

## บทที่ 3

### วิธีการวิจัย

#### 3.1 วิธีการวิจัย

การศึกษาการเจริญเติบโตและลักษณะสำคัญทางการสืบพันธุ์ของปลาเรนโบว์เทราต์กลุ่มประชากรภูฏานและกลุ่มประชากรอินทนนท์เดิม (F7) แบ่งออกเป็น 2 ระยะ ดังนี้ ระยะที่ 1 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของปลาเรนโบว์เทราต์สองกลุ่มประชากร และระยะที่ 2 การเลี้ยงปลาเรนโบว์เทราต์เพศผู้และเพศเมียสองกลุ่มประชากรในห้องควบคุมอุณหภูมิน้ำและช่วงแสง สำหรับการเตรียมการเพาะพันธุ์ โดยดำเนินการดังนี้

##### 1. ระยะที่ 1 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของปลาเรนโบว์เทราต์ 2 กลุ่มประชากร

1.1 ศึกษาเปรียบเทียบและคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ปลาเรนโบว์เทราต์ 2 กลุ่มประชากร ได้แก่ กลุ่มประชากรภูฏานและกลุ่มประชากรอินทนนท์เดิม (F7) กลุ่มประชากรละ 3 บ่อ ๆ ละ 48 ตัว รวมจำนวน 288 ตัว ปลาทดลองสองกลุ่มประชากรปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย มีน้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นและความยาวเฉลี่ยเริ่มต้น ดังนี้ น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ  $750.76 \pm 93.72$ ,  $758.53 \pm 54.28$  และ  $742.25 \pm 27.82$ ,  $788.43 \pm 33.11$  กรัม ความยาวเฉลี่ยเริ่มต้นเท่ากับ  $37.22 \pm 0.24$ ,  $38.69 \pm 1.46$  และ  $37.56 \pm 0.31$ ,  $39.99 \pm 0.35$  เซนติเมตร ตามลำดับ

##### 1.2 บ่อทดลอง

บ่อคอนกรีตขนาด  $2.25 \times 7.80$  เมตร ระดับน้ำลึก 0.6 เมตร แต่ละบ่อมีปริมาตรน้ำไหลเข้าบ่อ 360 ลิตรต่อนาที เลี้ยงปลาทดลองในบ่อคอนกรีตน้ำไหลผ่านตลอด จำนวน 6 บ่อ กลุ่มประชากรละ 3 บ่อ

##### 1.3 อาหารและการให้อาหาร

ให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำระดับโปรตีนไม่น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ระดับไขมันไม่น้อยกว่า 7 เปอร์เซ็นต์ ผสมน้ำมันปลา 5 เปอร์เซ็นต์ สไปรูไลน่า 1 เปอร์เซ็นต์ และแอสตาแซนทีน 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ให้อาหารปลาเพศผู้และเพศเมียในอัตรา 1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวันทุกวัน เป็นระยะเวลา 5 เดือน หลังจากนั้นลดปริมาณอาหารลง ให้ในอัตรา 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน จำนวน 3 วันต่อสัปดาห์ ระยะเวลา 3 เดือน และหลังจากนำพันธุ์ปลาทดลองเข้าบ่อในห้องควบคุมอุณหภูมิ น้ำลดอุณหภูมิน้ำลงได้ระหว่าง 10-12 องศาเซลเซียส แล้วจึงปรับปริมาณอาหารปลาทดลองในอัตรา 0.25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน จำนวนสัปดาห์ละครั้ง (ตารางที่ 2)

**ตารางที่ 2** ปริมาณการให้อาหาร (เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน) ในการเลี้ยงปลากลุ่มประชากร  
ภูฏานและกลุ่มประชากรอินทนนท์เดิม (F7) เพื่อเป็นพ่อแม่พันธุ์ ปี 2563

| เดือน                   | ปริมาณการให้อาหาร<br>(เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน) | จำนวนวันของการให้อาหาร |
|-------------------------|-------------------------------------------------------|------------------------|
| มกราคม – พฤษภาคม 2563   | 1.00                                                  | ทุกวัน                 |
| มิถุนายน – สิงหาคม 2563 | 0.50                                                  | 3 วันต่อสัปดาห์        |
| กันยายน – ธันวาคม 2563  | 0.25                                                  | สัปดาห์ละครั้ง         |

หมายเหตุ 1) เริ่มนำพ่อแม่พันธุ์เข้าห้องควบคุมอุณหภูมิน้ำต่ำกว่า 12 °C ในวันที่ 15 สิงหาคม 2563

2) ช่วงการเพาะพันธุ์คอดอาหาร (เดือนธันวาคม 2563 – กุมภาพันธ์ 2564)

#### 1.4 เก็บข้อมูลการทดลอง

สุ่มชั่งน้ำหนักและวัดความยาวพ่อแม่พันธุ์ปลาจำนวนบ่อละ 10 ตัว (ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์) ของจำนวนปลาในบ่อแต่ละบ่อ ทุก 2 เดือนต่อครั้ง เมื่อสิ้นสุดการศึกษาการเจริญเติบโต  
ชั่งน้ำหนักและวัดความยาวปลาทุกตัว พร้อมทั้งคัดเลือกปลาเพศผู้และเพศเมียเข้าเลี้ยงในบ่อควบคุม  
อุณหภูมิและช่วงแสงในเดือนสิงหาคม 2563

#### 1.5 วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล

##### 1.5.1 น้ำหนักเฉลี่ย (กรัมต่อตัว)

$$= \frac{\text{น้ำหนักรวมของปลาที่นำมาชั่งน้ำหนัก}}{\text{จำนวนปลาที่นำมาชั่งน้ำหนัก}}$$

##### 1.5.2 น้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน (กรัมต่อวัน)

$$= \frac{(LnWi - LnWo)}{T}$$

Wi = น้ำหนักเฉลี่ยของปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

Wo = น้ำหนักเฉลี่ยของปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

T = จำนวนวันที่เลี้ยงปลา

1.5.3 อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย (Specific Growth Rate, SGR ;  
เปอร์เซ็นต์ต่อวัน)

$$= \frac{(LnWi - LnWo)}{T} \times 100$$

Wi = น้ำหนักเฉลี่ยของปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

Wo = น้ำหนักเฉลี่ยของปลาเมื่อเริ่มต้นการทดลอง

T = จำนวนวันที่เลี้ยงปลา

##### 1.5.4 อัตรารอดตายของปลา (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือ}}{\text{จำนวนปลาที่เริ่มต้น}} \times 100$$

นำข้อมูลน้ำหนักเฉลี่ย ความยาวเฉลี่ย น้ำหนักเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะเฉลี่ย และอัตราการตาย มาวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองโดยวิธี T-test ใช้โปรแกรมทางสถิติ Sirichai statistic v.6 on windows

#### 1.6 บันทึกข้อมูลผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

1.6.1 อุณหภูมิ (Water Temperature) มีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส ( $^{\circ}\text{C}$ ) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) ใช้เครื่องมือวัดออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ยี่ห้อ YSI รุ่น Pro 20i ทุกวันเวลา 09.00 น.

1.6.2 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ใช้เครื่องมือวัดยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น pH F20 วิเคราะห์ทุกสัปดาห์ ๑ ครั้ง

1.6.3 ความเป็นด่าง (Alkalinity) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตรของแคลเซียมคาร์บอเนต (mg/L as  $\text{CaCO}_3$ ) ใช้วิธีไตเตรท ตามวิธีกล่าวอ้างโดยไมตรีและจรรวรณ์ (2528) วิเคราะห์สัปดาห์ละครั้ง

1.6.4 ความกระด้าง (Hardness) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตรของแคลเซียมคาร์บอเนต (mg/L as  $\text{CaCO}_3$ ) ใช้วิธีไตเตรท ตามวิธีกล่าวอ้างโดยไมตรีและจรรวรณ์ (2528) วิเคราะห์สัปดาห์ละครั้ง

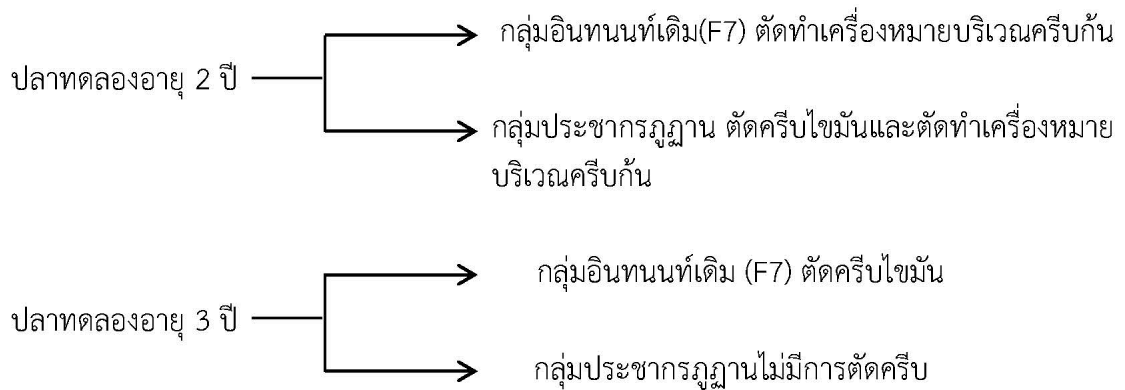
1.6.5 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อิสระในน้ำ (Free carbondioxide) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) ใช้วิธีไตเตรท ตามวิธีกล่าวอ้างโดยไมตรีและจรรวรณ์ (2528) วิเคราะห์สัปดาห์ละครั้ง

1.6.6 ปริมาณแอมโมเนียรวม (Total ammonia) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/L) วัดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์แอมโมเนีย ยี่ห้อ HANNA รุ่น HI 96715 วิเคราะห์สัปดาห์ละครั้ง

### 2. ระยะที่ 2 การเลี้ยงปลาเรนโบว์เทราต์เพศผู้และเพศเมียสองกลุ่มประชากรในห้องควบคุมอุณหภูมิและช่วงแสง

2.1 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและความสมบูรณ์เพศปลาเรนโบว์เทราต์กลุ่มประชากรภูฏานและกลุ่มประชากรอินทนนท์เดิม (F7) อายุ 2 และ 3 ปี โดยปลาอายุ 2 ปี กลุ่มประชากรภูฏาน มีปลาเพศผู้จำนวน 14 ตัว และเพศเมียจำนวน 19 ตัว กลุ่มประชากรอินทนนท์เดิม (F7) ปลาเพศผู้จำนวน 13 ตัว และปลาเพศเมียจำนวน 11 ตัว ปลาอายุ 3 ปี กลุ่มประชากรภูฏาน มีปลาเพศผู้จำนวน 44 ตัวและปลาเพศเมียจำนวน 44 ตัว กลุ่มประชากรอินทนนท์เดิม (F7) ปลาเพศผู้จำนวน 37 ตัว และปลาเพศเมียจำนวน 31 ตัว รวมปลาทั้งสิ้น 213 ตัว ทำเครื่องหมายด้วยวิธีการตัดครีบบปลาเพื่อความแตกต่างของกลุ่มประชากรตามผัง และนำปลาลงบ่อเลี้ยงบ่อเดียวกันในบ่อที่ควบคุมอุณหภูมิไม่เกิน 12 องศาเซลเซียส ขนาดความจุ 17.63 ลูกบาศก์เมตร ตั้งแต่วันที่ 15 สิงหาคม 2563 เพื่อดำเนินการเพาะพันธุ์ในเดือนธันวาคม 2563





การทำเครื่องหมายเพื่อแสดงความแตกต่างของกลุ่มตัวอย่างโดยวิธีการตัดครีบปลาทดลอง



ภาพที่ 1 ตำแหน่งการตัดครีบไขมัน และครีบกัน

## 2.2 บ่อทดลอง

- บ่อคอนกรีตควบคุมอุณหภูมิและช่วงแสง มีขนาด 3.80 x 5.80 เมตร ระดับน้ำลึก 0.8 เมตร คิดเป็นปริมาตรน้ำ 17.63 ลูกบาศก์เมตร บ่อเลี้ยงอยู่ในห้องที่สามารถควบคุมช่วงแสงได้ เติมน้ำที่ฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลีน 100 ppm เข้าสู่ระบบ และมีเครื่องสูบน้ำขนาด 1 นิ้ว สูบน้ำผ่านระบบกรองทราย คาร์บอน และผ่านระบบฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (UV) หมุนเวียนเข้าบ่อ เติมน้ำใหม่เข้าสู่ระบบปริมาตร 3 ลิตรต่อนาที ลดอุณหภูมิลงโดยเครื่องทำความเย็น และควบคุมให้อุณหภูมิน้ำอยู่ที่ 10-12 องศาเซลเซียส ตลอดการทดลอง ภายในบ่อเพิ่มอากาศผ่านหัวทราย จำนวน 60 หัว เพื่อรักษาระดับออกซิเจนที่ละลายในน้ำไม่ต่ำกว่า 6 ppm

- การควบคุมช่วงแสงในบ่อทดลอง ใช้หลอดนีออนขนาด 20 วัตต์ จำนวน 8 หลอด เปิด-ปิดไฟอัตโนมัติด้วยเครื่องตั้งเวลา เพื่อให้เกิดแสงสว่าง (ตารางที่ 3)

**ตารางที่ 3** ช่วงแสงของบ่อทดลองเลี้ยงพันธุ์ปลาเรนโบว์เทราต์ในห้องควบคุมอุณหภูมิน้ำและช่วงแสง ตั้งแต่เดือนสิงหาคมถึงเดือนธันวาคม 2563

| เดือน              | ช่วงแสง               |                         | หมายเหตุ                                                                                                                                                                            |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|                    | มืด<br>(ชั่วโมง:นาที) | สว่าง<br>(ชั่วโมง:นาที) |                                                                                                                                                                                     |
| สิงหาคม            | 12:00                 | 12:00                   | ในวันที่ 15 สิงหาคม 2563 นำปลาเพศผู้และเพศเมียเข้าเลี้ยงในบ่อทดลองในห้องควบคุมช่วงแสงและเริ่มลดอุณหภูมิของน้ำให้ได้ไม่เกิน 12 °C ใช้เวลาปรับอุณหภูมิน้ำและลดช่วงแสงประมาณ 2 สัปดาห์ |
| กันยายน            | 11:00                 | 13:00                   |                                                                                                                                                                                     |
| ตุลาคม             | 13:00                 | 11:00                   |                                                                                                                                                                                     |
| พฤศจิกายน          | 15:00                 | 9:00                    |                                                                                                                                                                                     |
| ธันวาคม-กุมภาพันธ์ | 16:00                 | 8:00                    | เริ่มฤดูกาลเพาะพันธุ์                                                                                                                                                               |

### 2.3 อาหารและการให้อาหารปลาทดลอง

ให้อาหารสำเร็จรูปชนิดเม็ดลอยน้ำระดับโปรตีนไม่น้อยกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ระดับไขมันไม่น้อยกว่า 7 เปอร์เซ็นต์ ผสมน้ำมันปลา 5 เปอร์เซ็นต์ สไปรูไลนา 1 เปอร์เซ็นต์ และแอสตาแซนทิน 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอาหาร ให้อาหารผสมในอัตรา 0.25 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัวต่อวัน ให้อาหารสัปดาห์ละ 1 ครั้ง (ทุกวันพุธ) ก่อนการเพาะพันธุ์

2.4 ศึกษาความสมบูรณ์เพศของปลาเรนโบว์เทราต์ปลาเพศผู้และปลาเพศเมีย กลุ่มประชากรภูฏานและอินทนนท์อายุ 2 ปี และ 3 ปี ที่เลี้ยงในสภาพการเลี้ยงของดอยอินทนนท์ ประเทศไทย ประเมินความสมบูรณ์เพศโดยวิธีการเพาะพันธุ์ ซึ่งเริ่มหลังจากที่เลี้ยงพันธุ์ปลาในสภาพควบคุมอุณหภูมิน้ำไม่เกิน 12 องศาเซลเซียส ระยะเวลาไม่น้อยกว่า 2 เดือนครึ่ง สามารถตรวจสอบความสมบูรณ์เพศของปลา โดยสุ่มปลาเพศผู้กลุ่มละ 50% และปลาเพศเมียที่มีลักษณะท้องนูนดังนี้

#### 2.4.1 ปลาเพศเมียตรวจสอบด้วยการรีดไข่

สังเกตลักษณะไข่ ได้แก่ สีไข่ วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางไข่ ชั่งน้ำหนักไข่ และนับจำนวนไข่ต่อแม่ปลา

#### 2.4.2 ปลาเพศผู้ตรวจสอบด้วยการรีดน้ำเชื้อ

- ประเมินการเคลื่อนที่และระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนที่

นำตัวอย่างน้ำเชื้อทดสอบด้วยสารละลายเกลือผ่านการกรองด้วยกลองจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า สังเกตตัวสเปิร์ม มีส่วนหางสามารถว่ายน้ำเคลื่อนที่ได้ถือว่าปลาเพศผู้สมบูรณ์เพศ วางสไลด์บนกลองจุลทรรศน์ดูน้ำยากระตุ้นการเคลื่อนที่ของสเปิร์ม (0.45% NaCl) ปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนสไลด์ และดูดตัวอย่างน้ำเชื้อ 10 ไมโครลิตร หยดลงในตำแหน่งใกล้กับหยดน้ำยาจากนั้นใช้แท่งแก้วขนาดเล็กกลั่นน้ำยามาผสมน้ำเชื้อให้เข้ากัน ซึ่งเป็นการกระตุ้นให้สเปิร์มเคลื่อนที่แล้วจึงมองผ่านกลองจุลทรรศน์ประเมินการเคลื่อนที่โดยพิจารณาว่ามีสเปิร์มกี่เปอร์เซ็นต์

ที่มีการเคลื่อนที่แบ่งเป็นระดับ 6 ระดับ คือ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 เปอร์เซ็นต์ พร้อมทั้งเริ่มจับเวลาหน่วยเป็นวินาที นับตั้งแต่สเปิร์มเคลื่อนที่แข็งแรงจนกระทั่งเคลื่อนที่ช้าลง 75 เปอร์เซ็นต์

ระยะเวลาที่สเปิร์มเคลื่อนที่ = นับตั้งแต่สเปิร์มเริ่มเคลื่อนที่จนกระทั่งสเปิร์มเคลื่อนที่ช้าลง 75 เปอร์เซ็นต์

เมื่อพบว่าสเปิร์มมีการเคลื่อนที่ตั้งแต่ระดับ 5 ขึ้นไป (เคลื่อนที่ 80 เปอร์เซ็นต์) จึงถือว่าเป็นปลาเพศผู้ที่สมบูรณ์เพศ

## 2.5 บันทึกข้อมูลผลการวิเคราะห์คุณภาพน้ำ

2.5.1 อุณหภูมิ (Water temperature) มีหน่วยเป็นองศาเซลเซียส ( $^{\circ}\text{C}$ ) และปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (Dissolved oxygen) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) ใช้เครื่องมือวัดออกซิเจนที่ละลายในน้ำ ยี่ห้อ YSI รุ่น Pro 20i ทุก 3 ชั่วโมงในรอบวัน

2.5.2 ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ใช้เครื่องมือวัดยี่ห้อ METTLER TOLEDO รุ่น pH F20 วิเคราะห์สัปดาห์ละครั้ง

2.5.3 ความเป็นด่าง (Alkalinity) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตรของแคลเซียมคาร์บอเนต (mg/l as  $\text{CaCO}_3$ ) ใช้วิธีไตเตรท ตามวิธีกล่าวอ้างโดยไมตรีและจารุวรรณ (2528) วิเคราะห์สัปดาห์ละครั้ง

2.5.4 ความกระด้าง (Hardness) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตรของแคลเซียมคาร์บอเนต (mg/l as  $\text{CaCO}_3$ ) ใช้วิธีไตเตรท ตามวิธีกล่าวอ้างโดยไมตรีและจารุวรรณ (2528) วิเคราะห์สัปดาห์ละครั้ง

2.5.5 ปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์อิสระในน้ำ (Free carbondioxide) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) ใช้วิธีไตเตรท ตามวิธีกล่าวอ้างโดยไมตรีและจารุวรรณ (2528) วิเคราะห์สัปดาห์ละครั้ง

2.5.6 ปริมาณแอมโมเนียรวม (Total ammonia) มีหน่วยเป็นมิลลิกรัมต่อลิตร (mg/l) วัดโดยใช้เครื่องวิเคราะห์แอมโมเนีย ยี่ห้อ HANNA รุ่น HI 96715 วิเคราะห์สัปดาห์ละครั้ง

## 2.6 วิเคราะห์ข้อมูลและสรุปผล

ความสมบูรณ์เพศ

2.6.1 อัตราความสมบูรณ์เพศ(เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาทั้งหมดที่สมบูรณ์เพศ}}{\text{จำนวนปลาทั้งหมด}} \times 100$$

2.6.2 อัตราความสมบูรณ์เพศปลาเพศเมีย (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเพศเมียที่สมบูรณ์เพศ}}{\text{จำนวนปลาที่สมบูรณ์เพศทั้งหมด}} \times 100$$

2.6.3 อัตราความสมบูรณ์เพศปลาเพศผู้ (เปอร์เซ็นต์)

$$= \frac{\text{จำนวนปลาเพศผู้ที่สมบูรณ์เพศ}}{\text{จำนวนปลาที่สมบูรณ์เพศทั้งหมด}} \times 100$$



นำข้อมูลอัตราความสมบูรณ์เพศวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองโดยวิธี T-test ใช้โปรแกรมทางสถิติ Sirichai statistic v.6 on windowsเปรียบเทียบสัดส่วนความสมบูรณ์เพศระหว่างชุดการทดลองด้วย Fisher's exact probability test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ (Preacher, K.J.and N. E. Briggs. 2001)

### 3.2 พื้นที่ดำเนินการวิจัย

สถานีเกษตรหลวงอินทนนท์ อำเภอจอมทอง จังหวัดเชียงใหม่

