

การชักนำเพศปลาช่อนทะเลให้เสถียรด้วยเทคนิคขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า

Artificial Sex Induction of Cobia using Electroporation Technique

เสาวลักษณ์ ขาวแสง

Saowaluk Kawsang

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Technology and Environmental Management
Prince of Songkla University

2560

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การชักนำเพศปลาช่อนทะเลให้เสถียรด้วยเทคนิคขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า
ผู้เขียน นางสาวเสาวลักษณ์ ขาวแสง
สาขาวิชา เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศักย์ชิน บุญถวิล)

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พันธุ์ ทองชุมนุม)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ศักย์ชิน บุญถวิล)

.....
(Assoc. Prof. Dr. Raymond James Ritchie)

..... กรรมการ
(Assoc. Prof. Dr. Raymond James Ritchie)

..... กรรมการ
(ดร. อติสร เตือนตรานนท์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยฉบับนี้เป็น
ส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีและการ
จัดการสิ่งแวดล้อม

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร. ดำรงค์ดี ฟารุ่งแสง)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ _____

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศักย์ชิน บุญถวิล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ _____

(นางสาวเสาวลักษณ์ ขาวแสง)

นักศึกษา

(4)

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ _____

(นางสาวเสาวลักษณ์ ขาวแสง)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การชักนำเพศปลาช่อนทะเลให้เสถียรด้วยเทคนิคขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า
ผู้เขียน	นางสาวเสาวลักษณ์ ขาวแสง
สาขาวิชา	เทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม
ปีการศึกษา	2560

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้นำเสนอเทคนิคการแปลงเพศไข่ปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) โดยใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์กระตุ้นให้ผิวเซลล์ไข่ปลาขยายรูเปิดกว้างชั่วคราว ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ อาศัยแรงดันทางไฟฟ้านำพาสารละลายฮอร์โมนเพศผู้แอนโดรเจนเข้าสู่ภายในเซลล์ เพื่อชักนำเพศให้เสถียร ไข่ปลาช่อนทะเลที่ใช้ทดลองมีลักษณะทรงกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.29 ± 0.02 มิลลิเมตร ช่วงอายุ 6-19 ชั่วโมง หลังการปฏิสนธิ (hpf; hour post fertilization) บรรจุในช่องขั้วไฟฟ้าและกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์รูปคลื่นสี่เหลี่ยม (Pulse generator) ที่มีคาบสัญญาณในหัวไมโครวินาที แอมพลิจูดของสัญญาณไฟฟ้าช่วง 100-350 VDC (เทียบเท่าสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มในช่วง 26.25-87.5 กิโลโวลต์ต่อเมตร) เหนี่ยวนำเพศในสารละลายสูตรที่คิดค้นขึ้น โดยเฉพาะ (Electroporation Medium, EPM) อยู่ในระหว่างการจดสิทธิบัตร เป็นสารละลายที่มีส่วนผสมของฮอร์โมนเพศผู้ 17α -Methyltestosterone (MT) กับสารละลายเฉื่อยที่มีสภาพนำไฟฟ้าต่ำ คือ สารละลายแมนนิทอล (Mannitol) และน้ำตาล (Sucrose) เป็นสารตั้งต้นหลักผสมกับสารละลาย HEPES Buffer หรือ PBS Buffer ตามลำดับ ผลการทดลองพบว่าชุดแอมพลิจูด 350 VDC จำนวน 3 ลูกคลื่น คาบสัญญาณ 50 ไมโครวินาที ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT ช่วง 1,500-5,000 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถชักนำเพศไข่ปลาให้ขยายรูเปิดกว้างมากกว่า 1.5 เท่า และสารละลายที่มีอัตราแรกฟัก (Hatching) ซึ่งมีค่า 35.7 ± 1.8 ถึง 89.3 ± 1.17 %, (n=700) และอัตราการรอดตาย (Survival rate) 85.2 ± 1.7 % การทดลองประสบความสำเร็จที่ความหนาแน่นไข่ปลาช่วง 700-1,000 ฟองต่อ 10 มิลลิลิตร เทคนิคนี้สามารถลดระยะเวลาในการดำเนินการแปลงเพศไข่ปลาในระยะเวลา 15 นาทีต่อชุดการทดลอง โดยใช้สารละลายที่ผสมฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

คำสำคัญ: ปลาช่อนทะเล, การแปลงเพศ, การขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์, ฮอร์โมนแอนโดรเจน, 17α -Methyltestosterone (MT),

Thesis Title	Artificial sex induction of Cobia using electroporation technique
Author	Miss Saowaluk Kawsang
Major Program	Technology and Environmental Management
Academic	2017

ABSTRACT

The present study proposes a novel technique of monosex-male reversal for the commercially important marine fish of Cobia (*Rachycentron canadum*) using transient square pulse-electric and androgen hormone dose. The eggs of *R. canadum* had a simple spherical shape ($\approx 1.29 \pm 0.02$ mm. in diameter) which is smaller than that of freshwater fish. The critical age of 6-19 hpf (hour post fertilization) were induced in the external field with square wave pulses of μ s-duration and amplitude of 100-350 VDC (equivalent to 26.25-87.5 kV.m^{-1}). The suspending medium of electroporation (EPM) contained a poor conductive medium with a minimized concentration of the androgen hormone 17 α -Methyltestosterone (MT). Mannitol and Sucrose are the main osmotica with HEPES Buffer or PBS Buffer. Using the amplitude of 350 VDC of 3 square-wave pulses of 50 μ s duration with the concentration of 1,500 - 5,000 $\mu\text{g.l}^{-1}$ MT could be made all-male sex reversal. Hatching rate varied from 35.7 \pm 1.8 to 89.3 \pm 1.2 % (n=700) with the maximum survival rate to 85.2 \pm 1.7 %. Experimentations were achievable at a commercial density ranging from 700-1,000 eggs/10ml for each induction. Nevertheless, we have not yet accurately determined the sex reversal rate since their sex will be stable only after they are 2-3 years old. This novel technique could reduce the MT dose down to a minimized value with a rapid throughput of only quarter-hour per batch of eggs and using only 10 ml lots of hormone containing medium.

Keywords: Cobia, Sex reversal, Electroporation, 17 α -Methyltestosterone, Androgen hormone,

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดีขอขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก รองศาสตราจารย์ ดร.ศักดิ์ชิน บุญถวิล อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม Assoc.Prof.Dr Raymond James Ritchie, ที่ช่วยถ่ายทอดความรู้ ชี้แนะและให้กำลังใจในการทำวิจัยเสมอมา

ขอขอบคุณ คณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขต ภูเก็ต ที่มอบโอกาสในการศึกษาและสนับสนุนทุนการศึกษา พี่นักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือในการเบิก ยืม อุปกรณ์ สารเคมีเพื่อใช้ในการวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.อดิสร เตือนตรานนท์ ผู้อำนวยการหน่วยปฏิบัติการศูนย์นวัตกรรม การพิมพ์อิเล็กทรอนิกส์และอิเล็กทรอนิกส์อินทรีย์ และ ดร.ศุภา จารุงศรีรังสี ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์ และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สวทช. ที่แนะนำและให้ความช่วยเหลือในการผลิตอุปกรณ์ในการเหนี่ยวนำ ไฟฟ้าที่ใช้สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณผู้อำนวยการรัชช ศรีวิระชัย ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมง ชายฝั่ง จังหวัดภูเก็ต ที่ช่วยถ่ายทอดความรู้รวมถึงให้ความอนุเคราะห์ใช้ปลาช่อนทะเล

ขอขอบคุณผู้อำนวยการไฟบูลย์ บุญลิปตานนท์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนา ประมงชายฝั่ง จังหวัดกระบี่ ที่ช่วยถ่ายทอดความรู้ในการเพาะเลี้ยงปลาเก๋าเสือ และปลาช่อนทะเล

ขอขอบคุณศาสตราจารย์ อลงกลด แทนอมทอง อาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา คณะ วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ที่ช่วยถ่ายทอดความรู้เรื่องการเตรียมและ วิเคราะห์โครโมโซมในปลา

ขอขอบคุณ คุณสมหมาย บุญลอย เจ้าหน้าที่มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขต ภูเก็ต และคุณสมพร สาระการ ประธานศูนย์บริการนักท่องเที่ยวบ้านโคกไคร อำเภอบ้านปลิว จังหวัด พังงา ที่ช่วยถ่ายทอดความรู้ คำแนะนำวิธีการเลี้ยงปลากะรังจุดฟ้าและปลาเก๋าเสือ

ขอขอบคุณกำลังใจจากครอบครัวชาวแสง กิ่งแก้ว อภิชาติเมธา ศิริพร นักพีช และ เพื่อนทุกคน รวมถึงนักศึกษาปริญญาโท คณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตภูเก็ต ที่ให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ ทำให้การศึกษาในครั้งนี้ประสบผลสำเร็จ

เสาวลักษณ์ ชาวแสง

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ (ภาษาไทย)	(5)
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการรูป	(12)
สัญลักษณ์และตัวย่อ	(14)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์	3
1.3 ขอบเขตการวิจัย	4
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	5
2.1 ข้อมูลทั่วไปของปลาช่อนทะเล (Taxonomy)	6
2.2 ลักษณะโครโมโซมของปลาช่อนทะเล	9
2.3 ความแตกต่างทางกายภาพของปลาช่อนทะเลเพศผู้และเพศเมีย	10
2.4 การเพาะเลี้ยงและอนุบาลปลาช่อนทะเล	12
2.5 คุณค่าทางอาหารของปลาช่อนทะเล	18
2.6 ข้อมูลด้านการตลาดของปลาช่อนทะเล	18
2.7 งานวิจัยในการเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลที่ผ่านมา	18
2.8 ลักษณะทางเศรษฐกิจของปลาช่อนทะเล	21
2.9 การศึกษาการพัฒนาการของคัพภะ	24
2.10 ฮอโมน 17 α -Methyltestosterone (MT)	28
2.11 ความเป็นพิษของ 17 α -Methyltestosterone (MT)	30
2.12 เทคนิคการขยายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า (Electroporation)	31
2.13 คุณสมบัติไฟฟ้าของอนุภาคชีวภาพในเซลล์ทดลอง	32
2.14 การเคลื่อนที่ของสารผ่านเซลล์ที่เกิดขึ้นในการขยายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า	32
2.15 การรักษาสมดุลของเซลล์ชีวภาพในสารละลายแวนลอยเซลล์	33

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.16 สนามไฟฟ้าแบบพัลส์สี่เหลี่ยม (Square-pulse electric field)	35
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	39
3.1 การเตรียมตัวอย่างไขปลาช่อนทะเลที่ใช้ในการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า	41
3.2 การทดลองเพื่อเตรียมสารละลายที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำไขปลาในสนามไฟฟ้า	42
3.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้เหนี่ยวนำ (Electroporation medium, EPM)	43
3.4 การทดลองหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เหนี่ยวนำไขปลาช่อนทะเล	47
3.5 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง	48
3.6 การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบสัณฐานไขปลาช่อนทะเลด้วยกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)	49
3.7 วิธีการตรวจสอบเพศปลาช่อนทะเล	51
3.8 การเตรียมโครโมโซมในปลากระรังจุดฟ้าและปลากระรังลายเสือ	52
3.9 อุปกรณ์ขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไขปลาด้วยไฟฟ้า	59
บทที่ 4 ผลการศึกษาและการอภิปรายผล	61
4.1 ผลการทดลองเตรียมสารละลายที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำไขปลาในสนามไฟฟ้า	61
4.2 เงื่อนไขทางไฟฟ้าที่เหมาะสมในการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไขปลาช่อนทะเล	63
4.3 การทดลองปริมาณฮอร์โมน 17 α -Methyl testosterone (MT)	82
4.4 ผลตรวจสอบสัณฐานไขปลาช่อนทะเลด้วยภาพถ่าย SEM	89
4.5 ผลการตรวจสอบโครโมโซมในปลากระรังจุดฟ้าและปลากระรังลายเสือ	92
บทที่ 5 บทสรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	96
5.1 สรุปผลการวิจัย	96
5.2 ข้อเสนอแนะ	97
เอกสารอ้างอิง	98
ประวัติผู้เขียน	105

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ผลผลิตปลาช่อนทะเลของโลกในปี ค.ศ. 2000-2014	23
2.2 ตัวอย่างชนิดพันธุ์ปลาและระยะเวลาฟัก	24
2.3 พัฒนาการของคัพภะปลาช่อนทะเล	25
2.4 คุณสมบัติฮอร์โมน 17 α -Methyltestosterone (MT)	29
3.1 ระดับปริมาณความเข้มข้นของฮอร์โมนใน EPM ที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	46
4.1 ผลการทดลองการเข้ากันได้ของสารละลาย	63
4.2 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM1	65
4.3 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM2	66
4.4 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM3	67
4.5 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM4	68
4.6 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลายเมนนิทอลที่มีส่วนผสม HEPES Buffer และสารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม)	70
4.7 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม)	71
4.8 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย HEPES Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม)	73
4.9 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม)	74
4.10 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสม HEPES Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม)	76
4.11 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสม PBS Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม)	77
4.12 ค่าอัตราการฟักตัวและอัตราการรอดในสารละลาย EPM 1-4	81
4.13 ค่าอัตราการฟักตัวและอัตราการรอดในฮอร์โมนที่ความเข้มข้น 1,000-100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร	84
4.14 แสดงอัตราการรอด (%) ในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย HEPES Buffer และผสมสารละลาย MT	86

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.15 แสดงอัตราการรอด (%) ในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และผสมสารละลาย MT	88
4.16 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากการเหนี่ยวนำไขปลาซ็อนทะเลและงานวิจัยอื่น	89

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
2.1 ลักษณะทั่วไปของปลาช่อนทะเล	6
2.2 การแพร่กระจายของปลาช่อนทะเล	7
2.3 โครโมโซมดิพลอยด์ของปลาช่อนทะเล	9
2.4 ลักษณะสองเพศในตัวเดียวกัน (Intersex)	10
2.5 ลักษณะสองเพศในตัวเดียวกัน (Intersex)	11
2.6 รังไข่ของปลาช่อนทะเล	11
2.7 อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของปลาช่อนทะเล	12
2.8 ลูกปลาช่อนทะเลอายุ 10 วัน	14
2.9 ลูกปลาช่อนทะเลอายุ 45 วัน	15
2.10 พัฒนาการระยะต่าง ๆ ของการเลี้ยงปลาช่อนทะเลในได้หวัน	20
2.11 สูตรการให้อาหารลูกปลาช่อนทะเล	20
2.12 ผลผลิตปลาช่อนทะเลของโลกในปี ค.ศ. 2000-2014	23
2.13 พัฒนาการของคัพภะปลาช่อนทะเล	27
2.14 โครงสร้าง 17 α -Methyltestosterone	30
2.15 การแพร่ (Diffusion)	33
2.16 โครงสร้าง HEPES Buffer	34
2.17 รูปสัญญาณพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (square-pulse electric field)	35
2.18 ภาพถ่าย SEM เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ ความเข้มและความถี่ที่เหมาะสม	36
2.19 ภาพถ่าย SEM แสดงรูที่ปรากฏบนเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลา (chorion pore) 6 ชนิด	37
2.20 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	38
3.1 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย	40
3.2 ไข่ปลาช่อนทะเลช่วงระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะบลาสโตพอร์ (Blastopore)	41
3.3 กระเพาะเพาะฟักตัวอ่อนปลาช่อนทะเล	48
3.4 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของรังไข่ (วินัย เนตรวงศ์, และคณะ, 2556)	52
3.5 ลักษณะภายนอกของปลากะรังจุดฟ้าและปลากะรังลายเสือ	53
3.6 อุปกรณ์เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้าสำหรับขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาด้วยไฟฟ้า	60
3.7 ลักษณะของขั้วไฟฟ้า (ภาพจำลองไม่เป็นไปตามสเกล)	60

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.1 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM1	65
4.2 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM2	66
4.3 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM3	67
4.4 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM4	68
4.5 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย ที่มีส่วนผสม HEPES Buffer และ สารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม)	70
4.6 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม)	72
4.7 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย HEPES Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม)	73
4.8 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม)	75
4.9 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสม HEPES Buffer และผสม สารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม)	76
4.10 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสม PBS Buffer และผสม สารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม)	78
4.11 อัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย HEPES Buffer และผสม สารละลาย MT	87
4.12 แสดงอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และผสม สารละลาย MT	88
4.13 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดลักษณะไขปลาช่อนทะเลชุดควบคุม	90
4.14 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)	91
4.15 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงความหนาแน่น ลักษณะ และขนาดความกว้างของรูในไขปลาช่อนทะเล	91
4.16 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงความหนาแน่น ลักษณะและขนาดความกว้างของรูในไขปลาช่อนทะเล	92
4.17 โครโมโซมระยะเมทาเฟสในปลากะรังลายเสือ	93
4.18 โครโมโซมระยะเมทาเฟสในปลากะรังจุดฟ้า	94

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

ER	Electroporation
EPM	Electroporation medium
hpf	hour post fertilization
hCG	human chorionic gonadotropin
I.U.	International Unit
MT	17 α -Methyltestosterone
ppt.	part per thousand
PUFA	Polyunsaturated fatty acid
SEM	Scanning electron microscop

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของการวิจัย

ปลาช่อนทะเล จัดอยู่ในกลุ่ม Perciformes เป็นปลาสายพันธุ์เดียวที่จัดอยู่ในวงศ์ Rachycentridae ชื่อวิทยาศาสตร์ *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) และมีชื่อเรียกทั่วไป อาทิ Ling, Lemon fish และ Crab-eater เป็นต้น ปลาช่อนทะเลเป็นปลาผิวน้ำที่อาศัยอยู่บริเวณเขตชายฝั่งทะเล และบริเวณไหล่ทวีป มีการแพร่กระจายในทะเลเขตอบอุ่น ยกเว้นพื้นที่ในเขตตอนกลางและฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ปลาชนิดนี้มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว เมื่อโตเต็มที่จะมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 2 เมตร และมีน้ำหนักประมาณ 61 กิโลกรัม โดยทั่วไปในธรรมชาติปลาชนิดนี้มีอายุยืนถึง 15 ปี (Jeffrey, et al., 2005) ปลาช่อนทะเลจัดเป็นปลาเศรษฐกิจที่มีความสำคัญและกำลังได้รับความสนใจจากผู้บริโภค เนื่องจากเป็นปลาเนื้อขาว ไม่มีกลิ่นคาว นิยมนำมาทำซาซิมิ ซึ่งเป็นที่ต้องการในตลาดได้หัววันเป็นอย่างมาก (FAO Fishery Statistics, 2006) อย่างไรก็ตามปลาชนิดนี้มีการแพร่พันธุ์โดยธรรมชาติในปริมาณน้อยจึงไม่เพียงพอต่อผู้บริโภค

ในปี พ.ศ.2518 มีการศึกษาค้นคว้าโดยคณะวิจัยจากนอร์ทคาโรไลน่า ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อหาแนวทางในการรวบรวมไข่ปลาช่อนทะเลจากธรรมชาติ โดยนำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตในระบบปิด จนเป็นที่สำเร็จในระดับหนึ่ง จนกระทั่งในปี พ.ศ. 2533 ประเทศไต้หวันสามารถนำพ่อแม่พันธุ์ปลาที่จับจากธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงในระบบปิดจนวางไข่ได้เป็นที่สำเร็จ หลังจากนั้นจึงมีผู้นำผลงานวิจัยไปใช้ต่อยอดในเชิงพาณิชย์ตัวอย่างเช่นในปี พ.ศ. 2545 มีผลผลิตปลาช่อนทะเลทั่วโลกทั้งจากการเพาะเลี้ยงและจับจากธรรมชาติมีประมาณ 10,416 ตัน ซึ่งประเทศที่สามารถเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลได้มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ ประเทศไต้หวัน ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ บราซิล และสหราชอาณาจักรอาหรับเอมิเรต ในปัจจุบันประเทศไต้หวันเป็นผู้ผลิตปลาช่อนทะเลอันดับต้นของโลก (Jeffrey, et al., 2005) และมีการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงอย่างเป็นรูปธรรม

เพื่อพุ่งเป้าสู่อุตสาหกรรมการค้าเต็มรูปแบบ อย่างไรก็ตามผลผลิตจากการเพาะเลี้ยงและการจับจากธรรมชาติยังไม่เพียงพอต่อความต้องการทั้งภายในประเทศและเพื่อการส่งออกในรูปแบบปลาแช่แข็งและแปรรูป ส่งผลให้ในปี พ.ศ. 2547 ประเทศไต้หวันได้พัฒนาเทคนิควิธีการเลี้ยงจนเพิ่มขีดความสามารถในการส่งออกและมีผลผลิตเฉลี่ย 5,000 ตัน ได้เป็นที่สำเร็จ (Allen, 2000 และ Florida Museum, 2007) ทั้งนี้เทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงยังมีประเด็นเปิดที่อาจพัฒนาต่อยอดได้หลายประเด็น เช่น ความเสถียรของเพศปลาในพ่อแม่พันธุ์ระหว่างผสมพันธุ์ช่วงอายุ 1-3 ปีแรก การขาดแคลนพ่อแม่พันธุ์ปลาทำให้ขาดความต่อเนื่องของการเลี้ยง

ในปี พ.ศ. 2548 รัฐบาลนอร์เวย์ได้ให้ความช่วยเหลือประเทศไทย ภายใต้โครงการความช่วยเหลือแก่ผู้ประสบภัยสึนามิและฟื้นฟูทรัพยากรธรรมชาติ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและพัฒนาการเลี้ยงปลาในกระชังขนาดใหญ่ ซึ่งรัฐบาลนอร์เวย์ได้ส่งผู้เชี่ยวชาญด้านวิชาการเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลในกระชังขนาดใหญ่ โดยติดตั้งกระชังบริเวณพื้นที่บ้านสามแหม่ม อ่าวปอ และตะกั่วทุ่ง ซึ่งเป็นรอยต่อระหว่างจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดพังงา โดยสถานที่ดังกล่าวเป็นพื้นที่นำร่องในการทดลองเลี้ยงภายใต้การดูแลของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต ทั้งนี้กรมประมงมีความมุ่งหวังให้เกษตรกรสามารถเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเล เพื่อเพิ่มรายได้ตอบสนองความต้องการของท้องตลาด ซึ่งประเทศไต้หวันต้องการปลาที่มีขนาดน้ำหนักมากกว่า 7 กิโลกรัม (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต, 2549) เพื่อทำปลาแช่เย็นส่งโรงงานแปรรูป ทั้งนี้ราคาเนื้อปลาช่อนทะเลอยู่ที่กิโลกรัมละ 120-150 บาท ทำให้การเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลในกระชังเป็นที่นิยมมากขึ้น (Liao, *et al.*, 2004 และ วินัย เนตรวงศ์ และคณะ, 2556)

ในปัจจุบันมีการนำฮอร์โมน 17α -Methyltestosterone (MT) ซึ่งเป็นฮอร์โมนแอนโดรเจนเพศผู้ที่นำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจทั้งในและนอกประเทศอย่างกว้างขวาง เนื่องจากฮอร์โมนชนิดนี้มีคุณสมบัติในการแปลงเพศปลาให้เป็นเพศผู้ โดยผสมลงในอาหารให้แก่สัตว์น้ำเพื่อเปลี่ยนเพศให้เป็นเพศที่ต้องการ รวมถึงการใช้สารเคมีและฮอร์โมนชนิดอื่นที่มีส่วนช่วยในการเพิ่มผลผลิต อัตราการแลกเนื้อในปลาให้สูงขึ้น และเพื่อลดระยะเวลาในการเลี้ยง (เรณู ว่องสงสาร, และคณะ, 2549) อย่างไรก็ตามฮอร์โมนดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิต และต่อผู้บริโภคได้ เนื่องจากฮอร์โมน MT ไม่ละลายในน้ำ แต่สลายตัวเมื่อถูกแสงแดด ความร้อน และถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ การตกค้างของสารฮอร์โมน MT จึงเกิดขึ้นในบริเวณที่ไม่ได้รับแสงและความร้อน (Fitzpatrick, *et al.*, 1998)

งานวิจัยนี้ทำการแปลงเพศปลาช่อนทะเลด้วยวิธีทางไฟฟ้าซึ่งเป็นเทคนิคแรกของโลกเพื่อลดปริมาณการใช้สารฮอร์โมนเพศ เพื่อลดระยะเวลาและลดโอกาสการปนเปื้อนสารฮอร์โมนเพศสังเคราะห์สู่ธรรมชาติ เป็นผลงานต่อยอดโดยคณะผู้วิจัยได้เริ่มศึกษาเบื้องต้นกับปลาชนิด

(Bunthawin, *et al.*, 2015) แล้วจึงขยายผลต่อยอดกับไข่ปลาเศรษฐกิจน้ำเค็ม อาทิ ปลากระรังจุดฟ้า และปลาช่อนทะเล อย่างไรก็ตามไข่ปลาชนิดแรกมีจำนวนตัวช่วยให้ศึกษาค่อนข้างจำกัด จึงได้ทดลองกับไข่ปลาช่อนทะเล โดยไข่ปลาที่ใช้ในการทดลองนั้นต้องมีการปฏิสนธิแล้ว ซึ่งมีอายุอยู่ระหว่างการพัฒนาตัวระยะช่วงระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะบลาสโตพอร์ (Blastopore) โดยแช่ในสารละลายฮอร์โมนเพศที่มีค่าการนำไฟฟ้าต่ำเพื่อกระตุ้นไข่ปลาด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์รูปร่างสี่เหลี่ยมที่มีความเข้มสูง ซึ่งเป็นจังหวะที่เหมาะสมต่อทดลองปรับเปลี่ยนเงื่อนไขทางไฟฟ้าจนได้ค่าที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำเซลล์ไข่ปลาให้ขยายรูเปิดกว้างชั่วคราว (Electroporation) (Chang, *et al.*, 1992) เพื่อเสริมประสิทธิภาพการนำพาอนุภาคของฮอร์โมนเข้าสู่ภายในเซลล์ไข่ปลาโดยอาศัยแรงทางไฟฟ้าเป็นตัวกระตุ้น ทั้งนี้ได้ทำการศึกษาอัตราการฟัก (Hatching) อัตราการรอดตาย (Survival rate) และตรวจสอบสัณฐานทางกายภาพเพื่อคุณลักษณะของไข่ปลาบริเวณพื้นผิวเซลล์ไข่ปลาผ่านภาพถ่าย “Scanning Electron Microscope” (SEM) เพื่อคุณลักษณะพื้นผิวเซลล์ไข่ปลา ความหนาแน่นรูที่ผิว ขนาดความกว้างของรูชุดควบคุมและชุดที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า ทั้งนี้ชุดอุปกรณ์ไฟฟ้าที่ได้พัฒนาขึ้นนี้อยู่ในระหว่างการจดสิทธิบัตร

1.2 วัตถุประสงค์ (Objectives)

- 1) เพื่อทราบเงื่อนไขของสนามไฟฟ้าแบบพัลส์รูปร่างสี่เหลี่ยมที่เหมาะสมต่อการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาช่อนทะเล
- 2) เพื่อลดการใช้ฮอร์โมนเพศ 17 α -Methyltestosterone (MT) ที่ใช้แปลงเพศของปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*)

1.3 ขอบเขตการวิจัย (Scope)

งานวิจัยนี้ใช้เทคนิคทางไฟฟ้าขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์รูปสี่เหลี่ยมเพื่อเปิดขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาอ่อนทะเลระหว่างช่วงการพัฒนาคัพภะระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะบลาสโตพอร์ (Blastopore) แซ่ในสารละลายที่ใช้เหนี่ยวนำไข่ปลาอ่อนทะเลในสนามไฟฟ้า (Electroporation medium, EPM) ที่มีส่วนผสมของฮอริโมนเพศ ความเข้มข้นในช่วง 1,000-100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร และสารละลายที่มีคุณสมบัติการนำไฟฟ้าต่ำ ทำการทดสอบที่ความหนาแน่นไข่ปลาจำนวน 700-1,000 ฟอง ต่อการเหนี่ยวนำแต่ละครั้ง (โดยประมาณ) กำหนดแอมพลิจูดสัญญาณในช่วง 100-350 VDC (เทียบเท่าสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มในช่วง 26.25-87.5 กิโลโวลต์ต่อเมตร) กระตุ้นด้วยช่วงสัญญาณคาบบวก 50 ไมโครมิลลิวินาที จำนวนลูกคลื่นสัญญาณ 3 ลูกคลื่น เปรียบเทียบผลกับชุดการทดลองที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า (ชุดควบคุม) เพื่อศึกษาอัตราการฟัก (Hatching) อัตราการรอดตาย (Survival rate) และตรวจสอบสัญญาณลักษณะของไข่ปลาบริเวณพื้นผิวเซลล์ไข่ปลาผ่านภาพถ่าย SEM เพื่อดูลักษณะพื้นผิวเซลล์ไข่ปลา ความหนาแน่นรูที่ผิว ขนาดความกว้างของรูชุดควบคุมและชุดที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า เพื่อหาเงื่อนไขทางไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาอ่อนทะเล

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1) ได้ชุดอุปกรณ์ต้นแบบเหนี่ยวนำเซลล์เพื่อการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลา
- 2) ทราบเงื่อนไขการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาอ่อนทะเล
- 3) ทราบปริมาณของฮอริโมนที่เหมาะสมในการแปลงเพศปลาอ่อนทะเลด้วยวิธีการเหนี่ยวนำเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์รูปสี่เหลี่ยม
- 4) สามารถขยายผลกับไข่ปลา เซลล์ชีวภาพชนิดอื่นได้ และทราบความเข้มข้นของสารแขวนลอยที่เหมาะสมกับเซลล์แต่ละชนิด

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

การศึกษาเรื่องการชักนำเพศปลาช่อนทะเลให้เสถียรด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าเป็นงานวิจัยต่อยอดองค์ความรู้จากโครงการวิจัยแปลงเพศไข่ปลานิลซึ่งเป็นไข่ปลาน้ำจืด ทั้งนี้งานวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์นี้ถือเป็นผลงานนาร่องครั้งแรกที่เริ่มศึกษากับไข่ปลาเศรษฐกิจน้ำเค็ม ประกอบกับยังไม่มีทฤษฎีรองรับกับไข่ปลาที่มีลักษณะทรงกลมที่เป็นไข่ปลาชนิดลอยน้ำ กอปรกับยังไม่มี ความชัดเจนในเรื่องกระบวนการวิธีเตรียมไข่ปลาน้ำเค็มเพื่อเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้าในการนำไปปฏิบัติทดลองจริง ซึ่งเป็นผลงานวิจัยที่ขยายองค์ความรู้ต่อยอดจาก Bunthawin, *et al.* (2015) ทั้งนี้องค์ความรู้ส่วนใหญ่ได้จากการทดลอง เนื้อหางานวิจัยประกอบไปด้วยองค์ความรู้หลายส่วน ได้แก่ เงื่อนไขค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำเซลล์ไข่ปลาด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์รูปสี่เหลี่ยม เงื่อนไขของสารละลายที่เหมาะสมต่อการทำให้รูที่ผิวเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาช่อนทะเลเปิดขยายชั่วคราว อาทิ ความเข้มข้นของสารละลาย สูตรองค์ประกอบสารอื่น ๆ ที่อยู่ในสารละลาย และชุดอุปกรณ์การทดลองทางไฟฟ้า หัวข้อการตรวจเอกสารตามเนื้องานที่กล่าวมิดังนี้

- 2.1 ข้อมูลทั่วไปของปลาช่อนทะเล (Taxonomy)
- 2.2 ลักษณะโครโมโซมของปลาช่อนทะเล
- 2.3 ความแตกต่างทางกายภาพของปลาช่อนทะเลเพศผู้และเพศเมีย
- 2.4 การเพาะเลี้ยงและอนุบาลปลาช่อนทะเล
- 2.5 คุณค่าทางอาหารของปลาช่อนทะเล
- 2.6 ข้อมูลด้านการตลาดของปลาช่อนทะเล
- 2.7 งานวิจัยในการเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลที่ผ่านมา
- 2.8 ลักษณะทางเศรษฐกิจของปลาช่อนทะเล
- 2.9 การศึกษาการพัฒนากายของคัพภะ
- 2.10 ฮอโมน 17 α -Methyltestosterone (MT)
- 2.11 ความเป็นพิษของ 17 α -Methyltestosterone (MT)
- 2.12 เทคนิคการขยายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า (Electroporation)

- 2.13 คุณสมบัติไฟฟ้าของอนุภาคชีวภาพในเซลล์ทดลอง
- 2.14 การเคลื่อนที่ของสารผ่านเซลล์ที่เกิดขึ้นในการขยายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า
- 2.15 การรักษาสมดุลของเซลล์ชีวภาพในสารละลายแชนนอนยเซลล์
- 2.16 สนามไฟฟ้าแบบพัลส์สี่เหลี่ยม (Square-pulse electric field)

2.1 ข้อมูลทั่วไปของปลาช่อนทะเล

2.1.1 อนุกรมวิธาน (Taxonomy)

ปลาช่อนทะเล จัดอยู่ในกลุ่ม Perciformes ปลาสายพันธุ์เดียวที่อยู่ในวงศ์ Rachycentridae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) มีชื่อเรียกหลายชื่อ อาทิ Ling, Lemon fish, Crab-eater ซึ่งได้มีการจัดจำแนกอันดับทางอนุกรมวิธานไว้ดังนี้

Kingdom : Animalia

Phylum : Chordata

Class : Actinopterygii

Order : Perciformes

Family : Rachycentridae

Genus : *Rachycentron* Kaup, 1826

Species: *Rachycentron canadum*
(Linnaeus, 1766)



รูปที่ 2.1 ลักษณะทั่วไปของปลาช่อนทะเล (อ้างอิงจาก <http://www.foodnetworksolution.com>, วันที่ 15 เมษายน พ.ศ. 2560)

2.1.2 ลักษณะทั่วไปของปลาช่อนทะเล

ปลาช่อนทะเลเป็นปลาผิวน้ำที่อาศัยอยู่บริเวณเขตชายฝั่งทะเลและบริเวณไหล่ทวีป ปลาชนิดนี้มีการแพร่กระจายในเขตทะเลอบอุ่น ยกเว้นพื้นที่ในเขตตอนกลางและฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก (Liao, *et al.*, 2004) ดังรูปที่ 2.2 ปลาช่อนทะเลมีหางแบบเว้าลึก (Fork) หรือแบบเสี้ยวพระจันทร์ (Lunate) ส่วนของครีบบมีสีน้ำตาลเข้ม ไม่มีถุงลม ส่วนหัวแบน ตามีขนาดเล็ก ขากรรไกรล่างยื่นยาวกว่าขากรรไกรบนเล็กน้อย มีฟันแบบ Villiform (ปุ่มเล็ก ๆ) อยู่บนขากรรไกรเพดานปาก และลิ้น ปากกว้างมีฟันเป็นซี่แหลมคม มีลำตัวค่อนข้างกลม ท่อนหางแบน หัวทรงกรวย นัยน์ตาเล็ก ขากรรไกรล่างยาวล้ำขากรรไกรบน มุมปากอยู่บน้านัยน์ตา (วินัย เนตรวงศ์ และคณะ, 2556) ครีบหลังของปลาช่อนทะเลจะแยกออกจากกันเป็นสองส่วน โดยที่ส่วนหน้าประกอบด้วยก้านครีบเดี่ยว 3 ก้าน และก้านครีบแขนง 23-27 ก้าน มีครีบอกใหญ่และปลายแหลม ครีบท้องมีจุดเริ่มต้นอยู่หน้าจุดเริ่มต้นของครีบอก ครีบกันมีฐานยาว ครีบหางมีปลายเว้าตื้น ๆ ลักษณะสีของปลาช่อนทะเลจะมี สีน้ำตาลเข้มบริเวณหลังและข้างลำตัว ช่วงที่ปลาช่อนทะเลอายุยังน้อยนั้นจะมีลายสีขาว 2 ลาย ยาวตามลำตัว (ทวี จินดามัยกุล, 2551) สำหรับในประเทศไทยปลาชนิดนี้มีการแพร่กระจายทั้งฝั่งทะเลอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน



รูปที่ 2.2 การแพร่กระจายของปลาช่อนทะเล (Shaffer and Nakamura, 1989)

2.1.3 ขนาด อายุ การเจริญเติบโต

ปลาช่อนทะเลเป็นปลาที่เจริญเติบโตเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับปลาชนิดอื่น ในช่วงระยะเวลา 1 ปี มีอัตราการเจริญเติบโตได้ประมาณ 5-7 กิโลกรัม มีอายุถึง 15 ปี ปลาเพศผู้จะมีความสมบูรณ์เพศอายุประมาณ 2 ปี มีขนาดความยาวประมาณ 60-65 เซนติเมตร ปลาเพศเมียจะมีความสมบูรณ์เพศอายุประมาณ 3 ปี มีขนาดความยาวประมาณ 80 เซนติเมตร (วินัย เนตรวงศ์ และคณะ, 2556)

2.1.4 นิสัยการกินอาหาร

ปลาช่อนทะเลเป็นปลาที่กินอาหารที่อยู่ตามพื้น เช่น กุ้ง หอย ปู หมึก และปลา ปลาชนิดนี้เป็นปลาที่ได้รับฉายานามว่า “Crab eater” เพราะปลาช่อนทะเลชอบกินปูเป็นอาหาร วิธีการล่าเหยื่อของปลาชนิดนี้คือ การรวมตัวกันเป็นฝูงประมาณ 3-100 ตัว

2.1.5 การสืบพันธุ์ (Reproduction)

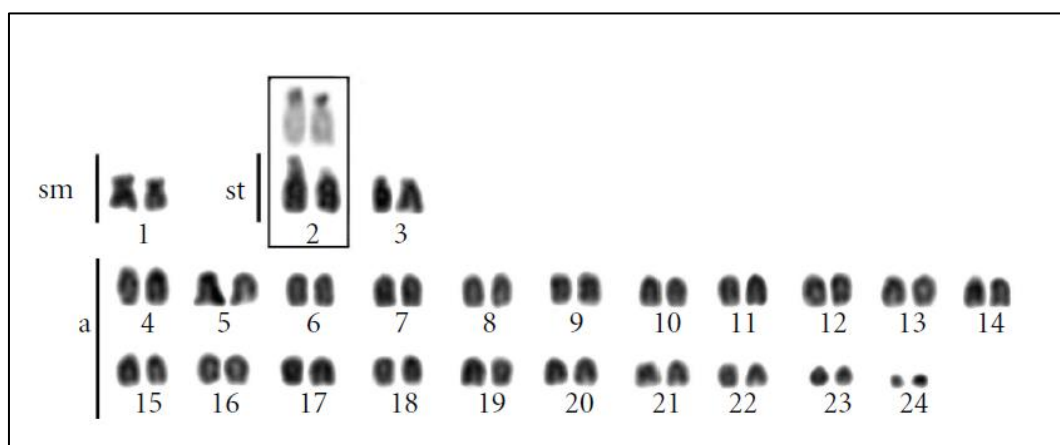
ปลาช่อนทะเลเป็นปลาที่ชอบอยู่เป็นฝูง วางไข่ตอนกลางคืนจนถึงรุ่งเช้า ในแต่ละพื้นที่จะมีช่วงระยะเวลาในการวางไข่ที่แตกต่างกัน ได้แก่ ในบริเวณมหาสมุทรแอตแลนติกในช่วงเดือนมิถุนายนถึงสิงหาคม บริเวณ North Carolina วางไข่ระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน บริเวณอ่าวเม็กซิโกวางไข่ในช่วงเดือนเมษายนถึงกันยายน ซึ่งความถี่ในการวางไข่ของปลาช่อนทะเลแต่ละครั้งจะห่างกันประมาณ 4-12 วัน และจะวางไข่ครั้งละประมาณ 300,000-2,000,000 ฟองต่อครั้ง ไข่ปลาเป็นไข่ประเภทลอยน้ำ มีลักษณะกลมใส มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.29 ± 0.02 มิลลิเมตร พบว่าปลาชนิดนี้วางไข่ในที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส และที่ความเค็มประมาณ 28.5 -30 ส่วนในพันส่วน (part per thousand) และจะฟักออกเป็นตัวเวลา 22 ชั่วโมง 20 นาที (Sakthivel, *et al.*, 2012 และ อาคม สิงหบุญ และคณะ, 2555) ลูกปลาแรกฟักมีความยาวเฉลี่ย 3.53 ± 0.15 มิลลิเมตร ไข่แดงมีปริมาตร 3.15 ± 0.99 ลูกบาศก์มิลลิเมตร หยดน้ำมันขนาด 0.35 ± 0.03 มิลลิเมตร ปากลูกปลาเปิดเมื่ออายุ 36 ชั่วโมง เริ่มพบอาหารในกระเพาะเมื่ออายุ 48 ชั่วโมง ไข่แดง และหยดน้ำมันยุบสมบูรณ์เมื่ออายุ 54 ชั่วโมง และ 7 วัน ตามลำดับ ลูกปลาพัฒนาเข้าสู่ระยะปลาวัยรุ่นเมื่อมีอายุ 45 วัน (อาคม สิงหบุญ และคณะ, 2555) พ่อแม่ปลาช่อนทะเลจะสามารถวางไข่ได้ตลอดปี โดยตัวผู้จะมีความสมบูรณ์เพศเมื่ออายุประมาณ 2 ปี ส่วนตัวเมียจะมีความสมบูรณ์เพศเมื่ออายุประมาณ 3 ปี

2.1.6 ศัตรูและโรคของปลาที่พบ

ศัตรูของปลาช่อนทะเลที่พบโดยธรรมชาติ ได้แก่ ปลาที่อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำหรือกลางน้ำ เช่น ปลาโลมา ปลาสาก ปลาฉลาม สำหรับสาเหตุของโรคปลานั้นมักเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส และปรสิต ได้แก่ พวกแบคทีเรียก่อให้เกิดโรค เช่น Pasteurellosis, Vibriosis และ Streptococcosis โรคที่เกิดจากไวรัส เช่น Lymphocystis และปรสิต เช่น Myxosporidea Trichodina, Neobenedenia และ *Amyloodinium infestations* นอกจากนี้สาเหตุที่ทำให้เกิดโรคอาจไปยับยั้งหรือลดการถ่ายเทออกซิเจนผ่านเหงือกของปลา เนื่องจากปลาช่อนทะเลเป็นปลาที่ว่องไว มีเจริญเติบโตที่รวดเร็ว ทั้งนี้ปรสิตสามารถทำให้เกิดอันตรายกับปลาได้โดยเฉพาะ Parasite (*Amyloodinium infestations*) ซึ่งสามารถฆ่าลูกปลาวัยอ่อนในระยะ Juvenile ได้ภายใน 1 วัน

2.2 ลักษณะโครโมโซมของปลาช่อนทะเล (Chromosome of *Rachycentron canadum*)

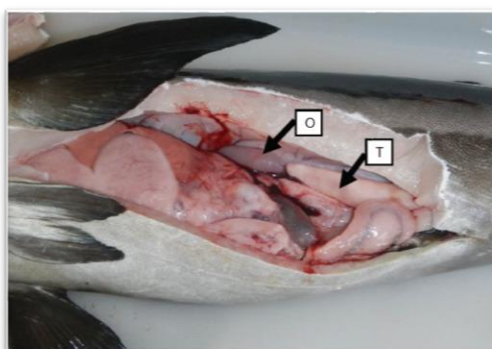
การศึกษาโครโมโซมของปลาช่อนทะเล (*R. canadum*) ของ Uedson, *et al.* (2011) โดยทำการเก็บตัวอย่างเซลล์จากบริเวณไตและเหงือก เพราะอวัยวะส่วนนี้มีการแบ่งเซลล์ตลอดเวลา โดยจะใช้เซลล์ระยะเมทาเฟส (Metaphase) ซึ่งเซลล์ระยะดังกล่าวโครโมโซมจะหดสั้นมากที่สุด และเห็นลักษณะได้ชัดเจนเมื่อมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 48 แท่ง ($2n=48$) เป็นชนิดเทโทเซนทริก ที่มีแขนข้างเดียว ดังรูปที่ 2.3



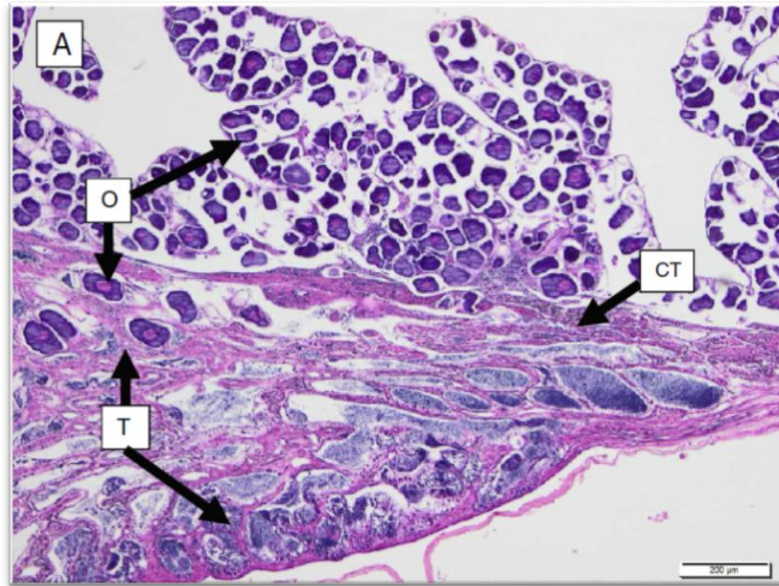
รูปที่ 2.3 โครโมโซมดิพลอยด์ของปลาช่อนทะเล (Uedson, *et al.*, 2011)

2.3 ความแตกต่างทางกายภาพของปลาช่อนทะเลเพศผู้และเพศเมีย

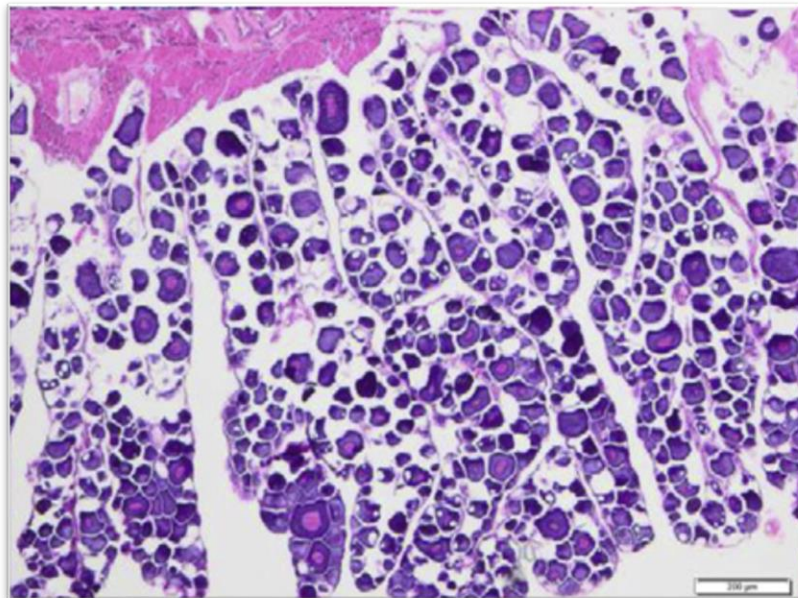
ลักษณะทางกายภาพของปลาช่อนทะเลเพศผู้และเพศเมียทุกช่วงอายุมีลักษณะคล้ายคลึงกันแยกด้วยตาเปล่าไม่ออก แต่มีลักษณะบางประการที่แตกต่างกันเมื่อปลาเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ กล่าวคือ ปลาเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ โดยปลาเพศผู้จะมีความสมบูรณ์เพศเมื่ออายุประมาณ 2 ปี ส่วนปลาเพศเมียจะมีความสมบูรณ์เพศเมื่อมีอายุประมาณ 3 ปี อย่างไรก็ตามปลาช่อนทะเลที่มีอายุระหว่าง 1-2 ปีแรกจะไม่สามารถระบุเพศได้ชัดเจนเนื่องจากปลายังไม่เข้าสู่ระยะสมบูรณ์เพศดังที่กล่าวในตอนต้น ดังนั้นในช่วงระหว่าง 1-2 ปีแรก หากต้องการตรวจสอบเพศสามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิคการตรวจสอบเพศปลาซึ่งนิยมทำโดยการตรวจผ่านช่องท้อง โดยมีการสังเกตในเบื้องต้นคือ กรณีที่เป็นปลาเพศผู้ เมื่อสัมผัสบริเวณท้องและรีดเบาๆ น้ำเชื้อจะไหลออกมาเป็นของเหลวสีขาวสามารถเห็นได้ชัด ส่วนปลาเพศเมียจะมีลักษณะท้องค่อนข้างอูม หากต้องการตรวจสอบการเจริญเติบโตของรังไข่จะต้องใช้ท่อสอดไข่ (I.D) ขนาด 1.0 มิลลิเมตร โดยสอดท่อเข้าทางตำแหน่งของช่องท้อง เพื่อดูดไข่ปลาและนำมาตรวจสอบผ่านกล้องจุลทรรศน์ โดยวิธีนี้เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบในปลาที่มีความสมบูรณ์เพศเท่านั้น จากการศึกษาของ Dutney, *et al.* (2017) ได้ทำการผ่าช่องท้องของปลาช่อนทะเลเพื่อศึกษาลักษณะของเพศ พบว่าปลาช่อนทะเล มีการแบ่งเพศออกเป็น 2 แบบ คือ แบบเพศเดียว (Monosex) และสองเพศในตัวเดียวกัน (Intersex) โดยแบบเพศเดียว (Monosex) สามารถระบุเพศผู้และเพศเมียได้อย่างชัดเจน โดยสังเกตจากรังไข่ (Ovary) ดังรูปที่ 2.6 อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Testis) ดังรูปที่ 2.7 สำหรับสองเพศในตัวเดียวกัน (Intersex) รังไข่ (Ovary) และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Testis) ดังรูปที่ 2.4



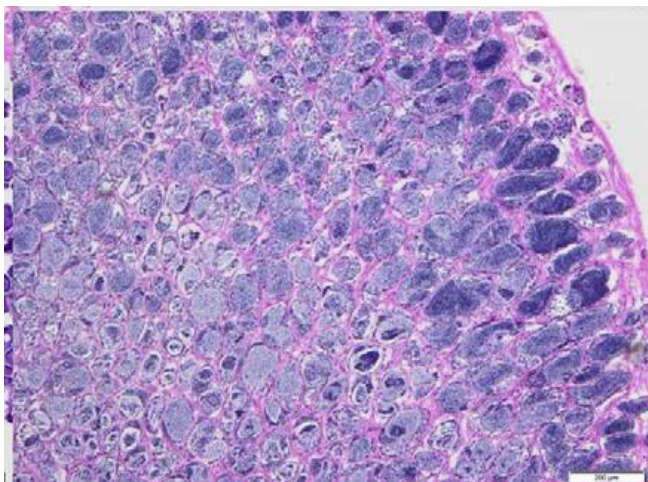
รูปที่ 2.4 ลักษณะสองเพศในตัวเดียวกัน (Intersex) O:รังไข่, T:อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (Dutney, *et al.*, 2017)



รูปที่ 2.5 ลักษณะสองเพศในตัวเดียวกัน (Intersex) (Dutney, *et al.*, 2017) เซลล์ผสมระหว่างรังไข่กับอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (CT) รังไข่ (O) อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (T)



รูปที่ 2.6 รังไข่ของปลาช่อนทะเล (Dutney, *et al.*, 2017)



รูปที่ 2.7 อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของปลาช่อนทะเล (Dutney, *et al.*, 2017)

2.4 การเพาะเลี้ยงและอนุบาลปลาช่อนทะเล

ปลาช่อนทะเลสามารถเพาะเลี้ยงและอนุบาลได้สำเร็จครั้งแรกในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2533 โดยนักวิชาการจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งพังงาและภูเก็ต โดยทำการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลาช่อนทะเลจากธรรมชาติมาเลี้ยงในกระชังเพื่อให้ได้ขนาดประมาณ 8-10 กิโลกรัม จึงนำขึ้นมาวางไข่ในบ่อคอนกรีต โดยวิธีธรรมชาติและรวบรวมไข่มาอนุบาลจนประสบความสำเร็จ แต่ไม่ได้มีการส่งเสริมการเลี้ยงอย่างจริงจัง เนื่องจากในระยเวลาดังกล่าวนั้นปลาช่อนทะเลยังไม่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ไม่เป็นที่นิยมของผู้บริโภคและยังไม่มีตลาดรองรับ (วินัย เนตรวงศ์, และคณะ, 2556) และข้อมูลการเพาะเลี้ยงรวบรวมจากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต (2549) และงานวิจัยของวินัย เนตรวงศ์, และคณะ, (2556) โดยมีข้อมูลการเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลมีดังนี้

2.4.1 วิธีการเลี้ยง การฟัก

1) การเตรียมพ่อแม่พันธุ์

นำพ่อแม่พันธุ์ที่ได้จากการรวบรวมจากธรรมชาติมาเลี้ยงต่อในกระชังเพื่อให้ได้น้ำหนักประมาณ 8-10 กิโลกรัม ซึ่งเป็นน้ำหนักเฉลี่ยของพ่อแม่พันธุ์ จากนั้นนำพ่อแม่พันธุ์ที่ได้มาทำการเพาะพันธุ์ต่อในระบบเลี้ยง ซึ่งปัจจุบันสามารถขุนพ่อแม่พันธุ์ โดยเลี้ยงจากลูกพันธุ์ที่ได้จาก

โรงเพาะฟัก โดยการเลี้ยงในกระชังในทะเลหรือในบ่อดิน ซึ่งใช้ระยะเวลาเลี้ยงประมาณ 2 ปี พ่อแม่พันธุ์ที่ได้จากโรงเพาะฟักต้องคัดพันธุ์ตามหลักพันธุศาสตร์ และต้องระวังปัญหาเรื่องสายเลือดชิด การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์สามารถเลี้ยงได้ทั้งในกระชัง บ่อดิน และบ่อคอนกรีต ส่วนใหญ่จะนิยมเลี้ยงในกระชังมากกว่า เนื่องจากการจัดการระบบคุณภาพน้ำสามารถควบคุมได้ง่าย และประหยัดกว่าการเลี้ยงในบ่อดินและบ่อคอนกรีต

2) การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในกระชัง

กระชังที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ปลาช่อนทะเลต้องมีขนาดประมาณ 3x6x3, 5x5x3 และ 10x10x3 เมตร หรือเล็กกว่านั้น ขนาดตาอวนประมาณ 5 เซนติเมตร การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์อาจแยกเพศหรือรวมเพศก็ได้ โดยใส่พ่อแม่พันธุ์ในอัตรา 1:2 และควบคุมคุณภาพน้ำให้มีความเค็มประมาณ 25-32 ส่วนในพันส่วน (part per thousand) ความขุ่นใสมากกว่า 2 เมตร และมีกระแสน้ำประมาณ 0.2-0.5 เมตรต่อนาที

3) การให้อาหารแก่พ่อแม่พันธุ์

การให้อาหารแก่พ่อแม่พันธุ์ปลาช่อนทะเลจะใช้ปลาสด เช่น ปลาหลังเขียว ปลาข้างเหลือง และเสริมด้วยปลาหมึก ให้กินจนอิ่มหรือในอัตรา 3-5 เปอร์เซ็นต์ ของน้ำหนักตัวต่อวัน ให้กินวันละครั้ง นอกจากนี้ยังใช้อาหารสำเร็จรูปแทนปลาสดได้ โดยอาหารสำเร็จรูปจะต้องมีคุณค่าทางโภชนาการที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของรังไข่ การพัฒนาตัวอ่อนและอัตราการรอดตายของลูกปลา โดยใช้กรดไขมันโอเมก้า-3 กรดไขมันไม่อิ่มตัว (Polyunsaturated fatty acid ;PUFA) วิตามินซี และโปรตีน โดยกรดไขมันโอเมก้า-3 และโปรตีนจะมีผลต่อตัวอ่อนและอัตราการรอดของลูกปลา PUFA จะช่วยเพิ่มผลผลิตในเรื่องของคุณภาพของไข่ การพัฒนาตัวอ่อน และมีผลต่อรอบของฮอร์โมนเอนโดรเจนของพ่อแม่พันธุ์ปลา วิตามินซีจะมีผลต่ออัตราการรอดของสเปิร์ม ความชื้นและการปฏิสนธิ

4) การวางไข่ของปลาช่อนทะเล

ปลาช่อนทะเลที่สมบูรณ์เพศเมื่อนำขึ้นบ่อเพาะฟักจะสามารถวางไข่ได้เองตามธรรมชาติ ภายในอาทิตย์แรกของการนำขึ้นมาวางไข่ และสามารถวางไข่ได้ทุกสัปดาห์หรือทุกเดือน ตลอดปีหากมีการดูแลและจัดการที่ดีโดยเฉพาะคุณภาพน้ำและคุณภาพอาหาร การวางไข่จะวางไข่ในช่วงกลางคืนจนถึงรุ่งอรุณ ปลาช่อนทะเลจะวางไข่ครั้งละประมาณ 300,000-2,000,000 ฟองต่อครั้ง เป็นไข่นิดลอยมีขนาด 1.2-1.5 มิลลิเมตร จะฟักออกเป็นตัวภายใน 24 ชั่วโมง น้ำที่อุณหภูมิ 27-29 องศาเซลเซียส ลูกปลาแรกฟักมีขนาด 3.4-3.6 มิลลิเมตร นอกจากการเพาะพันธุ์โดยวิธีธรรมชาติแล้ว ยังสามารถเพาะพันธุ์โดยใช้ฮอร์โมน ซึ่งปกติปลาเพศผู้ไม่จำเป็นต้องฉีดฮอร์โมน เนื่องจากมีน้ำเชื้อดี จะฉีดเฉพาะปลาเพศเมีย การฉีดฮอร์โมนฉีด 1 ครั้ง ปลาช่อนทะเลสามารถวางไข่ภายใน 28-52 ชั่วโมง หลังจากฉีดฮอร์โมน

5) การรวบรวมไข่และการเพาะฟัก

ไข่ปลาช่อนทะเลที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วจะลอยบนผิวน้ำเป็นกลุ่มทำให้ง่ายต่อการรวบรวม ซึ่งสามารถทำได้โดยใช้ผ้าลากไข่ปลาที่มีขนาดตา 800 ไมครอน และทำการรวบรวมไข่จากบ่อวางไข่ในเวลาตอนเช้า รวบรวมโดยการลากไปในทิศทางเดียวกัน 3-4 ครั้ง จนหมด นำไข่ปลามาเพาะฟักในถังเพาะฟัก หากมีสิ่งสกปรกหรือไข่เสียปะปนมาให้แยกตะกอนและไข่เสียออกจากถังเพาะฟัก โดยกรองตะกอนด้วยสวิงอวนไนลอน ส่วนไข่เสียจะตกที่บริเวณพื้นกันถังเพาะฟักให้ใช้สายยางดูดออก และก่อนนำไข่ปลาช่อนทะเลใส่ถังเพาะฟัก ควรทำความสะอาดด้วยน้ำสะอาดหรือน้ำยาฆ่าเชื้อ

6) การอนุบาลปลาช่อนทะเล

การอนุบาลปลาช่อนทะเลในบ่อคอนกรีต ควรใช้บ่อคอนกรีตที่มีขนาดประมาณ 5 ลูกบาศก์เมตรขึ้นไป ใส่ น้ำทะเลที่สะอาด วางระบบลมเบา ๆ ที่กลางบ่อรวบรวมลูกปลามาปล่อยลงบ่อ โดยมีความหนาแน่นประมาณ 70-80 ตัวต่อลิตร (ลูกปลาอายุ 1-10 วัน) ดังรูปที่ 2.8 เมื่อลูกปลามีอายุ 11-20 วัน จะลดความหนาแน่นลงเหลือ 20-30 ตัวต่อลิตร และปลาขนาดอายุมากกว่า 20 วัน จะมีความหนาแน่นน้อยกว่า 10 ตัวต่อลิตร เมื่อลูกปลามีอายุประมาณ 1 เดือน ปลาจะมีขนาดความยาวประมาณ 5-6 เซนติเมตร สามารถย้ายไปอนุบาลในบ่อคอนกรีต ถึงไฟเบอร์กลาส บ่อดิน หรือในกระชัง เพื่อทำเป็นปลาวัยรุ่นขนาด 12-15 เซนติเมตร เพื่อนำไปเลี้ยงในกระชังต่อไป ซึ่งระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 1-2 เดือน และการให้อาหารลูกปลานั้นจะใช้อาหารหลังจากไข่แดง (Yolk sac) หมดภายในระยะเวลา 5-8 วัน ปกติปากลูกปลาจะเปิดภายใน 3 วัน และสามารถให้อาหารได้ ลูกปลาจะมีขนาดประมาณ 5.0-5.2 มิลลิเมตร การให้อาหารหลังจากฟักจากไข่ 3 วัน ควรจะให้โรติเฟอร์เสริมกรดไขมัน (Enriched rotifer) ประมาณ 3-5 ตัวต่อซีซี จนถึงอายุ 10 วัน ในช่วงวันที่ 7 จะเริ่มให้อาร์ทีเมียที่มีการเสริมกรดไขมัน (Enriched artemia) เพื่อให้ปลาหัดกินอาร์ทีเมีย จนถึงอายุ 25-26 วัน โดยจะค่อยๆ ลดโรติเฟอร์ในช่วงอายุ 17-18 วัน จนถึงปลาขนาดความยาว 5-6 เซนติเมตร และจะเสริมด้วยโคพีพอดตัวอ่อนและตัวเต็มวัย ซึ่งระยะนี้สามารถให้อาหารหลายอย่างปนกันได้ จากระยะอายุ 25-26 วัน เป็นต้นไป จะเริ่มให้กินอาหารสำเร็จรูป จนลูกปลากินอาหารสำเร็จรูปได้ดีจึงหยุดให้อาหารมีชีวิต



รูปที่ 2.8 ลูกปลาช่อนทะเลอายุ 10 วัน (Gopakumar, et al., 2011)

การจัดการทั่วไปในการอนุบาลลูกปลาในบ่อคอนกรีต ในระยะแรกของการอนุบาล ประมาณ 1-7 วัน จะใส่แพลงก์ตอนจำพวก *Chlorella* sp. หรือ *Isochrysis* sp. หรือ *Tetraselmis* sp. ลงในบ่ออนุบาลเพื่อเป็นอาหารให้โรติเฟอร์ ในระยะนี้จะไม่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำ เพื่อหลีกเลี่ยงการเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำที่จะทำให้ปลาอ่อนแอได้ ควรควบคุมคุณภาพน้ำให้คงที่ โดยเฉพาะปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำไม่ควรต่ำกว่า 6 มิลลิกรัมต่อลิตร อุณหภูมิน้ำต้องควบคุม ให้คงที่ไม่เปลี่ยนแปลงมากกว่า 1 องศาเซลเซียส ตลอด 24 ชั่วโมง แอมโมเนียไม่เกิน 0.02 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเป็นกรด-ด่าง 7.8-8.0 ในการเคลื่อนย้ายลูกปลาลงบ่ออนุบาลนั้นจะต้องทำในช่วงที่ยังมีถุงไข่แดงอยู่ ซึ่งยังไม่กินอาหาร การเปลี่ยนถ่ายน้ำครั้งแรกจะกระทำในช่วงลูกปลามีอายุประมาณ 11-20 วัน โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณ 10-50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับคุณภาพน้ำ น้ำที่นำมาเปลี่ยนควรมีอุณหภูมิใกล้เคียงกับน้ำในบ่ออนุบาล ลูกปลาอายุมากกว่า 20 วัน จะเปลี่ยนน้ำประมาณ 50-100 เปอร์เซ็นต์ การให้อาหารปลานั้นจะให้วันละ 3-4 ครั้ง โดยอาหารที่ให้คือ โรติเฟอร์จะมีความหนาแน่น 10-15 ตัวต่อซีซี อาทิเมีย 1-2 ตัวต่อซีซี และโคพีพอด 1 ตัวต่อซีซี ส่วนอาหารสำเร็จรูปจะให้ทีละน้อย ๆ แต่บ่อยครั้งเมื่อปลาหยุดกินอาหารจะต้องหยุดให้ทันทีเพื่อป้องกันการให้อาหารมากเกินไป

เมื่อปลามีอายุประมาณ 25 วัน หรือมากกว่านี้จะเริ่มคัดแยกขนาดและแยกบ่อ เพื่อหลีกเลี่ยงการกินกันเอง ลูกปลาในระยะนี้จนถึงขนาด 5-6 เซนติเมตร (ประมาณ 1 เดือน) ยังไม่สามารถใช้ตะแกรงคัดขนาดได้ จะคัดโดยใช้สวิงตักออก การคัดขนาดจะคัดทุกสัปดาห์และหลังจากให้อาหารทุกวันจะต้องนำอาหารที่เหลือหรือปลาที่ตายจะต้องเอาออก โดยใช้สายยางดูดออกและจะต้องทำความสะอาดวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการอนุบาลให้สะอาด ปราศจากเมือกและสิ่งสกปรกต่าง ๆ



รูปที่ 2.9 ลูกปลาช่อนทะเลอายุ 45 วัน (Gopakumar, et al., 2011)

7) การเลี้ยงปลาช่อนทะเลในกระชัง

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต มีการเลี้ยงปลาช่อนทะเลในกระชังขนาดใหญ่ในทะเลลึก มีขั้นตอนการเลี้ยงคือ การเลี้ยงปลาช่อนทะเลในกระชังขนาดใหญ่ ให้อาหารเม็ดชนิดจมที่มีโปรตีนประมาณ 40-44 เปอร์เซ็นต์ เลือกใช้ให้สม่ำเสมอ ไขมัน 14-18 เปอร์เซ็นต์ ในระยะแรกที่ปลาขนาดเล็ก (40-500 กรัม) ให้อาหารวันละ 3 มื้อ (เช้า, เที่ยง และเย็น) ปลาที่มีน้ำหนักมากกว่า 500 กรัม ให้อาหารวันละ 2 มื้อ (เช้าและเย็น) และเมื่อปลามีน้ำหนักมากกว่า 1 กิโลกรัม ให้อาหารวันละ 1 มื้อ (เย็น) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความหนาแน่นและสภาวะแวดล้อม เช่น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำในขณะนั้น การให้อาหารควรให้อย่างรวดเร็ว เมื่อเริ่มต้นทำการให้อาหารและหว่านให้กระจายเป็นวงกว้างทั่วถึงบริเวณผิวหน้ากระชัง เพื่อให้ปลาได้กินทุกตัว โดยเฉพาะปลาเล็ก ซึ่งอยู่นอกฝูงระยะนี้ระวังไม่ให้อาหารหลุดรอดออกไปนอกกระชังให้อาหารจนปลาอิ่ม โดยสังเกตได้จากพฤติกรรมของปลาโดยปลาจะหยุดสนใจอาหาร เสียงปลาที่ขึ้นมากินอาหารเบาเสียง และการแตกชานหรือการกระจายตัวของน้ำลดลง ควรให้อาหารเป็นระยะ ๆ เพื่อสังเกตพฤติกรรมของปลา ดูว่าปลายังสนใจกินอาหารอยู่หรือไม่ (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต, 2549)

2.4.2 คุณภาพน้ำที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง

การควบคุมคุณภาพน้ำ คุณภาพน้ำจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและอัตราการรอดของลูกปลา โดยเฉพาะปลาช่อนทะเล เป็นปลาที่มีการเจริญเติบโตเร็วมีความต้องการอาหารที่มีโปรตีนและไขมันสูง เมื่ออาหารมีโปรตีนสูงทำให้มีการขับถ่ายแอมโมเนีย ($\text{NH}_3\text{-N}$) ออกมาสูงด้วย ทำให้มีสารประกอบไนโตรเจน ($\text{NO}_2\text{-N}$) ในระบบน้ำที่อนุบาลลูกปลา ทั้งแอมโมเนียและไนไตรท์เป็นพิษต่อลูกปลา ประกอบการอนุบาลลูกปลาช่อนทะเลอย่างหนาแน่นยังทำให้แอมโมเนียและไนไตรท์ มีค่าสูงในส่วนของปริมาณออกซิเจนในน้ำยังเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่ออัตราการเจริญเติบโตและอัตราการรอด เนื่องจากปลาช่อนทะเลเป็นปลาที่มีพฤติกรรมว่ายน้ำว่องไวต้องการออกซิเจนสูง การอนุบาลลูกปลาควรควบคุมคุณภาพน้ำให้มีปริมาณออกซิเจนที่ละลายน้ำไม่ต่ำกว่า 5 มิลลิกรัมต่อลิตร ถ้าปริมาณออกซิเจนต่ำกว่า 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่งผลให้การเจริญเติบโตลดลง และมีโอกาสเสี่ยงต่อการทำให้ปลาอ่อนแอ มีโรคแทรกซ้อน หรือหากปริมาณออกซิเจนต่ำมากจะทำให้ปลาตายได้ ดังนั้นการควบคุมคุณภาพน้ำในการอนุบาลควรจะมีการตรวจวัดคุณภาพน้ำเป็นประจำ เพื่อนำข้อมูลมาจัดการคุณภาพน้ำ เช่น การบำบัดน้ำก่อนใช้ โดยใช้เครื่องกำจัดโปรตีน (Protein skimmer) การฆ่าเชื้อด้วยโอโซน การเปลี่ยนน้ำ การทำความสะอาดบ่ออนุบาลและวัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการอนุบาล รวมทั้งการลดปริมาณอาหารในช่วงที่คุณภาพน้ำไม่ดี

2.4.3 ข้อสังเกตในการเลี้ยงปลาช่อนทะเล

- 1) การเลี้ยงปลาช่อนทะเลนั้นไม่ควรหนาแน่นเกินไป เนื่องจากจะทำให้ปลาโตช้า ใช้ระยะเวลาเลี้ยงนานและเสี่ยงต่อปัญหาสุขภาพของปลา
- 2) ควรทราบสถานภาพของลูกปลา เช่น สุขภาพปลา หรือประวัติการให้ยาต่าง ๆ ซึ่งควรมีการบันทึกอย่างละเอียด ควรมีการตรวจสอบสุขภาพพันธุ์ปลาก่อนการลำเลียงหรือก่อนปล่อยลงเลี้ยงในกระชัง หากพบโรคพยาธิ ควรมีการกำจัดหรือรักษาให้หายก่อน ซึ่งการปล่อยลูกปลาที่มีสุขภาพไม่ดี ลงในกระชังอาจเกิดโรคระบาดได้
- 3) สภาพแวดล้อมบริเวณรอบกระชังนั้น ควรสังเกตในเรื่องการไหลเวียนของกระแสน้ำที่จะช่วยถ่ายเทน้ำในกระชังไม่ให้ขาดออกซิเจน และพัดพาของเสียออกจากกระชังได้
- 4) จำนวนในการเลี้ยงความหนาแน่นที่เหมาะสมประมาณ 8-10 ตัวต่อลูกบาศก์เมตร และเมื่อปลาโตได้ประมาณ 1 กิโลกรัม ต้องคัดขนาดปลาจะทำให้ ปลาโตได้ใกล้เคียงกัน สะดวกต่อการจับจำหน่าย
- 5) ในการให้อาหารควรหลีกเลี่ยงในช่วงน้ำตาย หรือในช่วงที่มีออกซิเจนต่ำ เนื่องจากการให้อาหารในช่วงนี้ปลาจะใช้ออกซิเจนมากในการใช้พลังงานในการสันดาปอาหาร ทำให้ออกซิเจนในน้ำลดลงอาจเสี่ยงต่อการขาดออกซิเจนได้
- 6) การให้อาหารปลาต้องสังเกตจากพฤติกรรมการตอบสนองต่ออาหาร โดยสังเกตได้จากปลาจะหยุดสนใจในการให้อาหาร เสียงปลาที่ขึ้นมากินอาหารจะเบาลง และการแตกชานของน้ำจะลดลง หยุดให้อาหารเป็นระยะในช่วงระหว่างการให้อาหารเพื่อสังเกตพฤติกรรมของปลาเพื่อดูว่าปลายังสนใจกินอาหารอยู่หรือไม่
- 7) การให้อาหารในปริมาณที่มากจนเกินไปจะทำให้เกิดการสูญเสียอาหารและทำให้อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อสูง (FCR) ถ้าให้น้อยไปอาหารที่ปลาได้รับจะเพียงแต่ใช้เพื่อการดำรงชีวิตและจะทำให้การเจริญเติบโตต่ำ ซึ่งส่งผลให้ค่า FCR สูง การให้อาหารในปริมาณที่ถูกต้องจะเป็นสิ่งสำคัญที่จะทำให้ FCR ต่ำที่สุด ควรมีการบันทึกข้อมูลของปริมาณของอาหารที่ให้ในแต่ละมื้อ รวมทั้งสังเกตสิ่งผิดปกติต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นต่อความต้องการอาหารของปลา

2.5 คุณค่าทางอาหารของปลาช่อนทะเล

ปลาช่อนทะเลมีคุณค่าทางอาหารเทียบเท่ากับปลาแซลมอน เชื่อว่าสามารถชะลอภาวะแก่ก่อนวัย สามารถควบคุมน้ำหนัก บำรุงสมอง และช่วยลดความเครียดได้ดี คุณค่าของปลาช่อนทะเล ประกอบด้วย โปรตีนย่อยง่ายที่ช่วยซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ และมีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อร่างกายหลายชนิด ซึ่งกรดอะมิโนที่มีอยู่ในปลาทะเล โดยเฉพาะไลซีนและทรีโอนีน ที่มีปริมาณสูงถึงร้อยละ 92 เมื่อเทียบกับนํ้านมวัวที่มีร้อยละ 91 เนื้อวุ้นร้อยละ 80 และถั่วเหลืองร้อยละ 63 ซึ่งไลซีนและทรีโอนีนจะ ช่วยเสริมสร้างเอ็นให้แข็งแรง กล้ามเนื้อจะทำงานได้ดีขึ้น ทั้งยังเป็นส่วนประกอบของสารสร้างภูมิคุ้มกันโรค ทำให้นอนหลับสนิท สมองทำงานได้ดี และที่ช่วยชะลอภาวะแก่ก่อนวัย (ทวี จินตามัยกุล, 2551)

2.6 ข้อมูลด้านการตลาดของปลาช่อนทะเล

ตลาดที่มีความต้องการปลาช่อนทะเล คือ ญี่ปุ่น เกาหลีใต้ สิงคโปร์ และฮ่องกง ซึ่งนิยมนำไปทำอาหารประเภทปลาดิบหรือทำเป็นซาซิมิปลาช่อนทะเลแทนการใช้ปลาทูน่า ซึ่งปลาทูน่ามีปริมาณลดลงมาก แต่ในตลาดออสเตรเลียจะนิยมปลาช่อนทะเลที่มีเนื้อเป็นเส้น ประกอบกับคุณค่าทางอาหารที่มีในปลาช่อนทะเลและรสชาติหวานอร่อย เนื้อปลาช่อนทะเลสามารถนำมาประยุกต์เป็นเมนูอาหารไทยได้หลายชนิด (ศุภวิทย์วิชัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต, 2549) กรมประมงจึงได้มีการสนับสนุนให้เกษตรกรหันมาเลี้ยงปลาช่อนทะเลในบริเวณชายฝั่งมากขึ้น ทั้งในเขตชายฝั่งอ่าวไทยซึ่งได้แก่ กระบี่ สงขลา และจันทบุรี ส่วนในเขตชายฝั่งอันดามัน ได้แก่ ภูเก็ต

2.7 งานวิจัยในการเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลที่ผ่านมา

จากงานวิจัยของอาคม สิงหนุญ, และคณะ (2555) ในการศึกษาคัพพะของปลาช่อนทะเลพบว่า ปลาช่อนทะเลจะวางไข่ในช่วงเวลาประมาณ 22.00-23.00 น. ไข่ที่ได้รับการผสม จะมีลักษณะกลมใส เป็นไขชนิดไขลอยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.29 ± 0.02 มิลลิเมตร หลังจากไข่ผสมจะมีการพัฒนาของคัพพะที่อุณหภูมิ น้ำ 28-29 องศาเซลเซียส และความเค็ม 30 ส่วนในพันส่วน (part

per thousand) การฟักตัวออกเป็นตัวอ่อนใช้เวลา 22 ชั่วโมง 20 นาที ไข่ปลาที่ใกล้ฟักเป็นตัวจะมี หนืดน้ำมันขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.20 ± 0.03 มิลลิเมตร ไข่แดงมีปริมาตร 1.63 ± 0.14 มิลลิเมตร

Can (2005) การเพาะเลี้ยงพันธุ์ปลาช่อนทะเลในประเทศเวียดนามโดยใช้พ่อแม่พันธุ์ ขนาดน้ำหนัก 12 กิโลกรัม (อายุ 2 ปี) เลี้ยงในบ่อวางไข่ โดยใช้สัดส่วนพ่อแม่พันธุ์และแม่พันธุ์อัตรา 1:1 โดยให้แม่พันธุ์วางไข่ตามธรรมชาติ ไข่ปลาที่ได้มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.29 ± 0.042 มิลลิเมตร ลูกปลาฟัก ออกเป็นตัวใช้เวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และลูกปลาแรกฟักมีขนาดความยาว 3.31 ± 0.1 มิลลิเมตร

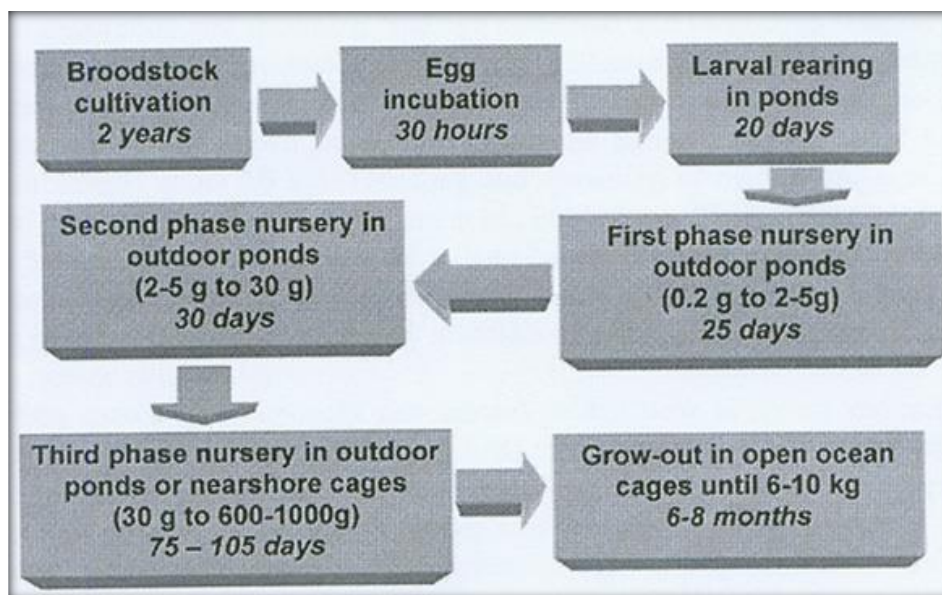
Liao, *et al.* (2004) และ Jeffrey, *et al.* (2004) รายงานการผลิตไข่ปลาช่อนทะเล ในประเทศไต้หวันใช้พ่อแม่พันธุ์ปลาช่อนทะเลที่มีขนาด 10 กิโลกรัม เลี้ยงในกระชังใกล้ชายฝั่งขนาด กระชัง 400-600 ตารางเมตร โดยใช้ระบบน้ำไหลผ่านตลอดเวลาใส่ในบ่อปลาจำนวน 100 ตัว ใช้อัตราส่วนเพศอัตรา 1:1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการวางไข่ 23-27 องศาเซลเซียส ช่วงที่ปลาไข่ สูงสุดช่วงระหว่างฤดูใบไม้ผลิ และฤดูฝน การรวบรวมไข่ที่ได้รับการผสมแล้วโดยเก็บบริเวณผิวน้ำ ในบ่อเพื่อนำไปฟัก เมื่อลูกปลาฟักเป็นตัวจะขนย้ายไปยังบ่ออนุบาลโดยใช้นอเปลีสของโคพีพอดและ โรติเฟอร์จนกระทั่งอายุ 20 วัน (อัตราการรอดตาย 5-10 เปอร์เซ็นต์) โดยแบ่งการอนุบาลเป็น 3 ระยะ ในระยะแรก 20-45 วัน ให้ลูกปลากินอาหารเม็ดลอยน้ำ คัดขนาดทุก 4-7 วัน เพื่อลดอัตราการ กินกันเอง และเมื่อมีขนาด 2-5 กรัม เป็นระยะที่ 2 (อายุ 45-75 วัน) ใช้บ่อที่มีขนาดใหญ่กว่า 300 ตารางเมตร ให้กินอาหารวันละ 5-6 ครั้ง เลี้ยงไปจนได้น้ำหนัก 30 กรัม ในการอนุบาลระยะสุดท้าย (อายุ 75 วัน ถึง 150-180 วัน) ปลาช่อนทะเลโตมีน้ำหนัก 600-1,000 กรัม ทั้งในบ่อขนาดใหญ่ และ ในกระชังที่เลี้ยงแยกกัน ในช่วงสุดท้ายเลี้ยงในกระชังใช้เวลาเลี้ยง 6-8 เดือน ได้น้ำหนัก 6-10 กิโลกรัม ความหนาแน่นตอนเก็บผลผลิต 14 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร อัตราการแลกเนื้อที่เลี้ยงด้วยอาหารเม็ด (โปรตีน 42-45 เปอร์เซ็นต์) ดังรูปที่ 2.10

วิธีการให้อาหารลูกปลาวัยอ่อน แสดงดังรูปที่ 2.11

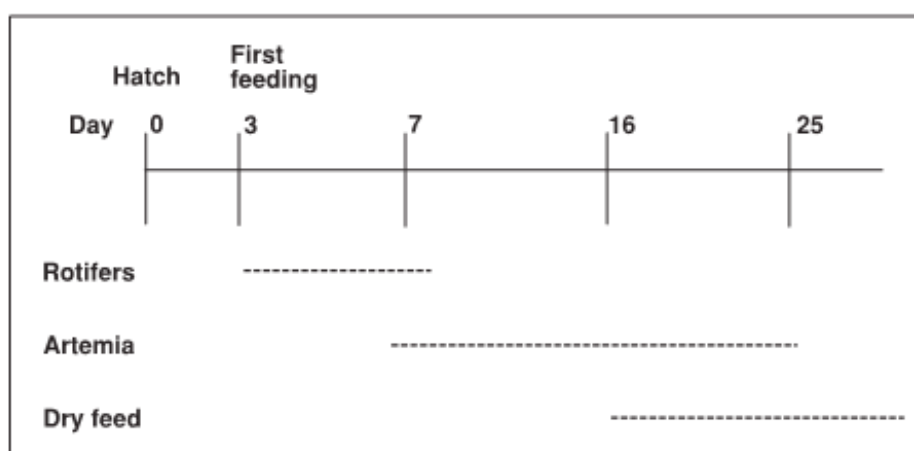
1) การให้อาหารปลาช่อนทะเลเริ่มให้ในวันที่ 3 หลังการฟักเป็นตัวโดยให้โรติเฟอร์ ที่เสริมน้ำมันความหนาแน่น 3-5 ตัวต่อมิลลิตร ให้ในปริมาณที่คงที่อย่างน้อยที่สุด 4 วัน (โรติเฟอร์ และอาร์ทีเมียที่ใช้ต้องเสริมน้ำมันล่วงหน้าก่อนนำมาใช้)

2) หลังจากนั้นให้อาร์ทีเมียเสริมน้ำมัน ประมาณ 25-30 วัน

3) หลังจากนั้นให้กินอาหารเม็ดสำเร็จรูปชนิดลอยน้ำเพียงอย่างเดียว



รูปที่ 2.10 พัฒนาการระยะต่าง ๆ ของการเลี้ยงปลาช่อนทะเลในไต้หวัน (Liao, *et al.*, 2004)



รูปที่ 2.11 สรุปการให้อาหารลูกปลาช่อนทะเล (Liao, *et al.*, 2004)

Holt, *et al.* (2007) รายงานผลการวิจัยการเพาะพันธุ์ปลาช่อนที่มหาวิทยาลัยเท็กซัส พบว่าลูกปลาช่อนทะเลฟักออกเป็นตัวใช้เวลาที่ 18-22 ชั่วโมง มีขนาดแรกฟักเฉลี่ย 3.5-3.6 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 26-27 องศาเซลเซียส มีขนาดไข่เส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.3 มิลลิเมตร น้ำหนัก 108 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแห้ง มีการเลี้ยงโดยให้เริ่มกินโรติเฟอร์ เมื่ออายุได้ 3 วัน ความหนาแน่นในการอนุบาลลูกปลา 3-5 ตัวต่อลิตร และเมื่ออายุเจ็ดวันจะให้กินอาร์ทีเมีย แรกฟัก

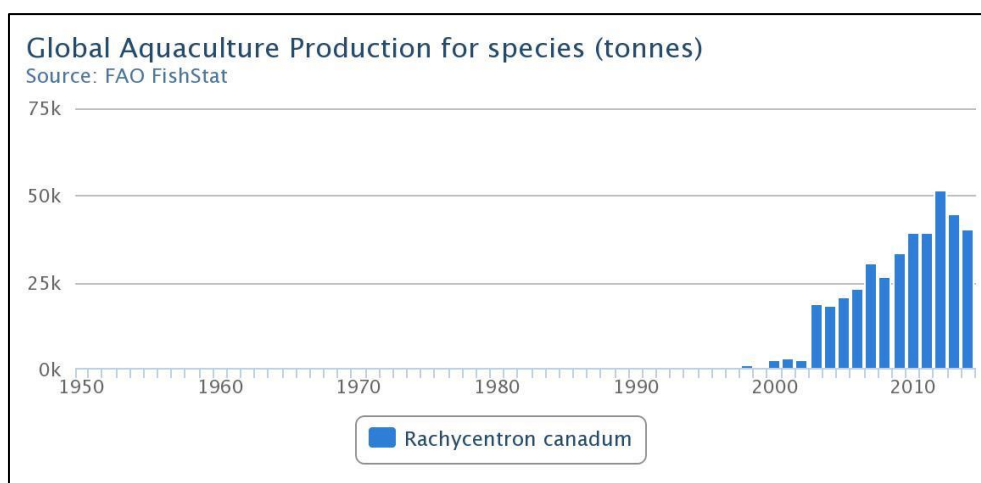
Sakthivel, *et al.* (2012) รายงานผลการวิจัยการพัฒนาระยะคัพภะและลูกปลาวัยอ่อนของปลาช่อนทะเล โดยใช้วิธีการนำพ่อแม่พันธุ์ที่มีขนาดและอายุที่เหมาะสม เซ็กซ์ขนาดไข่ แม่พันธุ์ต้องมีขนาดไข่ 700 ไมโครเมตร นำมาฉีดฮอร์โมน hCG (human chorionic gonadotropin) โดยฉีดฮอร์โมนกับพ่อแม่พันธุ์ปลาช่อนทะเลขนาด 250 หน่วยมาตรฐาน (International Unit:I.U.) ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม และฉีดให้แม่พันธุ์ 500 หน่วยมาตรฐาน ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม ปลาย้ายลงบ่อที่มีขนาด 5 ตัน และน้ำทะเลที่ใช้เลี้ยงนั้นมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 27-29 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง 8.2 ความเค็มที่ 32-35 ส่วนในพันส่วน (part per thousand) ให้มีการวางไข่แบบธรรมชาติ จากการทดลองพบว่าหลังจากฉีดฮอร์โมน hCG (human chorionic gonadotropin) 39 ชั่วโมง ปลามีการวางไข่ หลังจากการปฏิสนธิของไข่แล้ว 40 นาที ปลาช่อนทะเลจะเริ่มมีการพัฒนาคัพภะไข่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.1-1.2 มิลลิเมตร ฟักตัวเป็นตัวอ่อนใช้เวลา 22 ชั่วโมง อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 28.5-30 องศาเซลเซียส มีขนาดลูกปลาแรกฟัก 2.2-2.7 มิลลิเมตร

2.8 ลักษณะทางเศรษฐกิจของปลาช่อนทะเล

ปลาช่อนทะเลจัดเป็นปลาเศรษฐกิจที่กำลังได้รับความสนใจ ลักษณะเนื้อเป็นปลาเนื้อขาว ไม่มีกลิ่นคาว นิยมทำซาซิมิ และเป็นที่ต้องการในตลาดได้ทุกวัน (Jeffrey, *et al.*, 2005) ในปี ค.ศ. 2002 (พ.ศ.2545) ผลผลิตทั่วโลกทั้งจากการเลี้ยงและจับจากธรรมชาติมีประมาณ 10,416 ตัน ประเทศที่ผลิตปลาช่อนทะเลได้มากที่สุด 5 อันดับแรก ได้แก่ ประเทศไต้หวัน ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ บราซิลและสหราชอาณาจักรอาหรับเอมิเรต ในปัจจุบันประเทศไต้หวันเป็นผู้ผลิตปลาช่อนทะเลอันดับต้นของโลก และมีการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงอย่างเป็นทางการเพื่อมุ่งเป้าสู่อุตสาหกรรมการค้า จนกระทั่งในปี ค.ศ. 2004 (พ.ศ. 2547) ประเทศไต้หวันได้พัฒนาเทคนิควิธีการเลี้ยงจนเพิ่มขีดความสามารถในการส่งออกมีผลผลิตเฉลี่ย 5,000 ตัน ได้เป็นที่สำเร็จ (Allen, 2000 และ Florida Museum, 2007)

เมื่อวันที่ 26 ธันวาคม พ.ศ. 2547 ประเทศไทยประสบปัญหาการเกิดธรณีพิบัติภัยหรือคลื่นยักษ์สึนามิ ทำให้ในปีพ.ศ. 2548 รัฐบาลนอร์เวย์ได้ให้ความช่วยเหลือประเทศไทย ภายใต้โครงการความช่วยเหลือแก่ผู้ประสบภัยสึนามิและฟื้นฟูทรัพยากรธรรมชาติ เนื่องจากวัตถุประสงค์ของโครงการนี้เพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและพัฒนาการเลี้ยงปลาในกระชังขนาดใหญ่ โดยรัฐบาลนอร์เวย์มีการสนับสนุนช่วยเหลือโดยการส่งผู้ที่มีความเชี่ยวชาญการปฏิบัติในการเลี้ยงปลาช่อนทะเล ในการเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลในกระชังกลมขนาดใหญ่เส้นรอบวง 50 เมตร เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 16 เมตร ลึก 6 เมตร จำนวน 3 กระชัง ใช้ลูกพันธุ์ปลาที่มีขนาดตัว 40 กรัม จำนวน 20,000 ตัว ซึ่งบริเวณที่มีการติดตั้งกระชังในการเลี้ยงนั้นอยู่ ณ บ้านสามแหลม อ่าวปอ และตะกั่วทุ่งซึ่งเป็นทะเลรอยต่อระหว่างจังหวัดภูเก็ตและจังหวัดพังงา (ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต, 2549)

หลังจากที่เกษตรกรและชาวประมงได้เข้าร่วมโครงการนำร่องการเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลในกระชังขนาดใหญ่ โดยมีรัฐบาลนอร์เวย์ให้การสนับสนุน ภายใต้การดูแลของศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต ในสังกัดกรมประมง ปรากฏว่าประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยงอย่างมาก กรมประมงจึงมีนโยบายที่จะส่งเสริมสนับสนุนให้เกษตรกรไทยเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลเป็นการค้า เพื่อเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร กรมประมงได้เล็งเห็นว่าการส่งออกปลาช่อนทะเลในอนาคตมีแนวโน้มไปในทิศทางที่ดี เนื่องจากมีรายงานการเลี้ยงปลาช่อนทะเลในกระชังเป็นที่นิยมมากในประเทศไต้หวัน เพราะปลาชนิดนี้มีราคาแพง ซึ่งปลาที่มีขนาด 6-8 กิโลกรัม นั้นเป็นที่ต้องการของตลาดญี่ปุ่นและต่างประเทศ ในส่วนปลาที่มีขนาด 8-10 กิโลกรัม เป็นการบริโภคในประเทศโดยรูปแบบผลผลิตนั้นจะผลิตเป็นปลาแล่แช่แข็งเพื่อการส่งออก ทำให้มูลค่าของปลาช่อนทะเลมีราคาอยู่ที่ 5.5 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม, ปลาขนาด 7-8 กิโลกรัม ราคา 5.2 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม, ปลาขนาด 6-7 กิโลกรัม ราคา 4.8 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม และขนาดปลาน้อยกว่า 6 กิโลกรัม ราคา 4.5 ดอลลาร์สหรัฐต่อกิโลกรัม กรมประมงจึงผลักดันให้มีการเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลเพื่อการส่งออกในอนาคต ในปัจจุบันนี้ประเทศไทยไต้หวันและประเทศจีนเป็นประเทศหลักในการผลิตปลาช่อนทะเลเพื่อการส่งออก (FAO Fishery Statistics, 2006) ดังรูปที่ 2.11 และตารางที่ 2.1 แสดงให้เห็นว่าในแต่ละปีมีปริมาณผลผลิตปลาช่อนทะเลของโลกเพิ่มขึ้นทุกปี



รูปที่ 2.12 ผลผลิตปลาช่อนทะเลของโลกในปี ค.ศ. 2000-2014 (FAO, 2006)

ตารางที่ 2.1 ผลผลิตปลาช่อนทะเลของโลกแสดงเป็นตัวเลขในปี ค.ศ. 2000-2014 (FAO, 2006)

Scientific name	Code	ปี (ค.ศ.)	Quantity [t]
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2000	2,626
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2001	3,225
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2002	2,419
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2003	18,664
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2004	18,461
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2005	20,457
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2006	23,234
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2007	30,369
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2008	26,576
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2009	33,481
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2010	39,328
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2011	39,378
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2012	51,517
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2013	44,623
<i>Rachycentron canadum</i>	CBA	2014	40,329

2.9 การศึกษาการพัฒนาการของคัพพะ

จากการศึกษาคัพพะวิทยาในปลาช่อนทะเลของอาคม สิงห์บุญ, และคณะ, (2555) และ Sakthivel, *et al.* (2012) พบว่าปลาช่อนทะเลวางไข่ในช่วงเวลาประมาณเวลา 22.00-23.00 น. ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะมีลักษณะกลมใส เป็นไข่ชนิดไข่ลอยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.29 ± 0.02 มิลลิเมตร หลังจากไข่ผสมจะมีการพัฒนาของคัพพะที่อุณหภูมิน้ำ 27-30 องศาเซลเซียส และความเค็ม 28-30 ส่วนในพันส่วน (part per thousand) ไข่ปลาช่อนทะเลที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วมีการแบ่งเซลล์ เมื่อเวลาผ่านไป 30 นาที พัฒนาเข้าสู่ระยะมอรูล่า (Morula) เมื่อเวลา 3 ชั่วโมง ระยะบลาสตูล่า (Blastula) 4 ชั่วโมง 5 นาที ระยะบลาสโตพอร์ (Blastopore) ปิด 10 ชั่วโมง 55 นาที หลังจากระยะนี้ ปลาจะมีการพัฒนากล้ามเนื้อ ขั้วปล้อง เพื่อพัฒนาเป็นตัวอ่อน และฝักตัวเป็นตัวอ่อนใช้เวลา 22 ชั่วโมง 20 นาที แสดงดังตารางที่ 2.3 และรูปที่ 2.12 ไข่ปลาที่ใกล้ฝักเป็นตัวจะมีหยดน้ำมันขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.20 ± 0.03 มิลลิเมตร ไข่แดงมีปริมาตร 1.63 ± 0.14 มิลลิเมตร และยังพบว่าไข่ปลาช่อนทะเลมีการแบ่งเซลล์เป็นแบบเมอโรบลาสติก คลีเวจ (Meroblastic cleavage) คือมีการแบ่งเซลล์ไข่เฉพาะทางด้านแอนิมัลโพล (Animal pole) เท่านั้นในส่วนของเวเจทัลโพล (Vegetal pole) มีไข่แดงอยู่แต่ไม่มีการแบ่งเซลล์ (วีระพงษ์ วุฒิพันธุ์ชัย, 2536) ซึ่งไข่ปลาประเภทลอยนั้นพบได้ในปลาทะเลทั่วไป ปลาทะเลที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจเป็นส่วนใหญ่ และเมื่อศึกษาระยะการฟักตัวพบว่าจะอยู่ในช่วงเวลา 16-22 ชั่วโมง ดังตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างชนิดพันธุ์ปลาทะเลเศรษฐกิจและระยะเวลาฟักตัว

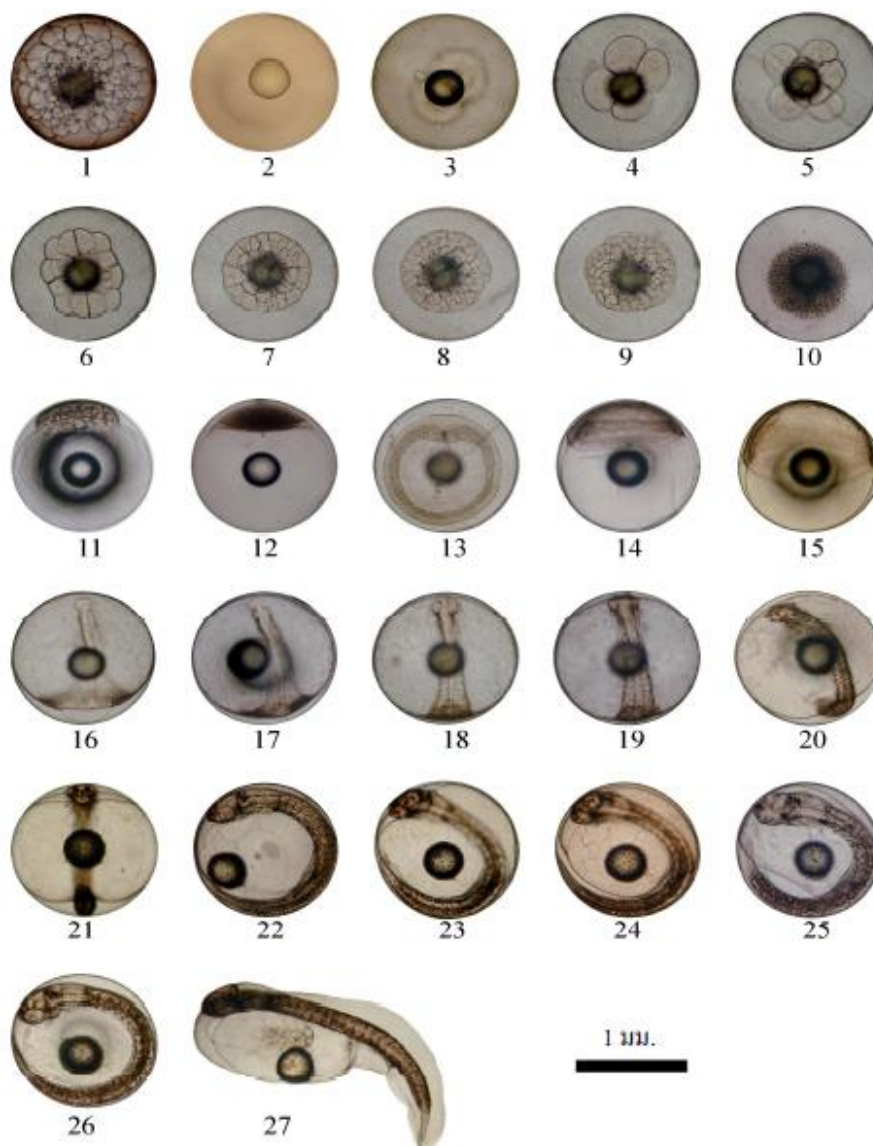
ลำดับ	ชนิดพันธุ์	ระยะเวลาฟัก	อ้างอิง
1	ปลาช่อนทะเล	22 ชั่วโมง	อาคมและคณะ, 2555
2	ปลากะรังจุดฟ้า	19 ชั่วโมง 30 นาที	ธวัชและคณะ, 2547
3	ปลาเก๋าเสือ	19 ชั่วโมง 5 นาที	อาคมและคณะ, 2547
4	ปลาเก๋าน้ำออน	18-20 ชั่วโมง	ทวี, 2529
5	ปลากะรังเหลืองจุดฟ้า	16-17 ชั่วโมง	โกวิทย์และคณะ, 2544
6	ปลาเก๋าดอกแดง	19 ชั่วโมง 45 นาที	อนุวัฒน์และกิตติ, 2530

ตารางที่ 2.3 พัฒนาการของคัพภะปลาช่อนทะเล (อาคม และคณะ, 2555)

เวลา (ชม.)	นาที	ขั้นตอนการพัฒนาของไข่	การจำแนก
-	0	ไข่ได้รับการผสม	-
-	30	zygote	ระยะ 1 เซลล์
-	45	Cleavage stage	ระยะ 2 เซลล์
-	50	Second cleavage	ระยะ 4 เซลล์
-	55	Third cleavage	ระยะ 8 เซลล์
1	15	Fourth cleavage	ระยะ 16 เซลล์
1	25	Fifth cleavage	ระยะ 32 เซลล์
1	33	Sixth cleavage	ระยะ 64 เซลล์
1	55	Seventh cleavage	ระยะ 128 เซลล์
2	15	Eight cleavage	ระยะ 256 เซลล์
3	5	Morula stage	เซลล์มีขนาดเล็กเห็นเป็นเนื้อเดียวกัน
4	5	Blastula stage	Blastoderm เริ่มปกคลุมไข่แดง
7	-	Early gastrula	Blastoderm ปกคลุมไข่แดงประมาณ ครึ่งหนึ่ง
9	55	Late gastrula	พัฒนาเป็นแกนของตัวอ่อน
10	55	Closing of blastopore	ตัวอ่อนยาวขึ้น
12	-	Body segment appearance stage	ระยะกล่อมเนื้อ 5 ปล้อง ตัวอ่อนเจริญ ยกตัวขึ้นสูงจากไข่แดง
13	-	Body segment appearance stage	ระยะกล่อมเนื้อ 11 ปล้อง เริ่มเห็นปุ่มตา เริ่มเกิดปุ่มหาง
14	10	Body segment appearance stage	บริเวณหัว ตานูนขึ้น
15	20	Body segment appearance stage	ปุ่มหางมีความยาวมากขึ้น
16	20	Body segment appearance stage	มองเห็นแกนกลางของร่างกายชัดขึ้น ตา และเริ่มเห็นเลนส์ตา

ตารางที่ 2.3 พัฒนาการของคัพภะปลาช่อนทะเล (อาคม, และคณะ, 2555) (ต่อ)

เวลา (ชม.)	นาที่	ขั้นตอนการพัฒนาของไข่	การจำแนก
17	10	Body segment appearance stage	กล้ามเนื้อเริ่มทำงาน
18	10	Body segment appearance stage	หัวใจเต้น กระจกตัวถี่และแรงขึ้น ความยาวลำตัวเพิ่มขึ้น เลนส์ตาชัดเจน
20	10	Body segment appearance stage	ปุ่มหางเล็ก ไข่แดงเล็กลง เป็นรูปวงรีมากขึ้น
21	10	Body segment appearance stage	เกิดการเคลื่อนที่ของหยดน้ำมัน
22	20	Body segment appearance stage	ระยะฟักเป็นตัว



รูปที่ 2.13 พัฒนาการของคัพภะปลาช่อนทะเล, 1=หลังผสม, 2=ระยะ 1 เซลล์, 3=ระยะ 2 เซลล์, 4=ระยะ 4 เซลล์, 5=ระยะ 8 เซลล์, 6=ระยะ 16 เซลล์, 7=ระยะ 32 เซลล์, 8=ระยะ 64 เซลล์, 9=ระยะ 128 เซลล์, 10=ระยะ 256 เซลล์, 11=morula stage, 12=blastula stage, 13=early gastrula stage, 14=early gastrula, 15=early gastrula, 16=late gastrula, 17=closing of blastopore, 18 ระยะกล้ามเนื้อ 5 ปล้อง, 19=ระยะกล้ามเนื้อ 11 ปล้อง, 20=14 ซม., 21=15 ซม., 22=16 ซม., 23=17 ซม., 24=18 ซม., 25=19 ซม., 26=20 ซม., 27=กำลังออกจากไข่, 27=แรกฟัก (อาคม และคณะ, 2555)

2.10 ฮอโมน 17 α -Methyltestosterone (MT)

คำว่าฮอโมน มาจากภาษากรีก คือ hormao สามารถแปลเป็นภาษาอังกฤษได้ว่า to stir up, awake หรือ excite ในภาษาไทยแปลว่า ก่อทวน หรือกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงคำนี้ได้ถูกใช้ครั้งแรกในปี ค.ศ. 1905 โดยมีทฤษฎีที่ให้ความหมายว่า ฮอโมนว่า เป็นสารเคมีที่สร้าง และหลังจากส่วนหนึ่งของร่างกายที่เป็นต่อมไร้ท่อเข้าสู่กระแสเลือดในปริมาณเพียงเล็กน้อย กระแสเลือดจะนำพาข่าวสารจากสารเคมีนี้ไปออกฤทธิ์ที่อวัยวะเป้าหมาย สารเคมีดังกล่าวจะควบคุมการทำงานของร่างกาย ผ่านกระบวนการสร้างและสลาย (Metabolism) ด้วยปฏิกิริยาเคมี ทำให้เกิดการเจริญ การสืบพันธุ์ และการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะเครียด (พิมลทิพย์ ชุณหพิมล, 2556)

2.10.1 การจัดกลุ่มฮอโมน มีการจัดกลุ่มออกเป็นดังนี้

จากงานวิจัยของเพ็ญพรรณ ศรีสกุลเดียว, (2553) ได้จัดกลุ่มของฮอโมนไว้ดังนี้

- 1) การจัดกลุ่มตามลักษณะโครงสร้าง เป็นการจัดกลุ่มตามโครงสร้างทางชีวเคมี โดยสามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ เปปไทด์ฮอโมนหรือโปรตีนฮอโมน (Peptide hormones) สเตียรอยด์ฮอโมน (Steroid hormone) และเอมีนฮอโมน (Amine hormone)
- 2) การจัดกลุ่มตามตำแหน่งของการออกฤทธิ์
- 3) การจัดกลุ่มฮอโมนตามคุณสมบัติการละลาย สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ ฮอโมนที่ละลายน้ำได้ดี (Hydrophilic hormones) และฮอโมนที่ละลายในไขมัน (Lipophilic hormones)

2.10.2 ชนิดของฮอโมนที่ใช้ในการแปลงเพศปลา

ฮอโมนเพศ (Sex steroids) มีแหล่งผลิตที่สำคัญ คือ อวัยวะเพศ และต่อมหมวกไต โดยมีการแบ่งฮอโมนเพศสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

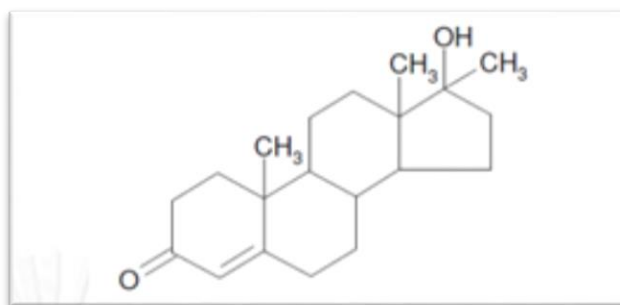
- 1) ฮอโมนเพศหญิง (Estrogen) ธรรมชาติจะสร้างจากรังไข่ ได้แก่ เอสโตรไดอล (Estradiol; E₂) เอสโตรน (Estrone; E₁) และเอสโตรออล (Estril; E₃) เอสโตรเจนธรรมชาติอยู่ในร่างกายได้ไม่นาน เพราะจะถูกย่อยสลายที่ตับ จึงต้องมีการผลิตเอสโตรเจนสังเคราะห์ (Synthetic oestrogens) ขึ้นโดยสามารถแบ่งเอสโตรเจนสังเคราะห์เป็นกลุ่ม 2 กลุ่ม คือ เอสโตรเจนสังเคราะห์ที่มีโครงสร้างสเตียรอยด์ (Steroid oestrogens) และเอสโตรเจนสังเคราะห์ที่ไม่มีโครงสร้างไม่เป็นสเตียรอยด์ (Nonsteroidal compound) ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ของเอสโตรเจน

2) ฮอโรโมนเพศชาย (Androgen) ฮอโรโมนธรรมชาติ ซึ่งมีแหล่งผลิตจากอวัยวะเป็นส่วนใหญ่นอกจากนี้ยังสามารถผลิตได้จากต่อมหมวกไตและรังไข่ ฮอโรโมนเหล่านี้ถูกย่อยสลายง่ายที่ตับ จึงต้องสังเคราะห์เทสโทสเตอโรนขึ้นเพื่อลดอัตราการถูกทำลายที่ตับลงทำให้ฮอโรโมนคงตัวได้นาน ฮอโรโมนสังเคราะห์ที่ใช้ในการแปลงเพศปลา ได้แก่ เมทิลเทสโทสเตอโรน (Methyltestosterone) แอนดรอสเตอโรน (Androsterone) เป็นต้น

ฮอโรโมน 17 α -Methyltestosterone (MT) เป็นฮอโรโมนเพศผู้สังเคราะห์ ซึ่งนิยมนำมาใช้ในการแปลงเพศ โดยฮอโรโมนชนิดนี้จะมีลักษณะเป็นผลึกสีขาวหรือสีครีม มีการขายในรูปแบบผงหรือเม็ด มีคุณสมบัติดังตารางที่ 2.4

ตารางที่ 2.4 คุณสมบัติฮอโรโมน 17 α -Methyltestosterone (MT) Lewis, *et al.* (1997) อ้างอิงใน พิมพ์พิพย์ ชุณหพิมล (2556)

คุณสมบัติ	17 α -Methyltestosterone (MT)
สูตรโมเลกุล	C ₂₀ H ₃₀ O ₂
ขนาดโมเลกุล	แน่นอนประมาณ 0.001287 ไมโครเมตร (1.287 นาโนเมตร) แนวตั้งประมาณ 0.001084 ไมโครเมตร
น้ำหนักโมเลกุล	302.45
เลขทะเบียน ซี.เอ.เอส	58-18-4
สี/รูปร่าง/กลิ่น	มีลักษณะเป็นผงผลึกสีขาวหรือครีม, ไม่มีกลิ่น
จุดหลอมเหลว	162-168 องศาเซลเซียส
การละลาย	ละลายในเมทานอล เอทานอล อีเทอร์และตัวทำละลายอินทรีย์อื่นๆ
การละลายน้ำ	3.39 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 25 องศาเซลเซียส
ค่าคงที่ของเฮนรี	4.7×10 ⁻⁹ (บรรยากาศ-ลูกบาศก์เมตร)ต่อโมล
ค่าสัมประสิทธิ์การกระจายตัวของสารในชั้นออกทานอลต่อชั้นน้ำ (Log k _{ow})	3.36
อัตราค่าคงที่ปฏิกิริยาไฮดรอกซี	1.0×10 ⁻¹⁰ ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อ(โมล-วินาที) ที่ 25 °C
อัตราค่าคงที่ปฏิกิริยาโอโซน	1.1×10 ⁻¹⁷ ลูกบาศก์เซนติเมตรต่อ(โมล-วินาที) ที่ 25 °C



รูปที่ 2.14 โครงสร้าง 17 α -Methyltestosterone (พิมลทิพย์ ชุณหพิมล, 2556)

2.11 ความเป็นพิษของ 17 α -Methyltestosterone (MT)

ฮอร์โมน 17 α -Methyltestosterone (MT) เป็นฮอร์โมนเพศผู้ที่นิยมใช้ในการแปลงเพศปลาชนิด และสัตว์น้ำเศรษฐกิจ MT จัดเป็นสารรบกวนการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ หากมนุษย์และสัตว์ได้รับ MT ในปริมาณที่มากเกินไป จะส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ และอาจก่อให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ได้ (พิมลทิพย์ ชุณหพิมล, 2556) ในการเกษตรใช้ MT ในการผสมอาหารให้แก่ปลุสัตว์ เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและนิยมใช้ในการแปลงเพศปลาโดยผสม MT ลงในอาหาร

งานวิจัยของธงชัย เย็นเปิง, และคณะ (2555) ได้ทำการศึกษาระดับ MT ที่ตกค้างอยู่ในการผลิตลูกปลาแปลงเพศในระบบน้ำหมุนวน 3 รอบการผลิตโดยมีชุดทดลอง 3 ชุด ได้แก่ 1) ไม่มีการใช้ MT และไม่มีการใช้ระบบน้ำหมุนเวียน 2) ไม่มีการใช้ MT แต่ใช้ระบบน้ำหมุนเวียน และ 3) มีการใช้ MT ในปริมาณ 40 มิลลิกรัม ต่ออาหาร 1 กิโลกรัม และใช้ระบบน้ำหมุนเวียน จากนั้นวัดปริมาณ MT ที่ตกค้างในน้ำ ตั้งแต่เริ่มแปลงเพศจนถึงการแปลงเพศ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีการ ECLIA (Electrochemiluminescence) พบว่าปริมาณ MT มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในรอบที่ 3 และทั้ง 3 ชุดการทดลองจะพบปริมาณ MT ใกล้เคียงกัน โดยเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง หลังการแปลงเพศในวันที่ 21 ได้ตรวจพบปริมาณ MT ประมาณ 0.07, 0.09 และ 0.02 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ

พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล และคณะ (2556) ทำการตรวจวัดปริมาณฮอร์โมน MT ในปลานิลรวมถึงตรวจวัด MT ที่ตกค้างในน้ำ ด้วยเครื่องแยกวิเคราะห์สารประสิทธิภาพสูง (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) โดยใช้ตรวจวัดเป็น UV และมีการใช้เทคนิคสกัดเพื่อเพิ่มความเข้มข้นด้วยวิธีสกัดด้วยตัวดูดซับของแข็ง (Solid phase Extraction: SPE) และสกัดของเหลว-ของเหลว (Liquid-Liquid Extraction: LLE) พบว่าในวันที่ 2 หลังจากการแปลงเพศปลาจะตรวจพบ MT ในปริมาณ 0.002 มิลลิกรัมต่อลิตร และไม่สามารถตรวจวัดปริมาณ MT ได้ ในวันที่ 3 หลังจากการแปลงเพศปลา

2.12 เทคนิคการขยายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า (Electroporation)

การขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า (Electroporation, EP) อาศัยหลักพื้นฐานแรงทางไฟฟ้าที่เกิดขึ้นแบบชั่วขณะอันเกิดจากสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ กระทำต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นวัสดุชีวภาพไดอิเล็กทริกมีโครงสร้างแบบ “Lipid bilayer membrane” ให้เกิดการแตกกระจาย หันส่วนหัวที่มีขั้ว (Polar head) ของฟอสโฟลิปิดเข้าหาน้ำ (Hydrophilic) และหันส่วนหางที่ไม่มีขั้ว (Non polar tail) ออกจากน้ำ (hydrophobic) ทำให้เกิดการเรียงตัวแบบ “Bilayer” ซึ่งประกอบด้วยสองชั้นของฟอสโฟลิปิดที่หันส่วนหางเข้าหากัน “ฟอสโฟลิปิดไบเลเยอร์” (Phospholipid bilayer) ทั้งนี้แรงผลัไฟฟ้าแบบชั่วขณะดังกล่าว กระจายอยู่ ทั่วผิวเยื่อหุ้มเซลล์ เพราะถูกแรงบวกกระทำ (Hydrophobic effect) ทำให้บริเวณบางจุดของฟอสโฟลิปิดไบเลเยอร์ บิดม้วนตัวเข้าหากันเป็นผิวเปิด (Open bilayer) เกิดสถานะเป็นช่วงกลางทะลุรูอดเยื่อหุ้มเซลล์ชั่วขณะ (Transient pore) ในบางสภาวะอาจขยายรูที่มีอยู่เดิมบนผิวเซลล์ ให้เปิดกว้างมากขึ้นกว่าเดิมชั่วคราว (Kanduser and Miklavcic, 2008) เป็นผลจากเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ยอมให้อิออนที่อยู่ในสารละลายภายนอกเซลล์และภายในเซลล์เคลื่อนที่เข้าออกแลกเปลี่ยนได้มากขึ้น (Membrane permeability) ทั้งนี้เพราะสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ (Pulse electric field) ก่อให้เกิดแรงทางไฟฟ้าสูงสุดชั่วขณะทำให้อิออนที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์เปิดขยายกว้างกว่าปกติชั่วขณะ บางกรณีสนามไฟฟ้าอาจเหนี่ยวนำให้ผิวเซลล์เพิ่มจำนวนรู ซึ่งกระบวนการเกิดใช้เวลาสั้น ๆ ในระดับไมโครถึงมิลลิวินาที ทั้งนี้ขึ้นกับหลายปัจจัย อาทิ ศักย์ไฟฟ้าเหนี่ยวนำภายนอกเซลล์ (สัมพันธ์กับค่าความเข้มสนามไฟฟ้าที่กำเนิดจากขั้วไฟฟ้า) ศักย์ไฟฟ้าเยื่อหุ้มเซลล์ (Transmembrane potential) สมบัติไฟฟ้าของเซลล์ (สมบัติไดอิเล็กทริกของเยื่อหุ้มเซลล์และของไซโทพลาสซึม) มุมระหว่างทิศทางของสนามไฟฟ้ากับจุดตำแหน่งที่ถูกเหนี่ยวนำบนผิวเซลล์ รัศมีเซลล์ และเงื่อนไขรูปร่างพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (Square-pulse conditions) ที่เหมาะสมได้แก่ ค่าแอมพลิจูด (Amplitude) ช่วงเวลารูปคลื่น (Duration time) และการคายตัวประจุ “Capacitor discharge” เป็นต้น โดยส่วนใหญ่ค่าศักย์ไฟฟ้ามีค่าติดลบ (ประมาณ 200 มิลลิโวลต์ถึง 1 โวลต์) (Zimmermann, 1982 และ Tsong, 1991) และมีค่าสูงสุดบริเวณขั้วเซลล์ (บริเวณที่เซลล์อยู่ใกล้กับขั้วไฟฟ้าบวกและลบ) ด้วยเหตุนี้ศักย์ไฟฟ้าจากขั้วไฟฟ้าที่ใช้เหนี่ยวนำเซลล์ จึงต้องมีค่าใกล้เคียงหรือมากกว่าค่าศักย์ไฟฟ้าเยื่อหุ้มเซลล์เล็กน้อยจึงจะเหนี่ยวนำให้เกิดการขยายรูที่ผิวเซลล์ได้ ทั้งนี้เซลล์แต่ละชนิดมีเงื่อนไขการเกิดต่างกัน ในกรณีนี้ศักย์ไฟฟ้าภายนอกมีค่ามากกว่าค่าวิกฤติ (ค่าเริ่มต้น “Threshold” ที่ก่อให้เกิด EP) และมากกว่าศักย์ไฟฟ้าวิกฤติ เยื่อหุ้มเซลล์จะสูญเสียสมบัติความยืดหยุ่นสูญเสียสมบัติไฟฟ้า และไม่สามารถคืนกลับสภาพเดิมได้ เป็นกระบวนการที่ผันกลับไม่ได้ (Irreversible EP) และในทางกลับกันหากศักย์ไฟฟ้ามีค่าไม่เกินค่าวิกฤติ รูสามารถคืนสู่สภาพเดิมถือเป็น EP แบบผันกลับได้ (Reversible EP) ที่เอื้อให้เซลล์ดำรงชีวิตต่อไปได้

2.13 คุณสมบัติไฟฟ้าของอนุภาคชีวภาพในเซลล์ทดลอง

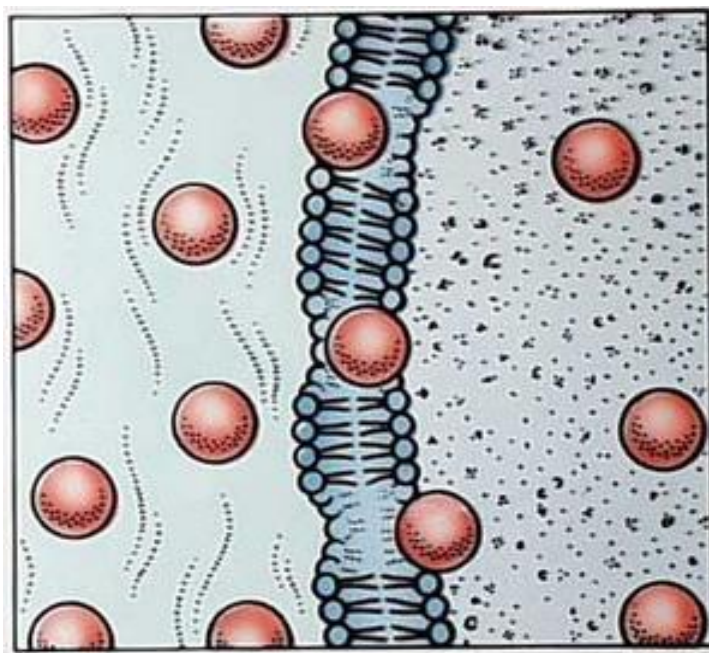
การเหนี่ยวนำอนุภาคชีวภาพให้สามารถเหนี่ยวนำด้วยเทคนิคทางไฟฟ้านั้น เซลล์จะต้องมีคุณสมบัติไดอิเล็กทริก (Dielectric properties) หรือที่เรียกว่า “สมบัติทางไฟฟ้า” เพราะสามารถบ่งบอกค่าสภาพนำไฟฟ้า (Conductivity) และค่าไดอิเล็กทริก (ศักย์ชิน บุญถวิล, 2554) จากการศึกษาของ Asami, *et al.*, (1996) สมบัติไฟฟ้าเซลล์ชีวภาพที่มีค่าไดอิเล็กทริกและสภาพนำไฟฟ้าแปรค่าตามอายุ ขนาด และรูปร่างของเซลล์ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มีผลต่อกระบวนการนำพาสารเข้าสู่เซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และส่งผลต่อการกระจายตัวและการจัดเรียงตัวของประจุภายในเซลล์และของเหลวภายในเซลล์ตามลำดับ เมื่อเซลล์ได้รับอิทธิพลจากสนามไฟฟ้ากระแสสลับจะถูกแรงเสริมกระตุ้นผลักดันให้ประจุไฟฟ้าเหล่านั้นเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกผนังเซลล์แบบผิดธรรมชาติ ทำให้ค่าไดอิเล็กทริกและสภาพนำไฟฟ้าของเซลล์มีค่าผันผวนแปรเปลี่ยนตามความถี่ของสนามไฟฟ้า (ศักย์ชิน บุญถวิล, 2554)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมของเซลล์ชีวภาพที่ต้องการเหนี่ยวนำต้องมีสภาพนำไฟฟ้าต่ำกว่าสารที่อยู่ภายในเซลล์ และต้องมีค่าต่ำกว่าค่าสภาพนำไฟฟ้าของเซลล์ไฮโดพลาสซึมของเซลล์ ทั้งนี้เซลล์แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันทางด้านคุณสมบัติไฟฟ้า ค่าสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายแขวนลอยเซลล์จึงมีความสำคัญ โดยงานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการทดลองในสารละลายจำพวกน้ำตาล คือ แมนนิทอล (Mannitol) และซูโครส (Sucrose) โดยใช้เป็นตัวทำลายซึ่งสารละลายดังกล่าวนี้ซึ่งเป็นสารละลายที่เฉื่อยต่อกระบวนการแพร่ของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

2.14 การเคลื่อนที่ของสารผ่านเซลล์ที่เกิดขึ้นในการขยายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า

การเคลื่อนที่ของอนุภาคสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยธรรมชาติจัดเป็นกระบวนการแพร่ แต่ในงานวิจัยนี้เซลล์แช่ปลออยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามไฟฟ้า การเคลื่อนที่ของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์จึงเป็นแบบอาศัยแรงทางไฟฟ้าภายนอกเป็นตัวกระตุ้นให้อนุภาคสารผ่านเข้าออกแบบผิดธรรมชาติชั่วคราวโดยที่เซลล์ยังมีชีวิตอยู่ ซึ่งกระบวนการดังกล่าวนี้เกิดจากพลังงานจลน์ (Kinetic energy) ของโมเลกุลหรือไอออนของสาร ทั้งนี้การแพร่ของโมเลกุลของสารจะเกิดจากความเข้มข้นสูงกว่าไปยังจุดที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า จนทำให้ทุกบริเวณมีความเข้มข้นของโมเลกุลหรือไอออนเท่ากัน ดังรูปที่ 2.15 โดยมีปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อความเร็วของการแพร่จะมากหรือน้อยนั้นขึ้นอยู่กับ อุณหภูมิ ความ

แตกต่างของความเข้มข้น ขนาดของโมเลกุลสาร และความเข้มข้นของขนาดของสารตัวกลาง แต่การเคลื่อนที่ของโมเลกุลของสารฮอร์โมนเพศที่ใช้จะเคลื่อนที่เข้าสู่ภายในเซลล์ไปปลาด้วยแรงทางไฟฟ้า



รูปที่ 2.15 การแพร่ (Diffusion) (อ้างอิงจาก <http://www.thaigoodview.com/node/33361>, วันที่ 30 พฤษภาคม พ.ศ. 2560)

2.15 การรักษาสมดุลของเซลล์ชีวภาพในสารละลายแวนลอยเซลล์

เซลล์ชีวภาพที่อยู่ในสารละลายแวนลอยเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการรักษาสมดุลและคุณภาพของเซลล์ให้อยู่ในสภาพที่ไม่ผิดจากเดิมนั้นต้องมีคุณสมบัติในการลดการเกิดปัจจัยที่ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนระหว่างความเข้มข้นของสารละลายภายในเซลล์กับสารละลายแวนลอย

โดยงานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการทดลองสารแวนลอยโดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย ตัวถูกละลายได้แก่สารละลายจำพวกน้ำตาลคือ แมนนิทอล (Mannitol) หรือซูโครส (Sucrose) ซึ่งเป็นสารละลายที่มีคุณสมบัติเฉื่อยต่อกระบวนการแพร่ของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (ศักย์ชิน บุญถวิล, 2554) และสารละลายบัฟเฟอร์ (Buffer solution) ที่มีคุณสมบัติในการรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ในสารละลายแขวนลอยเพื่อลดปัญหาที่จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่ศึกษา โดยใช้ HEPES Buffer และ PBS Buffer ซึ่งสารละลายแขวนลอยเซลล์ดังกล่าวมีคุณสมบัติดังนี้

1) แมนนิทอล (Mannitol)

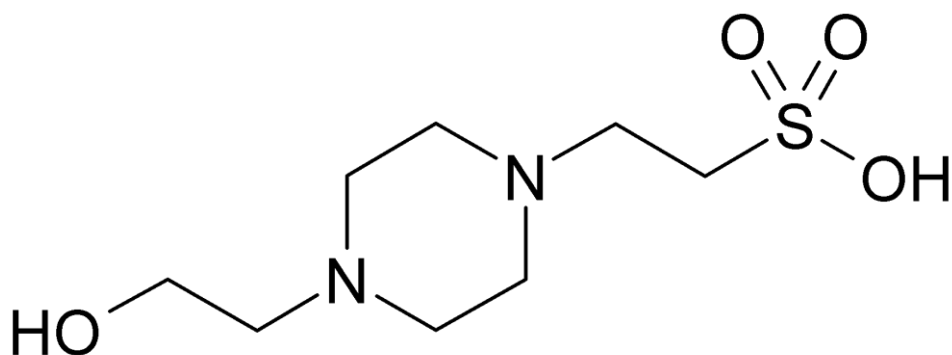
เป็นสารที่มีโครงสร้างเชิงสีขาว มีรสหวานคล้ายน้ำตาลทราย (มีชื่อเรียก Manna sugar) สูตรโมเลกุล คือ $C_6H_{14}O_6$ จัดเป็นสารอนุพันธ์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่มีชื่อเรียกว่า แมนโนส (Mannose) อุตสาหกรรมที่ใช้แมนนิทอลมากที่สุด คือ อุตสาหกรรมการผลิตยา มีคุณสมบัติในการไม่ให้ของเหลวภายในเซลล์ไหลซึมออกจากเซลล์ แรงดันที่ป้องกันไม่ให้ของเหลวในเซลล์ไหลซึมออกนอกเซลล์ เพื่อลดการแลกเปลี่ยนสารละลายระหว่างเซลล์และสารแขวนลอย ไม่ให้เซลล์ได้รับความเสียหายจากสารละลายภายนอก (อภัย ราชภรวิจิตร, 2012)

2) ซูโครส (Sucrose)

เป็นน้ำตาลที่ใช้เป็นสารให้ความหวาน น้ำตาลโมเลกุลคู่ชนิดหนึ่ง สูตรโมเลกุล คือ $C_{12}H_{22}O_{11}$ เกิดจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว 2 โมเลกุล คือ ฟรักโทส และกลูโคส มาเรียงต่อกัน พบอยู่ในพืชและผลไม้หลายชนิด นิยมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งเป็นสารละลายที่มี คุณสมบัติเฉื่อยต่อกระบวนการแพร่ของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (ศักย์ชิน บุญถวิล, 2554)

3) HEPES Buffer (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethane-sulfonic acid)

HEPES Buffer นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเซลล์เนื่องจากส่วนใหญ่จะรักษาค่าความเป็นกรด-ต่าง (pH) ในเซลล์ได้ดี ที่มีคุณสมบัติในการรักษาสภาพความเป็นกรด-ต่าง (pH) ในสารละลายแขวนลอยซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม อีกทั้งเป็นบัฟเฟอร์ที่นิยมใช้ในหน่วยวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพราะมีค่า pH ที่ใกล้เคียงกับร่างกายมนุษย์ (ประมาณ 7.4-7.5) และมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดี รวมทั้งไม่มีผลข้างเคียงกับเซลล์ที่ศึกษา (Wang, *et al.*, 2017 และ ชลธิชา สาหับ, และคณะ, 2013)



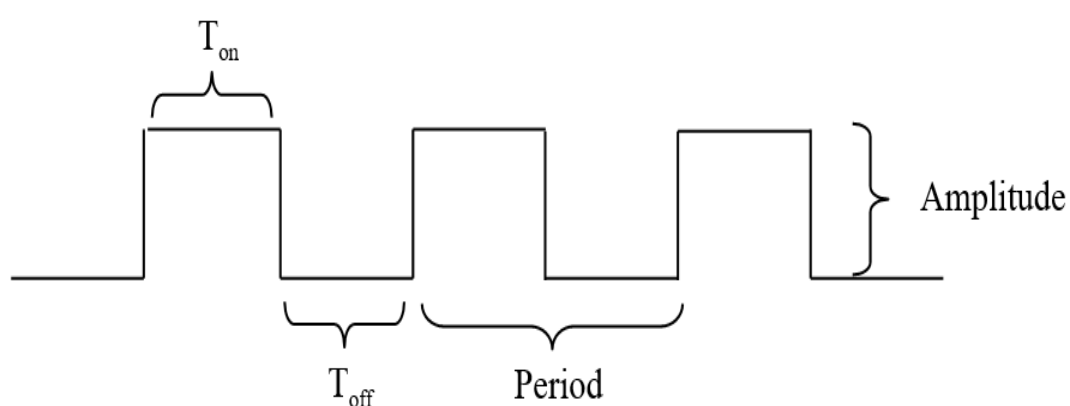
รูปที่ 2.16 โครงสร้าง HEPES Buffer (Wang, *et al.*, 2017)

4) PBS Buffer (Phosphate buffered saline)

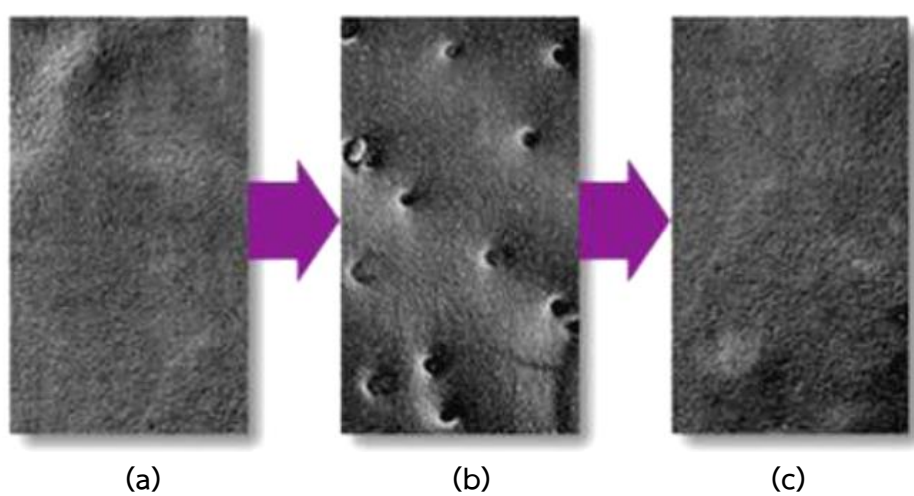
สารละลายมีคุณสมบัติในการรักษาแรงตึงภายในเซลล์ให้เท่ากับภายนอกเซลล์ หรือที่เรียกว่า “Isotonic” ซึ่งประกอบด้วยเกลือต่าง ๆ จะมีคุณสมบัติเป็น Buffer เป็นสิ่งที่ใช้ควบคุม ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารให้และหน้าที่การรักษาเนื้อเยื่อของเซลล์ นิยมใช้สารละลายนี้ ในการล้างผิวเซลล์หรือใช้ในการบ่มเซลล์ในระยะเวลาสั้น ๆ (น้อยกว่า 4 ชั่วโมง)

2.16 สนามไฟฟ้าแบบพัลส์สี่เหลี่ยม (Square-pulse electric field)

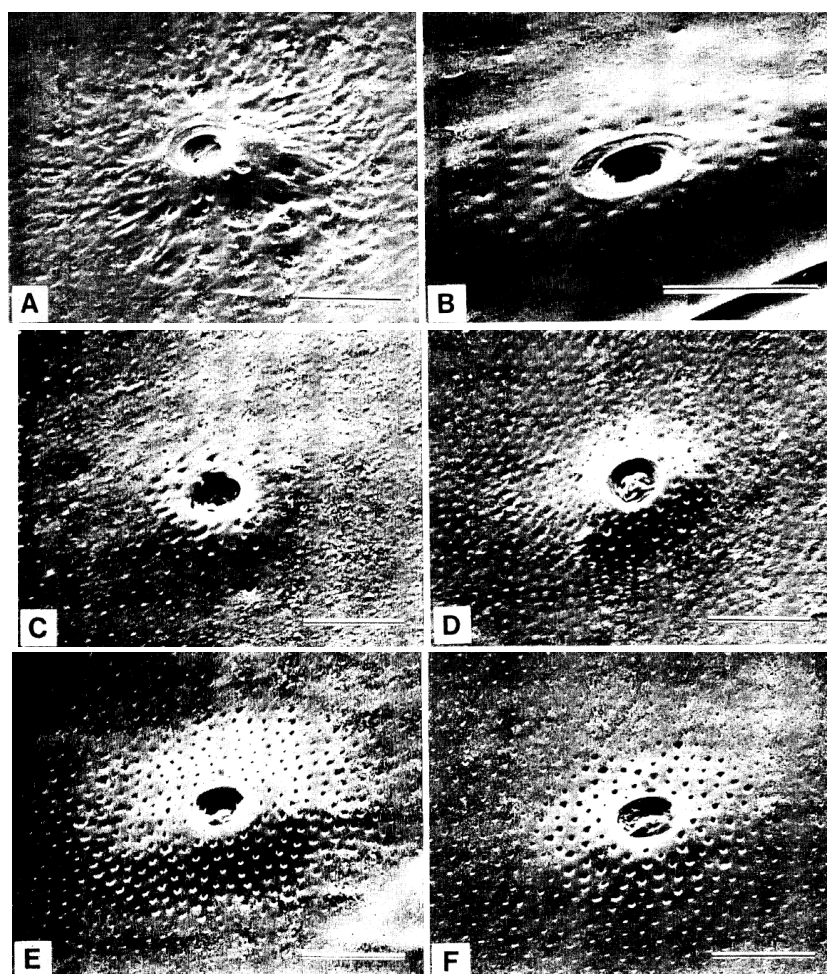
สัญญาณพัลส์แบบรูปสี่เหลี่ยมที่จ่ายให้กับขั้วไฟฟ้าแบบแผ่นบางคู่ขนานก่อให้เกิดกำเนิด สนามไฟฟ้าที่มีขนาด E แปรตามแรงดันไฟฟ้า ความต่างศักย์ไฟฟ้า (V) ที่สัมพันธ์กับรูปสัญญาณ จะมี ค่าเป็นช่วงจังหวะตามคาบสัญญาณ (T) ที่ประกอบด้วยช่วงจ่ายสัญญาณเวลา (T_{on}) และจังหวะการ หยุดจ่ายสัญญาณ (สนามไฟฟ้าและศักย์ไฟฟ้ามีค่าเป็นศูนย์) ในช่วงเวลา T_{off} โดยมีจำนวนลูก คลื่นสัญญาณตามที่กำหนดตามรูปที่ 2.17 ทั้งนี้รูปสัญญาณดังกล่าวจะถูกใช้ให้เป็นมาตรฐานเริ่มต้น ของการเริ่มต้นการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ชีวภาพ โดยทั่วไปที่มีขนาดเซลล์ไม่เกิน 10 ไมโครเมตร แต่ สำหรับเซลล์ที่มีขนาดใหญ่กว่านี้อาจต้องทำการศึกษาเงื่อนไขอื่นเพิ่มเติม อาทิ สัดส่วนของ T_{on}/T_{off} จำนวนลูกคลื่น และปรับค่าแรงดันให้เหมาะสม รวมถึงต้องพิจารณาร่วมกับรูปแบบสัญญาณแบบอื่น



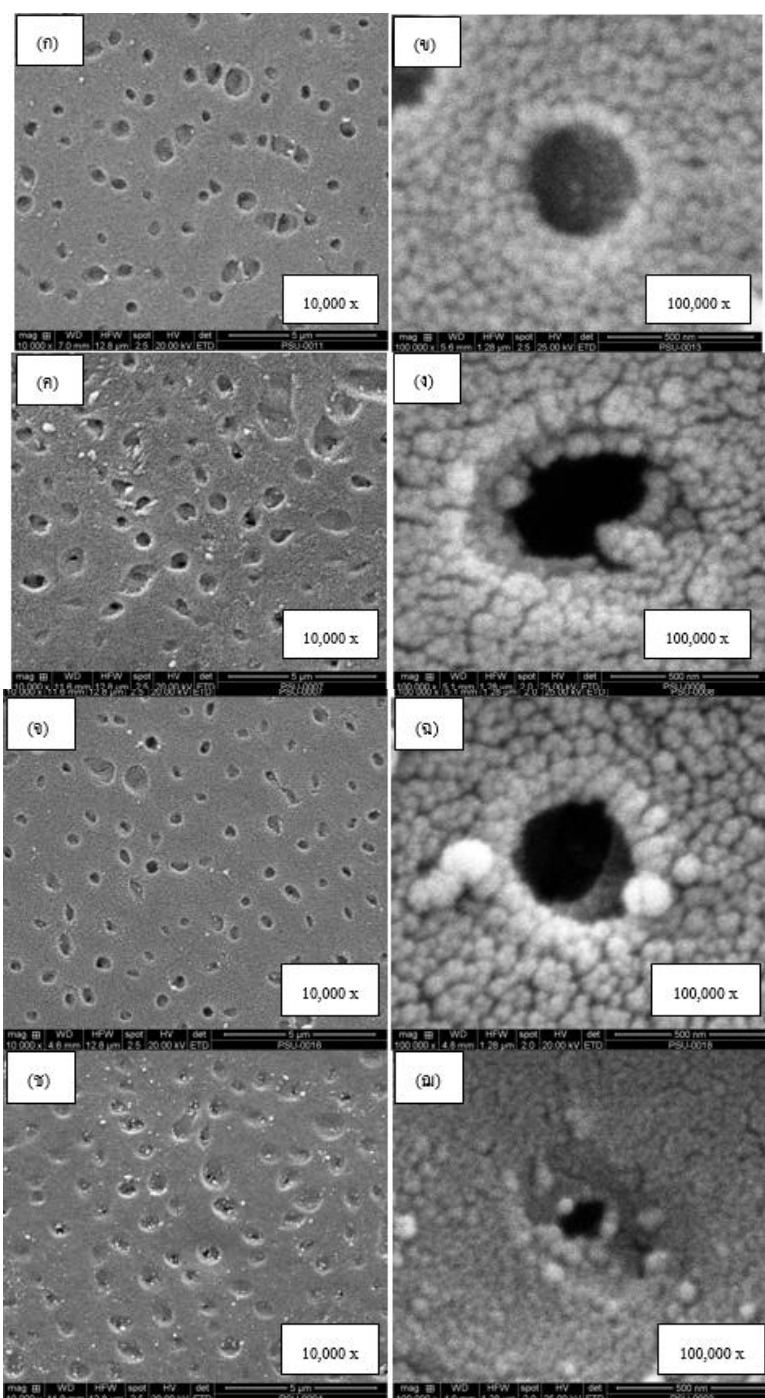
รูปที่ 2.17 รูปสัญญาณพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (square-pulse electric field)



รูปที่ 2.18 ภาพถ่าย SEM เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์ที่กระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ ความเข้มและความถี่ที่เหมาะสม (a) ก่อนการเหนี่ยวนำ (b) ขณะเหนี่ยวนำ (c) หลังการเหนี่ยวนำ ในช่วงเวลาประมาณ 0.5 มิลลิวินาที (Chang, *et al.*, 1992)



รูปที่ 2.19 ภาพถ่าย SEM แสดงรูที่ปรากฏบนเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลา (chorion pore) 6 ชนิด (A) *Sardinops melanostitus*, (B) *Saurida elongate*, (C) *Lateolabrax japonicas*, (D) *Sillago japonica*, (E) *Parapristipoma trilineatum*, (F) *Oplegnatus fasciatus* รูส่วนใหญ่กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 ไมครอน (Hirai, 1987)



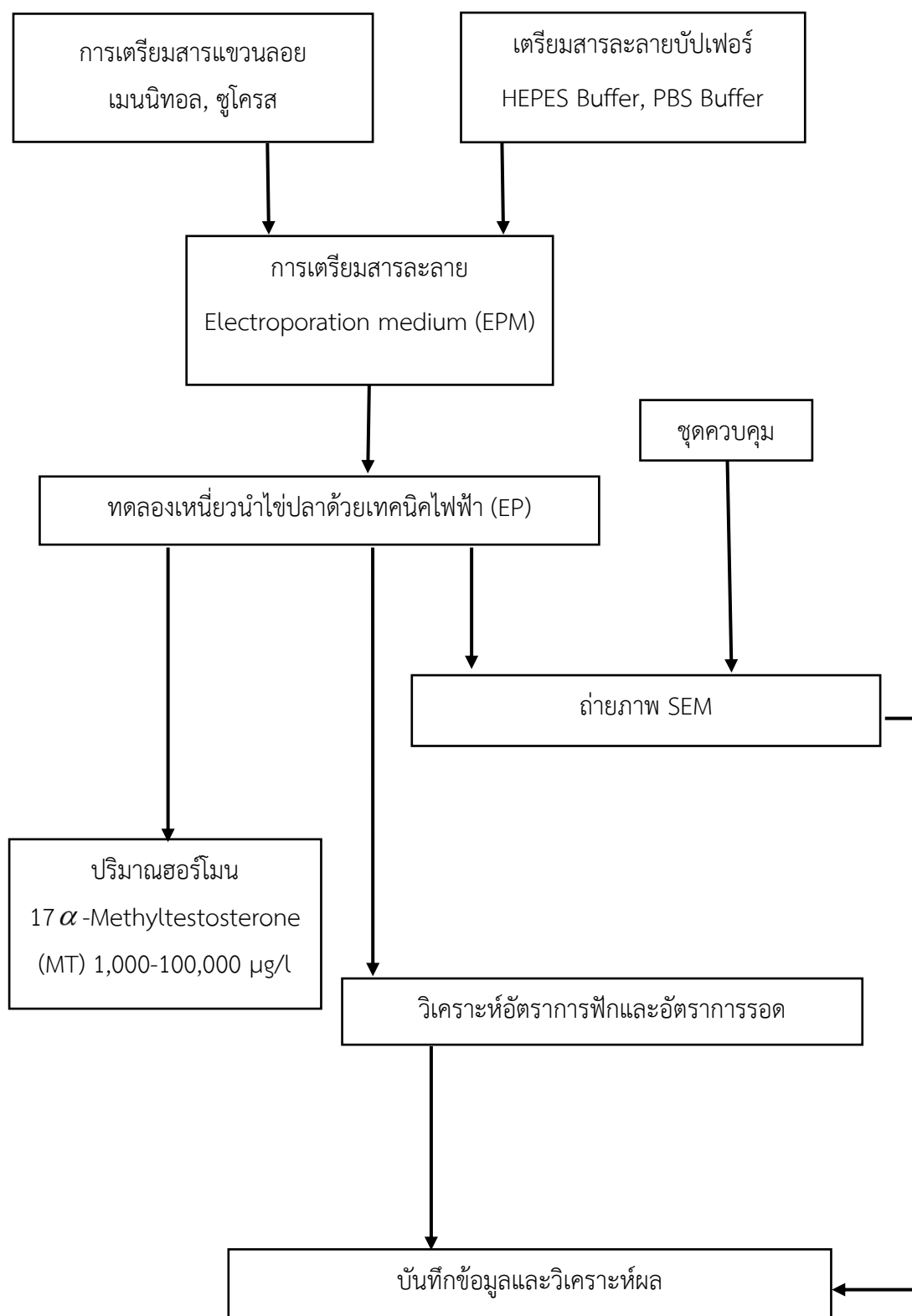
รูปที่ 2.20 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) (ก) และ (ข) ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์, 50 ไมโครวินาที, 1 พัลส์ (ค) และ (ง) ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์, 50 ไมโครวินาที, 3 พัลส์ (จ) และ (ฉ) ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์, 5 ไมโครวินาที, 1 พัลส์ (ช) และ (ฉ) ชุดควบคุม (ธัญดา สอนศิลป์, 2557)

บทที่ 3

วิธีการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการประยุกต์ใช้เทคนิคการขยายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า (Electroporation) เพื่อช่วยในการขยายรูเปิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของไขปลาช่อนทะเลและเหนียวนำอนุภาคสารฮอร์โมนเพศแอนโดรเจนให้แทรกซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ให้เกิดการแปลงเพศด้วยฮอร์โมนดังกล่าว โดยงานวิจัยนี้ทำการหาสูตรสารละลายที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสมต่อการเหนียวนำไขปลาน้ำเค็มด้วยสนามไฟฟ้าโดยมีส่วนผสมของสารฮอร์โมน 17α -Methyltestosterone (MT) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ หาเงื่อนไขทางไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการกระตุ้นให้ไขปลาเปิดขยายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์เงื่อนไขทางไฟฟ้าเหล่านี้ ได้แก่ แอมพลิจูดของสัญญาณพัลส์ (หน่วยเป็นโวลต์) คาบของสัญญาณ (หน่วยเป็นไมโครวินาที) จำนวนลูกคลื่นของสัญญาณ (pulse number) ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเหนียวนำไขปลาในการทดลองแต่ละครั้ง รวมถึงรูปแบบการจัดลำดับกระบวนการทดลองในเชิงเทคนิค (Protocol) และประดิษฐ์ชุดต้นแบบขั้วไฟฟ้าที่เหมาะสมต่อการขยายรูไขปลาช่อนทะเลที่ใช้ในการแปลงเพศ โดยมีรายละเอียด แสดงดังรูปที่ 3.1

- 3.1 การเตรียมตัวอย่างไขปลาช่อนทะเลที่ใช้ในการเหนียวนำ
- 3.2 การทดลองเพื่อเตรียมสารละลายที่เหมาะสมต่อการเหนียวนำไขปลาในสนามไฟฟ้า
- 3.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้เหนียวนำ (Electroporation medium, EPM)
- 3.4 การทดลองหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เหนียวนำไขปลาช่อนทะเล
- 3.5 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง
- 3.6 การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบสัณฐานไขปลาช่อนทะเลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)
- 3.7 วิธีการตรวจสอบเพศปลาช่อนทะเล
- 3.8 การเตรียมโครโมโซมในปลากระรังจุดฟ้าและปลากระรังลายเสือ
- 3.9 อุปกรณ์ขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไขปลาด้วยไฟฟ้า



รูปที่ 3.1 ขั้นตอนการดำเนินงานวิจัย

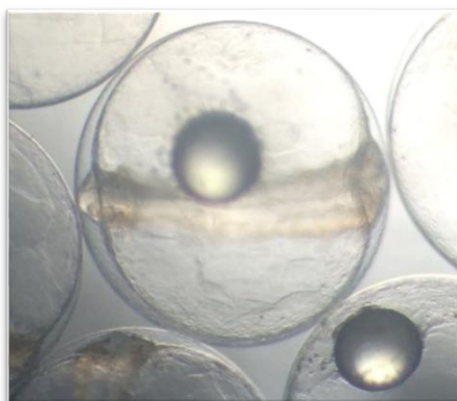
3.1 การเตรียมตัวอย่างไข่ปลาช่อนทะเลที่ใช้ในการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า

การวิจัยครั้งนี้ใช้ไข่ปลาช่อนทะเล ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต จังหวัดภูเก็ต โดยเริ่มจากการนำพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ปลาช่อนทะเลขึ้นมาจากกระชังเพื่อมาปล่อยไว้ในบ่อซีเมนต์ที่มีขนาด 50 ตัน ในอัตราพ่อพันธุ์ต่อแม่พันธุ์ 1:1 ปลาที่ปล่อยไว้ในบ่อซีเมนต์มีการพักฟื้นเพื่อปรับสู่สภาพเป็นระยะเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ เมื่อปลาวางไข่จะดำเนินการเก็บไข่ปลาช่อนทะเลในช่วงอายุ 6-19 ชั่วโมง หลังการปฏิสนธิ (hour post fertilization, hpf) โดยเริ่มสุ่มตัวอย่างไข่ปลาที่มีอายุ 4-5 hpf เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์และระยะการพัฒนาคัพภะของไข่ปลาที่จะนำมาใช้ วิธีการเก็บมีดังนี้

1) เก็บไข่ปลาในบ่อโดยวิธีการลากอวนที่มีขนาดตา 20 ไมโครเมตร โดยใช้วนลากไปในทิศทางเดียวกัน หลายชั่วโมง ตักพักไข่ปลาไว้ในถังที่มีการเติมออกซิเจนตลอดเวลา

2) แยกไข่ดีและไข่เสียโดยพิจารณาจากลักษณะการลอยและจมน้ำของไข่ (ไข่ดีจะลอยน้ำ/ไข่เสียจะจมน้ำ) ตักไข่ที่ลอยผิวน้ำแยกไว้ (ในบางกรณีใช้วิธีการเอาตะกอนออกด้วยการดูดสายยาง)

3) พิจารณากำหนดระยะของคัพภะวิทยาของไข่ปลาโดยมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ระยะคัพภะที่มีการปฏิสนธิแล้วที่ใช้ในงานวิจัยนี้อยู่ในช่วงระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะบลาสโตพอร์ (Blastopore) ซึ่งยังไม่มีการพัฒนาเพศที่ชัดเจน (Sakthivel, *et al.*, 2012 และ อาคม สิงหนุญ และคณะ, 2555) เนื่องจากไข่ปลามีขนาดเล็กและช่วงระยะเวลาในการเจริญเติบโตในแต่ละระยะมีช่วงที่ใกล้เคียงกันไม่สามารถแยกได้ด้วยตาเปล่าจึงได้เลือกการพัฒนาคัพภะวิทยาของปลาช่อนทะเลในช่วงเวลาดังกล่าว ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 ไข่ปลาช่อนทะเลช่วงระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะบลาสโตพอร์ (Blastopore)

3.2 การทดลองเพื่อเตรียมสารละลายที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำไขปลาในสนามไฟฟ้า

เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นโครงการแรกที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อนกับไขปลาน้ำเค็มด้วยเทคนิคทางไฟฟ้า จึงยังไม่มีข้อมูลใดอ้างอิง ผู้วิจัยจึงได้เริ่มจากการทดลองนำสารละลายที่มีแมนนิทอล (Mannitol) และน้ำตาล (Sucrose) เป็นสารตั้งต้นหลัก ผสมกับสารละลาย HEPES Buffer และ PBS Buffer ตามลำดับ โดยสารละลายของฮอร์โมนที่ใช้ในการแปลงเพศปลาในครั้งนี้คือแอนโดรเจนฮอร์โมน 17α -Methyltestosterone (MT) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อนำมาผสมกับสารละลายข้างต้นในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อให้ได้สารละลายรูปแบบสุดท้ายที่รวมส่วนผสมต่าง ๆ เข้าไว้ด้วยกัน เรียกว่า “Electroporation medium” (EPM) ทั้งนี้ในการทดลองแต่ละครั้งจะใช้ปริมาณสาร EPM ที่มีปริมาตรสุทธิ 19.2 มิลลิลิตร (20 มิลลิลิตร โดยประมาณ)

อนึ่งในการทดสอบคุณสมบัติของสารละลาย EPM จะใช้เกณฑ์การพิจารณาความเหมาะสมของสารละลาย ได้แก่ การแยกชั้นของสารละลาย สี และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) โดยการทดสอบในแต่ละครั้งจะใช้สารละลาย EPM ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

โดยหลักการแล้วการเหนี่ยวนำอนุภาคชีวภาพด้วยเทคนิคทางไฟฟ้านั้น เซลล์จะต้องมีคุณสมบัติไดอิเล็กทริก (Dielectric properties) หรือที่เรียกว่า “สมบัติทางไฟฟ้า” เพราะสามารถบ่งบอกค่าสภาพนำไฟฟ้า (Conductivity) และค่าไดอิเล็กทริก (ศักย์ชิน บุญถวิล, 2554) จากการศึกษาของ Asami, *et al.* (1996) สมบัติไฟฟ้าเซลล์ชีวภาพที่มีค่าไดอิเล็กทริกและสภาพนำไฟฟ้าแปรค่าตามอายุ ขนาด และรูปร่างของเซลล์ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้มีผลต่อกระบวนการนำพาสารเข้าสู่เซลล์ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และส่งผลต่อการกระจายตัวและการจัดเรียงตัวของประจุภายในเซลล์และของเหลวภายในเซลล์ตามลำดับ เมื่อเซลล์ได้รับอิทธิพลจากสนามไฟฟ้ากระแสสลับจะถูกแรงเสริมกระตุ้นผลักดันให้ประจุไฟฟ้าเหล่านั้นเคลื่อนที่ผ่านเข้าออกผนังเซลล์แบบผิดธรรมชาติ ทำให้ค่าไดอิเล็กทริกและสภาพนำไฟฟ้าของเซลล์มีค่าผันผวนแปรเปลี่ยนตามความถี่ของสนามไฟฟ้า (ศักย์ชิน บุญถวิล, 2554)

สภาพแวดล้อมที่เหมาะสมของเซลล์ชีวภาพที่ต้องการเหนี่ยวนำต้องมีสภาพนำไฟฟ้าต่ำกว่าของเหลวที่อยู่ภายในเซลล์ และต้องมีค่าต่ำกว่าค่าสภาพนำไฟฟ้าของไซโตพลาสซึม ทั้งนี้เซลล์แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันทางด้านคุณสมบัติไฟฟ้า ค่าสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายแขวนลอยเซลล์จึงมีความสำคัญ โดยงานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการทดลองในสารละลายจำพวกน้ำตาล คือ แมนนิทอล (Mannitol) และซูโครส (Sucrose) โดยใช้เป็นตัวทำละลาย ซึ่งสารละลายดังกล่าวนี้เป็นสารละลายที่เฉื่อยต่อกระบวนการแพร่ของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

3.3 การเตรียมสารละลายที่ใช้เหนี่ยวนำ (Electroporation medium, EPM)

ในการทดลองการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไขปลาช่อนทะเลด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์ ได้คิดค้นสูตรสารละลาย Electroporation medium (EPM) (อยู่ในระหว่างจดสิทธิบัตร) มีส่วนผสมของ HEPES Buffer, PBS Buffer และสารละลายฮอร์โมน MT ที่ละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 มีสูตรการทดลองดังนี้

สูตร	EPM1 = Mannitol + HEPES Buffer
	EPM2 = Mannitol + PBS Buffer
	EPM3 = Sucrose + HEPES Buffer
	EPM4 = Sucrose + PBS Buffer
	EPM5 = Mannitol + HEPES Buffer + MT Solution
	EPM6 = Mannitol + PBS Buffer + MT Solution

3.3.1 อุปกรณ์ที่ใช้

- 1) pH มิเตอร์ (ยี่ห้อ pH METER รุ่น PH-2305D)
- 2) ขวดเก็บสารเคมี
- 3) ปีกเกอร์ขนาด 50 100 500 และ 1,000 มิลลิลิตร
- 4) ไมโครปิเปต
- 5) กระจกบอทวง
- 6) เครื่องกวนสาร (Stirrer)
- 7) เครื่องชั่ง รุ่น BP 210S (บริษัท เอส วี เมดิโก จำกัด) จุดทศนิยม 3 ตำแหน่ง
- 8) แท่งแก้ว
- 9) หลอดใส่ตัวอย่างเพื่อถ่าย SEM

3.3.2 การเตรียมสารละลาย (Electroporation medium, EPM)

สารเคมีที่ใช้ EPM1 = Mannitol + HEPES Buffer

แมนนิทอล (Mannitol) (ยี่ห้อ SIGMA-ALORICH)	91.1	กรัม
HEPES Buffer (ยี่ห้อ Fisher Scientific)	0.477	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	24.6	มิลลิกรัม

สารเคมีที่ใช้ EPM2 = Mannitol + PBS Buffer		
แมนนิทอล (Mannitol) (ยี่ห้อ SIGMA-ALORICH)	91.1	กรัม
PBS Buffer	200	มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	24.6	มิลลิกรัม
สารเคมีที่ใช้ EPM3 = Sucrose + HEPES Buffer		
น้ำตาล (Sucrose)	171	กรัม
HEPES Buffer (ยี่ห้อ Fisher Scientific)	0.477	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	24.6	มิลลิกรัม
สารเคมีที่ใช้ EPM4 = Sucrose + PBS Buffer		
น้ำตาล (Sucrose)	171	กรัม
PBS Buffer	0.200	มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	24.6	มิลลิกรัม
สารเคมีที่ใช้ EPM5 = Mannitol + HEPES Buffer + MT Solution		
แมนนิทอล (Mannitol) (ยี่ห้อ SIGMA-ALORICH)	91.1	กรัม
HEPES Buffer	0.477	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	24.6	มิลลิกรัม
MT Solution	1,000-100,000	ไมโครกรัมต่อลิตร
สารเคมีที่ใช้ EPM6 = Mannitol + PBS Buffer + MT Solution		
น้ำตาล (Sucrose) (ยี่ห้อ SIGMA-ALORICH)	171	กรัม
PBS Buffer	200	มิลลิลิตร
แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตาไฮเดรต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	24.6	มิลลิกรัม
MT Solution	1,000-100,000	ไมโครกรัมต่อลิตร

นำสารละลายในแต่ละสูตรละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับค่า pH ให้ได้ค่า 7.5 ± 0.2 (Maurice, *et al.*, 1992) โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 1 โมล ช่วยปรับความเป็นกรด-ต่าง (pH) เมื่อไม่ใช้ควรเก็บสารละลายไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 17-20 องศาเซลเซียส สารละลายจะแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1

EPM1 = Mannitol + HEPES Buffer	}	100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม
EPM2 = Mannitol + PBS Buffer		
EPM3 = Sucrose + HEPES Buffer		
EPM4 = Sucrose + PBS Buffer		

ตัวอย่างจำนวน 20 ตัวอย่าง และชุดควบคุมจำนวน 1 ตัวอย่าง สารละลายแต่ละชุด การทดลองจะมีการใช้การเหนี่ยวนำโดยเพิ่มตัวต้านทาน 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ

ชุดการทดลองที่ 2

EPM5 = Mannitol + HEPES Buffer + MT solution	}	100 1,000 และ 10,000 โอห์ม
EPM6 = Mannitol + PBS Buffer + MT solution		

สารละลายแต่ละชุดผสม MT ที่มีความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะได้ตัวอย่างทั้งหมด 36 ตัวอย่าง และชุดควบคุม 1 ตัวอย่าง สารละลายแต่ละชุดการทดลองจะมีการใช้การเหนี่ยวนำด้วยศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ โดยเพิ่มตัวต้านทาน 100 1,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ

3.3.3 การเตรียมฮอร์โมน 17 α -Methyltestosterone (MT)

ใช้ฮอร์โมน 17 α -Methyltestosterone (MT) ปริมาณ 3 กรัม ละลายใน เอทิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฮอร์โมน MT (sMT) ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร มีความเข้มข้นของ MT 3,000,000 ไมโครกรัมต่อลิตร

3.3.4 การปรับความเข้มข้นปริมาณสาร MT ใน EPM

ในงานวิจัยแบ่งเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 ไม่เติมสารละลาย MT และชุดการทดลองที่ 2 เพื่อหาเงื่อนไขในการขยายรูเอื่อหุ้มเซลล์ไขปลาช่อนทะเลจะเตรียม EPM ที่ระดับความเข้มข้นของสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ สารละลาย MT ผสมกับสารละลายตัวกลาง (EPM) ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยใช้การคำนวณดังสูตรต่อไปนี้

$$C_1V_1 = C_2V_2 \quad (1)$$

C_1 คือ ความเข้มข้นเริ่มต้น

C_2 คือ ความเข้มข้นที่ต้องการ

V_1 คือ ปริมาตรเริ่มต้น

V_2 คือ ปริมาตรที่ต้องการ

ตัวอย่างการคำนวณหาความเข้มข้นของ MT ใน EPM 1500 ไมโครกรัมต่อลิตร

EPM = Mannitol + HEPES Buffer + MT solution

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$V_1 = \frac{1,500 \text{ ไมโครกรัมต่อลิตร} \times 100 \text{ มิลลิลิตร}}{3,000,000}$$

$$V_1 = 0.050$$

สรุป สารละลาย MT ปริมาตร 0.050 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายตัวกลางปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยสามารถเทียบดังตารางที่ 3.1 ที่คำนวณหาปริมาตรของฮอร์โมนที่ใช้ใน EPM

ตารางที่ 3.1 ระดับปริมาตรความเข้มข้นของฮอร์โมนใน EPM ที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ความเข้มข้น (ไมโครกรัมต่อลิตร)	ความเข้มข้น MT (ไมโครกรัมต่อลิตร)
1,000	0.033
1,500	0.050
3,000	0.100
5,000	0.168
50,000	1.667
100,000	3.334

3.4 การทดลองหาค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้เหนี่ยวนำไข่ปลาช่อนทะเล

กำหนดเงื่อนไขของไข่ศักย์ไฟฟ้าที่ไข่ปลาช่อนทะเลสามารถทนทานได้ ทำการทดลองโดยนำไข่ปลาช่อนทะเลช่วงระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะบลาสโตพอร์ (Blastopore) มาทดสอบเหนี่ยวนำค่าความทนทานต่อศักย์ไฟฟ้าที่สามารถเหนี่ยวนำได้โดยไข่ไม่ได้รับความเสียหาย และสามารถประเมินจากอัตราการฟักและอัตราการรอดตายของไข่ปลาหลังการเหนี่ยวนำ โดยมีกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ และเพิ่มค่าความต้านทานที่มีขนาด 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ โดยเงื่อนไขรูปสัญญาณพัลส์แบบรูปสี่เหลี่ยม (T_{on} และ T_{off}) 50 ไมโครวินาที จำนวนลูกคลื่น 3 ลูกคลื่น โดยมีขั้นตอนในการปฏิบัติดังนี้

- 1) คัดแยกเซลล์ไข่ปลาช่อนทะเลให้ได้ระยะที่ต้องการ
- 2) นำไข่ปลาที่ได้จากการเก็บมาตัวอย่างละประมาณ 700-1,000 ฟอง มากรองเอาเฉพาะไข่ปลาด้วยกระชอน
- 3) นำไข่ปลาช่อนทะเลมาแช่ในสารละลาย EPM ที่เตรียมไว้ในแต่ละชุดตัวอย่างประมาณ 10 วินาที แล้วนำไปเหนี่ยวนำโดยใช้เทคนิคทางไฟฟ้า (Electroporation) ศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เพิ่มต้านทานที่มีขนาด 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม (เทียบเท่าสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มในช่วง 26.25-87.5 กิโลโวลต์ต่อเมตร) ตามลำดับ ด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์รูปคลื่นสี่เหลี่ยม (Square pulse-wave electric field) กระตุ้นด้วยคาบสัญญาณช่วง 50 ไมโครมิลลิวินาที จำนวนลูกคลื่นสัญญาณ 3 ลูกคลื่น
- 4) นำไข่ปลาช่อนทะเลที่ได้ผ่านการเหนี่ยวนำแล้วแบ่งออกเป็นสองส่วน เพื่อศึกษาอัตราการฟัก (Hatching) อัตราการรอดตาย (Survival rate) และตรวจสอบสัญญาณทางกายภาพ เพื่อดูลักษณะของไข่ปลาบริเวณพื้นผิวเซลล์ไข่ปลาผ่านภาพถ่าย SEM เพื่อดูลักษณะพื้นผิวเซลล์ไข่ปลา ความหนาแน่นรูที่ผิว ขนาดความกว้างของรูชุดควบคุมและชุดที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า

3.5 ขั้นตอนการเพาะเลี้ยง

งานวิจัยนี้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงและเหนี่ยวนำไขปลาช่อนทะเลที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต จังหวัดภูเก็ต

3.5.1 การเพาะเลี้ยงและอนุบาลปลาวัยอ่อน

เมื่อเหนี่ยวนำไขปลาช่อนทะเลแล้ว นำไขปลาช่อนทะเลมาเพาะฟักในกระบะที่มีความจุ 50 ลิตร ดังรูปที่ 3.3 ด้วยอัตราส่วนไขปลาช่อนทะเลประมาณ 50 ฟองต่อน้ำ 1 ลิตร โดยเติมออกซิเจนตลอดเวลาในระดับเบา ซึ่งไขปลาช่อนทะเลเป็นประเภทลอยน้ำ จึงไม่สมควรที่จะเติมออกซิเจนที่มีความแรงจนเกินไปเพราะจะทำให้ไข่ช้ำ และเสียหายได้ ไขปลาช่อนทะเลเมื่อมีการฟักออกเป็นตัวอ่อนแล้วจะมีขนาดของไข่แดงหรือหยดน้ำมันมีขนาดเล็กจึงต้องมีการให้อาหารหลังจากมีการฟัก โดยให้โรติเฟอร์เป็นอาหารซึ่งจะใส่โรติเฟอร์ให้มีความหนาแน่น 5-10 ตัวต่อมิลลิลิตร พร้อมกับเติมคลอเรลลาความหนาแน่น 500,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เพื่อเป็นอาหารของโรติเฟอร์ (อาคมสิงห์บุญ, และคณะ, 2555)



รูปที่ 3.3 กระบะเพาะฟักตัวอ่อนปลาช่อนทะเล

3.5.2 การสูบน้ำจำนวนตัวอ่อนปลาช่อนทะเล

สูบน้ำลูกปลาในช่วงระยะมีการฟัก (Hatching) โดยใช้บีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร สูมตักในถังเพาะฟัก สูมน้ำลูกปลา 3 ครั้งต่อ 1 ถัง หากค่าเฉลี่ยและเทียบกับปริมาณน้ำทั้งหมดภายใน ถังเพาะฟัก ปริมาณของลูกปลาทั้งหมดที่คำนวณได้นี้เป็นวิธีเดียวกับการนับไข่ปู ตามวิธีการของวุฒิชัย อ่อนเอี่ยม, และคณะ (2552) หลังจากการฟักของตัวอ่อนปลาช่อนทะเล 3 วัน จะใช้วิธีการนับโดยการ ลดปริมาณน้ำที่มีทั้งหมดแล้วนับจำนวนปลาทั้งหมดที่มีชีวิตอยู่ จะทำให้ได้ค่าอัตราการรอดตายของตัว อ่อนปลาช่อนทะเล

3.6 การเตรียมตัวอย่างเพื่อตรวจสอบสัณฐานไข่ปลาช่อนทะเลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM)

ตรวจสอบสัณฐานของไข่ปลาช่อนทะเลโดยวิธีการพิจารณาผลจากภาพถ่าย “Scanning Electron Microscope” (SEM) ส่งตัวอย่างไข่ปลาช่อนทะเลที่ผ่านการตรึงสภาพ (fixation) แล้วไปยังศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์เพื่อตรวจสอบลักษณะโครงสร้าง ทั้งนี้ผู้วิจัยได้รักษา สภาพตัวอย่างไข่ปลาที่ผ่านการเหนียวน้ำด้วยไฟฟ้าด้วยสาร Formaldehyde (CH₂O)_n 4 เปอร์เซ็นต์ ตัวแปรที่ถูกนำมาพิจารณาลักษณะทางกายภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ของไข่ปลา ได้แก่ ความหนาแน่นรู ที่ปรากฏที่ผิวไข่ปลา ลักษณะของรู และขนาดความกว้างของรู การตรึงสภาพ (fixation) ไข่ปลาช่อน ทะเลกระทำโดยใช้สาร Formaldehyde (CH₂O)_n 4 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายใน 0.2 นอร์มอล ฟอสเฟต บัฟเฟอร์เป็นระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง ล้างไข่ปลาด้วย 0.1 นอร์มอล ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง ตาม ด้วยล้างไข่ปลาด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ขจัดน้ำออกจากไข่ปลาโดยใช้ เอทิลแอลกอฮอล์จากระดับความ เข้มข้นต่ำ ๆ ไปจนถึงเอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ที่ตามความเข้มข้นดังนี้

50 เปอร์เซ็นต์	เอทิลแอลกอฮอล์	15-30	นาที	2 ครั้ง
70 เปอร์เซ็นต์	เอทิลแอลกอฮอล์	15-30	นาที	2 ครั้ง
80 เปอร์เซ็นต์	เอทิลแอลกอฮอล์	15-30	นาที	2 ครั้ง
90 เปอร์เซ็นต์	เอทิลแอลกอฮอล์	15-30	นาที	2 ครั้ง
100 เปอร์เซ็นต์	เอทิลแอลกอฮอล์	30	นาที	2 ครั้ง

เมื่อแช่ตัวอย่างในเอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ที่ 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำตัวอย่างไปทำให้แห้ง ณ จุดวิกฤต (Critical point drying, CPD) และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope, SEM) ต่อไปซึ่งขั้นตอนนี้ต้องส่งตัวอย่างไปที่ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

หมายเหตุ

- 1) ไข่ปลาช่อนทะเลมีขนาดเล็กจึงไม่เหมาะแก่การแช่เอทิลแอลกอฮอล์เป็นระยะเวลาเกินกว่า 20 นาที เพราะจะทำให้โครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลารวมถึงรูปร่างของไข่ปลาช่อนทะเลมีลักษณะผิดปกติได้
- 2) กรณีที่ต้องการหยุดการเตรียมตัวอย่างชั่วคราว ให้แช่ตัวอย่างใน 70 เปอร์เซ็นต์เอทิลแอลกอฮอล์ และเก็บในตู้เย็น
- 3) การขนส่งไข่ปลาเพื่อวิเคราะห์นั้นควรนำไข่ปลาแช่ในสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 95-100 เปอร์เซ็นต์ และเก็บในที่เย็น

3.6.1 อุปกรณ์และสารเคมีมีดังนี้

อุปกรณ์ที่ใช้

- 1) บีกเกอร์ขนาด 100, 500 และ 1,000 มิลลิลิตร (ยี่ห้อ PYREX)
- 2) กระจกตวง (ยี่ห้อ PYREX)
- 3) ขวดเก็บสารเคมีสีชา
- 4) แห้งแก้ว (สำหรับคนสารเคมี)
- 5) ไมโครปิเปต ขนาด 1 มิลลิลิตร (ยี่ห้อ Transferpette)

สารเคมีที่ใช้

- 1) Formaldehyde (CH₂O)_n 4 เปอร์เซ็นต์
- 2) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์
- 3) เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 50, 70, 80, 90 และ 100 เปอร์เซ็นต์
- 4) น้ำกลั่น

การเตรียมบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer solution, PB)

การเตรียม Stock Solution

1) Solution A Sodium Phosphate monobasic (NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O)	27.6	กรัม
หรือ NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	31.2	กรัม
เติมน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

2) Solution B Sodium Phosphate dibasic (Na_2HPO_4)	28.4	กรัม
หรือ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	35.61	กรัม
เติมน้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

การเตรียม 0.2 โมลาร์ PB

1) Stock Solution A	23	46	69	92	มิลลิลิตร
2) Stock Solution B	77	154	231	308	มิลลิลิตร
Total	<u>100</u>	<u>200</u>	<u>300</u>	<u>400</u>	มิลลิลิตร

3) นำสารละลายข้อ 1 และ 2 มาผสมกันปริมาตรรวม 100, 200, 300 และ 400 มิลลิลิตรตามลำดับ

4) ปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.3 โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) 1 นอร์มอล

การเตรียม 0.1 โมลาร์ PB

เจือจาง 0.2 โมลาร์ PB ด้วยน้ำกลั่น ในอัตราส่วน 0.2 โมลาร์ PB:DW 1:1 เตรียม 0.2 โมลาร์ PB:น้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร:250 มิลลิลิตร

3.7 วิธีการตรวจสอบเพศปลาช่อนทะเล

ลักษณะทางกายภาพของปลาช่อนทะเลตัวผู้และตัวเมียมีลักษณะเหมือนกัน แต่จะมีลักษณะแตกต่างกันเมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ ปลาเพศเมียจะมีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ ปลาเพศผู้จะมีความสมบูรณ์เพศเมื่ออายุประมาณ 2 ปี ส่วนปลาเพศเมียจะมีความสมบูรณ์เพศเมื่อมีอายุประมาณ 3 ปี อย่างไรก็ตามปลาช่อนทะเลที่มีอายุระหว่าง 1-2 ปี จะไม่สามารถระบุเพศได้ชัดเจนเนื่องจากปลายังไม่เข้าสู่ระยะสมบูรณ์เพศดังที่กล่าวในตอนต้น ดังนั้นในช่วงระหว่าง 1-2 ปีแรก หากต้องการตรวจสอบเพศสามารถตรวจสอบได้โดยเทคนิคการตรวจสอบเพศปลาซึ่งนิยมทำโดยนำปลามาตรวจช่องท้องเนื่องจากปลาช่อนทะเลไม่สามารถแยกเพศด้วยตาเปล่าได้ โดยมีวิธีการดังกล่าวนี้สามารถสังเกตเบื้องต้นคือ ถ้าเป็นปลาเพศผู้เมื่อจับท้องรีดเบา ๆ น้ำเชื้อจะไหลออกมาจะมีลักษณะสีขาวเห็นได้ชัด ส่วนปลาเพศเมียจะมีลักษณะท้องค่อนข้างอูมหากจะตรวจสอบการเจริญเติบโตของรังไข่จะต้องใช้ท่อสอดไข่ (I.D) ขนาด 1.0 มิลลิเมตร สอดเข้าทางช่องท้องของปลา แสดงดังรูปที่ 3.4 เพื่อดูไข่ปลาและนำมาตรวจสอบผ่านกล้องจุลทรรศน์

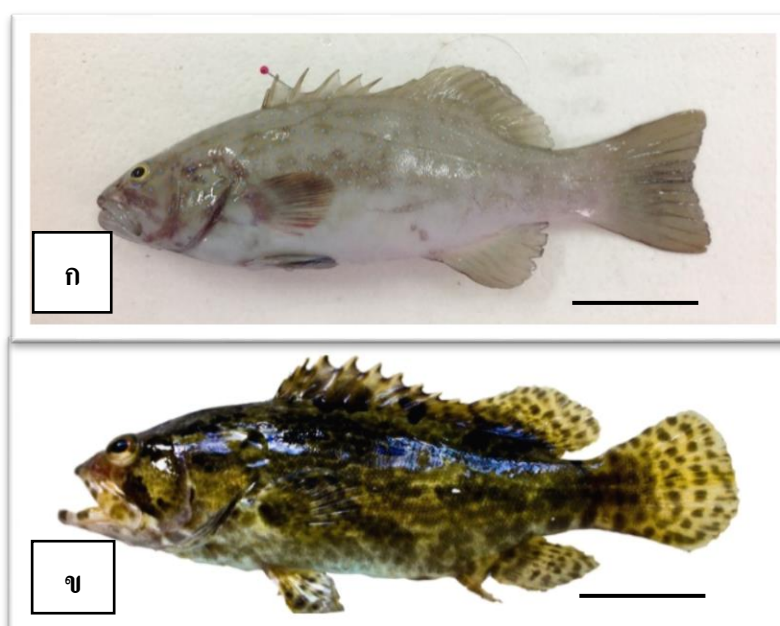


รูปที่ 3.4 การตรวจสอบการเจริญเติบโตของรังไข่ (วินัย เนตรวงศ์ และคณะ, 2556)

3.8 การเตรียมโครโมโซมในปลากะรังจุดฟ้าและปลากะรังลายเสือ

การเตรียมโครโมโซมเป็นการวิเคราะห์ด้านพันธุศาสตร์ ในเบื้องต้นของงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยได้ทดลองตรวจโครโมโซมเพศกับปลากะรังในสกุล *Epinephelus* และ *Plectropomus* ด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบธรรมดา เพื่อเป็นความรู้พื้นฐานในการขยายผลต่อยอดสู่ปลาช่อนทะเลในอนาคต โดยมีการดำเนินงานแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน ได้แก่ การเก็บตัวอย่าง การเตรียมโครโมโซม การย้อมสีโครโมโซม การวิเคราะห์และ ตรวจสอบโครโมโซม มีขั้นตอนดังนี้

1) เก็บตัวอย่างปลากะรังบางชนิดในสกุล *Epinephelus* และ *Plectropomus* โดยได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต เมื่อวันที่ 12 กรกฎาคม พ.ศ. 2558 โดยตัวอย่างปลาทั้งหมดมี 2 ชนิด คือ ปลากะรังจุดฟ้า จำนวน 5 ตัว และปลากะรังลายเสือ จำนวน 3 ตัว ปลามีน้ำหนัก 100-500 กรัม ส่งตัวอย่างปลาเพื่อตรวจสอบโครโมโซมที่ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น โดยทำการเลี้ยงปลาตัวอย่างในตู้ปลาที่มีขนาด 20×48×20 นิ้ว ในน้ำทะเลที่มีความเค็ม 26-32 ส่วนในพันส่วน (part per thousand) อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียส ได้รับแสงช่วงสว่างต่อช่วงมืด เป็นจำนวน 8 ต่อ 16 ชั่วโมง เลี้ยงไว้เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน เพื่อทำการปรับสภาพปลาให้หายเครียด ก่อนทำการตรวจสอบโครโมโซมในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 3.5 ลักษณะภายนอกของปลากะรังจุดฟ้า (*Plectropomus leopardus*) (ก) ปลากะรังลายเสือ (*Epinephelus fuscoguttatus*) (ข) สเกลบาร์เท่ากับ 5 เซนติเมตร

3.8.2 การเตรียมโครโมโซม

การเตรียมโดยใช้วิธีทางตรง (Direct chromosome preparation) อวัยวะที่ใช้ในการทดสอบ คือไต เนื่องจากอวัยวะส่วนนี้เป็นส่วนที่มีการแบ่งเซลล์ตลอดเวลา โดยเตรียมจากในตัวอย่างปลาที่มีชีวิต การเตรียมโครโมโซมโดยวิธีทางตรง ในสภาพภายในร่างกายตัดแปลงจากวิธีของ Chen and Ebeling (1968) และ Nanda, *et al.* (1995) มีขั้นตอนดังนี้

ฉีดโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ ขนาด 1 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม เข้าไปในกล้ามเนื้อ (Intramuscular injection) ของปลา หรือช่องท้องของปลาเป็นระยะเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการสลบปลาโดยใช้น้ำแข็ง แล้วนำเอาเฉพาะส่วนไตออกมาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ และบดโดยเติมสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ (KCl 0.075 M) กรองเศษเซลล์ขนาดใหญ่ออก เทตะกอนเซลล์ลงในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 15 มิลลิลิตร และปั่นประมาณ 25-35 นาที นำตะกอนเซลล์ตัวอย่างไปปั่นที่ระดับความเร็ว 1,200-1,500 รอบต่อนาที นาน 10 นาที ซึ่งตะกอนจะแยกส่วนออกเป็นสองส่วน โดยทำการทิ้งส่วนใสข้างบน แล้วเติมน้ำยาตรึงสภาพ (fixative) ที่มีส่วนผสมของเมทานอล 3 ส่วนต่อกรดอะซิติก 1 ส่วน (methanol: acetic; 3:1) หลังจากนั้นนำสารละลายไปปั่นเหวี่ยงที่ระดับความเร็ว 1,200-1,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

ทั้งส่วนใสข้างบน เติมน้ำยาตรึงสภาพลงไป 7-8 มิลลิลิตร ปั่นอีกครั้ง ทำซ้ำเพื่อล้างตะกอนจนเซลล์ตัวอย่างสะอาด และเก็บตะกอนเซลล์ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3.8.3 การเตรียมสไลด์โครโมโซมและการย้อมสีโครโมโซม

เตรียมสไลด์โครโมโซมโดยนำตะกอนเซลล์ที่เตรียมไว้มาหยดบนสไลด์ที่สะอาด 1-2 หยด ปล่อยให้ตะกอนแห้งในอุณหภูมิห้อง จากนั้นย้อมสีโครโมโซมโดยเทคนิคการย้อมแบบธรรมดา จะย้อมสไลด์ด้วยสีจิมซ่า 10 เปอร์เซ็นต์ ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่า pH 7.2 เป็นระยะเวลา 20-30 นาที แล้วล้างสไลด์ด้วยน้ำกลั่นให้สะอาด ผึ่งให้แห้งในอุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.8.4 การตรวจสอบโครโมโซม การจัดการไอโทป์ และการทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน

1) การตรวจสอบโครโมโซม เลือกเซลล์ที่ต้องการนำมาศึกษา ซึ่งมีโครโมโซมระยะเมทาเฟสกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน มีจำนวนโครโมโซมครบ ถ่ายภาพโครโมโซมด้วยเลนส์วัตถุ (Objective Lens) กำลังขยาย 100X โดยใช้กล้องดิจิทัลที่ต่อกับกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ใช้ภาพถ่ายที่ได้นี้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน และศึกษาโครโมโซมโดยการหาความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (Long arm; L1) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (Short arm; Ls) และคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (Total Length; LT, $LT=L1+Ls$) จากนั้นทำการคำนวณหาค่า Relative Length (RL) และ Centromeric Index (CI) เพื่อหาชนิดของโครโมโซม นำค่าที่ได้ทั้งหมดไปใช้ประกอบในการจัดทำคาริโอไทป์ และอิดิโอแกรม

2) การจัดทำคาริโอไทป์ โดยใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ วัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้ายเสมอ ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่าง วางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง

- เลือกเซลล์ในระยะเมทาเฟส ที่มีขนาดของโครโมโซมไม่ยาวหรือสั้นเกินไป มีการกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน และนับจำนวนโครโมโซมได้ครบเท่ากับจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ถ่ายภาพเซลล์ที่เลือกไว้โดยใช้เลนส์วัตถุกำลังขยาย 100X เลือกมาจัดจำนวนชนิดละ 2 เซลล์

- ใช้รูปถ่ายที่ได้ในการจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน โดยการกำหนดตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ของโครโมโซมแต่ละแท่งในเซลล์ จากนั้นวัดค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว ค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น นำค่าที่ได้มาคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง การ

วัดค่าความยาวของโครโมโซมอาจจะใช้วิธีการตัดโครโมโซมออกมาจากรูปถ่ายที่ละแท่ง กำหนดหมายเลขให้โครโมโซมทุกแท่งก่อนการวัด เมื่อวัดความยาวเสร็จแล้วจึงจับคู่โครโมโซมที่มีความยาวของแขนแต่ละข้าง และความยาวทั้งแท่งใกล้เคียงกันมากที่สุด

การคำนวณหาค่า Relative Length (RL) คำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ค่า relative length (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}{\text{ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกแท่ง (SLT)}} \quad (2)$$

การใช้ค่า RL นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซม เพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

การคำนวณหาค่า centromeric index (CI) คำนวณได้จากสูตรดังนี้

$$\text{ค่า Centromeric Index (CI)} = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (LI)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}} \quad (3)$$

นำค่า CI ที่ได้นำมาระบุชนิดของโครโมโซม โดยใช้เกณฑ์ ดังนี้

CI	อยู่ระหว่าง 0.500–0.599	จัดเป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก
CI	อยู่ระหว่าง 0.600–0.699	จัดเป็นโครโมโซมชนิดซับเมทาเซนทริก
CI	อยู่ระหว่าง 0.700–0.899	จัดเป็นโครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก
CI	อยู่ระหว่าง 0.900–1.000	จัดเป็นโครโมโซมชนิดเทโลเซนทริก

การกำหนดขนาดของโครโมโซม แบ่งขนาดของโครโมโซมออกเป็น 3 ขนาด โดยกำหนดให้โครโมโซมคู่ที่ยาวที่สุดเป็นโครโมโซมคู่ที่ 1 และโครโมโซมคู่ที่สั้นที่สุดเป็นโครโมโซมคู่สุดท้าย

โครโมโซมขนาดใหญ่ (Large=L) คือ โครโมโซมที่มีความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่ที่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

$$\text{ดังนั้น } L > \frac{LT \text{ เฉลี่ยคู่ที่ } 1 + LT \text{ เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2} \quad (4)$$

โครโมโซมขนาดกลาง (Medium=M) คือ โครโมโซมที่มีค่าความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมใหญ่สุด รวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด

$$\text{ดังนั้น } \frac{M < LT \text{ เฉลี่ยคู่ที่ } 1 + LT \text{ เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2} \quad (5)$$

โครโมโซมขนาดเล็ก (small=S) ได้แก่ โครโมโซมที่มีความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่สุด

$$\text{ดังนั้น } \frac{S < LT \text{ เฉลี่ยคู่ที่ } 1}{2} \quad (6)$$

จัดเรียงคาริโอไทป์ ให้เรียงตามความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่จากมากไปหาน้อย ยกเว้นโครโมโซมเพศจะวางเป็นคู่สุดท้ายมุมล่างซ้าย ต้องบอกหมายเลขของโครโมโซมแต่ละคู่ด้านล่าง วางแท่งโครโมโซมให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ด้านล่าง และนิยมวางแท่งโครโมโซมให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ตรงกัน

3) การทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน

อิดิโอแกรม คือ ไดอะแกรมแสดงคาริโอไทป์ของโครโมโซม 1 ชุดแฮพลอยด์ (haploid) ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมร่างกาย และโครโมโซมเพศ (sex chromosome) โดยใช้ข้อมูลค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซม รูปร่างของโครโมโซม และตำแหน่งเซนโทรเมียร์ อิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาใช้เซลล์ระยะ เมทาเฟสชนิดละ 20 เซลล์ นำมาจัดคาริโอไทป์ แล้ววัดความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว และแขนโครโมโซมข้างสั้นของโครโมโซมทุกคู่ด้วยเวอร์เนีย (vernier) จัดทำภาพวาดอิดิโอแกรมด้วยคอมพิวเตอร์ โดยการนำค่าเฉลี่ยความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่มาสร้างกราฟโดยใช้โปรแกรม Microsoft Excel XP/2003 ให้แกนตั้ง (Y) เป็นความยาวของโครโมโซมแต่ละคู่ และแกนนอน (X) เป็นลำดับของโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดไปหาคู่ที่เล็กที่สุด ยกเว้นโครโมโซมเพศจัดเป็นคู่สุดท้าย แล้วนำมาปรับปรุงร่างของโครโมโซมโดยใช้โปรแกรม Microsoft Word XP/2003 หรือ Microsoft Power point XP/2003

3.8.5 การจัดเตรียมอุปกรณ์ สารเคมี และการเตรียมสารต่าง ๆ

วัสดุอุปกรณ์

- 1) เครื่องแก้วขนาดต่าง ๆ
- 2) Hot plate และ magnetic stirrer
- 3) ขวดเก็บ media ขนาด 1000, 500 และ 100 มิลลิลิตร
- 4) กระจกนียดยา (syling) และเข็มฉีดยาขนาดต่าง ๆ
- 5) Automicropipette, micropipette และ pipette ขนาดต่าง ๆ
- 6) โถสำหรับย้อมสี (staining jar)
- 7) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)
- 8) กระดาษกรอง (millipore membrane filter) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร
- 9) เครื่องชั่งแบบละเอียด (balance)
- 10) ตู้เย็น
- 11) อ่างน้ำอุ่น (water bath)
- 12) หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
- 13) เครื่อง vortex mixture
- 14) กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ

สารเคมี

- 1) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- 2) โคลชิซิน (colchicine)
- 3) เมทานอล (methanol)
- 4) เอทานอล 95 และ 70 เปอร์เซ็นต์ (ethanol 95% และ 70%)
- 5) สีย้อมจิมซ่า (Giemsa's stain)
- 6) โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (NaHCO_3)
- 7) โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (NaHPO_4)
- 8) โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)
- 9) โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)
- 10) กรดไฮโดรคลอริก (HCl)
- 11) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH)

การเตรียมอาหารและสารเคมี

- การเตรียม Hypotonic solution 0.075 โมลาร์ HCl

สารที่ใช้เตรียม

- 1) KCl crystal
- 2) น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 100 มิลลิลิตร)

ชั่งผลึก KCl 0.5588 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เขย่าจนผลึกละลายหมด เก็บไว้ที่

อุณหภูมิห้อง **หมายเหตุ** : สารละลายมีอายุการใช้งาน 1-2 สัปดาห์

- การเตรียม Colchicine

- สูตรที่ 1 ชั่ง colchicine 0.005 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
ได้ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- สูตรที่ 2 ชั่ง colchicine 0.0025 กรัม ละลายน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร
ได้ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

- Colchicine powder เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส

- การเตรียม Fixative

สารที่ใช้เตรียม

- 1) Glacial acetic acid
- 2) Absolute methanol

วิธีเตรียม ใช้ glacial acetic acid 1 ส่วน ผสมกับ absolute methanol 3 ส่วน

เก็บใส่ขวดแช่ในตู้เย็น

- การเตรียม Sorensen buffer

สารที่ใช้เตรียม

- 1) Stock solution A: ใช้ KH_2PO_4 9.1 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร
- 2) Stock solution B: ใช้ NaH_2PO_4 9.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร

วิธีเตรียม ใช้ Stock solution A 50.8 มิลลิลิตร ผสมกับ Stock solution B 49.2 มิลลิกรัม

จะได้ Sorensen buffer (pH 6.8) 100 มิลลิกรัม

- การเตรียมสีย้อม Giemsa (10% Giemsa's solution)

สีจิมซ่า 10 เปอร์เซ็นต์ เตรียมจาก Giemsa's stain ใช้ชนิด Stock Giemsa's solution โดยดูด

สีจิมซ่าจาก Stock Giemsa's solution มา 5 มิลลิลิตร ละลายใน Sorensen buffer 45 มิลลิลิตร

- การเตรียมสารละลาย 1 นอร์มอล HCl

สารที่ใช้เตรียม

- 1) กรดไฮโดรคลอริก Conc. HCl
- 2) น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 500 มิลลิลิตร)

ใช้ Conc. HCl จำนวน 43.68 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 456.32 มิลลิลิตร โดยค่อยๆ รินกรด HCl ใส่ลงใน น้ำกลั่น (ข้อควรระวัง ห้ามเทน้ำกลั่นลงใน HCl เป็นอันขาด แต่ให้เทกรด HCl ลงในน้ำกลั่น)

- การเตรียมสารละลาย 1 นอร์มอล NaOH

สารที่ใช้เตรียม

- 1) NaOH crystal (Sodium hydroxide)
- 2) น้ำกลั่น

วิธีเตรียม (ปริมาตรที่เตรียม 500 มิลลิลิตร)

ชั่งผลึก NaOH 20 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3.9 อุปกรณ์ขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ใช้ปลาด้วยไฟฟ้า

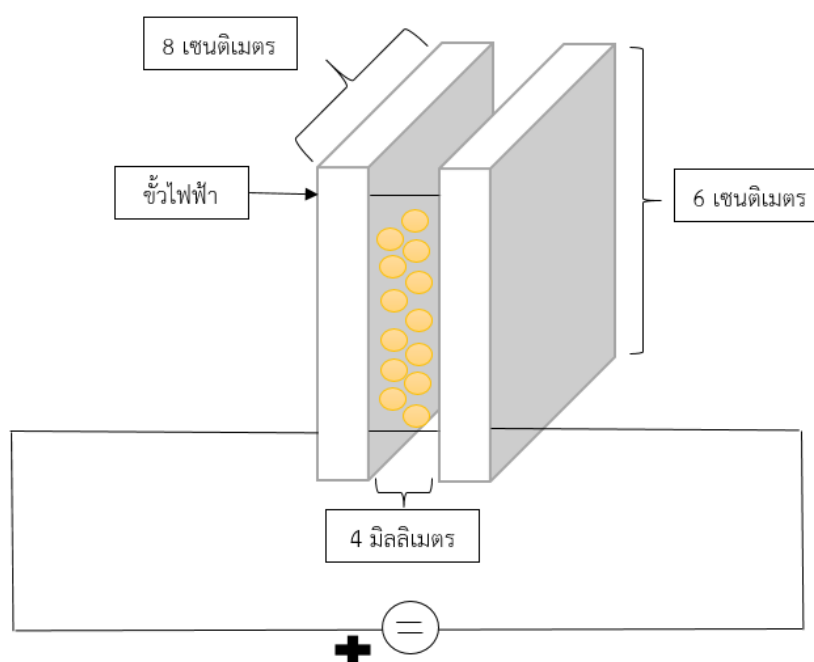
อุปกรณ์ที่ใช้ในการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ใช้ปลาด้วยไฟฟ้าในงานวิจัยในครั้งนี้ได้รับความร่วมมือจากศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ (National Electronics and Computer Technology Center:NECTEC) ช่วยพัฒนาอุปกรณ์เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้าสำหรับขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ใช้ปลาด้วยไฟฟ้า ตัวอุปกรณ์สามารถปรับพารามิเตอร์ทางไฟฟ้าได้ เช่น

ค่าศักย์ไฟฟ้า ตามเงื่อนไขสัญญาณพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (T_{on} และ T_{off}) และสามารถกำหนดจำนวนลูกคลื่นได้

ตัวขั้วไฟฟ้า (Electrode) มีขนาด 30×55 มิลลิเมตร วางคู่ขนานกันระยะห่าง 4 มิลลิเมตร ดังรูปที่ 3.6 ตามความกว้างของขนาดใช้ปลาช่อนทะเลที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.29 ± 0.02 มิลลิเมตร (อาคม สิงหบุญ, และคณะ, 2555)



รูปที่ 3.6 อุปกรณ์เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้าสำหรับขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ใช้ปลาด้วยไฟฟ้า (อยู่ในระหว่างจดสิทธิบัตรห้ามเผยแพร่)



รูปที่ 3.7 ลักษณะของขั้วไฟฟ้า (ภาพจำลองไม่เป็นไปตามสเกล)

บทที่ 4

ผลการศึกษาและการอภิปรายผล

การวิจัยนี้เป็นงานวิจัยใหม่ ที่มีการประยุกต์ใช้เทคนิคการขยายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสนามไฟฟ้า (Electroporation) เพื่อช่วยในการขยายรูเปิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของไขปลาคอนทะเล และเหนี่ยวนำอนุภาคสารฮอร์โมนเพศ 17 α -Methyltestosterone (MT) ที่มีส่วนประกอบความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำไขปลาน้ำเค็มด้วยสนามไฟฟ้า โดยมีเงื่อนไขทางไฟฟ้า ได้แก่ แอมพลิจูดของสัญญาณพัลส์ (หน่วยเป็นโวลต์) คาบของสัญญาณ (หน่วยเป็นไมโครวินาที) จำนวนลูกคลื่นของสัญญาณ (Pulse number) ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำไขปลาในการทดลองแต่ละครั้ง และรูปแบบการจัดลำดับกระบวนการทดลองในเชิงเทคนิค (Protocol) พร้อมทั้งตรวจสอบสัณฐานทางกายภาพเพื่อดูลักษณะพื้นผิวเซลล์ไข่ ความหนาแน่นรูที่ผิว และขนาดความกว้างของรูของชุดควบคุมและชุดที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า

4.1 ผลการทดลองเตรียมสารละลายที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำไขปลาในสนามไฟฟ้า

การเตรียมสารละลายที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำเซลล์ไขปลาด้วยสนามไฟฟ้านั้นมีความจำเป็นอย่างมาก เนื่องจากเซลล์ไขปลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำนั้นเป็นอนุภาคชีวภาพที่มีคุณสมบัติทางไฟฟ้า ซึ่งสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมของเซลล์ชีวภาพที่ต้องการเหนี่ยวนำต้องมีสภาพนำไฟฟ้าต่ำกว่าสารที่อยู่ภายในเซลล์ และต้องมีค่าต่ำกว่าค่าสภาพนำไฟฟ้าของเซลล์ไซโตพลาสซึมของเซลล์ ทั้งนี้เซลล์แต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันทางด้านคุณสมบัติไฟฟ้า ค่าสภาพนำไฟฟ้าของสารละลายแขวนลอยเซลล์จึงมีความสำคัญ โดยงานวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการทดลองในสารละลายจำพวกน้ำตาล คือ แมนนิทอล (Mannitol) และซูโครส (Sucrose) โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลายซึ่งสารละลายดังกล่าวนี้เป็นสารละลายที่เฉื่อยต่อกระบวนการแพร่ของสารผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ โดยจะใช้บัฟเฟอร์ที่มีคุณสมบัติในการรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในสารละลายแขวนลอยซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ไขปลา โดยมีการเตรียมสารละลาย คือนำสารละลายแมนนิทอล (Mannitol) และ

น้ำตาล (Sucrose) เป็นสารตั้งต้นหลัก ผสมกับสารละลาย HEPES Buffer หรือ PBS Buffer ตามลำดับ โดยสารละลายของฮอร์โมนที่ใช้ในการแปลงเพศปลาในครั้งนี้คือ แอนโดรเจนฮอร์โมน 17 α -Methyltestosterone (MT) ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อนำมาผสมกับสารละลายข้างต้นในอัตราส่วนต่าง ๆ เพื่อให้ได้สารละลายสุดท้ายที่เรียกว่า “EPM” (รายละเอียดการทดลองดังบทที่ 3 หัวข้อ 3.3) โดยที่สารละลาย EPM นั้นต้องมีความเหมาะสมกับการนำไปใช้เพื่อเหนี่ยวนำไข่ปลาแล้ว ไข่ปลาไม่ได้รับความเสียหาย มีอัตราการฟักและอัตราการรอดตายสูง โดยพิจารณาจากประเด็นดังนี้

1) การแยกชั้นของสารละลายทั้งสองชนิด เมื่อผสมสารต่าง ๆ เข้าด้วยกันแล้ว สารสุดท้ายต้องมีความเข้ากันได้ โดยสังเกตจากสารละลายนั้นต้องเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีการแยกชั้นของสาร เพื่อให้ได้สารละลายเป็นแบบเอกพันธ์ (Homogeneous solution) ส่งผลให้ในขณะที่เหนี่ยวนำไข่ปลาที่แขวนลอยในสารละลาย EPM เชื่อว่าจะได้รับอิทธิพลของสนามไฟฟ้าและอนุภาคสารฮอร์โมนเพศอย่างทั่วถึง

2) สี เมื่อนำสารละลายแมนนิทอล (Mannitol) และน้ำตาล (Sucrose) เป็นสารตั้งต้นหลัก ผสมกับสารละลาย HEPES Buffer หรือ PBS Buffer และผสมฮอร์โมน MT ในอัตราส่วนที่ต้องการ พบว่าสารละลายดังกล่าวนี้เป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีการแยกสี ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยตาเปล่า

3) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) คือ สารละลายที่ใช้ในการเหนี่ยวนำเซลล์ไข่ปลาอ่อนทะเลนั้นต้องปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 7.5 ± 0.2

4) ค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity) โดยสารละลายที่นำมาใช้ในการทดลองอุณหภูมิจะอยู่ที่ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจากการนำไฟฟ้าของสารละลายนั้นขึ้นอยู่กับอุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิสูงจะส่งผลให้ค่าการนำไฟฟ้ามีค่ามากขึ้น

เมื่อนำสารละลายมาผสมกันแล้วพบว่าสารละลายเข้ากันได้ดี ไม่มีการแยกชั้นและสีของสารเคมีไม่มีการเปลี่ยนแปลง ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าอยู่ที่ 7.30-7.47 ซึ่งเป็นค่าที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำทางไฟฟ้าและเซลล์ไข่ปลา แสดงดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 ผลการทดลองการเข้ากันได้ของสารละลาย

ผลการสังเกตความเหมาะสมของสารละลาย EPM				
สารละลาย	การแยกชั้น	สี	ค่า pH	ค่าการนำไฟฟ้า (ms.)
Sucrose+PBS Buffer	ไม่แยกชั้น	ใส ไม่มีสี	7.30	2.590
Sucrose+HEPES Buffer	ไม่แยกชั้น	ใส ไม่มีสี	7.30	0.224
Mannitol+PBS Buffer	ไม่แยกชั้น	ใส ไม่มีสี	7.47	0.111
Mannitol+HEPES Buffer	ไม่แยกชั้น	ใส ไม่มีสี	7.30	0.152

4.2 เจื่อนไซทางไฟฟ้าที่เหมาะสมในการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาช่อนทะเล

งานวิจัยนี้เลือกไข่ปลาช่อนทะเลที่มีอายุในช่วงการพัฒนาคัพภะระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะบลาสโตพอร์ (Blastopore) เพราะในช่วงระยะเวลาดังกล่าวจะมีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งในการเหนี่ยวนำเพื่อขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาช่อนทะเล โดยกำหนดศักย์ทางไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ และเพิ่มค่าความต้านทาน (Resistor) ที่มีค่าขนาด 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม (Ω) ตามลำดับ เจื่อนไซรูปสัญญาณพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (T_{on} และ T_{off}) กระตุ้นด้วยวงสัญญาณคาบบวก 50 ไมโครมิลลิวินาที จำนวน 3 ลูกคลื่น ในการทดลองหาเจื่อนไซทางไฟฟ้าที่เหมาะสมในการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาช่อนทะเล มีการพิจารณาผลจากอัตราการฟักและอัตราการรอดตายของเซลล์ไข่ และตรวจสอบสัญญาณทางกายภาพโดยการถ่ายภาพ SEM เพื่อดูลักษณะพื้นผิวเซลล์ไข่ ความหนาแน่นรูที่ผิว และขนาดความกว้างของรูชุดควบคุมและชุดที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า

สารละลายที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำไข่ปลาน้ำเค็มด้วยสนามไฟฟ้าสารละลายจำพวกน้ำตาล คือ แมนนิทอล (Mannitol) ซูโครส (Sucrose) โดยใช้น้ำเป็นตัวทำละลาย และใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (HEPES Buffer และ PBS Buffer) ที่มีคุณสมบัติในการรักษาสภาพความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในสารละลายแขวนลอยซึ่งเป็นสารที่ไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ไข่ปลา และใช้สารฮอร์โมนเพศ 17α -Methyltestosterone (MT) เพื่อหาสารละลายที่เหมาะสมกับเซลล์ไข่ปลา จึง

แบ่งชุดการทดลองออกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ 1) ชุดการทดลองที่ 1 ที่ไม่ผสมสาร MT เพื่อหาสารตั้งต้นและสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสม 2) ชุดการทดลองที่ 2 ที่มีสาร MT เพื่อดูความเข้มข้นของ MT ที่เหมาะสมกับเซลล์ไขปลา

ผลของการทดลองจากสารละลายจะแบ่งออกเป็น 2 ชุดการทดลอง ดังนี้

ผลการทดลองชุดที่ 1 (ชุดการทดลองที่ไม่ผสมสาร MT)

EPM1=Mannitol+HEPES Buffer	}	100, 500, 1,000 5,000 10,000 โอห์ม
EPM2=Mannitol+PBS Buffer		
EPM3=Sucrose+HEPES Buffer		
EPM4=Sucrose+PBS Buffer		

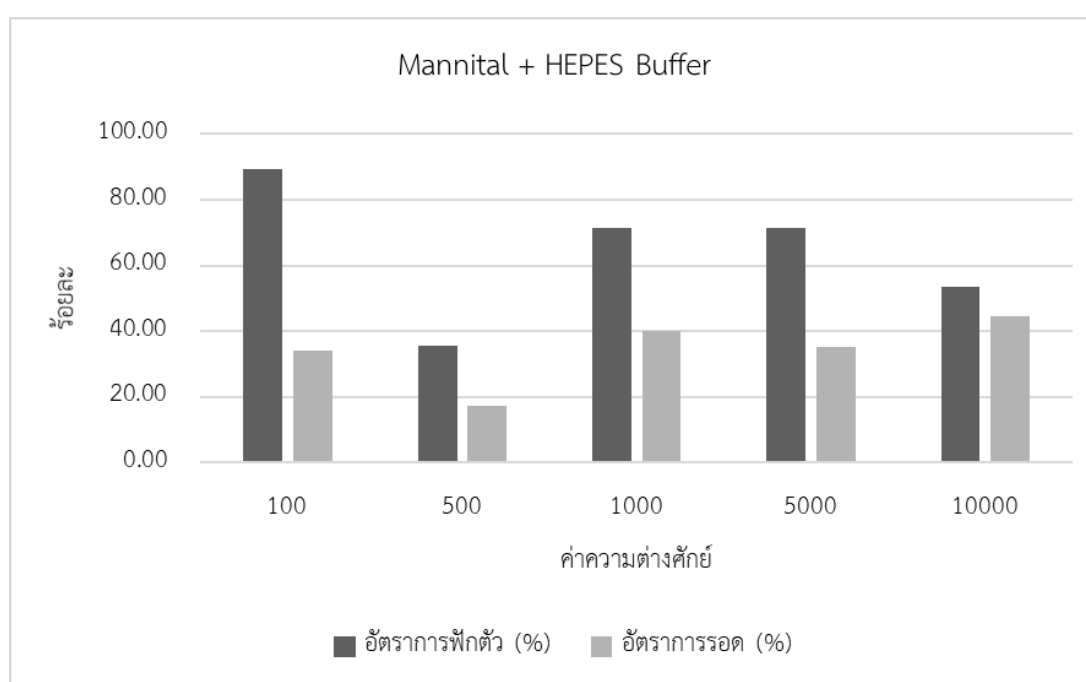
จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 20 ตัวอย่าง ชุดควบคุมจำนวน 1 ตัวอย่าง สารละลายแต่ละชุดการทดลองมีการกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ และเพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์สารละลาย EPM1 ที่มีส่วนผสมของแมนนิทอล (Mannitol) และ HEPES Buffer กำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เหนี่ยวนำโดยเพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ พบว่าสารละลาย EPM1 มีค่าอัตราการฟลักซ์ระหว่าง 35.71 ± 0.07 - 89.29 ± 0.04 อัตราการการรอดระหว่าง 17.2 ± 0.91 ถึง 44.53 ± 1.61 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุดที่การเพิ่มตัวต้านทาน 10,000 โอห์ม คือ 44.53 ± 1.61 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่มีการเพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 5,000 100 และ 500 โอห์ม ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.2 และรูปที่ 4.1

ตารางที่ 4.2 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM1

สารละลาย	ค่าความต่างศักย์	การฟักตัว (n=700)	อัตราการฟักตัว (%)	การรอด	อัตราการรอด(%)
Mannitol+HEPES	100 Ω	625±0.28	89.29±0.04	212±3.68	33.92±1.75
Mannitol+HEPES	500 Ω	250±0.17	35.71±0.07	43±0.39	17.2±0.91
Mannitol+HEPES	1000 Ω	500±0.32	71.43±0.06	201±3.44	40.2±1.71
Mannitol+HEPES	5000 Ω	500±0.32	71.43±0.07	175±2.86	35±1.64
Mannitol+HEPES	10000 Ω	375±0.27	53.57±0.07	167±2.69	44.53±1.61

รูปที่ 4.1 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM1

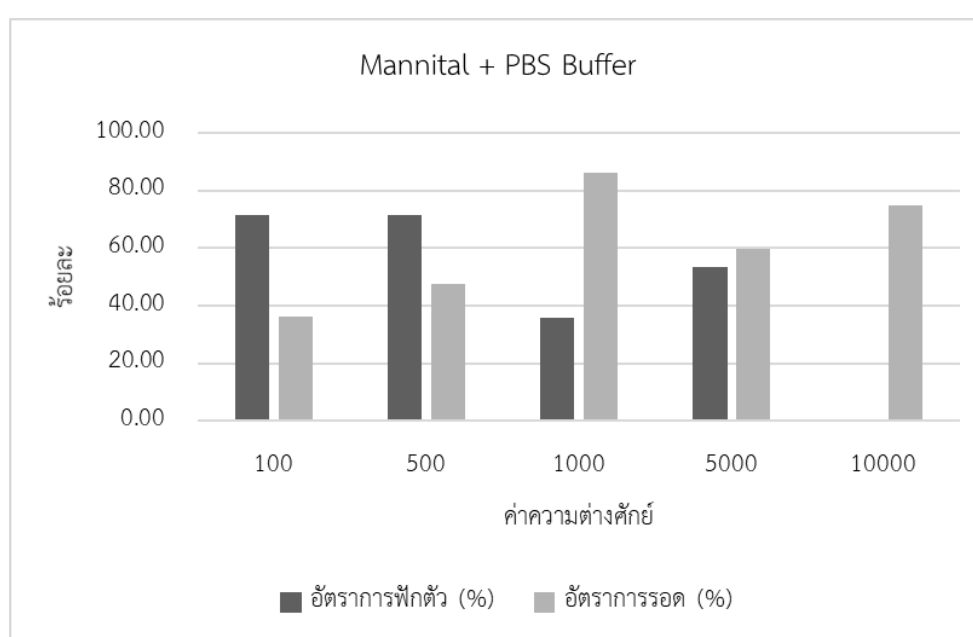


ผลการวิเคราะห์สารละลาย EPM2 ที่มีส่วนผสมของแมนนิทอล (Mannitol) และ PBS Buffer กำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เหนี่ยวนำโดยเพิ่มตัวต้านทาน 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ พบว่าสารละลาย EPM2 มีค่าอัตราการฟลักซ์ระหว่าง 0.57 ± 0.01 - 71.43 ± 0.07 อัตราการการรอดระหว่าง 36.4 ± 1.66 ถึง 86.4 ± 1.75 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุดที่การเพิ่มตัวต้านทาน 1,000 โอห์ม คือ 86.4 ± 1.75 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่มีการเพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 5,000 500 และ 100 โอห์ม ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2

ตารางที่ 4.3 ค่าอัตราการฟลักซ์และอัตราการรอดในสารละลาย EPM2

สารละลาย	ค่าความต่างศักย์	การฟลักซ์ตัว (n=700)	อัตราการฟลักซ์ตัว (%)	การรอด	อัตราการรอด (%)
Mannitol+PBS	100 Ω	500 ± 0.32	71.43 ± 0.06	182 ± 3.02	36.4 ± 1.66
Mannitol+PBS	500 Ω	500 ± 0.32	71.43 ± 0.07	238 ± 4.26	47.6 ± 1.79
Mannitol+PBS	1000 Ω	250 ± 0.17	35.71 ± 0.07	216 ± 3.77	86.4 ± 1.75
Mannitol+PBS	5000 Ω	375 ± 0.27	53.57 ± 0.07	224 ± 3.95	59.73 ± 1.76
Mannitol+PBS	10000 Ω	4 ± 0.00	0.57 ± 0.01	3 ± 0.01	75 ± 0.25

รูปที่ 4.2 ค่าอัตราการฟลักซ์และอัตราการรอดในสารละลาย EPM2

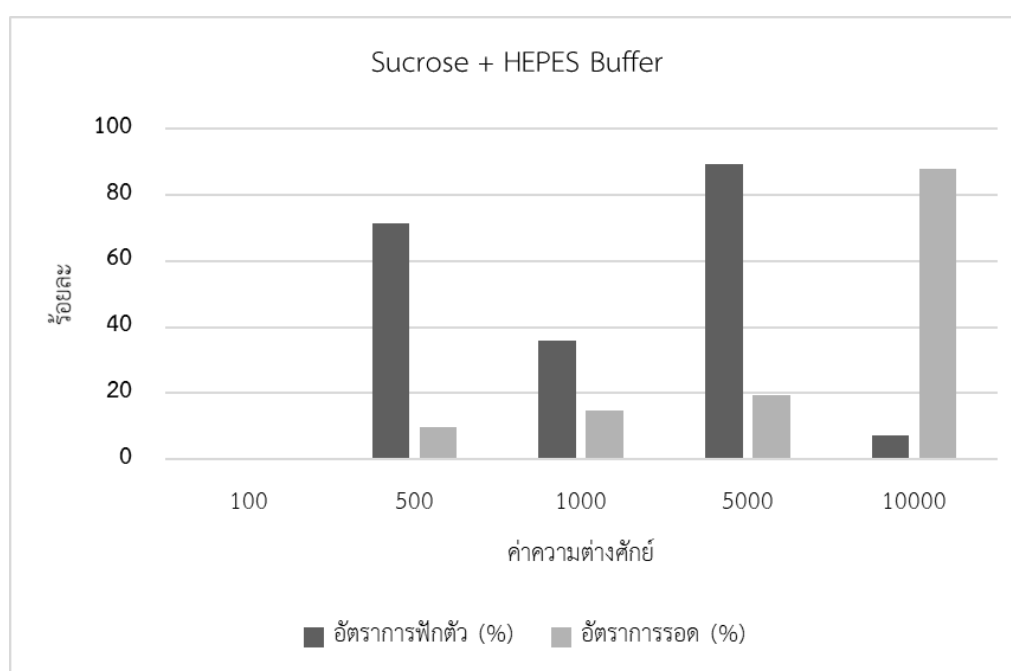


ผลการวิเคราะห์สารละลาย EPM3 ที่มีส่วนผสมของซูโครส (Sucrose) และ HEPES Buffer กำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เหนี่ยวนำโดยเพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ พบว่าสารละลาย EPM3 มีอัตราการฟลักซ์ระหว่าง 35.71 ± 0.07 ถึง 89.29 ± 0.04 อัตราการรอดระหว่าง 9.60 ± 0.95 ถึง 87.75 ± 0.91 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุดที่เพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม คือ 87.75 ± 0.91 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือที่มีการเพิ่มตัวต้านทานขนาด 5,000 1,000 500 และ 100 โอห์มตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.3

ตารางที่ 4.4 ค่าอัตราการฟลักซ์และอัตราการรอดในสารละลาย EPM3

สารละลาย	ค่าความต่างศักย์	การฟลักซ์ (n=700)	อัตราการฟลักซ์ (%)	การรอด	อัตราการรอด (%)
Sucrose+HEPES	100 Ω	-	-	-	-
Sucrose+HEPES	500 Ω	500 ± 0.32	71.43 ± 0.06	48 ± 0.46	9.60 ± 0.95
Sucrose+HEPES	1000 Ω	250 ± 1.17	35.71 ± 0.07	37 ± 0.31	14.80 ± 0.85
Sucrose+HEPES	5000 Ω	625 ± 0.28	89.29 ± 0.04	122 ± 1.75	19.52 ± 1.43
Sucrose+HEPES	10000 Ω	49 ± 0.02	7.00 ± 0.04	43 ± 0.39	87.75 ± 0.91

รูปที่ 4.3 ค่าอัตราการฟลักซ์และอัตราการรอดในสารละลาย EPM3

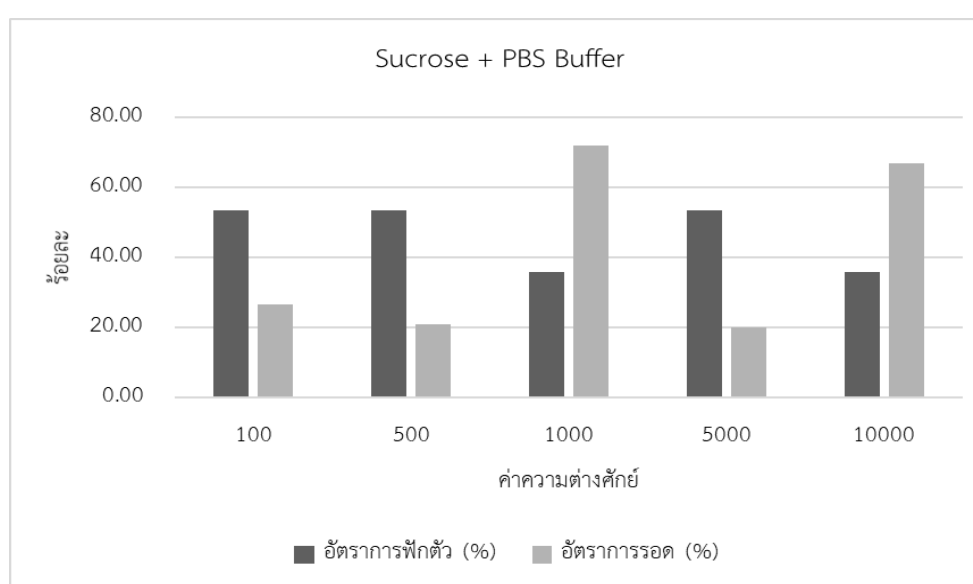


ผลการวิเคราะห์สารละลาย EPM4 ที่มีส่วนผสมของซูโครส (Sucrose) และ PBS Buffer ใช้ศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เหนี่ยวนำโดยเพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ พบว่าในสารละลาย EPM4 มีอัตราการฟักระหว่าง 35.71 ± 0.07 ถึง 53.57 ± 0.07 อัตราการรอดระหว่าง 20.00 ± 1.17 ถึง 72 ± 1.65 เปอร์เซ็นต์ มีค่าสูงสุดที่เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม คือ 72 ± 1.65 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ที่มีการเพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 100 500 และ 5,000 โอห์มตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.5 และรูปที่ 4.4

ตารางที่ 4.5 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM4

สารละลาย	ค่าความต่างศักย์	การฟักตัว (n=700)	อัตราการฟักตัว (%)	การรอด	อัตราการรอด (%)
Sucrose+PBS	100	375 ± 0.27	53.57 ± 0.07	100 ± 1.32	26.67 ± 1.32
Sucrose+PBS	500	375 ± 0.27	53.57 ± 0.07	78 ± 0.93	20.80 ± 1.19
Sucrose+PBS	1,000	250 ± 0.17	35.71 ± 0.07	180 ± 2.97	72 ± 1.65
Sucrose+PBS	5,000	375 ± 0.27	53.57 ± 0.07	75 ± 0.88	20.00 ± 1.17
Sucrose+PBS	100,00	250 ± 0.17	35.71 ± 0.07	167 ± 2.69	66.80 ± 1.61

รูปที่ 4.4 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย EPM4



ผลจากการทดลองชุดที่ 1 ที่ไม่ผสมสาร MT เพื่อหาสารตั้งต้นและสารละลายบัฟเฟอร์ที่เหมาะสมนั้น พบว่าสารละลายเมนนิทอล (Mannitol) เป็นสารละลายตั้งต้นที่มีอัตราการฟักและอัตราการรอดสูงกว่าสารละลายน้ำตาล (Sucrose) จึงได้ทำการเลือกสารละลายเมนนิทอล และใช้สารละลายบัฟเฟอร์ (HEPES Buffer และ PBS Buffer) ผสมกับสารฮอร์โมนเพศ 17 α - Methyltestosterone (MT) ที่ความเข้มข้น 1,000-100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร เพื่อหาค่าความเข้มข้นของฮอร์โมนที่เหมาะสมและไม่ส่งผลกระทบต่อเซลล์ไข่หรือเซลล์ได้รับความเสียหาย ซึ่งผลการทดลองชุดที่ 2 มีดังนี้

ผลการทดลองชุดที่ 2 (ชุดการทดลองที่ผสมสาร MT)

EPM5 = Mannitol + HEPES Buffer + MT solution	}	100 1,000
EPM6 = Mannitol + PBS Buffer + MT solution		10,000 โอห์ม

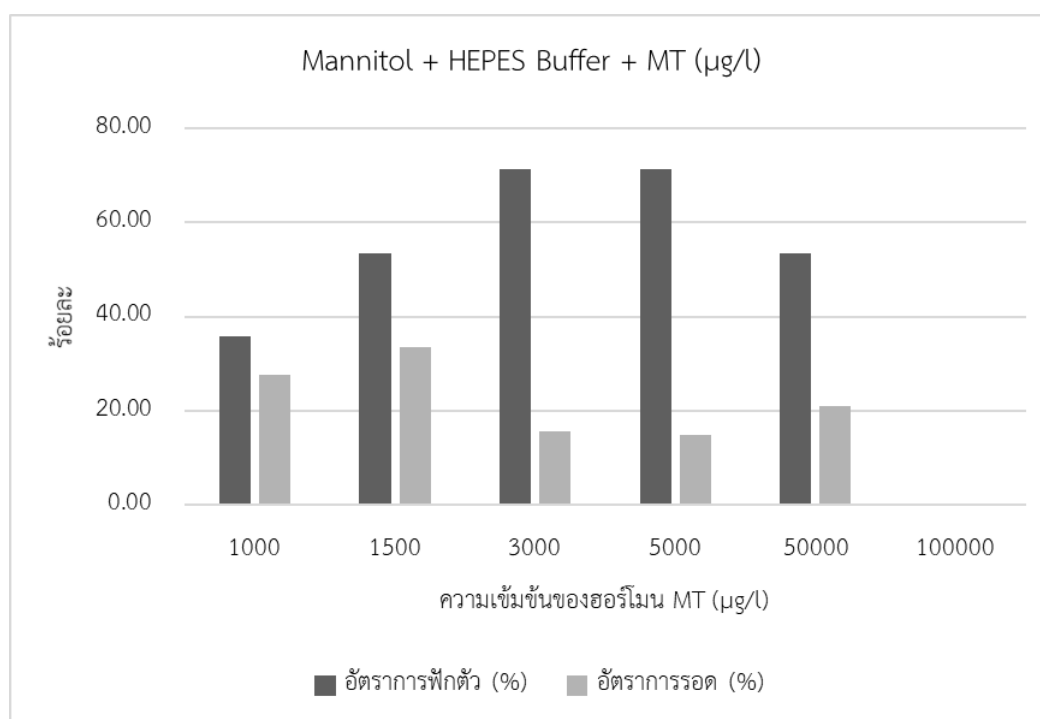
สารละลายแต่ละชุดผสม MT ที่มีความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ได้ตัวอย่างจำนวน 36 ตัวอย่าง และชุดควบคุมจำนวน 1 ตัวอย่าง สารละลายแต่ละชุดการทดลองจะมีการเหนี่ยวนำด้วยการกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เหนี่ยวนำโดยเพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 1,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ

ผลการวิเคราะห์สารละลาย EPM5 โดยกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ โดยเพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม ที่มีส่วนผสมของเมนนิทอล (Mannitol) และ HEPES Buffer และฮอร์โมนเพศ MT ที่ความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการฟัก (Hatching) มีค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 71.43 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอด (Survival Rate) พบว่า MT ที่ความเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อลิตร อัตราการรอดสูงสุดคือ 33.6 ± 2.72 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือ ที่ความเข้มข้น 1,000 50,000 3,000 5,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.6 และรูปที่ 4.5

ตารางที่ 4.6 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลายเมนนิทอลที่มีส่วนผสม HEPES Buffer และสารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม)

สารละลาย	MT ไมโครกรัม ต่อลิตร	การฟักตัว (n=700)	อัตราการ ฟักตัว (%)	การรอด	อัตรา การรอด (%)
Mannitol+HEPES	1,000	250±4.53	35.71±1.88	69±0.78	27.60±1.81
Mannitol+HEPES	1,500	375±7.07	53.571±1.88	126±1.83	33.6±2.72
Mannitol+HEPES	3,000	500±8.54	71.429±1.71	78±0.93	15.6±2.51
Mannitol+HEPES	5,000	500±8.54	71.429±1.71	74±0.86	14.8±2.51
Mannitol+HEPES	50,000	375±7.07	53.571±1.88	79±0.94	21.07±1.88
Mannitol+HEPES	100,000	0	0	0	0

รูปที่ 4.5 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย ที่มีส่วนผสม HEPES Buffer และสารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม)

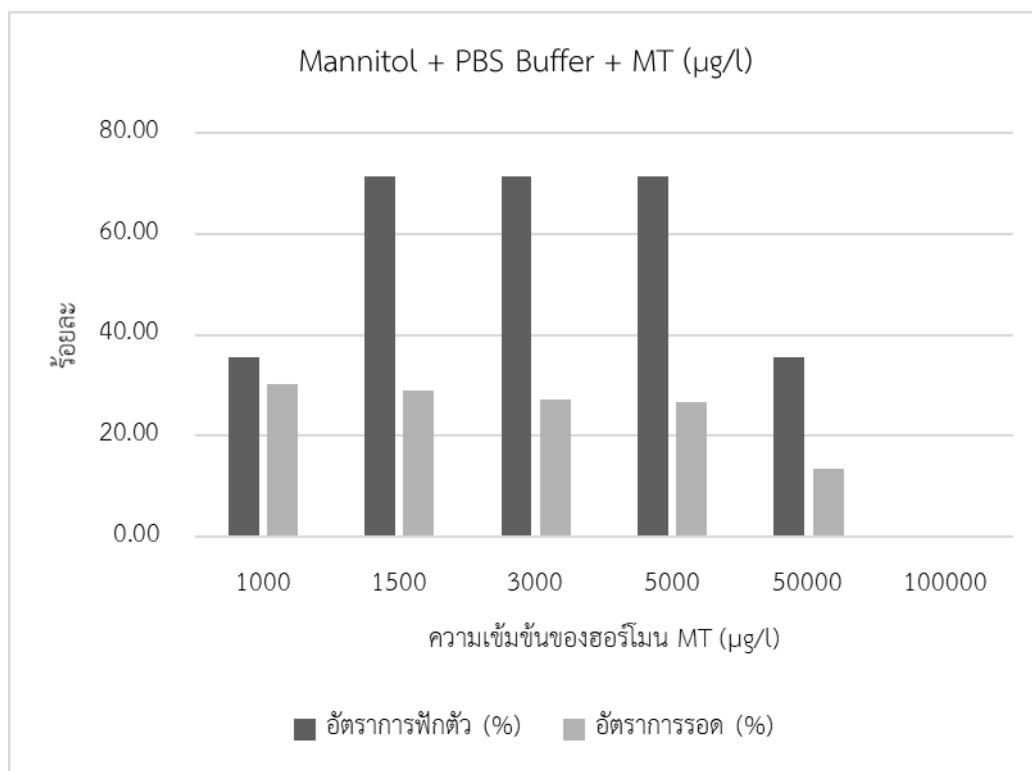


ผลการวิเคราะห์สารละลาย EPM6 โดยกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ โดยเพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม ที่มีส่วนผสมของแมนนิทอล (Mannitol) และ PBS Buffer และฮอริโมนแปลงเพศ MT ที่ความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการฟักตัว (Hatching) ระหว่างค่า 0 ถึง 71.43 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอด (Survival Rate) พบว่า MT ที่ความเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดสูงสุดคือ 29 ± 2.51 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือ สารละลาย MT ที่มีความเข้มข้น 3,000 5,000 1,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.7 และรูปที่ 4.6

ตารางที่ 4.7 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม)

สารละลาย	MT ไมโครกรัม ต่อลิตร	การฟักตัว (n=700)	อัตราการ ฟักตัว (%)	การรอด	อัตราการรอด (%)
Mannitol+PBS	1,000	250 ± 4.53	35.71 ± 1.81	50 ± 0.49	20 ± 1.81
Mannitol+PBS	1,500	500 ± 8.54	71.43 ± 1.71	145 ± 2.22	29.0 ± 2.51
Mannitol+PBS	3,000	500 ± 8.54	71.43 ± 1.71	136 ± 2.03	27.2 ± 1.71
Mannitol+PBS	5,000	500 ± 8.54	71.43 ± 1.71	134 ± 1.99	26.8 ± 2.51
Mannitol+PBS	50,000	250 ± 4.53	35.71 ± 1.81	34 ± 0.28	13.6 ± 1.81
Mannitol+PBS	100,000	0	0	0	0

รูปที่ 4.6 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม)

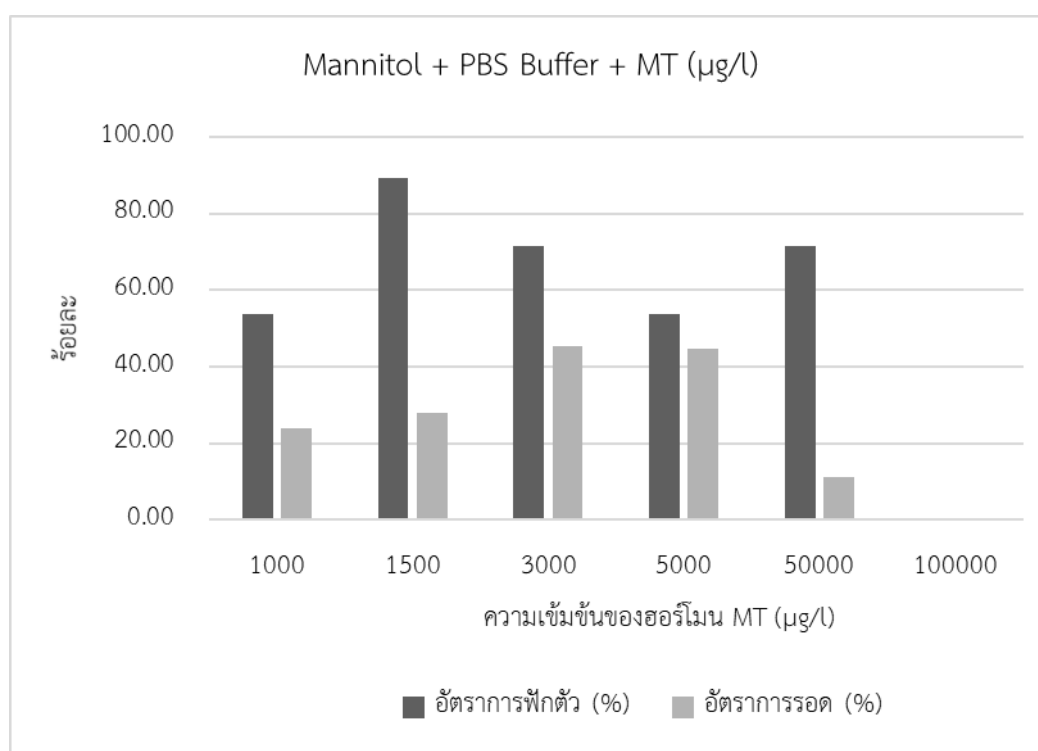


ผลการวิเคราะห์สารละลาย EPM5 โดยกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม ที่มีส่วนผสมของแมนนิทอล (Mannitol) และ HEPES Buffer และฮอร์โมนแปลงเพศ MT ที่ความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการฟักตัว (Hatching) ค่าระหว่าง 0 ถึง 89.29 ± 6.17 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอด (Survival Rate) พบว่า MT ที่ความเข้มข้น 1,500 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดสูงสุดคือ 85.20 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือ สารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5,000 50,000 1,000 3,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.8 และรูปที่ 4.7

ตารางที่ 4.8 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย HEPES Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม)

สารละลาย	MT ไมโครกรัม ต่อลิตร	การฟัก (n=700)	อัตราการฟัก (%)	การรอด	อัตราการรอด (%)
Mannitol+HEPES	1,000	375±7.07	53.57±1.88	89±1.12	23.73±2.72
Mannitol+HEPES	1,500	500±8.54	71.43±7.71	426±7.86	85.20±1.71
Mannitol+HEPES	3,000	375±7.07	53.57±8.88	50±0.49	13.33±1.88
Mannitol+HEPES	5,000	375±7.07	53.57±8.88	283±5.25	75.47±1.88
Mannitol+HEPES	50,000	625±7.31	89.29±6.17	243±4.37	38.88±1.17
Mannitol+HEPES	100,000	0	0	0	0

รูปที่ 4.7 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย HEPES Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม)

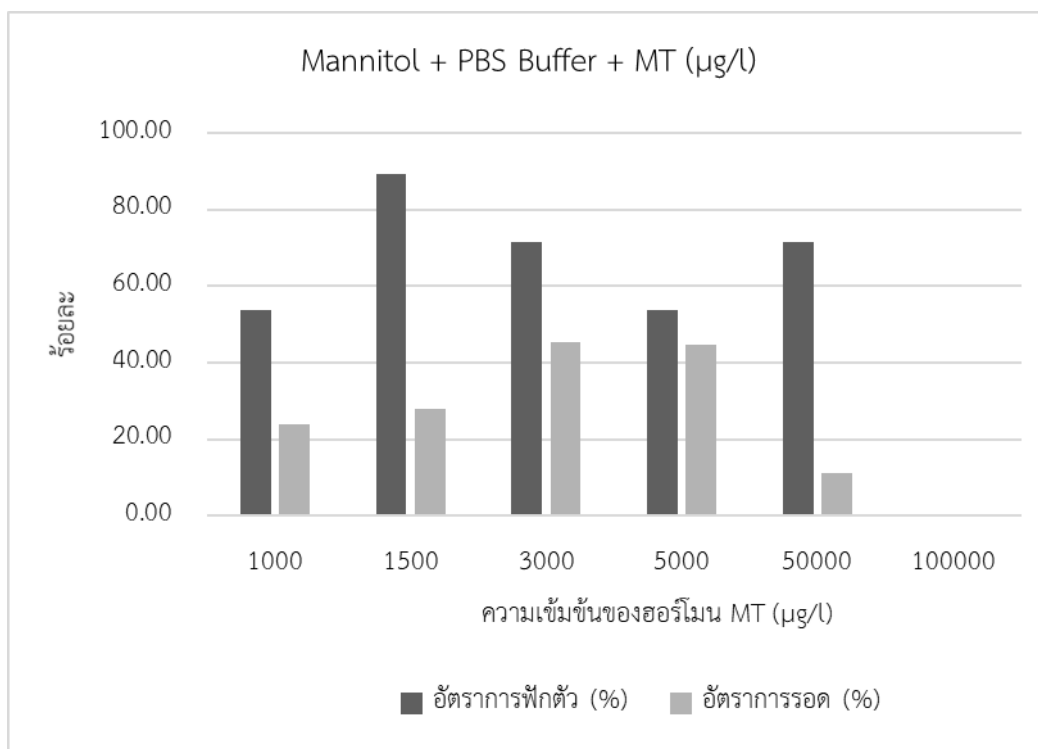


ผลการวิเคราะห์สารละลาย EPM6 โดยกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เพิ่มความต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม ที่มีส่วนผสมของเมนนิทอล (Mannitol) และ PBS Buffer และฮอโรโมนแปลงเพศ MT ที่ความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการฟักตัว (Hatching) มีค่าอยู่ระหว่าง 0 ± 9.89 ถึง 89.29 ± 6.17 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอด (Survival Rate) พบว่าสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 3,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดสูงสุดคือ 45.20 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือ สารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5,000 1,500 1,000 และ 50,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.9 และรูปที่ 4.8

ตารางที่ 4.9 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม)

สารละลาย	MT ไมโครกรัม ต่อลิตร	การฟักตัว (n=700)	อัตราการฟัก (%)	การรอด	อัตราการรอด (%)
Mannitol+PBS	1,000	375 ± 7.07	53.57 ± 1.88	90 ± 1.14	24.00 ± 2.72
Mannitol+PBS	1,500	625 ± 7.37	89.286 ± 6.17	175 ± 2.86	28.000 ± 1.17
Mannitol+PBS	3,000	500 ± 8.54	71.429 ± 7.71	226 ± 3.99	45.200 ± 1.71
Mannitol+PBS	5,000	375 ± 7.07	53.571 ± 9.88	168 ± 2.71	44.800 ± 1.88
Mannitol+PBS	50,000	500 ± 8.54	71.429 ± 7.71	55 ± 0.56	11.000 ± 1.71
Mannitol+PBS	100,000	0	0	0	0

รูปที่ 4.8 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม)

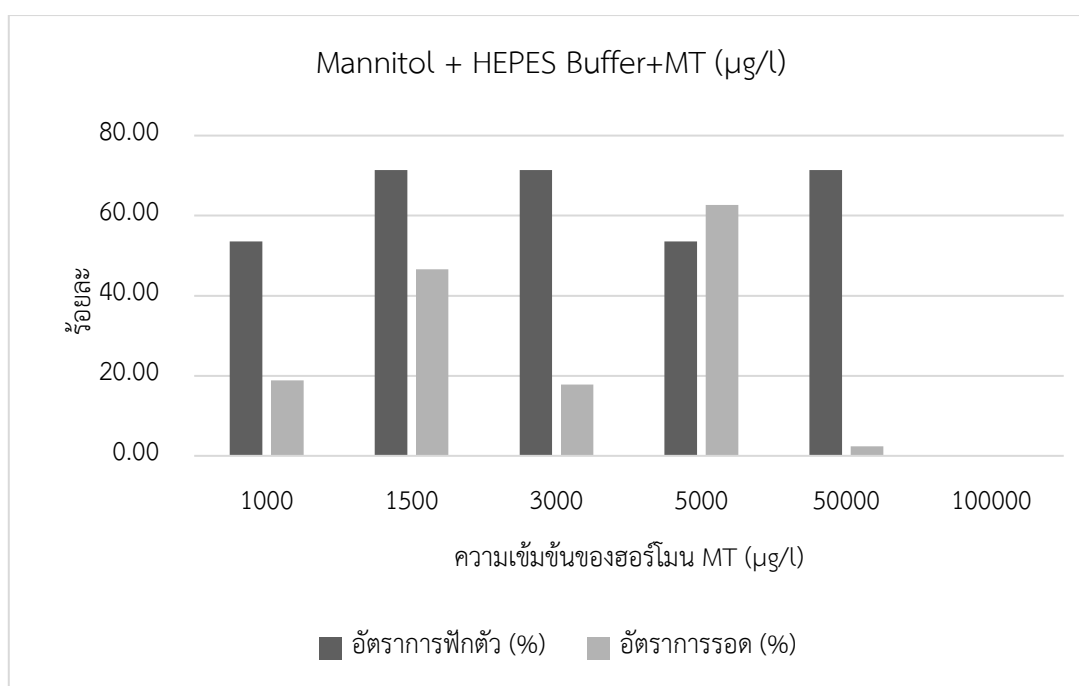


ผลการวิเคราะห์สารละลาย EPM5 โดยกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เพิ่มความต้านทาน 10,000 โอห์ม ที่มีส่วนผสมของแมนนิทอล (Mannitol) และ HEPES Buffer และฮอร์โมนแปลงเพศ MT ที่ความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการฟัก (Hatching) อยู่ช่วงระหว่าง 0 ถึง 71.43 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอด (Survival Rate) พบว่าสารละลาย MT ที่ความเข้มข้นของ MT ที่ 5,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดสูงสุดคือ 62.67 ± 1.88 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 1,500 1,000 3,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.10 และรูปที่ 4.9

ตารางที่ 4.10 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสม HEPES Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม)

สารละลาย	MT ไมโครกรัม ต่อลิตร	การฟัก (n=700)	อัตราการฟัก (%)	อัตราการ รอด	อัตราการรอด (%)
Mannitol+HEPES	1,000	375±7.07	53.57±1.88	70±0.79	18.67±2.72
Mannitol+HEPES	1,500	500±8.54	71.43±1.71	233±4.15	46.60±3.62
Mannitol+HEPES	3,000	500±8.54	71.43±1.71	89±1.12	17.80±2.51
Mannitol+HEPES	5,000	375±7.07	53.57±1.88	235±4.19	62.67±1.88
Mannitol+HEPES	50,000	500±8.54	71.43±1.71	12±0.06	2.40±3.62
Mannitol+HEPES	100,000	0	0	0	0

รูปที่ 4.9 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสม HEPES Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM5 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม)

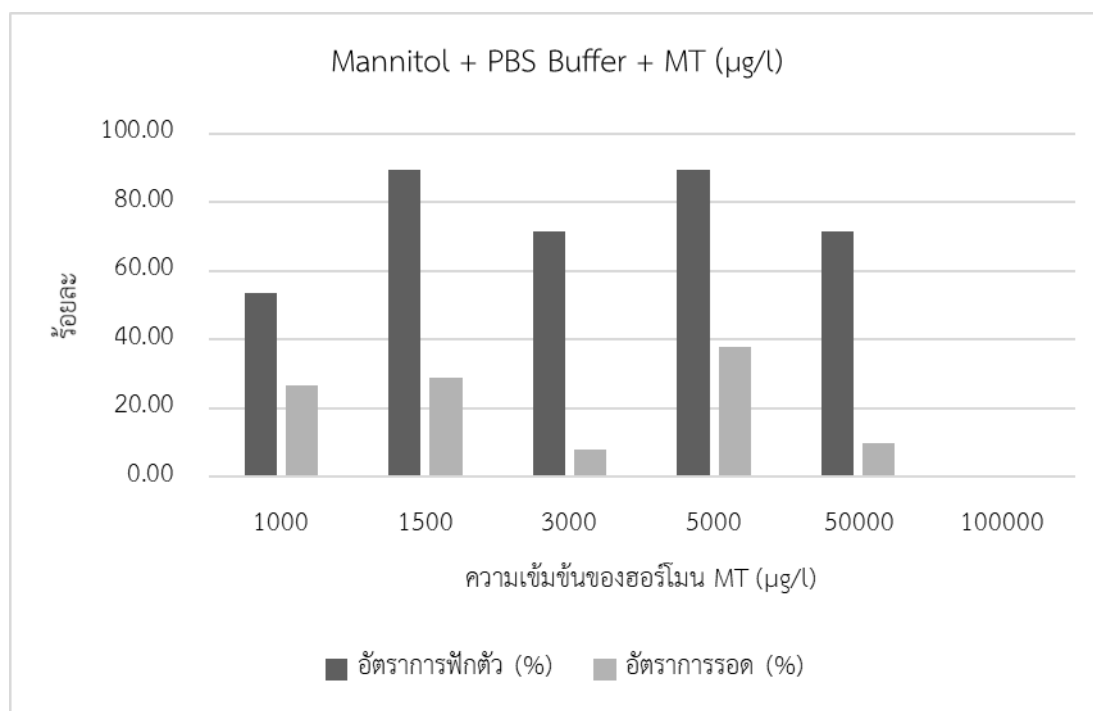


ผลการวิเคราะห์สารละลาย EPM6 โดยกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เพิ่มความต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม มีส่วนผสมของเมนนิทอล (Mannitol) และ PBS Buffer และฮอร์โมนแปลงเพศ MT ที่ความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการฟัก (Hatching) ค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 89.29 ± 1.17 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอด (Survival Rate) พบว่าสารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดสูงสุดคือ 37.92 ± 2.13 เปอร์เซ็นต์ และรองลงมาคือ สารละลาย MT ที่ความเข้มข้น 1,500 1,000 50,000 3,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ แสดงผลดังตารางที่ 4.11 และรูปที่ 4.10

ตารางที่ 4.11 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสม PBS Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม)

สารละลาย	MT ไมโครกรัม ต่อลิตร	การฟัก (n=700)	อัตราการฟัก (%)	การรอด	อัตราการรอด (%)
Mannitol+PBS	1,000	375 ± 7.07	53.57 ± 1.88	100 ± 1.32	26.67 ± 2.72
Mannitol+PBS	1,500	625 ± 7.31	89.29 ± 1.17	181 ± 2.99	28.96 ± 2.13
Mannitol+PBS	3,000	500 ± 8.54	71.43 ± 1.71	39 ± 0.34	7.80 ± 2.51
Mannitol+PBS	5,000	625 ± 7.32	89.29 ± 1.17	237 ± 4.24	37.92 ± 2.13
Mannitol+PBS	50,000	500 ± 8.54	71.43 ± 1.71	48 ± 0.46	9.60 ± 3.62
Mannitol+PBS	100,000	0	0	0	0

รูปที่ 4.10 ค่าอัตราการฟักและอัตราการรอดในสารละลาย Mannitol ผสม PBS Buffer และผสมสารละลาย MT (สูตร EPM6 เพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม)



การทดลองเพื่อหาเงื่อนไขในการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาช่อนทะเลโดยมาทดสอบ ค่าศักย์ทางไฟฟ้าที่เหมาะสมและสามารถเหนี่ยวนำได้โดยไข่ปลาไม่ได้รับความเสียหายและประเมน จากอัตราการฟักและอัตราการรอดตายของไข่ปลาหลังการเหนี่ยวนำ โดยกำหนดศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ และเพิ่มค่าความต้านทานที่มีค่า 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ โดยเงื่อนไขรูปสัญญาณพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (T_{on} และ T_{off}) กำหนดที่ 50 ไมโครวินาที จำนวนลูกคลื่น 3 ลูกคลื่น พิจารณาอัตราการฟัก ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 4.12

จากตารางที่ 4.12 พบว่าชุดควบคุมอัตราการฟัก (Hatching) มีค่าเท่ากับ 89.29 ± 0.04

เมื่อพิจารณาสารละลายชนิดเดียวกัน คือ สารละลาย Mannitol ผสม HEPES Buffer ค่าศักย์ไฟฟ้าโดยกำหนดเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ และเพิ่มค่าความต้านทานที่มีค่า 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ พบว่าศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ ที่เพิ่มค่าตัวต้านทาน 10,000 โอห์ม มีค่าอัตราการฟักมากที่สุด คือ 44.53 ± 1.61

สารละลาย Mannitol ผสม PBS Buffer ค่าศักย์ไฟฟ้าโดยกำหนดเริ่มต้นที่ 350 โวลต์และเพิ่มค่าความต้านทานที่มีค่า 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ พบว่า ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ ที่เพิ่มค่าตัวต้านทาน 1,000 โอห์ม มีค่าอัตราการฟักมากที่สุด คือ 86.40 ± 1.75

สารละลาย Sucrose ผสม HEPES Buffer ค่าศักย์ไฟฟ้าโดยกำหนดเริ่มต้นที่ 350 โวลต์และเพิ่มค่าความต้านทานที่มีค่า 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ พบว่า ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ ที่เพิ่มค่าตัวต้านทาน 10,000 โอห์ม มีค่าอัตราการฟักมากที่สุด คือ 87.75 ± 0.91

สารละลาย Sucrose ผสม PBS Buffer ค่าศักย์ไฟฟ้าโดยกำหนดเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ และเพิ่มค่าความต้านทานที่มีค่า 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ พบว่า ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ ที่เพิ่มค่าตัวต้านทาน 10,000 โอห์ม มีค่าอัตราการฟักมากที่สุด คือ 44.53 ± 1.61

สรุปผลการทดลองพบว่า ค่าศักย์ทางไฟฟ้าที่เริ่มต้นที่ 350 โวลต์ และเพิ่มค่า ความต้านทานที่ขนาด 10,000 โอห์ม มีอัตราการฟักสูงสุด

เมื่อพิจารณาจากตารางที่ 4.12 โดยพิจารณาจากสารละลายต่างชนิดกัน แต่ค่าความต้านทานเดียวกัน โดยกำหนดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ และเพิ่มค่าความต้านทานที่ 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ มีเงื่อนไขรูปสัญญาณพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (T_{on} และ T_{off}) กำหนดที่ 50 ไมโครวินาที และจำนวนลูกคลื่น 3 พัลส์ พบว่า

ค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ ที่เพิ่มค่าความต้านทานขนาด 100 โอห์ม พบว่ามีค่าอัตราการฟกมากที่สุดในการละลาย Mannitol ผสม PBS Buffer มีค่าอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 36.40 ± 1.67

ค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ ที่เพิ่มค่าความต้านทานขนาด 500 โอห์ม พบว่ามีค่าอัตราการฟกมากที่สุดในการละลาย Mannitol ผสม PBS Buffer มีค่าอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 47.60 ± 1.79

ค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ ที่เพิ่มค่าความต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม พบว่ามีค่าอัตราการฟกมากที่สุดในการละลาย Mannitol ผสม PBS Buffer มีค่าอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 86.40 ± 1.75

ค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ ที่เพิ่มค่าความต้านทานขนาด 5,000 โอห์ม พบว่ามีค่าอัตราการฟกมากที่สุดในการละลาย Mannitol ผสม PBS Buffer มีค่าอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 59.73 ± 1.76

ค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ ที่เพิ่มค่าความต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม พบว่ามีค่าอัตราการฟกมากที่สุดในการละลาย Mannitol ผสม HEPES มีค่าอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 44.53 ± 1.61

จากการวิเคราะห์โดยเปรียบเทียบความแตกต่างของสารละลาย ในชุดความต่างศักย์เดียวกัน พบว่าสารละลายที่มีความเหมาะสมกับอัตราการฟกมากที่สุด คือ สารละลาย Mannitol ผสม PBS Buffer พบว่าเมื่ออยู่ในค่าความต่างศักย์ไฟฟ้าต่าง ๆ แล้วยังคงมีค่าอัตราการรอดตายที่สูงเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับสารละลายที่ใช้น้ำตาล (Sucrose) เป็นตัวทำละลายตั้งต้น

ตารางที่ 4.12 ค่าอัตราการฟักตัวและอัตราการรอดในสารละลาย EPM 1-4

สารละลาย	ค่าความ ต่างศักย์	การฟัก (n=700)	อัตราการฟัก (%)	การรอดตาย (ตัว)	อัตราการรอด (%)
ชุดควบคุม	-	625±0.28	89.29±0.04	331±6.25	52.96±1.89
Mannitol+HEPES	100	625±0.28	89.29±0.04	212±3.68	33.92±1.74
Mannitol+HEPES	500	250±0.17	35.71±0.07	43±0.39	17.20±0.91
Mannitol+HEPES	1,000	500±0.32	71.43±0.06	201±3.46	40.20±1.71
Mannitol+HEPES	5,000	500±0.32	71.43±0.06	175±2.86	35±1.64
Mannitol+HEPES	10,000	375±0.27	53.57±0.07	167±2.69	44.53±1.61
Mannitol+PBS	100	500±0.32	71.43±0.06	182±3.02	36.40±1.66
Mannitol+PBS	500	500±0.32	71.43±0.06	238±4.26	47.60±1.79
Mannitol+PBS	1,000	250±0.17	35.71±0.07	216±3.77	86.40±1.75
Mannitol+PBS	5,000	375±0.27	53.57±0.07	224±3.35	59.73±1.76
Mannitol+PBS	10,000	4±0	0.57±0.01	3±0.01	66.80±1.61
Sucrose+HEPES	100	-	-	-	-
Sucrose+HEPES	500	500±0.32	71.43±0.06	48±0.46	9.60±0.95
Sucrose+HEPES	1,000	250±0.17	35.71±0.07	37±0.31	14.80±0.85
Sucrose+HEPES	5,000	625±0.28	89.29±0.04	122±1.75	19.52±1.43
Sucrose+HEPES	10,000	49±0.02	7±0.04	43±0.39	87.75±0.91
Sucrose+PBS	100	375±0.27	53.57±0.07	100±1.32	26.67±1.32
Sucrose+PBS	500	375±0.27	53.57±0.07	78±0.93	20.80±1.19
Sucrose+PBS	1,000	250±0.17	35.71±0.07	180±2.97	10.20±1.71
Sucrose+PBS	5,000	375±0.27	53.57±0.07	75±0.88	35±1.64
Sucrose+PBS	10,000	250±0.17	35.71±0.07	167±2.69	44.53±1.61

4.3 การทดลองปริมาณฮอร์โมน 17 α -Methyl testosterone (MT)

จากการทดลองเพื่อลดปริมาณฮอร์โมน MT ที่ใช้ในการแปลงเพศปลาช่อนทะเลโดยพิจารณาจากการอัตราการฟัก (Hatching) และอัตราการรอดตาย (Survival rate) โดยในการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้ากำหนดค่าความต่างศักย์เริ่มต้นที่ 350 โวลต์ และเพิ่มค่าความต้านทานที่ 100 1,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ มีเงื่อนไขรูปสัญญาณพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (T_{on} และ T_{off}) จำนวนลูกคลื่น 3 พัลส์ คาบสัญญาณ 50 ไมโครวินาที แสดงผลดังกราฟที่ 4.11 และ 4.12

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย HEPES Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 35.71 ± 1.88 ถึง 53.57 ± 1.88 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 100 โอห์ม มีอัตราการรอดตายมากที่สุด คือ 27.60 ± 1.81 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย HEPES Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 1,500 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 53.57 ± 1.88 ถึง 71.43 ± 1.7 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 1,000 โอห์ม มีอัตราการรอดตายมากที่สุด คือ 85.20 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย HEPES Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 3,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 53.57 ± 1.88 ถึง 71.43 ± 1.7 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 10,000 โอห์ม มีอัตราการรอดตายมากที่สุด คือ 17.80 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย HEPES Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 5,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 53.57 ± 1.88 ถึง 71.43 ± 1.7 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 1,000 โอห์ม มีอัตราการรอดตายมากที่สุด คือ 75.47 ± 1.88 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย HEPES Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 50,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 53.57 ± 1.88 ถึง 89.29 ± 1.17 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 1,000 โอห์ม มีอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 38.88 ± 1.17 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย HEPES Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก และอัตราการรอดตาย คือ 0 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย PBS Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 35.71 ± 1.88 ถึง 53.57 ± 1.88 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 100 โอห์ม มีอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 26.67 ± 2.72 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย PBS Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 1,500 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 71.43 ± 1.7 ถึง 89.29 ± 1.17 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 100 โอห์ม มีอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 29.00 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย PBS Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 3,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 71.429 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 1,000 โอห์ม มีอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 45.20 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย PBS Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 5,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 71.43 ± 1.71 ถึง 89.29 ± 1.17 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 100 โอห์ม มีอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 44.80 ± 1.88 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย PBS Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 50,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 35.71 ± 1.81 ถึง 71.43 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 100 โอห์ม อัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 13.60 ± 1.81 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

สารละลายที่มีแมนนิทอลเป็นสารตั้งต้นหลักมีสารละลาย PBS Buffer ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก และอัตราการรอดตาย คือ 0 เปอร์เซ็นต์ แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 4.13

ตารางที่ 4.13 ค่าอัตราการฟักตัวและอัตราการรอดในฮอริโมนที่ความเข้มข้น 1,000-100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร

สารละลาย	ความเข้มข้น ฮอริโมน ไมโครกรัมต่อ ลิตร	ค่า ความ ต่าง ศักย์	การฟัก ตัว (n=700)	อัตราการ ฟักตัว (%)	การรอด ตาย (ตัว)	อัตราการ รอดตาย (%)
Mannitol+HEPES	1,000	100	250±4.53	35.71±1.88	69±0.78	27.60±1.81
Mannitol+HEPES	1,000	1,000	375±7.07	53.57±1.88	89±1.12	23.73±2.72
Mannitol+HEPES	1,000	10,000	375±7.07	53.57±1.88	70±0.79	18.67±2.72
Mannitol+HEPES	1,500	100	375±7.07	53.57±1.88	126±1.83	33.60±2.72
Mannitol+HEPES	1,500	1,000	500±8.54	71.43±1.71	426±7.86	85.20±1.71
Mannitol+HEPES	1,500	10,000	500±8.54	71.43±1.71	233±4.15	46.60±3.62
Mannitol+HEPES	3,000	100	500±8.54	71.43±1.71	78±0.93	15.60±2.51
Mannitol+HEPES	3,000	1,000	375±7.07	53.57±1.88	50±0.49	13.33±1.88
Mannitol+HEPES	3,000	10,000	500±8.54	71.43±1.71	89±1.12	17.80±1.71
Mannitol+HEPES	5,000	100	500±8.54	71.43±1.71	74±0.86	14.80±1.71
Mannitol+HEPES	5,000	1000	375±7.07	53.57±1.88	283±5.25	75.47±1.88
Mannitol+HEPES	5,000	10,000	375±7.07	53.57±1.88	235±4.19	62.67±1.88
Mannitol+HEPES	50,000	100	375±7.07	53.57±1.88	79±0.94	21.07±1.88
Mannitol+HEPES	50,000	1,000	625±7.31	89.29±1.17	243±4.37	38.88±1.17
Mannitol+HEPES	50,000	10,000	500±8.54	71.43±1.71	12±0.06	2.40±1.71
Mannitol+HEPES	100,000	100	0	0	0	0
Mannitol+HEPES	100,000	1,000	0	0	0	0
Mannitol+HEPES	100,000	10,000	0	0	0	0

ตารางที่ 4.13 ค่าอัตราการฟักตัวและอัตราการรอดในฮอริโมนที่ความเข้มข้น 1,000-100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร (ต่อ)

สารละลาย	ความเข้มข้น ฮอริโมน ไมโครกรัม ต่อลิตร	ค่า ความ ต่างศักย์	การฟัก ตัว (n=700)	อัตราการ ฟักตัว (%)	การรอด ตาย	อัตราการ รอดตาย (%)
Mannitol+PBS	1,000	100	250±4.53	35.71±1.81	50±0.49	20±1.81
Mannitol+PBS	1,000	1,000	375±7.07	53.57±1.88	90±1.14	24.00±2.72
Mannitol+PBS	1,000	10,000	375±7.07	53.57±1.88	100±1.32	26.67±2.72
Mannitol+PBS	1,500	100	500±8.54	71.43±1.71	145±2.22	29.00±1.71
Mannitol+PBS	1,500	1,000	625±7.31	89.29±1.17	175±2.86	28.00±1.17
Mannitol+PBS	1,500	10,000	625±7.31	89.29±1.17	181±2.99	28.96±1.17
Mannitol+PBS	3,000	100	500±8.54	71.43±1.71	136±2.03	27.20±1.71
Mannitol+PBS	3,000	1,000	500±8.54	71.43±1.71	226±3.99	45.20±1.71
Mannitol+PBS	3,000	10,000	500±8.54	71.43±1.71	39±0.34	7.80±1.71
Mannitol+PBS	5,000	100	500±8.54	71.43±1.71	134±1.99	26.80±1.71
Mannitol+PBS	5,000	1,000	375±7.07	53.57±1.88	168±2.71	44.80±1.88
Mannitol+PBS	5,000	10,000	625±7.31	89.29±1.17	237±4.24	37.92±1.17
Mannitol+PBS	50,000	100	250±4.53	35.71±1.81	34±0.28	13.60±1.81
Mannitol+PBS	50,000	1,000	500±8.54	71.43±1.71	55±0.56	11.00±1.71
Mannitol+PBS	50,000	10,000	500±8.54	71.43±1.71	48±0.46	9.60±1.71
Mannitol+PBS	100,000	100	0	0	0	0
Mannitol+PBS	100,000	1,000	0	0	0	0
Mannitol+PBS	100,000	10,000	0	0	0	0

จากตารางที่ 4.12 ในชุดควบคุมมีอัตราการฟัก (Hatching) 89.29 ± 0.04 และอัตราการรอดตาย (Survival rate) มีค่าร้อยละ 52.96 ± 1.89 จากตารางที่ 4.14 เมื่อทดลองกับเงื่อนไขทางไฟฟ้าที่กำหนด 350 โวลต์ เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม โดยใช้สารละลาย Mannitol ผสม HEPES buffer ในการแปลงเพศใช้ฮอร์โมนความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการรอดตายน้อยกว่าชุดควบคุม ค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 33.6 ± 2.72

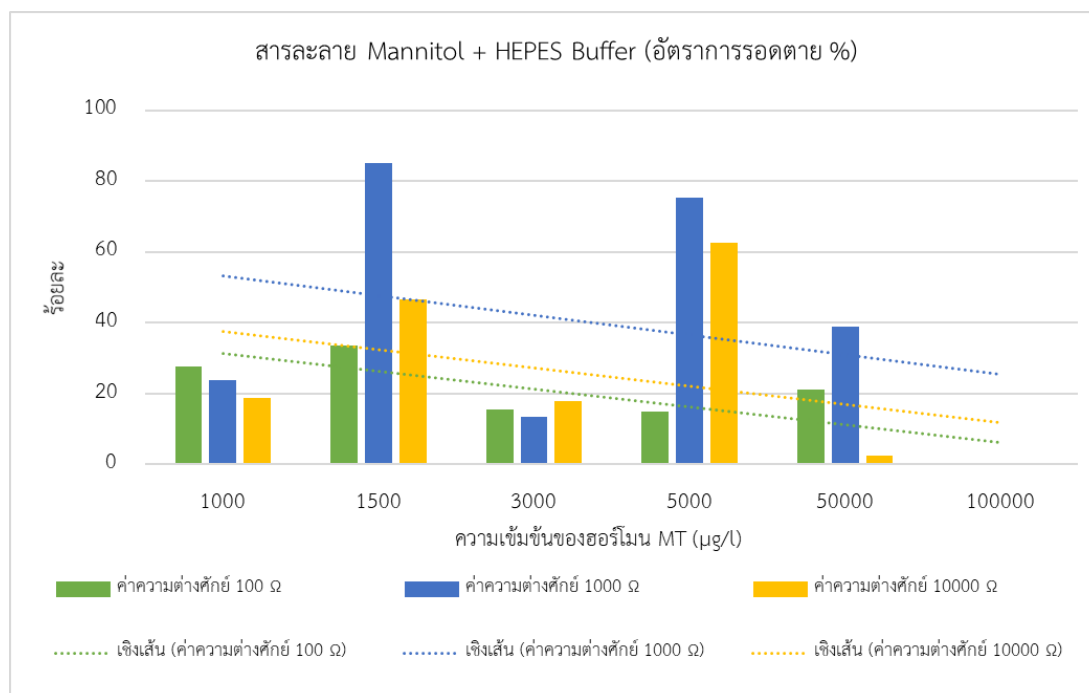
เงื่อนไขทางไฟฟ้าที่กำหนดค่าศักย์ทางไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม โดยใช้สารละลาย Mannitol ผสม HEPES Buffer ในการแปลงเพศใช้ฮอร์โมน MT ความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการรอดตายที่ใช้ฮอร์โมน MT ที่ความเข้มข้นที่ 1,500 และ 5,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดตายสูงกว่าชุดควบคุมค่าคือ 85.20 ± 1.71 และ 75.47 ± 1.88 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.14

เงื่อนไขทางไฟฟ้าที่กำหนดค่าศักย์ทางไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เพิ่มตัวต้านทานขนาด 10,000 โอห์ม โดยใช้สารละลาย Mannitol ผสม HEPES Buffer ในการแปลงเพศใช้ฮอร์โมน MT ที่ความเข้มข้น 1,500 3,000 5,000 และ 50,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการรอดตายที่ใช้ฮอร์โมน MT ที่ความเข้มข้นที่ 5,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดสูงกว่าชุดควบคุมค่าคือ 62.67 ± 1.88 แสดงดังตารางที่ 4.14

ตารางที่ 4.14 แสดงอัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์) ในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย HEPES Buffer และผสมสารละลาย MT

ความเข้มข้นฮอร์โมน ไมโครกรัมต่อลิตร	สารละลาย Mannitol+HEPES (อัตราการรอด เปอร์เซ็นต์) ค่าความต่างศักย์		
	100 โอห์ม	1000 โอห์ม	10000 โอห์ม
1,000	27.60 ± 1.81	23.73 ± 2.72	18.67 ± 2.72
1,500	33.6 ± 2.72	85.20 ± 1.71	46.60 ± 3.62
3,000	15.6 ± 2.51	13.33 ± 1.88	17.80 ± 2.51
5,000	14.8 ± 2.51	75.47 ± 1.88	62.67 ± 1.88
50,000	21.07 ± 1.88	38.88 ± 1.17	2.40 ± 3.62
100,000	0	0	0

รูปที่ 4.11 อัตราการรอด (เปอร์เซ็นต์) ในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย HEPES Buffer และ ผสมสารละลาย MT



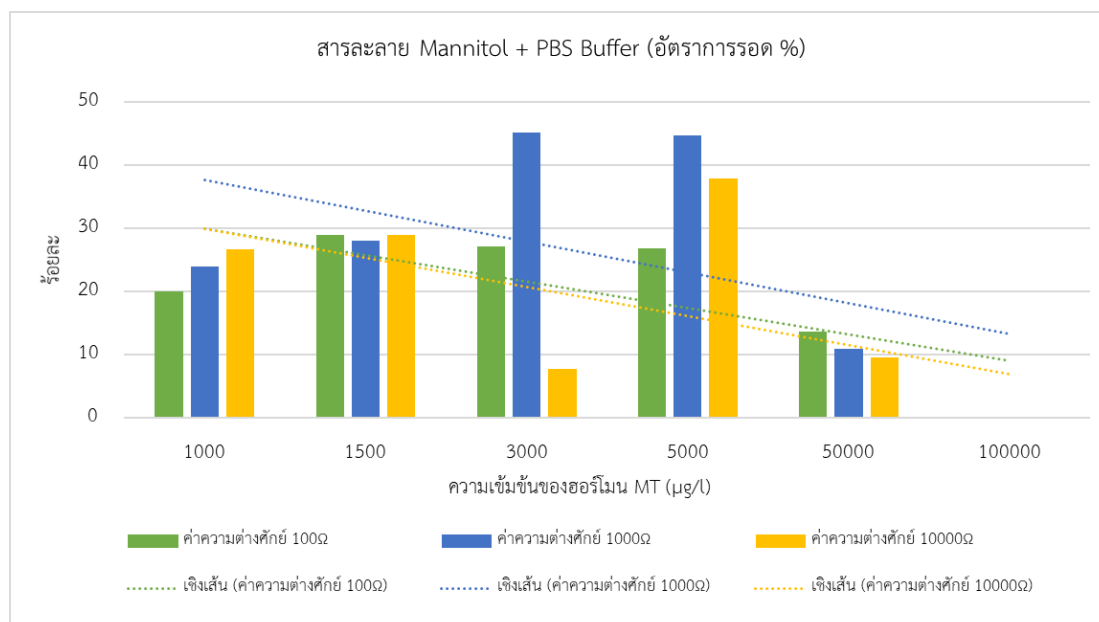
การทดลองกับเงื่อนไขไฟฟ้าที่กำหนดค่าศักย์ทางไฟฟ้าเริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 1,000 และ 10,000 โอห์ม โดยใช้สารละลาย Mannitol ผสม PBS buffer ในการแปลงเพศใช้ฮอริโมนความเข้มข้น 1,000 1,500 3,000 5,000 50,000 และ 100,000 ไมโครกรัมต่อลิตร พบว่าอัตราการรอดตายน้อยกว่าชุด ควบคุมค่าอยู่ระหว่าง 0 ถึง 29 ± 2.51 , 13.6 ± 1.81 ถึง 29 ± 2.51 , 11.00 ± 1.71 ถึง 45.20 ± 1.71 , 7.80 ± 2.51 ถึง 37.92 ± 2.13 และ 0 ตามลำดับ แสดงดังตารางที่ 4.15 และชุดควบคุมอัตราการรอดตายมีค่า 52.96 ± 1.89 แสดงดังรูปที่ 4.12

สรุปได้ว่าใช้สารละลาย Mannitol ผสม HEPES buffer และฮอริโมนความเข้มข้นที่ 1,500-5,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีความเหมาะสมกว่าการใช้สารละลาย Mannitol ผสม PBS buffer

ตารางที่ 4.15 แสดงอัตราการรอด (%) ในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และ ผสมสารละลาย MT

ความเข้มข้นฮอร์โมน ไมโครกรัมต่อลิตร	สารละลาย Mannitol+PBS (อัตราการรอด %)		
	ค่าความต่างศักย์		
	100Ω	1000Ω	10000Ω
1,000	20±1.81	24.00±2.72	26.67±2.72
1,500	29±2.51	28.00±1.17	28.96±2.13
3,000	27.2±1.71	45.20±1.71	7.80±2.51
5,000	26.8±2.51	44.80±1.88	37.92±2.13
50,000	13.6±1.81	11.00±1.71	9.60±3.62
100,000	0	0	0

รูปที่ 4.12 แสดงอัตราการรอด (%) ในสารละลาย Mannitol ผสมสารละลาย PBS Buffer และผสมสารละลาย MT



เมื่อทราบผลการวิเคราะห์การเหนี่ยวนำไข่ปลาช่อนทะเล ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์การเหนี่ยวนำไข่ปลาช่อนทะเลกับงานวิจัยอื่น แสดงดังตารางที่ 4.16 พบว่า

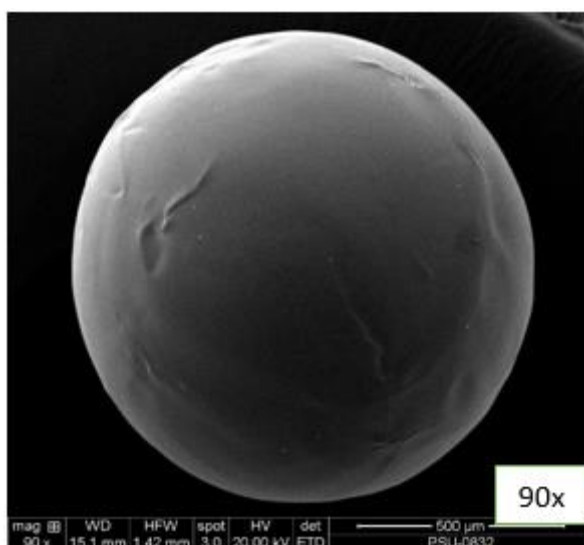
ตารางที่ 4.16 การเปรียบเทียบผลการวิเคราะห์จากการเหนี่ยวนำไข่ปลาช่อนทะเลและงานวิจัยอื่น

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์	ข้อดี/ข้อเสีย
จากการวิเคราะห์งานวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์นี้ พบว่าการเหนี่ยวนำไข่ปลาช่อนทะเลที่มีการพัฒนาตัวระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะบลาสโตพอร์(Blastopore) มาทดลองโดยการเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้ามีอัตราการรอด 75.47 ± 1.88 ถึง 85.20 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์	การเหนี่ยวนำไข่ปลาช่อนทะเลจะสามารถระบุเพศเฉพาะเจาะจงให้กับปลาช่อนทะเลได้ เนื่องจาก MT เป็นฮอร์โมนเพศที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง จึงอาจจะมีแนวโน้มความเป็นไปได้สูงที่ปลาช่อนทะเลที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าจะเป็นเพศผู้ แต่ในการพิจารณาการทดลองในครั้งนี้ไม่สามารถระบุเพศของปลาช่อนทะเลได้เนื่องจากปลาชนิดนี้มีระยะเวลาในการเลี้ยง โดยปลาเพศผู้จะมีความสมบูรณ์เพศอายุประมาณ 2 ปี และปลาเพศเมียจะมีความสมบูรณ์เพศอายุประมาณ 3 ปี (วินัย เนตรวงศ์, และคณะ, 2556)
จากผลการศึกษาของ Liao, <i>et al.</i> , (2004) พบว่า ในธรรมชาติปลาช่อนทะเลมีอัตราการรอด 90 เปอร์เซ็นต์	ในธรรมชาติปลาช่อนทะเลเพศผู้ต่อเพศเมียเป็น 50:50 เปอร์เซ็นต์

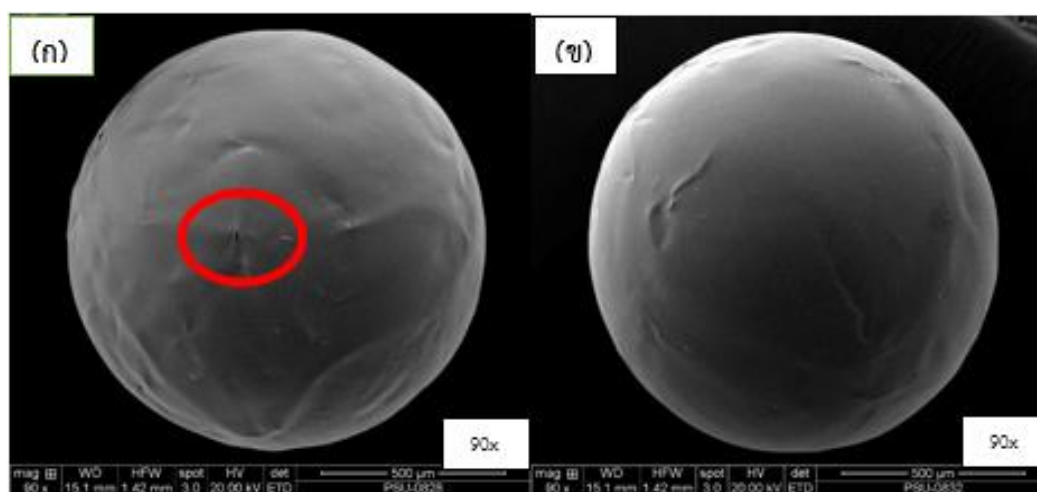
4.4 ผลตรวจสอบสัณฐานไข่ปลาช่อนทะเลด้วยภาพถ่าย SEM

ผลการตรวจสอบสัณฐานลักษณะของไข่ปลาช่อนทะเลและลักษณะพื้นผิวเซลล์ไข่ปลาช่อนทะเลผ่านภาพถ่าย SEM เพื่อดูลักษณะของไข่ปลาช่อนทะเลมีความหนาแน่น และขนาดความกว้างของรูในไข่ปลาช่อนทะเล แสดงดังรูปที่ 4.13 และไข่ปลาที่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม กระตุ้นด้วยช่วงสัญญาณคาบบวก 50 ไมโครมิลลิวินาที จำนวน 3 ลูกคลื่น พบว่าเปลือกไข่ปลาช่อนทะเลได้รับความเสียหายแสดงดังรูปที่ 4.14 (ก) และรูปที่ 4.14 (ข) แสดงลักษณะของเปลือกไข่โดยมีการเหนี่ยวนำด้วยศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ เพิ่มตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์มกระตุ้นด้วยช่วงสัญญาณคาบบวก 50 ไมโครมิลลิวินาที จำนวน 3 ลูกคลื่น ลักษณะเปลือกไข่ไม่ได้รับความเสียหายจากศักย์ไฟฟ้า

ลักษณะของเปลือกไข่ปลาช่อนทะเลชุดควบคุม มีขนาดรูกว้าง 150 นาโนเมตร ดังรูปที่ 4.13 (ง) เปลือกไข่ปลาช่อนทะเลที่เหนี่ยวนำด้วยศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 และ 1,000 โอห์ม, 50 ไมโครวินาที, 3 พัลส์ มีขนาดความกว้างของรู 215.7 และ 221.4 นาโนเมตร ตามลำดับ ดังรูปที่ 4.16 (ฉ), (ช) และพบว่าในการใช้ตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม ไข่ปลาช่อนทะเลได้รับความเสียหาย



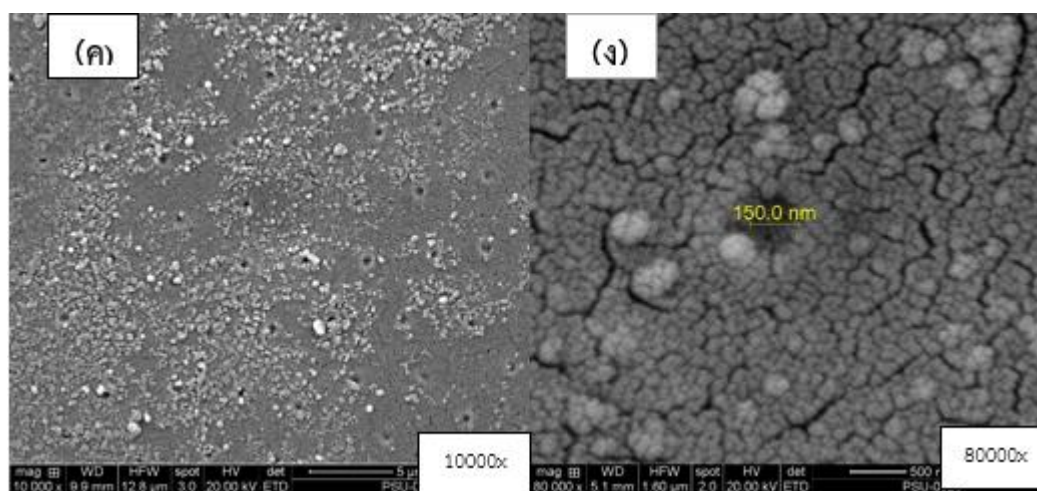
รูปที่ 4.13 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ลักษณะไข่ปลาช่อนทะเลชุดควบคุม



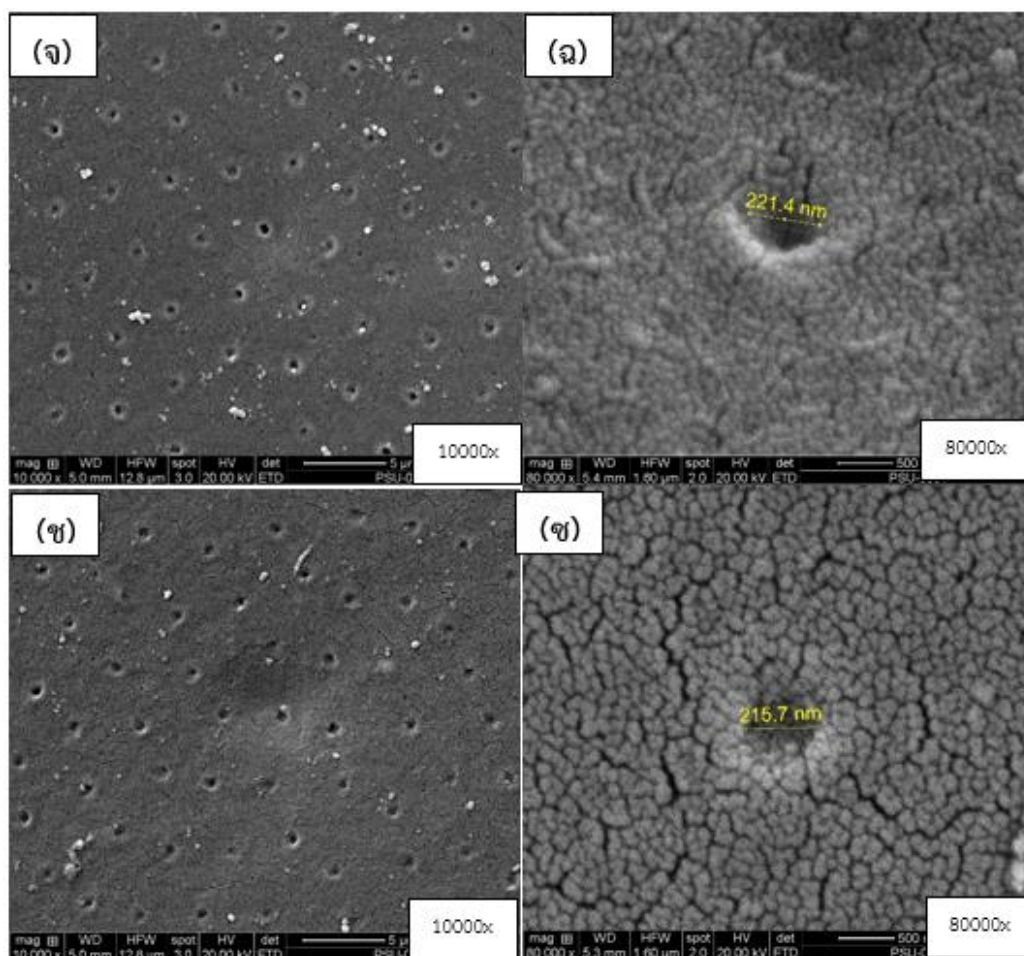
รูปที่ 4.14 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM)

(ก) ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ ตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม, 50 ไมโครวินาที, 3 พัลส์

(ข) ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ ตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม, 50 ไมโครวินาที, 3 พัลส์



รูปที่ 4.15 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงความหนาแน่น ลักษณะ และขนาดความกว้างของรูในไข่ปลาช่อนทะเล (ค), (ง) ลักษณะจำนวนรูไข่ปลาช่อนทะเลชุดควบคุม



รูปที่ 4.16 รูปถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงความหนาแน่น ลักษณะและขนาดความกว้างของรูในโซ่ปลาช่อนทะเล

(จ), (ฉ) ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม, 50 ไมโครวินาที, 3 พัลส์

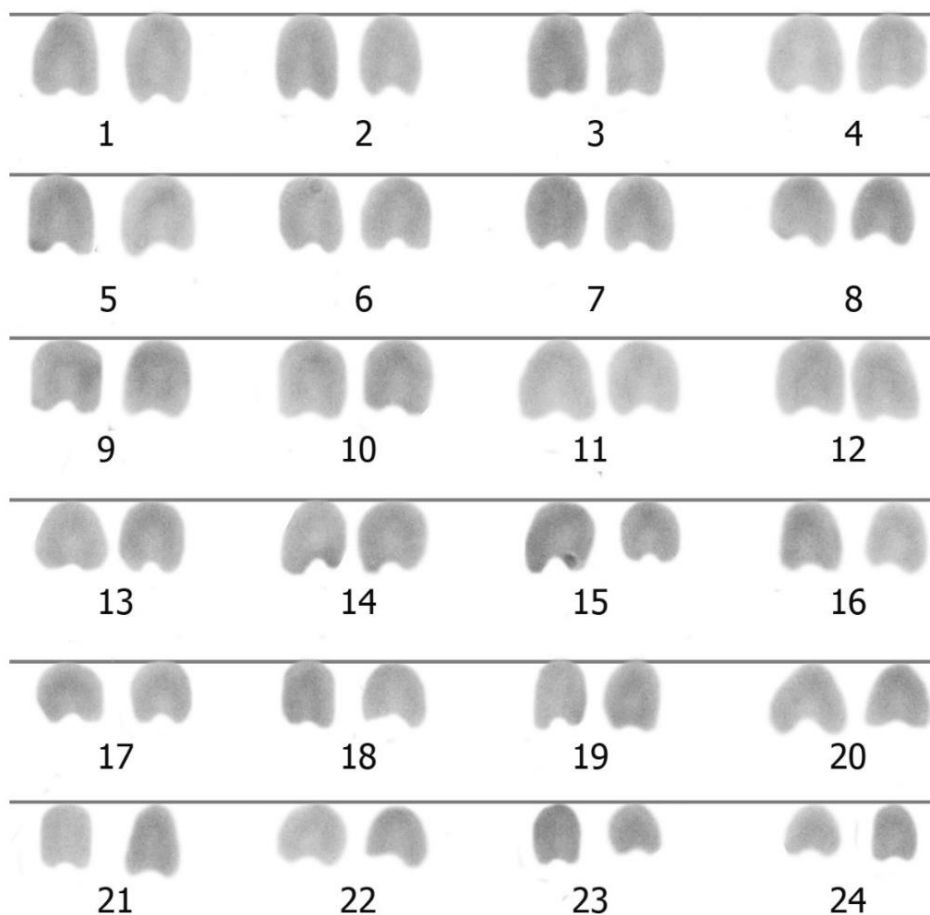
(ช), (ฅ) ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ตัวต้านทานขนาด 1,000 โอห์ม, 50 ไมโครวินาที, 3 พัลส์

4.5 ผลการตรวจสอบโครโมโซมในปลากะรังจุดฟ้าและปลากะรังลายเสือ

สรุปผลการทดลอง

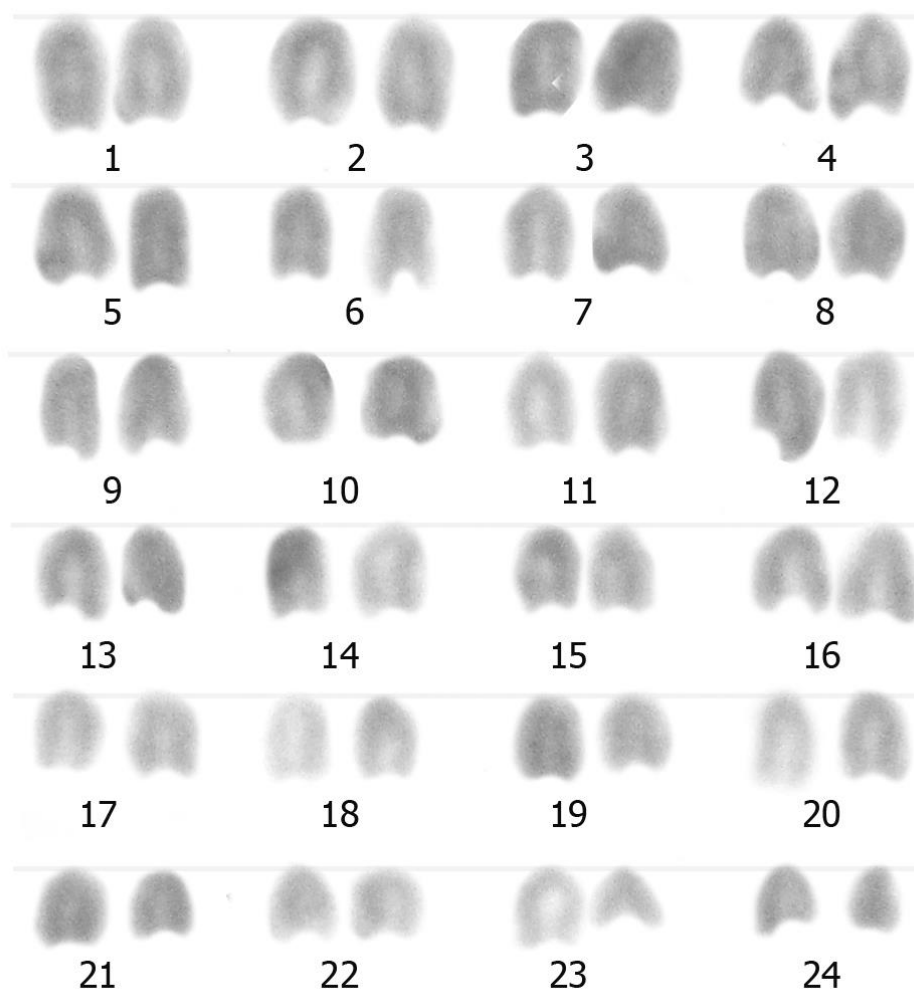
ผลการศึกษานับจำนวนโครโมโซมของปลาวงศ์ *Epinephelus* 2 ชนิด ประกอบด้วยปลากะรังจุดฟ้า และปลากะรังลายเสือ สรุปได้ว่าปลากะรังจุดฟ้า และปลากะรังลายเสือ มีโครโมโซมดิพลอยด์ 48 แห่ง ($2n=48$)

1) โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของปลากะรังลายเสือ (*Epinephelus fuscoguttatus*, $2n=48$)



รูปที่ 4.17 โครโมโซมระยะเมทาเฟสในปลากะรังลายเสือ (*Epinephelus fuscoguttatus*, $2n=48$)

2) โครโมโซมระยะเมทาเฟสและคาริโอไทป์ของปลากะรังจุดฟ้า (*Plectropomus leopardus*, $2n=48$)



รูปที่ 4.18 โครโมโซมระยะเมทาเฟสในปลากะรังจุดฟ้า (*Plectropomus leopardus*, $2n=48$)

อภิปรายผล

การเตรียมโครโมโซมเป็นวิธีที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย และให้ผลดีพอสมควร การทำให้โครโมโซมมีการกระจายตัวไม่จับตัวเป็นกลุ่มก้อน ทำให้สามารถดูรูปร่างโครโมโซมได้อย่างชัดเจน การกระจายตัวของโครโมโซมขึ้นอยู่กับ การนำเซลล์เข้าเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่มีความเร็วและเวลาที่เหมาะสม เพราะความเร็วที่มีความเร็วสูงและเวลานานเกินไปจะส่งผลกระทบต่อ การแผ่กระจายของเซลล์ทำให้เซลล์หลุดออกจากกลุ่มโครโมโซม ดังนั้นจึงควรมีการระมัดระวังเกี่ยวกับ ความเร็วรอบต่อวินาทีและเวลาที่ใช้นอกจากนี้ขึ้นอยู่กับชนิด ขนาดและอายุของปลา

ข้อควรระวัง ให้การฉีดโคลชิซิน ต้องระวังปลาไม่ให้เครียดจะส่งผลกระทบต่อเซลล์ที่ใช้ในการทดลอง เพราะถ้าปลาเครียดหรือช็อคจะส่งผลกระทบต่อเซลล์โครโมโซม เนื่องจากเซลล์ที่ต้องการคือเซลล์ในระยะเมทาเฟส ซึ่งโคลชิซินนั้นจะทำหน้าที่เพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ที่ระยะเมทาเฟส ระยะเวลา หลังจากการฉีดโครชิซินในปลาแต่ละชนิดไม่เท่ากัน ขึ้นอยู่กับขนาดและอายุของปลาปลากระรังจุดฟ้ากับปลาเก๋าเสือที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ใช้ระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง

บทที่ 5

บทสรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์หีไข่ปลาช่อนทะเลที่มีการพัฒนาคัพภะระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะบลาสโตพอร์ (Blastopore) มาทดลองโดยการเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า เนื่องจากการวิจัยในครั้งนี้ไข่ปลาช่อนทะเลมีขนาดเล็กและไม่สามารถแยกด้วยตาเปล่าได้ มาทดลองเพื่อหาเงื่อนไขในการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาช่อนทะเลซึ่งเป็นวัตถุประสงค์ของงานวิจัยในครั้งนี้

จากการทดลองพบว่าที่ เงื่อนไขทางไฟฟ้า 350 โวลต์ ที่มีการเพิ่มตัวต้านทานที่ 1,000 ใช้สารละลายแมนนิทอล (Mannitol) ผสมสารละลาย HEPES Buffer และจากผลการทดลองเพื่อลดปริมาณฮอร์โมน MT ที่ใช้ในการทดลองความเข้มข้นของสารละลายฮอร์โมน MT 1,500-5,000 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเงื่อนไขที่เหมาะสมในการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ โดยพิจารณาจากภาพถ่าย SEM และอัตราการรอดอยู่ระหว่าง 75.47 ± 1.88 ถึง 85.20 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีอัตราการรอดมากกว่าชุดควบคุม ซึ่งชุดควบคุมมีค่า 52.96 ± 1.89 เปอร์เซ็นต์ ในการพิจารณาการทดลองนี้ไม่สามารถระบุเพศของปลาช่อนทะเลได้เนื่องจากปลาชนิดนี้มีระยะเวลาในการเลี้ยงปลาเพศผู้จะมีความสมบูรณ์เพศอายุประมาณ 2 ปี ปลาเพศเมียจะมีความสมบูรณ์เพศอายุประมาณ 3 ปี (วินัย เนตรวงศ์, และคณะ, 2556)

การทดลองนี้จึงได้ทราบเงื่อนไขในการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาช่อนทะเลคือ เงื่อนไขค่าศักย์ทางไฟฟ้าที่ 350 โวลต์ และมีการเพิ่มตัวต้านทานที่ 1,000 โอห์ม ที่ใช้สารละลาย แมนนิทอล (Mannitol) ผสมสารละลาย HEPES Buffer และปริมาณฮอร์โมน MT ที่ใช้ที่เหมาะสมความเข้มข้นของสารละลายฮอร์โมน MT 1,500-5,000 ไมโครกรัมต่อลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยในครั้งนี้เป็นโครงการนำร่อง มีปัจจัยการทดลองที่ใช้พิจารณาหลายประเด็น ในการทดลองหาเงื่อนไขทางไฟฟ้ามีการทดลองเพื่อกำหนดศักย์ไฟฟ้าที่มีช่วงคือ ค่าความต่างศักย์ ที่ 350 โวลต์ เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 500 1,000 5,000 และ 10,000 โอห์ม ในการเตรียมสารละลาย EPM นั้นต้องคำนึงถึงค่าการนำไฟฟ้าเนื่องจากปลาช่อนทะเลเป็นปลาน้ำเค็ม องค์ประกอบของไข่มีปริมาณของเกลืออยู่ด้วยซึ่งมีผลต่อค่าการนำไฟฟ้า (Conductivity)

งานวิจัยนี้ทดลองใช้ไข่ปลาช่อนทะเลที่ระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะบลาสโตพอร์ (Blastopore) ซึ่งเป็นการยากในการเลือกไข่ปลาให้อยู่ในระยะเดียวกันทั้งหมดในแต่ละชุดการทดลอง เนื่องจากปลาชนิดนี้มีระยะในการพัฒนาตัวอ่อนใช้เวลาประมาณ 22 ชั่วโมง ในการฟักเป็นตัวหลังจากการปฏิสนธิ และไข่มีขนาดเล็กจึงไม่สามารถนับจำนวนที่แน่นอนได้ในแต่ละชุดการทดลอง ทั้งนี้ต้องใช้ระยะเวลาในการติดตามเพื่อให้ได้ไข่ปลามาทำการทดลองนั้นนาน เนื่องจากปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเข้ามาเกี่ยวข้องในการวางไข่ของปลาช่อนทะเล

เอกสารอ้างอิง

- กฤษณา จันทรแก้ว ปัญญา อัครวางกูร วุฒิ คุปตะวาทีน เรณู ยาชิโร สุกัญญา วีรวัฒน์กุ่มพะ และ นิพนธ์ เสนอินทร์ . (2547). “ระดับไวเทลโลจินีในรอบปีเพื่อบ่งชี้ความสมบูรณ์เพศ ปลากะรังจุดฟ้า *Plectropomus maculates* (BLOCH). เอกสารวิชาการฉบับที่ 69/2547.” สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง , กรมประมง. 20 หน้า.
- โกวิทย์ แก้วเอี่ยม ทวี จินตามัยกุล และ ฉัตรชัย พลายนะหาร. (2544). “การเพาะและอนุบาลปลากะรังเหลืองจุดฟ้า *Plectropomus areolatus*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2544.” กองเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 11 หน้า.
- คณิต ไชยาคำ สิริ ทุกข์วินาศ ยงยุทธ ปรีดา ลัมพะบุตร พุทธ ส่องแสงจินดา และ ดุสิต ต้นวิลัย. (2537). “คุณภาพน้ำเพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง ความรู้เบื้องต้นและวิธีการวิเคราะห์.” สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 109 หน้า.
- โครงการความร่วมมือระหว่างไทย-นอร์เวย์. การเลี้ยงปลาในกระชังขนาดใหญ่ (Sea Cage Farming). (2549) ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต. สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง www.coastalaqua.com/index.php?option=com_rokdownloads&view=file
- ชลธิชา สาหับ1,กมลวรรณ ธรรมเจริญ2, ธวัชชัย ตันทุลานี1, สนอง เอกสิทธิ1 และบุษยรัตน์ ธรรมพัฒนกิจ1, (2013), “การศึกษาอนุภาคโคออร์ดิเนชันนาโนเมตรชนิดใหม่จากการรวมตัวกันเองของสารลดแรงตึงผิวและกาโดลิเนียมไอออนเพื่อทำให้เคอร์คูมินเสถียรในสารละลายบัฟเฟอร์”. KRU Res. J. 2013; 18(5): 832-843 *ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 2 ศูนย์นาโนเทคโนโลยีแห่งชาติ (นาโนเทค) สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (สวทช.)** Correspondent author : tboosayarat@gmail.com
- ทวี จินตามัยกุล. (2529). *การศึกษากาการเพาะและอนุบาลปลากะรังหน้าอง*, สถาบันประมงน้ำกร่อย กรมประมง, ภูเก็ต.
- ทวี จินตามัยกุล. (2551). *การเลี้ยงปลาช่อนทะเลในกระชังขนาดใหญ่ในทะเลลึกเพื่อเป็นอุตสาหกรรม การส่งออก*, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต, ภูเก็ต.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- ธวัช ศรีวีระชัย เรณู ยาชีโร และ นิพนธ์ เสนอินทร์. (2547). “การเพาะปลากะรังจุดฟ้า *Plectropomus leopardus* โดยการให้ออร์โมนเพศผู้และให้แม่ปลาวางไข่ตามธรรมชาติในบ่อระบบปิด.”, เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2547, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรมประมง
- เจียร บรรณโคภิชฐ์ . (2512). “ปลากะรังในน่านน้ำไทย.” สถาบันวิจัยประมงทะเล กองสำรวจและค้นคว้า, กรมประมง. 73 หน้า.
- ธงชัย เย็นเป้ง วรวิทย์ พรหมปากดี สมศรี งามวงศ์ชน และ ธราพันธ์ วัฒนสมมหาตม์. (2555) “การศึกษาระดับของฮอร์โมน (17 alpha methyltestosterone) ที่ตกค้างในการผลิตลูกปลานิลแปลงเพศระบบน้ำหมุนเวียน.”, *เอกสารวิชาการ* ประจำปี 2556, ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดมหาสารคาม, กรมประมง.
- ธัญดา สอนศิลป์. (2556). “การขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลานิลด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแปลงเพศ.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม, คณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตภูเก็ต.
- พิมลทิพย์ ชุณหพิมล. (2556). “การย่อยสลาย 17 แอลฟา-เมทิลเทสโทสเตอโรนโดยใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตในช่วงยู วีซีและยูวีในช่วงสุญญากาศ.” วิทยานิพนธ์ศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม, คณะวิศวกรรมศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์. (2010). “Food Network Solution ศูนย์เครือข่ายข้อมูลอาหารครบวงจร.” (ออนไลน์) เข้าถึงได้ที่ <http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/3278/%E0%B8%9B%E0%B8%A5%E0%B8%B2%E0%B8%8A%E0%B9%88%E0%B8%AD%E0%B8%99%E0%B8%97%E0%B8%B0%E0%B9%80%E0%B8%A5-cobia> (วันที่ 28 มิถุนายน 2559).
- พุทธรัตน์ เบ้าประเสริฐกุล และคณะ (2556) เบญจพร สัมฤทธิเวช, สันติชัย รังสียาภิรมณ์ และเต็มดวง สมศิริ. กรมประมง การตรวจฮอร์โมน 17 อัลฟา เมทิลเทสโทสเตอโรนในปลานิลแปลงเพศ The Determination of 17 α -Methyltestosterone in Sex-reversed Tilapia , Technical Paper No. 3 /2013 เอกสารวิชาการฉบับที่ 3 /2556 ,18 หน้า

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว. (2553). ฮอว์โมนในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น
- เภสัชกร อภัย ราษฎร์วิจิตร (2012) แมนนิทอล (Mannitol) เข้าถึงเมื่อวันที่ 20/12/2559
<http://haamor.com/th/%E0%B9%81%E0%B8%A1%E0%B8%99%E0%B8%99%E0%B8%B4%E0%B8%97%E0%B8%AD%E0%B8%A5/#article103>
- เรณู ยาชีโร เจนจิตต์ คงกำเนิด วิชัย วัฒนกุล และ นิเวศน์ เรืองพานิช. (2536). “การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในปลากะรัง *Epinephelus malabaricus*. เอกสารวิชาการฉบับที่ 14/2536.” สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่งสงขลา, กรมประมง. 14 หน้า.
- เรณู ยาชีโร ธวัช ศรีวีระชัย และ นิพนธ์ เสนอินทร์. (2546). “ผลการใช้ฮอว์โมนเพศผู้เสริมความสมบูรณ์เพศของพ่อพันธุ์ปลากะรังจุดฟ้า *Plectropomus maculatus*.” (เอกสารความก้าวหน้างานวิจัย , ยังไม่ได้พิมพ์เผยแพร่).
- เรณู ยาชีโร, กฤษณา จันท์แก้ว, ปัญญา อัสวางกุล, วุฒิ คุปตะวาทีน, สุกัญญา วีระพัฒนกะมุพะ และ นิพนธ์ เสนอินทร์. (2547) ระดับไคโทลโลจินินในรอบปีเพื่อป้องกันความสมบูรณ์เพศปลากะรังจุดฟ้า *Plectropomus maculatus* (Bloch). เอกสารวิชาการฉบับที่ 69/2547. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งระยอง สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. 20 หน้า
- เรณู ว่องสงสาร และนพนันท์ อยู่รอง. (2549). “คู่มือการผลิตปลานิลแปลงเพศ.” ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดอุดรธานี.
- วินัย เนตรวงศ์ ลาวัลย์ เนตรวงศ์ ศักดิ์ชัย เนตรวงศ์ ยมนา เนตรวงศ์ สุภาภรณ์ ดำแดง สมบัติ สวัสดิ์ นาค วิไลพร เจริญวงศ์ ศิริพร หิตสมุย ภัทธีรา มาฆทาน สมศักดิ์ มาฆทาน กิตติ สวัสดิ์ นาค ภัทราพรรณ สักจันทร์ สรายุทธ์ ณ ตะกั่วทุ่ง ศิริญา เพชรรัตน์ จเร มาฆทาน และ ประเชาว์ เนตรวงศ์. (2556). ปัญหาการเลี้ยงปลาช่อนทะเล และแนวทางการจัดการเลี้ยงปลาช่อนทะเล เพื่อเป็นอาชีพทางเลือกของประมงชายฝั่งขนาดเล็ก ชุมชนบ้านแหลมโพธิ์ ตำบลพุมเรียง อำเภอไชยาจังหวัดสุราษฎร์ธานี ระยะที่ 1, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพมหานคร.
- วีระพงศ์ วุฒิปันธุ์ชัย. (2536). การเพาะพันธุ์ปลา, โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งภูเก็ต. (2549). “การเลี้ยงปลาในกระชังขนาดใหญ่ (*Sea Cage Farming*).” (ออนไลน์) เข้าถึงได้ที่ www.coastalaqua.com/index.php?option=com_rokdownloads&view=file (วันที่ 2 พฤษภาคม 2559)
- ศักดิ์ชัย บัญญัติ. (2554). *ฟิสิกส์กลศาสตร์ไฟฟ้าของอนุภาคชีวภาพ*, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, ภูเก็ต
- อนุวัฒน์ รัตนโชติ และกิตติ ภัคดี. (2530). “การทดลองเพาะขยายพันธุ์และอนุบาลปลากะรังจุดน้ำตาล (*Epinephelus tauvina*).”, เอกสารประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัย สถาบันเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำสงขลา: 23-25 กุมภาพันธ์ 2530.
- อาคม สิงห์บุญ ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ และ สามารถ เดชสถิตย์. (2546). “พัฒนาการคัพภะและลูกปลาวัยอ่อนของของปลาเก๋าเสือ *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsk., 1775).” ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่, สำนักวิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง, กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ . 29 หน้า
- อาคม สิงห์บุญ, ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์, สามารถ เดชสถิต,ปริศนา คลั่งสุขคล้าย และพิกุล ไชยรัตน์. (2555). คัพภะวิทยาและพัฒนาของลูกปลาช่อนทะเลวัยอ่อน *Rachycentron canadum* Linnaeus, 1766. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่. กรมประมง.
- Allen, G. (2000). *Marine Fishes of South-East Asia*, Periplus Editions, Singapore.
- Asami K. and Irimajiri A. 1984. Dielectric analysis of mitochondria isolated from rat liver II. Intact mitochondria as simulated by a double shell model. *Biochim Biophys Acta* 778: 570-578.
- Bunthawin S., Sornsilpa T., Tuantranont A., Jaruwongrungrsee K. and Ritchie R. J. (2015). “Monosex-Male Sex Reversal of Nile Tilapia Eggs Using Pulse-Electric Field Inductions.” *Computational and Theoretical Nanoscience*, 12, 1-5.
- Can, N.V. (2005). “Present status of hatchery technology for cobia *Rachycentron canadum*.” *Aquaculture*, 4, 32-34.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A. and Sowers, A. E. (1992). "Guide to Electroporation and Electrofusion." *Academic Press*, San Diego, California.
- Cathleen, B. (2007). "*Rachycentron canadum* Florida Museum of Natural History" (ออนไลน์) เข้าถึงได้ที่ <https://www.floridamuseum.ufl.edu/fish/discover/species/profiles/rachycentron-canadum> (วันที่ 20 กันยายน 2559)
- Cultured Aquatic Species Information Programme. (2006). "*Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) Food and Agriculture Organization of the United Nations." (ออนไลน์) เข้าถึงได้ที่ http://www.fao.org/fishery/culturedspecies/Rachycentron_canadum/en (วันที่ 20 กันยายน 2559)
- Dutney, L., Elizur, A. & Lee, P. 2017. Analysis of sexually dimorphic growth in captive reared cobia (*Rachycentron canadum*) and the occurrence of intersex individuals. *Aquaculture* 468, 348-355.
- Fitzpatrick, M.S., W.M. Contreras-Sánchez, R.H. Milston, M. Lucero, G.W. Feist and C.B. Schreck. (1998). "Steroid immersion of masculinization of tilapia." In: D. Burke, J. Baker, B. Goetze, D. Clair, and H. Eгна (Editors), Fifteenth Annual Technical
- Fitzpatrick, M. S. and Contreres-Sanchez, W. M. 2000. Fate of Methytestosterone in the pond environment: detection of MT in soil after treatment with MT food. PD/A CRSP seventeenth annual technical report. pp. 109-112. Oregon state University, Corvallis, Oregon, U.S.A.
- Florida Museum. (2007). "Ichthyology." (ออนไลน์) เข้าถึงได้ที่ <http://www.flmnh.ufl.edu/fish>
- Gopakumar, G., Rao, G. S., Nazar, A. K. A., Kalidas, C., Tamilmani, G., Sakthivel, M., Maharshi, V.A. and Rao, K. S., (2011) Successful seed production of Cobia, *Rachycentron canadum*, in India, Volume XVI No. 3 July-September 2011, 24-29 *Aquaculture Asia Magazine*

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Holt, G. J., Kaiser, J., and Faulk, C. (2007). *Advances in Cobia Research in Texas. In: I Chiu Liao and Eduardo M. Leano. COBIA AQUACULTURE: Research, Development and Commercial Production*, National Taiwan Ocean University, Taiwan.
- Jeffrey B. Kaiser and G. Joan Holt. (2004). "Species Profile Cobia." SRAC Publication. No.7202
- Kanduser, M., and Miklavcic, D. (2008). "Electroporation in biological cell and tissue: An overview of electrotechnologies for extraction from food plants and biomaterials." DOI: 10.1007/978-0-387-79374-01.
- Liao, I.C., Huang, T.S., Tsai, W.S., Hsueh, C.M., Chang, S.L. & Leano, E.M. 2004. "Cobia culture in Taiwan: current status and problems". *Aquaculture*, 237:155-165.
- Luke Dutney , Abigail Elizur , Peter Lee., (2017). "Analysis of sexually dimorphic growth in captive reared cobia (*Rachycentron canadum*) and the occurrence of intersex individuals." *Aquaculture* 468 (2017) 348–355
- Sakthivel, M., Abdul, A. K., Nazar, G., Tamilmani, C.K, Alidas, N., Ramamoorthy, V., Ashok Maharshi, K., Srinivasa, R., and Gopakumar, G. (2012). "Embryonic development of cobia, *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) in controlled conditions." *Mar Biol Ass*, 54, 5-8.
- Shaffer, R.V. and Nakamura, E.L. 1989. *Synopsis of biological data on the cobia *Rachycentron canadum* (Pisces: Rachycentridae)*, U. S. Department of Commerce, U.S.A.
- Tsong, T. Y. (1991). "Electroporation of cell membranes." *Biophysical Journal*, 60, 297-306.
- Uedson P.J., Marcelo, D.B.C., Rodrigues Souza, G. L., Leonardo L.C., Manoel T., Manzella J.R., Bertollo, L.A.C., and Wagner F. (2011) "Chromosome Mapping of Repetitive Sequences in *Rachycentron canadum* (Perciformes: Rachycentridae): Implications for Karyotypic Evolution and Perspectives for Biotechnological Uses." *J Biomed Biotechnol*, 8.

เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- Wang, S., Li, Q., Chen, F., Ke, J. & Chen, R. 2017. HEPES-mediated controllable synthesis of hierarchical CuO nanostructures and their analogous photo-Fenton and antibacterial performance. *Advanced Powder Technology* 28, 1332-1339.
- Zimmermann, U. (1982). "Electrical field-mediated fusion and related electrical phenomena." *Biochimica et Biophysica Acta*, 694, 227-277.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล	นางสาวเสาวลักษณ์ ขาวแสง		
รหัสประจำตัวนักศึกษา	5730220015		
วุฒิการศึกษา	วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
	วิทยาศาสตร์บัณฑิต	มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์	2554

การตีพิมพ์เผยแพร่ผล

เสาวลักษณ์ ขาวแสง และ ศักย์ชิน บุญถวิล. (2560). “การชักนำเพศปลาช่อนทะเลให้เสถียรด้วยเทคนิคทางไฟฟ้า” การประชุมสวนสุนันทาวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 6, โรงแรมเดอะรอยัลริเวอร์ เชียงสะพานกรุงธน กรุงเทพมหานคร: 22 – 23 มิถุนายน พ.ศ. 2560