การศึกษาเบื้องต้นการเหนี่ยวนำโครโมโซมในปลานิล

Preliminary Study on Induceing Chromosomes in Tilapia(*Oreochomis niloticus*)

วรศิริ จอมวรวงศ์ [1] ไสว พูลเกษ [2] ชัยสงคราม ภูกิ่งเงิน [3]

[1 2 3] สาขาวิชาประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตกาฬสินธุ์

บทคัดย่อ

การศึกษาเบื้องต้นการเหนี่ยวนำไข่ปลานิล ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สลับกับอุณหภูมิปกติ อย่างละ 30 ครั้ง โดยใช้ระยะเวลาการเหนี่ยวนำต่อเซลล์ไข่ปลานิลห่างกัน 3 ระดับ คือ ที่ 5 10 และ 15 วินาที ได้ทำการทดลองที่ คณะวิชาประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตกาฬสินธุ์ ระหว่างวันที่ วันที่ 26 ตุลาคม 2548 ถึง วันที่ 7 มีนาคม 2549 เป็นระยะเวลา 132 วัน ผลการศึกษาปรากฏว่า สัดส่วนเปอร์เซ็นต์เพศผู้ต่อเพศเมียที่เหนี่ยวนำนาน 10 วินาที มีเปอร์เซ็นต์เพศผู้สูงสุดเท่ากับ 78.89 : 21.11 รองลงมาคือ ที่เวลา 5 และ 15 วินาที เท่ากับ 72.22 : 27.78 และ 64.44 : 35.56 ตามลำดับ วิเคราะห์ทางสถิติไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนอัตรารอดตายสูงที่สุดคือเหนี่ยวนำนาน 5 วินาที เท่ากับ 95.78 ± 0.84 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ เหนี่ยวนำนาน 10 และ 15 วินาที มีอัตราการรอดตายเท่ากับ 92.55 ± 1.07 และ 92.00 ± 2.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ วิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ส่วนผลการตรวจขนาดเม็ดเลือดแดง และตัวอ่อนพบว่าไม่ผิดปกติ

ABSTRACT

A Preliminary study on induceing chromosomes in Tilapia by using eggs through water, 10 °C and normal degrees temperature . Three treatments and three replications in CRD were laid out . There were three longtime levels , eggs through 10 °C and normal degrees temperature water at 5 10 and15 seconds. Rearing times were 132 days. The results showed that there were no significant difference in male-sexed percentages by 10 5 and15 seconds (78.89 ,72.22 ,64.44 percent) as well as survival rate among treatments by 5 10 and15 seconds. (95.78 , 92.55 ,92.00 percent) In addition , Blood cell sizes and embryo were normal.

คำนำ

ปัจจุบันสัตว์เศรษฐกิจหลายชนิด ได้มีบทบาทสำคัญที่สามารถทำรายได้ให้กับเกษตรกรในแต่ละท้องที่ สัตว์น้ำนับว่าเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีคุณประโยชน์มากไม่ว่าจะเป็น กุ้ง หอย ปู ปลา และสัตว์น้ำชนิดหนึ่งที่ได้รับความสำคัญนิยมเป็นอันมากในกลุ่มเกษตร คือ ปลานิล การเลี้ยงปลานิลนับว่าเป็นอาชีพที่ให้ผลตอบแทนที่คุ้มค่า ทำให้เกษตรกรมาเลี้ยงปลานิลเป็นส่วนใหญ่เพราะปลานิลเป็นพันธุ์ ปลาที่เลี้ยงง่าย มีความแข็งแรงสามารถปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมได้ดี เจริญเติบโตรวดเร็ว มีรสชาติอร่อย มีโปรตีนสูง และที่สำคัญราคาไม่แพง จึงเป็นที่นิยมบริโภคกันมาก การศึกษาครั้งนี้ อยากทดลองใช้อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เหนี่ยวนำโครโมโซมของปลานิล เพื่อศึกษาเปอร์เซ็นต์ ความผิดปกติของเซลล์ภายในเม็ดเลือด ความผิดปกติในตัวอ่อนของลูกปลาและการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ เพศผู้กับเพศเมียโดยการเหนี่ยวนำไข่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสสลับกับอุณหภูมิปกติ โดยแช่ผ่านน้ำนาน 5 10 และ 15 วินาทีสลับกับอุณหภูมิ ปกติ และศึกษาการเปรียบเทียบอัตราการรอดตายโดย

การเหนี่ยวนำไข่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส โดยแช่นาน 5 10 และ 15 วินาที เพื่อใช้เป็นแนวทางพื้นฐานในการศึกษาการใช้อุณหภูมิต่ำ เหนี่ยวนำโครโมโซมของสัตว์น้ำชนิดอื่นๆเพื่อที่จะให้สัตว์น้ำนั้นๆเป็นหมันมีขนาดใหญ่ เจริญเติบโตเร็ว

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปรียบเทียบสัดส่วนเพศผู้กับเพศเมียโดยการเหนี่ยวนำไข่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส โดยแช่นาน 5 10 และ 15 วินาที สลับกับอุณหภูมิปกติ

2. เพื่อศึกษาการเปรียบเทียบอัตราการรอดตายโดยการเหนี่ยวนำไข่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส โดยแช่นาน 5 10 และ 15 วินาทีสลับกับอุณหภูมิ ปกติ

3. เพื่อศึกษาความผิดปกติของเซลล์ภายในเม็ดเลือด และความผิดปกติในตัวอ่อนของลูกปลา โดยการเหนี่ยวนำไข่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส โดยแช่นาน 5 10 และ 15 วินาที สลับกับอุณหภูมิปกติ

ตรวจเอกสาร

<u>วัตถุประสงค์ของการทำโพลีพลอยด์</u>

วัตถุประสงค์ของการทำโพลีพลอยด์ เพื่อเพิ่มการเจริญเติบโต ลดอัตราการแลกเนื้อ เพื่อให้สัตว์น้ำนั้นเป็นหมัน โดยลดกิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ของปลาที่จะทำให้การเจริญเติบโตชะงัก (Cassani and Caton, 1985) หรือคาดหวังเพื่อเพิ่มความต้านทานโรค วิธีการคัดเลือกพันธุ์ใช้เวลานานมากจึงจะได้สัตว์น้ำตามความต้องการ (อุทัยรัตน์, 2543) นอกจากนั้นยังมุ่งหวังที่จะสร้างพ่อแม่พันธุ์สำหรับการผลิตปลาทริพลอยด์ โดยการเหนี่ยวนำโครโมโซมให้เป็นเตตราพลอยด์ (4n) ซึ่งสืบพันธุ์ได้ และเมื่อผสมพันธุ์กับปลาดิพลอยด์ปกติจะได้ลูกเป็น ดิพลอยด์ (3N) ทั้งหมด (อุทัยรัตน์ ณ นคร, 2543 อ้างตาม Myer and Hershberger, 1991 ; Arai et al, 1993)

การทดลองเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ในสัตว์น้ำส่วนใหญ่คาดหวังน่าจะมีการเจริญเติบโตดีกว่าสัตว์ดิพลอยด์ (2n) ปกติ เนื่องจากสัตว์น้ำเป็นหมัน (Purdom, 1983) จะนำพลังงานที่ใช้ในการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์มาใช้ในการเจริญเติบโตทางร่างกายแทน เป็นผลให้ปลาโพลีพลอยด์ที่มีอายุวัยสืบพันธุ์มีการเจริญเติบโตดีกว่าปลาดิพลอยด์ (Refstie, 1981 : Wolters et al, 1982) โดย Valenti (1975) ทดลองปลานิลโพลีพลอยด์นาน 14 เดือนพบว่าการเจริญเติบโตดีกว่าปลาดิพลอยด์เช่นเดียวในปลาแซนนัสแคทฟิช อายุ 8 เดือน ขึ้นไปว่าปลาทริพลอยด์มีน้ำหนักมากกว่าปลาโพลีพลอยด์เช่นเดียวกับการทดลองของ Solar et al (1981) ที่เลี้ยงปลาชนิดเดียวกัน อายุ 24 – 48 สัปดาห์ พบว่าปลาทริพลอยด์เติบโตช้ากว่าปลาดิพลอยด์

<u>การเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ในสัตว์น้ำ</u>

การจัดชุดโครโมโซม โดยการเพิ่มชุดโครโมโซมในสัตว์น้ำ พบได้ทั้งในธรรมชาติและจากการเหนี่ยวนำโดยวิธีการทางกายภาพ และทางเคมี โดยโพลีพลอยด์ในสัตว์น้ำที่พบในธรรมชาติมี 2 ชนิด คือ ทริพลอยด์ (3n) และเตตราพลอยด์ (4n) (อุทัยรัตน์, 2543) หรือเพนตราพลอยด์ (5n) ซึ่งพบในธรรมชาติได้น้อยมาก แต่เหนี่ยวนำได้ในการเพิ่มชุดโครโมโซมในสัตว์น้ำ มีการทำ 3 วิธี คือ การใช้สารเคมี ความดัน และอุณหภูมิ (Refstie,1981 ; Purdom, 1983 ; Reddy et al, 1990) วิธีการใช้สารเคมีมีข้อเสียคือ สารเคมีจะทำให้ไข่เสียได้จึงไม่ค่อยนิยมใช้ ส่วนการช็อคไข่โดยใช้ความดันน้ำให้ผลดีแต่มีข้อจำกัดคือเครื่องมือพิเศษราคาแพง เทคนิคยุ่งยาก และยังช็อคไข่ได้คราวละไม่มาก ทำให้ไม่นิยมใช้วิธีนี้ในการเหนี่ยวนำ (Hussain et al, 1991 ; Teskeredzic et al, 1993) ส่วนการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิเป็นวิธีที่นิยม เนื่องจากไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ช็อคไข่ได้ครั้งละ

มากๆ และผลการช็อคอยู่ในระดับดี (Thorgaard, 1986 ; Levanduski et al, 1990) โดยปกติแล้วการเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ด้วยอุณหภูมิสามารถเหนี่ยวนำได้ด้วยความร้อน (Heat shock) และความเย็น (Cold shock) โดยพบว่าในปลาเขตร้อนวิธีช็อคด้วยความเย็นจะได้ผลดีกว่าในเขตหนาว (อุทัยรัตน์, 2543) โดยวิธีการเหนี่ยวนำทำได้โดยการแช่ไข่ปลาที่ได้รับการผสมกับเชื้อตัวผู้แล้วลงในอุณหภูมิต่ำ แล้วนำไข่ที่ผ่านการช็อคแล้วไปฟักในอุณหภูมิปกติทันที เพื่อเป็นการช็อคกลับทำให้อัตราการฟักเพิ่มขึ้น หากไม่มีการช็อคกลับเพื่อให้ระบบต่างๆ ทำงานตามปกติอัตราการฟักจะต่ำลง (อุทัยรัตน์, 2543)

<u>หลักในการเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์</u>

1. การช็อค เพื่อให้ไข่เก็บโพลาร์ บอดี ในขบวนการสร้างไข่ของปลาโอโอไซท์จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงโครโมโซมเพื่อการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสระยะที่ 1 ตั้งแต่ระยะที่ไข่เริ่มมีการสะสมโยล์ค แต่โครโมโซมก็จะพักตัวอยู่ในระยะโปรเฟสจนกระทั่งการสะสมโยล์คเสร็จสิ้นลง จากนั้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากฮอร์โมน การแบ่งเซลล์จึงเริ่มดำเนินต่อไปจนเสร็จสิ้น

2. การช็อค เพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ครั้งแรกของไซโกต หากปล่อยให้การแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสดำเนินไปตามปกติ สุดท้ายไข่ก็จะคงเหลือโครโมโซมเพียง 1 ชุดจากเชื้อตัวผู้ก็จะได้ไซโกตที่มีโครโมโซม 2 ชุดตามปกติ จากนั้นไซโกต ถ้าจะเริ่มมีการแบ่งเซลล์แบบไมโตซีสต่อไป การแบ่งเซลล์ของไซโกตเรียกว่าคลิเวจ (cleavage) โดยโครโมโซมจะจำลองตัวเองและแยกออกจากกัน จากนั้นก็จะมีการสร้างผนังขึ้นมาแบ่ง ไซโตพลาสซึมเมื่อสิ้นสุดการแบ่งเซลล์ก็จะได้คัพภะในระยะ 2 เซลล์ ดังนั้น หากสามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ ทำให้โครโมโซมทั้งหมดรวมอยู่ในเซลล์เดียว ก็จะได้ปลาที่มีโครโมโซม 4 ชุด การช็อค ลักษณะนี้ทำได้ยาก ทำให้ผลดีเมื่อช็อคด้วยความดันเท่านั้น (Thorgaard, 1986) นอกจากนั้นเตตราพลอยด์ที่ได้มามักอ่อนแอมีอัตรารอดต่ำมากซึ่งอาจเป็นผลจากการที่โครโมโซมบางส่วนถูกทำลายระหว่างการช็อค (Yamazkai and Goodier, 1993)

โดยทฤษฎีหากยับยั้งการแบ่งเซลล์ไปเรื่อยๆ ก็จะได้คัพภะที่มีระดับพลอยดีสูงขึ้นไปเรื่อยๆ

<u>ปัจจัยที่กำหนดความสำเร็จในการเหนี่ยวนำ</u>

ในการเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์นั้นมีปัจจัยหลายประการที่กำหนดความสำเร็จของการเหนี่ยวนำปัจจัยนั้นได้แก่

1. เวลาเริ่มช็อค การช็อคจะได้ผลในขณะที่ไข่กำลังจะกำจัดโพลาร์ บอดี หรือไซโกตกำลังจะแบ่งเซลล์ครั้งแรก จึงต้องทำการทดลองหาเวลาเริ่มช็อคที่เหมาะสมก่อนว่าจะเริ่มช็อคหลังการผสมไข่น้ำเชื้อเป็นเวลากี่นาที

2. ระยะเวลาในการช็อค หากช็อคในเวลาสั้นจนเกินไป อัตราการเกิดโพลีพลอยด์จะต่ำแต่อัตราการฟักจะสูง เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการช็อคขึ้น อัตราการเกิดโพลีพลอยด์จะสูงขึ้นเรื่อย ๆ แต่อัตราฟักจะต่ำลง อย่างไรก็ตามระยะเวลาในการช็อคที่เหมาะสมจะเปลี่ยนไปตามอุณหภูมิระหว่างการช็อคด้วย หากช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำระยะเวลาในการช็อคก็จะต้องนานขึ้นเพราะ<u>การเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ช้าลงตามอุณหภูมิ</u>

3. การช็อคด้วยอุณหภูมิ

อุณหภูมิต่ำหรือสูงเกินกว่าภาวะที่เหมาะสม แต่ไม่ทำให้ไข่ตายจะทำลายสายใยสปินเดิล ทำให้โครโมโซมที่เพิ่มจำนวนขึ้นและกำลังเคลื่อนที่ไปยังขั้วเซลล์ยังคงอยู่ในเซลล์เซลล์เดียวอย่างไรก็ตาม Romashov and Belyaeva (1965) เสนอแนวคิดว่าการช็อคด้วยความร้อนและความเย็นมีกระบวนการทำให้เกิดโพลีพลอยด์ต่างกัน โดยทั่วๆ ไปการช็อคด้วยความร้อนจะได้ผลดีในปลาเมืองหนาวส่วนการช็อคด้วยความเย็นได้ผลดีกับปลาเมืองร้อน

อุณหภูมิที่ใช้ช็อค อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการช็อคมักมีค่าในช่องกว้างโดยมีระยะเวลาในการช็อคเหมาะสมกับอุณหภูมิในแต่ละระดับโดยระยะเวลาที่ใช้ช็อคต่างกันจะให้ผลแตกต่างกันไป (อุทัยรัตน์, 2543 ; ICES, 1999) เช่น การช็อคไข่ปลาดุกอุยที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส ใช้เวลาช็อค 20 นาที ทำให้เกิดปลาทริพลอยด์ 8 เปอร์เซ็นต์ อัตราฟัก 55.19 เปอร์เซ็นต์

ในขณะที่การช็อคที่ 5 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลานานเท่ากันได้ลูกปลาเป็นทริพลอยด์ทั้งหมด แต่มีอัตราการฟัก 18.02 เปอร์เซ็นต์ แต่มีข้อพิจารณาคืออุณหภูมิของน้ำก่อนการช็อคเป็นสิ่งสำคัญ ดังนั้น จะเห็นได้จากเมื่อแช่ไข่ไว้อุณหภูมิก่อนการช็อคต่างกันแล้วช็อคด้วยอุณหภูมิเดียวกันตามความแตกต่างของอุณหภูมิก็จะให้ผลช็อคที่ต่างไปดังรายการผลการเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ที่สรุปรวมไว้จากตารางการทดลองของ ICES (1999) พบว่ามีผลต่างของอุณหภูมิขณะปฏิสนธิ และอุณหภูมิของความเย็นที่ใช้ช็อคอยู่ระหว่าง 5-27องศาเซลเซียส ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าผลต่างของอุณหภูมิในช่วงการพัฒนาการของไข่ปลาหลังการปฏิสนธิมีผลต่อการเหนี่ยวนำด้วยความเย็น โดยมีค่าแตกต่างอยู่ในช่วงกว้าง แต่ต้องไม่ทำให้ไข่เสีย แต่อย่างไรก็ตามปัจจัยที่เข้ามามีผลร่วมกันจะให้ผลในการเหนี่ยวนำที่แตกต่างกันไป

<u>ผลการเหนี่ยวนำด้วยความเย็นต่อการเพิ่มชุดโครโมโซม</u>

การใช้อุณหภูมิในการช็อคไข่ที่ปฏิสนธิแบบปกติเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์มีรายงานครั้งแรกในปี ค.ศ. 1959 ในปลา Stickleback (*Gasterosteus acieatus*) แต่ให้ผลในการเหนี่ยวนำไม่ดีนัก (Swarup, 1959) และต่อมามีการทดลองในปลาหลายชนิด เช่น ในปลาดุกลูกผสมระหว่างปลา Plaice และปลา Flounder (Purdom, 1972) ปลา Blue tilapia (*Tilapia aurea*) (Valenti, 1975) ปลาโพลีพลอยด์ที่ใช้เทคนิคการเหนี่ยวนำโดยใช้ระยะความเย็นในระยะแรกๆ ที่นิยมผลิตเพื่อใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายโดยใช้เป็นตัวกำจัดวัชพืชในแหล่งน้ำ คือ ปลาเฉา โดยเหนี่ยวนำให้เป็นทริพลอยด์ ซึ่งได้เป็นปลาหมัน และเจริญดีกว่าปลาปกติ หลังจากนั้นจึงมีการศึกษา และเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์กันอย่างแพร่หลาย และสามารถผลิตปลาเฉาทริพลอยด์ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ (Cassani and Caton, 1980) ในระยะแรกมีรายงานการผลิตปลาทริพลอยด์โดยใช้ความเย็นในการเหนี่ยวนำในปลาเขตหนาว แต่ต่อมาเทคนิคนี้ได้รับความนิยมทั่วไปโดยเฉพาะในปลาเขตร้อน เนื่องจากความแตกต่างของอุณหภูมิน้ำ และอุณหภูมิที่ใช้ช็อคอยู่ในช่วงกว้าง การช็อคจึงให้ผลดีกว่า (อุทัยรัตน์, 2543) การเหนี่ยวนำในเขตร้อนส่วนมากทำให้ปลาเศรษฐกิจ เช่น ปลาเฉา (Cassani and Caton, 1985) ปลานิล (Don and Avtalion, 1988) ปลาดุกอุย (Na-Nakorn and Lakhaanantakun, 1993) ปลาดุกยักษ์ (Henken et al, 1987) ปลาดุกด้าน (Manickam, 1991) แซนมอลแคทฟิช (Wolters et al, 1981) ปลายี่สกเทศ (ICES, 1999) นอกจากนั้นยังมีรายงานจากหอย เช่น หอยแมลงภู่ หอยนางรม รวมไปถึงสัตว์น้ำพวก Scallops (Pectenmaximus) (Nell et al, 1995)

<u>การตรวจสอบสภาพโพลีพลอยด์</u>

อัตราการเจริญเติบโตไม่ได้ขึ้นอยู่กับการเป็นโพลีพลอยด์ จึงไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าการเจริญเติบโตผิดปกติของปลาเกิดจากการเป็นโพลีพลอยด์ ดังนั้น จึงต้องมีการตรวจสอบการเกิดโพลีพลอยด์โดยวิธีอื่น ซึ่งสามารถตรวจสอบได้โดยวิธีตรง และวิธีอ้อม โดยอาศัยหลักการที่ว่าเซลล์ของโพลีพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้นิวเคลียสที่เป็นที่อยู่ของโครโมโซมจะมีปริมาตรเพิ่มขึ้นด้วย และมีปริมาณดีเอ็นเอเพิ่มขึ้น อาศัยหลักการนี้มาใช้ตรวจสอบการเกิดโพลีพลอยด์ได้ 3วิธี คือ

1. การนับจำนวนโครโมโซม ทำได้โดยการหยุดการแบ่งเซลล์ของสัตว์น้ำนั้นให้อยู่ในระยะเมตาเฟส เพื่อให้เห็นชุดโครโมโซมชัดเจน โดยทั่วไปนิยมใช้ Cochicine, Cocimid and Vellban แช่หรือฉีดเข้าตัวปลา จากนั้นฆ่าปลาแล้วเก็บชิ้นส่วนอวัยวะมาตรวจ โดยหากยังเล็กนิยมเก็บตัวอย่างเหงือก หรือเก็บทั้งตัว (Kligerman and Bloom, 1977) ส่วนตัวเต็มวัยนิยมเก็บตับ ไต และม้าม (Denton, 1973) จากนั้นทำให้เซลล์พอง โดยแช่ในสารละเหยไฮเปอร์โทนิคแล้วตรึงโครโมโซมให้คงสภาพโดยใช้ Fixative solution แล้วจึงนำไปย้อมสีจิมซาก่อนนำไปตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (อุทัยรัตน์, 2543)

2. วัดปริมาตร DNA ในเซลล์ ใช้บอกจำนวนโครโมโซมได้ เนื่องจากปริมาณของ DNA เพิ่มขึ้นตามจำนวนของโครโมโซม ทำได้โดยการดูดเลือดจากสัตว์น้ำแล้วนำมาย่อยด้วยเอ็นไซม์อาร์เอนเอเอส แล้วเติมสีเรืองแสง จากนั้นนำไปวัดด้วย

เครื่องมือโฟลว์ ไซโตมิเตอร์เครื่องจะแสดงกราฟของปริมาณ DNA แล้วนำไปเปรียบเทียบกับแถบมาตรฐานของสัตว์ดิพลอยด์ ซึ่งวิธีนี้ยุ่งยาก และใช้เครื่องมือราคาแพง จึงไม่เป็นที่นิยม (อุทัยรัตน์, 2543 ; อ้างตาม Dube et al, 1991)

3. วิธีตรวจสอบโพลีพลอยด์โดยการวัดปริมาตรนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดง หรือปริมาตรของเม็ดเลือดแดงโดยอาศัยหลักการที่ว่าโครโมโซมเป็นตัวกำหนดทั้งทางปริมาณ และทางคุณภาพของสิ่งมีชีวิต (อุทัยรัตน์, 2543) การเพิ่มจำนวนของโครโมโซมจึงทำให้ขนาดของเซลล์เพิ่มขึ้น เซลล์ที่ศึกษาเรื่องการขยายขนาด หรือเพิ่มปริมาตรเนื่องจากเก็บตัวอย่างง่าย มีขนาดของเซลล์ที่ตรวจสอบง่าย ชัดเจน และอาจไม่จำเป็นต้องฆ่าปลาตัวอย่าง ซึ่งพบว่าขนาดของเซลล์ และนิวเคลียสเพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนกับการเป็นโพลีพลอยด์ ซึ่งขนาดของเซลล์ และนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงปลาโพลีพลอยด์เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนมากหรือน้อยแตกต่างกันไปขึ้นกับขนาดของโครโมโซม จำนวนชุดโครโมโซม และชนิดของสัตว์น้ำโพลีพลอยด์ส่วนระหว่างปริมาตรของเซลล์กับนิวเคลียสไม่เปลี่ยนแปลง (อุทัยรัตน์, 2543)

วิธีการศึกษา

<u>การวางแผนการทดลอง</u>

การวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยการแบ่งชุดการทดลอง (Treatment) เป็น 3 ชุดการทดลองๆ ละ 3 ซ้ำ (Replication) ใช้ปลา 30 ตัวต่อซ้ำ เริ่มทำการทดลองเมื่อวันที่ 26 ตุลาคม 2548 สิ้นสุดการทดลองเมื่อวันที่ 7 มีนาคม 2549 ใช้ระยะเวลาในการทดลองทั้งสิ้น 132 วัน

ทรีตเมนต์ที่ 1	คือ	อุณหภูมิ	10 องศาเซลเซียส	แช่นาน	5	วินาที
ทรีตเมนต์ที่ 2	คือ	อุณหภูมิ	10 องศาเซลเซียส	แช่นาน	10	วินาที
ทรีตเมนต์ที่ 3	คือ	อุณหภูมิ	10 องศาเซลเซียส	แช่นาน	15	วินาที

<u>การวิเคราะห์ข้อมูล</u>

ทดสอบความแตกต่างทางสถิติของสัดส่วนเพศ อัตราการรอดตาย โดยวิธีวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ One Way Analysis of Variance (ANOVA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยวิธี Duncan's new multiple range test โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ SPSS for Microsoft windows Version 11

ระยะเวลา และสถานที่ทำการทดลอง

ระยะเวลาทดลอง

เริ่มดำเนินการ เมื่อวันที่ 26 ตุลาคม 2548

เสร็จสิ้น เมื่อวันที่ 7 มีนาคม 2549

สถานที่ทำการทดลอง

คณะวิชาประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตกาฬสินธุ์

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

<u>ขั้นตอนดำเนินการทดลอง</u>

1. การใช้อุณหภูมิคงที่วินาทีต่างกันผ่านไข่ปลานิล

1.1 เคาะไข่ปลานิลโดยคัดไข่ดีในระยะแรกๆหลังการผสมพันธุ์

1.2 คัดเลือกไข่ปลาโดยแบ่งออกเป็น 9 ถ้วย ถ้วยละ 300 ฟอง

1.3 น้ำที่จะทำการช็อคไข่ โดยมีน้ำธรรมดาใส่น้ำแข็งลงไปและน้ำอุณหภูมิปกติ เทอร์โมมิเตอร์ใช้วัดอุณหภูมิ

1.4 การช็อคไข่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แช่นาน 5 10 และ 15 วินาทีสลับอุณหภูมิปกติ อย่างละ 30 ครั้ง

1.5 เมื่อช็อคเสร็จแล้วนำไข่ปลานิลมาปล่อยลงในกระบะที่เตรียมไว้ โดยให้น้ำผ่านตลอด

1.6 ประมาณ 5 วัน ไข่ปลาก็จะฟักออกเป็นตัว ถุงไข่แดงของลูกปลาจะยุบ ก็ให้อาหารในกระบะ คือ ไรแดง โดยจะให้เพียงเล็กน้อย เพื่อที่จะให้ลูกปลาฝึกกินอาหาร และมีอัตราการรอดสูง

1.7 จากนั้นนำลูกปลาไปปล่อยในบ่อซีเมนต์กลมที่เตรียมไว้แล้ว

1.8 อาหารที่ให้ คือ ไรแดง จะให้เริ่มต้น หลังจากนั้นจะให้ ปลาป่นผสมรำ ปลาป่น 3 ส่วน รำ 1 ส่วน

2. การอนุบาลลูกปลาในบ่อซีเมนต์กลม

2.1 การเตรียมบ่อซีเมนต์กลม มีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 120 เซนติเมตร สูง 80 เซนติเมตร เติมน้ำจนได้ระดับ 50 เซนติเมตร จำนวนทั้งสิ้น 9 บ่อ โดยให้ออกซิเจนทุกบ่อ ใช้เลี้ยงปลาทดลองหลังจากการช็อคในระดับอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แช่นาน 5 10 และ 15 วินาที โดยจะปล่อยบ่อละ 300 ตัว เลี้ยงในระยะเวลา 73 วัน

2.2 อาหารและการให้อาหาร จะเป็นการให้อาหารธรรมชาติ โดยไม่ต้องผสมฮอร์โมนใด ๆ ลงไป โดยจะผสมรำ 1 ส่วน ปลาป่น 3 ส่วน หรือ 1 : 3 ในอาหาร 1 กิโลกรัม แล้วผสมให้เข้ากัน แล้วนำมาให้ลูกปลากิน โดยจะให้วันละ 4 ครั้ง คือ เวลา 06.00 10.00 14.00 และ 17.00 นาฬิกา

2.3 การเลี้ยงปลา จะเลี้ยงประมาณ 73 วัน ถ้าครบกำหนดแล้วก็นำปลานิลทั้ง 9 บ่อ มาหาอัตราการรอดตาย และตรวจสอบเพศภายนอก แล้วจึงนำมาตรวจสอบเพศด้วยการย้อมสีอะซิโตคามีน แล้วนำมาส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลต่อไป

3. การตรวจสอบเพศปลานิลจากภายนอกและภายใน

การตรวจสอบเพศปลานิล วัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบว่าลูกปลาที่ผ่านการช็อคอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เวลาต่างกัน จะมีผลกระทบอย่างไรต่อลักษณะภายนอกและภายในของปลา

3.1 การตรวจสอบลักษณะเพศภายนอก โดยดูลักษณะเพศภายนอกของปลานิล เพศผู้จะมีติ่งเพศยาวปลายแหลม มีรูปัสสาวะ 1 รู และสีผิวจะมีสีเข้มมากกว่าเพศเมีย เพศเมียติ่งเพศจะสั้นป้อม และปลายมนกว่าเพศผู้ ติ่งเพศของปลานิลเพศเมียจะมีช่องเปิด 2 ช่อง โดยช่องแรกจะเป็นช่องทางออกของปัสสาวะที่ปลายติ่ง ถัดเข้ามาตามทางขวางจะเป็นช่องทางออกของรังไข่

3.2 การตรวจสอบลักษณะเพศภายใน โดยวิธีการย้อมสีอะซิโตคามีน มีขั้นตอนดังนี้

3.2.1 การเตรียมเครื่องมือ และอุปกรณ์

3.2.2 การเตรียมสีย้อมอะซิโตคามีน

1) ชั่งสีย้อมอะซิโตคามีน น้ำหนัก 0.5 กรัม ละลายในกรด อะซิติก 45 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 ซีซี

2) ต้มสารละลาย 2-4 นาที ปล่อยให้สารเย็นจึงกรองด้วยกระดาษกรอง และบรรจุสีย้อมในขวดแก้ว

3.3 ขั้นตอนการตรวจสอบเพศปลานิลโดยวิธีการย้อมสี

3.3.1 นำลูกปลานิลที่จะใช้ตรวจสอบมีขนาด 4 เซนติเมตร

3.3.2 ตรวจสอบโดยการนำลูกปลานิลบ่อละ 30 ตัว จำนวน 9 บ่อ มาทำการตรวจสอบ

3.3.3 ทำการผ่าตัดบริเวณท้องให้เปิดออก เอาอวัยวะภายในออกให้หมด เพื่อสะดวกในการตัดอวัยวะที่ เป็นแหล่งกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ได้ง่าย และรวดเร็ว

3.3.4 ตัดอวัยวะที่เป็นแหล่งกำเนิดเซลล์สืบพันธุ์ (Gonad)

3.3.5 Gonad ที่ติดอยู่ผนังท้องด้านบน อยู่เหนือไตเล็กน้อยมีลักษณะคล้ายเส้นด้าย 2 เส้น มีขนาดเล็ก

3.3.6 ใช้กรรไกรปลายแหลมตัดเส้น Gonad คีบด้วยที่คีบปลายแหลม วางลงแผ่นสไลด์ ย้อมด้วยสีอะซิโตคามีน จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.3.7 ดูลักษณะเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ และเพศเมีย ลักษณะของเพศเมียจะเป็นเม็ดกลมขนาดใหญ่คล้ายเม็ดโฟม ลักษณะของเพศผู้จะเป็นจุดเล็กๆ ทั่วไป

4. การตรวจสอบความผิดปกติของเซลล์ภายในเม็ดเลือด

ความผิดปกติของเซลล์ภายในเม็ดเลือด และความผิดปกติในตัวอ่อนของลูกปลา พิจารณาได้จากถ้าเซลล์ภายในเม็ดเลือดมีขนาดใหญ่กว่าปกติแสดงได้ว่า การเหนี่ยวนำไข่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส โดยแช่นาน 5 10 และ 15 วินาที สลับอุณหภูมิปกติ อย่างละ 30 ครั้ง มีผลต่อโครโมโซมของเซลล์ ของลูกปลา ถ้าพบว่าเซลล์ผิดปกติก็จะนำเนื้อเยื่อไปตรวจวิเคราะห์โครโมโซมต่อไป

ผลการทดลอง

1. การใช้อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ต่อเปอร์เซ็นต์ปลานิลเพศผู้โดยดูจากลักษณะเพศภายใน

ตารางที่ 1 แสดงเปอร์เซ็นต์เป็นเพศผู้จากการตรวจสอบลักษณะเพศจากภายในตัวปลา

ชุดการทดลอง	เปอร์เซ็นต์ที่เป็นเพศผู้
1. เหนี่ยวนำไข่ปลานิลที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แช่นาน 5 วินาที	72.22 ± 9.62
2. เหนี่ยวนำไข่ปลานิลที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แช่นาน 10 วินาที	78.89 ± 1.92
3. เหนี่ยวนำไข่ปลานิลที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แช่นาน 15 วินาที	64.44 ± 12.62

2. อัตรารอดตายของลูกปลานิล

ตารางที่ 2 อัตราการรอดตายของปลานิลที่เหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แช่นาน 5 และ 10 วินาที

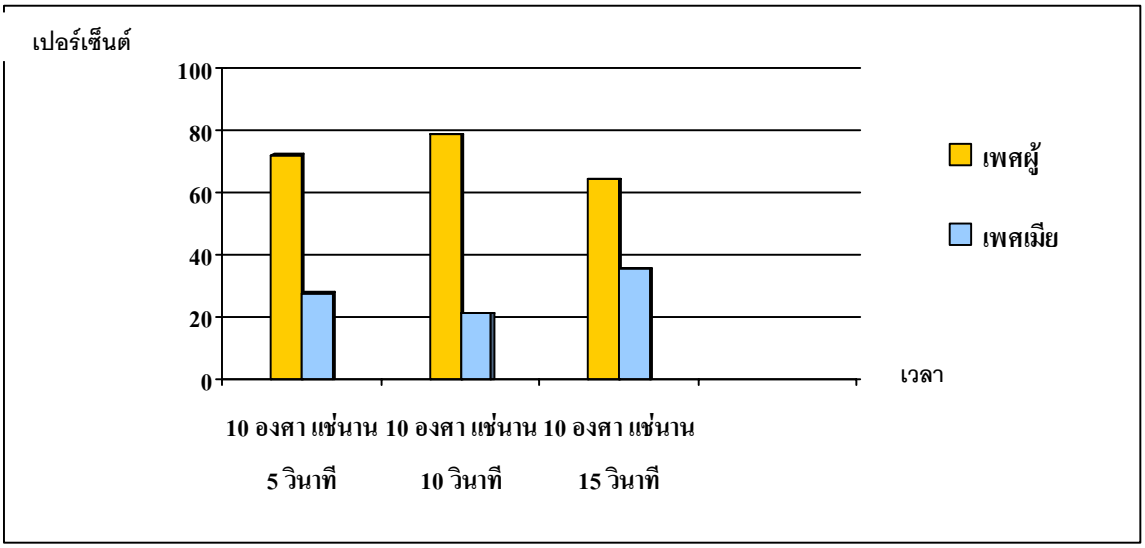
ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (เปอร์เซ็นต์)
1. เหนี่ยวนำไข่ปลานิลที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แช่นาน 5 วินาที	95.78 ± 0.84
2. เหนี่ยวนำไข่ปลานิลที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แช่นาน 10 วินาที	92.55 ± 1.07
3. เหนี่ยวนำไข่ปลานิลที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แช่นาน 15 วินาที	92.00 ± 2.96

หมายเหตุ : ± คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ตารางที่ 3 ผลอุณหภูมิต่ำ วินาทีต่างกัน ที่ 5 10 และ 15 วินาที ต่อสัดส่วนเพศปลานิลจากลักษณะภายในตัวปลา

เวลาแช่นาน	สัดส่วนเพศ			
	*เพศผู้ (ตัว)	*เพศเมีย (ตัว)	% เพศผู้	% เพศเมีย
5 วินาที	21.67	8.33	72.22	27.78
10 วินาที	23.67	6.33	78.89	21.11
15 วินาที	19.33	10.67	64.44	35.56

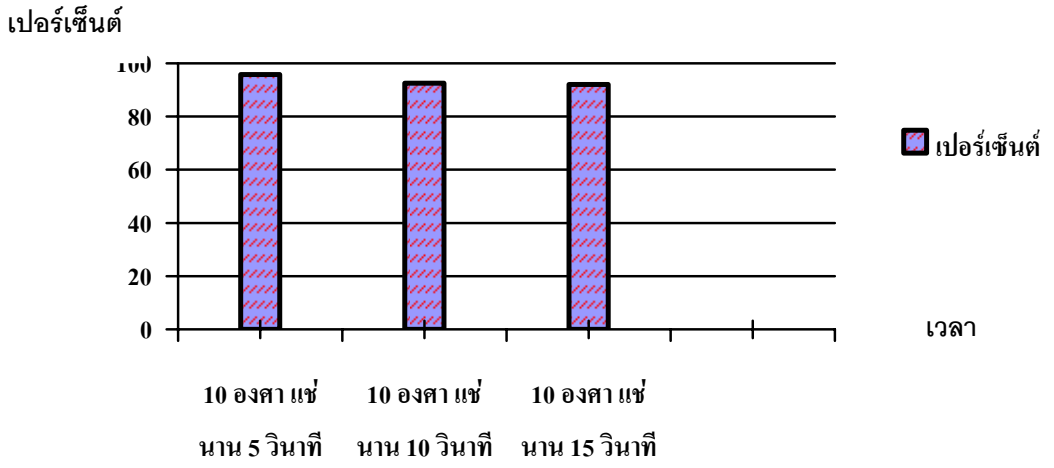
หมายเหตุ : * คือ ค่าเฉลี่ยจำนวนเพศปลา



กราฟที่ 1 ผลอุณหภูมิต่ำ วินาทีต่างกัน ที่ 5 10 และ 15 วินาที ต่อสัดส่วนเพศปลานิลจากลักษณะภายในตัวปลา

ตารางที่ 4 เปอร์เซ็นต์อัตรารอดตายของปลานิลที่เหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิต่ำ วินาทีต่างกัน ที่ 5 10 และ 15 วินาที

เวลาแช่นาน	จำนวนปลา ที่รอดตาย ($\bar{x}$) (ตัว)	คิดเป็น (%)
5 วินาที	287.33	95.78
10 วินาที	277.67	92.55
15 วินาที	276.00	92.00



กราฟที่ 2 เปอร์เซ็นต์อัตรารอดตายของปลานิลที่เหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิต่ำ วินาทีต่างกัน ที่ 5 10 และ 15วินาที

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เหนี่ยวนำเพศเมื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกัน อาจมีผลมาจากระยะเวลาในการแช่ไข่ปลานิลที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส มีความใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงพอจะกล่าวได้ว่า ระดับเวลาที่ใช้นานต่างกัน 3 ระดับที่นำมาทดสอบช็อคไ ข่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส โดยแช่สลับกับอุณหภูมิปกติ ไม่มีอิทธิพลต่อเพศปลานิลหรือมีความผิดปกติภายในเซลล์สืบพันธุ์และของเซลล์เม็ดเลือด ความผิดปกติในตัวอ่อนของลูกปลาเกิดจากการอนุบาลมากกว่าการแช่ไข่ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ที่จะก่อให้เกิดความผิดปกติภายในโครโมโซม โดยสังเกตจากการย้อมสีดูภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์และลักษณะภายนอกของลูกปลานิลที่แสดงออกมาไม่มีลูกปลาพิการ อัตราการฟักตัวสูง เหตุผลอาจเนื่องมาจากการนำไข่ปลาจากปากแม่ปลาระยะต้นๆไข่ได้พัฒนาเซลล์อย่างสมบูรณ์แล้ว ซึ่งเลยระยะเมตาเฟสที่จะทำให้เกิดขบวนการทริปพลอยด์หรือโพลีพลอยด์ไปการแสดงเปอร์เซ็นต์เพศผู้มากกว่าเพศเมียน่าจะเป็นเรื่องปกติของการกระจายเพศตามธรรมชาติ จากการทดลองครั้งนี้ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เหนี่ยวนำเพศไปทางเพศผู้การจะยืนยังให้แน่นชัดว่าอุณหภูมิต่ำมีผลต่อเพศจะต้องทดลองเพิ่ม นอกจากนั้นเรายังพบว่าไข่ปลานิลมีอัตราการฟักและรอดตายสูง เปอร์เซ็นต์การรอดตายสัมพันธ์กับเวลาที่อยู่ในอุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส การตรวจสอบความผิดปกติเซลล์ภายในเม็ดเลือด ความผิดปกติในตัวอ่อนของลูกปลาเป็นปกติ ดังนั้นพออธิบายได้ว่าการทดลองช็อคไข่ครั้งนี้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสโดยใช้ระยะเวลา 5-15 วินาที ไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำให้โครโมโซมเป็นทริพลอยด์หรือโพลีพลอยด์ การทดลองครั้งนี้มีทุนสนับสนุนน้อย ข้อมูลที่ได้จึงขาดความชัดเจนในแนวลึก แต่ก็นับได้ว่าเป็นพื้นฐานความรู้เรื่องการวิเคราะห์เม็ดเลือดแดงของปลานิลที่ถูกต้อง รวมถึงการเหนี่ยวนำเพศและการวิเคราะห์แยกเพศของปลานิลได้ถูกต้องมากขึ้นเพื่อนำไปสู่การศึกษา วิธีการเหนี่ยวนำไข่ปลาโดยการช็อคให้ได้โครโมโซมเป็นทริพลอยด์หรือโพลีพลอยด์ในครั้งต่อไป

เอกสารอ้างอิง

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

Cassni, J.R. and W.E. Caton. 1985. Induced triploidy in grass carp, *Ctenopharyngodon idella* Val. Aquaculture, 46:37-44.

Don, J. and R.R. Avtalion. 1988. Comparative study on the induction of triploidy in tilapias, using coid-and heat-shock techniques. J. Fish Biol., 32:665-672.

Henken, A.M., A.M. Brunink and C.J.J. Richter. 1987. Differences in growth rate and feed utilization between diploid and triploid African catfish, *Clarias gariepinus* (Burchell 1822). Aquaculture, 63: 233-242

Hussain, M.G., A. Chatterji, B.J. McAndrew and R. Johnstone. 1991. Triploidy induction in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. using pressure,heat and coid shock. Theor. Appl. Genet., 81:6-12.

Manickam, P. 1991. Triploidy induced by cold shock in the Asian catfish, *Clarias batrachus* (L.). Aquaculture,94: 377-379.

Na-Nakorn, U. and A. Lakhaanantakun. 1993. Comparison between the performance of diploid and triploid *Clarias macrocephalus*. BIOTROP Spec. Publ., 52:79-86.

Purdom, C.E. 1983. Genetic engineering by the manipulation of chromosome. Aquacuture, 33:287-300.

Refstie, T. 1981. tetraploidy rainbow trout produced by cytochalasin B. Aquacuture, 25:51-58.

Romashov, D.D. and V.N. Belyaeva. 1965. Increased yield of diploid gynogenetic loach larvae (*Misgurnus fossilis* L.) induced by temperature shock. *Cited after* Valenti, R.J. 1975. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment . J. Fish Biol., 7:519-528.

Teskeredzic, E., E.M. Donaldson, Z. Teskeredzic, I.I. Solar and E. McLean. 1993. Comparison of hydrostatic pressure and thermal shock to induce tripoidy in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). Aquacuture, 117:47-55.

Thorgaard, G.H. 1986. Ploidy manipulation and performance. Aquaculture, 57: 57-64.

Valenti, R.J. 1975. Induced polyploidy in *Tilapia aurea* (Steindachner) by means of temperature shock treatment. J. Fish Bioi., 7:519-528.

Wolters, W.R., C.L. Chrisman and G.S. Libey. 1982. Erythrocyte nuclear measurements of diploidy and triploidy channel catfish, *Ictalurus punctatus* (Rafinesque). J. Fish Biol., 20:253-258.

Yamamoto, F. and J. Goodier. 1993. Cytogenetic effects of hydrostatic pressure teeatment to suppress the first cleavage of salmon embryos. Aquaculture, 110: 51-59.