในถังขนาด 35 แกลลอน มีหัวทรายเป่าลมในน้ำประมาณ 2-3 หัว/ถัง ส่วนชุดควบคุมเตรียมน้ำสะอาดจำนวน 10 ลิตร ใส่ ethanol จำนวน 2 มิลลิลิตร เท่ากับปริมาณที่ใช้ผสมและละลายฮอร์โมน MT และ FLU ลงในถังน้ำที่เตรียมไว้

5. สุ่มไข่ด้วยเครื่องซึ่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่งจำนวน 86 กรัม/ภาดปักไข่ 1 ใบ จำนวน 4 ภาด เหลือไข่ประมาณ 50 กรัมนำไปแยกฟักด้วยระบบลมในกระปุกพลาสติกขนาด 1.5 ลิตรที่บรรจุน้ำ 1 ลิตร (ใช้น้ำผสม ethanol ที่เตรียมไว้ในข้อ 4) กระปุกละ 4 กรัม (728 ฟอง/กระปุก) จำนวน 4 กระปุก แต่ละกระปุกมีหัวทรายเป่าลมกระปุกละ 1 หัว ใช้ลมจากหัวทรายช่วยให้ไข่ปลามีการขยับเคลื่อนที่ระหว่างการฟัก การปักไข่ในระบบลมนี้ใช้ในการทดลองที่ 1 (เรื่องอายุ) และ 2 (ความเข้มข้นและระยะเวลา) จึงใช้การปักไข่ในระบบลมนี้เป็นชุดเปรียบเทียบกับปักไข่ในระบบโต๊ะเขย่าและระบบใบพัด

6. ใช้สารละลายฮอร์โมนที่เตรียมไว้ในข้อ 4 มาสุ่มใส่ลงในภาดปักไข่ ข้อ 5 ชนิดละ 2 ภาด รวม 4 ภาด นำไข่และภาดที่เตรียมไว้ ไปสู่วางบนระบบโต๊ะเขย่าจำนวน 2 ภาด และระบบใบพัดจำนวน 2 ภาด ระหว่างการแช่และปักไข่ปลามีการบันทึกจำนวนและแยกไข่เสียในแต่ละภาดทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ทำการแช่ฮอร์โมนนาน 48 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนจากน้ำฮอร์โมนเป็นน้ำสะอาด ย้ายไข่ปลาที่เหลือไปฟักต่อในขวดปักไข่ที่

มีน้ำไหลเวียนตลอดเวลา เมื่อลูกปลาฟักเป็นตัวอายุประมาณ 5-6 วันหลังการผสม เทลูกปลาลงถาด ฟักไข่ที่มีน้ำไหลเวียนตลอดเวลาจนลูกปลามีอายุประมาณ 9-10 วัน

7. ย้ายลูกปลาที่ได้จากแต่ละระบบและชนิดฮอร์โมนลงโหลพลาสติกขนาด 10 ลิตรที่บรรจุน้ำเริ่มต้น โหลละ 4 ลิตร สุ่มนับลูกปลาจำนวน 200 ตัว/โหล อนุบาลลูกปลาด้วยอาหารโปรตีน 40% ในสัปดาห์แรกใช้ อาหารที่บดเป็นผง สัปดาห์ที่ 2 ใช้อาหารเม็ดแช่น้ำให้นิ่ม ในปริมาณที่กินจนอิ่ม วันละ 3-5 ครั้ง ทุกวัน ระหว่างการอนุบาลมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวัน พร้อมกับเพิ่มระดับน้ำตามความหนาแน่นของลูกปลา

8. เมื่ออนุบาลลูกปลาในโหลพลาสติกครบ 2 สัปดาห์ ทำการย้ายลูกปลาลงในตู้กระจกขนาด 100 ลิตรที่บรรจุน้ำเริ่มต้น 30 ลิตร โหลละ 1 ตู้ ระบบน้ำในตู้เป็นแบบหมุนเวียน นำน้ำที่ผ่านการใช้แล้ว มา บำบัดในบ่อกรองชีวภาพ ก่อนนำกลับไปใช้อีก มีการเพิ่มระดับน้ำในตู้กระจกเป็นระยะตามความเหมาะสม ของขนาดปลา เมื่ออนุบาลลูกปลาครบ 60 วันจึงทำการตรวจเพศปลาด้วยวิธีการเดียวกับการทดลองที่ 1, 2 และ 3

9. วิเคราะห์ข้อมูลและเขียนรายงาน

ผลการทดลอง

การทดลองแช่ไข่ปลานิลด้วยอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบโต๊ะเขย่าและแบบใบพัดในสารละลาย MT และ FLU ที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/ลิตรนั้น พบว่าอุปกรณ์ประกอบการแช่ทั้ง 2 แบบ มีผลให้เกิดไข่เสียจำนวน 2.97-3.46 และ 1.96-3.95% ในแบบโต๊ะเขย่าและแบบใบพัดตามลำดับ โดยที่ไข่ปลานิล ที่แช่ในสารละลาย FLU มีผลให้เกิดไข่เสีย (แบบโต๊ะเขย่า = 3.46 %; แบบใบพัด 3.95%) ในปริมาณที่สูงกว่าการแช่ในสารละลาย MT (แบบโต๊ะเขย่า = 2.97%; แบบใบพัด = 1.96%) แต่อย่างไรก็ตามจำนวนไข่เสียที่ได้จากอุปกรณ์ประกอบการแช่ทั้ง 2 แบบ มีปริมาณน้อยกว่าการฟักไข่ปลานิลด้วยระบบลม ที่มีปริมาณไข่เสียสูงที่สุดถึง $4.43 \pm 0.73\%$ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 ผลการแช่ไข่ปลานิลในสารละลายฮอร์โมนด้วยอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบโต๊ะเขย่าและแบบใบพัด

อุปกรณ์ประกอบการฟักไข่ (แบบ)	ชนิดฮอร์โมน	จำนวนไข่ (ฟอง)		
		เริ่มต้น	ไข่เสีย	% ไข่เสีย
1. โต๊ะเขย่า	17 α -methyltestosterone	15,652	465	2.97
	fluoxymesterone	15,652	541	3.46
2. ใบพัด	17 α -methyltestosterone	15,652	307	1.96
	fluoxymesterone	15,652	618	3.95
3. ระบบลม	ethanol	728	32.25 $\pm$ 5.3	4.43 $\pm$ 0.73

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์เพศของลูกปลาที่ได้จากการแช่แปลงเพศด้วยอุปกรณ์ฟักไข่ปลานิลทั้ง 3 แบบ

อุปกรณ์ประกอบการฟัก	ชนิดฮอร์โมน	% เพศของลูกปลา		
		ผู้	เมีย	ผู้+เมีย
1. ระบบโต๊ะเขย่า	17 α methyltestosterone	78.00	4.00	18.00
	fluoxymesterone	68.00	12.00	20.00
2. ระบบใบพัด	17 α methyltestosterone	72.34	10.64	17.02
	fluoxymesterone	68.00	20.00	12.00
3. ระบบลม	ethanol	85.25 $\pm$ 3.16	3.00 $\pm$ 3.00	11.75 $\pm$ 0.71

สรุปและวิจารณ์ผล

อุปกรณ์ประกอบการแช่ไข่ปลานิลนี้ มีบทบาทช่วยให้ไข่ปลาขยับเคลื่อนที่ระหว่างการแช่ ทำให้ไข่ปลาไม่ตายหรือเสียทั้งที่แช่ในความหนาแน่นสูงถึง 15,652 ฟอง/ลิตร พบว่ามีไข่เสียเพียง 1.96-3.95% ต่ำกว่าการแช่ด้วยระบบลมที่ใช้ความหนาแน่นน้อยกว่าถึง 21.5 เท่า (728 ฟอง/ลิตร)แต่มีไข่เสียสูงถึง 4.43 $\pm$ 0.73% ที่สำคัญการแช่ด้วยระบบลม ไม่สามารถทำการแช่ที่ความหนาแน่นสูงถึง 15,652 ฟอง/ลิตร ประสิทธิภาพของอุปกรณ์ที่ใช้ ไม่สามารถทำการวิเคราะห์ทางสถิติได้ เพราะว่าการทดลองแต่ละแบบมีเพียง 1 ซ้ำเท่านั้น เนื่องจากข้อจำกัดในการหาไข่ปลาระยะเดียวกันมาทำการทดลอง ทั้งที่ทางศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่นให้ความร่วมมืออย่างดี โดยทั่วไปจะเก็บไข่ปลาระยะเดียวกันได้ประมาณ 250 กรัม วันที่ทำการทดลองนี้สามารถเก็บไข่ได้จาก 19 แม่ มีน้ำหนักไข่รวมถึง 407 กรัม นับว่าสูงมาก แต่ทำการทดลองได้เพียง 1 ซ้ำเท่านั้น

นอกจากนี้อุปกรณ์ประกอบการแช่ไข่มีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะนำไปใช้ แช่แปลงเพศปลานิลเชิงการค้า จึงเลือกใช้วัสดุราคาถูก หาง่ายในท้องตลาด เช่น ถาดพลาสติกทงสูงที่ใช้เป็นถาดแช่ไข่ในสารละลายฮอร์โมน เป็นถาดขนาดเดียวกับถาดอูมิเนียมที่ใช้ในโรงเพาะฟักปลานิลปัจจุบัน ซื้อได้ในราคาใบละไม่เกิน 50 บาท ขนาดของถาดมีความเหมาะสมกับการปฏิบัติงานแบบใช้โต๊ะเขย่า เพราะสามารถยกเข้า-ออก เพื่อการแช่หรือเปลี่ยนถ่ายน้ำได้ง่าย สะดวกกว่าอุปกรณ์การแช่แบบใบพัดซึ่งต้องมีการขยับใบพัดให้อยู่ในตำแหน่งขนานกับพื้นโต๊ะก่อนจึงจะเคลื่อนย้ายถาดเข้า-ออก แต่การแช่แบบใบพัดมีข้อดีที่สามารถทำงานได้ในกรณีไฟดับ เพราะระหว่างการทำงานมีการชาร์ตไฟเข้าแบตเตอรี่ตลอดเวลา เมื่อไฟฟ้าดับมอเตอร์จะใช้ไฟที่สะสมอยู่ในแบตเตอรี่ได้ทันที สามารถใช้ไฟในแบตเตอรี่ทำงานหมุนใบพัดต่อเนื่องได้นานถึง 9 ชั่วโมง อุปกรณ์ประกอบการแช่ทั้ง 2 แบบมีข้อดี-ข้อเสียต่างกัน สามารถใช้เป็นอุปกรณ์ประกอบการแช่ไข่ปลานิลเชิงการค้าได้ แต่ผลการแปลงเพศที่ได้พบว่าได้ลูกปลาเพศผู้เพียง 68-78% ต่ำกว่าการแช่ที่ความหนาแน่น

ต่ำในระบบลม ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากความหนาแน่นของไขปลาระหว่างการแช่สูงมาก ปริมาณฮอร์โมนที่ใช้อาจจะไม่เพียงพอ สอดคล้องกับภาคผนวกที่ 3.1 ที่พบว่าการใช้ไขปลาที่ความหนาแน่นมากกว่า 40 ฟอง/ลิตร มีผลทำให้ประสิทธิภาพการแปลงเพศของปลานิลเป็นเพศผู้โดยวิธีแช่ต่ำลง ซึ่งอาจจะมีสาเหตุจากปริมาณฮอร์โมนที่ใช้ไม่เพียงพอ จึงควรทำการทดลองซ้ำอีกครั้งและเพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมนให้สูงขึ้น นอกจากนี้ควรดื่งใช้ alcohol ในชุดควบคุม เพราะว่าการทดลองที่ 2 แสดงให้เห็นว่า alcohol มีผลเหนี่ยวนำให้ไขปลานิลอายุ 2 วันพัฒนาไปเป็นเพศผู้ได้มากขึ้น (ภาคผนวกที่ 1 และ 2)

ภาคผนวกที่ 3.3

4.2 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่แบบโต๊ะเขย่าและแบบใบพัดในการแปลงเพศปลานิลที่ความหนาแน่นสูง

คำนำ

ผลจากการทดลองที่ 4 ในภาคผนวกที่ 3.2 เรื่องอุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่แปลงเพศไข่ปลานิล 2 แบบ คือ แบบโต๊ะเขย่า และแบบใบพัด ซึ่งใช้ถาดพลาสติกสีเหลืองผืนผ้าขนาดที่มีความจุประมาณ 0.5 – 3 ลิตร สำหรับการแช่แปลงเพศแบบอุตสาหกรรม ในการทดลองดังกล่าวไม่สามารถทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ต้นแบบทั้ง 2 ชนิดได้โดยตรง เพราะจำนวนไข่ก่อนเริ่มทดลองมีเพียง 407 กรัมนั้น จึงทำการทดลองเพื่อศึกษาการทำงานของอุปกรณ์แต่ละชนิด ชนิดละ 1 ชั่วโมงนั้น ดร.วงศ์ปฐม จึงแนะนำให้ลดขนาดถาดพลาสติกลง เพื่อให้จำนวนไข่ที่เก็บได้เพียงพอที่จะทำการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ทั้ง 2 แบบ ได้ ในขณะเดียวกันให้เพิ่มความเข้มข้นของฮอร์โมน 17α methyltestosterone (MT) ขึ้นเป็น 5 – 20 มิลลิกรัม/ลิตร เพราะการแช่ที่ความเข้มข้น 250 – 1,000 ไมโครกรัม/ลิตร ยังไม่สามารถเหนี่ยวนำให้ปลานิลแปลงเป็นเพศผู้ได้มากกว่าชุดควบคุม

วิธีการ

1. การเตรียมภาชนะและใบพัดที่ใช้กับอุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่แบบใบพัด โดยการหาภาชนะพลาสติกที่มีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าและใกล้เคียง มีขนาดเล็กลงให้เหมาะสมสำหรับใช้ทดลองกับอุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่แบบใบพัด ทำการต่อแกนใบพัดให้ยาวออกไปประมาณ 1.5 เมตร เพื่อการติดตั้งตัวยึดใบพัด 20 ใบ นอกจากนี้ทำการออกแบบตัวใบพัดที่มีขนาดและรูปร่างต่างๆ นำมาทดสอบหาเหมาะสมกับภาชนะที่คัดเลือก และทำการทดสอบการใช้งานโดยใช้เม็ดแมงลักเป็นตัวแทนไข่ปลานิล

2. การเตรียมภาชนะและอุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่แบบโต๊ะเขย่า ใช้อุปกรณ์ต้นแบบโต๊ะเขย่าที่ได้จากการทดลองที่ 3 และ 4 (สรุปรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 3) ที่ใช้มอเตอร์ไฟฟ้าขนาด ¼ แรงม้า ที่หมุนด้วยความเร็ว 1,450 รอบ/นาที ต่อมอเตอร์เข้ากับเฟืองตัวทดเกสียวตัวหนอนลดจำนวนรอบลงเหลือ 56 รอบ/นาที ทำให้หน้าโต๊ะถูกขยับหรือเขย่าในแนวราบด้วยจำนวนรอบเท่ากัน ส่วนภาชนะที่ใช้บรรจุไข่ทดลองใช้ถาดพลาสติกใสแบบสี่เหลี่ยมผืนผ้าที่มีความจุสูงสุดประมาณ 250 มิลลิลิตร ในการทดลองครั้งนี้ใช้บรรจุไข่และสารละลายฮอร์โมนที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

3. วางแผนการทดลองแบบสองปัจจัย (Twoway analysis of variance) คือ ปัจจัยที่ 1 ศึกษาอุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่ 2 แบบ (ใบพัด และ โต๊ะเขย่า) ส่วนปัจจัยที่ 2 คือ ความเข้มข้นของ 17α methyltestosterone (MT) 5 ระดับประกอบด้วย 5, 10, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัม/ลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (0) ที่ใช้น้ำเปล่าไม่ใส่ทั้งแอลกอฮอล์และ MT แต่ละชุดการทดลองทำ 3 ซ้ำ ดัง

น้ำอุปกรณ์แต่ละแบบ จะใช้ภาชนะพลาสติกบรรจุไข่และฮอร์โมนจำนวน 18 อัน รวมทั้งหมด 36 อัน

4. การเตรียมน้ำสำหรับการทดลอง ใช้น้ำประปาพักไว้ในถังพลาสติกขนาด 30-45 แกลลอน ที่มีหัวทรายเป่าฟองตลอดเวลาถึงละ 1 – 2 หัว ประมาณ 2 – 5 วัน ก่อนเริ่มทำการทดลอง

5. การเตรียมน้ำปลาที่ใช้ในการทดลอง คือไปปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 ที่รวบรวมได้จากศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น คัดเลือกไข่ที่มีอายุ 2 วันหลังการผสม ณ วันที่เริ่มทำการทดลอง ประมาณ 600 กรัม ล้างไข่กลับมากำทำการทดลองที่หมวดประมง มหาวิทยาลัยขอนแก่น ก่อนเริ่มการทดลองทำความสะอาดไข่ด้วยฟอร์มาลิน 100 ส่วนในพันนาน 1 – 2 นาที เพื่อเป็นการกำจัดพยาธิที่จะติดมากับไข่ปลา ล้างไข่ด้วยน้ำสะอาด รวมไข่ทั้งหมดไว้ในถาดพลาสติกบรรจุน้ำ ประมาณ 2 ลิตร

6. การเตรียมน้ำละลายฮอร์โมน 17 α methyltestosterone (MT; Fluka) ทำการเตรียมน้ำละลายฮอร์โมน MT เข้มข้นเริ่มต้น 2 ระดับ ดังนี้

ระดับที่ 1 (MT1) ชั่ง MT 0.05 กรัมด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าที่มีทศนิยม 3 ตำแหน่ง ละลายในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร (ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ใช้ MT1 นี้เตรียมน้ำละลาย MT อีก 3 ระดับ โดย

เตรียม MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร จุด MT1; 0.1 มิลลิลิตร + แอลกอฮอล์ 0.4 มิลลิลิตร + น้ำ 1 ลิตร

เตรียม MT10 มิลลิกรัม/ลิตร จุด MT1; 0.2 มิลลิลิตร + แอลกอฮอล์ 0.3 มิลลิลิตร + น้ำ 1 ลิตร

เตรียม MT 20 มิลลิกรัม/ลิตร จุด MT1; 0.4 มิลลิลิตร + แอลกอฮอล์ 0.1 มิลลิลิตร + น้ำ 1 ลิตร

ระดับที่ 2 (MT2) ชั่ง MT 0.2 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 1 มิลลิลิตร (200 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) ใช้ MT2 นี้เตรียมน้ำละลาย MT อีก 2 ระดับ ดังนี้

เตรียม MT 40 มิลลิกรัม/ลิตร จุด MT2; 0.2 มิลลิลิตร + แอลกอฮอล์ 0.3 มิลลิลิตร + น้ำ 1 ลิตร

เตรียม MT 80 มิลลิกรัม/ลิตร จุด MT2; 0.4 มิลลิลิตร + แอลกอฮอล์ 0.1 มิลลิลิตร + น้ำ 1 ลิตร

ชุดควบคุมใช้น้ำสะอาดที่เตรียมไว้ในข้อ 4 โดยไม่ต้องใส่แอลกอฮอล์และ MT

7. สุ่มไข่ปลาที่รวบรวมได้ในข้อ 5 ครั้งละ 14 กรัม (ประมาณ 2,100 ฟอง/100 มิลลิลิตร) ลงในภาชนะพลาสติกที่เตรียมไว้ โดยใส่ไข่ใส่ภาชนะสลับกันระหว่างอุปกรณ์ทั้ง 2 แบบ เติมน้ำละลายฮอร์โมนที่เตรียมไว้ในข้อ 6 ไปละ 100 มิลลิลิตร นำภาชนะวางบนอุปกรณ์ประกอบ การแช่ทั้ง 2 แบบจนครบอุปกรณ์ละ 18 ใบ

8. สุ่มซังไข่ปลาที่เหลือประมาณ 1 – 4 กรัม นำไข่ไปฟักในกระปุกฟักไข่ที่บรรจุน้ำสะอาด 1 ลิตร จำนวน 5 ใบ ที่มีหัวทรายเป่าลมช่วยทำให้ไข่ปลาเคลื่อนที่กระปุกละ 1 หัว ไข่ที่เหลือนี้ใช้ศึกษาคุณภาพของไข่ปลาเมื่อเริ่มการทดลอง โดยศึกษาจากอัตราสมมติและอัตราการรอดตาย เมื่อฟักในระบบลมที่ความหนาแน่นต่ำ

9. ทำการแยกและนับจำนวนไข่เสียที่เกิดขึ้นจากอุปกรณ์แต่ละแบบตลอดระยะเวลาการแช่นาน 48 ชั่วโมง บันทึกข้อมูลอุณหภูมิ เมื่อครบระยะเวลาการแช่ ล้างไข่ด้วยน้ำสะอาดที่เตรียมไว้ในข้อ 4 นำไข่ปลาที่ได้ไปฟักต่อในขวดฟักพลาสติกกันม่นที่มีน้ำไหลผ่านตลอด ลูกปลาจะอยู่ในขวดฟักนี้จนลูกปลามีอายุประมาณ 8 – 9 วันหลังการผสม ลูกปลาจะเริ่มกินอาหาร ทำการย้ายลงโหลอนุบาล

10. ทำการสุ่มนับจำนวนลูกปลาชุดการทดลองละ 150 ตัวลงโหลอนุบาลพลาสติกขนาด 10 ลิตรที่บรรจุน้ำสะอาดเริ่มต้นประมาณ 2 ลิตร/โหล อนุบาลลูกปลาด้วยอาหารโปรตีน 40% วันละ 4 – 5 มื้อ ทุกวัน จนลูกปลามีอายุครบ 60 วันหลังการผสม มีรายละเอียดการให้อาหารแต่ละระยะดังนี้

อายุลูกปลา (วันหลังการผสม)	อาหารที่ให้อนุบาล
8 – 15	อาหารผง
16 – 30	อาหารผง + อาหารเม็ดแช่น้ำ
31 – 45	อาหารเม็ดแช่น้ำ
46 - 60	อาหารเม็ด

11. ลูกปลาที่เหลือจากการสุ่มในข้อ 10 ทั้งหมด จะถูกย้ายลงในโหลพลาสติกอีกใบที่บรรจุ น้ำ 2 ลิตร/โหล ทำการแช่ซอร์โม่ครั้งที่ 2 โดยแช่ที่ความเข้มข้นเดิมนาน 24 ชั่วโมง จึงล้างด้วยน้ำสะอาด สุ่มนับลูกปลาจำนวน 150 ตัวลงโหลสำหรับการอนุบาลเพื่อเก็บผลต่อไป

12. ทำการดูดตะกอนเปลี่ยนถ่ายน้ำ ทุกวัน มีการเพิ่มระดับน้ำในโหลอนุบาลเป็นระยะๆ ตามขนาดปลา เมื่อลูกปลามีอายุประมาณ 21 วัน ทำการย้ายลูกปลาลงตู้กระจกขนาด 15x15x30 นิ้ว ที่บรรจุน้ำเริ่มต้น 30 ลิตร ระบบน้ำในตู้กระจกนี้เป็นน้ำระบบปิด น้ำที่ผ่านการใช้งานแล้วจะไหลเข้าสู่บ่อกรอง ไหลผ่านกรวดหยาบ กรวดละเอียด และตัวกรองชีวภาพก่อนที่จะนำกลับมาใช้ใหม่ อนุบาลลูกปลาในตู้จนมีอายุครบ 60 วันหลังการผสม

13. สุ่มปลานิลในข้อ 12 ตู้ละประมาณ 30 ตัว มาตรฐานเพศโดยวิธี Acetocarmine Squash Method (Guerrero and Shelton, 1974)

14. นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ สรุปข้อมูล และเขียนรายงาน

ผลการทดลอง

1. ภาชนะและอุปกรณ์ต้นแบบประกอบใบพัด

ในการหาภาชนะสำหรับทดลองเชอร์โมนที่มีขนาดเล็กลงนี้ ได้หาภาชนะแบบต่างๆ ตั้งแต่ชาม ตะกร้า ถาด และกล่อง ที่ทำจากพลาสติกหรือโฟม ที่มีรูปร่างเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าหรือรูปรี ที่น่าจะใช้ได้ประมาณ 7 แบบ เมื่อนำมาทดสอบกับอุปกรณ์ต้นแบบใบพัดพบว่า กล่องพลาสติกรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้าขนาดกว้าง 8 เซนติเมตร ยาว 30 เซนติเมตร สูง 5.5 เซนติเมตร เป็นภาชนะที่มีความเหมาะสมมากที่สุด สามารถใช้กับแกนใบพัดที่มีอยู่ และใช้กับใบพัดขนาดเล็ก ทำให้สามารถเรียงภาชนะทดลองติดต่อกันได้ถึง 20 ใบ เมื่อทำการตรวจหาปริมาตรของกล่องพลาสติกนี้ พบว่าปริมาตรค่าสุดคือ 100 มิลลิลิตร สูงสุดคือ 1,000 มิลลิลิตร

ในการออกแบบใบพัดสำหรับใช้เป็นอุปกรณ์ประกอบการแช่ชุดนี้ ได้ใช้พลาสติกใสของขวดน้ำอัดลม มาตัดเป็นรูปร่างต่างๆ 9 แบบ (รูปที่ 1) เมื่อนำมาทดสอบโดยติดใบพัดเข้ากับก้านยึดใบพัด ที่ติดกับแกนหมุนด้วยแรงมอเตอร์ปั้มน้ำฝนที่หมุนด้วยความเร็ว 40 - 45 รอบ/นาที นำภาชนะพลาสติกที่คัดเลือกมาใส่น้ำ 100 มิลลิลิตร ใส่เม็ดแมงลักที่พองน้ำดีแล้วประมาณ 1 ช้อนโต๊ะ เปิดเครื่องให้มอเตอร์ปั้มน้ำฝนทำงาน พบว่าใบพัดแบบที่ 1, 2 และ 3 ปั้ดทั้งน้ำและเม็ดแมงลักออกนอกภาชนะจำนวนมาก (รูปที่ 2) ในขณะที่ใบพัดแบบที่ 4 ปั้ดน้ำออกน้อยที่สุด แต่การขับเคลื่อนของเม็ดแมงลักดูไม่ค่อยดีเท่าใดนัก ส่วนใบพัดแบบที่ 5, 6, 7, 8 และ 9 สามารถทำงานได้ใกล้เคียงกัน จึงเลือกใช้ใบพัดแบบที่ 6 และแบบที่ 9 สำหรับใช้แช่ไข่ปลานิล



รูปที่ 1 ใบพัด 9 แบบที่ใช้กับอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบใบพัด



รูปที่ 2 แสดงการทำงานของอุปกรณ์แบบใบพัดที่ทดสอบการทำงานกับเมล็ดแมงลัก

2. ผลการเปลี่ยนแปลงเพศปลานิลด้วยอุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่แบบใบพัดและแบบโด๊ะเขย่า

อุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่ไข่ปลานิลแบบใบพัดและแบบโด๊ะเขย่าที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เมื่อใช้ภาชนะพลาสติกบรรจุไข่ขนาดเล็กลง เพื่อการเปรียบเทียบประสิทธิภาพการทำงาน ของอุปกรณ์ทั้ง 2 แบบ (รูปที่ 3 และรูปที่ 4) ในการทดลองครั้งที่ 1 พบว่า อุปกรณ์แบบใบพัด พัดทั้งไข่และน้ำออกจากภาชนะเป็นจำนวนมาก เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการแช่พบว่าอุปกรณ์แบบใบพัดมีไข่เสียที่นับจำนวนได้เฉลี่ย 272 ± 106 ฟอง/กล่อง นอกนั้นเป็นไข่แตกที่ไม่สามารถนับจำนวนได้ ทำให้ต้องเปลี่ยนสารละลายซอร์โบนประมาณ 2 – 5 ครั้งตลอดระยะเวลาแช่ 2 วัน ในขณะที่อุปกรณ์แบบโด๊ะเขย่ามีไข่เสียเฉลี่ยเพียง 148 ± 6.13 ฟอง/กล่อง (ตารางที่ 1) โดยไม่พบไข่แตกจากการเขย่า เมื่อนำจำนวนไข่เสียที่นับได้จากแต่ละอุปกรณ์ในการทดลองครั้งที่ 1 ไปวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกันโดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$; ตารางที่ 1) ทั้งนี้คงเป็นเพราะว่าจำนวนไข่เสียที่ได้จากการแช่ในครั้งที่ 1 ของอุปกรณ์แบบใบพัด ยังไม่ได้รวมจำนวนไข่แตกระหว่างการแช่ที่มีเป็นจำนวนมาก เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการแช่ครั้งที่ 1 พบว่าอุปกรณ์แบบใบพัดมีไข่ปลาเหลืออยู่เพียง 3 กล่อง จากจำนวนเริ่มต้น 18 กล่อง และกล่องที่มีไข่เหลือนี้นี้จะมีไข่ปลาเพียง 35 – 100 ฟอง/กล่องเท่านั้นจากจำนวนไข่เริ่มต้นประมาณ 2,100 ฟอง/กล่อง ในขณะที่ไข่ปลานิลที่แช่ในอุปกรณ์แบบโด๊ะเขย่า สามารถทำการแช่ซอร์โบนได้ตลอดระยะเวลา 2 วัน โดยไม่ต้องเปลี่ยนสารละลายซอร์โบน ส่วนการทดลองครั้งที่ 2 นั้น พบว่า อุปกรณ์แบบใบพัดทำให้ไข่ปลานิลเสียและแตกเฉลี่ย 907 ± 148 ฟอง/กล่อง สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอุปกรณ์แบบโด๊ะเขย่าที่มีไข่เสียเฉลี่ยเพียง 171 ± 114 ฟอง/กล่อง เท่านั้น (ตารางที่ 1) ไข่ปลานิลที่ผ่านการแช่ด้วยอุปกรณ์แบบใบพัดเมื่อสิ้นสุดระยะเวลาแช่ มีจำนวนเหลือเฉลี่ย 154.1 ± 49.1 ฟอง/กล่อง แต่ไข่เหล่านี้ส่วนมาก เสียหรือตายในระยะต่อมาที่ทำการฟักในกระบอกขวดน้ำไหลวน

ตารางที่ 1 จำนวนไข่เสียจากอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบใบพัดและแบบโด๊ะเขย่าในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2

ชุดการทดลอง ความเข้มข้นของMT (มิลลิกรัม/ลิตร)	จำนวนไข่เสีย (ฟอง $\pm$ SE)			
	ใบพัด		โด๊ะเขย่า	
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
0	80.0 ± 42.1	$1,368 \pm 391$	164.0 ± 7.8	57.3 ± 11.6
5	24.0 ± 6.1	779 ± 272	136.3 ± 15.7	54.0 ± 6.8
10	142.7 ± 60.4	610 ± 234	150.7 ± 16.2	59.0 ± 3.6
20	969.0 ± 471	$1,209 \pm 446$	161.0 ± 19.1	67.0 ± 10.5
40	274 ± 159.0	568 ± 149	134.3 ± 18.0	55.0 ± 5.6
80	140.7 ± 87.2	907 ± 601	142.0 ± 16.1	734 ± 683.0
รวมเฉลี่ย	272.0 ± 106^{ns}	$907.0 \pm 148.0^*$	148.0 ± 6.1^{ns}	$171.0 \pm 114.0^*$

หมายเหตุ ns หมายถึงความว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ระหว่างแถวตั้งที่มีอักษรกำกับ

* หมายถึงความว่ามีความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$) ระหว่างแถวตั้งที่มีเครื่องหมายกำกับ



รูปที่ 3 การทำงานของอุปกรณ์ประกอบการหั่นแบบในพัดที่ความเร็ว 27 – 30 รอบ/นาที



รูปที่ 4 การทำงานของอุปกรณ์ประกอบการหั่นแบบโต๊ะเขย่าที่ความเร็ว 56 รอบ/นาที

3. เพศถูกปลาที่ได้จากการแช่แปลงเพศ

การทดลองที่ 3.2 นี้ ถูกปลานิลที่ทำการตรวจเพศได้ เป็นถูกปลาที่ผ่านการแช่แปลงเพศด้วยอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบโต๊ะเขย่าเท่านั้น ในการทดลองครั้งที่ 1 การแช่ฮอร์โมน MT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลทำให้ได้ปลานิลเพศผู้สูงสุดคือ $93.28 \pm 0.06\%$ รองลงมาคือ 90.39 ± 1.69 , 88.31 ± 2.60 , 86.66 ± 3.33 และ $83.84 \pm 1.62\%$ จากการแช่ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 20, 40, 80 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ขณะที่ชุดควบคุมมีถูกปลาเพศผู้ $86.06 \pm 3.37\%$ (ตารางที่ 2) อย่างไรก็ตามเปอร์เซ็นต์เพศผู้ที่ได้จากการทดลองนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนการแช่ฮอร์โมน 2 ครั้ง มีผลทำให้ได้ถูกปลาเพศผู้เฉลี่ยลดลงเหลือ 81.96 ± 2.65 , 69.68 ± 2.65 , 77.76 ± 9.95 และ 64.52% เมื่อทำการแช่ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 40 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ การแช่ครั้งที่ 2 ที่ความเข้มข้น 40 มิลลิกรัม/ลิตรมีผลทำให้ถูกปลาตาย 2 โหล เหลือถูกปลาเพียง 1 ตู้ สำหรับการตรวจเพศ ส่วนการแช่ครั้งที่ 2 ที่ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลทำให้ถูกปลาตายทั้งหมด เมื่อนำข้อมูลเพศผู้ที่ได้จากการแช่ 1 ครั้ง มาเปรียบเทียบกับการแช่ 2 ครั้งที่จะดับความเข้มข้นเท่ากัน พบว่า เปอร์เซ็นต์เพศผู้ที่ได้จากทุกชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกัน โดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เปอร์เซ็นต์เพศถูกปลานิลเมื่อทำการแปลงเพศโดยวิธีแช่ MT 1 – 2 ครั้ง ที่ความเข้มข้นต่างกันโดยใช้ความหนาแน่นสูง บนอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบโต๊ะเขย่า การทดลองครั้งที่ 1

ความเข้มข้นของ MT (มิลลิกรัม/ลิตร)	เปอร์เซ็นต์เพศผู้เฉลี่ย $\pm$ SE				
	male	female	intersex	survival	abnormal
0	86.06 ± 3.37	13.96 ± 3.39	0.00	91.87 ± 1.71	10.46 ± 8.22
5	93.28 ± 0.06	7.04 ± 0.37	0.00	97.48 ± 2.52	0.85 ± 0.85
2 nd 5	81.96 ± 2.65	18.04 ± 2.66	0.00	90.29 ± 4.35	13.27 ± 9.81
10	83.84 ± 1.62	15.06 ± 1.36	0.56 ± 0.56	93.77 ± 1.59	1.49 ± 0.96
2 nd 10	69.68 ± 2.65	29.25 ± 1.63	1.08 ± 1.08	89.20 ± 5.39	3.33 ± 1.93
20	90.39 ± 1.69	9.71 ± 1.74	0.00	80.47 ± 5.67	1.16 ± 0.59
2 nd 20	77.76 ± 9.95	22.25 ± 9.95	0.00	87.71 ± 4.86	9.95 ± 6.67
40	88.31 ± 2.60	10.90 ± 1.81	0.00	93.95 ± 0.80	5.45 ± 0.61
2 nd 40	64.52	14.75	6.45	86.67	10.34
หรือ 1 ตู้					
80	86.66 ± 3.33	13.33 ± 3.34	0.00	94.87 ± 0.97	0.00
2 nd 80	ตายหมด	ตายหมด	ตายหมด	ตายหมด	ตายหมด

หมายเหตุ 2nd คือถูกปลาที่ผ่านการแช่ครั้งที่ 1 แล้วนำมาแช่ครั้งที่ 2 ใน MT ที่ความเข้มข้นที่กำหนด

ในการทดลองครั้งที่ 2 มีผลทำให้ได้ถูกปลาเพศผู้เฉลี่ย 85.70 ± 1.19 , 84.29 ± 3.00 , 87.22 ± 2.42 , $85.24 \pm 4.92\%$ เมื่อทำการแช่สารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, และ 40 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่มีถูกปลาเพศผู้ $83.11 \pm 9.22\%$ และชุดการทดลองที่แช่ในสารละลาย MT ความเข้มข้น 80 มิลลิกรัม/ลิตร ที่มีผลทำให้ได้ถูกปลาเพศผู้เฉลี่ยลดลงเหลือ $73.44 \pm 4.69\%$ โดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ไข่ปลาที่ผ่านการแช่ครั้งที่ 1 ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 40 และ 80 มิลลิกรัม/ลิตร แล้วนำมาทดลองแช่ 2 ครั้ง ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20, 10 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ มีผลทำให้ได้ถูกปลาเพศผู้โดยเฉลี่ยลดลงเหลือ 72.92 ± 7.32 , 64.42 ± 6.80 , 53.44 ± 5.10 , 51.72 ± 4.96 และ $53.89 \pm 2.36\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 3) อย่างไรก็ตามก็ได้ออกปลาเพศผู้ที่ได้จากการทดลองนี้พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์เพศถูกปลานิลเมื่อทำการแปลงเพศโดยวิธีแช่ MT 1 – 2 ครั้ง ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน โดยใช้ความหนาแน่นสูง บนอุปกรณ์ประกอบการแช่แบบโต๊ะเขย่า การทดลองครั้งที่ 2

ความเข้มข้นของ MT (มิลลิกรัม/ลิตร)	เปอร์เซ็นต์เพศผู้เฉลี่ย $\pm$ SE				
	male	female	intersex	survival	abnormal
0	83.11 ± 9.22	16.55 ± 8.91	0.00	79.30 ± 11.40	2.77 ± 0.57
5	87.70 ± 1.19	13.74 ± 0.64	0.56 ± 0.56	86.22 ± 5.07	1.08 ± 1.08
	$2^{nd} 5$ 72.92 ± 7.32	24.84 ± 6.56	2.24 ± 1.12	90.88 ± 5.31	1.08 ± 1.08
10	84.29 ± 3.00	13.48 ± 2.50	2.22 ± 1.11	84.86 ± 8.27	3.03 ± 3.03
	$2^{nd} 10$ 64.42 ± 6.80	32.25 ± 5.61	3.33 ± 3.33	85.79 ± 6.89	1.15 ± 1.15
20	87.22 ± 2.42	11.67 ± 2.55	1.11 ± 1.11	93.36 ± 2.69	0.00
	$2^{nd} 20$ 53.44 ± 5.10	38.09 ± 6.07	8.48 ± 2.74	88.92 ± 3.56	6.79 ± 5.05
40	85.24 ± 4.92	14.76 ± 4.92	0.00	86.51 ± 5.91	0.00
	$2^{nd} 10$ 51.72 ± 4.96	45.05 ± 3.73	3.23 ± 1.86	80.46 ± 7.04	3.41 ± 0.04
80	73.44 ± 4.69	25.00 ± 3.13	1.57 ± 1.57	73.90 ± 21.30	6.26 ± 3.13
	$2^{nd} 10$ 53.89 ± 2.36	39.69 ± 2.46	6.16 ± 0.09	97.85 ± 2.15	9.24 ± 0.15

หมายเหตุ 2^{nd} คือถูกปลาที่ผ่านการแช่ครั้งที่ 1 แล้วนำมาแช่ครั้งที่ 2 ใน MT ที่ความเข้มข้นที่กำหนด

สรุปและวิจารณ์ผล

การทดลองครั้งนี้ประสงค์ที่จะทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ประกอบการแช่ทั้ง 2 แบบ คือ แบบใบพัดและแบบโด๊ะเขย่า ซึ่งในเบื้องต้นได้ออกแบบไว้สำหรับการแช่แบบอุตสาหกรรม (ในการทดลองที่ 4; สรุปรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 3) อุปกรณ์ทั้ง 2 แบบสามารถทำงานได้ดีเท่าเทียมกัน ดังจะเห็นได้จากเปอร์เซ็นต์ไข่เสียที่จากอุปกรณ์การแช่ทั้ง 2 แบบ มีเพียง 1.96 – 3.95% ต่ำกว่าไข่เสีย (4.43±0.73%) ที่ได้จากการฟักไข่ในระบบถนอม ทั้งที่อุปกรณ์ประกอบการแช่ทั้ง 2 แบบแช่ไข่ที่ความหนาแน่นสูงกว่าระบบถนอมถึง 21.5 เท่า แต่การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของอุปกรณ์ทั้ง 2 แบบ ไม่สามารถดำเนินการได้โดยตรง เพราะต้องใช้ไข่ปลานิลประมาณ 500 – 600 กรัมเพื่อเริ่มการทดลอง ซึ่งในระยะนั้น ไม่สามารถรวบรวมไข่ปลานิลจากศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่นได้มากเพียงพอ ประกอบกับผลการทดลองแช่แปลงเพศปลานิลที่ความหนาแน่นสูงประมาณ 15,000 – 20,000 ฟอง/ลิตร ในการทดลองที่ 3 และ 4 (สรุปรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 3) ยังไม่ได้ผลที่น่าพอใจ ทิมที่ปรึกษาจึงแนะนำให้ทำการทดลอง 3.2 ขึ้น

การลดขนาดของภาชนะแช่จากขนาด 28 x 42.5 x 9.5 เซนติเมตร เหลือขนาด 8 x 30 x 5.5 เซนติเมตร ทำให้ต้องเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขนาดใบพัดให้เล็กลงและเหมาะสมกับขนาดภาชนะ ถึงแม้ว่าจะได้ออกแบบใบพัดรูปร่างต่างๆ ถึง 9 แบบ มาใช้ในการทดลอง พบว่ามีเพียง 2 แบบเท่านั้นที่น่าจะทำงานได้ดี ใบพัดทั้ง 2 แบบนี้ปลายใบพัดต้องยาวถึงพื้นภาชนะ เพื่อทำให้เกิดแรงบิดของใบพัดเพิ่มการขับเคลื่อนที่ของไข่และสารละลายในภาชนะให้ดีขึ้น นี่คงเป็นสาเหตุที่สำคัญทำให้ไข่เสียและแตกระหว่างการทดลองแช่ ในขณะที่การใช้ใบพัดแบบเท่ากับภาชนะขนาดใหญ่ (การทดลองที่ 4; สรุปรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 3) ใบพัดอยู่ห่างจากพื้นภาชนะประมาณ 0.5 เซนติเมตร แต่แรงบิดของใบพัดสามารถทำให้ทั้งไข่และสารละลายมีการขับเคลื่อนที่ดี โดยไม่ทำให้ไข่แตก นอกจากนี้ความเร็วของมอเตอร์ที่ใช้หมุนแกนใบพัด เป็นมีส่วนที่สำคัญอีกประการหนึ่ง เพราะการทดลองที่ 3.2 นี้ได้ใช้มอเตอร์ตัวใหญ่ขึ้น เพราะต้องทำการหมุนแกนเหล็กที่ติดใบพัดมากถึง 20 ใบ จากเดิมติดใบพัดเพียง 2 – 4 ใบ (ความเร็ว 18 รอบ/นาติ) เท่านั้น มอเตอร์ตัวใหม่นี้หมุนใบพัดด้วยความเร็วประมาณ 40 – 45 รอบ/นาติ ความเร็วที่สูงขึ้นนี้ ทำให้ใบพัดหมุนและมีแรงเหวี่ยงมากขึ้น แต่ภาชนะที่ใช้กลับมีขนาดเล็กลงมาก แม้ใบพัดมีขนาดเล็กลง แต่แรงเหวี่ยงที่สูงขึ้น ส่งผลให้ไข่และสารละลายกระจายออกนอกภาชนะเป็นจำนวนมาก ในการทดลองครั้งที่ 2 ได้ปรับลดจำนวนความเร็วรอบลงเหลือ 27 – 30 รอบ/นาติ พบว่าไข่และสารละลายไม่กระจายออกนอกภาชนะอีก แต่ปัญหาไข่แตกยังคงมีอยู่เป็นจำนวนมาก ทั้งนี้คงเป็นเพราะว่าใบพัดที่ยาวลากไปกับพื้นภาชนะทำไข่แตกและเสีย จนดูเหมือนกับว่าอุปกรณ์แบบใบพัดมีประสิทธิภาพดีกว่าอุปกรณ์แบบโด๊ะเขย่า ทั้งที่อุปกรณ์ทั้ง 2 แบบ มีประสิทธิภาพที่ใกล้เคียงกัน ข้าพเจ้าไม่เห็น

ประโยชน์อันใดที่จะพัฒนาในขนาดเล็กสำหรับการทดลองนี้อีกเพราะต้องใช้เวลามาก ที่สำคัญคือใบพัดขนาดเล็กจะถูกใช้งานครั้งนี้เพียงครั้งเดียวเท่านั้น การทดลองครั้งต่อไปจะเป็นการทดลอง On Farm ซึ่งต้องใช้อุปกรณ์ประกอบการแช่ในภาชนะขนาดใหญ่ ซึ่งมีใบพัดที่ใช้งานได้แล้ว การพัฒนาในขนาดเล็กจึงไม่มีประโยชน์อันใด

นอกจากนี้ข้าพเจ้าได้ค้นคว้าข้อดีของอุปกรณ์แบบโต๊ะเขย่า ที่มีความสะดวกในการใช้งาน คือ สามารถยกย้ายภาชนะใส่ไข่และสารละลายฮอร์โมนเข้า-ออกได้ง่าย และข้อดีของอุปกรณ์แบบใบพัดที่สามารถทำงานได้ในกรณีที่ไฟฟ้าดับเข้าด้วยกัน เป็นอุปกรณ์ต้นแบบโต๊ะโยก (รูปที่ 5) ที่โยกขยับหน้าโต๊ะที่ความเร็วประมาณ 18 รอบ/นาที โต๊ะโยกนี้ใช้ไฟฟ้ากระแสตรง (DC) ทำงานด้วยมอเตอร์ขนาดเล็ก ที่ต่อกับแบตเตอรี่ 70 แอมป์ร่วมกับเครื่องชาร์จแบตเตอรี่ขนาด 12 แอมป์ ขนาดกะทัดรัด สามารถใช้กับไฟฟ้าตามบ้านได้ทั่วไป พลังงานสำรองในแบตเตอรี่นี้ ทำให้โต๊ะโยกสามารถทำงานได้อย่างน้อย 6 ชั่วโมงขณะที่ไฟฟ้าดับ การใช้งานจึงมีประสิทธิภาพดีขึ้น สะดวก มีความปลอดภัยต่อไข่ปลาและผู้ใช้สูงกว่าอุปกรณ์แบบโต๊ะเขย่าเดิม ที่ใช้กระแสไฟมากและจะหยุดการทำงานทันทีที่ไฟฟ้าดับ ขนาดโต๊ะโยกตัวนี้ออกแบบสำหรับวางภาชนะแช่ไข่ได้ 6 ถาด ใช้น้ำหนักได้ประมาณ 12 กิโลกรัม



รูปที่ 5 แสดงอุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่แบบโต๊ะโยก

ผลการแช่แปลงพืช 1 ครั้งที่ความหนาแน่น 21,000 พืช/ไร่ ในสารละลาย MT 5 – 80 มิลลิกรัม/ลิตรของการทดลองครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 พบว่า ได้พืชผู้ 83.84 $\pm$ 1.62 - 93.28 $\pm$ 0.06% และ 73.44 $\pm$ 4.69 - 87.22 $\pm$ 2.42% ในขณะที่ชุดควบคุมมีพืชผู้ 86.06 $\pm$ 3.37 และ 83.11 $\pm$ 9.22% ตามลำดับ การวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าพืชผู้ที่ได้ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในทุกชุดการทดลอง สอดคล้องกับผลการทดลองที่ 3 และ 4 ในสรุปรายงานความก้าวหน้าครั้งที่ 3 ที่พบว่าการแช่แปลงพืชปลานิลที่ความหนาแน่นสูงประมาณ 20,000 พืช/ไร่ มีผลให้พืชผู้ที่ได้ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม

ภาคผนวกที่ 4.1

5. การทดลองภาคสนาม

การทดลองแปลงเพศโดยวิธีแช่ที่บุญโฮมฟาร์ม

คำนำ

จากข้อสังเกตการทำงานในโรงเพาะฟักของบุญโฮมฟาร์มที่ผ่านมาพบว่า ฟาร์มนี้มีการให้อาหารผสมฮอร์โมนแก่ลูกปลานิลวัยอ่อนอายุประมาณ 5-7 วันหลังการผสมที่ภายในโรงเพาะฟัก ก่อนที่จะย้ายลูกปลาลงอนุบาลในกระชังด้วยอาหารผสมฮอร์โมน จึงมีข้อสันนิษฐานว่า น่าจะมีฮอร์โมนจากอาหารละลายและตกค้างอยู่ในน้ำของโรงเพาะฟักด้วย ดังนั้นไข่ปลานิลที่รวบรวมได้ ก่อนเริ่มการทดลอง ถ้าใช้น้ำในโรงเพาะฟักอาจจะได้รับฮอร์โมนที่ปนเปื้อนอยู่ในน้ำ ซึ่งอาจมีผลทำให้ลูกปลาเพศผู้ของชุดควบคุมสูงกว่าที่ควรจะเป็น การทดลองภาคสนามครั้งนี้ประสงค์ที่จะป้องกันผลกระทบจากฮอร์โมนดังกล่าว จึงมีการนำน้ำจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ซึ่งเป็นน้ำประปาที่ผ่านการพักไว้แล้วไม่น้อยกว่า 3 วัน ใส่ถุงลำเลียงไปใช้ในการทดลองแช่ภาคสนามที่บุญโฮมฟาร์ม ตั้งแต่ก่อนเริ่มทำการทดลองจริง 1 วันทุกครั้ง

วิธีการ

1. สถานที่

ฟาร์มที่เลือกสำหรับการทดลองครั้งนี้คือ บุญโฮมฟาร์ม เป็นฟาร์มผลิตลูกปลานิลเพศผู้ขนาดใหญ่ที่สุดในจังหวัดขอนแก่น มีพื้นที่ 83 ไร่ ตั้งอยู่ที่ อำเภอเมืองจตุร จังหวัดขอนแก่น ฟาร์มนี้ทำการผลิตปลานิลเพศผู้โดยใช้วิธีการแปลงเพศด้วยอาหารผสมฮอร์โมน MT ทางปาก ตามวิธีการของสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (Asian Institute of Technology; AIT; Little, Lin and Turner, 1995) มีความสามารถในการผลิตสูงสุดเดือนละ 5 ล้านตัว

2. การเตรียมน้ำสำหรับการทดลอง

เติมน้ำประปาใส่ถังพลาสติกขนาด 35-45 แกลลอน จำนวน 4 ถัง แต่ละถังใส่หัวทรายถึงละ 1 - 2 หัว ทำการพักน้ำไว้ในถึงอย่างน้อย 3 วันก่อนบรรจุลงถังพลาสติก ขนลำเลียงไปที่บุญโฮมฟาร์มล่วงหน้าก่อนเริ่มทำการทดลอง 1 วัน น้ำนี้จะใช้ทำความสะอาดไข่ก่อนการแช่และใช้ผสมกับสารละลาย MT ที่ใช้ในการทดลองแช่ฮอร์โมน

3. การเตรียมไข่ปลาสำหรับการทดลอง

- 3.1 พ่อแม่พันธุ์ปลานิลที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นปลานิลที่นำพันธุ์มาจากสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT) เป็นพันธุ์ปลาจากพระราชวังสวนจิตรลดาที่ AIT ได้รับผ่านสถาบันประมงน้ำจืดแห่งชาติ พ่อแม่พันธุ์มีขนาดน้ำหนักตัวละประมาณ 100 – 200 กรัม ถูกปล่อยลงบ่อเพาะในอัตราเพศผู้:เพศเมีย = 1:1 จำนวน 200 คู่ ในกระชังขนาด 5x20x0.9 เมตร จำนวน 12 – 15 กระชัง ในบ่อขนาด 1,600 ตารางเมตร มีการให้อาหารเม็ดโปรตีน 28% วันละ 1% ทุกวันยกเว้นวันที่ทำการแยกไข่ปลา ทำการแยกไข่จากแม่ปลาทุก 5 วัน
- 3.2 เมื่อถึงวันแยกไข่จากแม่ปลานิล ทำการแยกไข่จากปากแม่ปลาที่ละตัว เลือกรวมไข่ปลานิลเฉพาะระยะที่ 1 และ 2 (อายุ 1 และ 2 วันหลังการวางไข่) มาทำความสะอาด แยกเศษหญ้าและหอยที่ติดมา ล้างทำความสะอาดไข่ด้วยฟอรีมาลินความเข้มข้น 100 ppm นานประมาณ 1 นาที จึงล้างด้วยน้ำสะอาด นำไข่ปลาที่ได้ไปรวมไว้ในถาดพลาสติกบรรจุน้ำที่เตรียมมาถาดละประมาณ 1-2 ถาด จำนวน 4 ถาดที่วางอยู่บนโต๊ะโยกที่ความเร็ว 18 รอบ/นาที (รูปที่ 1) ไข่ปลานิลที่คัดเลือกจะอยู่บนโต๊ะโยกที่มีการขยับเคลื่อนที่ตลอดเวลาประมาณวันละ 5 - 6 ชั่วโมงก่อนเริ่มทำการทดลอง ทำการแยกไข่จากแม่ปลาในกระชังเพาะประมาณ 7 – 10 กระชัง จึงจะได้ไข่ปลาเพียงพอที่จะเริ่มทำการทดลองได้ ใช้เวลารวบรวมไข่ประมาณวันละ 6 ชั่วโมง ก็ตั้งแต่เวลา 9.00 ถึง 15.00 น. นำไข่ปลาที่ได้ไปชั่งน้ำหนักรวม เพื่อการประมาณจำนวนหรือน้ำหนักไข่ปลาที่จะใช้ในการทดลองแต่ละซ้ำ



รูปที่ 1 การรวบรวมไข่ปลานิลไว้บนโต๊ะโยกก่อนเริ่มทำการทดลอง และระหว่างการทดลองนำไข่ปลานิลอายุ 2 วันในสารละลาย MT และชุดควบคุม ที่บุญโฮมฟาร์ม อ. มีนบุรี จ. ชอนแก่น

4. การเตรียมสารละลายฮอร์โมน

- 4.1 เตรียม MT1 โดยชั่ง 17 α methyltestosterone (MT; Fluka) 0.05 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (absolute ethanol) 5 มิลลิลิตร เมื่อเริ่มทำการทดลองให้เท MT1 ที่เตรียมไว้ทั้งหมดใส่ในถังคำที่บรรจุน้ำที่เตรียมไว้จำนวน 10 ลิตร จะได้น้ำที่มี MT เข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร
- 4.2 เตรียม MT2 โดยชั่ง MT 0.1 กรัม ละลายในแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 5 มิลลิลิตร เมื่อเริ่มทำการทดลองให้เท MT2 ที่เตรียมไว้ทั้งหมดใส่ในถังคำที่บรรจุน้ำที่เตรียมไว้จำนวน 10 ลิตร จะได้น้ำที่มีสารละลาย MT เข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร

5. ชุดควบคุม

5.1 ชุดควบคุม คือไข่ปลานิลที่อยู่บนโต๊ะโยกประมาณ 5-6 ชั่วโมง ก่อนเริ่มทำการทดลอง เป็นไข่ปลาที่หลีกเลี่ยงการสุมซังน้ำหนักไข่ทดลองแต่ละซัง ไข่ปลาชุดนี้จะถูกสุมซังน้ำหนัก และนับจำนวนเพื่อการคำนวณหาจำนวนไข่ปลาจากน้ำหนัก นอกจากนี้ยังมีการแยกอายุของไข่ปลาเพื่อใช้เป็นข้อมูลระบุพัฒนาการของไข่ปลานิลก่อนเริ่มทำการทดลองแซ่ หลังจากนั้นถ้าเลี้ยงไข่กลับมาฟักและอนุบาล ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น

5.2 ชุดควบคุมเปรียบเทียบ MT คือไข่และลูกปลานิลที่เก็บได้ในวันเดียวที่เริ่มทำการทดลอง แต่ไม่ได้ใช้เพื่อการทดลอง ไข่และตัวอ่อนจะถูกฟักและอนุบาลด้วยปลาปนผสม MT (Fluka) ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม นาน 21 วัน มีการให้อาหารแก่ลูกปลาวินละ 5 ครั้ง ทุกวัน ดำเนินการโดยบุญโฮมฟาร์ม ลูกปลาที่ได้เมื่อเสร็จสิ้นขบวนการให้อาหาร MT แล้ว จะถูกสุมกลับมาที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น เพื่อการตรวจเพศลูกปลาที่อายุ 2 เดือน

6. การทดลอง

6.1 เมื่อรวบรวมไข่ปลานิลได้เพียงพอแล้ว ทำการชั่งน้ำหนักไข่ปลาที่รวบรวมได้ เพื่อทำการคำนวณหาน้ำหนักไข่ที่เหมาะสมกับการทดลองแต่ละครั้ง ทำการสุมซังไข่หนัก 58 - 115 กรัม ใส่ลงในภาควลาสติกขนาด 28x42.5x10 เซนติเมตร จำนวน 6 ภาคว (3 ภาคว/1 ชุดการทดลอง) เติมน้ำสารละลายฮอร์โมน MT ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตรที่เตรียมไว้จำนวนภาควละ 0.5 - 1 ลิตร

6.2 วางถาดไว้บนโต๊ะโยกที่โยกไปมาด้วยความเร็ว 18 รอบ/นาที ทำให้ไข่ปลาเกิดการเคลื่อนที่และไม่เสียดระหว่างการทดลอง ปล่อยให้ไข่ปลาแช่ฮอร์โมนในถาดนาน 24-48 ชั่วโมง (รูปที่ 1) จึงล้างออกด้วยน้ำสะอาด

6.3 เมื่อล้างไข่ปลาในน้ำสะอาดแล้วแบ่งลูกปลาที่ได้เป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปฟักต่อในขวดฟักไข่ที่มีน้ำไหลผ่านของบุญโฮมฟาร์ม และส่วนที่ 2 ถัดเลี้ยงกลับมาฟักต่อในขวดฟักไข่ที่ฟาร์มประมง มหาวิทยาลัยขอนแก่น ไข่ปลาจะอยู่ในระบบฟักไข่จนกระทั่งฟักเป็นตัวและเริ่มกินอาหาร ที่อายุประมาณ 8-9 วัน หลังการวางไข่

6.4 สุ่มนับลูกปลาลงโหลอนุบาลพลาสติกขนาด 10 ลิตร โดยสุ่มนับลูกปลาที่ผ่านการแช่ MT ที่ความเข้มข้น 5 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร ความเข้มข้นละ 9 โหล แต่ละโหลบรรจุน้ำเริ่มต้น 2 ลิตร ใส่ลูกปลาจำนวนโหลละ 150 ตัว ส่วนชุดควบคุมนั้น สุ่มนับลูกปลาลงโหลจำนวนชุดละ 3 โหล ทำการอนุบาลลูกปลาในโหลพลาสติกและตู้กระจก ด้วยอาหารโปรตีน 41% ตามรายละเอียดในตารางที่ 1

6.5 ให้อาหารผงที่มีโปรตีน 41 % อนุบาลลูกปลานิลในโหลทดลองในปริมาณที่มากเกินไปพอ วันละ 3-5 ครั้ง ทุกวัน ตั้งแต่ระยะที่ลูกปลาเริ่มกินอาหาร มีการเพิ่มระดับน้ำในโหลขึ้นเรื่อยๆ ตามความเหมาะสมกับการเจริญเติบโตของลูกปลา อนุบาลลูกปลาในโหลทดลองประมาณ 7-10 วัน ย้ายลูกปลาจากโหลทดลองไปใส่ในตู้กระจกขนาด 15x15x30 นิ้ว โดยใส่น้ำเริ่มต้นที่ 30 ลิตร อนุบาลลูกปลาด้วยอาหารผง+อาหารเม็ดโปรตีน 41% ต่อ จนลูกปลามีอายุ 2 เดือนหรือมากกว่า จึงทำการตรวจเช็คเพศ

6.6 เมื่อลูกปลามีอายุได้ 2 เดือนหลังการวางไข่ ทำการสุ่มตัวอย่างลูกปลาตู้ละ 50 ตัว ไปทำการตรวจเช็คเพศปลาโดยวิธี Acetocarmine Squash Method (Guerrero and Shelton, 1974) ถ้าข้อมูลที่ได้ไม่ชัดเจนพอ ทำการสุ่มตัวอย่างครั้งที่ 2 กับตู้ที่สงสัยตู้ละ 50 ตัว

ตารางที่ 1 ประเภทของอาหารและภาชนะอนุบาลลูกปลานิลหลังการแปลงเพศ ตั้งแต่เริ่มต้น
ลูกปลา เริ่มกินอาหารจนกระทั่งมีอายุครบ 2 เดือน ด้วยอาหารโปรตีน 41%

ชุดการทดลอง	ประเภทของอาหารและภาชนะที่ใช้ออนุบาลลูกปลานิลที่อายุต่างๆ			
	โหลพลาสติก			ตู้กระจก
	1 – 5 วัน	6 – 8 วัน	9-12 วัน	13วัน- 2 เดือน
1. ชุดควบคุม	1. ผง	1. ผง	1. ผง + เม็ด	1. อาหารเม็ด
2. ชุดที่แช่ MT 5mg/l	2.1 ผง	2.1 ผง	2.1 ผง + เม็ด	2.1 อาหารเม็ด
	2.2 ผง + MT	2.2 ผง	2.2 ผง + เม็ด	2.2 อาหารเม็ด
	2.3 ผง + MT	2.3 ผง + MT	2.3 ผง + เม็ด	2.3 อาหารเม็ด
3. ชุดที่แช่ MT 10mg/l	3.1 ผง	3.1 ผง	3.1 ผง + เม็ด	3.1 อาหารเม็ด
	3.2 ผง + MT	3.2 ผง	3.2 ผง + เม็ด	3.2 อาหารเม็ด
	3.3 ผง + MT	3.3 ผง + MT	3.3 ผง + เม็ด	3.3 อาหารเม็ด

7. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาคิดเป็นร้อยละของปลาแต่ละเพศในแต่ละซ้ำของทุกชุดการทดลอง - ทำการทดสอบการกระจายของข้อมูลว่าเป็นโค้งปกติ (normality) หรือไม่ ถ้าไม่เป็นปกติทำการแปลงข้อมูลโดยใช้ Arcsine Transformation ก่อนทำการวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติด้วย ANOVA และใช้ Fisher's Least-Significant-Difference Test ของ Post-hoc test ในการจับคู่หาความแตกต่างทางสถิติของแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้โปรแกรม Systat

ผลการทดลอง

การทดลองภาคสนามที่บุญโฮมฟาร์มนี้ ทำการทดลองทั้งหมดรวม 3 ครั้ง ดังนี้
ครั้งที่ 1 รวบรวมไข่ปลานิลระยะที่ใกล้เคียงกันได้ 440 กรัม ประกอบด้วยไข่ปลานิลระยะต่างๆ คือ ไข่ที่อายุ 2 (59.45 ± 3.11 %) และ 3 วัน (37.82 ± 3.54 %) หลังการวางไข่ นอกจากนี้ยังมีไข่เสียปนมาอีก 2.73 ± 1.06 % (ตารางที่ 2) และไข่ที่รวบรวมได้ค่อนข้างน้อย จึงต้องลดขนาดการทดลองจาก 1 ลิตร เหลือเพียง 0.5 ลิตร โดยสุ่มซังไข่ปลานิลถาดละ 58 กรัม (คิดเป็นความหนาแน่นของไข่ในถาดทดลอง 11,832 ฟอง/0.5 ลิตร หรือ 23,664 ฟอง/ลิตร: ตารางที่ 2) เมื่อแช่ได้ 1 วัน ที่อุณหภูมิ น้ำ 27 องศาเซลเซียส พบว่าไข่ปลาเริ่มฟัก แต่ยังไม่ครบระยะเวลาการแช่ที่ต้องการ ทำการเปลี่ยนถ่ายสารละลายฮอร์โมน 1 ครั้ง แต่ในวันถัดมาพบว่าไข่และลูกปลาดายจำนวนมาก จึงต้องยกเลิกการทดลองนี้

การทดลองภาคสนามที่พยายามแช่บวบ 48 ชั่วโมงนั้น ล้มเหลว เพราะว่า ไข่ปลาที่รวบรวมได้มีระยะที่คละกันค่อนข้างมาก ในการทดลองครั้งที่ 1 มีไข่อายุ 3 วันปนอยู่ถึง 37.82% ไข่จะเริ่มฟักในวันที่ 5 หลังการวางไข่ นั่นคือวันที่ 2 ของการแช่ การแช่เกิน 24 ชั่วโมง พบว่าไข่ปลานิลบางส่วนเริ่มฟักทำให้น้ำในถาดเสีย ถูกปลาตายและไข่ที่เหลือตายตาม ดังนั้น การทดลองครั้งที่ 2 และ 3 จึงลดระยะเวลาการแช่ลงเหลือ 24 ชั่วโมงเท่านั้น

ครั้งที่ 2 ในการทดลองครั้งนี้บุญโฮมฟาร์มได้รวบรวมไข่ปลานิลให้ 2 อายุ คือ

ไข่อายุ 1 ประกอบด้วย ไข่อายุ 1 วัน (26.72%) อายุ 2 วัน (15.73%) และไข่เสีย (57.55%) น้ำหนักไข่รวม 247 กรัม

ไข่อายุ 2 ประกอบด้วย ไข่อายุ 1 วัน (3.18%) อายุ 2 วัน (20.17%) อายุ 3 วัน (35.46%) อายุ 4 วัน (27.35%) และไข่เสีย (13.84%) น้ำหนักไข่รวม 258 กรัม

ปริมาณไข่ที่รวบรวมได้ในการทดลองครั้งที่ 2 นี้ ได้ไข่จำนวนน้อย จึงต้องลดจำนวนชำลงเหลือชุดการทดลองละ 2 ซ้ำเท่านั้นคือ 116 กรัม/ถาด (23,200 ฟอง/ลิตร; ตารางที่ 2) โดยทำการแช่ที่ความเข้มข้นเท่ากันคือ 5 มิลลิกรัม/ลิตร ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาการแช่แล้ว ไข่ปลาถูกแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 ถูกนำกลับมาที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น และส่วนที่ 2 เก็บไว้ที่บุญโฮมฟาร์ม ลูกปลาทั้ง 2 แห่งนี้ถูกอนุบาลด้วยอาหารโปรตีน 41% แบบต่างๆ ในภาชนะอนุบาลที่แสดงไว้ในตารางที่ 1 สรุปเพศลูกปลาในแต่ละชุดการทดลองปรากฏในตารางที่ 3 ในการทดลองครั้งที่ 2 นี้ มีข้อบกพร่องคือ ไม่ได้ทำชุดควบคุมที่อยู่บนโต๊ะโยก เพราะว่าไข่ทดลองมีจำนวนจำกัด และชุดควบคุม 0 ซึ่งเป็นไข่ที่สุ่มตัวอย่างไว้ก่อนการรวบรวมไข่บนโต๊ะโยก จึงเป็นไข่ที่ไม่ได้รับผลกระทบของโต๊ะโยกแต่อย่างใด นอกจากนี้ไข่ปลาชุดดังกล่าวตายระหว่างการอนุบาล ทำให้มีข้อมูลชุดควบคุม 0 เหลือเพียง 1 ซ้ำเท่านั้น

ครั้งที่ 3 ทำการรวบรวมไข่ปลานิลจากกระชังเพาะรวม 7 กระชังได้ 760 กรัม ไข่ปลาประกอบด้วยไข่ระยะต่างๆ ดังนี้ ไข่อายุ 1 วัน ($34.79 \pm 5.25\%$) อายุ 2 วัน ($35.1 \pm 18.0\%$) อายุ 3 วัน ($0.13 \pm 0.08\%$) และไข่เสีย ($29.9 \pm 16.4\%$; ตารางที่ 2) ทำการสุ่มซังไข่ปลาถาดละ 115 กรัม (ความหนาแน่น 19,895 ฟอง/ลิตร; ตารางที่ 2) แช่สารละลาย MT นาน 24 ชั่วโมง มีการแบ่งไข่ปลาไปฟักและอนุบาลที่มหาวิทยาลัยขอนแก่นและที่บุญโฮมฟาร์มด้วย แต่ที่บุญโฮมไม่ได้ให้อาหาร MT สมทบ นาน 5 และ 8 วันตามที่ตกลงกันไว้ จึงเหลือเฉพาะข้อมูลชุดควบคุมเปรียบเทียบ MT ที่ทำการแปลงเพศด้วยอาหาร MT ของบุญโฮมฟาร์มตลอดระยะเวลาการแปลงเพศ 21 วันเท่านั้น ผลการแช่แปลงเพศปลาครั้งที่ 3 ปรากฏในตารางที่ 4

ตารางที่ 2 สรุปลักษณะประกอบของไข่ปลาในระยะต่างๆ ก่อนเริ่มทำการทดลองและความหนาแน่นของไข่ปลาที่ใช้ในการทดลองซ้ำ ทั้ง 3 ครั้ง

การทดลอง	% ไข่ปลาแต่ละอายุ					ความหนาแน่น		การแช่ (ชม.)	ผลการแช่
	เสีย	1 วัน	2 วัน	3 วัน	4 วัน	ฟอง/ไข่	ฟอง/ล.		
1	2.73	-	59.45	37.82	-	11,832	23,664	>24	ตาย
	± 1.06		± 3.11	± 3.54		/0.5ล.			หมด
2.									
อายุ 1	57.55	26.72	15.73	-	-	23,200	23,200	24	ตาราง
						/ลิตร			ที่ 3
อายุ 2	13.84	3.18	20.17	35.46	27.35	23,200	23,200	24	
						/ลิตร			
3	29.9	34.79	35.1	0.13	-	19,895	19,895	24	ตาราง
	± 16.4	± 5.25	± 18.0	± 0.08		/ลิตร			ที่ 4

ตารางที่ 3 ผลการแช่แปลงเพศปลานิลเชิงการค้าภาคสนามที่บุญโฮมฟาร์มครั้งที่ 2 ในสระละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	ผลการแปลงเพศ (%)			
	เพศผู้	เพศเมีย	ผู้ + เมีย	อัตราการรอด
ชุดควบคุม 0	73.46	26.54	0.00	72.41
มหาวิทยาลัยขอนแก่น				
1. แช่ MT 5 มก./ล. + ไข่อายุ 1	68.03±0.72	31.45±1.24	0.52±0.52	86.33±1.67
2. แช่ MT 5 มก./ล. + ไข่อายุ 2	65.90±2.35	33.58±1.83	0.52±0.52	73.4±14.10
3. แช่ MT 5 มก./ล. ไข่อายุ 1 + อาหาร MT 5 วัน	45.80±2.67	52.71±2.20	1.49±0.47	61.67±7.00
4. แช่ MT 5 มก./ล. ไข่อายุ 2 + อาหาร MT 5 วัน	53.81±0.20	47.12±1.12	0.58±0.58	81.7±10.30
5. แช่ MT 5 มก./ล. ไข่อายุ 1 + อาหาร MT 8 วัน	50.98±0.04	44.15±0.75	4.87±0.79	77.74±9.07
6. แช่ MT 5 มก./ล. ไข่อายุ 2 + อาหาร MT 8 วัน	67.77±6.23	30.31±4.31	1.92±1.92	88.00±2.00
บุญโฮมฟาร์ม				
7. แช่ที่ 5 มก./ล. รวมไข่อายุ 1 + 2	56.0	34.0	10.0	98.0
8. แช่ที่ 5 มก./ล. รวมไข่อายุ 1 + 2 + อาหาร MT 5 วัน	69.15	28.73	2.13	70.81
9. แช่ที่ 5 มก./ล. รวมไข่อายุ 1 + 2 + อาหาร MT 8 วัน	66.67	29.17	4.17	100
10. การแปลงเพศด้วยอาหาร MT	100	0	0	-

ตารางที่ 4 ผลการแช่แปลงเพศปลานิลเชิงการค้าภาคสนามที่บึงโสมฟาร์มครั้งที่ 3
ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 24 ชั่วโมง

ชุดการทดลอง	ผลการแปลงเพศ (%)			
	เพศผู้	เพศเมีย	ผู้+เมีย	อัตรารอด
1. ชุดควบคุมบนโต๊ะ โยก	59.76±14.97 ^{ac}	38.32±13.38 ^{ac}	1.92±1.92	92.00±5.21
2. แช่ MT 5 มก./ล.	79.49±5.43 ^b	20.52±5.43 ^b	0	84.89±8.47
3. แช่ MT10 มก./ล.	75.82±5.40 ^{ab}	22.54±4.85 ^{bd}	2.28±0.84	91.33±5.03
4. แช่ MT5 มก./ล.+ อาหาร MT นาน 5 วัน	56.33±6.03 ^c	40.23±4.02 ^c	3.23±1.39	97.11±1.68
5. แช่ MT 5 มก./ล. + อาหาร MT นาน 8 วัน	50.84±11.34 ^c	46.19±12.66 ^c	2.97±1.52	87.33±19.7
6. แช่ MT10 มก./ล.+ อาหาร MT 5 วัน	62.85±8.23 ^{ac}	35.87±6.18 ^{cd}	1.28±1.28	94.89±3.42
7. แช่ MT10 มก./ล.+ อาหาร MT 8 วัน	58.67±13.32 ^{ac}	36.67±11.02 ^{cd}	4.67±1.33	95.56±4.68
8. การแปลงเพศด้วยอาหาร MT	97.35±1.32	2.64±1.32	0	98.73

หมายเหตุ: อักษรภาษาอังกฤษที่ต่างกันในแนวดิ่งแสดงถึงความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (P<0.05)

วิจารณ์ผล

อายุของไข่ปลาก่อนเริ่มทำการทดลอง

อายุของไข่ปลาก่อนการแช่พบว่ามีการแปลงเพศโดยวิธีแช่ ดังแสดงไว้อย่างชัดเจนในการทดลองที่ 1 (รายงานความก้าวหน้า งวดที่ 2) อายุที่เหมาะสมกับการแปลงเพศโดยวิธีแช่นั้นปรากฏที่อายุ 2, 5 และ 11 วันหลังการวางไข่ ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 86.83±2.6 ถึง 87.48±2.51% สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีลูกปลาเพศผู้ 73.85±2.98 ถึง 79.77±1.69% อย่างไรก็ตามการรวบรวมไข่ของฟาร์มเอกชน ไม่สามารถทำได้อย่างใกล้ชิดดังที่ได้ดำเนินการที่ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น ส่งผลให้การเก็บรวบรวมไข่ปลาของคณงานที่บึงโสมฟาร์มมีไข่ละอายุด่อนข้างมาก ดังปรากฏในตารางที่ 2 การเก็บไข่ปลาครั้งที่ 1 มีไข่ปลาอายุ 3 วันปนมาถึง 37.82±3.54% เมื่อแช่ไข่ครบ 24 ชั่วโมงแล้วพบว่าน้ำสารละลายที่ใช้แช่ไข่มีสีขาวขุ่น ไข่ปลาบางส่วนเริ่มฟักเป็นตัว จึงทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำสารละลาย MT 1 ครั้ง แต่อย่างไรก็ดีไข่และ

ถูกปลาในถาดแช่เริ่มตายในคืนนั้น (หลังการแช่ประมาณ 27 ชั่วโมง) และตายทั้งหมดในเช้าวันรุ่งขึ้น (หลังการแช่ประมาณ 40 ชั่วโมง) จึงทำการลดระยะเวลาการแช่ให้สั้นลงเหลือ 24 ชั่วโมงในการทดลองภาคสนามครั้งต่อมา พบว่าแม้จะมีไข่ระยะอายุกันมากในการทดลองครั้งที่ 2 ชุดอายุ 2 ที่มีไข่ตั้งแต่อายุ 1 – 4 วันหลังการวางไข่ ไข่ที่อายุ 4 วันมีจำนวนสูงถึง 27.35% แต่สามารถแช่ MT ได้ครบ 24 ชั่วโมง ส่วนในการทดลองครั้งที่ 3 พบว่าทางฟาร์มสามารถคัดแยกอายุไข่ได้ดีขึ้น ทำให้ไข่ที่ได้ส่วนมากเป็นไข่อายุ 1 ($34.79 \pm 5.25\%$) และ 2 ($35.1 \pm 18.0\%$) วันหลังการวางไข่ การแช่ MT นาน 24 ชั่วโมงจึงสามารถทำได้โดยง่าย ดังนั้นเทคนิคการแช่ไข่แปลงเพศปลาไนล์ ต้องอาศัยประสบการณ์ในการแยกพัฒนาการของไข่ปลาไนล์ที่อายุ 1 และ 2 วันหลังการวางไข่ นอกจากไข่ปลาอายุ 3 วันขึ้นไป นอกจากนี้ควรจะต้องมีการฝึกหัดคนงานให้สามารถคัดแยกไข่เสียออกจากไข่ดีที่อายุ 1 วันได้อีกด้วย มิฉะนั้นจะทำให้มีไข่เสียเข้าสู่ขบวนการแช่สูงถึง 30% ดังที่พบในการทดลองครั้งที่ 3

การแปลงเพศโดยวิธีแช่ MT ภาคสนาม

การทดลองครั้งที่ 2 ได้ทำการแช่ MT กับไข่ปลาไนล์(อายุ 1 และอายุ 2) ไข่ปลาชุดนี้มีความแตกต่างกันที่อายุ โดยไข่ปลาอายุ 1 ประกอบด้วยไข่อายุ 1 และ 2 วันหลังการวางไข่ จำนวน 26.72 และ 15.73% ตามลำดับ ส่วนไข่ปลาที่เหลืออีก 57.55% นั่นคือไข่เสีย ส่วนไข่ปลาอายุ 2 ประกอบด้วยไข่อายุ 1, 2 และ 3 วันหลังการวางไข่ จำนวน 3.18, 20.17 และ 35.46% ตามลำดับ ไข่ปลาชุดนี้มีไข่เสียอยู่เพียง 13.84% เท่านั้น (ตารางที่ 2) การแช่ MT นาน 24 ชั่วโมง กับไข่ปลาที่อายุ 1 และ 2 นี้ มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ $68.03 \pm 0.72\%$ และ $65.90 \pm 2.35\%$ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ความสำเร็จของการทดลองครั้งนี้ตายระหว่างการอนุบาลเป็นจำนวนมาก เมื่อสิ้นสุดการทดลองมีลูกปลาของชุดควบคุมเหลืออยู่เพียง 1 ตัวเท่านั้น การวิเคราะห์และวิจารณ์ผลทางสถิติจึงทำได้ค่อนข้างยาก

นอกจากนี้ในการทดลองครั้งที่ 2 ผู้จัดการบุญโฮมฟาร์มได้ร่วมทำการทดลองให้อาหารสมทบหลังการแช่ที่ภายในโรงเพาะฟักของฟาร์มด้วย แต่การทดลองมีข้อจำกัดที่จำนวนกระชัง และจำนวนลูกปลาจากแต่ละชุดการทดลองมีน้อย จึงต้องรวมลูกปลาอายุ 1 และ 2 เข้าด้วยกัน ทำให้แต่ละชุดการทดลองมีเพียง 1 ซ้ำเท่านั้น การวิเคราะห์ผลทางสถิติเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ดำเนินการที่มหาวิทยาลัยขอนแก่นจึงไม่สามารถทำได้

เมื่อคนงานของบุญโฮมฟาร์มเข้าใจและสามารถแยกไข่ปลาไนล์ระยะที่ต้องการได้ดีขึ้นในการทดลองภาคสนามครั้งที่ 3 ทำให้ได้ไข่อายุ 1 และ 2 วันหลังการวางไข่จำนวน 34.79 ± 5.25 และ $35.1 \pm 18\%$ ตามลำดับ มีไข่อายุ 3 วันปนมาเพียง $0.13 \pm 0.08\%$ เท่านั้น ไข่ที่เหลือคือ ไข่เสีย ซึ่งมีอยู่จำนวน $29.9 \pm 16.4\%$ (ตารางที่ 2) ปริมาณไข่ที่เก็บได้ก่อนเริ่มทำการทดลองคือ 760 กรัม ทำให้สามารถวางแผนการทดลองได้ดีขึ้น ทำการสุ่มชั่งไข่แต่ละ 115 กรัม ใส่สารละลายฮอร์โมน 1 ลิตร

คิดเป็นความหนาแน่น 19.895 ฟอง/ลิตร ทำการแช่นาน 24 ชั่วโมง ในสารละลายฮอร์โมน MT 5 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร ผลปรากฏว่า การแช่ MT ทั้ง 2 ความเข้มข้นมีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ใกล้เคียงกันโดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติคือ 79.49 ± 5.43 และ $75.82 \pm 5.40\%$ ตามลำดับ แต่ปริมาณลูกปลาเพศผู้ที่ได้จากการแช่ MT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตรนี้ สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.02$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีลูกปลาเพศผู้เพียง $59.76 \pm 14.97\%$ ในขณะที่การแช่ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้สูงกว่าชุดควบคุมเพียงเล็กน้อยเท่านั้น โดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P=0.057$) แสดงว่าการแช่ MT 24 ชั่วโมงในภาคสนาม มีผลในการแปลงเพศปลานิลเชิงการค้า

คุณสุพงษ์ วรวงศ์ ผู้จัดการบุญโฮมฟาร์ม มีข้อสงสัยว่า ลูกปลานิลที่แปลงเพศโดยวิธีแช่เสร็จแล้ว ถ้ามีการให้อาหารผสม MT แก่ลูกปลาหลังการแช่ประมาณ 5 – 8 วัน จะมีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้สูงขึ้นหรือไม่ ในการทดลองครั้งนี้มีลูกปลานิลหลังการแช่เหลืออยู่จำนวนมาก จึงสุ่มนับลูกปลาที่เหลือจากการแช่ MT ที่ 5 และ 10 มิลลิกรัม/ลิตร มาทดลองให้อาหารผสม MT เริ่มตั้งแต่ระยะที่ลูกปลาเริ่มกินอาหาร (อายุประมาณ 9-10 วันหลังการวางไข่) เป็นเวลานาน 5 และ 8 วัน พบว่าฮอร์โมน MT ในอาหารที่ให้สมทบหลังการแช่นี้ มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P=0.002 - 0.039$; ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่แช่ MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร แต่เมื่อนำข้อมูลดังกล่าวมาเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่แช่ MT 10 มิลลิกรัม/ลิตร พบว่า การให้ MT สมทบ 5 และ 8 วัน หลังการแช่ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร และการให้อาหาร MT สมทบอีก 8 วัน หลังการแช่ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เช่นกัน แต่การให้ MT สมทบนาน 5 วันหลังการแช่ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/ลิตร ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ลดลงเหลือ $62.85 \pm 8.23\%$ โดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P = 0.107$) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดการแช่อย่างเดียวที่ความเข้มข้นของ MT 10 มิลลิกรัม/ลิตร (ตารางที่ 4) การให้ MT สมทบหลังการแช่ที่ให้ผลเชิงลบต่อการแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแช่นี้ น่าจะเป็นผลจากลูกปลาได้รับฮอร์โมนที่มากเกินไป จนส่งผลให้เกิด paradox ที่มีผลให้ได้ลูกปลาเพศตรงข้ามสูงขึ้นแทนที่จะเป็นลูกปลาเพศที่ต้องการ ผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองแช่ฮอร์โมน 2 ครั้ง พบว่า การแช่ฮอร์โมน 2 ครั้ง มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้น้อยลงกว่าการแช่เพียงครั้งเดียวในการทดลองแช่ MT ที่ความหนาแน่นสูง ที่เปรียบเทียบประสิทธิภาพของการแช่ MT ตั้งแต่ 0 – 80 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 48 ชั่วโมงในรายงานความก้าวหน้า ครั้งที่ 4

ประสิทธิภาพของการแปลงเพศปลาโดยใช้วิธีแช่เปรียบเทียบกับวิธีการกิน

จากข้อมูลในตารางที่ 4 แสดงให้เห็นว่าการแปลงเพศเชิงการค้าที่ความหนาแน่น 20,000 ฟอง/ลิตรโดยวิธีแช่สารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5 – 10 มิลลิกรัม/ลิตรนาน 24 ชั่วโมงนั้น สามารถแปลงเพศลูกปลานิลให้เป็นเพศผู้ได้ 75.82 – 79.49% ในขณะที่การแปลงเพศโดยวิธีการให้อาหารผสม MT (วิธีการกิน) นาน 21 วัน ของทางฟาร์มเองมีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 97.35 $\pm$ 1.32% แสดงว่าการแปลงเพศโดยวิธีแช่ มีประสิทธิภาพต่ำกว่าการแปลงเพศโดยการให้อาหารผสม MT อยู่ประมาณ 11.53 – 17.86%

เปรียบเทียบวิธีการแปลงเพศลูกปลานิล

1. การแปลงเพศด้วยอาหารผสมฮอร์โมน (oral MT) เป็นขบวนการที่ทำการเพาะปลานิลในกระชังขนาดใหญ่ที่ทางกระชังไว้ในบ่อดิน มีการเก็บไข่/ลูกปลาทุก 5 – 7 วัน นำไข่ปลาที่ได้มาคัดแยกกระยะตามพัฒนาการของตัวอ่อน ฟักไข่จนเป็นตัว เมื่อลูกปลาเริ่มกินอาหาร ย้ายไปอนุบาลในกระชังที่ทางไว้ในบ่อดิน ให้อาหารผสม MT ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม วันละอย่างน้อย 5 ครั้ง เป็นเวลานานอย่างน้อย 21 วัน ระหว่างการอนุบาลต้องมีการเปลี่ยนกระชังทุก 7 – 10 วัน เพราะว่าตะไคร่น้ำเกาะทำให้กระชังตัน มีผลทำให้ลูกปลาโตช้าและมีอัตราการรอดตายต่ำ โดยทั่วไปจะได้ลูกปลาเพศผู้ 87 – 100 % วิธีการนี้ต้องใช้แรงงานค่อนข้างมากในการดำเนินงานขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

- | | |
|--------------|---|
| ขั้นตอนที่ 1 | แรงงานในการคัดแยกไข่จากแม่ปลาแต่ละตัวในกระชังเพาะ |
| ขั้นตอนที่ 2 | แรงงานในการดูแลโรงเพาะฟักไข่และลูกปลานิลวัยอ่อน |
| ขั้นตอนที่ 3 | แรงงานในการเตรียมอาหารผสม MT และการให้อาหาร MT
วันละ 5 ครั้ง นาน 21 วัน |
| ขั้นตอนที่ 4 | แรงงานในการกางและเปลี่ยนกระชังอนุบาลลูกปลานิลระหว่างการให้อาหาร MT ทุก 7 – 10 วัน |
| ขั้นตอนที่ 5 | แรงงานในการดูแลจัดการคุณภาพน้ำ (สีน้ำ) ในบ่ออนุบาลลูกปลานิล |
| ขั้นตอนที่ 6 | แรงงานในการย้ายลูกปลาหลังจากเสร็จขบวนการให้อาหาร MT 21 วัน |

2. การแปลงเพศโดยวิธีแช่ MT (immersion MT) เป็นขั้นตอนการใช้ระบบการเพาะและฟักไข่ เหมือนกับการใช้อาหารผสม MT แต่มีข้อแตกต่างคือ การแช่สามารถเห็นขบวนการให้ลูกปลาเป็นเพศผู้ได้ในระยะไข่ปลาที่อายุ 2 วันหลังการวางไข่ โดยใช้เวลานั้นกว่าเพียง 6-48 ชั่วโมงเท่านั้น สามารถทำการแช่แปลงเพศได้ด้วยความหนาแน่นต่ำคือ 40 ฟอง/ลิตร และที่ความหนาแน่นสูงถึง 20,000 ฟอง/ลิตร หลังจากการแช่ฮอร์โมนแล้ว ไข่ปลาสามารถนำมาทำการฟักต่อในระบบของโรงเพาะฟักปลานิลปกติทั่วไป ส่วนขั้นตอนการอนุบาลนั้นลูกปลาที่ผ่านการแช่แปลงเพศแล้ว สามารถทำการอนุบาลในบ่อดินได้โดยตรง เหมือนการอนุบาลลูกปลาปกติทั่วไป ทำให้ลดค่าใช้จ่ายค่าจ้างแรงงานที่ทำหน้าที่เตรียมและให้อาหารผสม MT (ขั้นตอนที่ 3) ลงได้ 1-2 คน นอกจากนี้ยังช่วยลดค่ากระชังอนุบาลและแรงงานในการเปลี่ยนกระชังซึ่งต้องทำทุกๆ 7 – 10 วัน (ขั้นตอนที่ 4) ลงได้อีก อย่างไรก็ตามการแช่ไข่ในฮอร์โมนที่ความหนาแน่นสูงถึง 20,000 ฟอง/ลิตรนั้น ไม่สามารถทำการแช่โดยลำพัง จำเป็นต้องมีอุปกรณ์ประกอบการแช่ที่จะทำหน้าที่ขยับเคลื่อนที่ตลอดเวลา ทำให้ไข่ปลานิลไม่ตายระหว่างการแช่ 1-2 วัน อุปกรณ์ต้นแบบประกอบการแช่ไข่ในสารละลายฮอร์โมนนี้มีราคาไม่เกิน 5,000 บาท สามารถทำการแช่ได้ไข่ได้ครั้งละ 6 ถาดละ 20,000 – 40,000 ฟอง รวม 1,200,000 – 2,400,000 ฟอง อุปกรณ์นี้สามารถทำงานได้ในกรณีที่ไฟฟ้าดับ หรือที่ที่ไม่มีกระแสไฟฟ้า นอกจากนี้สามารถควบคุมการใช้และเก็บฮอร์โมนจากการใช้ เพื่อความสะดวกในการจัดการกับฮอร์โมนที่อาจจะเหลืออยู่ก่อนที่จะทิ้งออกสู่ภายนอก เป็นการลดผลกระทบจากฮอร์โมนสู่สิ่งแวดล้อมได้เป็นอย่างดี

การเปรียบเทียบต้นทุนค่าฮอร์โมน MT และ แอลกอฮอล์ที่ใช้ในการแปลงเพศปลานิลแต่ละวิธี

การแปลงเพศปลานิลโดยวิธี การกิน หรือ การแช่ มีการใช้ MT และ แอลกอฮอล์เหมือนกัน แต่วิธีการที่ปริมาณการใช้ เมื่อคำนวณต้นทุนเฉพาะค่า MT และ แอลกอฮอล์แล้ว พบว่าการแปลงเพศด้วยการกินนี้ มีค่าใช้จ่าย MT และแอลกอฮอล์รวมตัวละ 0.83 สตางค์ ในขณะที่วิธีการแช่ MT มีต้นทุนดังกล่าวเพียงตัวละ 0.027 สตางค์ คิดเป็น 3.25% ของต้นทุนการแปลงเพศโดยวิธีการกิน รายละเอียดการคำนวณปรากฏในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบค่าใช้จ่ายของ MT และแอลกอฮอล์ในการแปลงเพศปลานิล
โดยวิธีให้อาหารผสม MT และการแช่ MT ที่ความหนาแน่นต่ำและสูง

ไข่/ลูกปลา	วิธีการแปลงเพศที่ความหนาแน่นต่างๆ		
	การให้อาหารผสม MT ในกระชังขนาด 2x3x0.5 เมตร	การแช่ MT ที่ความหนาแน่น 40 ฟอง/ลิตร	การแช่ MT ในถาดที่ความหนาแน่น 20,000 ฟอง/ลิตร
- ไข่ปลาอายุ 2 วันหลัง การวางไข่	-	40 ↓ ฟัก 80%	20,000 ↓ ไข่เสีย 30% ฟัก 80%
- ลูกปลาที่เริ่มกินอาหาร	36,000 ตัว	32	11,200 ตัว
- ลูกปลาเพศผู้	18,000 ตัว	16	5,600 ตัว
ค่าใช้จ่าย			
1. MT	300 มิลลิกรัม	250 ไมโครกรัม	5 มิลลิกรัม
(300 บาท/กรัม)	90 บาท	0.075 บาท	1.5 บาท
2. Alcohol	1,200 มิลลิลิตร	0.5 มิลลิลิตร	0.5 มิลลิลิตร
(50 บาท/ลิตร)	60 บาท	0.025 บาท	0.025 บาท
รวมค่าใช้จ่าย	150 บาท	0.1 บาท	1.525 บาท
MT+Alc			
ค่า MT+Alc ต่อลูก ปลานิล 1 ตัว	0.83 สต.	0.625 สต.	0.027 สต.
ค่า MT+Alc ต่อลูก ปลา 1 ล้านตัว	8,300 บาท	6,250 บาท	270 บาท
%ค่า MT+Alc เทียบ กับวิธีผสมในอาหาร	100%	75.30%	3.25%

สรุป

การแปลงเพศโดยวิธีแช่ MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 24 ชั่วโมงที่ความหนาแน่น 20,000 ฟอง/ลิตร มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ $79.49 \pm 3.13\%$ ต่ำกว่าการแปลงเพศโดยวิธีการกินที่ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 97.4% แต่วิธีการแช่มีค่าใช้จ่าย MT และ แอลกอฮอล์ เพียง 3.25% ของวิธีการกินเท่านั้น แสดงว่าวิธีการแช่มีผลในการลดต้นทุนของการแปลงเพศอย่างชัดเจน บรรลุวัตถุประสงค์ของโครงการที่ตั้งไว้

ข้อเสนอแนะ

ถึงแม้การแปลงเพศโดยวิธีแช่จะช่วยลดค่าใช้จ่าย MT และ แอลกอฮอล์ลงเหลือเพียง 3.25% ของวิธีการแปลงเพศด้วยการกิน แต่ประสิทธิภาพของการแปลงเพศโดยวิธีแช่นั้นได้เพศผู้เพียง 75-80% เท่านั้น ควรที่จะหาวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการแปลงเพศโดยวิธีแช่ให้สูงขึ้น ไม่ว่าจะเป็นการใช้ ultrasound (Athauda, 2001), enhancers, aromatase inhibitors (Kwon et.al., 2000) หรือการควบคุมสิ่งแวดล้อมอื่นๆ ที่อาจมีผลกระทบต่อกระบวนการพัฒนาเพศของปลานิล หากสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการแปลงเพศโดยวิธีแช่ได้เพศผู้สูงถึง 95 - 100% ก็ใกล้เคียงกับประสิทธิภาพของการกินแล้ว วิธีการแช่น่าจะเป็นทางเลือกใหม่ให้เกษตรกรผู้ผลิตลูกปลานิลแปลงเพศนำไปดำเนินการ วิธีการแช่นี้นอกจากจะทำให้ค่าใช้จ่ายเรื่องฮอร์โมนและแอลกอฮอล์ลดลงเหลือเพียง 3.25% แล้ว ยังช่วยลดปัญหาการปนเปื้อนของฮอร์โมนสู่สิ่งแวดล้อมได้อีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

Athauda, A.R.S.B. 2001. Ultrasound-immersion techniques to improve the efficiency of sex reversal of male tilapia population. MS. Thesis. AIT. (abstract).

Kwon, J.Y., Haghpahan, V., Kogson-Hurtado, L.M. McAndrew, B.J. and Penman, D.J. 2000. Masculinization of genetic female Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by dietary administration of an aromatase inhibitor during sexual differentiation. J. Exp. Zool. 15:287(1): 46-53.

ภาคผนวกที่ 4.2

การทดลองภาคสนามที่บุญโฮมฟาร์ม
ความหนาแน่นของไข่ในการแช่แปลงเพศปลานิล
(5,000-20,000 ฟอง/ลิตร)

คำนำ

การแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแช่สามารถแปลงเพศปลานิลให้เป็นเพศผู้ได้ (85-91%) เฉพาะที่ความหนาแน่นต่ำ (35-40 ฟอง/ลิตร) เท่านั้น เมื่อโครงการฯ เพิ่มความหนาแน่นของไข่ปลานิลให้สูงขึ้นเพื่อวัตถุประสงค์เชิงการค้าคือ 20,000 ฟอง/ลิตร ตั้งแต่ปี 2543 จนถึงปัจจุบัน พบว่าวิธีการแช่ไม่มีผลต่อการแปลงเพศปลานิล ดังรายงานสรุปความก้าวหน้า ครั้งที่ 3, 4 และ 5 อย่างไรก็ตามเทคนิคการแช่แปลงเพศปลานิลนี้ เป็นวิธีการที่ใช้ฮอร์โมนน้อยมากเพียง 5.36% ของฮอร์โมนที่ใช้ผสมในอาหาร และที่สำคัญคือวิธีการนี้ สามารถควบคุมปัญหาการปนเปื้อนของฮอร์โมนสู่สิ่งแวดล้อมได้ สกว.จึงให้งบประมาณเพิ่มเติม เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแช่ ด้วยการลดระดับความหนาแน่นของไข่ปลาระหว่างการแช่สารละลายฮอร์โมน เหลือ 10,000 ฟอง/ลิตร

วิธีการ

ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เป็นการทดลองเชิงการค้าในภาคขนาดใหญ่ ปริมาตร 2 ลิตร ส่วนการทดลองครั้งที่ 2 และ 3 เป็นการทดลองในภาคขนาดเล็กปริมาตร 100 มิลลิลิตร

1. การเตรียมน้ำ บุญโฮมฟาร์มให้ความอนุเคราะห์บ่อในโรงเพาะฟัก 1 บ่อ ทำการปิดทางน้ำออกของบ่อนี้ ใช้น้ำในโรงเพาะฟักฟาร์มเดิมให้เต็มบ่อ ปิดวาล์วน้ำเข้า ใส่คลอรีนผงเพื่อทำการเตรียมน้ำที่ความเข้มข้น 20 ppm ใช้โดโวขนาด 1 นิ้วจำนวน 2 ตัว สูบน้ำให้ไหลวนเวียนภายในบ่อก่อนเริ่มทำการทดลองประมาณ 1 สัปดาห์ ใช้น้ำในบ่อนี้ในการเตรียมสารละลายฮอร์โมน การฟักไข่หลังการแช่ฮอร์โมน และการอนุบาลลูกปลานิลได้อายุที่ต้องการคือประมาณ 16 – 21 วันหลังวางไข่ ก่อนที่จะทำการลุ่มน้ำกลับมาอนุบาลต่อที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น

2. การเตรียมไข่ปลาสำหรับการทดลอง ใช้ไข่อายุประมาณ 2 วันหลังการผสม ที่แยกได้จากกระชังเพาะปลานิลบ่อ E4 ที่เป็นปลานิลพันธุ์พื้นเมือง นำไข่มาล้างทำความสะอาดด้วยฟอร์มาลิน 100 ppm ประมาณ 1 นาที รวมไข่ไว้ที่ถาดฟักไข่ลูมิเนียมที่มีน้ำไหลวนภายในโรงเพาะฟัก ทำการ

รวบรวมน้ำจากกระชังเพาะประมาณ 7 - 10 กระชัง ตั้งแต่เวลา 9.00 — 15.00 น. นำไข่ที่ได้ไปชั่งน้ำหนักเพื่อทำการประมาณจำนวนไข่ปลา ก่อนเริ่มทำการทดลองทุกครั้ง

3. การเตรียมสารละลายฮอร์โมน เตรียม stock MT โดยชั่ง 17 α methyltestosterone (MT; Fluka) 0.050 กรัม ละลายด้วย แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 2 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฮอร์โมนที่เป็นสารละลายเริ่มต้นที่ความเข้มข้น 25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เมื่อเวลาต้องการใช้ ให้ดูด stock MT มา 400 ไมโครลิตร (10 มิลลิกรัม) ใส่ลงในขวดพลาสติกที่บรรจุน้ำเปล่า 2 ลิตร จะได้สารละลายฮอร์โมนที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร

4. ชุดควบคุม ประกอบด้วยชุดควบคุม 2 ชุด คือ

4.1 **control +** คือ ไข่ปลานิลที่ถูกผสมซึ่งใส่ในขวดทดลองบรรจุน้ำ 2 ลิตร และใส่ แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 400 ไมโครลิตร หรือ 0.4 มิลลิลิตร

4.2 **control -** คือ ไข่ปลานิลชุดเดียวกันกับที่ใช้ในการทดลอง เป็นไข่ที่เหลือจากการผสมเพื่อทำการทดลองแล้ว ไข่ปลาชุดนี้จะอยู่ในระบบฟักของบุญโฮมฟาร์ม โดยไม่สัมผัสกับโต๊ะโยกที่ใช้ประกอบการแช่สารละลายฮอร์โมน

5. การทดลอง ครั้งที่ 1

5.1 รวบรวมไข่ปลานิลจากบ่อ E4 (สายพันธุ์พื้นเมือง) ได้ 704 กรัม ทำการผสมไข่หนัก 110 กรัม/ถาด ที่บรรจุน้ำสะอาด 2 ลิตร จำนวน 6 ถาด

5.2 ดูดสารละลาย stock MT ที่เตรียมไว้ในข้อ 3 จำนวน 400 ไมโครลิตร ผสมใส่ลงในถาดที่บรรจุน้ำ 2 ลิตร จะได้สารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 3 ถาด ส่วนถาดทดลองที่เหลืออีก 3 ถาด ใส่แอลกอฮอล์บริสุทธิ์จำนวน 400 ไมโครลิตร/ถาด เป็นชุด control +

5.3 วางถาดทดลองทั้งหมดบนโต๊ะโยกที่ความเร็ว 24 รอบ/นาที ทำการแช่ไข่นาน 24 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนน้ำทำการล้างสารละลายฮอร์โมนออกด้วยน้ำสะอาด ย้ายไข่ปลาทั้งหมดไปฟักต่อในถาดอูมิเนียมที่มีน้ำไหลวนในบ่อเตรียมน้ำในข้อ 1 ไข่ปลาจะอยู่ในบ่อนี้จนกระทั่งฟักเป็นตัว เมื่อลูกปลาเริ่มกินอาหาร ให้อาหารผงโปรตีน 41% เป็นอาหารวันละ 3 — 5 ครั้ง ทุกวัน อนุบาลลูกปลาในถาดฟักนาน 15-20 วัน ก่อนทำการสุ่มย้ายลูกปลาไปอนุบาลที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น

6. การทดลองครั้งที่ 2 และ 3

ลดขนาดถาดทดลองลงเหลือถาดละ 100 มิลลิลิตร เพราะต้องการเปรียบเทียบความหนาแน่นของไข่ที่แตกต่างกัน การทดลองที่ 2 ใช้ไข่ปลานิลจากบ่อ E5, E6 และ E7 ที่มีปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 ปนอยู่ ส่วนการทดลองที่ 3 ใช้ไข่ปลานิลจากบ่อ E4 ที่เป็นปลานิลพื้นเมืองเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ใช้สารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตรเหมือนการทดลองที่ 1

6.1 ทำการซังไข่ปลาอายุประมาณ 2 วันหลังการผสมไข่สดทดลองขนาดเล็كدังนี้

- ชุดที่ 1. ซังไข่ปลานิลหนัก 11.52 กรัม จำนวน 4 ถาด ใช้เป็นชุดควบคุม (control +) ใส่สารละลายน้ำ+แอลกอฮอล์ 0.2 มิลลิลิตร/ลิตร ถาดละ 100 มิลลิลิตร ความหนาแน่นของไข่ปลา คือ 2,000 ฟอง/100 มิลลิลิตร (20,000 ฟอง/ลิตร)
- ชุดที่ 2. ซังไข่ปลานิลหนัก 11.52 กรัม จำนวน 4 ถาด ใส่สารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 100 มิลลิลิตร ทำให้ถาดทดลองมีความหนาแน่นของไข่ปลาเป็น 2,000 ฟอง/100 มิลลิลิตร (20,000 ฟอง/ลิตร)
- ชุดที่ 3. ซังไข่หนัก 11.52 กรัม จำนวน 4 ถาด ใส่สารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 200 มิลลิลิตร ทำให้ความหนาแน่นของไข่ปลา ระหว่างการแช่เป็น 2,000 ฟอง/200 มิลลิลิตร (10,000 ฟอง/ลิตร)
- ชุดที่ 4. ซังไข่ปลานิลหนักถาดละ 5.76 กรัม ใส่สารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร ถาดละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ถาด ทำให้มีความหนาแน่นของไข่ปลาเป็น 1,000 ฟอง/100 มิลลิลิตร (10,000 ฟอง/ลิตร)
- ชุดที่ 5. ซังไข่ปลานิลหนักถาดละ 2.88 กรัม ใส่สารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร ถาดละ 100 มิลลิลิตร จำนวน 4 ถาด ทำให้มีความหนาแน่นของไข่เป็น 500 ฟอง/100 มิลลิลิตร (5,000 ฟอง/ลิตร)

6.2 วางถาดทดลองบนโต๊ะโยกที่ความเร็ว 26-28 รอบ/นาที นาน 24 ชั่วโมง จึงล้างด้วยน้ำสะอาด ทำการฟักและอนุบาลต่อเช่นเดียวกับการทดลองครั้งที่ 1 ก่อนที่จะสุ่มลูกปลาประมาณ 150 ตัว ข้ายกกลับมาอนุบาลที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น

6.3 การอนุบาลลูกปลาที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น ทำการอนุบาลลูกปลาต่อในตู้กระจกขนาด 100 ลิตร ด้วยอาหารเม็ดโปรตีน 41% จนลูกปลามีอายุอย่างน้อย 2 เดือน จึงทำการสุ่มลูกปลาตู้ละ 50 ตัวเพื่อทำการเช็คเพศด้วยวิธี acetocarmine squash method ตามวิธีของ Guerrero and Shelton (1974) ถ้าข้อมูลใดยังไม่ชัดเจน ทำการสุ่มตัวอย่างครั้งที่ 2 หรือ 3 ครั้งละ 50 ตัว

7. การวิเคราะห์ข้อมูล นำข้อมูลที่ได้นำมาคำนวณหาร้อยละของลูกปลาแต่ละเพศ ทดสอบการกระจายของข้อมูล ก่อนนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ หากข้อมูลมีการกระจายแบบไม่ปกติ ทำการแปลงข้อมูลด้วย arcsine transformation ก่อนที่จะทำการวิเคราะห์ด้วย ANOVA และใช้ Fisher's Least-Significance Test ใน Post-Hoc Test เพื่อการจับคู่หาความแตกต่างทางสถิติของแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้โปรแกรม Systat

ผลการทดลอง

การทดลองทั้ง 3 ครั้งนี้ดำเนินการที่บุญโฮมฟาร์ม เป็นการทดลองภาคสนาม ไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสมที่รวบรวมได้ มักมีไข่ระยะอื่นปนมาเสมอ การทดลองครั้งที่ 1 และ 2 มีไข่อายุ 1 และ 2 วันเป็นส่วนมาก โดยมีไข่อายุ 1 วันจำนวน 44.75 ± 12.56 และ $41.0 \pm 1.14\%$ ส่วนไข่อายุ 2 วันมีจำนวน 37.71 ± 9.05 และ $57.47 \pm 1.04\%$ ในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 ตามลำดับ ส่วนการทดลองครั้งที่ 3 ไข่ปลานิลที่ใช้ในการทดลองประกอบด้วยไข่อายุ 2 วันเป็นส่วนมาก ($46.32 \pm 7.11\%$) รองลงมาคือไข่อายุ 3 วัน ($27.19 \pm 7.89\%$) และ 1 วัน ($11.49 \pm 4.00\%$; ตารางที่ 1.1)

ตารางที่ 1.1 ส่วนประกอบของอายุไข่ปลานิลที่เริ่มใช้ทำการทดลองแต่ละครั้ง (mean $\pm$ SD)

การทดลอง ครั้งที่	สายพันธุ์ปลานิล	ไข่อายุ 1 วัน (%)	ไข่อายุ 2 วัน (%)	ไข่อายุ 3 วัน (%)	ไข่เสีย (%)
1	พื้นเมือง	44.75 ± 12.56	37.71 ± 9.05	1.67 ± 1.76	15.88 ± 3.38
2	พื้นเมือง+จิตรลดา 3	41.00 ± 1.14	57.47 ± 1.04	1.53 ± 0.31	ไม่มีข้อมูล
3	พื้นเมือง	11.49 ± 4.00	46.32 ± 7.11	27.19 ± 7.86	15.01 ± 2.34
เฉลี่ย		32.41 ± 5.90	47.17 ± 5.73	10.13 ± 3.31	15.45 ± 2.86

หมายเหตุ: ข้อมูลไข่เสียในการทดลองที่ 2 ทำการเก็บข้อมูลล่าช้า ทำให้ไข่เสียบางส่วนสลายตัวไปก่อน

การประมาณจำนวนไข่ปลาจากน้ำหนักไข่ มีผลทำให้ความหนาแน่นของไข่ปลาแต่ละการทดลองเปลี่ยนไปจากแผนที่วางไว้เล็กน้อย เช่น การทดลองที่ 1 ตามแผนต้องการความหนาแน่นของไข่ระหว่างการทดลองเป็น 10,000 ฟอง/ลิตร แต่ไข่ปลาชุดนี้มีน้ำหนักค่อนข้างมาก คือมีจำนวนไข่เฉลี่ย 155 ฟอง/กรัม ทำให้จำนวนไข่ที่ได้จากการชั่งน้ำหนัก 110 กรัม มีค่าเป็น 17,050 ฟอง การแช่ไข่ในสารละลาย 2 ลิตร ทำให้ความหนาแน่นของไข่ปลานิลระหว่างการแช่ทดลองแปลงเพศมีค่าเป็น 8,525 ฟอง/ลิตรดังแสดงในตารางที่ 1.2 ส่วนความหนาแน่นของไข่ปลานิลในการทดลองครั้งที่ 2 และ 3 นั้น มีค่าใกล้เคียงกับแผนที่วางไว้ คือมีความหนาแน่นอยู่ในช่วง 5,000 – 20,000 ฟอง/ลิตร

การทดลองครั้ง 1, 2 และ 3 เป็นการทดลองภาคสนามที่ไม่ได้ทำในวันเดียวกัน ดังนั้นอุณหภูมิระหว่างการแช่สารละลายฮอร์โมนของการทดลองครั้งที่ 1 มีอุณหภูมิอยู่ในช่วง 21-22 °ซ การทดลองครั้งที่ 2 มีอุณหภูมิ 19.5-23.5 °ซ ในขณะที่การทดลองครั้งที่ 3 มีอุณหภูมิค่อนข้างสูงคือ 24-25 °ซ ดังแสดงในตารางที่ 1.3 ส่วนการลำเลียงลูกปลากลับมาอนุบาลต่อที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น นั้น ทำการลำเลียงในวันที่ 15, 16 และ 20 วันหลังการผสม ในการทดลองครั้งที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ (ตารางที่ 1.3)

ตารางที่ 1.2 ความหนาแน่นของไข่ปลานิลในแต่ละการทดลอง

การทดลอง ครั้งที่	น้ำหนักไข่ (กรัม)	ไข่เฉลี่ย (ฟอง/กรัม)	จำนวนไข่ (ฟอง)	ปริมาตร (มิลลิลิตร)	ความหนาแน่นของไข่ปลา (ฟอง/ลิตร)
1	110	155	17,050	2,000	8,525
2	2.88	174	501	100	5,010
	5.76	174	1,002	100	10,020
	11.52	174	2,005	100	20,005
	11.52	174	2,005	200	10,025
3	2.88	173	498	100	4,980
	5.76	173	997	100	9,970
	11.52	173	1,993	100	19,930
	11.52	173	1,993	200	9,965

ตารางที่ 1.3 สายพันธุ์ปลานิล อุณหภูมิ และอายุของลูกปลาเมื่อลำเลียงกลับมหาวิทยาลัยขอนแก่น

การทดลอง ครั้งที่	สายพันธุ์ ปลานิล	อุณหภูมิ ระหว่างแซ่ (°ซ)	อายุที่ลำเลียงกลับ มข.		
			หลังการวางไข่ (วัน)	หลังการฟัก (วัน)	เริ่มกินอาหาร (วัน)
1	พื้นเมือง	21-22	15	10	7
2	มีจิตรลดา 3 ปน	19.5-23.5	16	11	8
3	พื้นเมือง	24-25	20	15	12

ผลการเปลี่ยนแปลงเพศปลานิลเชิงการค้าในภาคขนาดใหญ่ (การทดลองครั้งที่ 1) ที่ความหนาแน่น 17,050 ฟอง/2 ลิตร พบว่า ชุดการทดลองที่แช่ในสารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ $45.48 \pm 4.01\%$ ใกล้เคียงกับชุดการทดลองที่แช่ในสารละลายแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ (control +) ที่มีลูกปลาเพศผู้ $44.21 \pm 15.98\%$ ส่วนชุดควบคุมที่อยู่ในระบบการฟักไข่ของบุญโฮมฟาร์ม โดยไม่ได้ยวบยาบโต๊ะโยกประกอบการแช่แปลงเพศปลานิลนั้น (control -) มีลูกปลาเพศผู้ 42.19% ปริมาณลูกปลาเพศผู้ที่ได้จากการทดลองครั้งที่ 1 นี้มีค่าใกล้เคียงกันโดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ แสดงว่าการแช่ไข่ปลานิลที่ความหนาแน่น 17,050 ฟอง/2 ลิตร (8,525 ฟอง/ลิตร) ในสารละลาย MT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร ไม่มีผลในการแปลงเพศปลานิล (ตารางที่ 1.4)

ตารางที่ 1.4 ผลการแปลงเพศ การทดลองครั้งที่ 1 ทำการทดลองแช่แปลงเพศเชิงการค้า ในภาคใหญ่
ที่ความหนาแน่น 17,050 ฟอง/ 2 ลิตร (mean $\pm$ SD)

ชุดการทดลอง	เพศผู้ (%)	เพศเมีย (%)	ผู้+เมีย (%)	อัตรารอด (%)
Control -	42.19	56.25	1.56	94
Alcohol	60.71	35.71	3.57	96.8
(control +)	28.81	67.80	3.39	100
	43.10	50.00	6.90	98.09
เฉลี่ย	44.21 $\pm$ 15.98	51.17 $\pm$ 16.08	4.62 $\pm$ 1.98	98.30 $\pm$ 1.61
MT 5mg/l	44.07	44.07	11.86	97.14
	42.37	52.54	5.09	95.45
	50.00	43.33	6.67	93.00
เฉลี่ย	45.48 $\pm$ 4.01	46.65 $\pm$ 5.12	7.87 $\pm$ 3.54	95.20 $\pm$ 2.08

หมายเหตุ: Control - คือไข่ปลาที่เก็บไว้ในถาดฟักไข่ของโรงเพาะฟักที่บุญโฮมฟาร์ม

ส่วนผลการทดลองแปลงเพศครั้งที่ 2 พบว่า ชุดcontrol - มีจำนวนเพศผู้ต่ำที่สุดคือ 38.33% ชุดการทดลองที่มีเพศผู้สูงที่สุดคือ ชุดการทดลองที่ใส่แอลกอฮอล์ (control+) และชุดที่แช่ในสารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ความหนาแน่น 10,020 ฟอง/ลิตร ที่มีลูกปลาเพศผู้ 51.56 ± 8.53 และ $51.39 \pm 6.73\%$ ตามลำดับ รองลงมาคือชุดการทดลองที่แช่สารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ความหนาแน่น 5010, 20050 และ 10025 ฟอง/ลิตร ที่ได้ลูกปลาเพศผู้ 45.36 ± 5.17 , 44.17 ± 3.08 และ $44.12 \pm 3.74\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 1.5) การแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแช่ในสารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ความหนาแน่น 5010-20050 ฟอง/ลิตร ไม่มีผลต่อการแปลงเพศปลานิล

ตารางที่ 1.5 ผลการทดลองแช่แปลงเพศ ครั้งที่ 2 เปรียบเทียบความหนาแน่น ในถาดทดลอง ขนาดเล็กปริมาตร 100-200 มิลลิลิตร ใช้ไข่ปลานิลที่มีสายพันธุ์จิตรลดา 3 ปน (mean $\pm$ SD)

ชุดการทดลอง	ความหนาแน่น (ฟอง/ลิตร)	เพศผู้ (%)	เพศเมีย (%)	ผู้+เมีย (%)	อัตราการรอด (%)
Control -	-	38.33	60.00	1.67	98
Alcohol (control +)	20,005	62.07	37.93	0	97.22
		54.24	45.76	0	97.20
		42.37	55.93	1.70	97.27
		47.54	52.46	0	99.09
		51.56 $\pm$ 8.53	48.02 $\pm$ 7.94	0.43 $\pm$ 0.85	97.70 $\pm$ 0.93
MT 5mg/l	5,010	43.37	50.88	1.75	97.32
		49.09	50.91	0	100
		50.00	50.00	0	95.24
		38.98	61.02	0	100
		45.36 $\pm$ 5.17	53.20 $\pm$ 5.23	0.44 $\pm$ 0.88	98.14 $\pm$ 2.31
MT 5mg/l	10,020	46.67	53.33	0	98.11
		60.00	35.00	5.00	98.10
		53.45	44.83	1.72	98.15
		45.45	50.91	3.33	96.20
		51.39 $\pm$ 6.73	46.02 $\pm$ 8.17	2.51 $\pm$ 2.14	97.64 $\pm$ 0.96
MT 5mg/l	20,050	45.76	50.85	0	98.11
		44.83	51.72	3.39	97.14
		39.66	56.90	3.33	96.30
		46.43	53.57	3.45	99.05
		44.17 $\pm$ 3.08	53.26 $\pm$ 2.68	2.54 $\pm$ 1.70	97.63 $\pm$ 1.91
MT 5mg/l	10,025	47.37	49.12	3.51	100
		36.67	61.67	1.67	98.18
		48.33	48.33	3.33	98.08
		44.12 $\pm$ 3.74	53.04 $\pm$ 7.48	2.84 $\pm$ 1.01	98.75 $\pm$ 1.08

หมายเหตุ: Control- คือไข่ปลาที่เก็บไว้ในถาดฟักไข่ของโรงเพาะฟักที่ศูนย์โสมฟาร์ม

ในการทดลองครั้งที่ 3 ได้ใช้ไข่ปลาพื้นเมืองจากภาค F4 พบว่า ชุดการทดลองที่ได้ลูกปลาเพศผู้สูงที่สุดคือ ชุดการทดลองที่ใส่ไข่ปลาในสารละลาย MT ที่ความหนาแน่นของไข่ต่ำที่สุดคือ 4,980 ฟอง/ลิตร ที่ได้ลูกปลาเพศผู้ $63.45 \pm 19.88\%$ ในขณะที่ชุดการทดลองที่เป็น control + และ control - ได้ลูกปลาเพศผู้ 55.16 ± 9.22 และ 48.28% ตามลำดับ ส่วนชุดการทดลองอื่นที่ใส่ไข่ในสารละลาย MT ที่ความหนาแน่น 9,970, 19,930 และ 9,965 ฟอง/ลิตร ได้ลูกปลาเพศผู้เป็น 54.34 ± 10 , 52.68 ± 7.636 และ $54.91 \pm 1.31\%$ ตามลำดับ (ตารางที่ 1.6) เมื่อนำปริมาณเพศผู้ที่ได้จากการทดลองครั้งที่ 3 นี้ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ พบว่า ปริมาณลูกปลาเพศผู้ของทุกชุดการทดลองมีค่าที่ใกล้เคียงกันโดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ แสดงว่าการใส่ไข่ปลาในสารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร ที่ความหนาแน่น 4,980 – 19,930 ฟอง/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการแปลงเพศลูกปลาแต่อย่างใด

ตารางที่ 1.6 ผลการการทดลองแปลงเพศ ครั้งที่ 3 ทำการเปรียบเทียบความหนาแน่น

ในถาดขนาดเด็กปริมาตร 100-200 มิลลิเมตร ใส่ไข่ปลาพื้นเมือง (mean $\pm$ SD)

ชุดการทดลอง	ความหนาแน่น (ฟอง/ลิตร)	เพศผู้ (%)	เพศเมีย (%)	ผู้+เมีย (%)	อัตรารอด (%)
Control -	-	48.28	51.72	0	90.74
Alcohol (Control +)	19,930	45.76 67.86 53.57 53.45	54.24 32.14 44.64 43.10	0 0 1.79 3.45	97.27 99.99 93.40 93.40
เฉลี่ย		55.16 $\pm$ 9.22	48.02 $\pm$ 7.94	1.31 $\pm$ 1.66	96.01 $\pm$ 1.61
MT 5mg/l	4,980	67.24 46.55 90.00 50.00	32.76 50.00 8.33 46.43	0 3.45 1.67 3.57	94.50 95.33 100 96.36
เฉลี่ย		63.45 $\pm$ 19.88	34.38 $\pm$ 18.89	2.17 $\pm$ 1.69	96.55 $\pm$ 1.21
MT 5mg/l	9,970	55.36 63.79 43.86 *	41.07 32.76 50.88 *	3.57 3.45 5.26 *	92.73 96.36 92.79 *
เฉลี่ย		54.34 $\pm$ 10.0	41.57 $\pm$ 9.07	4.09 $\pm$ 1.01	93.96 $\pm$ 1.20
MT 5mg/l	19,930	61.29 44.07 50.00 55.36	38.71 54.24 50.00 44.64	0 1.69 0 0	93.64 96.26 99.09 95.45
เฉลี่ย		52.68 $\pm$ 7.36	46.90 $\pm$ 6.72	0.42 $\pm$ 0.85	96.11 $\pm$ 2.27
MT 5mg/l	9,965	55.00 56.67 53.57 54.38	38.33 43.33 44.64 42.11	6.67 0 1.79 3.51	94.44 94.50 97.96 96.36
เฉลี่ย		54.91 $\pm$ 1.31	42.10 $\pm$ 2.72	2.99 $\pm$ 2.84	95.82 $\pm$ 1.69

หมายเหตุ : Control - คือไข่ปลาที่เก็บไว้ในถาดฟักไข่ของโรงเพาะฟักของบุญโฮมฟาร์ม; * = ข้อมูลสูญหาย

วิจารณ์ผล

การทดลองหาความหนาแน่นของไข่ปลานิลที่เหมาะสม ในการแปลงเพศโดยวิธีแช่ไข่ ได้ทำการทดลองถึง 3 ครั้ง โดยครั้งแรกได้ทำการทดลองในเชิงการค้า โดยทำการทดลองในถาดขนาดใหญ่บรรจุสารละลาย 2 ลิตร ใส่ไข่ปลานิล 17,050 ฟอง ส่วนการทดลองครั้งที่ 2 และ 3 ได้ทำการทดลองในถาดขนาดเล็ก ที่บรรจุสารละลายปริมาตร 100-200 มิลลิลิตร ทำการแช่ไข่ปลานิลถาดละ 498 – 2,005 ฟอง คิดเป็นความหนาแน่น 4,980 – 20,050 ฟอง/ลิตร ใช้ความเข้มข้นของ MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง เท่ากัน พบว่าวิธีการแช่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนเพศลูกปลานิลแต่อย่างใด

ข้าพเจ้าได้นำผลการทดลองเสนอคณะกรรมการติดตามผล ที่มาเยี่ยมชมการปฏิบัติงานของโครงการฯ ที่มหาวิทยาลัยขอนแก่นในวันที่ 22 พฤษภาคม 2545 เพื่อขอคำปรึกษา คณะกรรมการฯ ได้ซักถามและให้ข้อเสนอแนะว่า การวิเคราะห์หาปริมาณของฮอร์โมนในสารละลายว่ามีอยู่เท่าใดในแต่ละระยะเวลาการทดลอง จะทำให้สามารถตอบได้ว่าฮอร์โมนที่เตรียมใส่ไว้ในสารละลายแช่ไข่ปลานิล อยู่ได้นานเพียงใด ไม่ว่าความเข้มข้นของฮอร์โมนจะลดลงจากการสลายตัวของฮอร์โมนตามธรรมชาติ หรือการถูกสิ่งสกปรกที่ไข่ปลาขับออกมาจับไว้ ทำให้ไม่มีโมเลกุลของฮอร์โมนอิสระที่จะซึมเข้าไปทำงานในไข่ปลา ส่งผลให้การทดลองล้มเหลว ถ้ายังไม่สามารถทำการวิเคราะห์หาความเข้มข้นของสารละลายที่ต้องการได้ ควรทำการทดลองเปลี่ยนถ่ายสารละลายฮอร์โมนตามกำหนดระยะเวลาตลอดการแช่ 24 ชั่วโมง เพื่อเป็นการรักษาความเข้มข้นของฮอร์โมนในสารละลายให้คงที่ น่าที่จะทำให้การแปลงเพศโดยวิธีแช่มีประสิทธิภาพดีขึ้น คณะกรรมการฯ ให้งดการทดลองใช้ enhancer ไว้ก่อน โดยทำการทดลองเปลี่ยนถ่ายสารละลายฮอร์โมนหลายๆครั้งแทน

ภาคผนวกที่ 4.3

การทดลองแปลงเพศปลานิลโดยวิธีการแช่ ด้วยการเปลี่ยนสารละลายฮอร์โมนหลายครั้ง

คำนำ

จากการทดลองภาคสนาม พบว่าวิธีการแช่ที่ความหนาแน่น 4,980 – 20,050 ฟอง/ลิตร ไม่มีผลต่อการแปลงเพศปลานิลเชิงการค้า คณะกรรมการติดตามผลจึงแนะนำให้ข้าพเจ้าทำการเปลี่ยนถ่ายสารละลายฮอร์โมนหลายๆครั้ง ระหว่างการทดลองแช่แปลงเพศปลานิล เพื่อรักษาความเข้มข้นของฮอร์โมนให้อยู่ในระดับคงที่ตลอดระยะเวลาการทดลองแช่ โดยคาดหวังว่าจะทำให้สามารถแช่แปลงเพศปลานิลเชิงการค้าได้ดีขึ้น

วิธีการ

1. การเตรียมน้ำและไข่ปลาสำหรับการทดลอง ทำเหมือนกับภาคผนวกที่ 1
2. การเตรียมฮอร์โมน ซึ่ง 17α -methyltestosterone(Fluka) 0.250 กรัม (250 มิลลิกรัม) ละลายของแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ 25 มิลลิลิตร จะทำให้ได้สารละลาย stock MT ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ทำการเตรียม stock MT จำนวน 2 ขวด (2 ขวด X 25 มิลลิลิตร) ในการทดลองแต่ละครั้ง เก็บ stock MT ไว้ในกระติกแช่น้ำแข็ง เมื่อต้องการเริ่มทำการทดลองทุกครั้ง เตรียมสารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 11 ลิตร โดย ผสม stock MT มา 5.5 มิลลิลิตร เติมน้ำสะอาดที่เตรียมไว้ให้ได้จำนวน 11 ลิตร ในระหว่างการทดลองมีการเตรียมสารละลาย MT ครั้งละ 1-2 ลิตร เพื่อการเปลี่ยนสารละลาย ทำการเตรียมโดยผสม stock MT 0.5 – 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในน้ำสะอาดที่ตวงมา 1 – 2 ลิตร ทำการเตรียมสารละลายเมื่อถึงเวลาที่ต้องการใช้เท่านั้น
3. แผนการทดลอง ทำการทดลองเชิงการค้าในภาคพลาสติกขนาดใหญ่สามารถบรรจุสารละลายได้ 0.5-2 ลิตร ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 และ 2 ทำการทดลองที่ปริมาตร 1 ลิตร เพราะว่าเก็บไข่ได้น้อย ส่วนการทดลองครั้งที่ 3 เก็บไข่ได้มากจึงสามารถทำการทดลองที่ปริมาตร 2 ลิตร ใช้ภาคทดลองครั้งละ 6 ภาค ประกอบด้วย:

ภาคที่ 1: ไข่ปลานิล 100 กรัม+สารละลายแอลกอฮอล์ในน้ำ (0.5 มิลลิกรัม/ลิตร)

ไม่มีการเปลี่ยนสารละลายตลอดการแช่ 24 ชั่วโมง (control +)

ภาคที่ 2: ไข่ปลานิล 100 กรัม+สารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร

ไม่มีการเปลี่ยนสารละลายตลอดการแช่ 24 ชั่วโมง

ภาคที่ 3: ไข่ปลานิล 100 กรัม+ สารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร

เปลี่ยนสารละลายทุก 12 ชั่วโมง = มีการเปลี่ยนสารละลาย 1 ครั้ง/24 ชั่วโมง

ถาดที่ 4: ไข่ปลานิล 100 กรัม+ สารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร

เปลี่ยนสารละลายทุก 6 ชั่วโมง = มีการเปลี่ยนสารละลาย 3 ครั้ง/24 ชั่วโมง

ถาดที่ 5: ไข่ปลานิล 100 กรัม+ สารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร

เปลี่ยนสารละลายทุก 3 ชั่วโมง = มีการเปลี่ยนสารละลาย 7 ครั้ง/24 ชั่วโมง

ถาดที่ 6: ไข่ปลานิล 100 กรัม+ สารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร

เปลี่ยนสารละลายทุก 2 ชั่วโมง = มีการเปลี่ยนสารละลาย 11 ครั้ง/24 ชั่วโมง

ทำการแช่ไข่ปลานิลบนโต๊ะโยกที่ความเร็ว 26 – 38 รอบ/นาที เมื่อครบกำหนดการแช่ไข่ในสารละลาย 24 ชั่วโมง ทำการล้างไข่ปลาด้วยน้ำสะอาด 3-4 ครั้ง ย้ายไข่ปลาทุกถาดไปฟักในถาดอูมิเนียมที่มีน้ำไหลวนเหมือนภาคผนวกที่ 1 ทำการอนุบาลลูกปลาที่ฟักออกมาในถาดนี้จนลูกปลามีอายุประมาณ 17-20 วันหลังวางไข่ ก่อนที่จะทำการสุ่มลูกปลาถาดละ 150 ตัวนำกลับมาอนุบาลที่มหาวิทยาลัยขอนแก่นจนลูกปลามีอายุอย่างน้อย 2 เดือน จึงทำการตรวจเพศลูกปลาเหมือนภาคผนวกที่ 1

4. ผลการทดลอง

การทดลองแปลงเพศโดยวิธีแช่ด้วยการเปลี่ยนถ่ายสารละลายหลายครั้งนี้ ทำการทดลองเชิงการค้าในภาคสนามที่บุญโฮมฟาร์ม โดยใช้ถาดทดลองพลาสติกความจุ 1-2 ลิตร จำนวน 6 ถาด/ครั้ง ซึ่งแต่ละถาดมีความถี่ในการเปลี่ยนถ่ายสารละลายที่ไม่เหมือนกัน ทำให้การทดลองแต่ละชุดมีเพียง 1 ซ้ำเท่านั้น ดังนั้น ผู้วิจัยจึงทำการทดลองรวม 3 ครั้ง ไข่ปลานิลที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นไข่ปลานิลสายพันธุ์พื้นเมืองในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 แต่รวบรวมไข่ได้น้อย จึงต้องทำการทดลองที่ปริมาตรเพียง 1 ลิตรเท่านั้น ส่วนการทดลองครั้งที่ 3 นั้น มีไข่ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา 3 ปนประมาณ 60% รวบรวมไข่ได้มากพอที่จะทำการทดลองแช่ที่ปริมาตร 2 ลิตร ไข่ปลานิลที่รวบรวมได้มีไข่เสียปนอยู่ 14.24 – 42.49% ในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 ไข่ปลาส่วนมากเป็นไข่ปลาอายุ 2 วันหลังการผสมที่มีจำนวน 44.24 ± 7.18 และ $34.4 \pm 4.87\%$ ตามลำดับ ส่วนการทดลองครั้งที่ 3 นั้นถึงแม้จะรวบรวมไข่ได้มาก แต่มีไข่เสียสูงถึง $42.49 \pm 0.49\%$ รองลงมาคือ ไข่ปลาอายุ 3 ($22.53 \pm 7.54\%$), 2 ($13.48 \pm 0.5\%$), 4 ($11.19 \pm 9.8\%$) และ 1 ($10.32 \pm 3.09\%$) วันหลังการผสม (ตารางที่ 2.1)

ตารางที่ 2.1 ส่วนประกอบของไขปลานิลที่ใช้ในการทดลองเปลี่ยนสารละลายหลายครั้ง

การทดลอง ครั้งที่	สายพันธุ์ ปลานิล	ส่วนประกอบไขปลานิล (%)				
		อายุ 1 วัน	อายุ 2 วัน	อายุ 3 วัน	อายุ 4 วัน	ไข่เสีย
1	พื้นเมือง	23.62±6.54	44.24±7.18	4.52±4.66	0.62±0.29	27.0±8.62
2	พื้นเมือง	31.29±3.57	34.4±4.87	20.07±1.74	0	14.24±0.92
3	ปนจิตรลดา 3 60%	10.32±3.09	13.48±0.50	22.53±7.54	11.19±9.8	42.49±0.49
เฉลี่ย		21.74±10.61	30.71±15.71	15.71±9.77	3.94±6.29	27.91±14.15

ตารางที่ 2.2 อุณหภูมิของสารละลายและความเร็วของไค้ะ โยกที่ใช้ประกอบการแช่แปลงเพศ ปลานิลและวันที่ทำการสูบลูกปลาลำเลียงกลับมาอนุบาลที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การทดลอง ครั้งที่	ความหนาแน่น ของไขปลา (ฟอง/ลิตร)	อุณหภูมิ สารละลาย (⁰ ซ)	ความเร็วของ ไค้ะ โยก (รอบ/นาที่)	วันที่ลำเลียงลูกปลา กลับ ม.ข. (วันหลังการผสม)
1	18,335	25-30	38-40	27
2	18,667	24-29	25-26	22
3	17,867	24-30	26-28	21

การทดลองแช่สารละลายแปลงเพศปลานิลทั้ง 3 ครั้งนี้ สารละลายที่ใช้ระหว่างการทดลองจะถูกเปลี่ยนตามแผนการทดลองที่วางไว้ อย่างไรก็ตามไค้ะ โยกที่ใช้ในการแช่ทั้ง 3 ครั้ง มีอุณหภูมิอยู่ในช่วงที่ใกล้เคียงกัน คือ 24-30 องศาเซลเซียส(ตารางที่ 2.2) ส่วนความเร็วของไค้ะ โยกที่ใช้ประกอบการแช่สารละลายฮอร์โมนนี้ การทดลองครั้งที่ 1 ไค้ะ โยกมีความเร็วสูงมากคือ 38-40 รอบ/นาที่ เพราะวามอเตอร์ตัวที่เคยใช้ (ความเร็ว 18-24 รอบ/นาที่) มีปัญหาการทำงานไม่สม่ำเสมอ จึงเปลี่ยนตัวใหม่ ทำให้มีความเร็วสูงขึ้นมาก ในการทดลองครั้งที่ 2 และ 3 ได้ใช้ตัวด้านทานควบคุมปริมาณไฟฟ้า ทำให้ความเร็วรอบลดลงเหลือ 25-28 รอบ/นาที่ (ตารางที่ 2.2)

สภาพของสารละลายระหว่างการแช่แปลงเพศปลาไนล์เมื่อเริ่มทำการทดลอง (ชั่วโมงที่ 0) สารละลายทุกถาดทดลองมีสภาพใสสะอาด ดังรูปที่ 1 เมื่อทำการทดลองนาน 6, 12 และ 24 ชั่วโมง สภาพของสารละลายมีความขุ่นมากขึ้นตามระยะเวลาที่ทดลอง (รูปที่ 2, 3 และ 4) โดยถาดที่ทำการเปลี่ยนสารละลายทุก 24 ชั่วโมงในชุดการทดลองที่แช่สารละลาย MT และ control + มีความขุ่นมากที่สุด ถัดมาคือถาดแช่สารละลาย MT ที่เปลี่ยนสารละลายทุก 12, 6, 3 และ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังรูปที่ 4

ถาดทดลองที่เปลี่ยนสารละลายทุก 2 และ 3 ชั่วโมง มีสภาพที่ค่อนข้างใสอยู่เสมอตลอดระยะเวลาแช่ 24 ชั่วโมง ส่วนสารละลายที่เปลี่ยนทุก 6 ชั่วโมง มีสีของสารละลายเป็นสีขาวขุ่น ที่ขุ่นมากขึ้นในถาดที่ทำการเปลี่ยนทุก 12 ชั่วโมง ส่วนถาดที่ไม่มีการเปลี่ยนสารละลายระหว่างการแช่เลยจะมีสีเหลืองก้ำเฟี้ยน ประกอบกับการทดลองครั้งที่ 1 และ 3 มีไข่เสียจำนวนมากคือ 27 ± 8.62 และ $42.49 \pm 0.49\%$ ส่งผลให้ไข่ปลาในถาดที่ไม่มีการเปลี่ยนสารละลาย (24 ชั่วโมง) ของชุดควบคุม control + และสารละลาย MT ของการทดลองครั้งที่ 1 และ 3 คายหมด นอกจากนี้ไข่ปลาที่แช่ MT ที่เปลี่ยนสารละลายทุก 12 ชั่วโมง ก็ตายทั้งหมดเช่นกัน



รูปที่ 1 สภาพของสารละลายในถาดแช่แปลงเพศเมื่อเริ่มทำการทดลอง (ชั่วโมง 0)



รูปที่ 2 ภาพของสารละลายในถาดแช่แข็งเพศชั่วโมงที่ 6



รูปที่ 3 : สภาพของสารละลายในถาดแช่แปลงเพศชั่วโมงที่ 12



รูปที่ 4 สภาพของสารละลายในภาชนะทดลองเพศชั่วโมงที่ 24

ปริมาณลูกปลาเพศผู้ในการทดลองครั้ง 1, 2 และ 3 ปรากฏในตารางที่ 3, 4 และ 5 ตามลำดับ การทดลองครั้งที่ 1 ถาดที่ไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำระหว่างการแช่ 24 ชั่วโมง (control+ และ MT ทุก 24 ชั่วโมง) พบว่าไข่เสียทั้งหมด ถาดที่มีการเปลี่ยนสารละลาย MT ทุก 2 ชั่วโมง มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้สูงที่สุดคือ 50.23% รองลงมาคือการเปลี่ยนสารละลายทุก 6, 12 และ 3 ชั่วโมง มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 33.33, 25 และ 22.77% ในขณะที่ชุด control- ที่เป็นไข่ปลาชุดเดียวกันแต่ฟักอยู่ในระบบของบุญโฮมฟาร์ม มีเพศผู้ 38% (ตารางที่ 2.3)

ตารางที่ 2.3 ปริมาณลูกปลาเพศผู้ที่ได้จากการทดลองแช่แปลงเพศด้วยการเปลี่ยนสารละลายครั้งที่ 1

การเปลี่ยนสาร ละลาย	เพศผู้ (%)	เพศเมีย (%)	ผู้ + เมีย (%)	อัตราการรอดตาย (%)
Control -	38.00	62.00	0.0	73.33
Control +	*	*	*	*
MT ทุก 2 ชม.	50.23	49.77	0.0	40.69
MT ทุก 3 ชม.	22.77	75.24	2.0	63.33
MT ทุก 6 ชม.	33.33	60.00	6.7	20.00
MT ทุก 12 ชม.	25.00	75.00	0.0	86.03
MT ทุก 24 ชม.	*	*	*	*

หมายเหตุ: control- คือ ไข่ปลาชุดเดียวกันแต่อยู่ในระบบฟักไข่ของฟาร์มฯ

control+ คือ ไข่ปลาชุดเดียวกันที่อยู่บนโต๊ะโยก ใส่แอลกอฮอล์ 0.5 ml/l

* หมายความว่าไข่เสียหมดหลังการแช่ครบ 24 ชั่วโมง

การทดลองครั้งที่ ๖ ถาดที่ให้เพศผู้สูงสุดคือถาดที่แซ่สารละลาย MT นาน 24 ชั่วโมงโดยไม่มีมีการเปลี่ยนถ่ายสารละลายเลย มีเพศผู้ 57.65% รองลงมาคือถาดที่แซ่สารละลาย MT ที่เปลี่ยนสารละลาย ทุก 3 (44.27%), 2(39%), control+ (38.15%), 12 (31.59%) และ 6 (25.31%) ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนชุด control- นั้นมีเพศผู้ 48.75% (ตารางที่ 2.4)

ตารางที่ 2.4 ปริมาณลูกปลาเพศผู้ที่ได้จากการทดลองแซ่แปลงเพศด้วยการเปลี่ยนสารละลาย ครั้งที่ 2

การเปลี่ยนสาร ละลาย	เพศผู้ (%)	เพศเมีย (%)	ผู้ + เมีย (%)	อัตราการตาย (%)
Control -	48.75	50.75	0.50	69.34
Control +	38.15	61.85	0.00	80.65
MT ทุก 2 ชม.	39.00	53.00	8.00	69.00
MT ทุก 3 ชม.	44.27	55.73	0.00	43.00
MT ทุก 6 ชม.	25.31	72.22	2.04	68.00
MT ทุก 12 ชม.	31.59	66.34	2.09	50.02
MT ทุก 24 ชม.	57.65	41.35	1.00	75.38

หมายเหตุ: control- คือ ไข่ปลาชุดเดียวกันแต่อยู่ในระบบฟักไข่ของฟาร์มฯ

control+ คือ ไข่ปลาชุดเดียวกันที่อยู่บนโต๊ะโยก ใส่แอลกอฮอล์ 0.5 ml/l

* หมายความว่าไข่เสียหายหมดหลังการแซ่ครบ 24 ชั่วโมง

การทดลองครั้งที่ 3 พบว่าถาดทดลองที่ไม่มีการเปลี่ยนสารละลายระหว่างการทดลองแซ่ คือ ถาด control+ และ ถาดแซ่สารละลาย MT ทุก 24 ชั่วโมง รวมทั้งถาดทดลองที่แซ่สารละลาย MT ทุก 12 ชั่วโมง มีผลทำให้ไข่ตายหลังการแซ่ เพราะว่าไข่ปลาชุดนี้มีไข่เสียสูงมากถึง 42.49% และมีไข่อายุ 4 วันหลังการผสมปนอยู่ถึง 11.19% ทั้งไข่เสียและไข่อายุ 4 วันนี้ มักจะแตกระหว่างการแซ่สารละลาย MT เป็นผลให้สารละลายเปลี่ยนเป็นสีเหลืองกาแฟเข้ม (รูปที่ 2) สารละลายที่ใช้แซ่ไข่ปลาสกปรกมาก ส่งผลให้ไข่ที่ไม่ฟักตายตามไปด้วย นอกจากนี้ลูกปลาที่อนุบาลในถาดอคูมิเนียมก่อนย้ายกลับมหาวิทยาลัยขอนแก่นเริ่มปรากฏอาการโรคคือ ลอยขึ้นมาตายที่ผิวน้ำ ทำให้ต้องรีบสุมย้ายลูกปลากลับไปอนุบาลที่มหาวิทยาลัยขอนแก่น เป็นผลทำให้ลูกปลามีอัตราการรอดตายต่ำกว่าการทดลองอื่น คือ 34.34 ถึง 80.67% เมื่อทำการตรวจเพศปลาพบว่า ถาดทดลองที่เปลี่ยนสารละลาย MT ทุก 3, 6 และ 12 ชั่วโมง ได้เพศผู้ 39.59, 35.54 และ 33.54% ตามลำดับ ในขณะที่ชุด control- ได้เพศผู้ 29.92% เท่านั้น (ตารางที่ 2.5)

ตารางที่ 2.5 ปริมาณลูกปลาเพศผู้ที่ได้จากการทดลองแซ่แปลงเพศด้วยการเปลี่ยนสารละลายครั้งที่ 3

การเปลี่ยนสารละลาย	เพศผู้ (%)	เพศเมีย (%)	ผู้ + เมีย (%)	อัตราการรอดตาย (%)
Control -	29.92	67.91	2.18	34.34
Control +	*	*	*	*
MT ทุก 2 ชม.	33.54	61.69	4.79	55.00
MT ทุก 3 ชม.	39.59	56.96	3.46	80.67
MT ทุก 6 ชม.	35.54	61.95	2.52	51.00
MT ทุก 12 ชม.	*	*	*	*
MT ทุก 24 ชม.	*	*	*	*

หมายเหตุ: control- คือ ไข่ปลาชุดเดียวกันแต่อยู่ในระบบฟักไข่ของฟาร์มฯ

control+ คือ ไข่ปลาชุดเดียวกันที่อยู่บนโต๊ะโยก ใส่แอลกอฮอล์ 0.5 ml/l

* หมายความว่าไข่เสียหมดหลังการแซ่ครบ 24 ชั่วโมง

ผลการทดลองที่ได้จากการเปลี่ยนสารละลายแช่แปลงเพศปลาไนหลายครั้งนี้ ถึงแม้จะทำการทดลองถึง 3 ครั้ง เพื่อป้องกันความผิดพลาดและต้องการแสดงความถูกต้องของข้อมูล ผลการทดลองที่ได้จากการทดลองครั้งที่ 1 และ 3 แม้จะมีไข่มาก แต่ให้ผลในทางเดียวกันคือ การเปลี่ยนสารละลายแช่ MT ทุก 2 และ 3 ชั่วโมง มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 50.23 และ 39.59% สูงกว่าชุดการทดลองอื่นรวมทั้ง control - ที่ได้เพศผู้ 38 และ 29.92% ตามลำดับ ส่วนการทดลองครั้งที่ 2 แสดงผลในทางตรงข้ามกับแนวความคิดที่วางไว้ คือการเปลี่ยนสารละลาย MT ทุก 24 ชั่วโมง (ไม่มีการเปลี่ยนสารละลายระหว่างแช่) ได้เพศผู้สูงสุดคือ 57.65% สูงกว่าชุด control- ที่ได้เพศผู้ 48.75% ส่วนการเปลี่ยนสารละลาย MT ทุก 12, 6, 3 และ 2 ชั่วโมง ได้รับสารละลาย MT เป็น 2, 4, 8 และ 12 เท่าของถาดที่เปลี่ยนสารละลาย MT ทุก 24 ชั่วโมง ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ 31.59, 25.31, 44.27, และ 39% ตามลำดับ แสดงว่าไขปลาไนที่แช่ในถาดที่เปลี่ยนสารละลาย MT บ่อยครั้ง อาจได้รับฮอร์โมนมากเกินไปจนส่งผลเชิงลบ (paradox) แต่อย่างไรก็ดี ผลการทดลองครั้งที่ 2 นี้ ขัดแย้งกับผลการทดลองครั้งที่ 1 และ 3 ที่การแช่ไขในถาดที่เปลี่ยนสารละลาย MT บ่อยครั้งมีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้สูงกว่าชุดการทดลองอื่น

ข้าพเจ้าได้นำผลการทดลองนี้ปรึกษากับ ดร.วงศ์ปฐม ผอ.วัฒนะ และนายณฤพล สุขุมาสวิน ที่กรมประมง เมื่อวันที่ 27 กันยายน 2545 สรุปข้อเสนอแนะดังนี้

1. sampling error ดร.วงศ์ปฐมแนะนำให้การสุ่มลูกปลาเพื่อการตรวจเพศนั้นผู้ละ 50 ตัว อาจจะน้อยไป ควรทำการสุ่มให้มากขึ้นอาจจะต้องสุ่มถึง 500 ตัวต่อชุดการทดลอง โดยเก็บปลาทดลองทั้งหมด ไม่ใช้วิธีสุ่มแบบที่เคยทำมา
2. 17 α methyltestosterone ที่ใช้ในการทดลองเก่าไปหรือไม่ ควรมีการตรวจวัดสารละลายที่เตรียมว่ามีฮอร์โมนตามที่ต้องการหรือไม่
3. คณะกรรมการแนะนำให้ทำการทดลองที่ศูนย์พัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น โดยเตรียมสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/ลิตร จำนวน 2 ถาด ใส่ไขปลาไนลงแช่ที่ความหนาแน่น 20,000 ฟอง/ลิตร จำนวน 1 ถาด ส่วนถาดที่ 2 ไม่ต้องใส่ไขปลา ทำการสุ่มตัวอย่างสารละลายที่เวลา 0, 15, 30, 60 นาที, 2, 3, 6, 12 และ 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วย RIA หาระดับ testosterone ที่มีในสารละลายตัวอย่าง