

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

อัตราการรอดของลูกปลาอุกเทศที่เหนียวนำด้วยวิธีไจโนเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็นในระยะเวลาต่างกัน

**SURVIVAL RATE OF AFRICAN SHARPTOOTH CATFISH WITH GYNOGENETIC
DIPLOIDIZATION AND INDUCTION WITH COOL WATER IN DIFFERENT TIME**

จัดทำโดย

นายรัชชัย แสงทอง

รหัส 5007101007

สาขาวิชาการประมง

มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปีการศึกษา 2552

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

อัตราการรอดของลูกปลาอุกเทศที่เหนียวนำด้วยวิธีไจโนเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็นในระยะเวลาต่างกัน

**SURVIVAL RATE OF AFRICAN SHARPTOOTH CATFISH WITH GYNOGENETIC
DIPLOIDIZATION AND INDUCTION WITH COOL WATER IN DIFFERENT TIME**

จัดทำโดย

นายรณชัย แสงทอง

รหัส 5007101007

สาขาวิชาการประมง

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

มหาวิทยาลัยแม่โจ้-ชุมพร

มหาวิทยาลัยแม่โจ้

ปีการศึกษา 2552

ชื่อเรื่อง : อัตราการรอดของลูกปลาตุกเทศที่เหนียวนำด้วยวิธีไจโนเจนซิสและกระตุ้นด้วย
น้ำเย็น ในระยะเวลาต่างกัน

SURVIVAL RATE OF AFRICAN SHARPTOOTH CATFISH WITH
GYNOGENETIC DIPLOIDIZATION AND INDUCTION WITH COOL
WATER IN DIFFERENT TIME

ชื่อผู้เขียน: นายรณชัย แสงทอง

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาการประมง (การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ)

อาจารย์ที่ปรึกษา: อาจารย์วีรชัย เพชรสุทธิ

บทคัดย่อ

การศึกษาอัตราการรอดของลูกปลาตุกเทศที่เหนียวนำด้วยวิธีไจโนเจนซิส และกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ชุด ด้วยน้ำเย็น ในระยะเวลาต่างกัน ดำเนินการโดยใช้
น้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ผ่านการฉายรังสีที่ระดับความเข้มของแสง 196 ไมโครวัตต์ต่อตาราง
เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 1 นาที แล้วนำมาผสมกับไข่ปลาตุกเทศ ในระยะเวลา 1.30 นาที
จากนั้นนำไข่ปลาตุกเทศที่ผ่านการผสม ไปกระตุ้นด้วยน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส
เป็นระยะเวลา 0, 5, 10, 15, และ 20 นาที

เมื่อสิ้นสุดการทดลองพบว่า ลูกปลาตุกเทศที่เหนียวนำด้วยวิธีไจโนเจนซิส
และกระตุ้นด้วยน้ำเย็น ที่อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 15 นาที มีอัตราการ
รอดตายดีที่สุด โดยมีค่าเท่ากับ 64.37 ± 18.556 เปอร์เซ็นต์, รองลงมาคือ ที่เวลา 20 และ 10 นาที
มีอัตราการรอดตาย 46.00 ± 39.154 และ 36.33 ± 32.036 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่ชุดการทดลอง
ที่กระตุ้นด้วยน้ำเย็น ที่อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0 และ 5 ไม่มีการพัฒนา
ไปเป็นตัวอ่อนของลูกปลาตุกเทศ

คำสำคัญ : ปลาตุกเทศ การเหนียวนำไข่ด้วยความเย็น (Gynogenetic diploidization)

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษางานวิจัย เรื่องอัตราการรอดของลูกปลาคุกเทศที่เหนียวนำด้วยวิธีโคโนเจเนซิส และกระตุ้นด้วยน้ำเย็นในระยะเวลาต่างกัน ลุล่วงไปด้วยดี เนื่องจากการอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย ขอขอบพระคุณอาจารย์ วีรชัย เพชรสุทธิ ซึ่งได้กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษและคอยแนะนำให้ความรู้ความเข้าใจที่ดี ตลอดจนช่วยตรวจสอบแก้ไขจนกระทั่งสำเร็จออกมาเป็นรูปเล่มปัญหาพิเศษอย่างสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ คุณสุชาติ จุลอตุล และคุณกฤษฎพันธ์ โกเมนไปรรินทร์ (นักวิชาการประมง) ได้กรุณารับเป็นที่ปรึกษาปัญหาพิเศษร่วม ให้คำแนะนำการทำปัญหาพิเศษและให้ความสะดวกในเรื่องสถานที่ในการทำการทดลองให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา-มารดาที่คอยให้ความช่วยเหลือด้านกำลังทรัพย์และให้กำลังใจในการทำงานด้วยดีเสมอมา รวมไปถึงเพื่อนๆทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือในเรื่องต่าง ๆ และคอยให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้า

รณชัย แสงทอง

กันยายน 2552

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
สารบัญ	(ก)
สารบัญตาราง	(ข)
สารบัญภาพ	(ค)
บทคัดย่อ	
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	2
บทที่ 3 วิธีการวิจัย	
เวลาและสถานที่	15
การวางแผนการทดลอง	16
อุปกรณ์และวิธีการผสมเทียม	16
การเพาะพันธุ์	17
การดำเนินงานในวิธีการไจโนเจนซิส (Gynogenetic diploidization)	17
การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผล	18
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	
ผลการทดลอง	19
วิจารณ์ผลการทดลอง	20
สรุปผลการทดลอง	21
ข้อเสนอแนะ	21
บทที่ 5 สรุป	
บรรณานุกรม	22
ภาคผนวก	
ภาพผนวก ก วิธีการวิเคราะห์ข้อมูล	23
ภาพผนวก ข ประวัติผู้วิจัย	

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1 แผนการดำเนินงาน	15
2 อัตราการรอดของลูกปลาดุกเทศอายุ 48 ชั่วโมงที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยวิธีไฮโปเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็น อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ	19
ตารางผนวก	
2 อัตราการรอดของลูกปลาดุกเทศระยะเวลา 48 ชั่วโมง	24
3 ตาราง ANOVA แสดงอัตราการรอดตายของลูกปลาดุกเทศระยะเวลา 48 ชั่วโมง	25
4 ตาราง Sirichai Statistics เปรียบเทียบอัตราการรอดตายของลูกปลาดุกเทศระยะเวลา 48 ชั่วโมง	25

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
1	แผนผังในการทดลองอัตราการรอดของลูกปลาดุกเทศอายุ 48 ชั่วโมง ที่เหนียวนำด้วยวิธีใจโนเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็นในระยะเวลาต่างกัน	18
2	อัตราการรอดของลูกปลาดุกเทศอายุ 48 ชั่วโมงที่เกิดจากการเหนียวนำด้วย วิธีใจโนเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็น อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ	20
ภาพผนวก		
1	ภาชนะฟักไข่ปลาดุกเทศ	26
2	ตู้ฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet)	26
3	หลอดรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet)	27
4	เครื่องเขย่า รุ่น Vortex genie 2	27
5	เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	28
6	ตะกร้าฟักไข่ปลาดุกเทศที่เหนียวนำด้วยวิธีใจโนเจนซิส	28
7	สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemocytometer)	29
8	กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope) ไว้สำหรับนับน้ำเชื้อพ่อปลาตะเพียนขาว	29
9	น้ำผสมกับโซเดียมคลอไรด์ (NaCl 0.85 %)	30
10	นาฬิกาไว้สำหรับจับเวลาในการฉายรังสี และเวลาการกระตุ้นด้วยน้ำเย็น	30
11	ภาชนะสำหรับใส่น้ำเชื้อพ่อปลาตะเพียนขาว	31
12	ภาชนะสำหรับใส่ไข่ปลาดุกเทศ	31

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพผนวก	หน้า
13 เข็มฉีดยา (Syringe)	32
14 ไมโครปิเปต ขนาด 0.5 มิลลิลิตร	32
15 เพลตสำหรับใส่ไข่ปลาตุกเทศ	33
16 การฉีดฮอร์โมนตั้งเคราะห์ (Buserelinacetate) เพื่อกระตุ้นให้น้ำเชื้อสมบูรณ์	33
17 น้ำเชื้อปลาคะเพียนขาวที่รีดใส่ในเพลต	34
18 การนับจำนวนน้ำเชื้อของปลาคะเพียนขาว	34
19 ลักษณะของน้ำเชื้อปลาคะเพียนขาวที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x	35
20 แม่พันธุ์ปลาคะเพียนขาวที่นำมาฉีดไข่เพื่อใช้ในการทดลอง การเหนี่ยวนำด้วยวิธีไฮโปออสโมซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็น	35
21 ไข่ปลาคะเพียนขาวที่รักษาสภาพไว้ด้วยการแช่เย็น	36
22 ไข่ปลาคะเพียนขาวที่ใช้ในการทดลองน้ำหนัก 0.5 กรัม (326 ฟอง)	36
23 การดูน้ำเชื้อเพื่อฉายรังสีด้วยไมโครปิเปต ขนาด 5,000 ไมโครลิตร	37
24 การนำน้ำเชื้อฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเพื่อทำลายสารพันธุกรรม	37
25 การผสมไข่ปลาคะเพียนขาวกับน้ำเชื้อปลาคะเพียนขาวที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเพื่อทำลายสารพันธุกรรม	38
26 การนำไข่ปลาคะเพียนขาวที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยวิธีไฮโปออสโมซิสกระตุ้นด้วยน้ำเย็นเพื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้เป็น 2 ชุด	38
27 การให้อากาศในภาชนะฟักไข่ของลูกปลาคะเพียนขาวที่เหนี่ยวนำด้วยวิธีไฮโปออสโมซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็น	39

- 28 การใส่ยา (Methylenblue) เพื่อฆ่าเชื้อราในระหว่างการฟักไข่ปลาอุกเทศที่เหนียวด้วย
วิธีใจโนเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็น 39
- 29 ลูกปลาอุกเทศอายุ 48 ชั่วโมง ที่เกิดจากการเหนียวน้ำด้วยวิธีใจโนเจนซิสและ
กระตุ้นด้วยน้ำเย็นในชุดการทดลองที่ 3 40
- 30 ลูกปลาอุกเทศอายุ 48 ชั่วโมง ที่เกิดจากการเหนียวน้ำด้วยวิธีใจโนเจนซิสและ
กระตุ้นด้วยน้ำเย็นในชุดการทดลองที่ 4 40
- 31 ลูกปลาอุกเทศอายุ 48 ชั่วโมง ที่เกิดจากการเหนียวน้ำด้วยวิธีใจโนเจนซิสและ
กระตุ้นด้วยน้ำเย็นในชุดการทดลองที่ 5 41



บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำให้มีลักษณะเป็นเพศใดเพศหนึ่งล้วน ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้กันอย่างแพร่หลายในสัตว์น้ำหลายชนิด เช่น ปลาตะเพียนขาว ปลาหมอ ปลาดุกเทศ และปลาคาร์ฟ เป็นต้น ซึ่งมีวิธีการปรับปรุงพันธุ์หลายวิธี เช่น การใช้ฮอร์โมน การเหนี่ยวนำด้วยวิธีดิลอยด์ ซูเปอร์เมต เอ็นโดรเจนซิส และไจโนเจนซิส เพื่อทราบชนิดโครโมโซมของปลาแต่ละชนิดและยังสามารถนำมาใช้กับปลาเพศผู้ที่มีน้ำเชื้อน้อย เช่น ปลาดุกลำพัน นอกจากนี้ ยังทำให้สัตว์น้ำโตเร็ว เพราะมีปลาเพศเดียวในบ่อเดียวกัน เช่น ปลาตะเพียนขาว

วิธีการเหนี่ยวนำไจโนเจนซิสในปลาตะเพียนขาวเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถผลิตลูกพันธุ์เพศเมียล้วนและทราบชนิดของโครโมโซม ซึ่งวิธีการเหนี่ยวนำไจโนเจนซิสเป็นการกระตุ้นไข่ปลาด้วยน้ำเชื้อตัวผู้ที่ถูกทำลายขององค์ประกอบทางพันธุกรรม ตัวอ่อนจึงไม่ได้รับสารพันธุกรรมจากเชื้อปลาเพศผู้ ซึ่งไข่ปลาจะเกิดการแบ่งเซลล์การเจริญเติบโตเท่านั้น ปรากฏการณ์การนี้พบในธรรมชาติ้น้อยมาก เพราะจะทำให้ได้คัพภะที่มีโครโมโซมเพียงชุดเดียว แต่ถ้าผ่านการเหนี่ยวนำให้เพิ่มจำนวนชุดโครโมโซมก็จะได้ลูกปลาที่มีโครโมโซม 2 ชุด ตามปกติ ซึ่งพบว่าอัตราฟักจะสูงขึ้นจากเดิมมาก ปัจจัยและวิธีการที่สำคัญในการทำไจโนเจนซิส มีหลักสำคัญอยู่ 2 ประการ คือ การฉายรังสี หมายถึง การทำลายขององค์ประกอบทางพันธุกรรมโดยการฉายรังสี รังสีที่ใช้ทำลายองค์ประกอบที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิด คือ เป็นรังสีประเภท non-ionizing คือไม่ทำให้สิ่งที่มีมันผ่านเกิดการแตกตัวเป็นไอออน เนื่องจากมีพลังงานต่ำกว่าและรังสี ionizing radiation เป็นรังสีที่มีพลังงานสูง (สิรานูช, 2527) ปริมาณความเข้มของรังสีนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของรังสีที่ใช้ และการเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้เป็น 2 ชุด เท่าเดิม ต้องใช้ไข่ผสมกับน้ำเชื้อที่ทำลายสารพันธุกรรมแล้ว การเพิ่มจำนวนโครโมโซมมีอยู่ 3 วิธีด้วยกัน คือ การใช้ความดัน การใช้สารเคมี และการใช้อุณหภูมิ ซึ่งอุณหภูมินั้นแบ่งออกเป็น 2 วิธี คือ การใช้ความร้อนและความเย็น ในการเพิ่มจำนวนโครโมโซม

ดังนั้นการจัดให้ปลาดุกเทศมีโครโมโซม 2 ชุด โดยได้รับจากแม่พันธุ์เพียงฝ่ายเดียวจึงเป็นวิธีการหนึ่งที่ทำให้ทราบถึงอัตราการรอด เพื่อนำไปพัฒนาให้มีอัตราการรอดที่สูงขึ้นและทราบชนิดของโครโมโซมที่ถูกต้องและเหมาะสมต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาอัตราการรอดของลูกปลาดุกเทศที่เหนี่ยวนำด้วยวิธีไจโนเจนซิส และกระตุ้นด้วยน้ำเย็นในระยะเวลาที่ต่างกัน

บทที่ 2

ตรวจสอบเอกสาร

ปลาดุกเทศ (Africa Sharptooth Catfish) เป็นปลาน้ำจืดในอันดับปลาหนังชนิดหนึ่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Clarias gariepinus* ในวงศ์ปลาดุก (Clariidae) มีลักษณะทั่วไป คล้ายปลาดุกค้ำ (C. batrachus) ซึ่งเป็นปลาในสกุลเดียวกัน แต่มีส่วนหัวยาวกว่าและแนวระหว่างจะงอยปากถึงท้ายทอยเว้าและโค้งลาด ด้านบนของศีรษะขรุขระกว่า เมื่อมองจากด้านบนจะเห็นเป็นรูปสามเหลี่ยม ท้ายทอยแหลมเป็นโค้ง 3 โค้ง โดยส่วนกลางยื่นยาวมากที่สุด ลำตัวยาว ครีบล้างและครีบก้นยาว ลำตัวด้านบนมีสีน้ำตาลคล้ำอมเหลือง และมีลายแฉกแบบลายหินอ่อนบนลำตัว แก้มและท้องสีจาง ที่โคนครีบก้นมีแถบตามแนวตั้งสีจาง ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของปลาชนิดนี้ ครีบบมีสีเข้มกว่าลำตัวเล็กน้อย บางตัวอาจมีขอบครีบล้างสีแดงนับเป็นปลาที่ขนาดใหญ่ที่สุดในสกุล *Clarias* ขนาดเมื่อโตเต็มที่ยาวได้ถึง 1.70 เมตร เป็นปลาพื้นเมืองของทวีปแอฟริกา พบได้ในตอนเหนือและตอนตะวันออกของทวีป สำหรับในประเทศไทยได้ถูกนำเข้ามามีในปี พ.ศ. 2528 โดยเอกชนบางรายในจังหวัดหนองคายและอุบลราชธานี โดยนำเข้ามาจากประเทศลาวเพื่อเลี้ยงไว้ดูเล่น เนื่องจากมีขนาดลำตัวใหญ่กว่าปลาดุกทั่วไป ต่อมากรมประมงได้นำมาทดลองผสมข้ามพันธุ์กับปลาดุกอูย (*C. macrocephalus*) พบว่าลูกผสมระหว่างพ่อปลาดุกแอฟริกาและแม่ปลาดุกอูยมีผลการรอดสูง และมีการเจริญเติบโตเร็วที่สุด เมื่อมีรสชาติที่ดีขึ้น จึงส่งเสริมและแพร่วิธีการเพาะขยายพันธุ์และเลี้ยงคู่เกษตรกรอย่างกว้างขวาง จนปัจจุบันนี้ กลายเป็นปลาเศรษฐกิจที่ได้รับความนิยมชนิดหนึ่งของไทย และเรียกชื่อลูกปลาผสมนี้ว่า "บักอูย" (วิกิพีเดีย, 2552)

การตรวจเอกสารลักษณะทางอนุกรมวิธาน ของปลาดุกแอฟริกา

จัดตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Phylum Chordata

Class Actinopterygii

Subclass Neopterygii

Order Siluriformes

Family Clariidae

Genus *Clarias*

Species *C. gariepinus*

1. การเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์

ควรเลี้ยงในบ่อดินที่มีขนาดตั้งแต่ 100 ตารางเมตรขึ้นไป โดยปล่อยในอัตรา 20-30 ตัว/ตารางเมตร ที่ระดับความลึกของน้ำประมาณ 1.0-1.5 เมตร ควรมีการถ่ายเทน้ำบ่อย ๆ เพื่อกระตุ้นให้ปลากินอาหารได้ดี และพัฒนาระบบสืบพันธุ์ของปลาให้มีไข่และน้ำเชื้อดียิ่งขึ้นจะใช้เวลาประมาณ 3-4 เดือน

ฤดูกาลผสมพันธุ์ปลาดุก จะอยู่ในช่วงเดือนมีนาคม- ตุลาคมก่อนฤดูกาลผสมพันธุ์ ในช่วงเดือนกุมภาพันธ์ ควรเริ่มคัดปลาที่มีไข่แก่สมบูรณ์บางส่วนมาเริ่มดำเนินการผสมเทียม (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, มปป.)

2. การคัดเลือกพ่อ – แม่พันธุ์

พ่อแม่พันธุ์ปลาดุกที่นำมาใช้ควรเป็นปลาที่สมบูรณ์ ไม่บอบช้ำ และควรมีอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป การสังเกตลักษณะปลาเพศเมียที่ดีในการเพาะพันธุ์ได้ จากส่วนท้องจะอูมเป่ง ไม่นิ่มหรือแข็งจนเกินไป ดังเพศจะมีลักษณะกลมมีสีสีแดง หรือชมพูอมแดง ถ้าเอามือบีบเบาๆ ที่ท้องจะมีไข่ลักษณะเป็นเม็ดกลมสีน้ำตาลอ่อนใสไหลออกมา ส่วนปลาดุกเพศผู้จะมีดังเพศยาวเรียว มีสีชมพูเรื่อ ๆ ปลาไม่ควรมีขนาดอ้วนหรือผอมจนเกินไป ขนาดพ่อแม่พันธุ์ปลาดุก ควรมีขนาดน้ำหนักมากกว่า 200 กรัมขึ้นไป หรือปลาที่มีอายุประมาณ 7-8 เดือน หรือ 1 ปี ให้อาหารที่มีคุณภาพดี เพื่อให้มีไข่แก่ จะใช้เวลา 3-4 เดือน มีการถ่ายเทน้ำบ่อย ๆ เพื่อกระตุ้นให้ปลาถึงวัยเจริญพันธุ์เร็วขึ้น ส่วนปลาดุกเพศผู้นิยมใช้ ขนาดน้ำหนักตัวมากกว่า 500 กรัม ขึ้นไป และควรเป็นปลาที่มีอายุไม่ต่ำกว่า 1 ปี ลำตัวเพรียวยาวและไม่อ้วนจนเกินไป (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, มปป.)

3. ชนิดและวิธีการฉีดฮอร์โมน

ฮอร์โมนสังเคราะห์ (Buserelin acetatae) ได้แก่ LHRHa หรือ LRH-a มีหน่วยความเข้มข้นเป็นไมโครกรัม ซึ่งในการฉีดกับปลาดุกต้องใช้ร่วมกับสารระงับการทำงานของระบบการหลั่งฮอร์โมนคือ โดมเพอริโดน (Domperidone) หรือมีชื่อทางการค้าว่าโมทีเลียม (Motilium) ซึ่งมีหน่วยเป็น มิลลิกรัม (mg) ขนาดที่มีขายโดยทั่วไปคือ เม็ดละ 10 มิลลิกรัม

การฉีดฮอร์โมนผสมเทียมปลาดุกอยู่ โดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์สามารถฉีดเร่งให้แม่ปลาดุกอุมไข่ได้ โดยการฉีดครั้งเดียวที่ระดับความเข้มข้น 20-30 ไมโครกรัม

แม่ปลาน้ำหนัก 1 กิโลกรัม ร่วมกับการใส่โดมเพอริโดนที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/แม่ปลาน้ำหนัก 1 กิโลกรัม หลังจากฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์นี้เป็นเวลาประมาณ 16 ชั่วโมง สามารถฉีดไข่ผสมน้ำเชื้อได้ (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, มปป.)

4. ปริมาณสารละลายที่ใช้

หลังจากที่เตรียมฮอร์โมนที่จะฉีดให้กับพ่อ-แม่พันธุ์ปลาได้แล้ว การคำนวณสารละลายที่จะผสมกับฮอร์โมนเพื่อฉีดให้กับพ่อ-แม่พันธุ์ปลาเป็นเรื่องที่ควรคำนึง คือ จะต้องใช้น้ำกลั่นหรือน้ำสะอาดเติมในปริมาณที่เหมาะสม โดยการฉีดปลาคูขนาด 200-500 กรัม จะใช้ปริมาณสารละลายผสมแล้ว ประมาณ 0.3-0.7 ซีซี ส่วนปลาคูขนาด 500-2,000 กรัม ควรใช้ปริมาณสารละลายผสมประมาณ 0.4 - 1.2 ซีซี ส่วนปลาคูขนาด 2,000 กรัมขึ้นไปใช้ สารละลายประมาณ 1.0-2.5 ซีซี (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, มปป.)

5. ตำแหน่งที่ฉีดฮอร์โมน

การฉีดฮอร์โมนปลาคูนั้น ตำแหน่งที่เหมาะสมที่สุดคือ บริเวณกล้ามเนื้อใต้ครีบหลังส่วนต้นเหนือเส้นข้างตัว โดยใช้เข็มเบอร์ 22-24 แทงเข็มเฉียงทำมุมกับลำตัวประมาณ 30 องศา แทงลึกประมาณ 1 นิ้ว หรือ (2 เซนติเมตร)

ในกรณีที่ต้องฉีดสองครั้ง ควรฉีดครั้งที่สองสลับข้างกับการฉีดครั้งแรกหลังจากฉีดฮอร์โมนปลาคูแล้วขังในภาชนะที่มีระดับน้ำเพียงท่วมหลังพ่อ-แม่พันธุ์ปลาเท่านั้น เพราะถ้าใส่น้ำมากเกินไปปลาจะบอบช้ำมาก (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, มปป.)

6. การฉีดไข่ผสมน้ำเชื้อ

การฉีดไข่ของปลาคูเพศเพื่อผสมกับน้ำเชื้อนั้นใช้วิธีกึ่งเปียก เป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด นำแม่ปลาที่ได้รับการฉีดฮอร์โมนและมีไข่แก่เต็มที่แล้วมารัดไข่ใส่ในภาชนะผิวเรียบ เช่น กะละมังเคลือบ พร้อมกันนี้ผ่าเอาถุงน้ำเชื้อจากพ่อปลา นำมาวางบนผ้ามุ้งเขียว แล้วยี้ให้ละเอียดพร้อมกับเทน้ำเกลือเข้มข้นประมาณ 0.7 เปอร์เซ็นต์ หรือน้ำสะอาดลงบนผ้ามุ้งเขียวที่ยีถุงน้ำเชื้อให้น้ำไหลผ่านเพื่อให้ น้ำเชื้อลงไปผสมกับไข่ ผสมไข่กับน้ำเชื้อให้เข้ากันโดยการคนเบา ๆ ด้วยขนไก่ประมาณ 2-3 นาที จึงนำไข่ที่ได้รับการผสมแล้วไปล้างน้ำสะอาด

1 ครั้ง แล้วนำไปปัก น้ำเชื้อจากปลาตัวผู้หนึ่งตัวสามารถผสมกับไข่ที่ได้จากการรีดปลาเพศเมีย ประมาณ 10 ตัว (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, มปป.)

7. การปักไข่

ไข่ปลาอุกเทศเป็นไข่ติด ไข่ที่ดีควรมีลักษณะกลม มีน้ำตาลเข้ม ไข่ของปลาอุกเทศก็เป็นไข่ติด เช่นเดียวกับปลาอุกอุย ไข่ที่ดีควรมีลักษณะกลมและมีสีเขียวเข้ม นำไข่ปลาอุกที่ได้รับการผสมกับน้ำเชื้อแล้วไปปัก โดยโรยไข่บนผ้ามุ้งเขียวเบอร์ 20 ที่ขึงตึงที่ระดับต่ำกว่าผิวน้ำ ประมาณ 5-10 เซนติเมตร โดยระดับน้ำในบ่อที่ขึงผ้ามุ้งเขียวนั้น มีระดับน้ำลึกประมาณ 20-30 เซนติเมตร เปิดน้ำไหลผ่านตลอดเวลาและควรมีเครื่องเพิ่มอากาศใส่ไว้ในบ่อปักไข่ปลาด้วย ไข่ปลาอุกที่ได้รับการผสมจะพัฒนาและฟักเป็นตัวโดยใช้เวลาประมาณ 21-26 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิของน้ำ 28-30 องศาเซลเซียส ลูกปลาอุกที่ฟักออกเป็นตัว จะหลุดลอกจากของมุ้งเขียวลงสู่พื้นก้นบ่อด้านล่าง หลังจากลูกปลาหลุดลอกจากของมุ้งเขียวแล้วจึงย้ายผ้ามุ้งเขียวที่ใช้ปักไข่ออกจากบ่อฟักจะใช้เวลา 6-8 ชั่วโมง ลูกปลาจะค่อย ๆ พัฒนาเจริญขึ้นเป็นลำดับจนมีอายุประมาณ 48 ชั่วโมง จึงเริ่มกินอาหาร บ่อเพาะฟักลูกปลาอุกควรมีหลังคาปกคลุม ป้องกันแสงแดดและน้ำฝนได้แม้ปลาขนาดประมาณ 1 กิโลกรัม จะได้ลูกปลาประมาณ 5,000 -20,000 ตัว ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับฤดูกาลและขนาดแม่ปลาและในการการดำเนินงานในวิธี การเหนี่ยวนำไข่โนเจนซิส ไข่จำเป็นต้องผสมกับน้ำเชื้อตัวผู้ก่อนจึงจะเจริญเป็นคัพพะได้ (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, มปป.)

ลักษณะทางอนุกรมวิธาน ของปลาตะเพียน

จัดตามหลักอนุกรมวิธานได้ดังนี้

Kingdom Animalia

Division Chordata

Class Actinopterygii

Order Cypriniformes

Family Cyprinidae

Genus Barbonymus

Species *B. gonionotus*

ปลาดุกเพียน

ตะเพียนเป็นชื่อปลาน้ำจืดชนิดหนึ่ง มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Barbonymus gonionotus* (เดิม *Puntius* หรือ *Barbodes gonionotus*) อยู่ในวงศ์ปลาดุกเพียน (Cyprinidae) วงศ์ย่อย Cyprininae - Poropuntini มีรูปร่างเหมือนปลาในตระกูลปลาดุกเพียนทั่วไป ตัวมีสีเงินแวววาว ด้านหลังมีสีคล้ำเล็กน้อย ด้านท้องสีจาง ครีบอื่นๆ มีสีเหลืองอ่อน

ปลาดุกเพียนชนิดนี้นับเป็นปลาน้ำจืดที่คนไทยรู้จักดี และอยู่ในวิถีชีวิตความเป็นอยู่มาแต่โบราณ เช่น ปลาดุกเพียนโบราณ มีการเลี้ยงปลาดุกชนิดนี้ในประเทศมานานกว่า 30 ปี และถูกนำพันธุ์ไปเลี้ยงยังต่างประเทศ เช่น มาเลเซีย บอร์เนียว อินโดนีเซีย แม้ว่าในประเทศเหล่านี้จะมีปลาดุกชนิดนี้อยู่ในธรรมชาติแล้วก็ตาม ขนาดโดยเฉลี่ย 36 เซนติเมตร

พบชุกชุมในทุกแหล่งน้ำทุกภาคของไทย ยกเว้นแม่น้ำสาละวิน เป็นปลากินพืช แมลง สัตว์หน้าดิน บริโภคโดยการปรงสด โดยเฉพาะตะเพียนต้มเค็ม หรือปลาต้ม นับว่าเป็นตำรับที่มีชื่อมากของปลาดุกชนิดนี้ แต่เป็นปลาที่มีก้างมาก นอกจากนี้ยังนิยมเลี้ยงเป็นปลาสวยงามอีกด้วย โดยเฉพาะเลี้ยงเพื่อใช้ประโยชน์เก็บกินเศษอาหารที่ปลาใหญ่กินเหลือหรือเก็บตะไคร่น้ำและปรสิตรในตู้

ปลาดุกเพียนชนิดนี้มีชื่อเรียกอื่นอีกเช่น " ตะเพียนขาว " หรือ " ตะเพียนเงิน " ภาคอีสานเรียกว่า " ปาก " (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, 2541)

1. ความเป็นอยู่

ปลาดุกเพียนขาวเป็นปลาที่หลบซ่อนอยู่ตามแม่น้ำ ลำคลอง หนอง บึง ที่มีกระแสน้ำไหลอ่อนๆ หรือน้ำนิ่ง เป็นปลาที่ทนต่อสิ่งเปลี่ยนแปลงและ สามารถปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี ทั้งยังเจริญเติบโตในน้ำกร่อยที่มี ความเค็มไม่เกิน 7 ส่วนในพัน อุณหภูมิเหมาะสมสำหรับปลาดุกชนิดนี้อยู่ระหว่าง 25 - 33 องศาเซลเซียส (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, 2541)

2. นิัยการกินอาหาร

2.1 ระบบการกินอาหาร การตรวจสอบระบบการกินอาหารของ ปลาดุกเพียนขาว ขนาด 12.5 - 25.5 เซนติเมตร พบว่า มีฟันในลำคอ (Pharyngeal teeth) เป็นชนิดกัดบดแบบสามแถว มีชื่อ

เหงือกสั้นๆ อยู่ห่างกัน พอประมาณ ท่อทางเดินอาหาร กระเพาะอาหาร ไม่มีลักษณะแตกต่างจาก ลำไส้ ลำไส้มีผนังบางๆ ยาวขดเป็นม้วนยาว 2.02 - 2.73 เท่า ความยาวสุดของลำตัว

2.2 นิสัยการกินอาหาร กล่าวกันว่าลูกปลาตะเพียนขาววัยอ่อน กินสาหร่ายเซลล์เดียวและ แพลงก์ตอนขนาดเล็ก ส่วนพวกปลาขนาด 3 - 5 นิ้ว กินพวกพืชน้ำ เช่น แหนเป็ด สาหร่ายพวงชะโด ผักบุ้ง สำหรับปลาขนาด ใหญ่สามารถกินใบพืชบก เช่น ใบมันเทศ ใบมันสำปะหลัง หญ้าขนาดเล็ก พบว่าปลาตะเพียนขาวหาอาหารกินในเวลากลางวันมากกว่ากลางคืน (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, 2541)

3. การแยกเพศ

ลักษณะภายนอกของปลาตัวผู้คล้ายคลึงกันมากแต่เมื่อใกล้ผสมพันธุ์ จะสังเกตเห็นได้ง่ายขึ้นคือ ตัวเมียจะมีท้องอูมเป่งพื้นที่ท้องนูนและรู้กันกว้างกว่าปกติ ส่วนตัวผู้ท้องจะแบนพื้นที่ท้องแข็ง ถ้าเอามือลองรีดเบาๆ ที่ท้องจะมีน้ำสีขาวขุ่น คล้ายน้ำมันไหลออกมา หากเอามือลูบตามแก้มจะรู้สึกสากมือ (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, 2541)

4. ชนิดและวิธีการฉีดฮอร์โมน

ฮอร์โมนสังเคราะห์ (Synthetic hormone) ได้แก่ LHRHa หรือ LRH-a มีหน่วยความเข้มข้นเป็นไมโครกรัม (ug) ซึ่งในการฉีดกับปลาคูต้องใช้ร่วมกับสารระงับการทำงานของระบบการหลั่งฮอร์โมนคือ โดมเพอริโดน (Domperidone) หรือมีชื่อทางการค้าว่าโมทีเลียม (Motilium) ซึ่งมีหน่วยเป็น มิลลิกรัม (mg) ขนาดที่มีขายโดยทั่วไปคือ เม็ดละ 10 มิลลิกรัม

การฉีดฮอร์โมนผสมเทียมปลาตะเพียน โดยใช้ฮอร์โมนสังเคราะห์สามารถฉีดเร่งให้แม่ปลาตะเพียนมีไข่สุกได้ โดยการฉีดครั้งเดียวที่ระดับความเข้มข้น 15-20 ไมโครกรัมต่อแม่ปลาน้ำหนัก 1 กิโลกรัม. ร่วมกับการใส่โดมเพอริโดนที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม ต่อ แม่ปลาน้ำหนัก 1 กิโลกรัม หลังจากฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์นี้เป็นเวลาประมาณ 8 ชั่วโมง สามารถรีดไข่ผสมน้ำเชื้อได้ (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, 2541)

5. การผสมพันธุ์

การผสมพันธุ์ทำได้ 2 วิธี คือ

5.1 ปลอຍให้พ่อแม่ปลาผสมพันธุ์กันเอง หากเลือกวิธีการนี้เมื่อน้ำจืดหรือเกลือเสร็จ ก็จะปลอຍพ่อแม่ปลาลง ในบ่อเพาะรวมกัน โดยใช้อัตราส่วนแม่ปลา 1 ตัว/ปลาเพศผู้ 2 ตัว บ่อเพาะ ควรมีพื้นที่ไม่ต่ำกว่า 3 ตารางเมตร ลึกประมาณ 1 เมตร บ่อขนาดดังกล่าว จะปลอຍแม่ปลาได้ประมาณ 3 ตัว เพื่อความสะดวกในการแยกพ่อแม่ปลา ควรใช้อวนช้อนตาห่าง ๒ นิ้วในบ่อไว้ชั้นหนึ่งก่อน แล้วจึงปลอຍพ่อแม่ปลาลงไป แม่ปลาจะวางไข่หลังการฉีดประมาณ 4 - 7 ชั่วโมง โดยจะไล่รัดกันจนน้ำแตกกระจาย เมื่อสังเกตว่าแม่ปลาวางไข่หมดแล้ว ก็ยกอวนที่ปูไว้รอบพ่อแม่ปลา จะติดมาโดยไข่ปลาลอดตาอวนลงไปรวมกันในบ่อ จากนั้นก็รวบรวมไข่ปลา ไปฟักในกรวยฟัก การผสมพันธุ์วิธีนี้มีข้อดีในเรื่องคุณภาพของไข่ที่ได้มักจะ เป็นไข่ที่สุกพอดี นอกจากนั้นผู้เพาะยังไม่ต้องเสียเวลารอคอย แต่ในบางครั้ง ปลาตัวผู้อาจไม่ฉีคน้ำเชื้อเข้าผสมทำให้ไข่ที่ได้ไม่ฟักเป็นตัว นอกจากนั้น ไข่ที่รวบรวมได้มักจะไม่วางไข่

5.2 วิธีการผสมเทียม หลังจากฉีดประมาณ 4 - 5 ชั่วโมง จะสามารถฉีดไข่ปลาได้โดยปลาจะมีอาการกระวนกระวายว่ายน้ำไปมารุนแรงผิดปกติ บางตัวอาจจะขึ้นมาสูบ อากาศบริเวณผิวน้ำ เมื่อพบว่าปลามีอาการดังกล่าวควรตรวจสอบความพร้อม ของแม่ปลา โดยจับปลาหงายท้องขึ้นโดยตัวปลายังอยู่ในน้ำและบีบบริเวณใกล้ ช่องเพศเบา ๆ หากพบว่าไข่พุ่งออกมาอย่างง่ายดายก็นำแม่ปลา มารีดไข่ได้ การผสมเทียมใช้วิธีแห้งแบบคัดแปลงโดยใช้ผ้าซับตัวปลาให้แห้ง แล้วรีดไข่ลงในภาชนะที่แห้งสนิท จากนั้นนำปลาตัวผู้มารีดน้ำเชื้อลงผสม ในอัตราส่วนของ ปลาตัวผู้ 1- 2 ตัว ต่อไข่ปลาจากแม่ไข่ 1 ตัวใช้ขนไก่คนไข่กับน้ำเชื้อจนเข้ากันดี แล้วจึงเติมน้ำสะอาดเล็กน้อยพอท่วมไข่ การคนเล็กน้อยในขั้นตอนนี้เองเชื้อตัวผู้ ก็จะเข้าผสมกับไข่จากนั้นจึงเติมน้ำจนเต็มภาชนะถ่ายน้ำเป็นระยะๆ เพื่อล้างไข่ ให้สะอาด ไข่จะค่อย ๆ ฟองน้ำ และขยายขนาดขึ้นจนฟองเต็มทีภายในเวลาประมาณ 20 นาที ระหว่างช่วงเวลาดังกล่าวต้องคอยถ่ายน้ำอยู่เสมอ เพื่อป้องกันไม่ให้ไข่บางส่วนเสีย เมื่อไข่ฟองเต็มที่แล้วก็สามารถนำไปฟักในกรวยฟักได้ (กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง, 2541)

การควบคุมเพศโดยมีโครโมโซมเพศ

โครโมโซมเพศ แบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ คือโครโมโซมเพศมีลักษณะไม่แตกต่างกับโครโมโซมร่างกาย และไม่มีความแตกต่างระหว่างโครโมโซมที่กำหนดเพศผู้และเพศเมีย ในปลา

เหล่านี้ สัดส่วนเพศในรุ่นลูกค่อนข้างแน่นอน แต่สัดส่วนเพศอาจเปลี่ยนแปลงไปบ้างเนื่องจากอิทธิพลของ Modifying genes ซึ่งมีตำแหน่งอยู่บนโครโมโซมร่างกาย

ถ้าในกรณีที่มีการควบคุมเพศแบบ Female homogametic มักจะกำหนดสัญลักษณ์ X แทนโครโมโซมเพศเมีย และ Y แทนโครโมโซมเพศผู้ ตัวอย่างปลาเช่น ปลาคะเพียน (นวลมณีและคณะ, 2534) ปลาคูกอุย ปลาฉา

ถ้าในกรณีที่มีการควบคุมเพศแบบ Male homogametic มักจะกำหนดสัญลักษณ์ Z แทนโครโมโซมเพศผู้ และ W แทนโครโมโซมเพศเมีย ตัวอย่างปลาที่มีการควบคุมแบบ female homogametic ได้แก่ ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ปลาหมอเทศ (*O. mossambicus*)

ระบบการควบคุมเพศในปลาเหล่านี้ไม่อาจตรวจสอบได้โดย Karyotype แต่ตรวจสอบได้โดยเทคนิคการเปลี่ยนเพศ โดยนำปลาเพศเมียปกติ (XX or ZW) มาผสมกับเพศผู้ที่เกิดจากการเปลี่ยนเพศ (XX or ZW) แล้วตรวจสอบอัตราส่วนเพศในรุ่นลูก

เช่น เพศผู้ XX (เปลี่ยนเพศ) x เพศเมีย XX ได้ลูก 100 เปอร์เซ็นต์ เพศเมีย

เพศผู้ ZW (เปลี่ยนเพศ) x เพศเมีย ZW ได้ลูก เพศผู้ ZZ 25 เปอร์เซ็นต์ เพศเมีย ZW 50 เปอร์เซ็นต์

เพศ ? WW 25 เปอร์เซ็นต์ (อาจเป็นเพศผู้) ซึ่งถ้าได้ลูกเพศเมียทั้งหมด ก็แสดงว่าเป็นระบบ XY ถ้าได้ลูกที่มีทั้งเพศผู้และเพศเมีย แสดงว่าเป็นระบบ ZW (อุทัยรัตน์, 2543)

การปรับปรุงพันธุ์โดยการจัดการชุดโครโมโซม โยโนเจนซิสและการเหนี่ยวนำในสัตว์น้ำ

โยโนเจนซิสเป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศแบบหนึ่ง ซึ่งพบน้อยมากในธรรมชาติ การสืบพันธุ์แบบนี้อาจอาศัยการผสมพันธุ์ตามปกติแต่เมื่อนิวเคลียสของเชื้อตัวผู้จะถูกกำจัดไปหลังจากผสมกับไข่ได้ไม่นาน ดังนั้นจะเห็นว่าการเกิดโยโนเจนซิสในธรรมชาติจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม 2 ประการ คือ การที่สารพันธุกรรมของน้ำเชื้อตัวผู้เสียคุณสมบัติไป (inactivation) และการที่ไข่ของปลาชนิดนั้นๆ เพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2 ชุด (อุทัยรัตน์, 2543)

นักวิทยาศาสตร์ยังไม่สามารถอธิบายได้ว่า เหตุใดไข่จึงจำเป็นต้องผสมกับน้ำเชื้อตัวผู้ก่อนจึงจะเจริญเป็นคัพภะได้ อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อตัวผู้จะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาหรือเชื้อตัวผู้อาจให้เซ็นโตรโซม (Centrosome) ที่จำเป็นในการแบ่งเซลล์ (Kirpichnikov, 1981)

การสืบพันธุ์แบบนี้สังเกตได้จากการที่ปลาชนิดนี้ๆ มีแต่ปลาเพศเมีย ในธรรมชาติพบการสืบพันธุ์แบบโจโนเจนซิสในประชากรของปลาครุฑเขินคาร์ฟ ซึ่งเป็นปลาด้นตระกูลของปลาทองและปลาชนิดอื่นๆ ในสกุล *Poecilia* และ *Poeciliopsis* (ครอบครัว *Poecillidae*) (อุทัยรัตน์, 2543)

จากการศึกษาในปลา *Poecilia Formosa* ซึ่งอาศัยอยู่ในแม่น้ำบริเวณอำเภอเม็กซิโก Hubbs และ Hubbs (1932) รายงานว่าปลาชนิดนี้เป็นปลาเพศเมียล้วน มันจะสืบพันธุ์แบบโจโนเจนซิสโดยอาศัยเชื้อตัวผู้ในปลาเพศผู้จากประชากรของ *P.latinpinna* และ *P.mexicana* ซึ่งเป็นชนิดที่มี 2 เพศ และอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำใกล้เคียงกัน (อุทัยรัตน์, 2543)

หลักการเหนี่ยวนำโจโนเจนซิส

โจโนเจนซิสสามารถเหนี่ยวนำได้จากห้องปฏิบัติการ การเหนี่ยวนำครั้งแรกโดย ซึ่งได้ทดลองในกบ หลังจากการเหนี่ยวนำคือการผสมไข่น้ำเชื้อตัวผู้ถูกทำลายสารพันธุกรรมแล้วเชื้อตัวผู้กระตุ้นให้ไข่เกิดการแบ่งเซลล์ไมโอซิสระยะที่ 2 ต่อไป เมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์ไข่ก็จะกำจัดโพลาร์ บอดีชดที่ 2 และเหลือโครโมโซมเพียง 1 ชุด ไข่สามารถเจริญต่อไปได้แต่จะเจริญถึงระยะใดก็ได้แล้วแต่ชนิดของปลา บางชนิดก็พอจะมีโครโมโซม 1 ชุดหรือที่เรียกว่าแฮพลอยด์เหล่านี้จะตายก่อนฟัก เช่น ปลาตุ๊กต๋อ ปลาตะเพียน และปลากลุ่ม ซัลโมนิเดส แฮพลอยด์ฟักออกเป็นตัวแต่มีลักษณะพิการคล้ายๆกับ คือ ตัวหนาสั้น มีช่องว่างขนาดใหญ่ระหว่างถุงไข่กับด้านหน้าของลำตัว (อุทัยรัตน์, 2543)

กล่าวโดยสรุปว่าการเหนี่ยวนำโจโนเจนซิส ให้ได้ปลาที่มีโครโมโซม 2 ชุด มีวิธีสำคัญอยู่ 2 ขั้นตอน คือ การทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้ และการเหนี่ยวนำให้ไข่โคตที่ได้โครโมโซม 2 ชุด (อุทัยรัตน์, 2543)

การทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้

การทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้ต้องทำโดยไม่ให้เชื้อตัวผู้ตาย วิธีการที่พบว่าใช้ได้ผลดีก็คือ การฉายรังสี รังสีจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหลายลักษณะ โดยการทำให้เกิดการจับกันของเบสไพริมิดีนที่อยู่ติดกันบนสาย DNA ทำให้ DNA สูญเสียคุณสมบัติ (Ijiri, 1983) นอกจากนั้นยังทำให้โครมาติดซึ่งตามปกติจะจับตัวกันแน่นคลายตัวหลวมขึ้น ผนังนิวเคลียส และเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของเชื้อตัวผู้ถูกทำลายการทำลายที่ผนังเซลล์นิวเคลียสถูกทำลายนี้ จะทำให้นิวเคลียสของเชื้อตัวผู้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ภายในไซโตพลาสซึมของไข่ (อุทัยรัตน์, 2543)

รังสีที่นิยมใช้ในการทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้ คือ รังสีแกมมา (r-ray) และรังสีเอ็กซ์ (X-ray) ซึ่งเป็นรังสีที่มีการแตกตัว (ionizing radiation) และรังสีอัลตราไวโอเลต (ultraviolet ray) ซึ่งเป็นรังสีที่ไม่มีการแตกตัว (un-ionizing radiation) จึงมีความสามารถในการทะลุทะลวงน้อยกว่า (อุทัยรัตน์, 2543)

ความเข้มข้นของรังสีที่เหมาะสมแตกต่างกันไปตามชนิดของน้ำเชื้อ และความเข้มข้นของน้ำเชื้อความเข้มข้นของรังสีที่ต่ำเกินไปจะไม่สามารถทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้ได้ เมื่อนำมาผสมกับไข่แล้ว จะได้คัพภะที่เกิดจากการปฏิสนธิตามปกติ หากความเข้มข้นของรังสีมากเกินไปก็อาจทำให้เชื้อตัวผู้ตาย ในการศึกษาต้องจึงจำเป็นต้องหาปริมาณรังสีความเข้มข้นจากต่ำไปหาสูง แล้วนำน้ำเชื้อดังกล่าวไปผสมกับไข่ จากนั้นให้ไข่ฟักโดยไม่ผ่านการช็อคความเข้มข้นของสปีชีส์ที่ดีที่สุด คือ ความเข้มข้นที่ให้ลูกปลาที่มีโครโมโซมหนึ่งชุดทั้งหมดและมีอัตราการฟักสูงที่สุด จากการทดลองดังกล่าวเมื่อนำความเข้มข้นของสปีชีส์มาพล็อตกราฟกับอัตราการฟักมักจะได้รับความสัมพันธ์ที่เรียกว่า เซอร์ตวิก เอฟเฟกต์ (อุทัยรัตน์, 2543)

อย่างไรก็ตามในการทดลองดังกล่าวอาจมีลูกปลาผิดปกติ โยโนเจเนซิส เกิดขึ้นได้ แม้จะไม่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมทั้งนี้เนื่องจากไข่ปลาบางชนิดมีแนวโน้มที่จะเก็บโพลาไรบอดีชุดที่ 2 ไว้ทำให้เกิดไข่ซึ่งมีโครโมโซม 2 ชุด ปรากฏการณ์ดังพบในปลาหลายชนิด เช่น ปลาคูกอุย (Na-Nakorn และคณะ, 1993a) ดังนั้นผู้ทดลองจึงควรใช้วิธีการศึกษาลากพันธุกรรมเพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลอง (อุทัยรัตน์, 2543)

การใช้ปลาดังกล่าว มีได้ 2 ลักษณะ คือ

1. ใช้ไข่จากแม่ปลาซึ่งมียีนโทไฟเป็นโฮโมไซกัสของยีนแฝงควบคุมลักษณะใดๆ ซึ่งแสดงลักษณะปรากฏที่สังเกตเห็นได้ชัดเจน เช่น ลักษณะเผือก (aa) ในปลาคูกอุย (อุทัยรัตน์, 2531) ปลาซันแนลแคทฟิช (Boondari, 1984a) และปลาเรนโบว์เทราท์ (Onozato, 1984) หรือใช้ลักษณะเกล็ดแบบมิร์เรอร์ (mirror, ss) ในปลาไน (Komen และคณะ, 1988) เมื่อใช้เชื้อตัวผู้จากปลาที่มียีนโทไฟเป็นเฮเทอโรไซกัสหรือโฮโมไซกัสของยีนเด่นมาฉายรังสี และผสมกับไข่จากแม่ปลาดังกล่าว หากมีลูกปลาแสดงลักษณะเด่นเกิดขึ้น แสดงว่ารังสียังไม่สามารถทำลายสารพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้ได้หมด (อุทัยรัตน์, 2543)

2. ใช้ไข่จากปลาต่างชนิด เมื่อจะตัดสินใจใช้น้ำเชื้อจากปลาชนิดใด ควรแน่ใจว่าเชื้อตัวผู้ของปลาชนิดนั้น ๆ จะสามารถเข้าผสมกับไข่ได้ นอกจากนั้นลูกผสมที่อาจเกิดขึ้นควรจะตายก่อนฟักออกเป็นตัวหากเป็นตัวก็ควรมีลักษณะที่แตกต่างจากลูกปลาโฮโมเจเนซิสอย่างชัดเจน นอกจากนั้น น้ำเชื้อของปลาต่างชนิดมีประสิทธิภาพในการกระตุ้นพัฒนาของไข่ปลาชนิดนั้น ๆ ไม่เท่ากันจึงต้องทดลองหาน้ำเชื้อชนิดที่เหมาะสมก่อน (อุทัยรัตน์, 2543)

น้ำเชื้อดังกล่าวแม้ไม่ฉายรังสีก็อาจกระตุ้นใจโนเจนซิสได้ หากนำน้ำเชื้อไปฉายรังสีก่อนนำมาผสมกับไข่ อัตราการเกิดใจโนเจนซิสก็จะเพิ่มขึ้นหลายเท่าตัว ตัวอย่างเช่น ในการผสมข้ามโดยใช้น้ำเชื้อปลาสวายผสมกับไข่ปลาคุยกุย จะให้ลูกใจโนเจนซิส 2.03 เปอร์เซ็นต์ (Na-Nakorn และคณะ, 1993a) หากฉายรังสีน้ำเชื้อจะทำอัตราการเกิดใจโนเจนซิสเพิ่มขึ้นเป็น 24.8-48.7% (Na-Nakorn และคณะ, 1993a) นอกจากตัวอย่างในปลาคุยกุยแล้ว การใช้น้ำเชื้อจากปลาต่างชนิดกันเพื่อเหนี่ยวนำใจโนเจนซิสยังมีรายงานในปลาแคทลา (ใช้น้ำเชื้อปลาอีสกเทศ) (John และคณะ, 1984) ปลาไซพรีนிடโลซ (ใช้น้ำเชื้อปลาไน) (อุทัยรัตน์, 2543)

Suzuki และคณะ, 1985 ได้เปรียบเทียบการเหนี่ยวนำใจโนเจนซิสในปลาไซพรีนிட โลซ โดยใช้น้ำเชื้อจากปลาชนิดเดียวกันและน้ำเชื้อปลาไน โดยให้น้ำเชื้อผ่านการฉายรังสีอุลตราไวโอเลต พบว่าน้ำเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำใจโนเจนซิสไม่แตกต่างกัน (อุทัยรัตน์, 2543)

ชนิดและความเข้มของรังสีที่ใช้ทำลายสารพันธุกรรม

รังสีที่ใช้ทำลายองค์ประกอบทางพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้ ที่นิยมใช้มีอยู่ 2 ชนิด คือ ionizing radiation เป็นรังสีที่มีพลังงานสูง ได้แก่ รังสีแกมมา และรังสีเอ็กซ์ ส่วนรังสีอุลตราไวโอเลตเป็นรังสีประเภท non-ionizing คือ ไม่ทำให้สิ่งที่มีมันผ่านเกิดการแตกตัวเป็นไอออนเนื่องจากมีพลังงานต่ำกว่า (สิรินุช, 2527)

ปริมาณความเข้มข้นของรังสีนั้น ขึ้นอยู่กับชนิดของรังสีที่ใช้ และชนิดของปลา Hertwig (1911) ได้เหนี่ยวนำใจโนเจนซิสในกบ โดยใช้รังสีแกมมาในปริมาณที่มากเกินไป (ประมาณ 100 Krad) พบว่าจะเป็นการกำจัดองค์ประกอบทางพันธุกรรมของเชื้อตัวผู้ได้อย่างสิ้นเชิง และจากการทดลองในปลาหลายชนิดพบว่า ถ้าใช้รังสีแกมมาประมาณ 100 Krad จะได้ผลดี (Purdom, 1969 ; Nagy และคณะ, 1978 ; Chourrout, 1980) การใช้รังสีเอกซ์นั้น ได้มีการทดลองใช้ในปริมาณเกินพอ (ประมาณ 100,000 roentgen) ในปลาหลายชนิดซึ่งปรากฏว่าได้ผลดี (Cherfas, 1975) ส่วนการใช้รังสีอุลตราไวโอเลตนั้น พบว่ามีการใช้ในปริมาณที่แตกต่างกันไปตามชนิดของปลาที่ใช้ในการทดลอง และความเจือจางของน้ำเชื้อ เช่นในกลุ่มปลา salmonid ใช้ 15 W ห่าง 6 เซนติเมตร เวลา 4-8 นาที (Chourrout, 1982) ในกลุ่มปลา Indianmajor carps คือปลา rohu (*Labeo rohita*) และปลา catla (*Catla catla*) ใช้ 15 W. ห่าง 20 เซนติเมตร นาน 17 นาที (John และคณะ, 1984) ในปลาไน (*Cyprinus carpio* L.) ใช้ 15 W. ห่าง 2.5 เซนติเมตร นาน 60 นาที (Komen และคณะ, 1988) จากการทดลองเหล่านี้ นอกจาก

ชนิดปลา และความเข้มข้นของรังสีจะมีผลต่อการทำลายสารพันธุกรรมในน้ำเชื้อแล้ว ความเข้มข้นของน้ำเชื้อที่นำไปฉายรังสี ก็มีผลเช่นกัน การฉายรังสีความเข้มใดๆแก่การนำเชื้อที่เข้มข้นจะใช้เวลานานกว่าการฉายรังสีน้ำเชื้อที่เจือจางกว่า (ชาติชาย, 2535)

การเตรียมน้ำเชื้อเพื่อฉายรังสี

ก่อนการฉายรังสีจะต้องเจือจางน้ำเชื้อในสารละลายที่สามารถยืดอายุน้ำเชื้อได้ เช่น กลีเซอรอล 0.85 เปอร์เซ็นต์ สารละลายริงเกอร์ส สารละลายแอสคัส ฯลฯ (อุทัยรัตน์, 2543)

ในการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต สัดส่วนของน้ำเชื้อต่อสารละลายมีความสำคัญมาก เนื่องจากรังสีชนิดนี้มีอำนาจทะลุทะลวงต่ำ ดังนั้นเมื่อนำน้ำเชื้อเข้มข้นก็จำเป็นต้องฉายรังสีปริมาณมากกว่าน้ำเชื้อที่เจือจาง ดังนั้นหากได้หลอด UV กำลังเท่ากัน ระยะห่างกันจากหลอดน้ำเชื้อเท่ากัน ระยะเวลาในการฉายรังสีก็ต้องแตกต่างกัน จากการทดลองของ Komen และคณะ (1988) พบว่าเมื่อเจือจางน้ำเชื้อปลาไนในอัตราส่วน 1:9 และ 1:3 (น้ำเชื้อ: 0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl) และฉายรังสีอัลตราไวโอเลตความเข้มข้น 2,000 จูลต่อนาที่ ($\text{Jm}^{-2}\text{min}^{-1}$) พบว่า การทำลายสารพันธุกรรมจะเกิดขึ้นได้สมบูรณ์เมื่อฉายรังสีนาน 5-40 นาทีในน้ำเชื้อชุดที่เจือจางกว่า (1:9) ส่วนน้ำเชื้อที่เข้มข้นกว่า (1:3) ต้องฉายรังสีนานถึง 60 นาที (อุทัยรัตน์, 2543)

สารละลายน้ำเชื้อดังกล่าวจะต้องรินเป็นชั้นบางๆ (ไม่ควรเกิน 0.2 มิลลิกรัมต่อลิตร) ขณะฉายรังสีควรวางภาชนะบรรจุน้ำเชื้อไว้บนเครื่องเขย่า เพื่อให้รังสีผ่านได้ทั่วถึง นอกจากนั้นต้องควบคุมอุณหภูมิขณะฉายรังสีให้ต่ำตลอดเวลา ซึ่งอาจทำได้โดยวางภาชนะบรรจุน้ำแข็งไว้ในตู้ฉายรังสี หรือวางน้ำเชื้อไว้บนน้ำแข็งทุบละเอียดขณะฉายรังสี (อุทัยรัตน์, 2543)

การเหนี่ยวนำให้โครโมโซมเพิ่มจำนวนเป็น 2 ชุด (diploidization)

เมื่อมีคัพภะที่เกิดจากไข่ผสมกับน้ำเชื้อฉายรังสีเจริญเป็นตัวโดยไม่เกิดการปฏิสนธิ ลูกที่ได้จะมีโครโมโซมเพียง 1 ชุด ลูกปลาจะตายก่อนหมดก่อนเริ่มจะกินอาหาร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องเหนี่ยวนำให้โครโมโซมของปลาเพิ่มเป็น 2 ชุด วิธีการทำอาศัยหลักการและวิธีการเช่นเดียวกันเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ เพียงแต่นำน้ำเชื้อที่นำมาผสมต้องเป็นน้ำเชื้อที่ผ่านการฉายรังสี การเหนี่ยวนำทำได้ 2 ระยะเช่นเดียวกัน คือ การเก็บโพลาร์บอดีชุดที่ 2 และการยับยั้งการแบ่งเซลล์ครั้งแรกของไซโกต (อุทัยรัตน์, 2543)

การเหนี่ยวนำวิธีแรกเป็นการยับยั้งในขั้นตอนของการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสระยะที่ 2 ซึ่งโครโมโซมดั้งเดิมและส่วนที่จำลองขึ้นมาใหม่ได้ผ่านการแลกเปลี่ยนท่อนส่วนของโครโมโซมมาแล้ว โครโมโซมซึ่งมีเซนโตรเมียร์ร่วมกันนี้แท่งหนึ่งจะมียืนเหมือนโครโมโซมดั้งเดิม อีกแท่งหนึ่งจะเป็นโครโมโซมสายผสม เมื่อผ่านการซ็อก ลูกปลาที่ได้จึงจะเป็นเฮเทอโรไซกัสที่ยีนบางตำแหน่ง ทั้งนี้เปอร์เซ็นต์เฮเทอโรไซกัส จะขึ้นอยู่กับระยะห่างระหว่างยีนและเซนโตรเมียร์ การเหนี่ยวนำลักษณะนี้ทำได้ง่าย การทดลองที่ทำมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ เป็นการเหนี่ยวนำลักษณะนี้ทั้งสิ้น โดยอาจเรียกไจโนเจเนซิส ลักษณะนี้ว่า ไมโอติกไจโนเจเนซิส (meiotic gynogenesis) (อุทัยรัตน์, 2543)

การเหนี่ยวนำอุณหภูมิ

สามารถเหนี่ยวนำได้ทั้งความเย็นและความร้อน ถึงแม้ว่าทั้ง 2 วิธี จะได้ผลทั้งปลาเขตหนาวและเขตอบอุ่น แต่พบว่าปลาในเขตหนาว การเหนี่ยวนำด้วยความร้อนจะให้ผลดีกว่าความเย็น (Thssen และคณะ, 1990) Valenti (1975) อ้างถึง Romashov และ Belyaeva (1965) ซึ่งกล่าวว่า การเหนี่ยวนำด้วยความเย็นและความร้อน มีกลไกต่างกัน กล่าวคือ การเหนี่ยวนำด้วยความเย็นจะมีผลในการยับยั้ง anaphase II ขณะที่การเหนี่ยวนำด้วยความร้อนจะทำลาย spindle fiber (สายใจ, 2539)

ปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการเหนี่ยวนำการเพิ่มชุดโครโมโซมด้วยอุณหภูมิ คืออุณหภูมิที่ใช้ในการซ็อกไข่ปลา ระยะเวลาในการเริ่มซ็อกหลังผสมไข่น้ำเชื้อเพศผู้ และช่วงเวลาของการซ็อก (Thssen และคณะ, 1990) ในการเหนี่ยวนำด้วยความร้อนจะใช้ช่วงเวลาของการซ็อก ๆ แต่การเหนี่ยวนำด้วยความเย็นจะใช้ระยะเวลานานขึ้น (Don และ Avtalion, 1988) เช่น การเหนี่ยวนำในปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ใช้อุณหภูมิ 41 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที (Bidwell และคณะ, 1985) แต่เมื่อทำการเหนี่ยวนำด้วยความเย็น 5 องศาเซลเซียส ต้องใช้เวลานานถึง 1 ชั่วโมง (Wolters และคณะ, 1981) ในปลาคูยกัย ใช้ในอุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 40 นาที ระยะเวลาเริ่มซ็อก 3 นาที (Henken และคณะ, 1987) ส่วนในปลาคูก้าน (*Clarias batrachus*) ใช้อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง ระยะเวลาในการเริ่มซ็อก 5 นาที (Manickam, 1991) วิเชียน (2533) รายงานการใช้ อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที ในการเหนี่ยวนำให้เกิดไจโนเจเนซิสในปลากุยได้สำเร็จ แต่มีอัตราการรอดตายและอัตราการเกิดคิพลอยด์ไจโนเจเนซิสต่ำ (อุทัยรัตน์, 2543)

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely randomized design) โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 ชุดการทดลอง (treatment) ตามการจัดการให้ไข่มิโครโมโซม 2 ชุด โดยแช่ไข่ปลาอุกอยู่ในน้ำ อุณหภูมิ 2 องศาเซลเซียส ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน แต่ละชุดการทดลองประกอบด้วย 3 ซ้ำดังนี้

- 1.1 ชุดการทดลองที่ 1 แช่ไข่ปลาอุกเทศในน้ำ อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 0 นาที
- 1.2 ชุดการทดลองที่ 2 แช่ไข่ปลาอุกเทศในน้ำ อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 5 นาที
- 1.3 ชุดการทดลองที่ 3 แช่ไข่ปลาอุกเทศในน้ำ อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 10 นาที
- 1.4 ชุดการทดลองที่ 4 แช่ไข่ปลาอุกเทศในน้ำ อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 15 นาที
- 1.5 ชุดการทดลองที่ 5 แช่ไข่ปลาอุกเทศในน้ำ อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 20 นาที

2. อุปกรณ์และวิธีการผสมเทียม

1. ฟอปปlateเพียน-แม่ปลาอุกเทศ
2. ฮอว์โมนสังเคราะห์ (buserelin acetatae)
3. โกร่งบดต่อมใต้สมอง
4. เข็มฉีดยา
5. เครื่องชั่งน้ำหนัก สามารถชั่งได้ถึงจุดทศนิยม 2 ตำแหน่ง
6. ภาชนะสำหรับผสมไข่ปลากับน้ำเชื้อ ได้แก่ กระชามพลาสติก และขันไก่อ
7. น้ำเกลือและน้ำกลั่น
8. อุปกรณ์ในการกักไข่ปลา เช่น กระชัง อวนมุ้งเขียว
9. ตู้ฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet)
10. อุปกรณ์ในการอนุบาลลูกปลาเครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)
11. สวิง
12. สายยางดูดน้ำสไลด์นับเม็ดเลือด (Hemocytometer)

13. กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope)
14. นาฬิกาจับเวลา
15. ภาชนะสำหรับใส่น้ำเชื้อฟอปลาตะเพียนขาว
16. ภาชนะสำหรับใส่ไข่ปลาอุกเทศ
17. เข็มฉีดยา (Syringe)
18. ไมโครปิเปต ขนาด 0.5 มิลลิลิตร
19. เพลตสำหรับใส่ไข่ปลาอุกเทศ
20. สมุดจดบันทึกผลการทดลอง

3. การเพาะพันธุ์

ดำเนินการเพาะโดยวิธีการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นให้แม่ปลาวางไข่ในอัตรา Synthetic hormone 20 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ Domperidone 5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักแม่ปลา 1 กิโลกรัม แม่ปลาจะวางไข่ในระยะเวลา 12 ชั่วโมง ส่วนฟอปลาตะเพียนขาวใช้ Synthetic hormone 5 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักฟอปลา 1 กิโลกรัม ร่วมกับยาเสริมฤทธิ์ Domperidone 5 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักปลา 1 กิโลกรัม (สุชาติและคณะ, 2550)

4. การดำเนินงานในวิธีการ gynogenetic diploidization

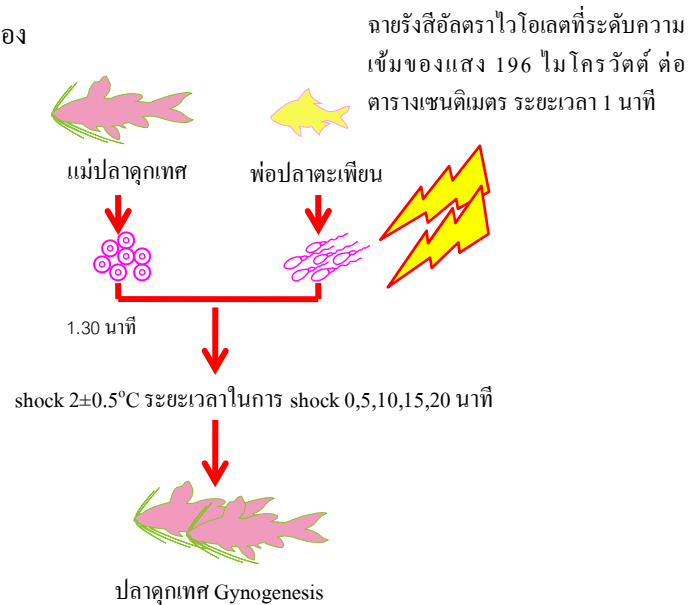
4.1 การทำลายสารพันธุกรรมของน้ำเชื้อปลาตัวผู้โดยใช้น้ำเชื้อจากปลาตะเพียนขาวเพศผู้ มาตรวจสอบการเคลื่อนที่ของน้ำเชื้อ และเจือจางด้วยสารละลาย 0.85เปอร์เซ็นต์ NaCl จนเหลือความเข้มข้น 8 (ชาติและคณะ, 2550) ไปฉายรังสี UV โดยที่พื้นผิวของน้ำเชื้อจะมีระยะห่าง 37 เซนติเมตร จากหลอดไฟ UV ขนาด 15 วัตต์ เป็นระยะเวลา 1 นาที (นวลมนิและทวี, 2534)

4.2 การผสมน้ำเชื้อและไข่ โดยน้ำเชื้อที่ผ่านการฉาย UV ไปผสมกับไข่แม่ปลาอุกอยู่ในอัตราส่วนไข่ 0.5 กรัม ต่อน้ำเชื้อ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร เป็นระยะเวลา 1 นาที (สุชาติ และคณะ, 2550)

4.3 การจัดการให้ไข่มีโครโมโซม 2 ชุด โดยนำไข่ปลาดังกล่าวมาหลังจากการผสม 1 นาที ไปแช่ในน้ำที่มี อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส นาน 0, 5, 10, 15, และ 20 นาที จากนั้นนำไปฟักในถังพลาสติกที่มีอุณหภูมิ น้ำปกติ (สุชาติ และคณะ, 2550)

4.4 สุ่มไข่ปลาของแต่ละชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 326 ฟอง มาฟักที่อุณหภูมิปกติ นับจำนวนไข่ที่อดตายที่ 48 ชั่วโมง หลังจากฟักเป็นตัว (สุชาติ และคณะ, 2550)

แผนการทดลอง



ภาพที่ 1 แผนผังในการทดลองอัตราการรอดของลูกปลาดุกเทศอายุ 48 ชั่วโมงที่เหนี่ยวนำด้วยวิธีไจโนเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็นในระยะเวลาต่างกัน

5. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลจากการทดลองในแต่ละชุดการทดลอง โดยนำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลองโดยวิธี Sirichai Statistics ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

บทที่ 4

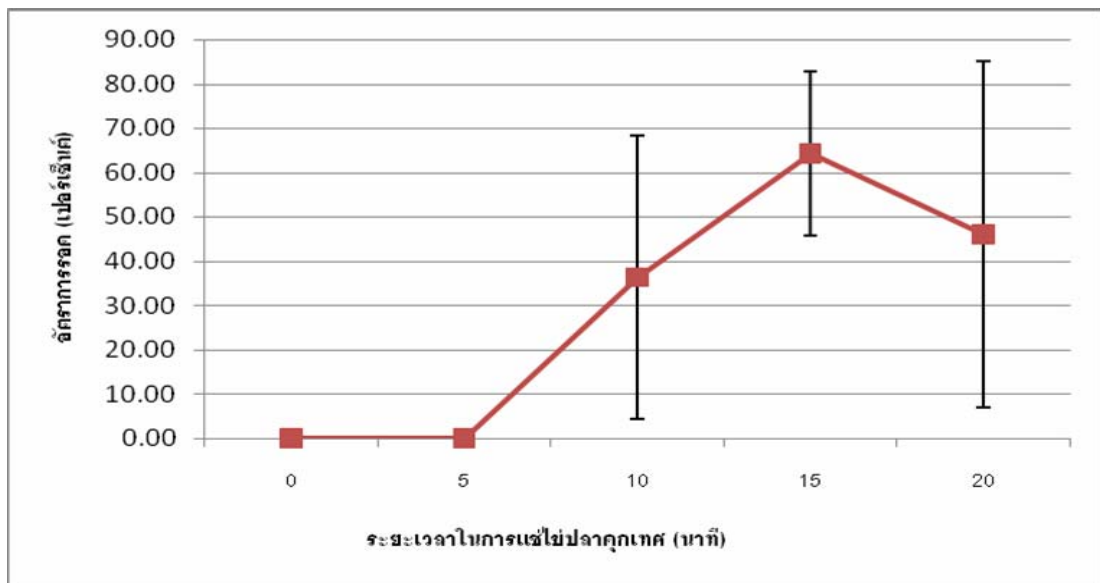
ผลการทดลอง

จากการนำน้ำเชื้อปลาดูเกเพียนขาวที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลตที่ระดับความเข้มของแสง 196 ไมโครวัตต์ ต่อตารางเซนติเมตร เป็นระยะเวลา 1 นาที และนำมาผสมกับไข่ปลาดูกเทศเป็นระยะเวลา 1.30 นาที จากนั้นนำไข่ปลาดูกเทศที่ได้รับการผสมมาแช่ในน้ำเย็นที่อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส (ภาพผนวกที่ 25) ที่ระยะเวลาต่างกันเพื่อกระตุ้นให้เกิดการจำลองโครโมโซมเพศขึ้นมาเป็น 2n และหลังจากนั้นนำไข่ปลาดูกเทศมาฟักในภาชนะที่น้ำมีอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงพบว่าไข่ของปลาดูกเทศที่กระตุ้นด้วยน้ำเย็น 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0 และ 5 นาที ไม่มีการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อน ส่วนไข่ปลาดูกเทศที่กระตุ้นด้วยน้ำเย็น ระยะเวลา 10, 15 และ 20 นาที สามารถพัฒนาเป็นลูกปลาดูกเทศและมีอัตราการรอด 36.33 ± 32.036 , 64.37 ± 18.556 , 46.00 ± 39.154 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อนำไปวิเคราะห์ความแปรปรวนและเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยของแต่ละชุดการทดลอง พบว่าชุดการทดลองที่ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ชุดการทดลองที่ 4 และ 5 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ชุดการทดลองที่ 1 และ 2 มีความแตกต่างกับชุดการทดลองที่ 4 และ 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ตารางที่ 2 และภาพที่ 2)

ตารางที่ 2 อัตราการรอดของลูกปลาดูกเทศอายุ 48 ชั่วโมงที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยวิธีไขโนเจนเนสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็น อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ

ระยะเวลาในการแช่ไข่ปลาดูกเทศ 2 ± 0.5 °c	อัตราการรอดของลูกปลาวัยอ่อนระยะแรก (%)
0 นาที	0 ^a
5 นาที	0 ^a
10 นาที	36.33 ± 32.036^{ab}
15 นาที	64.37 ± 18.556^b
20 นาที	46.00 ± 39.154^b

หมายเหตุ อักษรภาษาอังกฤษที่กำกับในแต่ละสดมภ์ถ้าไม่เหมือนกันแสดงว่า มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)



ภาพที่ 2 อัตราการรอดของลูกปลาอุกเทศอายุ 48 ชั่วโมงที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยวิธีไฮโนเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็น อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 นาที ตามลำดับ

บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองการนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเลต เพื่อทำลายสารพันธุกรรมและนำไปผสมกับไข่ปลาอุกเทศมีการแบ่งตัวและเจริญต่อไปได้อีกทั้งยังทำให้ผลการทดลองครั้งนี้มีความถูกต้องสูง เนื่องจากเป็นน้ำเชื้อต่างชนิดกัน ดังนั้นถ้าทำลายสารพันธุกรรมในน้ำเชื้อไม่สมบูรณ์ตัวอ่อนจากการผสมข้ามชนิดก็จะตายหมด (อุทัยรัตน์, 2538)

จากการนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ถูกฉายรังสีอัลตราไวโอเลตนาน 1 นาที ผสมกับไข่ปลาอุกเทศนาน 1.30 นาที แล้วนำไปแช่ในน้ำที่อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 0, 5, 10, 15 และ 20 นาที พบว่าไข่ปลาอุกเทศชุดที่ 1 และ 2 ไม่สามารถฟักออกมาเป็นตัวได้ ส่วนไข่ปลาอุกเทศชุดที่ 3, 4 และ 5 ไข่สามารถพัฒนาไปจนถึงอัตราการรอด วิเชียน (2533) และ อุทัยรัตน์ (2543) รายงานว่า หลังการผสมไขกับน้ำเชื้อที่ผ่านการฉายรังสี ไข่สามารถเจริญต่อไปได้แต่จะเจริญถึงระยะใดก็แล้วแต่ชนิดของปลา บางชนิดมีลักษณะ haploid syndrome มักตายระหว่างฟัก หรือ หลังจากฟักไม่นานสำหรับไข่ที่แช่นาน 20 และ 30 นาที ไม่สามารถพัฒนาถึงระยะที่มีจุดตาเกิดขึ้นในฟองไข่ (somite) ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองเหนี่ยวนำทรานสโพลอยด์ในปลาตะเพียนขาว ของ

อุทัยรัตน์ และ E. Legrand (2533) ที่พบว่า การเพิ่มชุดโครโมโซมโดยใช้ความเย็นเมื่อทำการชักนํานขึ้นจาก 15 เป็น 30 นาที จะทำให้อัตราการฟักลด สุชาติ เมตตา และ สืบพงษ์ (2550) รายงานว่าการแช่ไข่ปลาหมอ 0, 5 และ 10 นาที ไข่สามารถพัฒนาจนฟักเป็นตัวโดยไข่ปลาหมอกี่ผ่านการแช่ (0 นาที) ในน้ำที่อุณหภูมิ 2 ± 0.5 องศาเซลเซียส ลูกปลามีลักษณะรูปร่างผิดปกติ ลำตัวสั้น คดงอ และตายทั้งหมดในเวลาต่อมา ส่วนไข่ที่ผ่านการแช่ 5 และ 10 นาที มีอัตราการรอดตายสูง

ส่วนที่ระยะเวลา 0 และ 5 นาที ไข่ปลาถูกแช่ที่ผสมกับน้ำเชื้อที่ผ่านการฉายรังสีไม่สามารถฟักออกมาเป็นตัวได้ ส่วนไข่ปลาถูกแช่ที่ผ่านการแช่ 10, 15 และ 20 นาที ไข่สามารถฟักออกมาเป็นลูกปลาถูกแช่เป็นปกติ ซึ่งมีอัตราการรอดตายโดยเฉลี่ย 36.33 ± 32.036 , 64.37 ± 18.556 , 46.00 ± 39.154 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองการนำน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ผ่านการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ระดับความเข้มของแสง 195 ไมโครวัตต์ต่อตารางเซนติเมตร นำมาผสมกับไข่ปลาถูกแช่ ระยะ 1.30 นาที แล้วนำมาเพิ่มจำนวนโครโมโซมด้วยการกระตุ้นด้วยน้ำเย็น ผลปรากฏว่า 15 นาที ให้ผลดีที่สุด โดยมีอัตราการรอดอยู่ที่ 64.37 ± 18.556 เปอร์เซ็นต์ รองลงมา 20 และ 10 นาที โดยมีอัตราการรอด 36.33 ± 32.036 และ 46.00 ± 39.154 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนไข่ปลาถูกแช่ที่ไม่ผ่านการกระตุ้นด้วยน้ำเย็น และที่กระตุ้นด้วยน้ำเย็นระยะเวลา 5 นาที ไข่ไม่สามารถพัฒนาออกมาเป็นตัวอ่อนได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรปรับปรุงวิธีการที่ไม่ให้ไข่ปลาถูกแช่ติดเร็วเกินไปในขณะที่ผสมกับน้ำเชื้อปลาตะเพียน
2. การนับลูกปลาที่ยังมีถุงไข่แดงนับยาก ดังนั้นจึงทำด้วยความระมัดระวัง
3. ควรมีการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของปลาที่เกิดจากการเหนี่ยวนำใจโนเจนซิสเปรียบเทียบกับปลาที่เกิดจากการปฏิสนธิตามปกติ
4. ขั้นตอนในการผลิตลูกปลาถูกแช่ Gynogenetic มีขั้นตอนที่ต้องพิถีพิถัน มากเพราะมีอัตราฟักที่ค่อนข้างต่ำ

บรรณานุกรม

กองพัฒนาเพาะเลี้ยงชายฝั่ง มปป. การเพาะเลี้ยงสัตว์ปลาดุกบิกอูย. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง, กรมประมง. 32 หน้า

กองส่งเสริมการประมง. 2541. การเพาะเลี้ยงปลาดุก. สำนักพัฒนาและถ่ายทอดเทคโนโลยีการประมง , กรมประมง. 43 หน้า

ชาติชาย สุวรรณกระจำ. 2535. การเหนี่ยวนำโคโนเจนซิสในปลาดุก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 44 หน้า

นวลมณี พงศ์ธนา และ ทวี วิพุทธานุมาส. 2534. การผลิตปลาดุกเพศเมียทั้งหมดโดยการเหนี่ยวนำ **Gynogenetic diploid**. วารสารการประมง

วิกิพีเดีย. 2552 ปลาดุกเทศ. (ออนไลน์). เข้าถึงเมื่อ 9 สิงหาคม 2552 จาก www.fisheries.go.th

วิเชียร เหลืองพรหมพร. 2533. การเหนี่ยวนำให้เกิดโคโนเจนซิสในปลาดุก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 85 หน้า

สายใจ วิชญ์สันต์กุล. 2539. การศึกษาประสิทธิภาพของการเหนี่ยวนำดิพลอยด์โคโนเจนซิสในปลาดุกโดยวิธีการช็อคด้วยความเย็นและความร้อน. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 40 หน้า

สุชาติ จุลอคง และคณะ 2550. การทดลองจัดการให้ปลาหมอมีโครโมโซม 2 ชุด โดยได้รับจากแม่พันธุ์ฝ่ายเดียว. ศูนย์วิจัยและทดสอบพันธุ์สัตว์น้ำชุมพร สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ. กรมประมงกระทรวงเกษตรและสหกรณ์ 16 หน้า.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2543. พันธุศาสตร์สัตว์น้ำ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 203 หน้า.



ตารางผนวกที่ 3 อัตราการรอดของลูกปลาอุกทะเลระยะเวลา 48 ชั่วโมง

อัตราการรอด		อัตราการรอด		อัตราการรอด	
รอด		รอด		รอด	
ชุดการทดลอง	(ตัว)	ชุดการทดลอง	(ตัว)	ชุดการทดลอง	(ตัว)
T1R1	0	T3R1	27	T5R1	87
T1R2	0	T3R2	10	T5R2	42
T1R3	0	T3R3	72	T5R3	9
ค่าเฉลี่ย	0	ค่าเฉลี่ย	36.33	ค่าเฉลี่ย	46
standeviation	0	standeviation	32.036	standeviation	39.154
T2R1	0	T4R1	84		
T2R2	0	T4R2	63		
T2R3	0	T4R3	47		
ค่าเฉลี่ย	0	ค่าเฉลี่ย	64.67		
standeviation	0	standeviation	18.556		
หมายเหตุ T คือ ชุดการทดลอง R คือจำนวนซ้ำ					

ตารางผนวกที่ 4 ตาราง ANOVA แสดงอัตราการรอดตายของลูกปลาอุกทะเลระยะเวลา 48 ชั่วโมง

Source	df	SS	MS	F MS	F.05	F.01	F-Prob
Treatment	5	12049.17	2409.833	4.98	3.11	5.06	0.0108
Ex.Error	12	5807.333	483.9444				
Total	17	17856.5	1050.382				

GRAND MEAN = 24.5

CV = 89.7908 %

LSD .05 = 39.1389666355193

LSD .01 = 54.8735856225386

ตารางผนวกที่ 5 เปรียบเทียบอัตราการรอดตายของลูกปลาอุกทะเลระยะเวลา 48 ชั่วโมง

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .05
t4		64.6667 ^a	
t5		46.0000 ^a	
t3		36.3333 ^{ab}	
t2		0.0000 ^b	
t1		0.0000 ^b	

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.



ภาพผนวกที่ 1 ภาชนะฟักไข่ปลาตุ๊กเทศ ขนาด 248.4 ลูกบาศก์เมตร



ภาพผนวกที่ 2 ตู้ฉายรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet)



ภาพผนวกที่ 3 หลอดรังสีอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet)



ภาพผนวกที่ 4 เครื่องเขย่า รุ่น Vortex genie 2



ภาพผนวกที่ 5 เครื่องควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)



ภาพผนวกที่ 6 ตะกร้าฟักไข่ปลาตุกเทศที่เหนียวนำด้วยวิธีไนเจนแชส



ภาพผนวกที่ 7 สไลด์นับเม็ดเลือด (Hemacytometer)



ภาพผนวกที่ 8 กล้องจุลทรรศน์ (Compound microscope) ไว้สำหรับนับน้ำเชื้อพ่อปลาตะเพียนขาว



ภาพผนวกที่ 9 น้ำผสมกับโซเดียมคลอไรด์ (0.85 % NaCl)



ภาพผนวกที่ 10 นาฬิกาไว้สำหรับจับเวลาในการฉายรังสี และเวลาการกระตุ้นด้วยน้ำเย็น



ภาพผนวกที่ 11 ภาชนะสำหรับใส่น้ำเชื้อพอลาตะเพียนขาว



ภาพผนวกที่ 12 ภาชนะสำหรับใส่ไขปลาดุกเทศ



ภาพผนวกที่ 13 เข็มฉีดยา (Syringe)



ภาพผนวกที่ 14 ไมโครปีเปต ขนาด 0.5 มิลลิลิตร



ภาพผนวกที่ 15 เฟลทสำหรับใส่ไข่ปลาอุกเทศ



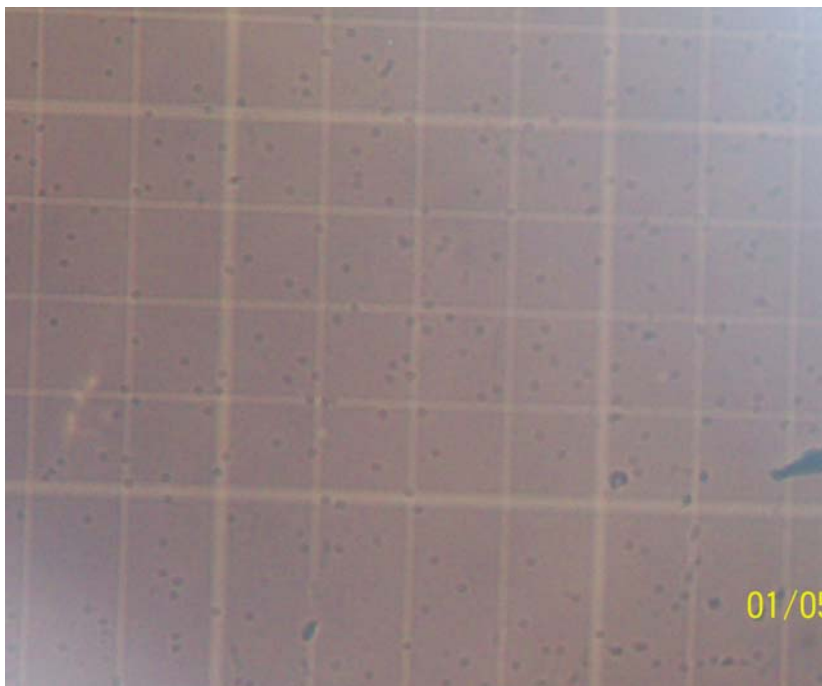
ภาพผนวกที่ 16 การฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ (Buserelinacetate) เพื่อกระตุ้นให้น้ำเชื้อสมบูรณ์



ภาพผนวกที่ 17 น้ำเชื้อปลาดะเพียนขาวที่รีดใส่ในเพลท



ภาพผนวกที่18 การนับจำนวนน้ำเชื้อของปลาดะเพียนขาว



ภาพผนวกที่ 19 ลักษณะของน้ำเชื้อปลาตะเพียนขาวที่ส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40x



ภาพผนวกที่ 20 แม่พันธุ์ปลาดุกเทศที่นำมาฉีดไข่เพื่อใช้ในการทดลอง การเหนี่ยวนำด้วย

วิธีไนโรเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็น



ภาพผนวกที่ 21 ไข่ปลาตุกเทศที่รักษาสภาพไว้ด้วยการแช่เย็น



ภาพผนวกที่ 22 ไข่ปลาตุกเทศที่ใช้ในการทดลองน้ำหนัก 0.5 กรัม (326 ฟอง)



ภาพผนวกที่ 23 การดูน้ำเชื้อเพื่อฉายรังสีด้วยไมโครบีเปต ขนาด 5,000 ไมโครลิตร



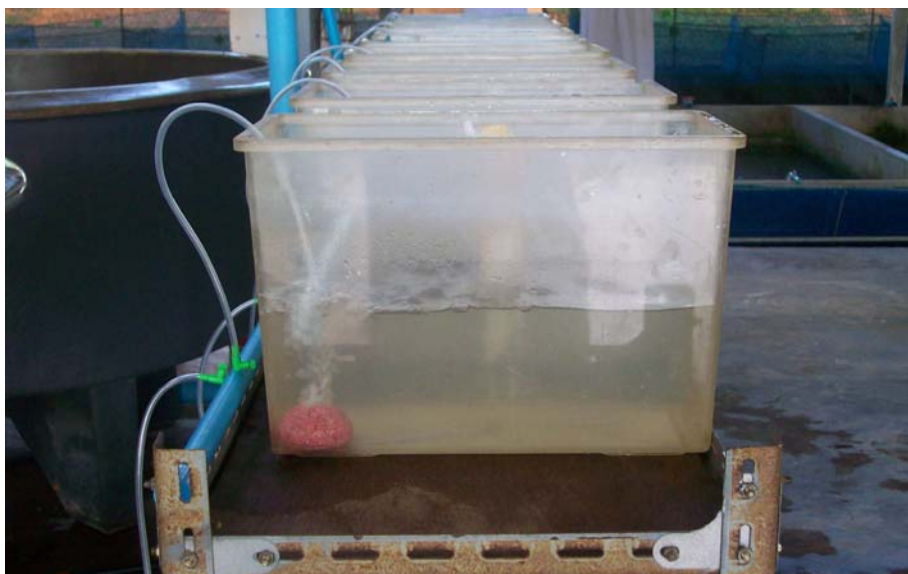
ภาพผนวกที่ 24 การนำน้ำเชื้อฉายรังสีอัลตราไวโอเลตเพื่อทำลายสารพันธุกรรม



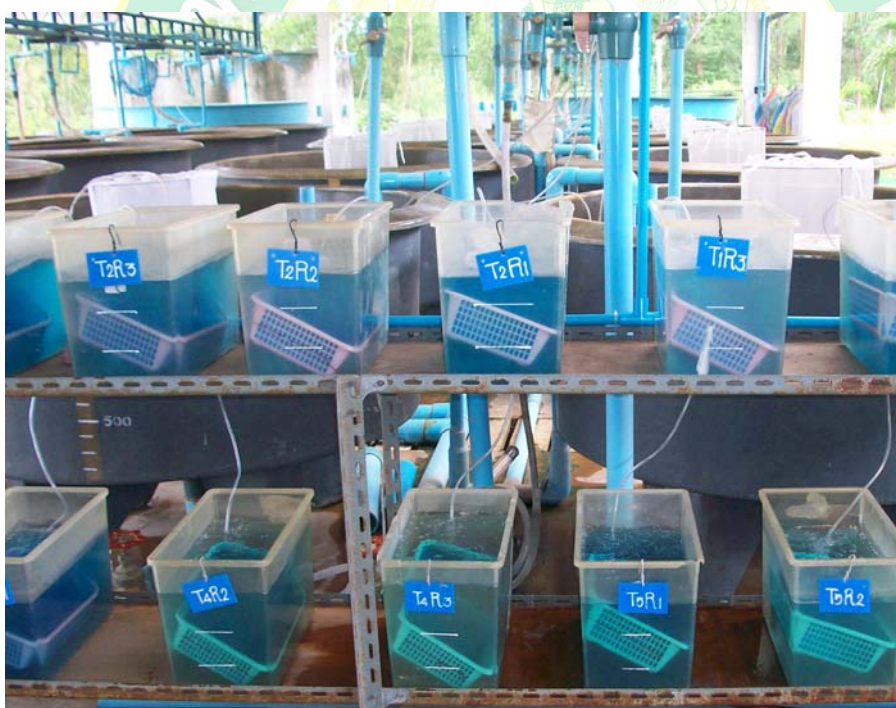
ภาพผนวกที่ 25 การผสมไข่ปลาดุกเทศกับน้ำเชื้อปลาคะเพียนขาวที่ผ่านการฉายรังสี
อัลตราไวโอเลตเพื่อทำลายสารพันธุกรรม



ภาพผนวกที่ 26 การนำไข่ปลาดุกเทศที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยวิธีไฮโฟเนซิสกระตุ้นด้วยน้ำเย็น
เพื่อเพิ่มจำนวนโครโมโซมให้เป็น 2 ชุด



ภาพผนวกที่ 27 การให้อากาศในภาชนะฟักไข่ของลูกปลาดุกเทศที่เหนียวด้วยวิธีไจโนเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็น



ภาพผนวกที่ 28 การใส่ยาเพื่อฆ่าเชื้อรา (Methylenblue) ในระหว่างการฟักไข่ปลาดุกเทศที่เหนียวด้วยวิธีไจโนเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็น



ภาพผนวกที่ 29 ลูกปลาตุกเทศอายุ 48 ชั่วโมง ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยวิธีไอโนเจนซิส และกระตุ้นด้วยน้ำเย็นในชุดการทดลองที่ 3



ภาพผนวกที่ 30 ลูกปลาตุกเทศอายุ 48 ชั่วโมง ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยวิธีไอโนเจนซิสและกระตุ้นด้วยน้ำเย็นในชุดการทดลองที่ 4



ภาพผนวกที่ 31 ลูกปลาตุ๊กเทศอายุ 48 ชั่วโมง ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยวิธีใจโนเจนซิสและ
กระตุ้นด้วยน้ำเย็นในชุดการทดลองที่ 5





ภาคผนวก (ข)

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล : นายรณชัย แสงทอง
เกิดเมื่อ : วันที่ 26 พฤษภาคม 252
ประวัติการศึกษา : ประถมศึกษา โรงเรียนทับทิมสุริยวงศ์
: มัธยมศึกษา โรงเรียนปากจั่นวิทยา
: ประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูง วิทยาลัยเกษตรและ
: เทคโนโลยีชุมพร สาขาวิชาการประมง พ.ศ. 2550
: วทบ. สาขาวิชาการประมง พ.ศ. 2552
: มหาวิทยาลัยแม่โจ้ – ชุมพร จังหวัดชุมพร

ประวัติการทำงาน : -

VITA

NAME : MR. RONNACHAI SANGTHONG
DATH OF BIRTH : 23 MAY 1984
EDUCATION : PRIMARY SCHOOL TUPLHEE SURIYAVONG
SCHOOL
: HIGH SCHOOL : PAHKJUNWITTHAYA SCHOOL
: AGRICULTRE AND TECHNOLOGY CHUMPHON
COLLEGE
FISHERY, 2009 MAEJO UNIVERSITY AT CHUMPHON