บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดในประเทศไทยมีความสำคัญมากขึ้น โดยผลผลิตด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดมีแนวโน้มสูงขึ้นทุกปี และในปี พ.ศ. 2545 ประเทศไทยมีผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดรวม 294,500 ตัน (กรมประมง, 2545) การขยายตัวของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด เกิดขึ้นได้จากการพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงหลายด้าน เช่น ด้านอาหาร ด้านการจัดการตลอดจนด้านการป้องกันและรักษาโรคสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันการพัฒนาสายพันธุ์สัตว์น้ำจืดที่เพาะเลี้ยง เพื่อให้การใช้ทรัพยากรสัตว์น้ำเกิดประโยชน์สูงสุดมีความจำเป็นที่จะต้องทำควบคู่ไปกับการพัฒนาด้านอื่น ๆ ด้วย

เทคโนโลยีชีวภาพได้เข้ามามีบทบาทอย่างสูงในการศึกษาด้านวิทยาศาสตร์ และศาสตร์ด้านการปรับปรุงพันธุ์ ทำให้มนุษย์สามารถนำความรู้ในสาขาต่าง ๆ เช่น ชีวเคมี เซลล์พันธุศาสตร์ อณูพันธุศาสตร์ ฯลฯ มาผสมผสานและประยุกต์ใช้นอกเหนือจากวิธีการปรับปรุงพันธุ์แบบดั้งเดิม เป็นผลให้มีทางเลือกในการปรับปรุงพันธุ์หลากหลายขึ้น หรือเพิ่มประสิทธิภาพของวิธีแบบดั้งเดิม ดังเช่น การดัดแปลงยีน การควบคุมเพศ การศึกษาเครื่องหมายทางพันธุกรรม การจัดการชุดโครโมโซม เป็นต้น

การจัดการชุดของโครโมโซม (chromosome manipulation) หมายถึงการเหนี่ยวนำให้สัตว์น้ำมีจำนวนชุดหรือลักษณะของชุดของโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปจากธรรมชาติ สามารถแบ่งออกได้เป็นสองลักษณะ คือ (1) การเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ (polyploid) (2) การเหนี่ยวนำแอนโดรเจเนซีส (androgenesis) หรือไจโนเจเนซีส (gynogenesis) (อุทัยรัตน์, 2543ข) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปลา และใช้ประโยชน์ด้านการทดลองวิทยาศาสตร์พื้นฐาน โดยทั่วไปการเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์นิยมใช้เพื่อผลิตปลาให้มีโครโมโซมจำนวน 3 ชุด (3n) ซึ่งปลาเหล่านี้เป็นหมันไม่สามารถใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ได้ ส่วนการเหนี่ยวนำแอนโดรเจเนซีสนั้นขั้นตอนการทำลายสารพันธุกรรมของไข่ และการเหนี่ยวนำเพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ไมโตซีสครั้งแรกทำได้ยาก วิธีการเหนี่ยวนำดังกล่าวจะนิยมนำมาใช้เพื่อการอนุรักษ์ การทดลองในครั้งนี้จึงเลือกใช้วิธีการเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีสในการศึกษา

ปลาหมอไทย (*Anabas testudineus* Bloch) เป็นปลาที่นิยมเลี้ยงและบริโภคในประเทศไทย อินเดีย เวียดนาม และอินโดนีเซีย เนื่องจากมีรสชาติดี เป็นที่ต้องการของตลาด และทนต่อสภาพการเลี้ยงแบบหนาแน่นได้ดี (นำชัย และคณะ, 2540; กฤษณา และ ภีระ, 2545) ในปี พ.ศ. 2545 ประเทศไทยมีผลผลิตปลาหมอไทยมูลค่า 458.8 ล้านบาท (กรมประมง, 2546) แต่การเลี้ยงปลาหมอไทยในปัจจุบันยังขาดแคลนปลาหมอไทยสายพันธุ์ดีและเกษตรกรต้องการเลี้ยงปลาหมอไทยแบบเพศเมียล้วน เนื่องจากปลาหมอไทยเพศผู้มีลักษณะลำตัวเรียวยาว ไม่เป็นที่ต้องการของตลาด ปลาเพศเมียมีความลึกของลำตัวมากกว่าเพศผู้ เมื่อมีความยาวเท่ากันเพศเมียจึงมีน้ำหนักมากกว่าเพศผู้ และมักมีไข่เมื่อได้ขนาดตลาด จึงเป็นที่ต้องการของตลาด ทำให้ราคาสูงกว่าปลาเพศผู้ นวลมณี และคณะ (2541) รายงานว่าสามารถควบคุมเพศของลูกปลาหมอไทยให้เป็นเพศเมีย โดยใช้ฮอร์โมน 17 β-estradiol (EST) ผสมอาหารให้ลูกปลาอายุ 2-3 สัปดาห์ กินเป็นระยะเวลานาน 3-4 สัปดาห์ แต่วิธีนี้มีปัญหาในการผลิต เนื่องจากฮอร์โมนที่ใช้มีราคาแพงจึงทำให้ต้นทุนการผลิตสูง และสัดส่วนของลูกปลาเพศเมียที่ผลิตได้ไม่แน่นอน

การทดลองในครั้งนี้เป็นการศึกษากระบวนการเหนี่ยวนำปลาหมอไทยด้วยวิธีไจโนเจเนซีส โดยคาดว่าจะได้รับประโยชน์สำคัญสองประการจากการศึกษา คือ 1) ได้กระบวนการสร้างปลาหมอไทยสายพันธุ์แท้ (inbred line) เพื่อใช้ในการศึกษาการปรับปรุงพันธุ์ปลาหมอไทยด้วยระบบการผสมพันธุ์ (mating systems) ซึ่งต้องใช้ปลาสายพันธุ์แท้มาทำการผสมข้ามกัน (cross breeding) เพื่อหาคู่ผสมที่ให้ค่าเฉลี่ยของลักษณะในลูกผสม ที่มีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยของพ่อแม่ (อุทัยรัตน์, 2543ข) 2) สามารถผลิตปลาหมอไทยเพศเมียล้วน ในกรณีที่ปลาหมอไทยมีการควบคุมเพศแบบ female homogamety ซึ่ง Tave (1993) กล่าวว่าปลาส่วนใหญ่มีการควบคุมเพศแบบ female homogamety ประโยชน์สองประการนี้จะเป็นส่วนสำคัญในการพัฒนาสายพันธุ์ปลาหมอไทยเพื่อการเพาะเลี้ยงต่อไปในอนาคต

การตรวจเอกสาร

1. การจัดการชุดของโครโมโซม (chromosome manipulation)

การจัดการชุดของโครโมโซม หมายถึงการเหนี่ยวนำให้สัตว์น้ำมีจำนวนชุดหรือลักษณะของชุดของโครโมโซมเปลี่ยนแปลงไปจากธรรมชาติ สามารถแบ่งออกได้เป็นสองลักษณะ คือ (1) การเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ (polyploid) (2) การเหนี่ยวนำแอนโดรเจเนซีส (androgenesis) หรือไจโนเจเนซีส (gynogenesis) (อุทัยรัตน์, 2543ข) ซึ่งเป็นวิธีที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อการปรับปรุงพันธุ์ปลา และใช้ประโยชน์ด้านการทดลองวิทยาศาสตร์พื้นฐาน โดยเริ่มมีการศึกษาวิธีการดังกล่าวมากว่า 30 ปี ตามรายละเอียดดังนี้

1.1. การเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ (polyploid)

การเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ คือ การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมให้มากกว่าปกติที่เป็นดิพลอยด์ (2n) ในสัตว์น้ำนิยมดำเนินการสองแบบ คือ ทริพลอยด์ (triploid, 3n) และเตตราพลอยด์ (tetraploid, 4n) การเหนี่ยวนำทริพลอยด์เพื่อวัตถุประสงค์ (1) สัตว์น้ำที่เป็นทริพลอยด์อาจเจริญเติบโตดีกว่าดิพลอยด์ เพราะจำนวนโครโมโซมที่เพิ่มขึ้นอาจทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น (2) ใช้ประโยชน์จากการเป็นหมัน เนื่องจากสัตว์มีจำนวนชุดของโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากปกติ 1 ชุด ทำให้การจับคู่ของโฮโมโลกัสโครโมโซมในการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ผิดปกติ ทำให้เกิดการเป็นหมัน จึงสามารถป้องกันประชากรปลาที่เพาะเลี้ยงหรือทดลองทางวิทยาศาสตร์ไม่ให้แพร่พันธุ์เมื่อปลาเหล่านี้หลุดออกสู่ธรรมชาติ และคาดหวังว่าสัตว์ที่เป็นหมันมีแนวโน้มเจริญเติบโตดีกว่าสัตว์ปกติ เพราะไม่ต้องแบ่งพลังงานบางส่วนไปใช้ในการสืบพันธุ์ แต่บางครั้งพบว่าปลาทริพลอยด์มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากปลาปกติ (อุทัยรัตน์, 2543ก; Malison *et al*., 1993; Horvath and Orban, 1995; Basavaraju *et al*., 2002; Kerby *et al*., 2002) นอกจากนี้ปลาที่เป็นหมันไม่สามารถใช้ในกระบวนการปรับปรุงพันธุ์ต่อไปได้

การผลิตปลาเตตราพลอยด์มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อใช้ในการผลิตปลาทริพลอยด์ เนื่องจากปลาเตตราพลอยด์ไม่เป็นหมันและสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนชุดของโครโมโซมเป็น 2n เมื่อผสมกับปลาปกติที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่มีจำนวนชุดโครโมโซมเพียง n เดียว จะได้ลูกปลาที่เป็นปลาทริพลอยด์

1.2. การเหนี่ยวนำแอนโดรเจเนซีส (androgenesis)

การเหนี่ยวนำแอนโดรเจเนซีส คือ การพัฒนาไข่เป็นตัวอ่อน โดยได้รับสารพันธุกรรม (genetic material) จากเชื้อตัวผู้เท่านั้น (Arai, 2001) วิธีการเหนี่ยวนำทำได้โดยการฉายรังสีเพื่อทำลายสารพันธุกรรมของไข่ และเพิ่มจำนวนชุดโครโมโซม (จากน้ำเชื้อตัวผู้) ด้วยการเหนี่ยวนำเพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ไมโตซีสครั้งแรกเท่านั้น ปัจจุบันนิยมใช้ประโยชน์การเหนี่ยวนำแอนโดรเจเนซีสเพื่อการอนุรักษ์ เพราะสามารถเก็บรักษาน้ำเชื้อด้วยวิธีการแช่แข็งได้ดีกว่าการเก็บรักษาไข่ แต่การเหนี่ยวนำชนิดนี้ไม่ค่อยประสบผลสำเร็จ เนื่องจากขั้นตอนการทำลายสารพันธุกรรมของไข่ และการเหนี่ยวนำเพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ไมโตซีสครั้งแรกทำได้ยาก

1.3. การเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีส (gynogenesis)

ไจโนเจเนซีส คือการพัฒนาไข่เป็นตัว โดยไม่ได้รับสารพันธุกรรมจากเชื้อตัวผู้ เชื้อตัวผู้จะมีส่วนในการกระตุ้นให้ไข่เกิดการแบ่งเซลล์เจริญเป็นตัวเท่านั้น (John *et al*., 1984) Hertwig (1911) อ้างโดย Gjedrem (2005) รายงานการเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีสครั้งแรกในกบ และมีรายงานการผลิตปลาด้วยวิธีไจโนเจเนซีสแล้ว 35 ชนิด (Pandian and Koteeswaran, 1998 อ้างโดย Kirankumar and Pandian, 2004)

ไจโนเจเนซีสเป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบบหนึ่ง ซึ่งพบน้อยมากในธรรมชาติ การสืบพันธุ์แบบนี้อาศัยการผสมพันธุ์ตามปกติ แต่เมื่อนิวเคลียสของเชื้อตัวผู้เข้าไปในไข่ สารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้จะสูญเสียคุณสมบัติไป สังเกตได้จากปลาชนิดนั้น ๆ มีแต่เพศเมีย เช่น ปลา *Poecilia formosa* ซึ่งอาศัยอยู่ในแม่น้ำบริเวณอ่าวเม็กซิโกเป็นปลาที่มีเฉพาะเพศเมีย มันจะสืบพันธุ์แบบไจโนเจเนซีส โดยอาศัยเชื้อตัวผู้จากปลาเพศผู้ของ *P. latipinna* และ *P. mexicana* ซึ่งเป็นปลาสองชนิดที่มีทั้งเพศผู้และเพศเมีย และอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำเดียวกัน (Hubbs and Hubbs, 1932 อ้างโดย อุทัยรัตน์, 2543ข)

การเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีสให้ได้ปลาที่มีโครโมโซม 2 ชุด มีวิธีการสำคัญ 2 ขั้นตอน คือ 1) การทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้ (sperm inactivation) และ 2) การเหนี่ยวนำให้ไซโกตที่ได้มีโครโมโซมสองชุด (diploidization) ซึ่งมีรายละเอียดของขั้นตอน คือ

1.3.1. การทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้

การทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้ (sperm inactivation) โดยไม่ให้เชื้อตัวผู้ตาย วิธีการที่ได้ผลดีคือ การฉายรังสี รังสีทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสามลักษณะ ดังนี้

1.3.1.1. ทำให้เกิดการจับกันของเบสไพริมิดินที่อยู่ชิดกันบนสาย DNA ทำให้ DNA สูญเสียคุณสมบัติ

1.3.1.2. ทำให้โครมาติน (chromatin) ซึ่งตามปกติจับตัวกันแน่นคลายตัวหลวมขึ้น

1.3.1.3. ผนังนิวเคลียส และเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเชื้อตัวผู้ถูกทำลาย ทำให้นิวเคลียสของเชื้อตัวผู้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ภายในไซโตพลาสซึมของไข่ (Don and Avtation, 1993 อ้างโดย อุทัยรัตน์, 2543ข)

รังสีที่ใช้ เช่น รังสีแกมมา (Linhart *et al*., 1986) หรือรังสีอัลตราไวโอเลต (John *et al*., 1984; Taniguchi *et al*., 1986; Komen *et al*., 1991; Gomelsky *et al*., 1992; Kavumpurath and Pandian, 1992; Guo *et al*., 1993; Kavumpurath and Pandian, 1994) เป็นต้น โดยรังสีอัลตราไวโอเลตมีคนนิยมใช้มากกว่ารังสีแกมมา เนื่องจากอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำเครื่องฉายรังสีมีราคาถูกและทำขึ้นได้ง่าย (อุทัยรัตน์, 2543ข)

ก่อนฉายรังสีต้องเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายที่สามารถยืดอายุน้ำเชื้อได้ เช่น เกลือแกง 0.85 เปอร์เซ็นต์ (Taniguchi *et al*., 1986; Komen *et al*., 1991) สารละลายริงเกอร์ (Ringer's solution) (Na-Nakorn *et al*., 1993; Pongthana *et al*., 1995; Luckenbach *et al*., 2004) สารละลายแฮงค์ (Hank's solution) (John *et al*., 1984; Kavumpurath and Pandian, 1992) เป็นต้น ความเข้มของรังสีที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปตามชนิดของน้ำเชื้อและความเข้มข้นของน้ำเชื้อ รังสีที่ความเข้มต่ำเกินไปจะไม่สามารถทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้ได้ หากความเข้มของรังสีมากเกินไปจะทำให้เชื้อตัวผู้ตาย (อุทัยรัตน์, 2543ข)

สายใจ (2539) รายงานว่า การเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีสสามารถใช้น้ำเชื้อจากปลาชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันก็ได้ และได้ใช้น้ำเชื้อปลาสวาย (*Pangasius sutchi*) ในการเหนี่ยวนำไข่ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*) ข้อดีของการใช้น้ำเชื้อปลาสวายในการเหนี่ยวนำไข่ปลาดุกอุย คือ สามารถตรวจสอบกระบวนการ gynogenesis ได้ง่ายขึ้นเพราะถ้าการฉายรังสีไม่สามารถทำลายสารพันธุกรรมของน้ำเชื้อปลาสวายได้ทั้งหมด ลูกปลาที่เกิดจากการปฏิสนธิของไข่ปลาดุกอุยกับน้ำเชื้อปลาสวายปกติจะมีลักษณะแตกต่างจากลูกปลาดุกอุยอย่างเห็นได้ชัด และมีรายงานการใช้น้ำเชื้อกับไข่จากปลาต่างชนิดกันในการเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีส เช่น Levanduski และคณะ (1990) ใช้น้ำเชื้อปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) กระตุ้นไข่ปลา chinook salmon

(*O. tshawytscha*) Kavumpurath และ Pandian (1994) ใช้น้ำเชื้อปลาหมอเทศ (*Oreochromis mossambicus*) กระตุ้นไข่ปลากัด *(Betta splendens*) Varadi และคณะ (1999) ใช้น้ำเชื้อปลา rosy barb (*Barbus conchonius*) กระตุ้นไข่ปลา African catfish (*Clarias gariepinus*) Luckenbach และคณะ (2004) ใช้น้ำเชื้อปลากระบอก (*Mugil cephalus*) กระตุ้นไข่ปลา southern flounder (*Paralichthys lethostigma*)

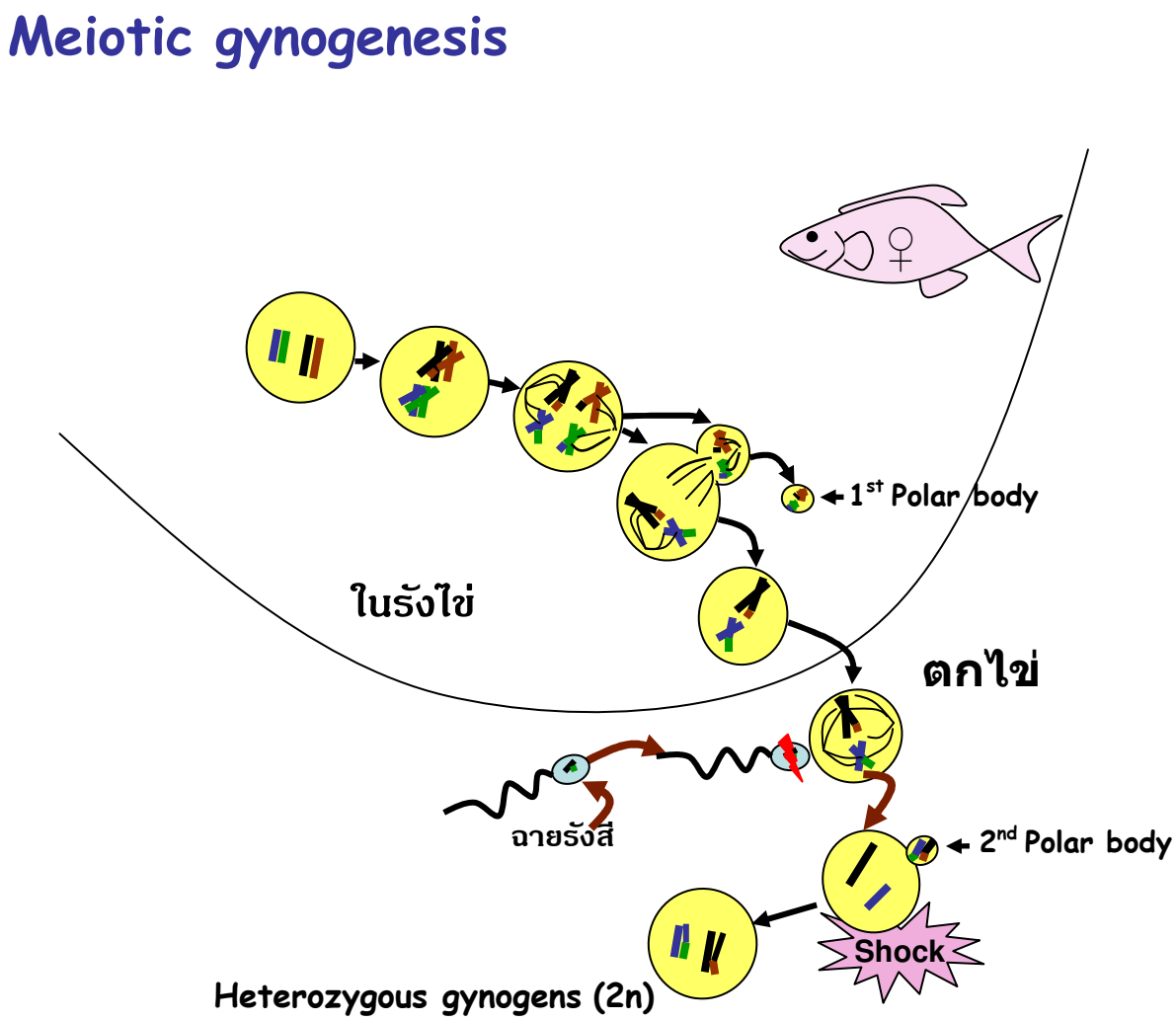
1.3.2. การเหนี่ยวนำให้โครโมโซมเพิ่มเป็นสองชุด (diploidization)

คัพภะที่ได้จากไข่ผสมกับน้ำเชื้อฉายรังสีเจริญเป็นตัวอ่อนโดยไม่ได้รับสารพันธุกรรมจากเชื้อตัวผู้ ลูกปลาจะมีโครโมโซมที่ได้จากไข่เพียง 1 ชุด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเหนี่ยวนำให้โครโมโซมของลูกปลาเพิ่มเป็นสองชุดซึ่งสามารถทำได้สองระยะ คือ ระยะการยับยั้งการแยกโพลาร์บอดีชุดที่สองของไข่ (meiotic gynogenesis) และระยะการยับยั้งการแบ่งเซลล์ครั้งแรกของไซโกต (mitotic gynogenesis)

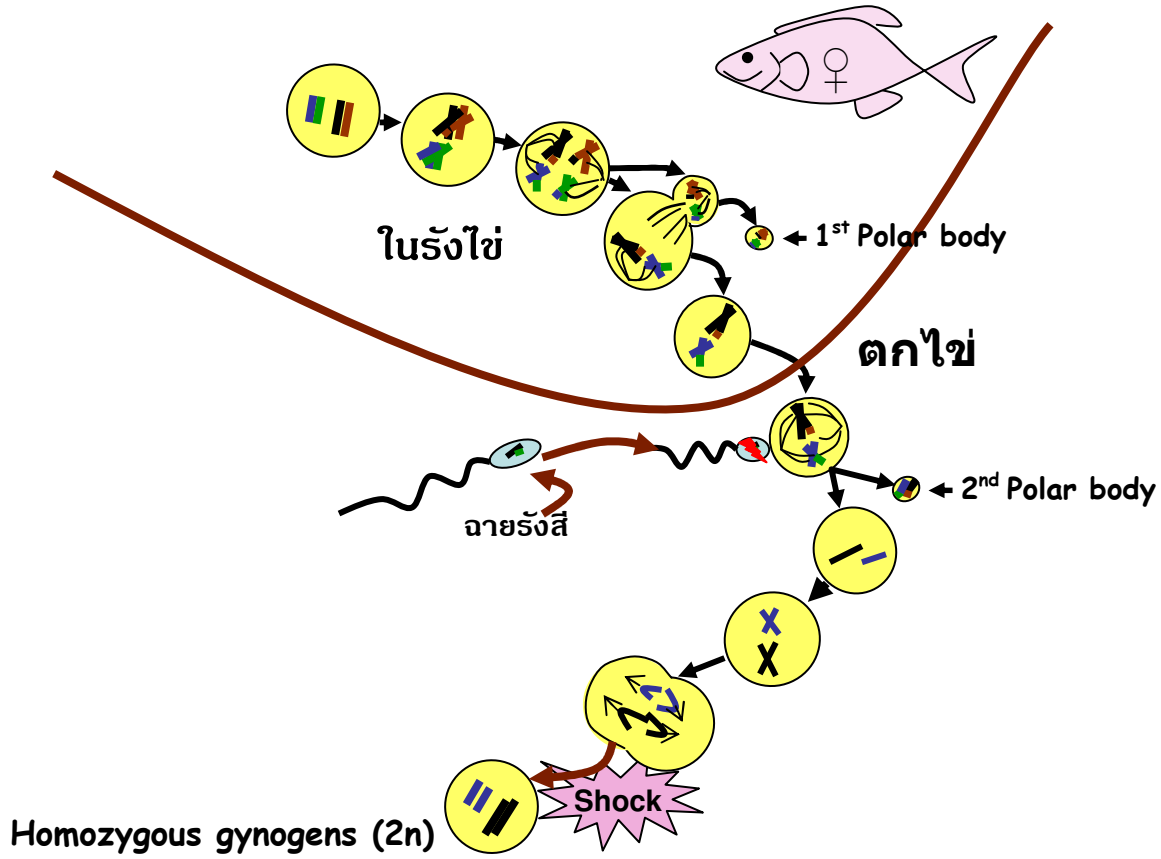
meiotic gynogenesis เป็นการช็อคเพื่อยับยั้งการแยกโพลาร์บอดีออกจากเซลล์ไข่ในขั้นตอนการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสระยะที่สอง โครโมโซมชุดที่อยู่ในเซลล์ไข่และชุดที่อยู่ในโพลาร์บอดี ได้ผ่านการแลกเปลี่ยนท่อนของโครโมโซม (crossing over) มาแล้ว เมื่อผ่านการช็อคลูกปลาที่ได้จึงเป็นเฮตเทอโรไซกัส (heterozygous) ที่ยีนบางตำแหน่ง ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์เฮตเทอโรไซกัสขึ้นกับระยะห่างระหว่างยีนและเซ็นโตรเมีย (centromere) (รูปที่ 1) การเหนี่ยวนำลักษณะนี้ทำได้ง่าย การเหนี่ยวนำ gynogenesis มากกว่า 90% จึงเป็นการเหนี่ยวนำลักษณะนี้ (อุทัยรัตน์, 2543ข; Arai, 2001)

mitotic gynogenesis เป็นการช็อคเพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ครั้งแรกของไซโกตที่มีการเพิ่มชุดโครโมโซมในระยะก่อนการแบ่งเซลล์ไมโตซีสครั้งที่ 1 ซึ่งเป็นระยะที่โครโมโซมซึ่งมีอยู่เพียงชุดเดียวแต่ละแท่งจำลองตัวเองขึ้นมา โครโมโซมทั้งสองชุดที่ได้หลังการจำลองตัวเองจึงเหมือนกันทุกประการ โครโมโซมที่เหมือนกันนี้คงอยู่ในเซลล์เดียวกัน ลูกปลาไจโนเจเนซีสที่เกิดขึ้นจึงมียีนทุกตำแหน่งอยู่ในสภาพโฮโมไซกัส (homozygous) เรียกลูกปลาที่ได้ว่าไมโตติกไจโนเจนส์ (mitotic gynogens) (รูปที่ 2) การเหนี่ยวนำโดยวิธีนี้ทำได้ยากกว่า meiotic gynogenesis อย่างไรก็ตามการที่ลูกปลาที่ได้มียีนทุกตำแหน่งเป็นโฮโมไซกัส จึงสามารถนำไปสร้างประชากรที่มียีโนไทพ์เหมือนกันทั้งหมดหรือที่เรียกว่าโคลน (clone) ได้โดยการนำไข่จากแม่ปลาที่ได้จากการเหนี่ยวนำไมโตติกไจโนเจเนซีส มาเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีสอีกครั้งหนึ่ง

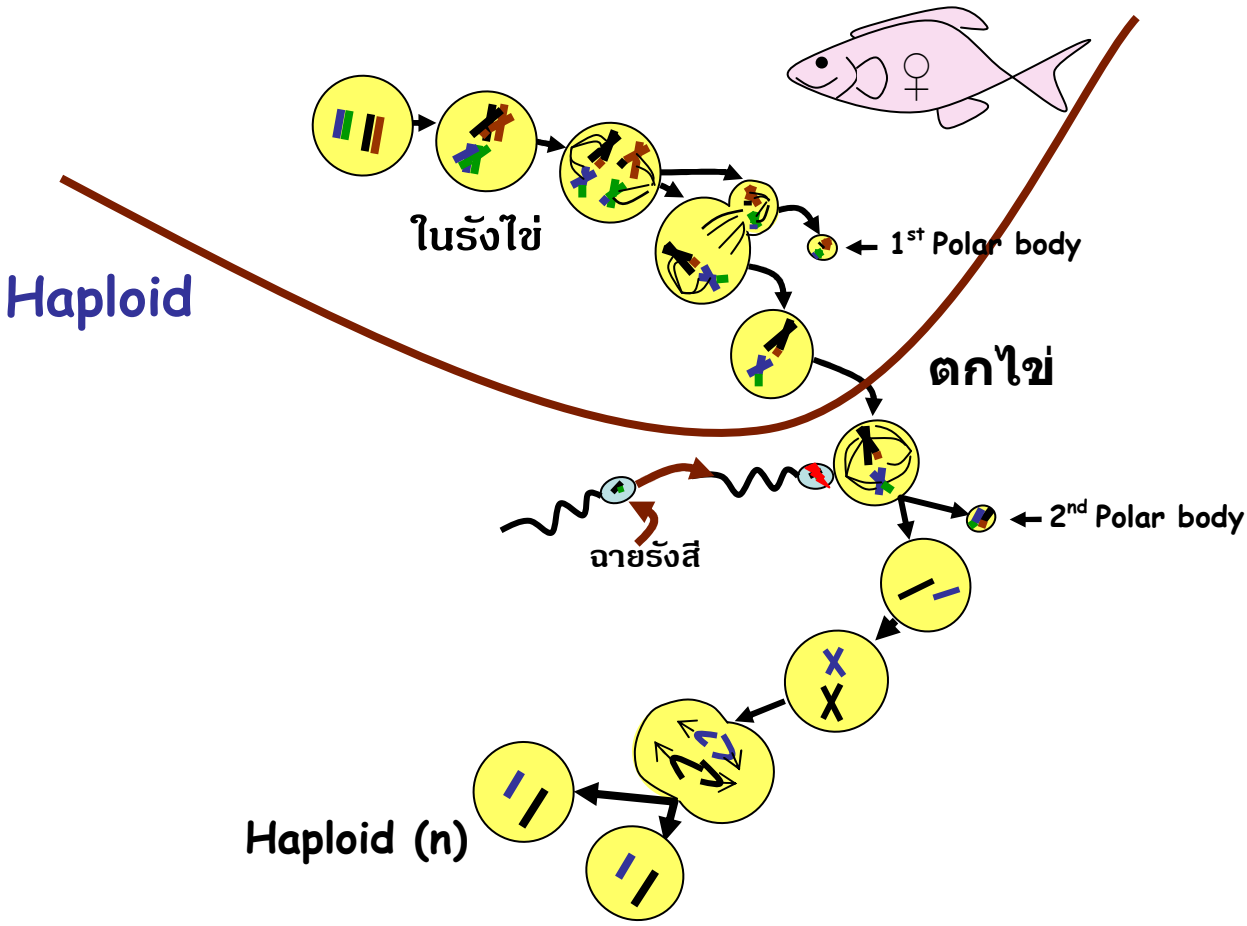
ถ้าหากกระบวนการเหนี่ยวนำให้โครโมโซมของลูกปลาเพิ่มเป็นสองชุดไม่สำเร็จ ลูกปลาจะมีโครโมโซมเพียงชุดเดียวเรียกว่าลูกปลาแฮพลอยด์ (haploid) (รูปที่ 3) มีผลทำให้ลูกปลาดังกล่าวมีลักษณะผิดปกติและจะตายหมดหลังจากฟักออกจากไข่ได้ไม่นานเรียกว่า haploid syndrome (รูปที่ 4) (Mair, 1993; Kavumpurath and Pandian, 1994; Thorgaard *et al*., 1995; Varadi *et al*., 1999; Arai, 2001; Francescon *et al.,* 2004)



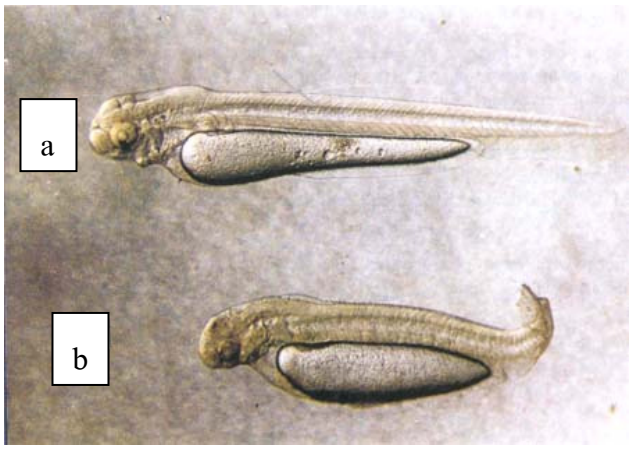
รูปที่ 1 หลักการของการเหนี่ยวนำ meiotic gynogenesis



รูปที่ 2 หลักการของการเหนี่ยวนำ mitotic gynogenesis



รูปที่ 3 การเกิดลูกปลาแฮพลอยด์ (haploid)



รูปที่ 4 ลูกปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita*) ปกติ (a) และเป็น haploid syndrome (b)

ที่มา : Reddy (1999)

1.3.3. ปัจจัยที่กำหนดความสำเร็จในการเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีส

1.3.3.1. เวลาเริ่มช็อค การช็อคจะได้ผลเมื่อช็อคในขณะที่ไข่กำลังกำจัดโพลาร์บอดี หรือเมื่อไซโกตกำลังแบ่งเซลล์ครั้งแรก (อุทัยรัตน์, 2543ข) ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองหาเวลาเริ่มช็อคที่เหมาะสมก่อน ว่าจะต้องปล่อยให้เวลาผ่านไปนานเท่าใดหลังการผสมไข่กับน้ำเชื้อแล้วจึงจะเริ่มทำการช็อค

1.3.3.2. ระยะเวลาและอุณหภูมิในการช็อค ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการช็อคจะขึ้นอยู่กับอุณหภูมิระหว่างทำการช็อคด้วย เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จะช้ากว่าที่อุณหภูมิสูง การช็อคที่อุณหภูมิต่ำจึงต้องใช้เวลาในการช็อคนานกว่าการช็อคที่อุณหภูมิสูง (Na-Nakorn *et al*., 1993)

1.3.3.3. วิธีการช็อคและระดับการช็อคที่เหมาะสม

ก. การช็อคโดยใช้สารเคมี (Chemical shock) มีการนำสารเคมี และก๊าซหลายชนิดมาใช้ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มชุดของโครโมโซม เช่น โคลชิซิน (colchicines) ไซโตคาลาซิน-บี (cytochalasin-B) ไนตรัสออกไซด์ แต่วิธีการนี้ได้ผลไม่ดี เนื่องจากมีปัญหาในการควบคุมระยะเวลาในการช็อค เพราะเมื่อสารเคมีซึมเข้าไปในช่องระหว่างไข่กับเปลือกไข่แล้ว เมื่อเสร็จสิ้นการช็อคไม่สามารถล้างเอาสารเคมีดังกล่าวออกได้หมด (อุทัยรัตน์, 2543ข)

ข. การช็อคด้วยความดันน้ำ (Hydrostatic pressure shock) (Kavumpurath and Pandian, 1994; Francescon *et al*., 2004) การช็อคไข่ด้วยความดันน้ำระดับสูงจะยับยั้งการทำงานของสายใยสปินเดิล ระดับความดันที่ใช้ในการช็อคไข่ปลาส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 6000-8000 psi (ปอนด์ต่อตารางนิ้ว) (อุทัยรัตน์, 2543ข) โดยช็อคในระยะเวลาสั้น ๆ การช็อคด้วยความดันน้ำเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อช็อคเพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีส อย่างไรก็ตามการช็อคด้วยความดันน้ำมีข้อเสีย คือ การช็อคแต่ละครั้งช็อคไข่ได้จำนวนน้อย และเครื่องมือที่ใช้มีราคาแพง

ค. การช็อคด้วยอุณหภูมิ (Temperature shock) อุณหภูมิที่ต่ำหรือสูงเกินกว่าสภาวะที่เหมาะสมโดยไม่ทำให้ไข่ตาย แต่จะทำลายสายใยสปินเดิล ทำให้โครโมโซมที่เพิ่มจำนวนขึ้นแล้วหยุดการเคลื่อนที่ไปยังขั้วเซลล์และคงอยู่ในเซลล์เดียวกัน การเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิโดยทั่วไปแบ่งออกเป็น การช็อคด้วยความร้อน (heat shock) (Varadaraj and Pandian, 1990;

Cherfas *et al*., 1993; Gomelsky *et al*., 1995) และการช็อคด้วยความเย็น (cold shock) (นวลมณี, 2537; วิกรม, 2537; สายใจ, 2539; John *et al*., 1984; Chingjiang *et al*., 1986; Komen *et al*., 1988; Volckaert *et al*., 1994; Linhart *et al*., 1995; Peruzzi and Chatain, 2000; Luckenbach *et al*., 2004)โดยที่การช็อคไข่ด้วยความร้อน ได้ผลดีกับปลาเมืองหนาว ส่วนการช็อคด้วยความเย็นได้ผลดีกับปลาเมืองร้อน (อุทัยรัตน์, 2543ข; Tave, 1993) ดังผลการเหนี่ยวนำให้เกิดไจโนเจเนซีสในสัตว์น้ำต่าง ๆ ที่แสดงในตารางที่ 1 การช็อคด้วยอุณหภูมิมักจะได้ผลที่แตกต่างกันเนื่องจากหลายสาเหตุ เช่น อุณหภูมิน้ำก่อนการช็อค การพักไข่ไว้ในน้ำอุณหภูมิต่างกันแล้วช็อคด้วยอุณหภูมิเดียวกันจะให้ผลการช็อคที่แตกต่างกัน เพราะเมื่ออุณหภูมิน้ำก่อนการช็อคต่างกัน อัตราการพัฒนาของคัพภะจะต่างกัน ทำให้ระยะของคัพภะต่างกันเมื่อเริ่มทำการช็อคแม้ช่วงเวลาที่ใช้พักไข่หลังการผสมไข่กับน้ำเชื้อจะเท่ากันก็ตาม ระยะเวลาหลังการผสมไข่กับน้ำเชื้อก่อนนำไข่ไปช็อคจึงต้องปรับให้เหมาะสมกับระยะของคัพภะด้วย อย่างไรก็ตามการช็อคด้วยอุณหภูมิเป็นวิธีที่นิยมใช้กันมากที่สุด เนื่องจากอุปกรณ์หาได้ง่าย และสามารถช็อคไข่ได้คราวละมาก ๆ

1.3.4. การตรวจสอบสภาพไจโนเจเนซีส

เนื่องจากไจโนเจเนซีส คือการพัฒนาไข่เป็นตัว โดยไม่ได้รับสารพันธุกรรม (genetic material) จากเชื้อตัวผู้ การตรวจสอบสภาพไจโนเจเนซีสจึงต้องตรวจสอบว่าไม่มีสารพันธุกรรมของตัวผู้ในสารพันธุกรรมของลูกปลา นิยมดำเนินการ 2 วิธีคือ

1.3.4.1. เทคนิคทางอณูพันธุศาสตร์ (Molecgular genetics) ตรวจหาสารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้ในลูกปลาที่ผลิตด้วยกระบวนการไจโนเจเนซีส เช่น เทคนิค DNA อิเลคโตรโฟเรซีส หรือ PCR (polymerase chain reaction) นิยมใช้ในกรณีที่ใช้น้ำเชื้อและไข่จากปลาชนิดเดียวกันในการเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีส (Volckaert *et al*., 1994; Galbusera *et al*., 2000)

1.3.4.2. การตรวจสอบจากลักษณะภายนอก ใช้กรณีที่สามารถใช้น้ำเชื้อและไข่จากปลาคนละชนิดกันในการเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีส เมื่อสารพันธุกรรมจากเชื้อตัวผู้เข้าผสมกับไข่และไข่พัฒนาเป็นลูกปลาได้ แต่ลูกปลามีลักษณะผิดปกติหรือตายหมดในที่สุด หรือใช้กรณีที่ใช้น้ำเชื้อและไข่จากปลาชนิดเดียวกันเมื่อทราบการทำงานของยีนที่ควบคุมลักษณะที่สามารถตรวจสอบได้จากสภาพภายนอก เช่น ลักษณะเกล็ดของปลาไน ดังรายงานของ Komen และคณะ (1991) ผลิตปลาไนไจโนเจเนซีสโดยใช้น้ำเชื้อจากปลาไนเพศผู้ลักษณะเกล็ดแบบปกติ ซึ่งมียีโนไทพ์แบบ **SS**nn นำไปฉายรังสีเพื่อทำลายสารพันธุกรรมของน้ำเชื้อ แล้วนำไปผสมกับไข่จากแม่ปลาไนลักษณะเกล็ดแบบ scattered คือมีลักษณะเกล็ดขนาดใหญ่ปกคลุมไม่ตลอดลำตัว ซึ่งมียีโนไทพ์

แบบ ssnn เพราะฉะนั้นในกรณีที่การฉายรังสีเพื่อทำลายสารพันธุกรรมของน้ำเชื้อไม่สมบูรณ์ ยีน **S** จึงสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกปลาไน ทำให้ลูกปลาไนที่ได้รับยีน **S** มีลักษณะเกล็ดปกติ แต่ถ้าการทำลายสารพันธุกรรมของน้ำเชื้อสมบูรณ์จะได้ลูกปลาที่มีลักษณะเกล็ดแบบ scattered เท่านั้น

ตารางที่ 1 การเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีสในสัตว์น้ำ

ชนิด	**แหล่งน้ำเชื้อ**	**วิธีฉายรังสีน้ำเชื้อ**	**ระยะเวลาหลังผสม (นาที)**	**วิธีช็อคไข่**	**วิธีตรวจสอบ**	**อัตราการรอด**	**เอกสารอ้างอิง**
ปลาตะเพียนขาว (*Puntius gonionotus*)	ปลาตะเพียนขาว	UV (หลอด 15 W) ห่าง 39.5 ซม. 1 นาที	1.5	ความเย็น 2 °C นาน 10 นาที	ไม่มีรายงาน	61.3%	นวลมณี และ ทวี (2534) (ไทย)
ปลาดุกอุย (*Clarias macrocephalus*)	ปลาสวาย (*Pangasius sutchi*)	UV (หลอด 30W) ห่าง 30 ซม. นาน 2 นาที	4.5	ความเย็น 7 °C นาน 14 นาที	ลักษณะภายนอก	15-17%	วิกรม (2537) (ไทย)
ปลาดุกอุย	ปลาสวาย	UV (หลอด 30W) ห่าง 30 ซม. นาน 2 นาที	4.5	ความเย็น 7 °C นาน 14 นาที	ลักษณะภายนอก	13-30%	สายใจ (2539) (ไทย)
ปลาดุกอุย	ปลาสวาย	UV (หลอด 30W) ห่าง 30 ซม. นาน 2 นาที	3.5-4.5	ความเย็น 7 °C นาน 14 นาที	ลักษณะภายนอก	27-43%	Na-Nakorn และคณะ (1993) (ไทย)
ปลาดุกอัฟริกัน (*Clarias gariepinus*)	ปลาดุกอัฟริกัน	UV 0.45 J cm^{-2}	3-5 *	ความดัน 55 MPa ช็อคนาน 1.5 นาที ความเย็น 5 °C นาน 40 นาที ความร้อน 41 °C นาน 2 นาที	multiple-locus DNA fingerprint	81% 80% 46%	Volckaert และคณะ (1994)
ปลาดุกอัฟริกัน	ปลาดุกอัฟริกัน	UV 0.45 J cm^{-2}	20-37**	ความร้อน 40 °C นาน 1 นาที	microsatellite DNA markers	5%	Galbusera และคณะ (2000)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิด	แหล่งน้ำเชื้อ	วิธีฉายรังสีน้ำเชื้อ	ระยะเวลาหลังผสม (นาที)	วิธีช็อคไข่	วิธีตรวจสอบ	อัตราการรอด	เอกสารอ้างอิง
ปลายี่สกเทศ (*Labeo rohita)*	*Catla catla*	UV (หลอด 15 W) ห่าง 20 ซม. นาน 17 นาที	4	ความเย็น 12 °C นาน 10 นาที	ลักษณะภายนอก	10-15%	John และคณะ (1984)
ปลาไน (*Cyprinus carpio*)	(ไม่มีรายงาน)	UV (ไม่มีรายงานความเข้มของรังสี)	5	ความเย็น 0-4 °C นาน 30 นาที	karyotype	36%	Chingjiang และคณะ (1986)
ปลาไน	ปลาไน	UV ห่าง 4 ซม. นาน 4 นาที (ไม่มีรายงานกำลังหลอด UV)	3-5	ความร้อน 39-40 °C นาน 1-2 นาที	ยีนควบคุมสีลำตัว	25-50%	Hollebecq และคณะ (1986)
ปลาไน	ปลาไน	^{60}Co (Gamma rays) 1000 Gy	5-15*	ความเย็น 0-4 °C นาน 60 นาที	genotypes ของ transferrin, Ldh-B^{1}	2.5%	Linhart และคณะ (1986)
ปลาไน	ปลาไน	UV 2200 Jm^{-2} min^{-1} นาน 1 ซม.	1-9	ความเย็น 0 °C นาน 45 นาที	ไม่มีรายงาน	25-50%	Komen และคณะ (1988)
ปลาไน	ปลาไน	UV 2200 Jm^{-2} min^{-1} นาน 60-65 นาที	28-30**	ความร้อน 40 °C นาน 2 นาที	ยีนควบคุมสีลำตัว	5-15%	Komen และคณะ (1991)
ปลาไน	ปลาไน	UV 300 Jm^{-2} (ไม่มีรายงานระยะเวลา)	54 **	ความร้อน 40 °C นาน 3 นาที	gene N	1.2%	Gomelsky และคณะ (1992)
Chinook salmon *(Oncorhynchus tshawytscha)*	Rainbow trout *(O. mykiss)*	UV 3600 ergs mm^{-2} 1.6 นาที	8-24*	ความร้อน 25 °C นาน 20 นาที	allozyme phenotypes	56.7%	Levanduski และคณะ (1990)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชนิด	แหล่งน้ำเชื้อ	วิธีฉายรังสีน้ำเชื้อ	ระยะเวลาหลังผสม (นาที)	วิธีช็อคไข่	วิธีตรวจสอบ	อัตราการรอด	เอกสารอ้างอิง
Brachydanio frankei	ปลาม้าลาย *(B. rerio)*	UV (หลอด 40W) ห่าง 28 ซม.นาน 4 นาที	2.5	ความร้อน 39 °C นาน 3 นาที	karyotype	57%	Kavumpurath และ Pandian (1992)
Common barbel *(Barbus barbus)*	ปลาไน	UV 7.02 W cm^{-2} นาน 5 นาที	3	ความร้อน 37 °C นาน 2 นาที	ลักษณะภายนอก	43-59%	Castelli (1994)
Tinca tinca	ปลาไน	^{60}Co (Gamma rays) 1400 Gy dose	2-10*	ความเย็น 0-2 °C นาน 30 นาที	karyotype biochemical analysis	5-21%	Linhart และคณะ (1995)
European Sea bass (*Dicentrarchus labrax*)	*D. labrax*	UV 32.000 erg mm^{-2} 6-8 นาที	5*	ความเย็น 0-1 °C นาน 15-20 นาที	microsatellite marker	35-100%	Peruzzi และ Chatain (2000)
D. labrax	*D. labrax*	UV 3,300 erg mm^{-2} 3 นาที	70-90 **	ความดัน 70-80 MPa 4 นาที	haploid control flow cytometry	1%	Francescon และคณะ (2004)
Southern flounder (*Paralichthys lethostigma*)	ปลากระบอก *(Mugil cephalus)*	UV 50 J cm^{-2} (ไม่มีรายงานระยะเวลา)	3-4*	ความเย็น 0-2 °C นาน 45-50 นาที	ลักษณะภายนอก	3-30%	Luckenbach และคณะ (2004)
หอยนางรม *(Crassostrea gigas)*	*C. gigas*	UV 1080 μW cm^{-2} นาน 5-6 นาที	25-50 *	สารเคมี Cytochalasin B 0.5 μg / ml	flow cytometry	18%	Guo และคณะ (1993)
หอยแมลงภู่ *(Mytilus edulis)*	*M. edulis*	UV source 220 V; 0.04 A; 254 nm; ระยะห่าง 20 ซม. นาน 15 นาที	30-50 *	สารเคมี Cytochalasin B 0.5 mg / l	chromosome counts	22.9 %	Fairbrother (1994)

MPa = MegaPascal

* meiosis gynogenesis

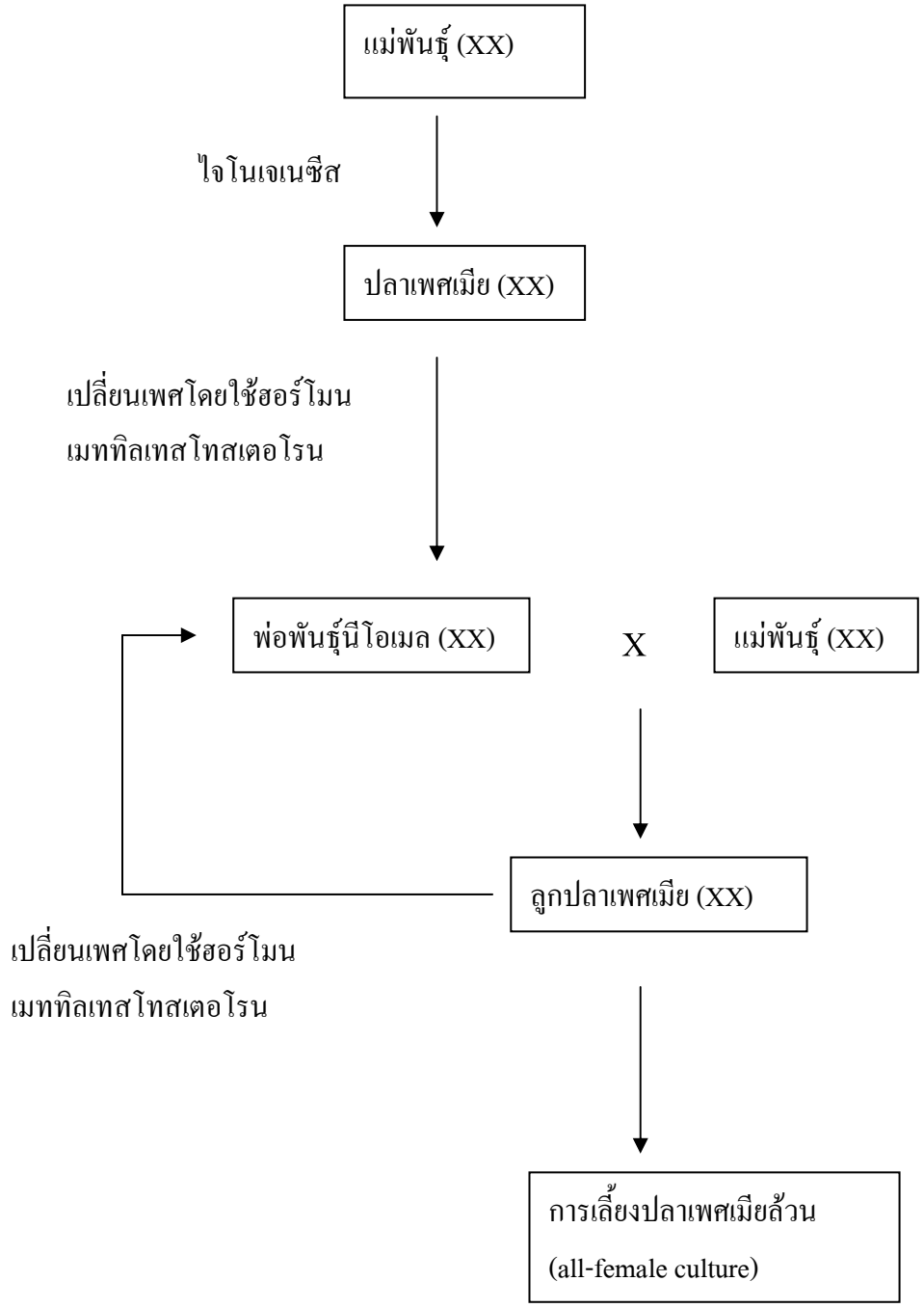
** mitotic gynogenesis, ที่ไม่มีเครื่องหมาย (*) เพราะไม่มีรายงาน

(ไทย) หมายถึง ดำเนินการทดลองในประเทศไทย

1.3.5. การใช้ประโยชน์จากปลาที่ผลิตด้วยกระบวนการไจโนเจเนซีส

1.3.5.1. การสร้างประชากรปลาเพศเมียล้วน

นวลมณี (2537); Pongthana และคณะ (1995) กล่าวว่าในกรณีที่ปลามีระบบควบคุมเพศแบบ female homogamety เช่น ปลา rainbow trout (*O. mykiss*) ปลาไน (*C. carpio*) ปลาเฉา (*Ctenopharyngodon idella*) และปลาตะเพียนขาว (*P. gonionotus*) เป็นต้น สามารถผลิตลูกปลาเพศเมียล้วนได้ด้วยวิธีไจโนเจเนซีส และได้ทดลองผลิตลูกปลาตะเพียนขาวด้วยวิธีไจโนเจเนซีส ได้ลูกปลาที่เป็นเพศเมียล้วน (มีระบบควบคุมเพศแบบ XX) แล้วแปลงเพศลูกปลาดังกล่าวให้แสดงลักษณะของเพศผู้ โดยให้อาหารผสมฮอร์โมนเมทิลเทสโทสเตอโรนระดับ 25 มิลลิกรัมต่ออาหาร 1 กิโลกรัม ระยะเวลานาน 4 สัปดาห์ หลังจากนั้น เลี้ยงลูกปลาที่แปลงเพศแล้วจนสมบูรณ์เพศ จะได้ปลาที่แสดงลักษณะของเพศผู้ แต่มีระบบควบคุมเพศแบบเพศเมีย (XX) เรียกว่าพ่อพันธุ์นีโอเมล เมื่อนำพ่อพันธุ์นีโอเมลผสมกับปลาตะเพียนขาวเพศเมียปกติ (XX) จะได้ลูกปลาเป็นเพศเมียล้วน (รูปที่ 5) วิธีการข้างต้นมีรายงานการนำมาใช้เพื่อผลิตปลาเพศเมียล้วนกับปลาเฉา (*C. idella*) (Shelton, 1986) ปลาไน (Komen *et al*., 1995) และในประเทศญี่ปุ่น มีการผลิตปลาเพศเมียล้วนด้วยวิธีดังกล่าว เพื่อการเลี้ยงเชิงพาณิชย์ในปลา rainbow trout, amago salmon, masu salmon (Arai, 2001)



รูปที่ 5 แผนผังการผลิตปลาตะเพียนขาวเพศเมียล้วน

ที่มา : นวลมณี (2537)

1.3.5.2. การสร้างปลาสายพันธุ์แท้

การผสมข้ามระหว่างปลาต่างสายพันธุ์ เพื่อใช้ประโยชน์ของเฮตเทอโรซิสที่อาจเกิดจากการผสมบางคู่ เป็นวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้ในการปรับปรุงพันธุ์ปลา โดยเฉพาะเมื่อต้องการปรับปรุงพันธุ์ปลาจากประชากรที่มีค่าอัตราพันธุกรรม (h^2) ต่ำ เนื่องจากความแปรปรวนที่เกิดจาก additive gene effect (V_A) น้อย การปรับปรุงพันธุ์ด้วยวิธีการคัดเลือกจะได้ผลตอบสนองน้อยจึงต้องใช้ประโยชน์จากความแปรปรวนที่เกิดจาก dominance gene effect (V_D) ด้วยการผสมข้ามสายพันธุ์ (Tave, 1993) Bakos และ Gorda (2001) รายงานว่าสถาบัน Fish Culture Research Institute ประเทศฮังการีปรับปรุงพันธุ์ปลาไนโดยการรวบรวมสายพันธุ์ปลาไนจากทั้งในประเทศฮังการีและปลาไนสายพันธุ์จากประเทศต่าง ๆ นำมาศึกษาการผสมข้ามเพื่อหาคู่ผสมที่ให้ลูกปลามีลักษณะเหมาะกับการเลี้ยงเพื่อการค้า และศึกษาการผลิตปลาไนสายพันธุ์แท้ด้วยวิธีไจโนเจเนซีส ผลจากการศึกษาทำให้สามารถผลิตปลาลูกผสมที่มีลักษณะดี 3 สายพันธุ์ คือ Sz215 mirror, SzP31 และ SzP34 scaly ซึ่งผลผลิต 80 เปอร์เซ็นต์ของการเลี้ยงปลาไนในประเทศฮังการี ได้จากการเลี้ยงปลาไนลูกผสม 3 สายพันธุ์ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นนี้ อย่างไรก็ตามการเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีสเป็นการเพิ่มระดับ homozygosity ที่เร็วมาก ทำให้ธรรมชาติไม่มีโอกาสกำจัดยีนเลวออกไป ลูกปลาที่ผลิตได้จึงมีอัตราการรอดต่ำ เนื่องจากการแสดงออกของยีนด้อย เมื่ออยู่ในสภาพ homozygous จึงอาจมีปัญหาในการสร้างปลาสายพันธุ์แท้ด้วยวิธีการดังกล่าว (อุทัยรัตน์, 2543ก)

1.3.5.3. การผลิตโคลน (clone) ของปลา

ในการทดลองทางวิทยาศาสตร์ที่ต้องการความละเอียดอ่อนมาก ๆ จำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลองที่มีพันธุกรรมเหมือนกัน (genetic clone) เช่น การทดลองด้านวิทยาภูมิคุ้มกัน (immunology), วิทยาต่อมไร้ท่อ (endocrinology) เป็นต้น จึงจำเป็นต้องสร้างโคลนของปลา (Quillet, 1994) Komen และคณะ (1991) รายงานการสร้างโคลนของปลาไนด้วยวิธีเหนี่ยวนำ mitotic gynogenesis ในครั้งแรก ลูกปลาไนที่ได้จะมีสภาพเป็น homozygous เลี้ยงลูกปลาไนไจโนเจเนซีสเหล่านี้จนถึงวัยเจริญพันธุ์ นำไข่ของปลาดังกล่าวมาเหนี่ยวนำแบบ meiotic gynogenesis ในครั้งที่สอง ทำให้ได้ลูกปลาไนที่มีสภาพเป็น clone (fully homozygous offspring) ที่มีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนแม่ทุกประการ ผู้ทดลองตรวจสอบสภาพ homozygous ด้วยยีนด้อยกลายพันธุ์ที่ควบคุมลักษณะสีของผิวหนังปลาไน นอกจากนี้มีรายงานการผลิตปลาม้าลาย

(*Brachydanio rerio*) (Westerfield *et al*., 1997) และปลานิล (*O. niloticus*) (Muller-Belecke and Horstgen-Schwark, 2000) ด้วยวิธีการโคลน เพื่อนำมาใช้เป็นสัตว์ทดลอง

1.3.5.4. การศึกษาระบบควบคุมเพศ (Systems of sex determination)

เนื่องจากลูกปลาไจโนเจเนซีสได้รับสารพันธุกรรมจากแม่เท่านั้น ดังนั้นเมื่อทราบสัดส่วนเพศของลูกปลาเหล่านี้ก็จะทราบแบบแผนการควบคุมเพศ Castelli (1994) ศึกษาระบบควบคุมเพศของปลา common barbel (*Barbus barbus*) ด้วยวิธีไจโนเจเนซีส พบว่าลูกปลาไจโนเจเนซีสที่ได้มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1:1 และเลี้ยงลูกปลาดังกล่าวจนถึงวัยเจริญพันธุ์ เมื่อนำปลาไจโนเจเนซีสเพศผู้ผสมกับปลาเพศเมียปกติ ลูกปลาที่ได้มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1:1 เมื่อนำปลาไจโนเจเนซีสเพศเมียผสมกับปลาเพศผู้ปกติ ลูกปลาที่ได้เป็นเพศเมียทั้งหมด จากผลการทดลองข้างต้นทำให้ทราบว่าปลาไจโนเจเนซีสเพศผู้มีระบบควบคุมเพศแบบ ZZ และปลาไจโนเจเนซีสเพศเมียมีระบบควบคุมเพศแบบ WW จึงสรุปว่าปลา common barbel มีระบบควบคุมเพศแบบ female heterogamety (ZW)

Komen และคณะ (1995) ศึกษาระบบควบคุมเพศในปลาไน (*C. carpio*) พบว่าเป็นแบบ female homogamety เพราะลูกปลาที่ได้จากการผลิตด้วยวิธีไจโนเจเนซีสเป็นเพศเมียล้วน (XX) และได้แปลงเพศลูกปลาเพศเมียดังกล่าวให้เป็นเพศผู้ด้วย 17α-methyltestosterone เพื่อผลิตปลานีโอเมล (neomale) นำปลานีโอเมลที่ได้ผสมกับแม่พันธุ์ปลาไนปกติ จะได้ลูกปลาที่เป็นเพศเมียล้วน แต่บางครั้งลูกที่ได้จากการผสมด้วยปลานีโอเมลดังกล่าวไม่เป็นเพศเมียล้วน ผู้วิจัยอธิบายว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจเกิดจากยีนกลายพันธุ์ (mutation) ที่เรียกว่า masculinization (mas-1) ซึ่งแสดงลักษณะเป็นยีนด้อย โดยปลาไนจะเป็นเพศผู้เมื่อมียีนควบคุมเพศแบบ XX; mas-1/mas-1 (ปกติปลา XX เป็นเพศเมีย) หรือ อาจเป็นเพราะสิ่งแวดล้อม เช่น ระดับการให้อาหาร อุณหภูมิ มีผลต่อการกำหนดเพศของปลาไน

Felip และคณะ (2002) ผลิตปลา sea bass (*D. labrax*) ด้วยวิธี meiotic gynogenesis พบว่าลูกปลาที่ได้มีอัตราส่วนเพศผู้ต่อเพศเมียเท่ากับ 1:1 ผู้วิจัยจึงสรุปว่าการควบคุมเพศของปลาดังกล่าวไม่ได้เป็นแบบ female homogamety

1.3.6. สถานภาพการศึกษาการผลิตปลาด้วยวิธีไจโนเจเนซีสในประเทศไทย

อุทัยรัตน์ (2543ก) และ Pongthana (2001) รายงานว่าประเทศไทยมีการเหนี่ยวนำไจโนเจเนซีสในปลา 2 ชนิด คือ ปลาดุกอุย และปลาตะเพียนขาว ดังแสดงในตารางที่ 1 โดยมีวัตถุประสงค์ในการผลิตปลาเพศเมียล้วน และสร้างปลาสายพันธุ์แท้ (inbred line) เพื่อทดลองผสมข้ามสายพันธุ์

2. ระบบควบคุมเพศของปลา (Systems of sex determination)

อุทัยรัตน์ (2543ข) รายงานว่าปลาส่วนใหญ่มีการกำหนดเพศที่ถูกควบคุมโดยพันธุกรรม ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็นสองแบบ คือ 1) แบบที่ไม่มีโครโมโซมเพศ (sex chromosome) เพศถูกควบคุมจากยีนหลายตำแหน่งที่กระจายอยู่บนโครโมโซมร่างกาย (autosome) เนื่องจากแต่ละยีนมีอิทธิพลต่อการกำหนดเพศค่อนข้างน้อย สิ่งแวดล้อมจึงมีอิทธิพลต่อการกำหนดเพศด้วย มีผลทำให้อัตราส่วนเพศในรุ่นลูกไม่แน่นอน 2) แบบที่มีโครโมโซมเพศควบคุมเพศ ในปลาเหล่านี้สัดส่วนเพศในรุ่นลูกค่อนข้างแน่นอน แบ่งออกได้เป็นสองลักษณะ คือ 2.1) โครโมโซมเพศมีลักษณะไม่แตกต่างกันและไม่แตกต่างกับโครโมโซมร่างกาย 2.2) โครโมโซมเพศมีลักษณะแตกต่างกัน (heteromorphic sex chromosome) สามารถสังเกตได้จากคาริโอไทพ์ เช่น การควบคุมเพศแบบ female homogamety หมายถึงปลาเพศเมีย (XX) สร้างไข่ที่มียีโนไทพ์ที่ควบคุมเพศเหมือนกันทั้งหมด ปลาที่มีระบบควบคุมเพศดังกล่าว สามารถผลิตลูกปลาให้เป็นเพศเมียล้วนด้วยวิธีไจโนเจเนซีส ในทางตรงกันข้าม การควบคุมเพศแบบ female heterogamety เช่น ปลาเพศเมีย (WZ) สร้างไข่ที่มียีโนไทพ์ที่ควบคุมเพศต่างกัน Tave (1993) รายงานระบบควบคุมเพศของปลา 9 แบบดังตารางที่ 2

ในปลาหลายชนิดที่มีผู้ศึกษาระบบควบคุมเพศไว้แน่นอนแล้ว บางครั้งอาจได้สัดส่วนเพศของลูกปลาแตกต่างจากที่ควรจะเป็น เนื่องจากอิทธิพลของโมดิฟายอิงยีน (modifying genes) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมร่างกาย (Komen *et al*., 1995) นอกจากนี้ยังพบการรายงานระบบควบคุมเพศต่างกันในปลาชนิดเดียวกัน (อุทัยรัตน์, 2543ข) เช่น ปลา African catfish (*C. gariepinus*) มีรายงานทั้งระบบควบคุมเพศแบบ female homogamety (XX) (Galbusera *et al*., 2000) และแบบ female heterogamety (WZ) (Ozouf-Costaz *et al*., 1990; Teugels *et al*., 1992; Varadi *et al*., 1999 อ้างโดย Galbusera *et al*., 2000)

ตารางที่ 2 ระบบควบคุมเพศของปลาชนิดต่าง ๆ

ระบบควบคุมเพศ	เพศเมีย	เพศผู้	ตัวอย่างชนิดปลาที่พบ
1. **XY**	**XX**	**XY**	*Oncorhynchus mykiss* (1)
2. **WZ**	**WZ**	**ZZ**	*Oreochromis aureus* (2)
3. **WXY**	**XX, WX, WY**	**XY, YY**	*Xiphophorus maculatus* (3)
4. **XO**	**XX**	**XO**	*Sternoptyx diaphana* (4)
5. **ZO**	**ZO**	**ZZ**	*Colisa lalius* (5)
6. $X_1 X_1 X_2 X_2 / X_1 X_2 Y_1$	$X_1 X_1 X_2 X_2$	$X_1 X_2 Y_1$	*Gobionellus shufeldti* (6)
7. $X Y_1 Y_2 / XX$	**XX**	$X Y_1 Y_2$	*Hoplias* sp. (7)
8. ZZ/ZW_1W_2	ZW_1W_2	**ZZ**	*Apareiodon affinis* (8)
9. แบบไม่มีโครโมโซมเพศ (ยีนควบคุมเพศอยู่บน autosomal chromosome)			*Limia caudofasciata* (9)

ที่มา : เอกสารอ้างอิงของตัวอย่างชนิดปลาที่พบในตารางข้างต้นทั้งหมดอ้างโดย อุทัยรัตน์ (2543ข) ดังนี้ (1) Thorgaard (1977) (2) Guerrero (1975) (3) Gordon (1946) (4) Chen (1969) (5) Rishi (1976) (6) Uyeno and Miller (1971) (7) Bertollo *et al*., (1983) (8) Filho *et al*., (1980) (9) Kosswig (1964)

ธวัช และ วิเชียร (2531) ศึกษาโครโมโซมของปลาหมอไทยจากแหล่งน้ำในเขตกรุงเทพมหานคร พบว่า ปลาหมอไทยมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 23 คู่ (2n = 46) ประกอบด้วยโครโมโซมแบบสับเมตาเซนตริก 1 คู่ อะโครเซนตริก 22 คู่ จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 48 การศึกษาในครั้งนี้ ไม่ได้กล่าวถึงโครโมโซมเพศของปลาหมอไทย

อิทธิพลของสิ่งแวดล้อมต่อการกำหนดเพศของปลา

เนื่องจากปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น (poikilothermic) และการพัฒนาของตัวอ่อนเกิดขึ้นภายนอกตัวแม่ สภาพแวดล้อมภายนอกจึงอาจมีผลต่อการกำหนดเพศของปลา (Devlin and Nagahama, 2002) Chang และ Yeung อ้างโดย อุทัยรัตน์ (2538) รายงานว่าสิ่งแวดล้อมเช่น อุณหภูมิ ความหนาแน่น หรือการควบคุมทางสังคม (socially control) เป็นปัจจัยที่มีผลต่อการกำหนดเพศของปลา ตัวอย่างเช่น เมื่อไข่ปลา *Epilatys chaperi* เจริญในน้ำอุณหภูมิต่ำ มีผลให้เกิดปลาเพศผู้มากกว่าปกติ Mair และคณะ (1989) อ้างโดย Devlin และ Nagahama (2002) ผลิตปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*) ให้เป็นเพศเมียล้วน (XX) แล้วอนุบาลลูกปลาในน้ำอุณหภูมิต่ำ (19 °C) มีผลให้ลูกปลาดังกล่าว เปลี่ยนเป็นเพศผู้ถึง 89 เปอร์เซ็นต์ Pavlidis และคณะ (2000) อ้างโดย Devlin และ Nagahama (2002) รายงานว่าลูกปลา sea bass (*D. labrax*) ซึ่งโดยปกติเลี้ยงที่น้ำอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาเลี้ยงในน้ำอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสมีผลให้ปลาดังกล่าวเป็นเพศผู้ล้วน Patio และคณะ (1996) อ้างโดย Devlin และ Nagahama (2002) พบว่าเมื่อนำปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ในระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อกำหนดเพศ มาเลี้ยงในน้ำอุณหภูมิสูงกว่าการเลี้ยงปกติ มีผลให้ปลามีสัดส่วนของเพศเมียมากขึ้น ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในปลา sockeye salmon (*O. nerka*) (Craig *et al*., 1996 อ้างโดย Devlin and Nagahama, 2002) นอกจากนี้ อุทัยรัตน์ (2538) รายงานว่าเมื่อปลากัดอยู่อย่างหนาแน่นและขาดอาหาร มีผลทำให้เกิดปลาเพศผู้มากกว่าปกติ และจากการศึกษาปลา *Trimma okinawae* พบว่าเมื่อนำเพศผู้ออกจากประชากร ปลาเพศเมียขนาดใหญ่ในประชากรจะเปลี่ยนเป็นเพศผู้ทดแทน (Sunobe and Nakazono, 1993 อ้างโดย Devlin and Nagahama, 2002)

3. ชีววิทยาปลาหมอไทย

ปลาหมอไทย (*A. testudineus*) มีชื่อสามัญ (common name) ว่า climbing perch, walking fish, climber และ perca มีลักษณะสำคัญประจำครอบครัว คือ มีอวัยวะช่วยหายใจ (labryrinth organ) อยู่ในช่องเหงือกใต้ลูกตา ประกอบด้วยแผ่นกระดูกบาง (lamellae) จำนวนมากพับกันอย่างไม่เป็นระเบียบคล้ายกับทางคดเคี้ยวที่ถูกห่อหุ้มด้วยผนังบาง ๆ ที่เต็มไปด้วยเส้นเลือดฝอย สามารถดูดซับออกซิเจนจากอากาศเมื่อปลาโผล่ขึ้นมาสูบอากาศจากผิวน้ำ ออกซิเจนจะถูกดูดซับผ่านเข้าไปในเส้นเลือดฝอยเหล่านั้น ปลาในครอบครัวนี้ส่วนมากเหงือกมีบทบาทในการหายใจน้อยกว่าอวัยวะช่วยหายใจ แม้ในน้ำมีออกซิเจนจำนวนมาก (สมพงษ์, 2542)

พบปลาหมอไทยได้ทั่วไปแถบอินเดีย จีนตอนใต้ พม่า ไทย มาเลเซีย ฟิลิปปินส์ ออสเตรเลีย รวมทั้งยุโรปและอเมริกา ในประเทศไทยพบทั่วทุกภาคตามแหล่งน้ำจืดทั่วไป (สมพงษ์, 2542) แต่ในประเทศอินเดียพบทั้งในเขตน้ำจืดและน้ำกร่อย (Sarkar *et al*., 2005) สถิติการประมงแห่งประเทศไทยปี พ.ศ. 2546 รายงานว่าผลผลิตปลาหมอไทยทั้งการเพาะเลี้ยงและจับจากธรรมชาติมีมูลค่ารวม 458.8 ล้านบาท (กรมประมง, 2546)

3.1 การเพาะพันธุ์

การเพาะพันธุ์ปลาหมอไทยควรใช้พ่อแม่พันธุ์ที่มีน้ำหนักอยู่ระหว่าง 60-120 กรัม หรือมีอายุประมาณ 5 เดือน ปลาในธรรมชาติจะวางไข่ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนตุลาคม เมื่อคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ได้แล้ว ปล่อยให้ปลาผสมกันแบบธรรมชาติ โดยมีน้ำใหม่เป็นตัวกระตุ้นการวางไข่ หรือกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่โดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์บูเซอรีลิน (busereline) มีชื่อการค้าว่า ซุปปรีแฟค (suprefact) ที่ความเข้มข้น 20-30 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม และยาเสริมฤทธิ์โดมเพอริโดน (domperidone) มีชื่อทางการค้าว่า โมทิเลียม-เอ็ม (motilium-m) ความเข้มข้น 5-10 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม โดยฉีดฮอร์โมนเข้ากล้ามเนื้อบริเวณใกล้ครีบหลัง หลังจากฉีดฮอร์โมนนาน 6-12 ชั่วโมง แม่ปลาจะวางไข่ โดยแม่ปลาหนัก 100 กรัม มีไข่ 52,693-63,075 ฟอง (สมพงษ์, 2542)

ไข่ปลาหมอไทยเป็นไข่ลอย ขนาดเล็ก ลักษณะกลม ไข่ที่ได้รับการผสมกับเชื้อตัวผู้จะมีสีเหลืองอ่อนใส เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8-1 มิลลิเมตร (Amornsakun *et al*., 2005) ไข่ฟักเป็นตัวในเวลา 18–20 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิน้ำเฉลี่ย 29.5 องศาเซลเซียส (สมพงษ์, 2531) หลังจากฟักออกจากไข่ตัวอ่อนมีถุงอาหารขนาดใหญ่ ทำให้ตัวอ่อนลอยผิวน้ำนาน 1-3 วัน หลังจากนั้นตัวอ่อนเริ่มเคลื่อนที่เป็นอิสระได้เนื่องจากครีบต่าง ๆ มีการพัฒนามากขึ้นและเริ่มกินอาหาร ตารางที่ 3 แสดงการให้อาหารลูกปลาหมอไทยวัยอ่อน ซึ่งอนุบาลด้วยความหนาแน่นที่เหมาะสม (20 ตัว/ลิตร) เมื่อลูกปลาหมอไทยเริ่มมีอายุ 3 วัน (สมพงษ์, 2542)

ตารางที่ 3 การให้อาหารลูกปลาหมอไทยวัยอ่อน

อายุลูกปลาหลังจากฟักออกจากไข่ (วัน)	ชนิดอาหาร
1-3	จากอาหารสะสมในถุงอาหาร
4-10	โรติเฟอร์
8-27	ไรแดง
24-32	อาหารแห้งมีระดับโปรตีนมากกว่า 30.59 %
33-78	อาหารแห้งมีระดับโปรตีน 30.59%

ที่มา : Doolgindachbaporn (1994) อ้างโดยสมพงษ์ (2542)

Amornsakun และคณะ (2005) รายงานว่า ลูกปลาหมอไทยอายุ 3, 6 วัน (ความยาวลำตัวเฉลี่ย 3.9-4.9 มม.) กินโรติเฟอร์ทั้งวันเฉลี่ย 9 และ 16 ตัว ตามลำดับ ลูกปลาอายุ 9 วัน (ความยาวลำตัวเฉลี่ย 4.4 มม.) กินทั้งไรแดงและโรติเฟอร์ โดยกินโรติเฟอร์ทั้งวันเฉลี่ย 19 ตัว และกินไรแดงทั้งวันเฉลี่ย 10 ตัว ลูกปลาอายุ 12, 15 วัน (ความยาวลำตัวเฉลี่ย 6.1-12.6 มม.) กินไรแดงทั้งวันเฉลี่ย 98 และ 113 ตัว ตามลำดับ

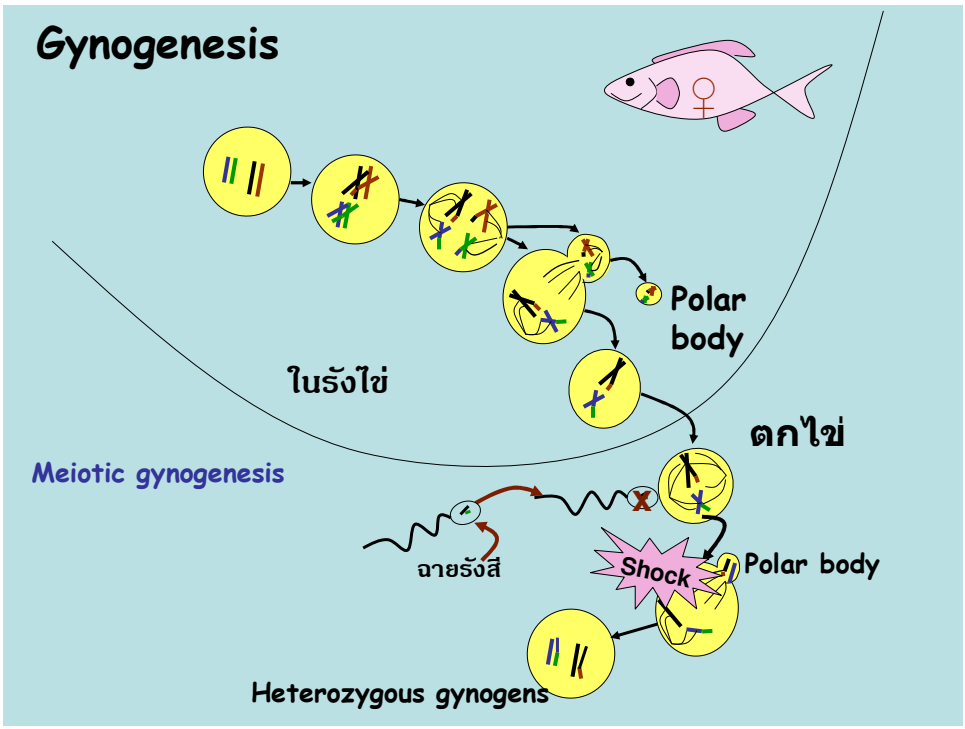
3.2 การเลี้ยงปลาหมอไทย

การเลี้ยงปลาหมอไทยในอดีตคาดว่าเริ่มจากการเลี้ยงร่วมกับการเลี้ยงปลาสลิดในบ่อดินประมาณ 70 ปีมาแล้ว (ศูนย์พัฒนาการประมงแห่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้, 2530) ปัจจุบันนิยมเลี้ยงปลาหมอไทยแบบชนิดเดียวในบ่อดิน โดยปล่อยปลาความยาว 2-3 เซนติเมตร ในอัตราความหนาแน่น 30-50 ตัวต่อตารางเมตร (กรมประมง, 2548) ระดับน้ำในบ่อไม่ควรต่ำกว่า 60 เซนติเมตร เมื่อเลี้ยงไปประมาณ 1 เดือน จึงเพิ่มน้ำในบ่อให้ได้ระดับ 1-1.5 เมตร เนื่องจากปลาหมอไทยเป็นปลากินเนื้อ ควรให้อาหารที่มีระดับโปรตีนไม่ต่ำกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ (นำชัย และ วิรัช, 2539)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษา ระยะเวลาหลังผสมไข่กับน้ำเชื้อก่อนเริ่มทำการช็อค อุณหภูมิที่ช็อค และระยะเวลาการช็อคที่เหมาะสมในการผลิตลูกปลาหมอไทยด้วยวิธีไจโนเจเนซีส

2. เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตลูกปลาหมอไทยเพศเมียล้วนด้วยวิธีไจโนเจเนซีส


Gynogenesis
Polar body
ในรังไข่
ตกไข่
Meiotic gynogenesis
ฉายรังสี
Shock
Polar body
Heterozygous gynogens