

This file has been cleaned of potential threats.

If you confirm that the file is coming from a trusted source, you can send the following SHA-256 hash value to your admin for the original file.

448f4a855c65624b9e6b5127518814169ee5040fc33699110488d638c58e436e

To view the reconstructed contents, please SCROLL DOWN to next page.

การชักนำเพศปลาช่อนทะเลให้เสถียรด้วยเทคนิคทางไฟฟ้า

เสาวลักษณ์ ขาวแสง¹, ศักย์ชิน บุญถวิล²

¹สาขาวิชาเทคโนโลยีและการจัดการสิ่งแวดล้อม คณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

²คณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้นำเสนอเทคนิคการแปลงเพศไข่ปลาช่อนทะเล (*Rachycentron canadum*) โดยใช้สนามไฟฟ้าแบบพัลส์กระตุ้นให้ผิวเซลล์ไข่ปลาขยายรูเปิดกว้างชั่วขณะซึ่งเป็นวิธีการใหม่ อาศัยแรงดันทางไฟฟ้านำพาสารละลายฮอร์โมนเพศผู้แอนโดรเจนเข้าสู่ภายในเซลล์เพื่อชักนำเพศให้เสถียรไข่ปลาช่อนทะเลที่ใช้ทดลองมีลักษณะทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.29 ± 0.02 มิลลิเมตร ช่วงอายุ 6-19 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ (hpf; hour post fertilization) บรรจุในช่องขั้วไฟฟ้า และกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์รูปคลื่นสี่เหลี่ยมที่มีคาบสัญญาณในหัวไมโครวินาที แอมพลิจูดของสัญญาณไฟฟ้าช่วง 100-350 VDC (เทียบเท่าสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มในช่วง 26.25-87.5 กิโลโวลต์ต่อเมตร) เหนี่ยวนำเพศในสารละลายสูตรที่คิดค้นขึ้นโดยเฉพาะ (Electroporation Medium, EPM) อยู่ในช่วงการจดสิทธิบัตร เป็นสารละลายที่มีส่วนผสมของฮอร์โมนเพศผู้ 17 α -Methyltestosterone (MT) กับสารละลายเนื้อเยื่อที่มีสภาพนำไฟฟ้าต่ำ ผลการทดลองพบว่าชุดแอมพลิจูด 350 VDC จำนวน 3 ลูกคลื่นคาบสัญญาณ 50 ไมโครวินาที ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT ช่วง 1,500-50,000 ไมโครกรัมต่อลิตรสามารถชักนำเพศไข่ปลาให้ขยายรูเปิดกว้างมากกว่า 1.5 เท่า อัตราแรกฟัก (Hatching) 35.71 ± 1.81 ถึง 89.28 ± 1.17 % (n=700) และอัตราการรอดตาย (Survival rate) 45.20 ± 1.71 % การทดลองประสบความสำเร็จที่ความหนาแน่นไข่ปลาช่วง 700-1,000 ฟอง/10 มิลลิลิตร เทคนิคนี้สามารถลดระยะเวลาในการดำเนินการแปลงเพศไข่ปลาในระยะเวลา 15 นาที/ชุดการทดลอง โดยใช้สารละลายที่ผสมฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 10 มิลลิลิตร

คำสำคัญ: ปลาช่อนทะเล, การแปลงเพศ, การขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์, ฮอร์โมนแอนโดรเจน, สนามไฟฟ้าแบบพัลส์รูปคลื่นสี่เหลี่ยม

Artificial sex induction of Cobia using electrical technique

Saowaluk Kawsang¹, Sakshin Bunthawin²

¹Faculty of Technology and Environment, Prince of Songkla University

²Biotechnology of Electromechanics, Science of Physics, Faculty of Technology and Environment
Prince of Songkla University

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 the freshwater. 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 the minimized concentration of the androgen hormone 17 α -Methyltestosterone (MT). Using the amplitude of 350 VDC of 3 square-wave pulses of 50 μ s duration with the concentration of 1,500-50,000 μ g.l⁻¹ MT could be made all-male sex reversal of hatching at 35.71 $\pm$ 1.81 to 89.28 $\pm$ 1.17% (n=700) with the maximum survival rate of 45.20 $\pm$ 1.71%. 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, Androgen hormone, square wave pulses

บทนำ

ปลาช่อนทะเลเป็นปลาทะเล จัดอยู่ในกลุ่ม Perciformes เป็นปลาสายพันธุ์เดียวที่อยู่ในวงศ์ Rachycentridae มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Rachycentron canadum* (Linnaeus, 1766) มีชื่อเรียกหลายชื่อ อาทิ Ling, Lemon fish, Crab-eater เป็นต้น เป็นปลาผิวน้ำที่อาศัยอยู่บริเวณเขตชายฝั่งทะเล และบริเวณไหล่ทวีป มีการเจริญเติบโตเร็ว ปลาชนิดนี้มีการแพร่กระจายในเขตทะเลอบอุ่น ยกเว้นพื้นที่ในเขตตอนกลางและฝั่งตะวันออกของมหาสมุทรแปซิฟิก ปลาช่อนทะเลโตเต็มที่จะมีความยาว 2 เมตร น้ำหนัก 61 กิโลกรัม ในธรรมชาติมีอายุยืนถึง 15 ปี จัดเป็นปลาเศรษฐกิจที่กำลังได้รับความสนใจ ลักษณะเนื้อปลานี้อร่อย ไม่มีกลิ่นคาว นิยมทำซาชิมิ และเป็นที่ต้องการในตลาดได้หวั่น (Jeffrey et al., 2005) อย่างไรก็ตาม ปลาชนิดนี้มีการแพร่พันธุ์โดยธรรมชาติน้อยแต่เป็นที่ต้องการจำนวนมากจึงไม่เพียงพอต่อผู้บริโภค ในปี ค.ศ.1975 มีการศึกษาค้นคว้าโดยคณะวิจัยจากนอร์ทคาโรไลน่า ประเทศสหรัฐอเมริกา เพื่อหาแนวทางในการรวบรวมไข่ปลาจากธรรมชาติ โดยนำมาเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตในระบบปิดจนเป็นที่สำเร็จในระดับหนึ่งแต่ยังได้จำนวนน้อย ต่อมาได้มีผู้พัฒนาผลงานวิจัยต่อยอด จนกระทั่งในปี ค.ศ. 1990 ได้มีรายงานผลการเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลโดยใช้พ่อแม่พันธุ์ปลาที่จับได้โดยธรรมชาตินำมาเพาะเลี้ยงในระบบปิดจนวางไข่ได้เป็นที่สำเร็จ หลังจากนั้นจึงมีผู้นำผลงานวิจัยไปใช้ต่อยอดในเชิงพาณิชย์จนทำให้ในปี 2002 ผลิตปลาช่อนทะเลทั่วโลกทั้งจากการเลี้ยงและจับจากธรรมชาติมีประมาณ 10,416 ตัน ซึ่งประเทศที่ผลิตปลาช่อนทะเลได้มากที่สุด 5 อันดับแรกได้แก่ประเทศไต้หวัน ปากีสถาน ฟิลิปปินส์ บราซิล และสหราชอาณาจักรอาหรับ เอมิเรต ในปัจจุบันประเทศไต้หวันเป็นผู้ผลิตปลาช่อนทะเลอันดับต้น

ของโลก และมีการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงอย่างเป็นรูปธรรมเพื่อมุ่งเป้าสู่อุตสาหกรรมการค้า จนกระทั่งในปี 2004 ประเทศไต้หวันได้พัฒนาเทคนิควิธีการเลี้ยงจนเพิ่มขีดความสามารถในการส่งออกมีผลผลิตเฉลี่ย 5,000 ตันได้เป็นที่สำเร็จ (Allen, 2000; Florida Museum, 2007) ทั้งนี้เทคนิควิธีการเพาะเลี้ยงยังมีประเด็นเปิดที่ต้องพัฒนาต่อยอดหลายประเด็น อาทิเช่น ความเสถียรของเพศของพ่อแม่พันธุ์ปลาในระหว่างผสมพันธุ์ช่วงอายุ 1-3 ปีแรก

ในปี พ.ศ.2548 รัฐบาลนอร์เวย์ได้ให้ความช่วยเหลือประเทศไทยภายหลังจากการเกิดธรณีพิบัติ ภัยใต้โครงการความช่วยเหลือแก่ผู้ประสบภัยสึนามิและฟื้นฟูทรัพยากรธรรมชาติ วัตถุประสงค์ของโครงการดังกล่าวเพื่อพัฒนาอุตสาหกรรมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและพัฒนาการเลี้ยงปลาในกระชังขนาดใหญ่ โดยรัฐบาลนอร์เวย์ได้สนับสนุนการช่วยเหลือส่งผู้ที่มีความเชี่ยวชาญทางด้านวิชาการและการปฏิบัติในการเลี้ยงปลาช่อนทะเล (Cobia) ในกระชังขนาดใหญ่ กรมประมงจึงให้การส่งเสริมเกษตรกรเพาะเลี้ยงปลาช่อนทะเลเพื่อเพิ่มรายได้และสนับสนุนเป็นสินค้าส่งออกเพื่อตอบสนองความต้องการของท้องตลาด สามารถขายได้ในตลาดภายในประเทศและต่างประเทศ โดยเฉพาะประเทศญี่ปุ่นและประเทศไต้หวัน เนื่องจากความต้องการของประเทศไต้หวันต้องการปลาที่ได้ขนาดเพื่อทำเป็นปลาแช่เย็นส่งโรงงานแปรรูป (กรมประมง, 2552; Liao et al., 2004)

ปัจจุบันมีการนำฮอร์โมน 17 α -Methyltestosterone (MT) ซึ่งเป็นฮอร์โมนแอนโดรเจนที่นิยมใช้มากในการแปลงเพศปลาให้เป็นเพศผู้ โดยใช้เทคนิคการผสมฮอร์โมน MT ในอาหาร เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต ซึ่งวิธีการดังกล่าวเป็นการเพิ่มอัตราการแลกเนื้อในปลาให้สูงขึ้นและลดระยะเวลาในการเลี้ยง

(เรณู ว่องส่งสาร และคณะ, 2549) ทำให้ออร์โมนดังกล่าวมีการใช้ในการเพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้น โดยปกติออร์โมน MT จะสลายตัวเมื่อถูกแสงแดด ความร้อน และถูกย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ การตกค้างของสารออร์โมน MT เกิดขึ้นในบริเวณที่ไม่ได้รับแสงและความร้อน (Fitzpatrick et al., 1998) ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมระบบนิเวศของสิ่งมีชีวิตและต่อผู้บริโภค (เพ็ญพรรณ, 2546)

งานวิจัยนี้ทำการแปลงเพศไข่ปลาซ่อนทะเลด้วยวิธีทางไฟฟ้าซึ่งเป็นเทคนิคแรกของโลกเพื่อลดปริมาณการใช้สารออร์โมนเพศ MT ลดระยะเวลา และลดโอกาสการปนเปื้อนสารออร์โมนเพศสังเคราะห์สู่ธรรมชาติ เป็นผลงานต่อยอดโดยคณะผู้วิจัยได้เริ่มศึกษากับไข่ปลานิลที่มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (Bunthawin et al., 2015) แล้วขยายผลต่อกับไข่ปลาเศรษฐกิจน้ำเค็ม ทดลองกับไข่ปลาปลาซ่อนทะเลที่มีการปฏิสนธิแล้ว แขนงสารละลายออร์โมนเพศแล้วกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์สี่เหลี่ยม ความเข้มสูงเป็นจังหวะที่เหมาะสมกับลักษณะไข่ปลา อาศัยเงื่อนไขทางไฟฟ้าที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำเซลล์ไข่ปลาให้ขยายรูเปิดกว้างชั่วคราว (Chang et al., 1992) เพื่อเสริมประสิทธิภาพการนำพาวนุภาคของออร์โมนเข้าสู่ภายในเซลล์โดยอาศัยแรงทางไฟฟ้าเป็นตัวกระตุ้น ศึกษาตรวจสอบสัณฐานลักษณะของไข่ปลาบริเวณพื้นผิวเซลล์ไข่ปลาผ่านภาพถ่าย SEM เพื่อดูลักษณะพื้นผิวเซลล์ไข่ปลา ความหนาแน่นรูที่ผิวขนาดความกว้างของรูชุดควบคุมและชุดที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า ทั้งนี้ชุดอุปกรณ์ไฟฟ้าที่ได้พัฒนาขึ้นนี้อยู่ในระหว่างการจดสิทธิบัตร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาค่าศักยภาพทางไฟฟ้าที่เหมาะสมในการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาซ่อนทะเลด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์สี่เหลี่ยม

2. เพื่อศึกษาปริมาณการใช้สารออร์โมนเพศ (MT) ที่เหมาะสมในการแปลงเพศไข่ปลาซ่อนทะเล

เทคนิคในการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาซ่อนทะเลด้วยสนามไฟฟ้าที่เหมาะสมในการขยายรูเปิดเยื่อหุ้มเซลล์ให้เปิดกว้างชั่วคราว เพื่อนำสารละลายออร์โมน MT เข้าสู่ภายในเซลล์ที่ความเข้มข้นของออร์โมนที่เหมาะสมกับเซลล์ไข่ปลาไม่ให้เซลล์ได้รับความเสียหายโดยตรงเพื่อประสิทธิภาพในการแปลงเพศปลาซ่อนทะเล

ระเบียบวิธีวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างไข่ปลาเพื่อเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า

เก็บไข่ปลาซ่อนทะเลในช่วงอายุ 6-19 ชั่วโมง หลังการปฏิสนธิ (hour post fertilization, hpf) โดยเริ่มสุ่มตัวอย่างไข่ปลาที่มีอายุ 4-5 hpf เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์และระยะการพัฒนาของไข่ปลาที่จะนำมาใช้ วิธีการเก็บมีดังนี้

1.1 เก็บไข่ปลาในบ่อโดยวิธีการลากอวนที่มีขนาดตา 20 ไมโครเมตร โดยใช้อวนลากไปในทิศทางเดียวกันหลายชั่วโมง ตักพักไข่ปลาไว้ในถังที่มีการเติมออกซิเจนตลอดเวลา

1.2 แยกไข่ดีและไข่เสียโดยพิจารณาจากลักษณะการลอยและจมของไข่ (ไข่ดีจะลอยน้ำ/ไข่เสียจะจมน้ำ) ตักไข่ที่ลอยผิวน้ำแยกไว้ (ในบางกรณีใช้วิธีการเอาตะกอนออกด้วยการดูดสายยาง)

1.3 พิจารณากำหนดระยะของศัพอายุของไข่ปลาโดยมองผ่านกล้องจุลทรรศน์ระยะศัพอายุที่มีการปฏิสนธิแล้วที่ใช้ในงานวิจัยนี้อยู่ในช่วงระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะบลาสโตพอร์ (Blastopore) ซึ่งยังไม่มีการพัฒนาเพศ

ที่ชัดเจน (Sakthival et al., 2012; อาคม สิงห์บุญ และคณะ, 2555)

1.4 แช่ไข่ปลาช่อนทะเลที่คัดระยะช่วงอายุแล้วจำนวน 700-1000 ฟอง ในสารละลาย EPM 10 มิลลิกรัม ที่มีส่วนผสมของสารละลายฮอร์โมน 17 α -Methyltestosterone (MT) ความเข้มข้น 1,500-50,000 ไมโครกรัมต่อลิตร นานประมาณ 10 นาที ใช้สนามไฟฟ้ากระตุ้นไข่ปลาด้วยสัญญาณไฟฟ้าแบบพัลส์ (Pulse-wave electric field) จำนวน 3 ลูกคลื่น คาบสัญญาณ 50 ไมโครวินาที ค่าความต่างศักย์ของสัญญาณไฟฟ้าช่วง 100-350 VDC (เทียบเท่าสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มข้นในช่วง 26.25-87.5 กิโลโวลต์ต่อเมตร) แบ่งชุดตัวอย่างไข่ปลาออกเป็นสองชุดเพื่อนำไปถ่ายภาพ SEM และนำไปเพาะเลี้ยงตามลำดับ

2. ตรวจสอบสัณฐานไข่ปลาช่อนทะเลด้วยภาพถ่าย SEM

ตรวจสอบสัณฐานของไข่ปลาช่อนทะเลโดยวิธีการพิจารณาผลจากภาพถ่าย “Scanning Electron Microscope” (SEM) ส่งตัวอย่างที่ผ่านการตรึงสภาพ (fixation) แล้วไปยังศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์เพื่อตรวจสอบลักษณะโครงสร้าง ทั้งนี้ผู้วิจัยได้รักษาสภาพตัวอย่างไข่ปลาที่ผ่านการเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าด้วยสาร Formaldehyde (CH₂O)_n 4% ตัวแปรที่ถูกนำมาพิจารณาลักษณะทางกายภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ของไข่ปลา ได้แก่ ความหนาแน่นรูที่ปรากฏที่ผิวไข่ปลา ลักษณะของรู และขนาดความกว้างของรู การตรึงสภาพ (fixation) ไข่ปลาช่อนทะเลกระทำโดยใช้สาร Formaldehyde (CH₂O)_n 4% ที่ละลายใน 0.2 N ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง ล้างไข่ปลาด้วย 0.1 N ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง ตามด้วยล้างไข่ปลาด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง ขจัดน้ำออกจากไข่ปลาโดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์จากระดับความเข้มข้นต่ำ ๆ ไปจนถึงเอทิลแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ตามความเข้มข้นดังนี้

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

3. การสัณนัยจำนวนตัวอ่อนปลาช่อนทะเล

สัณนัยลูกปลาในช่วงระยะมีการฟัก (Hatching) โดยใช้ปีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิกรัม สุ่มตักในถังเพาะฟัก สัณนัยลูกปลา 3 ครั้งต่อ 1 ถัง หาค่าเฉลี่ยและเทียบกับปริมาณน้ำทั้งหมดภายในถังเพาะฟัก ปริมาณของลูกปลาทั้งหมดที่คำนวณได้นี้เป็นวิธีเดียวกับการนับไข่ ตามวิธีการของวุฒิชัย อ่อนเอี่ยม และคณะ (2552) หลังจากการฟัก (Hatching) ของตัวอ่อนปลาช่อนทะเล 3 วัน จะใช้วิธีการนับโดยการลดปริมาณน้ำที่มีทั้งหมดแล้วนับจำนวนปลาทั้งหมดที่มีชีวิตอยู่ จะทำให้ได้ค่าอัตราการรอดตายของตัวอ่อนปลาช่อนทะเล

4. อุปกรณ์ขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาด้วยไฟฟ้า

งานวิจัยนี้ได้รับความร่วมมือจากศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ ช่วยผลิตอุปกรณ์เครื่องกำเนิดสัญญาณไฟฟ้าสำหรับขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาด้วยไฟฟ้าที่สามารถปรับพารามิเตอร์ทางไฟฟ้าได้ เช่น ศักย์ไฟฟ้า และเงื่อนไขสัญญาณพัลส์แบบสี่เหลี่ยม

ผลการวิจัย

จากการทดลองเพื่อลดปริมาณฮอร์โมน MT ที่ใช้ในการแปลงเพศปลาช่อนทะเลโดยพิจารณาจากการฟัก (Hatching) และอัตราการรอดตาย (Survival rate) โดยในการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า กำหนดค่าความต่างศักย์เริ่มต้นที่ 350 โวลต์ และเพิ่มค่าความต้านทานที่ 100, 1,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ มีเงื่อนไขรูปสัญญาณพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (T_{on} และ T_{off}) จำนวนลูกคลื่น 3 พัลส์

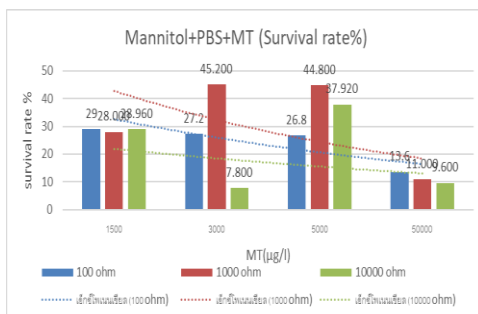
คาบสัญญาณ 50 ไมโครวินาที ได้ผลทั้งหมด ดังกราฟที่ 1

สารละลาย EPM 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 ผลการทดลองดังกราฟที่ 1

สารละลาย EPM ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 3,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 71.429 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 1,000 โอห์ม มีอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 45.20 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองดังกราฟที่ 1

สารละลาย EPM 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 ผลการทดลองดังกราฟที่ 1

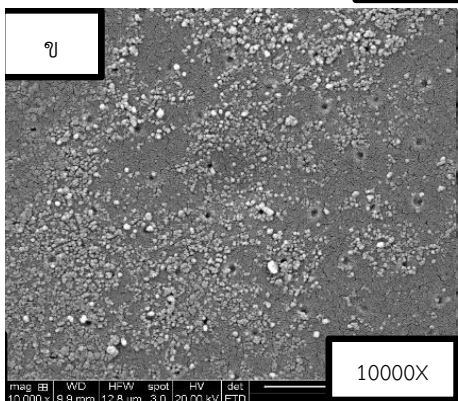
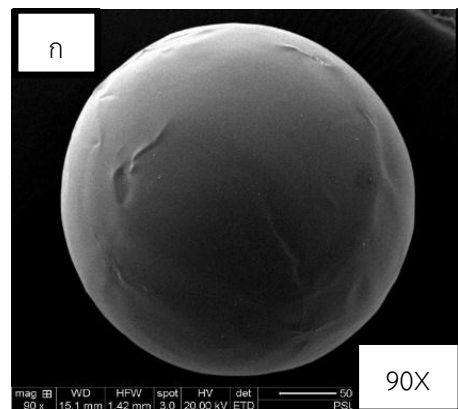
สารละลาย EPM ที่มีส่วนผสมของสารละลาย MT 50,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟัก 35.71 ± 1.81 ถึง 71.43 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ และพบว่าชุดการทดลองที่เพิ่มค่าความต้านทาน 100 โอห์ม มีอัตราการรอดตายมากที่สุดคือ 13.60 ± 1.81 เปอร์เซ็นต์ ผลการทดลองดังกราฟที่ 1

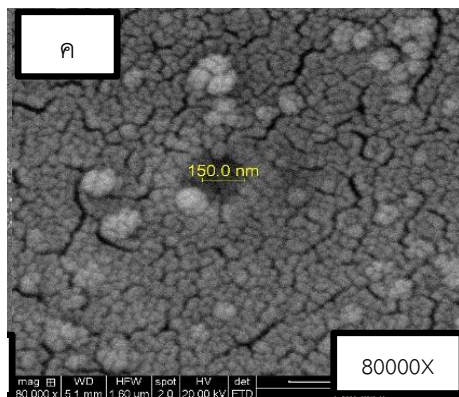


กราฟที่ 1 ผลการทดลองอัตราการฟัก (Hatching) และอัตราการรอด (Survival rate)

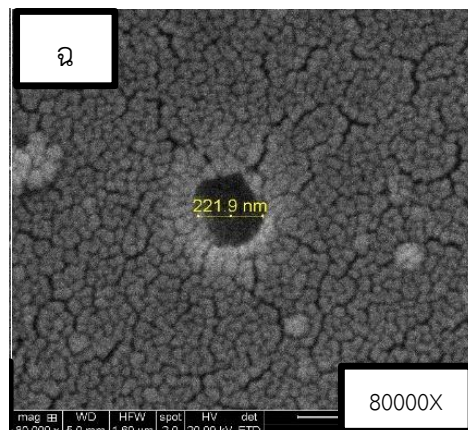
ผลตรวจสอบสัณฐานไข่ปลาซ่อนทะเล ด้วยภาพถ่าย SEM

ผลการตรวจสอบสัณฐานลักษณะของไข่ปลาซ่อนทะเลและลักษณะพื้นผิวเซลล์ไข่ปลาซ่อนทะเลผ่านภาพถ่าย SEM เพื่อดูลักษณะของไข่ปลาซ่อนทะเลมีความหนาแน่น และขนาดความกว้างของรูบริเวณพื้นผิวไข่ปลาซ่อนทะเลพบว่าบริเวณพื้นผิวเปลือกไข่ปลาซ่อนทะเลชุดควบคุมมีขนาดรูกว้าง 150 นาโนเมตร ตามภาพที่ 1 (ก) และการทดลองในการแช่ไข่ปลาซ่อนทะเลในสารละลาย EPM ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมน MT ที่เหนี่ยวนำด้วยศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ เพิ่มตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม คาบสัญญาณเวลา 50 ไมโครวินาที จำนวนลูกคลื่น 3 พัลส์ พบว่า บริเวณพื้นผิวเปลือกไข่ปลาซ่อนทะเลมีขนาดความกว้างของรู 221.9 นาโนเมตร ตามภาพที่ 2 (ฉ)

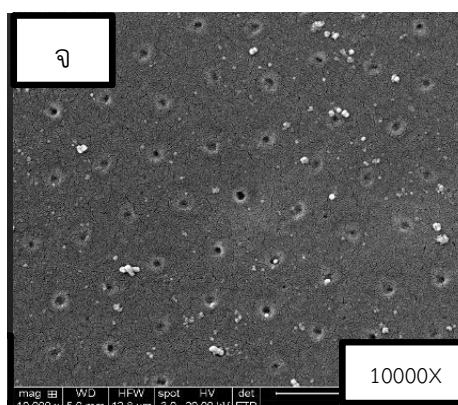
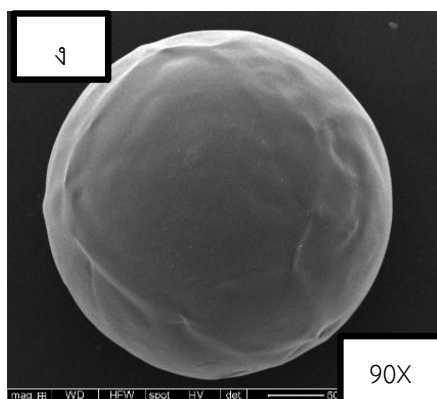




ภาพที่ 1 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ลักษณะไขปลาช่อนทะเลชุดควบคุม



ภาพที่ 2 ภาพถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงความหนาแน่นลักษณะ และขนาดความกว้างของรูในไขปลาช่อนทะเล (ง), (จ), (ฉ) ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ ตัวต้านทานขนาด 100 โอห์ม, 50 ไมโครวินาที, 3 พัลส์



สรุปและอภิปรายผล

ไขปลาช่อนทะเลเป็นไขประเภทไขลอย มีขนาดไข 1.29 ± 0.02 มิลลิเมตร มีการฟักเป็นตัวใช้เวลา 22 ชั่วโมง หลังจากไขได้รับการปฏิสนธิที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งมีความใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาศัพทวิทยาของ Sakthivel et al., (2012) และอาคม สิงหนุน และคณะ, (2555) รายงานว่าปลาช่อนทะเลฟักเป็นตัวที่ 22 ชั่วโมง 20 นาที อุณหภูมินี้ในช่วง 28.5-30 องศาเซลเซียส ไขปลาช่อนทะเลมีลักษณะการแบ่งเซลล์แบบ Meroblastic Cleavage คือ ไข่จะมีการแบ่งเซลล์เฉพาะด้านบน Animal pole เท่านั้น ส่วนทางด้าน Vegetal pole ไม่มีการแบ่งเซลล์ (วีระพงศ์, 2536)

งานวิจัยนี้เป็นโครงการแรกที่ประยุกต์ใช้เทคนิคการขยายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ไขปลาด้วยสนามไฟฟ้า (Electroporation) เพื่อขยายรูเปิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของไขปลาช่อนทะเลโดยเหนี่ยวนำอนุภาคสารฮอร์โมนเพศ 17 - Methyltestosterone (MT) ที่มีส่วนประกอบ

ความเข้มข้นของสารละลายที่เหมาะสมต่อการเหนี่ยวนำไข่ปลาน้ำเค็มด้วยแรงสนามไฟฟ้าในขณะที่ยาเจริญเติบโตช่วงขณะ เมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษากับเซลล์เม็ดเลือดแดงมนุษย์ (Chang et al., 1992) พบว่า เป็นไปในทางเดียวกันกล่าวคือ สนามไฟฟ้าที่มีค่าเฉพาะเท่านั้นที่จะมีผลต่อการเปิดขยายรูที่ผิวเซลล์เพื่อเสริมประสิทธิภาพการนำพาอนุภาคของฮอร์โมนเข้าสู่ภายในเซลล์ โดยอาศัยแรงทางไฟฟ้าเป็นตัวกระตุ้น ในการเหนี่ยวนำด้วยสนามไฟฟ้า กำหนดค่าความต่างศักย์เริ่มต้นที่ 350 โวลต์ เมื่อเพิ่มค่าความต้านทานที่ 100 1,000 และ 10,000 โอห์ม ตามลำดับ เจือปนโซลูชันสัญญาณพัลส์แบบสี่เหลี่ยม (T_{on} และ T_{off}) คาบสัญญาณ 50 ไมโครวินาที จำนวนลูกคลื่น 3 พัลส์ ผลการทดลองตามเงื่อนไขดังกล่าวพบว่า ชุดสารละลาย EPM ที่มีส่วนผสมของฮอร์โมนความเข้มข้น 1,500-50,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ความต่างศักย์ไฟฟ้าตามที่กำหนดข้างต้นนั้น มีอัตราการฟัก (Hatching) อยู่ในช่วงระหว่าง 35.71 ± 1.81 ถึง 89.28 ± 1.17 เปอร์เซ็นต์ ($n=700$) และอัตราการรอดตายสูงสุด (Survival rate) เท่ากับ 45.2 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองที่ความเข้มข้นฮอร์โมน MT ที่ 3,000 ไมโครกรัมต่อลิตร มีอัตราการรอดตายสูงสุดเท่ากับ 45.20 ± 1.71 เปอร์เซ็นต์ กรณีชุดค่าความต่างศักย์เริ่มต้นที่ 350 โวลต์ ที่เพิ่มค่าความต้านทานที่ 100 โอห์ม โดยมีเจือปนโซลูชันสัญญาณพัลส์แบบสี่เหลี่ยมที่ 50 ไมโครวินาที จำนวนลูกคลื่น 3 พัลส์ สามารถขยายรูไข่ปลาซ่อนทะเลได้ประมาณ 1.5 เท่า ซึ่งมีความกว้างของรูเท่ากับ 221.9 นาโนเมตร ซึ่งมีขนาดมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีขนาด 150 นาโนเมตร จากการทดลองข้างต้น พบว่า เมื่อความเข้มข้นของสารละลายฮอร์โมนเพศเพิ่มขึ้นจะส่งผลต่ออัตราการฟักและอัตราการรอดของปลาซ่อนทะเล

โดยสรุปงานวิจัยนี้ประสบผลสำเร็จในการกระตุ้นเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ปลาซ่อนทะเลให้รูเปิดกว้างด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์รูปคลื่นสี่เหลี่ยมที่มีคาบสัญญาณในช่วงไมโครวินาที แอมพลิจูดของสัญญาณไฟฟ้าช่วง 100-350 VDC (เทียบเท่าสนามไฟฟ้าที่มีความเข้มข้นในช่วง 26.25-87.5 กิโลโวลต์ต่อเมตร) ความเข้มข้นของสารละลายฮอร์โมนเพศ MT ที่เหมาะสมช่วง 1,500-5,000 ไมโครกรัมต่อลิตร ที่ความหนาแน่นไข่ปลาช่วง 700-1,000 ฟองต่อ 10 มิลลิลิตร หากวิธีการนี้ใช้ได้ผลกับการแปลงเพศปลาจะลดระยะเวลาในการดำเนินการแปลงเพศไข่ปลาในระยะเวลา 15 นาทีต่อการทดลอง ซึ่งการทดลองนี้เป็นงานวิจัยต้นแบบที่สามารถนำไปใช้ต่อยอดกับเซลล์ไข่ปลาทะเลชนิดอื่นที่มีลักษณะที่คล้ายคลึงกัน

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้ทดลองแรกเริ่มกับไข่ปลาซ่อนทะเลที่ระยะบลาสตูล่า (Blastula) ถึงระยะ บลาสโตพอร์ (Blastopore) เท่านั้น ส่วนระยะอื่นยังไม่ได้ทำการศึกษาเพราะกรอบข้อจำกัดด้านระยะเวลาดำเนินการและงบประมาณ กอปรกับปลาชนิดนี้มีระยะเวลาในการพัฒนาตัวอ่อนในระยะเวลาที่รวดเร็ว อีกทั้งไข่ปลามีขนาดเล็กจึงไม่สามารถนับจำนวนที่แน่นอนได้ในแต่ละชุดการทดลอง

กิตติกรรมประกาศ

ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากคณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อมมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง จังหวัดภูเก็ต ที่ให้ความอนุเคราะห์ไข่ปลาซ่อนทะเล

References

- Allen, G. (2000). **Marine Fishes of South-East Asia**. Periplus Editions. Singapore. 118-119.
- Bunthawin S., Sornsilpa T., Tuantranont A., Jaruwongrungrueng 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.
- Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A. and Sowers, A. E. (1992). **Guide to Electroporation and Electrofusio**. Academic Press, San Diego, California.
- Coastal Fisheries Research and Fisheries Office. (2009). **Breeding Cobia is not hard**. Create Money Create Job, Vol. 6. 64. 95-97.
- 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. Egn (Editors), Fifteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, pp. 29-34.
- Florida Museum of Natural History Ichthyology Department. (2007). Retrieved from <http://www.flmn.h.ufl.edu/fish>
- Jeffrey B. Kaiser and G. Joan Holt. (2005). **Species Profile Cobia**. SRAC Publication. No.7202.
- 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.
- Oniam, V., Wechakama, T., & Vichaimuang, S. (2009). **The survival rate of Blue Swimming Crab (Portunus pelagicus Linnaeus, 1758) larvae from Broodstocks's earthen ponds**. 381-387. Full text in 4th Conference: Fisheries, Kasetsart University, Bangkok.
- Sakthivel, M., Abdul Nazar, A. K., Tamilmani, G., Kalidas, C., Ramamoorthy, N., Ashok Maharshi, V., Srinivasa Rao, K., & Gopakumar, G.. (2012). **Embryonic development of cobia, Rachycentron canadum (Linnaeus, 1766) in controlled conditions**. The Marine Biological Association of India, 54, 5-8.
- Singhabun, A., Bunlipatanon, P., Detsathit, S., Klingsukklai, P., & Chairat, P. (2012). **Scientific Commons: Science and development of fish larvae, Rachycentron canadum Linnaeus, 1766**. Krabi Coastal Fisheries Research and Development Center. Department of Fisheries.
- Srisakultiew, P. (2003). **Study on status of Nile tilapia sex reversal to reduce cost**. Research Fund, Ministry of Fisheries.
- Vuthiphandchai, V. (1993). **Breeding fish**. Bangkok: Odean Store. 195.

Wongsongsarn, R., & Yurong, N. (2006).

Guide to producing sexed tilapia.

Udon Thani Fresh Water Fisheries

Research and Development Center.