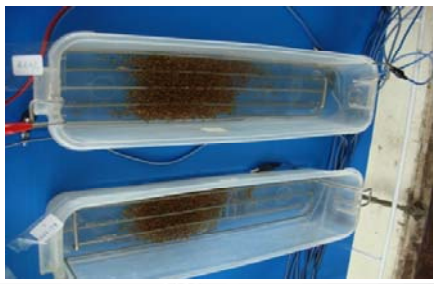
รายงานฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มประสิทธิภาพวิธีการแช่เหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้
Increasing Immersion Efficiency of Male Nile Tilapia Induction



โดยรองศาสตราจารย์. ดร. เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียวและคณะ

มิถุนายน 2558

สัญญาเลขที่ RDG5520076

รายงานฉบับสมบูรณ์

การเพิ่มประสิทธิภาพวิธีการแช่เหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้
Increasing Immersion Efficiency of Male Nile Tilapia Induction

รศ. ดร. เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว คณะเกษตรศาสตร์
นายสุนทร กัณหาสุระ โรงพยาบาลศรีนครินทร์
มหาวิทยาลัยขอนแก่น

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบาญ

	หน้า
บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร	1
บทคัดย่อ	2
บทนำ	3
การศึกษาจากเอกสาร	4
วิธีการทดลอง	10
ผลการทดลอง	20
วิจารณ์ผล	35
เอกสารอ้างอิง	39

บทสรุปย่อสำหรับผู้บริหาร
(Executive Summary)

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดเศรษฐกิจอันดับหนึ่งของไทย เกษตรกรนิยมเลี้ยงปลานิลเพศผู้ที่ผ่านการใช้ฮอร์โมนเหนี่ยวนำเพศหรือปัจจุบันเรียกว่าการแปลงเพศ เพราะปลานิลเพศผู้มีการเจริญเติบโตดี และมีขนาดสม่ำเสมอ เพ็ญพรรณ (2546) ทำการทดลองแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแช่ พบว่ามีประสิทธิภาพดีที่ความหนาแน่นต่ำ (35 ฟอง/ลิตร) ขณะที่การแช่ที่ความหนาแน่นสูง (20,000 ฟอง/ลิตร) ร่วมกับโต๊ะขยับสารละลาย (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 5254) เพื่อการค้า มีประสิทธิภาพต่ำคือได้เพศผู้ไม่ต่างจากชุดควบคุม ส่งผลให้อนุสิทธิบัตรที่จดทะเบียนไว้ยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ เมื่อผู้วิจัยดำเนินโครงการ “การเพิ่มประสิทธิภาพวิธีการแช่เหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้มา 2 ปี พบว่า วิธีการแช่ไข่หรือลูกปลาในสารละลายฮอร์โมนผสมหรือไม่ผสมสารเพิ่มการซึมผ่าน (vehicles) โดยลำพัง ไม่สามารถเหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้ได้ ต้องมีการใช้ปัจจัยภายนอกช่วยเหนี่ยวนำร่วมด้วย ดังที่ รศ.ดร. ศักดิ์ชิน บุญถวิล ออกแบบเครื่อง sequential signal pulse-generator ใช้ไฟฟ้า 0.25 - 87.5 kV/m นาน 5 – 1,000μs จำนวน 1- 5 ครั้ง กระตุ้นการขยายของรูเยื่อหุ้มเซลล์ได้ สามารถใช้แปลงเพศปลานิลได้ร้อยละ 91.25 แต่เครื่องนี้ทำงานครั้งละ 50 ฟอง ใช้งานได้เฉพาะไข่ปลาเท่านั้น ขณะนี้กำลังจะถูกพัฒนาให้มีขนาดใหญ่เพื่อการค้า จุดอ่อนของวิธีการของ รศ.ดร. ศักดิ์ชิน คือ ขาดความรู้และประสบการณ์ในเรื่องชีววิทยาการวางไข่ การจัดการโรงเพาะฟักปลานิล และการวางแผนการทดลองแปลงเพศปลานิลที่ถูกต้อง ทำให้ผลงานที่ออกมาขาดความน่าเชื่อถือ อีกทั้งการออกแบบพัฒนาตัวเครื่องรวมทั้งอุปกรณ์สำหรับเหนี่ยวนำเพศในโรงเพาะฟักที่เหมาะสม และสามารถใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพนั้น จำเป็นต้องใช้องค์ความรู้ดังที่กล่าวมา โครงการเพิ่มประสิทธิภาพฯ ที่ผู้วิจัยดำเนินการนี้ได้พัฒนาโต๊ะขยับสารละลายให้มีน้ำหนักเบากะทัดรัด และออกแบบถาดสำหรับเหนี่ยวนำเพศที่สามารถใช้กับไข่หรือลูกปลาได้พร้อมกันครั้งละประมาณ 100,000 ฟองหรือตัว ด้วยไฟกระแสตรง 12 V ผู้วิจัยทดลองเหนี่ยวนำเพศปลานิลในระยะไข่และลูกปลาแบบเป็นครั้ง 1- 6 ครั้ง และแบบเป็นชุด ชุดละ 3 ครั้ง พบว่าวิธีการเหนี่ยวนำทั้ง 2 แบบ จำนวน 6 การทดลอง ยังไม่ส่งผลต่อการเหนี่ยวนำเพศปลานิล ทั้งนี้ไม่ได้หมายความว่าวิธีการดังกล่าวไม่สามารถเหนี่ยวเพศปลา แต่ต้องใช้เวลาในการพัฒนามากกว่าระยะเวลาที่กำหนด

บทคัดย่อ

โครงการนี้ มีวัตถุประสงค์ที่จะพัฒนาวิธีการแช่เหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้ให้มีประสิทธิภาพร้อยละ 95 ด้วยการใช้สารเพิ่มการซึมผ่าน 3 ชนิด ประกอบด้วยกรดโอลิอิก (oleic acid) โพรไพลินไกลคอล (propylene glycol) และไดเมทิวซัลฟอกไซค์ (dimethylsulfoxide) พบว่าสามารถใช้สารเคมีทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 โดยไม่เป็นพิษต่อไข่ปลา ทำการทดลองแช่ที่ความหนาแน่นต่ำ (40 ฟองหรือตัว/ลิตร) และสูง (20,000 ฟอง/ลิตร) ทั้งในระยะไข่หรือลูกปลาวัยอ่อน พบว่าฮอร์โมนไม่สามารถซึมผ่านเข้าสู่ตัวปลา ปริมาณลูกปลาเพศผู้ของทุกชุดการทดลองที่ใช้ฮอร์โมนมีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุม เมื่อเพิ่มปัจจัยกายภาพ คือไฟฟ้ากระแสตรง (12 โวลต์) ครั้งละ 1 – 2 วินาที พัก 3 – 10 วินาที แบบเป็นครั้งจำนวน 1 - 6 ครั้ง และแบบเป็นชุด (3 ครั้ง/ชุด) ทำการทดลองในปลานิลและปลาหมอไทยไปแล้ว พบว่าวิธีการยังไม่ส่งผลต่อการเหนี่ยวนำเพศปลา

Abstract

The project aimed to increase immersion efficiency producing 95% male tilapia. Using 3 chemical vehicles: oleic acid, propylene glycol and dimethylsulfoxide found the 0.5% vehicles was the un-toxic dose. The chemical vehicles showed no effect to increase efficiency of the male tilapia in low (40 eggs or fry/L) and high (20,000 eggs or fry/L) immersion densities. When a physical factor (electricity; DC 12 V, time on 1-2s, and time off 3-10s) for 1 – 6 times and the sets of 3 times were used and found no effect to increase the male percentage. Experiments on using the sets of 3 time on DC 12V were conducted in tilapia and common climbing perch. The results showed no effect to induce both of them sex reversal.

1. บทนำ

ปลานิลในประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงมานานมากกว่า 40 ปี พื้นที่การเลี้ยงในปี พ.ศ. 2555 รวม 450,699 ไร่ คิดเป็นร้อยละ 48.1 ของพื้นที่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืดทั้งประเทศ (936,553 ไร่) ปริมาณผลผลิตปลานิลรวม 203,000 ตัน มูลค่า 9,635,936 ล้านบาท (ศูนย์สารสนเทศกรมประมง, 2557) เพ็ญพรรณ และคณะ (2551) ทำการรวบรวมองค์ความรู้และประสบการณ์ระบบตลาดข้อตกลง (Contract Farming) ในประเทศไทย: กรณีศึกษาปลานิล รายงานถึงการเลี้ยงปลานิลของไทยว่า เกษตรกรนิยมใช้ลูกปลาเพศผู้ เพราะว่าปลาเพศผู้โตเร็ว และมีสัดส่วนปลาขนาดใหญ่ที่สูงกว่าการเลี้ยงแบบคละเพศ สอดคล้องกับรายงานของ Kaliba *et al* (2006) ที่ทดลองเลี้ยงปลานิลคละเพศในบ่อดินที่ประเทศแทนซาเนียว่า พบปลานิลขนาดใหญ่เพียงร้อยละ 2.35 – 2.38 เท่านั้น ส่วนปลาขนาดเล็กมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 81.18 – 85.72 ในขณะที่การเลี้ยงปลานิลเพศผู้ที่ได้จากการคัดแยกเพศจากลักษณะภายนอกพบว่า มีปลาขนาดใหญ่สูงถึงร้อยละ 43.48 – 51.62 ส่วนปลาขนาดเล็กมีร้อยละ 22.58 – 25.22 นอกจากนี้ เรณู และคณะ (2546) ทดลองเลี้ยงปลานิลเพศผู้เปรียบเทียบกับปลานิลที่ผ่านกระบวนการแปลงเพศ และปลานิลเพศเมีย พบว่าปลานิลที่ผ่านกระบวนการแปลงเพศมีน้ำหนักเฉลี่ยสูงสุด รองลงมาคือปลานิลเพศผู้ และปลาเพศเมีย ตามลำดับ ประกอบกับ McAndrew (1993) อธิบายว่า ฮอร์โมนเพศผู้ที่ใช้ในกระบวนการแปลงเพศ มีผลทำให้ลูกปลาโตเร็วกว่าลูกปลาเพศผู้ธรรมชาติ สอดคล้องกับรายงานของเพ็ญพรรณ และคณะ (2555) ที่ทำการศึกษาปัญหาการเลี้ยงปลานิลในกระชังภาคสนาม รายงานว่าการเลี้ยงปลานิลในกระชังต้องใช้ลูกปลานิลที่ผ่านกระบวนการแปลงเพศเป็นเพศผู้ พร้อมกับให้ข้อสังเกตว่าการเลี้ยงลูกปลาดังกล่าวจะทำให้ปลานิลมีการเจริญเติบโตสม่ำเสมอ ให้ผลผลิตปลาที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 350 กรัม เพียงร้อยละ 6.33 ขณะที่การเลี้ยงลูกปลานิลที่ได้จากการคัดแยกเพศผู้จากลักษณะภายนอกพบปลาที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 350 กรัม สูงถึงร้อยละ 28.3 ขนาดปลาที่แตกต่างเมื่อสิ้นสุดการเลี้ยงนี้ นอกจากจะส่งผลกระทบต่อราคาขายปลา รายได้ และกำไรที่เกษตรกรจะได้รับแล้ว ยังแสดงถึงความสำคัญของลูกปลานิลที่ผ่านกระบวนการแปลงเพศต่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำของไทย

2. การศึกษาจากเอกสาร

2.1 ความเป็นมาของปลานิลแปลงเพศ

ทฤษฎีเริ่มต้นของการแปลงเพศปลามีจุดเริ่มต้นจาก Yamamoto (1969) แนะนำให้ใช้ฮอร์โมนเพศที่ต้องการกับลูกปลาตั้งแต่ระยะยังไม่ปรากฏเพศ (undifferentiated gonad) เป็นเวลานานครอบคลุมจนสิ้นสุดกระบวนการพัฒนาเพศ (sex differentiation) ของปลาชนิดนั้นๆ Delvin and Nagahama (2002) รวบรวมการศึกษาวิจัยการแปลงเพศปลาชนิดต่างๆ รวม 55 ชนิด มีการใช้ฮอร์โมนสเตียรอยด์รวม 18 ชนิด โดย 17α-methyltestosterone (MT) เป็นฮอร์โมนสเตียรอยด์ ที่มีการใช้ในการศึกษาวิจัยแปลงเพศปลามากที่สุดถึง 42 ชนิด สรุปประสิทธิภาพของการแปลงเพศแต่ละวิธีจะขึ้นกับ ชนิดของฮอร์โมน (type) ความเข้มข้นและระยะเวลาการใช้ฮอร์โมน (dose&duration) วิธีการใช้ (application) และอายุปลา (age; Delvin and Nagahama (2002)

เพ็ญพรรณ (2553) กล่าวถึงการแปลงเพศปลาด้วยฮอร์โมนว่า แบ่งเป็น 2 วิธีใหญ่ๆ (Hunter and Donaldson, 1983) คือ 1) การให้ฮอร์โมนทางอ้อม (indirect method) เป็นวิธีการที่มีขั้นตอนการใช้ฮอร์โมนในการผลิตพ่อแม่พันธุ์ ก่อนที่จะใช้พ่อแม่พันธุ์นั้นในการผลิตลูกปลาเพศที่ต้องการ โดยลูกปลาที่ผลิตได้นี้ จะไม่ได้สัมผัสกับฮอร์โมนเลย เป็นจุดเด่นของวิธีการนี้ ทำให้สามารถส่งผลผลิตปลาเข้าสู่ตลาดในกลุ่มประเทศยุโรปที่มีราคาสูง แต่วิธีการให้ฮอร์โมนทางอ้อมนี้ เป็นวิธีการยุ่งยากซับซ้อนมาก ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง โดยประสิทธิภาพของวิธีการนี้จะขึ้นกับ autosomal, heritable, polymorphic ของยีนพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ (McAndrew, 1993; Ezaz *et al*., 2004) การผลิตลูกปลานิลเพศผู้ด้วยวิธีการนี้ Mair *et al*., (1997) รายงานว่าต้องใช้พ่อแม่สายเลือดเดียวกัน เพื่อควบคุมยีน autosomal sex modifying genes, heritable และ polymorphicยีน วิธีการนี้มีประสิทธิภาพสามารถผลิตลูกปลาเพศผู้ได้เฉลี่ยร้อยละ 95.6 และอาจจะส่งผลทำให้มีปัญหาการผสมเลือดชิด ที่อาจส่งผลต่อการเจริญเติบโต และการปรากฏลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ (เพ็ญพรรณ, 2553) ส่งผลให้วิธีการให้ฮอร์โมนทางอ้อมนี้ มีการใช้ในวงจำกัด

ส่วนวิธีการให้ฮอร์โมนวิธีที่ 2) คือการให้ฮอร์โมนทางตรง (direct method) Tayamen and Shelton (1978) แนะนำให้ใช้ 17α-methyltestosterone (MT) ในอัตรา 30 – 60 มิลลิกรัม ผสมในอาหาร 1 กิโลกรัม อนุบาลลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ตั้งแต่เริ่มกินอาหารเป็นเวลา 24 -30 วัน ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ทั้งหมด ที่ฟิลิปปินส์ Guerrero (1975) แนะนำให้รวบรวมลูกปลานิลขนาด 9 – 11 มิลลิเมตร จากบ่อเพาะพันธุ์ นำมาให้อาหารที่ผสม MT ในอัตรา 60 มิลลิกรัมในอาหาร 1 กิโลกรัม นาน 18 วัน ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 85 วิธีการอนุบาลลูกปลานิลดังกล่าว เป็นการอนุบาลในตู้กระจกหรือบ่อซีเมนต์ที่ต้องล้างทำความสะอาดบ่อย ทำให้สิ้นเปลืองแรงงานและใช้น้ำปริมาณมาก Buddle (1984) จึงได้เปลี่ยนภาชนะอนุบาลไปเป็นกระชังที่กางไว้ในบ่อดิน ที่มีปัจจัยอาหารธรรมชาติเข้ามาเกี่ยวข้อง ทำการทดลองใช้ฮอร์โมน ethylnyltestosterone (ET) ผสมในอาหารที่อัตรา 60 มิลลิกรัมในอาหาร 1 กิโลกรัม อนุบาลปลา

นิลลูกผสม (*O. niloticus* + *O. aureus*) นาน 25 – 28 วัน ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 96 ต่อมาสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (AIT) ได้นำวิธีการดังกล่าวมาประยุกต์ให้เหมาะกับประเทศไทย โดยทำการเพาะปลานิลในกระชังตาถี่ขนาด 120 ตารางเมตร ทำการเก็บไข่จากปากแม่ปลาทุกสัปดาห์ นำไข่มาฟักในขวดพลาสติกและถาดอลูมิเนียมจนลูกปลาเริ่มกินอาหาร จึงย้ายลูกปลาไปอนุบาลในกระชังตาถี่ขนาด 1 – 5.4 ตารางเมตร อนุบาลด้วยอาหารผสม MT ในอัตรา 60 มิลลิกรัมในอาหาร 1 กิโลกรัม เป็นเวลานาน 21 วัน พบว่าได้ลูกปลาเพศผู้ทั้งหมด (Ponza *et al*., 1996) ต่อมามีการถ่ายทอดเทคโนโลยีนี้สู่เกษตรกรพร้อมกับติดตามประเมินผล พบว่าเกษตรกรสามารถผลิตลูกปลานิลเพศผู้ได้ร้อยละ 86 – 100 (Bhujel, 1998) ขึ้นกับระดับการยอมรับเทคโนโลยีของเกษตรกร (Little *et al*., 1995) ปัจจุบันมีโรงเพาะฟักที่ผลิตลูกปลานิลแปลงเพศกระจายอยู่ทั่วประเทศมากกว่า 26 แห่ง มีกำลังการผลิตในปี พ.ศ. 2551 ประมาณ 1,440 ล้านตัว (เพ็ญพรรณ และคณะ, 2551) ที่ผลิตลูกปลานิลแปลงเพศด้วยวิธีดังกล่าว อย่างไรก็ดี วิธีการนี้อาจส่งผลกระทบของ MT ตกค้างตั้งแต่ในดินเลนก้นบ่อ คลองระบายน้ำ และสิ่งแวดล้อมรอบๆ ฟาร์ม ที่ยังไม่มีข้อมูลการศึกษาวิจัย

นอกจากวิธีการผสมในอาหารดังกล่าวแล้ว วิธีการแช่ในสารละลาย (immersion) เป็นวิธีการให้ฮอร์โมนโดยตรงอีกวิธีหนึ่ง ที่ Piferrer and Donaldson (1993) รายงานว่า เป็นวิธีการที่ใช้ฮอร์โมนในปริมาณที่น้อยๆ ในระยะเวลาสั้นๆ กับลูกปลาระยะต้นๆ ของการพัฒนาอวัยวะเพศ (gonadal development) ครอบคลุมถึงระยะฟักไปจนถึงระยะแรกๆ ของการกินอาหาร เพราะระยะดังกล่าวลูกปลามีความไวต่อการใช้ฮอร์โมนภายนอกมาก และให้ผลตอบสนองต่อการแปลงเพศสูง ในกรณีของปลาแซลมอน (*Oncorhynchus tshawytscha*) การแช่ลูกปลาที่เพิ่มฟักออกมาใหม่ๆ ในสารละลาย MT ที่ความเข้มข้นเพียง 200 ไมโครกรัม/ลิตร นาน 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นอีก 1 สัปดาห์ จึงทำการแช่อีกครั้ง พบว่าได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 82 – 100 (Baker *et al*., 1988) สอดคล้องกับ Piferrer and Donaldson (1989) ที่ทดลองแช่ลูกปลาแซลมอน (*O. kisutch*) วัยอ่อนที่อายุ 6 วันหลังการฟัก ในสารละลาย MT 400 ไมโครกรัม/ลิตร นาน 2 ชั่วโมง เพียงครั้งเดียว ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 73 ในกรณีของปลานิลมีการทดลองแช่ในลูกปลาอายุ 21 – 30 วันหลังฟัก ในสารละลาย MT 5 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 3 วัน ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 90 แต่ขัดแย้งกับรายงานของ Fitzpatrick *et al*. (1999) ที่ทดลองแช่ลูกปลานิลอายุ 13 วันหลังการผสม ในสารละลาย methyldihydrotestosterone 200 ไมโครกรัม/ลิตร นาน 2 ชั่วโมง ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 79.3 ส่วนการแช่ที่อายุ 10 วันหลังการผสมให้ปริมาณเพศผู้ไม่ต่างจากชุดควบคุม แต่การแช่ 2 ครั้งที่อายุ 10 และ 13 วันหลังการผสม ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 82.9 สอดคล้องกับรายงานของเพ็ญพรรณ (2546) ที่ศึกษาสถานการณ์การแปลงเพศลูกปลานิลเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยทดลองทำการแปลงเพศปลานิลด้วยวิธีการแช่ MT ที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัม/ลิตร นาน 24 ชั่วโมง ครั้งเดียว พบว่าอายุของปลานิลที่ไวต่อการแช่แปลงเพศ คือ 2, 5 และ 11 วันหลังการผสม (เพ็ญพรรณ และ คณะ, 2544) ต่อมาทำการทดลองเปรียบเทียบปัจจัยความเข้มข้น (MT = 250 และ 500 ไมโครกรัม/ลิตร) และปัจจัยระยะเวลาการแช่ 6 – 96

ชั่วโมง โดยทำการแช่เพียงครั้งเดียว พบว่าปัจจัยการใช้ MT ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 84-91 สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีเพศผู้ร้อยละ 66 – 76 ส่วนปัจจัยระยะเวลาพบว่าไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ (เพ็ญพรรณ, 2546) อย่างไรก็ดี การทดลองนี้เป็นการแช่ที่ความหนาแน่นต่ำเพียง 35 ฟอง/ลิตร เมื่อทำการแช่ที่ความหนาแน่นสูงขึ้น (5,000 - 20,000 ฟอง/ลิตร) ซึ่งต้องใช้ร่วมกับโต๊ะขยับสารละลาย (อนุสิทธิบัตรเลขที่ 5254) ที่ความเข้มข้น 250 ไมโครกรัม/ลิตร ถึง 80 มิลลิกรัม/ลิตร นาน 24 – 48 ชั่งโมง ทั้งในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม เพ็ญพรรณ (2546) พบว่าไม่มีผลต่อการแปลงเพศ แสดงว่าความหนาแน่นที่สูงขึ้นส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพการแปลงเพศ อย่างไรก็ดี การแช่ที่ความหนาแน่นสูง 20,000 ฟอง/ลิตรนี้ มีต้นทุนค่าฮอร์โมนเพียง 3.25% ของวิธีผสมในอาหาร ที่เป็นจุดเด่นของวิธีการนี้ สอดคล้องกับรายงานของ Pandian and Kirankumar (2003) ที่กล่าวว่าการให้ฮอร์โมนโดยวิธีการแช่มีต้นทุนที่ถูกกว่าการใช้ผสมในอาหาร 200 – 1,000 เท่า

อนึ่ง McAndrew (1993) กล่าวว่ามีปัจจัยหลากหลายอย่างที่ส่งผลกระทบต่อการใช้ฮอร์โมนแปลงเพศปลานิลโดยตรง นับตั้งแต่ชีวเคมี (biochemistry) และประสาทวิทยา (neurology) ของฮอร์โมน ลักษณะกายภาพของเซลล์เนื้อเยื่อที่จะพัฒนาไปเป็นอวัยวะเพศ การปรากฏของเซลล์ตัวรับฮอร์โมน สเตียรอยด์ (steroid receptor) และปัจจัยสิ่งแวดล้อม (environmental factor) ในกรณีของปัจจัยสิ่งแวดล้อมนี้ อุณหภูมินับเป็นปัจจัยที่สำคัญ Baras *et al*. (2001) ทดลองใช้อุณหภูมิน้ำที่ 20.4 – 39 องศาเซลเซียส ระหว่างการอนุบาลลูกปลานิลระยะเริ่มกินอาหารนาน 28 วัน โดยไม่ใช้ฮอร์โมน พบว่าอุณหภูมิที่สูง (37.8 – 39.2 องศาเซลเซียส) มีผลทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้สูงขึ้นเป็นร้อยละ 90 แต่มีผลกระทบต่ออัตราการตาย คือทำให้ลูกปลาตายสูงมากกว่าร้อยละ 70 ซึ่งเป็นจุดอ่อนของวิธีดังกล่าวที่อาจจะต้องแก้ด้วยการใช้สายพันธุ์หรือคัดเลือกสายพันธุ์ปลาที่ทนอุณหภูมิสูง

Athauda (2000) เริ่มใช้ปัจจัยสิ่งแวดล้อมคือ คลื่นความถี่สูง หรืออัลตร้าซาวด์ (ultrasound) เข้ามาช่วยในการซึมผ่านของฮอร์โมนเข้าสู่ลูกปลานิล โดยใช้อัลตร้าซาวด์ 2 ชั่วโมงระหว่างการแช่ลูกปลานิลในสารละลาย MT หรือ AN (androstrennedione) ที่ความเข้มข้น 100 - 500µg/L พบว่าได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 88 – 94 ต่อมา Bart *et al*. (2003) สรุปว่าการแช่ trenbolone acetate (TBA) ที่ความเข้มข้น 250µg/L ร่วมกับการใช้คลื่นความถี่สูงส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้เฉลี่ยร้อยละ 98 อย่างไรก็ดี การใช้อัลตร้าซาวด์ เป็นเพียงงานทดลองในห้องปฏิบัติการเท่านั้น ยังไม่มีผู้ใดพัฒนาให้สามารถใช้เพื่อการแปลงเพศเชิงการค้า

การใช้ปัจจัยภายนอกประเภทอื่นเพื่อช่วยการซึมผ่านของ MT ในปลานิล Bunthawin *et al*., (2014) นำเสนอเครื่องมือสำหรับทำ electroporation ช่วยการซึมผ่านของ MT ในการแปลงเพศไข่ปลานิล (2-3dpf) ที่ความหนาแน่น 50 ฟองในสารละลายเฉพาะ (electroporation medium; EPM; pH = 7.5) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร สำหรับการใช้ประกอบเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า โดยการใช้ไฟฟ้า 1 – 350 โวลต์ นาน 50

-1,000μs ก่อนจะปิด เป็นช่วงๆ พบว่าทำให้เกิดแรงเคลื่อนไฟฟ้า 0.25 – 87.5KV/m ส่งผลให้ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 91.25 อัตรารอดตายร้อยละ 75

ส่วนในเรื่องการใช้สารเพิ่มการซึมผ่าน Arslan and Phelps (2003) ทดลองใช้ dimetyl sulfoxide (DMSO) และ cyclodextrins เป็นสารเคมีที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการซึมผ่านของฮอร์โมนเข้าสู่ตัวปลา *Lepomis macrochirus* รายงานว่าการแช่ปลาในสารละลายฮอร์โมนเพียงครั้งเดียวไม่มีผลต่อการแปลงเพศ การแช่ 3-6 ครั้งร่วมกับการใช้ (DMSO) ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับวิธีการใช้ฮอร์โมนผสมในอาหาร

2.2 การให้ยาผ่านผิวหนัง (transdermal drug delivery) ในมนุษย์

วิธีการให้ยาผ่านผิวหนังเป็นวิธีการให้ยาที่มีข้อดีมากกว่าวิธีการกินหรือการฉีดยา ตามที่ Mills and Cross (2006) รายงานว่า การให้ยาผ่านผิวหนังทำให้ไม่ต้องเจ็บตัวจากการฉีดยา ช่วยลดปัญหายาที่จะถูกตับทำให้สลาย และลดปัญหาน้ำย่อยในทางเดินอาหารที่จะลดประสิทธิภาพของยาหรือทำให้เกิดความระคายเคือง ยาที่จะซึมผ่านผิวหนังของมนุษย์และสัตว์โดยทั่วไป Mills and Cross (2006) รายงานว่าความสามารถของยาขึ้นกับโครงสร้างผิวหนังของคนหรือสัตว์แต่ละชนิด ตั้งแต่โครงสร้างของเซลล์ชั้นผิวหนัง ความหนา ตำแหน่งของผิวหนัง และการย่อยสลายของชั้นผิวหนัง (skin metabolism) เป็นต้น โดยปัจจัยทั่วไปที่มีผลกระทบต่อการซึมผ่านของยาด้วยกระบวนการแพร่กระจาย (diffusion) ประกอบด้วยปัจจัยต่างๆ (Mills and Cross, 2006) ดังนี้

1) ขนาดโมเลกุลของยาที่ต้องการให้ทางผิวหนัง ควรมีขนาดเล็กไม่เกิน 500 Da ควรมีโครงสร้างโมเลกุลที่มีอะตอมพร้อมจับกับไฮโดรเจน ควรมีค่า log *P* (lipophilicity) ที่น้อยกว่า 2.6 และมีค่าจุดหลอมเหลวต่ำกว่า 200 องศาเซลเซียส (Wong, 2014)
2) มีการใช้สารเคมีเพิ่มประสิทธิภาพ (vehicle and formulations) ควรเป็นสารเคมีที่ไม่ทำปฏิกิริยา (inert) กับยาที่ใช้ อาจเป็นสารเคมีในกลุ่มตัวทำละลาย (solvents), กลุ่ม preservatives, กลุ่ม fragrances และกลุ่มสารเคมีที่อยู่ตัวคงตัว (stabilizers) โดยยาจะละลาย (dissolved) หรือแขวนลอย (emulsion or suspension) อยู่ในสารเคมีเพิ่มประสิทธิภาพนั้น ปัจจัยที่มีผลต่อการซึมของยาผ่านผิวหนังประกอบด้วย ค่า relative และ absolute solubility ของยาใน vehicle และบนผิวหนังที่ยาจะซึมเข้าไป สารเคมีที่ใช้เป็น vehicle ช่วยการซึมของยานี้ จะทำหน้าที่เพิ่มค่า diffusivity ของผิวหนัง นอกจากนี้ควรมีการใช้สารเคมี (vehicles) ในปริมาณที่เพียงพอที่จะละลายยาให้เป็นเนื้อเดียวกัน เมื่อทาลงบนผิวหนังที่มีองค์ประกอบของโครงสร้างบางส่วนเป็นเซลล์ไขมัน จะทำให้ยาสามารถซึมผ่านผิวหนังเข้าได้ง่าย โดยไม่ทำอันตรายต่อผิวหนัง

3) ความคงตัวของผิวหนัง (Integrity of skin) การใช้สารเคมีบางชนิดในกลุ่มตัวทำละลาย เช่น acetone, methanol และ ethanol ฯลฯ บนผิวหนัง เพื่อทำความสะอาดก่อนการใช้ยาทา ส่งผลให้ยาสามารถซึมผ่านผิวหนังเข้าไปอย่างมีนัยสำคัญ
4) ปริมาณหลอดเลือดใต้ผิวหนัง (skin blood flow) ที่มีหลอดเลือดมาหล่อเลี้ยงมาก จะช่วยให้ยาซึมผ่านเข้ามาออกฤทธิ์ได้ง่าย
5) ตำแหน่งของผิวหนัง (site of application) ผิวหนังต่างตำแหน่ง จะมีความหนา-บาง ปริมาณหลอดเลือดที่มาหล่อเลี้ยง และองค์ประกอบเซลล์ที่แตกต่างกัน ส่งผลต่อการซึมผ่านของยาเข้าสู่ผิวหนัง
6) ความหนาแน่นขององค์ประกอบอื่นบนผิวหนัง เช่น รอยแผลเป็น (scar) ต่อมเหงื่อ (sweat) ต่อมรากผม (hair follicles) เป็นต้น สิ่งเหล่านี้มีผลต่อการซึมผ่านของยาผ่านผิวหนังแตกต่างกัน
7) ความเพิ่มความชื้นให้ผิวหนัง (skin hydration) การเพิ่มความชื้นให้ผิวหนังจะช่วยการซึมผ่านของยาได้มากขึ้น เพราะเซลล์ผิวหนังจะดูดซับสารละลายพร้อมกับยาเข้าไป

หากการซึมของยาผ่านผิวหนังด้วยกระบวนการแพร่กระจาย (diffusion) ไม่ดีพอ Mills and Cross (2006) กล่าวถึงปัจจัยภายนอกที่ไม่ใช่สารเคมีเพิ่มการซึมผ่าน (chemical penetration enhancers) แต่สามารถเพิ่มการซึมผ่านของยาได้ คือปัจจัยทางกายภาพ ที่ส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของเซลล์ชั้นผิวหนัง ทำให้ยาสามารถซึมผ่านเข้าไปเข้าไปได้มากกว่ากระบวนการแพร่กระจายของยกโดยปกติ ปัจจัยกายภาพนี้เป็นปัจจัยภายนอก ที่สามารถใช้เทคโนโลยีสมัยใหม่ทำให้เกิดขึ้นได้ ดังนี้

ก) **Ultrasound** เป็นวิธีการใช้คลื่นความถี่ต่ำประมาณ 20kHz (Mills and Cross, 2006) – 200 kHz ความถี่ปานกลางในช่วง 0.2 – 1 MHz และความถี่สูงถึง 16 MHz (Azagury *et al*., 2014) ทำให้เกิดฟองขนาดเล็กจำนวนมาก (cavitation) ที่จะรวมกันกลายเป็นฟองขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ ก่อนที่จะแตกออก และส่งพลังงานไปรบกวนเซลล์ชั้นผิวหนัง มีผลทำให้โปรตีน DNA/RNA หรือยาที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น อินซูลิน (insulin) อิริโทรโพอิทิน (erythropoietin) และ อินเตอร์ฟิรอน (interferon) ที่ทาไว้สามารถซึมผ่านผิวหนังได้มากขึ้น รายละเอียดกระบวนการทำงานของ ultrasound ศึกษาได้จาก Azagury *et al*., (2014)

ข) **Iontophoresis** เป็นวิธีการใช้กระแสไฟฟ้าขนาดต่ำๆ (ประมาณ 0.5 mA/cm^2) ผ่านขั้ว electrodes 2 ขั้วที่สัมผัสกับผิวหนัง กระแสไฟจะไปผลักโมเลกุลของยาที่มีประจุและไม่มีประจุผ่านชั้นเซลล์ผิวหนัง วิธีการนี้บางทีเรียกว่า electro-osmosis (Azagury *et al*., 2014) ประสิทธิภาพของวิธีการนี้ขึ้นอยู่กับ polarity, valency และ mobility ของ

โมเลกุลยา ร่วมกับวงจรไฟฟ้าที่ใช้ วิธีการนี้ใช้ในการช่วยการซึมผ่านของโมเลกุลโปรตีน และนิวคลีโอไทด์ขนาดใหญ่ (ologonucleotides) ข้อเสียของวิธีการนี้คือ ไม่เหมาะกับผิวหนังส่วนหนังศีรษะ เพราะกระแสไฟฟ้าที่ใช้จะระคายเคืองต่อมรากผมทำให้ผมร่วง

ค) **Electroporation** เป็นวิธีการใช้กระแสไฟฟ้าแรงสูง (ประมาณ 100 – 1,000 V/cm) ในระยะเวลาสั้นๆ มีหน่วยเป็นไมโครหรือมิลลิวินาที (μs- ms; Mills and Cross, 2006) หรือมากกว่า 50 โวล์ทขึ้นไป ในระยะเวลาเพียง 1- 100 มิลลิวินาที (Azagury *et al*., 2014) โดยให้กระแสไฟแบบเป็นช่วง (pulses) ส่งผลทำให้เกิดปุ่มน้ำ (aqueous pores) ที่ชั้นเซลล์ผิวหนัง ปุ่มน้ำเหล่านี้ช่วยให้ยาซึมสามารถผ่านเซลล์ชั้นผิวหนังได้ง่ายขึ้น วิธีการนี้มีการใช้ในการให้วัคซีนผ่านทางผิวหนัง

ง) **Particle-mediated epidermal delivery** (PMED) วิธีการนี้ใช้ละอองของทองที่เคลือบ DNA โปรตีน หรือยาที่ต้องการใช้ ละอองทองนี้จะช่วยเร่งการซึมผ่านของสิ่งที่ต้องการผ่านเซลล์ชั้นผิวหนังได้ (Mills and Cross, 2006)

นอกจากนี้ Wong (2014) รายงานถึงการใช้ปัจจัยกายภาพอื่น เช่น สนามแม่เหล็ก (magnetophoresis), แสงเลเซอร์ (laser) และ คลื่นไมโครเวฟ (microwave) ในการเพิ่มการซึมของยาผ่านผิวหนังของมนุษย์ได้อีกด้วย

3. วิธีการทดลอง

3.1 การเตรียม stock MT

ในการเตรียม stock MT (17α-methytestetosterone (MT; Aldemax Ltd, Switzerland) เพื่อการทดลองแช่เหนี่ยวนำเพศที่ความหนาแน่นต่ำ: ใช้แอลกอฮอล์บริสุทธิ์ แบ่งใส่ขวดที่สะอาด 6 ขวด ขวดละ 10 มิลลิลิตร (stock solution 1 ขวดต่อ 1 ชุดการทดลอง) ถ้าใส่สารเพิ่มการซึมผ่านชนิดเดียว ให้ดูดแอลกอฮอล์ออกที่ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมสารเพิ่มการซึมผ่านชนิด propylene glycol, DMSO หรือ oleic acid ที่ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรเท่ากัน ส่วนการใส่สาร 2 ชนิด ให้ดูดแอลกอฮอล์บริสุทธิ์ออก 1.0 มิลลิลิตร แล้วเติม propylene glycol + DMSO หรือ propylene glycol + oleic acid ในปริมาตรที่เท่ากัน คือ ชนิดละ 0.5 มิลลิลิตร ตามลำดับ ทำการละลายอนุพันธ์ของเทสทอสเตอโรน 10 มิลลิกรัม ลงในสารละลายที่เตรียมไว้ จะทำให้สารละลายมีความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร เมื่อต้องการใช้ทำการทดลอง ใช้ออโตเมติกปิเปตดูด stock MT+ สารเพิ่มการซึมผ่าน 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในขวดพลาสติกขนาด 1 ลิตรที่ใส่ไข่ปลานิลไว้ 40 ฟอง จะทำให้ได้ความเข้มข้นของสารละลายฮอร์โมนระหว่างการแช่ที่ 500 ไมโครกรัม/ลิตร

การเตรียม stock MT สำหรับการทดลองแช่เหนี่ยวนำเพศที่ความหนาแน่นสูง ชั่งฮอร์โมน MT ที่ 0.100 หรือ 0.250 กรัม ละลายด้วยแอลกอฮอร์บริสุทธิ์ 100 หรือ 250 มิลลิลิตร ทำให้ได้สารละลาย stock MT ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร หรือ 1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ในการเตรียมสารละลายฮอร์โมนสำหรับการทดลอง ใช้ปิเปตขนาด 20 มิลลิลิตร ดูดน้ำสะอาดที่เตรียมไว้สำหรับการทดลองใส่ลงในหลอดพลาสติกที่มีฝาปิดขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 15 - 20 หลอด ใช้ออโตเมติกปิเปตดูด stock MT 50 ไมโครลิตร ปล่อยลงในหลอดที่เตรียมไว้สำหรับใส่ในถาดทดลองแช่ MT เหนี่ยวนำเพศ ส่วนชุดควบคุมจะมีเฉพาะน้ำสะอาดที่ไม่ใส่ stock MT ทำการปั่นสารละลายในหลอดให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Vertex

3.2 การเตรียมน้ำสำหรับการทดลอง

ใช้น้ำประปาเติมลงในถังพลาสติกขนาด 100 – 200 ลิตร บำบัดด้วยคลอรีนผงที่ความเข้มข้น 15 ส่วนในล้าน พักไว้ 2 วัน เติมโซเดียมไทโอซัลเฟตในปริมาณเท่ากับคลอรีนผง พักน้ำในถังนั้นจนถึงการใช้งาน ใช้น้ำในถังนี้ในการทดลองแช่ฮอร์โมน และเปลี่ยนถ่ายน้ำตลอดระยะการทดลองทั้งหมด

3.3 การเตรียมไข่หรือลูกปลานิลวัยอ่อน

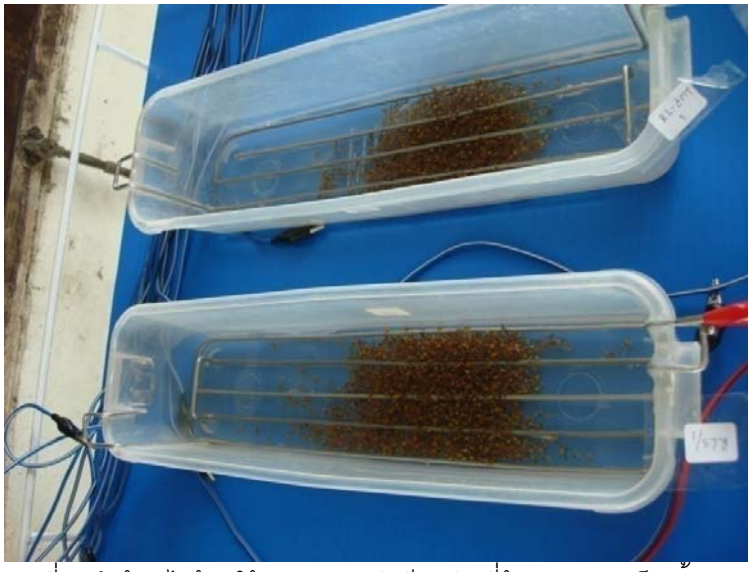
เลือกคัดไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสม (2dpf) โดยสังเกตจากจุดสีดำเล็กๆ ที่เริ่มปรากฏบนไข่ปลานิลสีเหลือง จากปากแม่ปลานิลที่เพาะในบ่อซีเมนต์ขนาด 50 ตารางเมตร ของศูนย์วิจัยประมงน้ำจืดขอนแก่น นับจำนวนแม่ปลาที่ได้ประมาณ 6 – 15 แม่ รวมไข่ที่คัดได้รวมไว้ในถาดพลาสติกขาว นำมาล้างทำความสะอาด แยกสิ่งเจือปนอื่นที่ไม่ต้องการออก กำจัดพยาธิภายนอกด้วยน้ำเกลืออิ่มตัว ฟอร์มาลิน

เข้มข้น หรือเบทาดีนในระยะเวลาสั้นๆ ประมาณ 1 นาที ก่อนล้างด้วยน้ำสะอาด และใช้ในการทดลองโดยการชั่งน้ำหนักไข่ เพื่อประมาณความหนาแน่นระหว่างการแช่ โดยการสุ่มชั่งไข่ปลา 1 – 2 กรัม นับจำนวนไข่ดีและไข่เสียที่ได้ นำมาคำนวณเป็นจำนวนความหนาแน่นของไข่ระหว่างการแช่แต่ละการทดลอง

ในการทดลองที่ใช้ตัวอ่อนปลานิลระยะตัวแดง (อายุประมาณ 5 – 7 วันหลังการผสม; 5-7 dpf) หรือระยะตัวดำ (อายุประมาณ 8 – 10 วันหลังการผสม; 8-10 dpf) ใช้วิธีการตวงด้วยช้อนโต๊ะ เพื่อลดความบอบช้ำ ทำการสุ่มตวงลูกปลานิลวัยอ่อนระยะดังกล่าวลงในถาดทดลองที่บรรจุสารละลายทดลองปริมาตร 100 มิลลิลิตร มีการสุ่มนับจำนวนลูกปลาที่ตวงใส่ถาดทดลองเพื่อคำนวณความหนาแน่นของลูกปลาระหว่างการแช่เหนี่ยวนำเพศ

3.4 การเตรียมถาดทดลองไฟฟ้า

ใช้ถาดพลาสติกที่ก้นถาดติดลวดอลูมิเนียมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 มิลลิเมตร จำนวน 5 เส้น แบ่งเป็นขั้วบวกและขั้วลบอย่างละ 2 และ 3 เส้น ตามลำดับ โดยลวดอลูมิเนียมแต่ละเส้นไม่สัมผัสกัน และมีตำแหน่งลวดสำหรับการคีบสายไฟฟ้าขั้วบวกและขั้วลบอยู่คนละด้านของถาด ดังรูปที่ 1 ภายในถาดทดลองบรรจุสารละลายระหว่างการแช่เหนี่ยวนำเพศ 100 มิลลิลิตร



รูปที่ 1 ถาดทดลองเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า ใช้ขดลวดอลูมิเนียมติดที่ก้นถาดแยกเป็นขั้วบวก (สีแดง) และขั้วลบ (สีน้ำเงิน) อยู่คนละด้านของถาด

3.5 การเตรียมโต๊ะขยับสารละลาย

ใช้โต๊ะขยับสารละลายที่เป็นนวัตกรรมอนุสิทธิบัตรหมายเลข 5254 มีการดัดแปลงเพิ่มเติม โดยเปลี่ยนแบตเตอรี่จากขนาด 70 Aที่มีน้ำหนักมาก เป็นขนาด 18 A ที่มีน้ำหนักน้อยลง ติดตั้งตัวแปลงไฟฟ้าจากกระแสสลับ (AC) เป็นกระแสตรง (DC) ขนาด 3 A พร้อมเต้าเสียบไฟฟ้าที่มีสายไฟโยงสำหรับต่อเชื่อม

กับไฟฟ้ากระแสสลับจากภายนอกที่จะนำเข้าโต๊ะฯ นอกจากนี้มีการติดตั้งปุ่มควบคุมความเร็วของโต๊ะขยับสารละลาย ทำให้สามารถควบคุมความเร็วของโต๊ะได้โดยง่ายตามต้องการ

(ก) (ข)

รูปที่ 2 โต๊ะขยับสารละลาย: (ก) โต๊ะฯที่จดอนุสิทธิบัตรหมายเลข (5254)ในปี 2546 และ (ข) โต๊ะฯที่พัฒนาให้มีความสะดวกในการใช้งานมากขึ้น

3.6 การทดลองแช่เหนี่ยวนำเพศปลานิลที่ความหนาแน่นต่ำ

ทำการสุ่มนับไข่ปลานิลอายุ 2dpf ที่เตรียมไว้จำนวน 40 ฟอง ลงในขวดน้ำพลาสติกทดลองขนาด 1 ลิตร ใส่หัวทรายให้ถึงก้นขวด เพื่อใช้ดันไข่ปลานิลให้คุ้งกระจายโดยไม่ให้ตกตะกอนที่ก้นขวด สุ่มดูดสารละลายผสม stock MT ผสมสารเพิ่มการซึมผ่านที่เตรียมไว้ล่วงหน้า vertex ให้เป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนเทลงในขวดพลาสติกทดลอง (รูปที่ 3) ที่สุ่มไว้ก่อน เมื่อครบระยะการแช่ฮอร์โมน 24 ชั่วโมงแล้ว เทสารละลายฮอร์โมนลงในถังพลาสติกสำหรับเก็บน้ำทิ้งจากฮอร์โมน เติมน้ำสะอาดลงในขวดทดลอง เปลี่ยนน้ำในขวดทดลองทุกวัน ทำการฟักไข่ปลานิลต่อจนลูกปลาฟักเป็นตัว เมื่อลูกปลาอายุครบ 7 วันหลังการผสม จึงย้ายลูกปลาไปอนุบาลต่อในโหลพลาสติกขนาด 10 ลิตร (รูปที่ 3) บรรจุน้ำเริ่มต้น 2 ลิตร เริ่มใช้ปลาป่นเป็นอาหารเมื่อลูกปลามีอายุ 8 วันหลังการผสม ทำการดูดเศษอาหารเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกวันในเวลาเย็น เมื่อลูกปลามีขนาดใหญ่ขึ้น ค่อยๆเพิ่มระดับน้ำในโหลทดลองขึ้นเรื่อยๆ ตามความเหมาะสม ทำการอนุบาลลูกปลาในโหลทดลองประมาณ 21 วัน จึงย้ายลูกปลาไปอนุบาลต่อในตู้กระจกบรรจุน้ำเริ่มต้น 30 ลิตร ตู้กระจกนี้ใช้ระบบน้ำหมุนเวียนผ่านบ่อตกตะกอนและบ่อกรองชีวภาพ มีการเพิ่มระดับน้ำในตู้ทดลองขึ้นเรื่อยๆ ตามความเหมาะสม เริ่มใช้อาหารเม็ดโปรตีนร้อยละ 40 อนุบาลลูกปลานิลจนอายุครบ 60 วันหลังการผสม จึงทำการตรวจเช็คเพศลูกปลาด้วยวิธี Aceto-carmine squash method (Guerrero and Shelton, 1974)

รูปที่ 3 อุปกรณ์การแช่เหนี่ยวนำเพศลูกปลานิลที่ความหนาแน่นต่ำ ประกอบด้วยขวดแช่เหนี่ยวนำเพศไข่และลูกปลานิลที่ความหนาแน่น 40 ฟอง/ลิตร (รูปด้านขวามือ) ทำการฟักและอนุบาลลูกปลานิลในขวดนี้จนอายุ 7 วันหลังการผสม จึงย้ายไปอนุบาลต่อในโหลพลาสติกขนาด 10 ลิตร (รูปด้านซ้ายมือ) ที่บรรจุน้ำตามขนาดลูกปลา ส่วนชุด control – คืออุปกรณ์ฟักไข่ปลานิลในกระปุกพลาสติกที่ความหนาแน่นสูง โดยไม่ได้สัมผัสกับสารเคมีใด

1.7 การทดลองแช่เหนี่ยวนำเพศที่ความหนาแน่นสูง

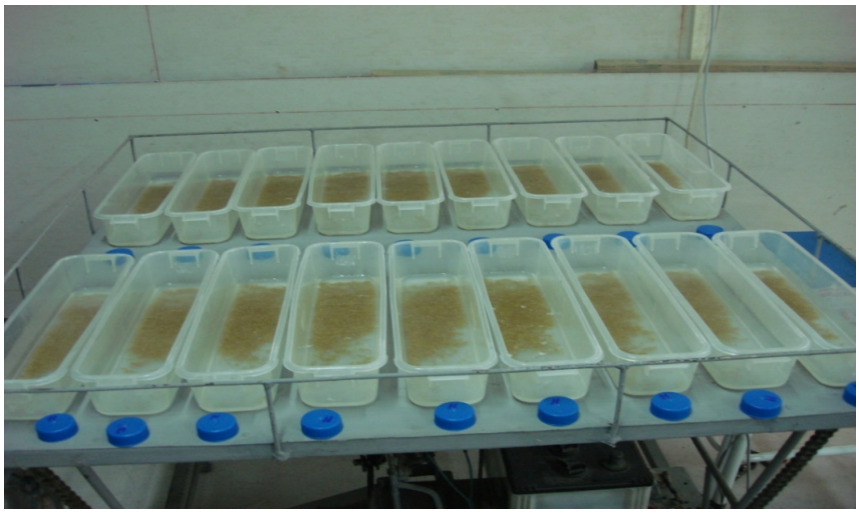
กิจกรรมที่ 1.2 การใช้สารเพิ่มการซึมผ่าน ความถี่ และการแช่เหนี่ยวนำเพศปลานิลที่ความหนาแน่นสูง

ก. วางแผนการทดลองแบบ Oneway Analysis of Variance ประกอบด้วย 7 ชุดการทดลอง ดังรายละเอียดของแต่ละชุดการทดลองปรากฏในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดแผนการทดลองทดสอบสารเพิ่มการซึมผ่านต่างชนิด ในการแช่เหนี่ยวนำเพศปลานิลที่ความหนาแน่นสูง ครั้งที่ 1

ชุดการทดลองที่	ระบบทดลองระหว่างการแช่	สารเพิ่มการซึมผ่าน 5 ml/L	17alpha-methyl testosterone (MT) 500μg/L
1: control -	ใช้หัวทรายเป่าลม	-	-
2: control +	ในถาดบนโต๊ะขยับสารละลาย	-	-
3: control +OA	ในถาดบนโต๊ะขยับสารละลาย	+ Oleic acid (OA)	-
4: control +PG	ในถาดบนโต๊ะขยับสารละลาย	+ Propylene glycol (PG)	-
5: MT + OA	ในถาดบนโต๊ะขยับสารละลาย	+ OA	+ MT
6: MT + PG	ในถาดบนโต๊ะขยับสารละลาย	+ PG	+ MT
7: MT	ในถาดบนโต๊ะขยับสารละลาย	-	+ MT

ข. รวบรวมไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสม (2dpf) จากศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น จำนวน 12-37 แม่ น้ำหนักไข่ปลารวม 256 - 676 กรัม ทำการสุ่มชั่งไข่ปลา 12.5 - 20 กรัม ลงในถาดทดลองแช่ที่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร คิดเป็นความหนาแน่นของไข่ปลาระหว่างการแช่ 15,740 – 26,392 ฟอง/ลิตร จำนวน 18 ถาดอยู่บนโต๊ะขยับสารละลาย (รูปที่ 4) มีน้ำอยู่ในถาดเริ่มต้น 80 มิลลิลิตร เติมสารละลายฮอร์โมนที่เตรียมไว้ 20 มิลลิลิตร รวมเป็นสารละลายฮอร์โมนในการแช่ไข่ปลานิล 100 มิลลิลิตร ส่วนไข่ปลาที่เหลืออีก 3 ถาด ถูกนำไปฟักในกระปุกพลาสติกบรรจุน้ำ 1 ลิตร ที่มีหัวทรายเป่าลมช่วยหมุนวนไข่ปลาไม่ให้กองทับกัน โดยไม่มีการเติมสารใดๆ (control – ในรูปที่ 3)



รูปที่ 4 การแช่เหนี่ยวนำเพศปลานิลที่ความหนาแน่นสูงในระยะไข่ปลา (2dpf) บนโต๊ะขยับสารละลายร่วมกับสารเพิ่มการซึมผ่านต่างชนิด

ค. ทำการแช่ที่ความถี่ 1, 2 และ 3 ครั้ง (ที่อายุ 2, 5 และ 11 วันหลังการผสม) เปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยการแช่ฮอร์โมน MT ที่ความเข้มข้นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 (500 ไมโครกรัม/ลิตร) รวม 6 ชุดการทดลอง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ โดยทำการแช่ระยะเวลานาน 24 ชั่วโมง ในการทดลองครั้งที่ 1 ส่วนการทดลองครั้งที่ 2, 3 และ 4 ทำการแช่เหมือนกับการทดลองครั้งที่ 1 แต่ลดระยะเวลาให้สั้นลงเหลือ 12, 6 และ 3 ชั่วโมง ตามลำดับ

ง. เมื่อครบกำหนดการแช่ ทำการล้างด้วยน้ำสะอาด ฟัก และอนุบาลลูกปลาในโหลพลาสติก (รูปที่ 5 ก) บรรจุน้ำ 1 ลิตร ก่อนย้ายลงถาดพลาสติก (รูปที่ 5 ข) สำหรับอนุบาลลูกปลานิลที่อายุ 6 – 12 วัน จากนั้นจึงย้ายลูกปลาไปอนุบาลในกระชังไนล่อนตาถี่ (16 – 20 ตา/นิ้ว) ที่กางในบ่อดิน (รูปที่ 6)

จ. เมื่อลูกปลามีอายุครบ 2 เดือนหลังการผสม จึงทำการตรวจเพศเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

ฉ. ทำการวิเคราะห์ข้อมูลและสรุปเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1

(ก) (ข)

รูปที่ 5 ระบบการฟักและอนุบาลลูกปลานิลหลังการแช่เหนี่ยวนำเพศที่ความหนาแน่นสูง: (ก) โหลพลาสติกสำหรับฟักไข่ปลานิล และ (ข) ถาดพลาสติกสำหรับอนุบาลลูกปลานิลหลังการฟักที่อายุ 6 – 12 วันหลังการผสม

รูปที่ 6 กระชังอนุบาลลูกปลานิลหลังการแช่เหนี่ยวนำเพศที่ความหนาแน่นสูง เป็นกระชังขนาด 1x1x0.5 เมตร หรือ 1x2x 0.5 เมตร กางในบ่อดินผนัง คสล. ขนาด 200 ตารางเมตร ที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดขอนแก่น

ในการแช่เหนี่ยวนำเพศที่ความหนาแน่นสูง มีการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเพิ่มการซึมผ่าน 2 ชนิดคือ oleic acid (OA) และ propylene glycol (PG) มีการเตรียม stock MT+OA ด้วยการดูดสารเพิ่มการซึมผ่านชนิด (OA) ที่ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดพลาสติกขนาด 8 มิลลิลิตร เติม stock

MT ที่เตรียมไว้หลอดละ 0.2 มิลลิลิตร ปั่นด้วย Vertex ให้สารละลายเข้ากัน จะได้ stock MT+OA ส่วน stock MT+PG ทำการเตรียมในลักษณะเดียวกัน แต่ใช้สารละลาย PG แทน OA จากนั้นทำการเตรียมสารละลายสำหรับการแช่เหนี่ยวนำเพศไข่ปลานิลบนโต๊ะขยับสารละลาย ดังนี้

ก. ตวงน้ำสะอาด 20 มิลลิลิตรลงในหลอดพลาสติกขนาด 50 มิลลิลิตร จำนวน 18 หลอด
ข. ดูดสารเพิ่มการซึมผ่าน OA 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่เตรียมไว้ 3 หลอด (OA)
ค. ดูดสารเพิ่มการซึมผ่าน PG 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดที่เตรียมไว้ 3 หลอด (PG)
ง. ดูด stock MT + OA 550 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่เตรียมไว้ 3 หลอด (MT+OA)
จ. ดูด stock MT + PG 550 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดที่เตรียมไว้ 3 หลอด (MT+PG)
ฉ ดูดสารละลาย stock MT 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ 3 หลอด (MT)
ช. ดูดเอธานอลบริสุทธิ์ 50 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่เตรียมไว้ 3 หลอด (control +)

ทำการปั่นสารละลายในหลอดทั้ง 18 หลอดด้วย vertex ให้สารละลายเป็นเนื้อเดียวกันก่อนเทลงในถาดทดลองที่มีไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสมบนโต๊ะขยับสารละลายที่สุ่มชุดการทดลองไว้ล่วงหน้า เปิดสวิทซ์โต๊ะขยับสารละลายให้ขยับที่ความเร็ว 24 รอบ/นาที จับระยะเวลาการแช่ 1 ชั่วโมง เมื่อครบระยะเวลา ทำการเทสารละลายในถาดทดลองออก ล้างด้วยน้ำสะอาดประมาณ 2 – 3 ครั้ง ก่อนทำการย้ายไข่ปลาลงฟักต่อในโหลพลาสติกขนาด 1 ลิตร (รูปที่ 5ก) ทำการเปลี่ยนน้ำในโหลฟักไข่ปลาทุกวัน จนไข่ปลาฟักเป็นตัว เมื่อลูกปลาอายุประมาณ 7 – 8 วันหลังการผสม และเริ่มกินอาหาร ทำการย้ายลูกปลาลงในถาดพลาสติกสี่เหลี่ยมขนาด 8 ลิตร (รูปที่ 5ข)ที่บรรจุน้ำเริ่มต้น 2 ลิตร ใส่หัวทราย 1 หัว นับจำนวนลูกปลาที่ได้ ทำการอนุบาลลูกปลาด้วยปลาป่นในปริมาณที่กินจนอิ่มวันละ 3 ครั้ง ทุกวัน ในระยะนี้ทำการดูดตะกอนเศษอาหารที่เหลือหลังการให้อาหารมื้อเย็น และเปลี่ยนถ่ายน้ำประมาณร้อยละ 20 - 50 ทุกวัน อนุบาลลูกปลาในถาดนี้ประมาณ 2 – 4 สัปดาห์ ในระยะนี้มีการเพิ่มปริมาตรน้ำในถาดอนุบาลตามขนาดลูกปลาที่โตขึ้น เพื่อให้ลูกปลาแข็งแรงก่อนย้ายอนุบาลในกระชังขนาด 1x1x0.9 เมตร ที่กางไว้ในบ่อดินขนาด 400 ตารางเมตร (รูปที่ 6) อนุบาลลูกปลาในกระชังด้วยอาหารเม็ดเล็กลอยน้ำโปรตีนร้อยละ 30 ให้อาหารวันละ 2 – 3 ครั้ง ทุกวัน เมื่อลูกปลามีอายุอย่างน้อย 60 วันหลังการผสม ทำการนับจำนวนลูกปลาที่เหลือของแต่ละกระชังเพื่อใช้คำนวณอัตรารอดตายของลูกปลา ก่อนทำการสุ่มตัวอย่างลูกปลากระชังละ 50 ตัว เพื่อใช้ในการตรวจเพศโดยวิธี aceto-carmine squash method ตามวิธีการของ (Guerrero and Shelton, 1974)

กิจกรรมที่ 1.3 การใช้ปัจจัยกายภาพ (electricity) เหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้ที่ความหนาแน่นสูง

ก. รวบรวมไข่หรือลูกปลานิลที่อายุ 2, 5 หรือ 8 – 10 วันหลังการผสม เหมือนการทดลองที่ 1 ถ้าเป็นการทดลองในระยะไข่ปลาใช้วิธีการสุ่มชั่งน้ำหนักไข่ แต่ถ้าเป็นลูกปลาวัยอ่อนทำการสุ่มตักด้วยช้อนโต๊ะเพื่อลดความบอบช้ำ ใส่ลงในถาดทดลองเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า (รูปที่ 1) ในแต่ละถาดที่ใส่น้ำสะอาดไว้ล่วงหน้า 80 มิลลิลิตร รวม 18 ถาดทดลอง

ข. ทำการเตรียมสารละลายฮอร์โมน MT ปริมาตร 20 มิลลิลิตร vertex ให้สารละลายฮอร์โมนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ก่อนเทลงในถาดทดลองบนโต๊ะขยับสารละลาย (รูปที่ 7)

(ก) (ข)

รูปที่ 7 ถาดทดลองแช่เหนี่ยวนำเพศปลานิลบนโต๊ะขยับสารละลาย: (ก) การแช่เหนี่ยวนำเพศในระยะไข่ปลา และ (ข) การแช่เหนี่ยวนำเพศในระยะลูกปลาอายุ 8 – 10 วันหลังการผสม

ค. ต่อสายไฟขั้วบวกและขั้วลบเข้าถาดทดลองทุกถาด เปิดสวิทช์ให้โต๊ะขยับสารละลายทำงานและปรับความเร็วรอบให้ห้าโต๊ะขยับอยู่ในช่วง 28 – 35 รอบต่อนาทีตามความเหมาะสม

ง. ปล่อยไฟฟ้ากระแสตรง (DC) ที่แรงเคลื่อน 12 โวลต์ เข้าถาดไข่หรือลูกปลานาน 5, 15, 30 และ 60 นาที เมื่อครบกำหนด เทสารละลายฮอร์โมนใส่ถังพลาสติกพักไว้ ล้างไข่/ลูกปลาด้วยน้ำสะอาด ทำการฟักไข่ในโหลพลาสติก (รูปที่ 5ก) และอนุบาลในถาดพลาสติก (รูปที่ 5ข) ตามลำดับ

จ. อนุบาลลูกปลานิลวัยอ่อนในกระชังจนมีอายุ 60 วันหลังการผสม จึงทำการตรวจเช็คเพศเหมือนการทดลองที่ความหนาแน่นต่ำและสูง

กิจกรรมที่ 2 การทดสอบผลการใช้กระแสไฟฟ้าเหนี่ยวนำเพศในปลาหมอไทยภาคสนาม

ใช้วิธีการแช่เหนี่ยวนำเพศปลานิลด้วยไฟฟ้า มาทดสอบผลการเหนี่ยวนำเพศปลาหมอไทยด้วยฮอร์โมนเอสตร้าไดอัล (E_2) ร่วมกับไฟ DC 12 โวลต์ 1-2 วินาที พัก 5 วินาที ใช้ DC 3 ครั้ง นับเป็น 1 ชุด เหนี่ยวนำด้วย DC 3, 6 และ 9 ชุด เปรียบเทียบกับ 1)การแช่ E_2 (500µg/L)โดยไม่ใส่ DC และ 2)วิธีการแปลงเพศปลาหมอไทยของขอนแก่นฟาร์ม ทำการทดลองในระยะลูกปลาวัยอ่อนที่อายุประมาณ 2 วันหลังการผสม จากนั้นทำการอนุบาลลูกปลาในถาดทดลอง (รูปที่ 7ก) กระชังผ้าโอล่อนแก้วประมาณ 1 สัปดาห์ จากนั้นจึงถ่ายกระชังเข้าสู่กระชังผ้าไนล่อนสีฟ้าตาถี่ (รูปที่ 7ข) ที่กางในบ่อดินที่ใช้อนุบาลลูกปลาหมอไทยชุดเดียวกันกับการทดลองแต่ใช้วิธีแปลงเพศของขอนแก่นฟาร์ม อนุบาลลูกปลาหมอไทยทุกวันด้วยปลาป่นวันละ 2 ครั้ง (เช้า-เย็น) จนลูกปลามีอายุ 2 เดือน จึงทำการสุ่มตัวอย่างตรวจเช็ดเพศด้วยวิธีเดียวกับการตรวจเช็คเพศของปลานิล

(ก) (ข)

รูปที่ 7 การอนุบาลลูกปลาหมอไทยหลังการแช่เหนี่ยวนำเพศที่ขอนแก่นฟาร์ม : (ก) ถาดอนุบาลหลังการแช่เหนี่ยวนำเพศ (ข) กระชังไนล่อนสีฟ้าตาถี่อนุบาลลูกปลาหมอไทยในบ่อดิน

4. ผลการทดลอง

เมื่อจะเริ่มเตรียมสารเคมีสำหรับทำการทดลอง ผู้วิจัยประสงค์ทราบความเข้มข้นของสารเพิ่มการซึมผ่านที่กำหนดไว้ในแผนการทดลอง จึงได้ทดสอบความเป็นพิษของสารเพิ่มการซึมผ่าน 3 ชนิด คือ propylene glycol (PG), oleic acid (OA) และ dimethylsulfoxid (DMSO) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 5 กับไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสม จำนวน 100 ฟอง/ลิตร ติดตามอัตรารอดตายของไข่ปลาที่ได้หลังการแช่ 3 และ 24 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าการใช้สารเพิ่มการซึมผ่านในปริมาณที่สูงขึ้นส่งผลกระทบต่อไข่ปลานิล คือทำให้ไข่มีอัตรารอดตายต่ำลง สารเพิ่มการซึมผ่านชนิด DMSO น่าจะมีความเป็นพิษที่สูงกว่า PG และ OA อย่างไรก็ดี สารเพิ่มการซึมผ่านทั้ง 3 ชนิดที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นระดับที่เหมาะสมทำให้ไข่ปลานิลมีอัตรารอดตายที่สูงหรือใกล้เคียงกับชุดควบคุมตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความเป็นพิษของสารเพิ่มการซึมผ่าน 3 ชนิด ต่อไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสม

ชนิดสารเพิ่มการซึมผ่าน และความเข้มข้น	อัตรารอดตาย (%) ของไข่ปลานิล	
	3 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
ชุดควบคุม	72	68
Propylene glycol 0.5%	73	71
Propylene glycol 5.0%	72	69
Oleic acid 0.5%	75	73
Oleic acid 5.0%	71	70
DMSO 0.5%	72	70
DMSO 5.0%	67	64
DMSO 10%	61	59

จากนั้นจึงปรับแผนการทดลองโดยใช้ความเข้มข้นของสารเพิ่มการซึมทั้ง 3 ชนิดร้อยละ 0.5 แทนการใช้ร้อยละ 5 ในทุกชุดการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่ใช้สารเพิ่มการซึมผ่าน 2 ชนิด ทำการใช้ร้อยละ 0.25 ต่อชนิด รวมเป็นความเข้มข้นของสารเพิ่มการซึมผ่านร้อยละ 0.5 เท่ากัน มีการเพิ่มชุดควบคุมจาก 1 ชุดการทดลองเป็น 5 ชุดการทดลอง ดังนี้

1. control – คือ ไม่ใส่สารเคมีใด
2. control + DM คือ ใส่เฉพาะสาร DMSO ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร/ลิตร
3. control + PG คือ ใส่เฉพาะสาร propylene glycol ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร/ลิตร
4. control + oleic acid คือ ใส่เฉพาะสาร oleic ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร/ลิตร
5. control + alcohol คือใส่ absolute ethanol ที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิลิตร/ลิตร

นอกจากนี้ มีการเพิ่มชุดการทดลองที่ใช้อาหารผสมฮอร์โมนที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัม/ปลาป่น 1 กิโลกรัม ซึ่งเป็นวิธีการทั่วไปที่ใช้ในการแปลงเพศปลานิลปัจจุบันสำหรับการเปรียบเทียบอีก 1 ชุดการทดลอง รวมทั้งหมด 12 ชุดการทดลอง ทำการทดลองแช่ไข่ปลานิลที่อายุ 2 วันหลังการผสม ที่ความหนาแน่นต่ำ (40 ฟอง/ลิตร) รวม 4 ครั้ง สามารถใช้ผลการทดลองได้เพียง 2 ครั้งเท่านั้น โดยผลการแช่เหนี่ยวนำเพศผู้ในปลานิลที่ความหนาแน่นต่ำครั้งที่ 1 ลูกปลานิลมีอัตรารอดตายใกล้เคียงกันโดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ (ร้อยละ 73.33 – 84.17) ดังปรากฏในตารางที่ 3 แสดงว่าการตายของลูกปลานิลระหว่างการทดลองเป็นการตายโดยทั่วไป ที่ไม่มีผลกระทบต่อการทดลอง

ตารางที่ 3 อัตรารอดตายของลูกปลานิลเมื่อสิ้นสุดการทดลองแช่ MT (500 ไมโครกรัม/ลิตร)เหนี่ยวนำปลาเพศผู้ในระยะไข่ปลา (2dpf) ทำการแช่ที่ความหนาแน่นต่ำ (40 ฟอง/ลิตร) นาน 24 ชั่วโมง ครั้งที่ 1

ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (ร้อยละ)
1. control -	84.17 ± 3.82
2.control + DM ที่ความเข้มข้น 0.5 มล./ลิตร	80.00 ± 6.61
3. control + PG ที่ความเข้มข้น 0.5 มล./ลิตร	75.83±14.22
4. control + oleic acid ที่ความเข้มข้น 0.5 มล./ลิตร	73.33 ± 8.04
5. control + alcohol ที่ความเข้มข้น 0.5 มล./ลิตร	82.50 ± 6.61
6. MT 500ug/L +DM ที่ 0.5 มล./ลิตร	79.17±10.10
7. MT 500ug/L +PG ที่ 0.5 มล./ลิตร	75.83 ± 7.64
8. MT 500ug/L + oleic acid ที่ 0.5 มล./ลิตร	73.33 ± 6.29
9. MT 500ug/L +DM 0.5 มล./ลิตร + PG 0.5 มล./ลิตร	73.75 ± 4.79
10 MT 500ug/L +DM 0.5 มล./ลิตร + oleic 0.5 มล./ลิตร.	78.33±15.88
11. MT 500ug/L +PG 0.5 มล./ลิตร + oleic 0.5 มล./ลิตร	81.67 ± 6.29
12. การให้กินอาหารผสมฮอร์โมน 60 มก./อาหาร 1 กิโลกรัม	80.00 ± 9.01
P-value	0.826

ประสิทธิภาพการแปลงเพศปลานิลโดยวิธีการแช่ดังกล่าวนี้ (ตารางที่ 4) พบว่าการแช่ MT ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 80.26 – 93.06 ใกล้เคียงกับชุดควบคุมที่มีเพศผู้ร้อยละ 83.05 – 92.21 โดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติ อย่างไรก็ดี วิธีการแช่สารละลายฮอร์โมนนี้พบว่ามีประสิทธิภาพสูงกว่าวิธีการให้ฮอร์โมนผสมในอาหารที่มีลูกปลาเพศผู้เพียงร้อยละ 76.21±10.89 เท่านั้น

ตารางที่ 4 ประสิทธิภาพการแช่ไข่ปลานิลที่อายุ 2 วันหลังการผสม ทำการแช่ที่ความหนาแน่นต่ำ (40 ฟอง/ลิตร) นาน 24 ชั่วโมง ครั้งที่ 1

ชุดการทดลอง	ค่าร้อยละของปลาแต่ละเพศ		
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้+เพศเมีย
1. control -	89.97 ± 5.03	4.82±4.38	5.21±9.02
2. control+ alcohol	83.05±10.82	11.65±11.77	5.29±5.03
3. control+DM	84.98 ± 8.07	12.84 ± 6.17	2.19±1.89
4. control+PG	87.78 ± 7.92	8.32 ± 3.74	3.89±4.34
5. control+oleic	92.21 ± 7.23	4.40 ± 3.85	3.39±3.59
6. MT+DM	85.51±5.29	8.61 ± 7.67	5.88±5.88
7. MT+PG	80.26±18.12	15.64±13.51	4.11±4.61
8. MT+oleic	93.06±3.88	6.94 ± 3.88	0
9. MT+DM+PG	89.03±8.75	8.52 ± 6.45	2.45±3.17
10. MT+DM+oleic	84.92±5.88	10.83 ± 2.03	4.25±4.29
11. MT+PG+oleic	82.66±8.65	12.41 ± 6.28	4.94±4.59
12. MT + อาหาร	76.21±10.89	14.69±6.33	9.09±5.81
P-value	0.513	0.685	0.778

ผู้วิจัยได้ทำการทดลองแช่ที่ความหนาแน่นต่ำอีก 2 ครั้ง แต่มีปัญหาไฟฟ้าดับ ลูกปลามีอัตรารอดตายต่ำมาก จึงไม่เก็บผลการทดลอง เมื่อทำการทดลองซ้ำอีก ในที่นี้ขอเรียกว่า การทดลองแช่ที่ความหนาแน่นต่ำครั้งที่ 2 ลูกปลามีอัตรารอดตายในช่วงร้อยละ 46.55 – 79.45 (ตารางที่ 5) มีประสิทธิภาพการแช่เหนี่ยวนำเพศที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05; ตารางที่ 6) ชุดควบคุมมีเพศผู้ร้อยละ 82.24 – 89.51 การแช่ในสารละลาย MT ที่ใส่สารเพิ่มการซึมผ่านพบว่ามีเพศผู้ร้อยละ 75.07 – 85.79 การแช่ในสารละลาย MT ที่ไม่ใส่สารเพิ่มการซึมผ่าน (MT immersion) ตรวจพบปลาเพศผู้สูงสุดร้อยละ 89.35±6.57 ส่วนวิธีการใช้ MT ผสมในอาหาร (MT + อาหาร) พบว่ามีลูกปลาเพศผู้ใกล้เคียงกับวิธีการใช้ MT immersion คือร้อยละ 88.16±4.32

ผลการทดลองที่ได้ทั้ง 2 ครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า การใช้สารเพิ่มการซึมผ่านของฮอร์โมนไม่ว่าชนิดใดนาน 24 ชั่วโมง ให้ค่าเฉลี่ยเพศผู้ส่วนมากต่ำกว่าชุดควบคุม แสดงว่าไข่ปลานิลอาจจะได้รับฮอร์โมนมากเกินไป ส่งผลเชิงลบต่อการแช่แปลงเพศปลานิล ขณะที่การแช่ MT immersion โดยไม่มีสารเพิ่มการซึมผ่านนาน 24 ชั่วโมงเท่ากัน พบว่ามีลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 89.35±6.57 ใกล้เคียงกับผลการทดลองที่เคยทำเมื่อปี พ.ศ. 2545 ดังนั้น ระยะการแช่นาน 24 ชั่วโมงร่วมกับการใช้สารเพิ่มการซึมผ่าน น่าจะทำให้ฮอร์โมนเข้าสู่ไข่ปลามากเกินไป จนทำให้เกิด paradox คือ testosterone ที่ได้รับมากเกิน เปลี่ยนโครงสร้างไปเป็น oestradiol ทำให้เหนี่ยวนำไข่ปลานิลเป็นลูกปลาเพศเมียแทนเพศผู้

ตารางที่ 5 อัตรารอดตายของลูกปลานิลเมื่อสิ้นสุดการทดลองแช่ MT (500 ไมโครกรัม/ลิตร) เหนี่ยวนำปลาเพศผู้ในระยะไข่ปลา (2dpf) ที่ความหนาแน่นต่ำ (40 ฟอง/ลิตร) นาน 24 ชั่วโมง ครั้งที่ 2

ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (ร้อยละ)
1. control -	46.55±18.41
2. control + DM ที่ความเข้มข้น 0.5 มล./ลิตร	61.62±12.08
3. control + oleic acid ที่ความเข้มข้น 0.5 มล./ลิตร	56.89±20.63
4. MT 500ug/L +DM ที่ 0.5 มล./ลิตร	79.45±5.78
5. MT 500ug/L +PG ที่ 0.5 มล./ลิตร	58.54±9.46
6. MT 500ug/L + oleic acid ที่ 0.5 มล./ลิตร	57.89±16.94
7. MT 500ug/L +DM 0.5 มล./ลิตร + PG 0.5 มล./ลิตร	55.11±20.65
8. MT 500ug/L +DM 0.5 มล./ลิตร + oleic 0.5 มล./ลิตร.	47.99±19.85
9. MT 500ug/L +PG 0.5 มล./ลิตร + oleic 0.5 มล./ลิตร	52.29±25.66
10. MT immersion	66.56±12.89
11. MT + อาหาร (60 มก./อาหาร 1 กิโลกรัม)	58.12±9.24
P-value	0.527

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพการแช่ไข่ปลานิล(2dpf) ที่ความหนาแน่นต่ำ(40 ฟอง/ลิตร) นาน 24ชั่วโมง ครั้งที่ 2

ชุดการทดลอง	ค่าร้อยละของปลาแต่ละเพศ		
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้+เพศเมีย
1. control -	82.24±12.62	11.84±6.35	5.92±6.28
2. control+DM	82.30±3.58	13.87±0.72	3.83±3.60
3. control+oleic	89.51±5.77	10.49±5.77	0
4. MT+DM	80.90±13.02	11.11±6.36	7.99±7.81
5. MT+PG	79.47±6.82	12.54±1.90	7.99±7.12
6. MT+oleic	82.32±24.66	12.56±15.77	5.13±8.88
7. MT+DM+PG	78.04±9.99	16.83±8.30	5.13±2.22
8. MT+DM+oleic	85.79±5.83	11.54±3.00	2.67±4.62
9. MT+PG+oleic	75.07±9.14	16.63±7.99	8.31±2.23
10. MT immersion	89.35±6.57	7.79±7.23	2.86+2.58
11. MT + อาหาร	88.16±4.32	8.51±1.94	3.33±5.78
P-value	0.816	0.819	0.625

ผลการทดลองแช่เหนี่ยวนำเพศปลานิลที่**ความหนาแน่นสูง**ในกิจกรรมที่ 1.2 นี้ ทำระหว่างที่รอผลการทดลองแช่ที่ความหนาแน่นต่ำ เพราะเกรงว่าจะทำให้งานทดลองล่าช้า ทำการทดลองรวม 3 ครั้ง โดยทดลองใช้สารเพิ่มการซึมผ่านทั้ง 3 ชนิด ชนิดละ 1 การทดลอง เมื่อทดลองใช้สารเพิ่มการซึมผ่านชนิด oleic acid การแช่เหนี่ยวนำเพศในระยะไข่ปลาที่อายุ 2 วันหลังการผสมบนโต๊ะขยับสารละลาย สามารถทำการแช่ที่ความหนาแน่นสูงถึง 12,685 – 20,840 ฟอง/ลิตร โดยไม่พบการตายของไข่ปลา แต่การแช่ในระยะลูกปลาวัยอ่อน ที่อายุ 5 วันหลังการผสม เป็นระยะที่ไข่ปลาฟักเป็นตัวแล้ว การแช่ในสารละลาย oleic acid ทำให้ลูกปลาตายตายหมดภายใน 50 นาทีหลังการแช่ แสดงว่า oleic acid น่าจะเป็นพิษกับลูกปลาวัยอ่อน การแช่ MT ที่ใช้ oleic acid เป็นสารเพิ่มการซึมผ่าน 2 ครั้งที่อายุ 2 และ 11 วันหลังการผสม นอกจากจะทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ต่ำกว่าชุดควบคุมแล้ว ยังทำให้ได้ลูกปลา 2 เพศเพิ่มสูงขึ้นเป็นร้อยละ 22.75 มากกว่าชุดควบคุมที่มีลูกปลา 2 เพศร้อยละ 9.09 เท่านั้น ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การใช้ oleic acid เป็นสารเพิ่มการซึมผ่านแช่ไข่และลูกปลานิลนาน 24 ชั่วโมงที่ความหนาแน่นสูง ทำให้ไข่และลูกปลานิลได้รับฮอร์โมน MTมากเกินไป จนส่งผลในทางตรงข้าม คือทำให้ลูกปลาเพศเมียมากขึ้น

ตารางที่ 7 อัตรารอดและปริมาณเพศลูกปลาที่ได้จากการทดลองแช่เหนี่ยวนำเพศลูกปลานิลที่ความหนาแน่นสูง ที่ใช้ oleic acid (OA) เป็นสารเพิ่มการซึมผ่าน

ชุดการทดลอง	ค่าร้อยละของปลานิลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง			
	อัตรารอด	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้+ เพศเมีย
1. Control -	37.18±1.16	82.73±2.09[a]	8.88±5.13	8.39±3.03
2. Control + OA (1 ครั้ง)	44.49±3.08	88.31±3.68[a]	9.42±6.89	2.27±3.21
3. MT + OA (1 ครั้ง)	34.92±6.09	69.70±4.29[b]	22.43±6.00	7.88±1.71
P-value	0.189	0.031	0.221	0.238
4. Control + OA (2 ครั้ง)	33.33	90.91	0	9.09
5. MT+ OA (2 ครั้ง)	52.08	72.73	4.54	22.75

หมายเหตุ: ชุดการทดลองที่ 4 และ 5 เหลือลูกปลาเพียง 1 ซ้ำเท่านั้น

อักษรอังกฤษที่ต่างกันในแถวตั้งแสดงความแตกต่างทางสถิติ ($P<0.05$)

ผลการใช้ Propylene glycol (PG) เป็นสารเพิ่มการซึมผ่านของ MT ที่ความหนาแน่น 19,900 ฟอง/ลิตร จำนวน 1, 2 และ 3 ครั้ง นานครั้งละ 24 ชั่วโมง ที่อายุ 2, 5 และ 11 วันหลังการผสม ทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แต่ปริมาณลูกปลาสองเพศมีความแตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 8) การแช่ MT ในสารละลายเพิ่มการซึมผ่านชนิด PG จำนวน 3 ครั้ง (ที่อายุ 2, 5 และ 11 วันหลังการผสม) มีลูกปลาเพศผู้ต่ำที่สุด คือร้อยละ 62.59±8.86 และมีลูกปลาสองเพศสูงถึงร้อยละ 12.04±5.06 ขณะที่ชุด

ควบคุมที่แช่ PG จำนวน 3 ครั้งเช่นกัน พบลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 63.40±10.50 มีลูกปลาสองเพศเพียงร้อยละ 8.76±4.84 สอดคล้องกับการทดลองใช้สารเพิ่มการซึมผ่านชนิด dimethylsulfoxside (DM) ที่ความหนาแน่น 20,059 ฟอง/ลิตร จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 24 ชั่วโมง ที่อายุ 2, 5, 11 วันหลังการผสม พบว่าทำให้ได้ลูกปลาเพศผู้เหลือเพียงร้อยละ 49.24±2.64 และพบปลาสองเพศสูงถึงร้อยละ 17.69±6.41 ขณะที่ชุดควบคุมที่แช่ในสารละลาย DM จำนวน 2 ครั้งที่อายุ 2, 5 วันหลังการผสม พบว่ามีลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 60.92±0.63 ปลาสองเพศร้อยละ 4.58±3.17 (ตารางที่ 9) ในการทดลองใช้สารเพิ่มการซึมผ่านชนิด PG และ DM ไม่พบการตายของไข่และลูกปลาระหว่างการแช่ แต่พบการตายของลูกปลาระหว่างการรอแช่เหนี่ยวนำเพศ ทำให้ผลเพศลูกปลาบางชุดการทดลองขาดหายหรือเหลือเพียง 1 ซ้ำเท่านั้น

การทดลองใช้สารเพิ่มการซึมผ่านชนิด PG และ DM ให้ผลที่สอดคล้องกับการใช้สารเพิ่มการซึมผ่านชนิด oleic acid การทดลองทั้ง 3 ครั้งนี้ ทำการแช่นานครั้งละ 24 ชั่วโมง จำนวน 1 – 3 ครั้ง ที่ความหนาแน่นสูง (19,900 – 20,840 ฟอง/ลิตร) เกิด paradox ที่ชัดเจนมากกว่าการแช่ความหนาแน่นต่ำ (40 ฟอง/ลิตร) ที่แช่ MT ร่วมกับสารเร่งการซึมผ่านทั้ง 3 ชนิด นาน 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ครั้ง เท่านั้น

ตารางที่ 8 อัตรารอดและปริมาณเพศลูกปลานิลที่ได้จากการทดลองแช่เหนี่ยวนำเพศที่ความหนาแน่นสูง ที่ใช้ Propylene glycol (PG) เป็นสารเพิ่มการซึมผ่าน

ชุดการทดลอง	ค่าร้อยละของปลานิลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง			
	อัตรารอด	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้+เพศเมีย
Control -	71.00±12.73	60.45±17.05	26.13±8.67	13.43±8.38 [a]
Control + PG (1 ครั้ง)	69.33±3.06	67.70±1.66	22.97±1.98	9.33±3.52 [ab]
Control + PG (2 ครั้ง)	76.00±12.17	55.54±9.15	37.75±12.23	6.71±3.29 [abc]
Control + PG (3 ครั้ง)	78.67±10.26	63.40±10.50	27.68±14.68	8.76±4.84 [abc]
MT+ PG (1 ครั้ง)	77.00±1.41	68.90±3.11	28.55±3.18	2.55±0.07 [c]
MT+ PG (2 ครั้ง)	82.00±8.00	66.23±6.24	30.38±4.58	3.36±1.78 [bc]
MT+ PG (3 ครั้ง)	76.67±4.16	62.59±8.86	25.37±9.63	12.04±5.06 [a]
P-value	0.608	0.530	0.645	0.029

หมายเหตุ: อักษรอังกฤษที่ต่างกันในแถวตั้งแสดงความแตกต่างทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 9 อัตรารอดและปริมาณเพศลูกปลานิลที่ได้จากการทดลองแช่เหนี่ยวนำเพศที่ความหนาแน่นสูง ใช้ Dimethylsulfoxside (DMSO) เป็นสารเพิ่มการซึมผ่าน

ชุดการทดลอง	ค่าร้อยละของปลานิลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง			
	อัตรารอด	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้+เพศเมีย
1. Control -	86.00±5.66	63.61±1.97	31.67±2.35	4.72±0.40
2. Control + DM (1 ครั้ง)	88.00±8.49	65.83±8.85	29.72±9.13	4.46±0.28
3. Control + DM (2 ครั้ง)	87.00±1.41	60.92±0.63	34.27±3.46	4.58±3.17
4. MT+DM (2 ครั้ง)	77.00±1.41	67.48±6.11	24.70±2.29	7.83±3.83
5. MT+DM (3 ครั้ง)	83.00±9.90	49.24±2.64	33.07±9.05	17.69±6.41
P-value	0.317	0.539	0.593	0.284
6. MT+ DM (1 ครั้ง)	84.00	69.05	16.67	11.90

หมายเหตุ: ชุดการทดลองที่ 6 เหลือลูกปลาเพียง 1 ซ้ำเท่านั้น

ผลการทดลองเปรียบเทียบประสิทธิภาพของสารเพิ่มการซึมผ่าน 2 ชนิด (OA & PG) ในการแช่เหนี่ยวเพศปลานิลที่ความหนาแน่นสูง

การทดลองแช่ไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสมนี้ ดำเนินการทดลองรวม 3 ครั้ง ประกอบด้วยการทดลองเปรียบเทียบระยะการแช่ 1 ชั่วโมงจำนวน 2 ครั้ง และการทดลองเปรียบเทียบระยะการแช่ 3 ชั่วโมง อีก 1 ครั้ง โดยการทดลองแช่ 1 ชั่วโมงทั้ง 2 ครั้งนี้ ทำการเก็บผลเพศปลาที่อายุ 2 เดือน ส่วนการทดลองแช่ 3 ชั่วโมง ทำการเก็บผลเพศปลา 2 ครั้งที่อายุต่างกันคือ 1 และ 2 เดือน เมื่อทำการตรวจเช็คเพศลูกปลาที่ผ่านการแช่เหนี่ยวนำเพศนาน 1 ชั่วโมง ครั้งที่ 1 ลูกปลานิลอายุ 2 เดือนหลังการผสมมีความยาวเหยียดของลำตัว 3.2 – 6.9 เซนติเมตร มีอัตรารอดตายใกล้เคียงกันอยู่ในช่วงร้อยละ 80.49 – 94.86 การแช่ไข่ปลานิลที่อายุ 2 วันหลังการผสมในสารละลาย MT หรือ MT + PG หรือ MT+OL นาน 1 ชั่วโมง พบลูกปลาเพศผู้ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน คือร้อยละ 56.98 – 62.56 โดยไม่แสดงความแตกต่างจากชุดควบคุมทั้ง 4 ชุดการทดลองที่พบลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 55.42 – 61.22 แสดงว่าการแช่สารละลายฮอร์โมน MT และสารเพิ่มการซึมผ่านไม่ว่าจะเป็นชนิด oleic acid (OL) หรือ propylene glycol (PG) ไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำเพศปลานิล (ตารางที่ 10)

ตารางที่ 10 อัตรารอดตายและปริมาณลูกปลานิลเพศผู้จากการแช่ไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสมที่ความหนาแน่นสูง (15,740 ฟอง/ลิตร) ใช้สารเพิ่มการซึมผ่าน 2 ชนิด (OL+PG) นาน 1 ชั่วโมง ครั้งที่ 1 ทำการตรวจเพศที่อายุ 2 เดือน

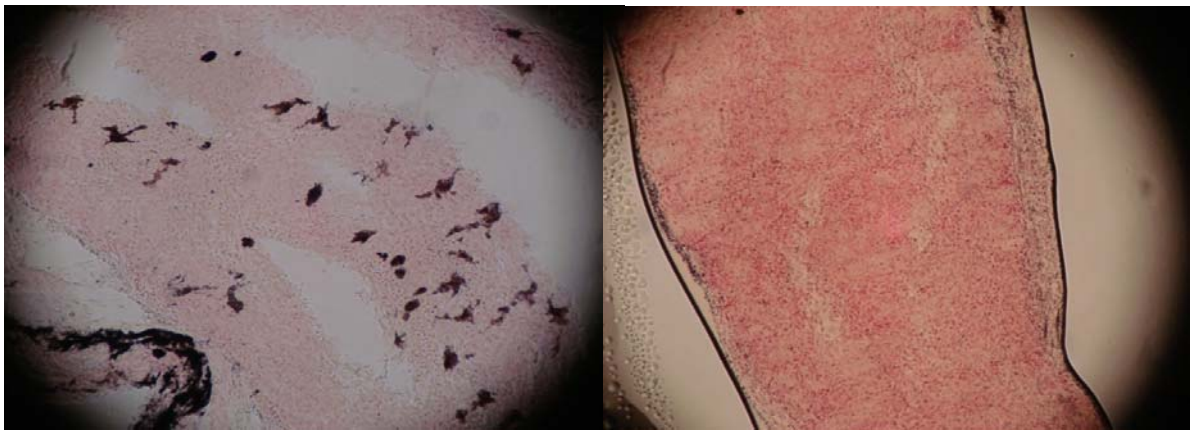
ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (ร้อยละ)	เพศผู้ (ร้อยละ)
1. Control -	93.75 ± 0.56	61.22 ± 5.58
2. Control +	85.81 ± 13.78	55.42 ± 5.60
3. Control + OL	94.86 ± 1.13	60.12 ± 2.42
4. Control + PG	85.81 ± 13.78	56.12 ± 6.46
5. MT + OL	91.39 ± 3.20	56.98 ± 4.16
6. MT + PG	80.49 ± 23.48	62.48 ± 8.01
7. MT immersion	91.38 ± 0.93	62.56 ± 6.54
P-value	0.876	0.945

ในการทดลองครั้งที่ 2 ของการแช่ไข่ปลานิลที่ความหนาแน่นสูงนาน 1 ชั่วโมง ประสงค์ที่จะแก้ไขข้อบกพร่องของการทดลองครั้งที่ 1 ที่บางซ้ำลูกปลาตายค่อนข้างมาก แต่กลับพบปัญหาอื่นคือนกกระยางขาวมากินลูกปลานิลที่อนุบาลไว้ก่อนการเก็บผลการทดลอง ทำให้อัตรารอดตายของลูกปลานิลลดลงอย่างมากเหลือเพียงร้อยละ 25.31 – 74.37 เท่านั้น ทั้งที่อัตรารอดตายของลูกปลานิลที่อายุ 11 วันหลังการผสมก่อนที่จะทำการย้ายลูกปลาลงกระชังมีอัตรารอดตายสูงอยู่ในช่วงร้อยละ 84.74 – 93.70 (ตารางที่ 11) ผลการเก็บเพศปลาพบว่า ในทุกชุดการทดลองปลานิลมีเพศผู้ใกล้เคียงกัน คืออยู่ในช่วงร้อยละ 47 – 55 โดยไม่มีความตกต่างทางสถิติ (ตารางที่ 11) แสดงว่า การใช้สารเพิ่มการซึมผ่านทั้ง OL และ PG ร่วมกับฮอร์โมน MT ไม่ส่งผลต่อการเหนี่ยวนำเพศปลานิล

ตารางที่ 11 อัตรารอดตายและปริมาณลูกปลานิลเพศผู้จากการแช่ไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสมที่ความหนาแน่นสูง (26,392 ฟอง/ลิตร) ใช้สารเพิ่มการซึมผ่าน 2 ชนิด (OL+PG) นาน 1 ชั่วโมง ครั้งที่ 2 ตรวจเพศที่อายุ 2 เดือน

ชุดการทดลอง	อัตรารอดที่ 11 วัน (ร้อยละ)	อัตรารอดที่ 2 เดือน (ร้อยละ)	เพศผู้ (ร้อยละ)
1. Control -	87.11 ± 7.44	74.37 ± 23.30	51.05 ± 4.02
2. Control +	90.05 ± 9.64	51.26 ± 41.88	52.00 ± 12.00
3. Control OL	92.55 ± 2.53	47.84 ± 38.46	50.37 ± 5.46
4. Control PG	93.67 ± 1.65	35.09 ± 11.36	48.00 ± 3.46
5. MT + OL	88.04 ± 10.24	57.51 ± 14.25	51.33 ± 4.16
6. MT + PG	93.70 ± 2.34	25.31 ± 1.24	47.00 ± 7.07
7. MT immersion	84.74 ± 7.29	61.99 ± 23.64	55.00 ± 4.24
P-value	0.865	0.743	0.887

เมื่อทำการทดลองแช่ไข่ปลานิลที่อายุ 2 วันหลังการผสมนาน 3 ชั่วโมง ผลการเก็บเพศลูกปลานิลที่อายุ 1 เดือน หรือ 36-38 วันหลังการผสม ลูกปลามีความยาวเหยียดอยู่ในช่วง 1.7 – 4.2 เซนติเมตร ลูกปลามีอวัยวะเพศ (gonad) ขนาดเล็ก โครงสร้างเนื้อเยื่อของอวัยวะเพศประกอบด้วยเซลล์ขนาดเล็กคล้ายเนื้อเยื่อเพศผู้เป็นส่วนมาก (รูปที่ 8ก) พบลูกปลาเพศผู้สูงมากอยู่ในช่วงร้อยละ 97.33 – 100 ขณะที่การเก็บเพศลูกปลาอายุ 2 เดือน ลูกปลามีความยาวเพิ่มขึ้นมากอยู่ในช่วง 3.8 – 6.8 เซนติเมตร แต่พบปริมาณลูกปลาเพศผู้กลับลดลงอย่างชัดเจนอยู่ในช่วงร้อยละ 50.49 – 54.33 โดยชุดควบคุมทั้ง 4 ชุดการทดลอง มีเพศผู้ร้อยละ 50.49 - 55.15 ใกล้เคียงกับลูกปลาที่แช่ฮอร์โมน 3 ชุดการทดลอง มีลูกปลาเพศผู้อยู่ในช่วงร้อยละ 53.01 – 54.33 โดยไม่แสดงความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 12) แสดงว่าการแช่สารเพิ่มการซึมผ่านทั้ง 2 ชนิด ร่วมกับสารละลายฮอร์โมน MT นาน 3 ชั่วโมงไม่มีผลต่อการเหนี่ยวนำเพศปลานิลที่ความหนาแน่นสูง



(ก) เพศผู้ (ข) เพศเมีย

รูปที่ 8 ลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่ออวัยวะเพศของลูกปลานิลที่อายุ 1 เดือน โดย aceto-carmine squash method แสดงลักษณะโครงสร้างเนื้อเยื่อใต้กล้องจุลทรรศน์ขยาย 100X (ก) เพศผู้ (ข) เพศเมีย

ตารางที่ 12 อัตรารอดตายและปริมาณลูกปลานิลเพศผู้จากการแช่ไข่ปลานิลอายุ 2 วันหลังการผสมที่ความหนาแน่นสูง (21,740 ฟอง/ลิตร) นาน 3 ชั่วโมง ทำการตรวจเพศลูกปลาที่อายุ 1 และ 2 เดือน

ชุดการทดลอง	เพศผู้ที่อายุ 1 เดือน (ร้อยละ)	อัตรารอดที่อายุ 2 เดือน (ร้อยละ)	เพศผู้ที่อายุ 2 เดือน (ร้อยละ)
1. Control -	97.33± 3.06	83.73 ± 22.08	53.33 ± 7.02
2. Control +	100.0 ± 0.00	80.08 ± 10.75	50.49 ± 0.69
3. Control OL	100.0 ± 0.00	85.53 ± 6.92	54.33 ± 5.86
4. Control PG	100.0 ± 0.00	96.93 ± 4.16	55.15 ± 3.61
5. MT + OL	100.0 ± 0.00	79.67 ± 14.43	53.01 ± 3.59
6. MT + PG	99.33 ± 1.15	87.60 ± 6.24	54.33 ± 5.52
7. MT immersion	100.0 ± 0.00	97.40 ± 0.28	53.53 ± 0.66
P-value	0.987	0.845	0.958

ผลการใช้ปัจจัยกายภาพ (electricity) **เหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้ที่ความหนาแน่นสูง**

ในเบื้องต้นมีการทดสอบผลกระทบของไฟฟ้ากระแสตรง (DC) ต่อการแสดงออกของลูกปลานิลอายุ 5-6 วันก่อนการทดลองจริง ด้วยการใช้ไฟ DC ที่แรงเคลื่อนต่างระดับ จับเวลาที่ลูกปลาเริ่มนอนนิ่งไม่เคลื่อนไหว พบว่า เมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้า DC เข้าถาดทดลอง มีผลทำให้ลูกปลาสะดุ้ง กระตุก และหยุดการว่ายน้ำเคลื่อนที่ในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ผกผันกับระดับแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่ต่างกัน โดยแรงเคลื่อนไฟ DC ระดับต่ำ (2 – 6 โวลต์) ระดับกลาง (7 – 10 โวลต์) และระดับสูง (11 – 12 โวลต์) ทำให้ลูกปลาหยุดการเคลื่อนที่ในเวลา 18 – 30, 6.8 – 15 และ 4 วินาที ตามลำดับ (ตารางที่ 13) นอกจากนี้ มีการทดสอบการใช้ไฟ DC 6 และ 12 โวลต์ ปล่อยเข้าสู่ถาดทดลองที่มีลวดอลูมิเนียมที่ก้นถาด เติมน้ำเปล่า 500 มิลลิลิตร 1 ถาด และสารละลายฮอร์โมน MT (500 ไมโครกรัม/ลิตร) ในปริมาตรที่เท่ากัน (500 มิลลิลิตร) อีก 1 ถาด พบว่าไฟ DC ทำให้เกิดฟองขนาดเล็กๆ เกาะที่ลวดอลูมิเนียม แสดงถึงปฏิกิริยาของไฟ DC ต่อลวดอลูมิเนียม ในระยะเวลาอันสั้นไม่กี่วินาที สารละลายในถาดทั้งสองเปลี่ยนสีจากใสเป็นขาวขุ่นภายใน 2 และ 10 นาที เมื่อใช้ DC 12 และ 6 โวลต์ ตามลำดับ การเปลี่ยนสีของสารละลาย แสดงว่าสารอลูมิเนียมจากเส้นลวดที่ก้นถาดละลายออกมาสู่น้ำหรือสารละลายที่ใส่ไว้ ผู้วิจัยจึงเลือกใช้ไฟ DC ที่แรงเคลื่อน 12 โวลต์ ในระยะเวลาสั้น คือ 1-2 วินาที พัก 2 นาที ทำการให้ DC แก่ไข่/ลูกปลานิล จำนวน 3, 6, 9, 12 และ 15 ครั้งร่วมกับการใช้สารละลาย MT ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ พบว่าการใช้ DC จำนวน 9 – 15 ครั้งส่งผลทำให้ไข่ปลาตายเป็นจำนวนมาก โดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเหนี่ยวนำเพศแต่อย่างใด (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 13 ระดับแรงเคลื่อนไฟฟ้า DC ที่ต่างกัน ส่งผลต่อระยะเวลาหยุดการเคลื่อนที่ของลูกปลานิลอายุ 5-6 วันหลังการผสม

ระดับแรงเคลื่อนไฟฟ้า DC (โวลต์)	ระยะเวลาถึงหยุดการเคลื่อนที่ (วินาที)
2	30
3	25
4	22
5	18
6	18
7	15
8	12
9	9.4
10	6.8
11	4
12	4

ตารางที่ 14 ผลการใช้ DC 12 โวลต์ 1-2 วินาที พัก 2 นาทีร่วมกับ MT (500µg/L) เหนี่ยวนำเพศปลานิล (2dpf) ที่ความหนาแน่น 2,446 ฟอง/100 มิลลิลิตร ครั้งที่ 1

ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (%)	ลูกปลาเพศผู้ (%)
Control – 1	35.90	45.16
Control – 2	-	-
Control - 3	-	-
Control MT immersion ซ้ำ 1	-	-
Control MT immersion ซ้ำ 2	49.22	44.83
Control MT immersion ซ้ำ 3	46.85	43.64
MT+DC 3 ครั้ง ซ้ำ1	55.43	44.00
MT+DC 3 ครั้ง ซ้ำ2	-	-
MT+DC 3 ครั้ง ซ้ำ3	52.70	42.00
MT+DC 6 ครั้ง ซ้ำ 1	30.95	53.38
MT+DC 6 ครั้ง ซ้ำ 2	-	-
MT+DC 6 ครั้ง ซ้ำ 3	20.97	52.94
MT+DC 9 ครั้ง ซ้ำ 1	-	-
MT+DC 9 ครั้ง ซ้ำ 2	22.12	40.99
MT+DC 9 ครั้ง ซ้ำ 3	-	-
MT+DC 12 ครั้ง ซ้ำ 1	-	-
MT+DC 12 ครั้ง ซ้ำ 2	-	-
MT+DC 12 ครั้ง ซ้ำ 3	0	-
MT+DC 15 ครั้ง ซ้ำ 1	0	-
MT+DC 15 ครั้ง ซ้ำ 2	0	-
MT+DC 15 ครั้ง ซ้ำ 3	2.78	52.78

หมายเหตุ: Control – หมายถึงชุดการทดลองที่ฟักไข่/ลูกปลาในโหล (รูปที่ 5ก) โดยไม่ใส่ MT

Control MT immersion คือการแช่ MT (500µg/L) ในถาดทดลองบนโต๊ะขยับฯโดยไม่ใส่ DC

MT+DC 3–15 ครั้งคือการแช่ MTในถาดทดลองใส่DC จำนวน 3–15 ครั้งระหว่างครั้งพัก 2 นาที

แสดงว่าการใช้ไฟฟ้า DC เหนี่ยวนำหลายๆ ครั้ง ทำให้ไข่/ลูกปลาตาย จึงทำการลดจำนวนครั้งของ DC และเพิ่มระยะการพักในการทดลองครั้งที่ 2 โดยใช้ DC เหนี่ยวนำเพศปลานิลในระยะไข่ปลา (2dpf) โดยใช้ DC 12 โวลต์ นาน 1-2 วินาที พัก 3 นาที จำนวน 1, 3, 5 และ 7 ครั้ง ชุดการทดลองละ 3 ซ้ำ พบว่าสามารถทำการทดลองจนแล้วเสร็จ ลูกปลามีอัตรารอดตายในช่วงร้อยละ 35.55 – 72.41 มีลูกปลาเพศผู้ที่อายุ 2 เดือนร้อยละ 40.38 – 55.80 (ตารางที่ 15) วิธีการใช้ DC ยังไม่ส่งผลกระทบต่อการเหนี่ยวนำเพศไข่ปลานิล

ตารางที่ 15 ผลการใช้ DC 12 โวลต์ 1-2 วินาที พัก 3 นาทีร่วมกับ MT (500µg/L) เหนี่ยวนำเพศปลานิล (2dpf) ที่ความหนาแน่น 2,858 ฟอง/100 มิลลิลิตร ครั้งที่ 2

ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (%)	ลูกปลาเพศผู้ (%)
Control -	64.26±7.25	55.80±2.75
Control + DC	35.55±3.96	40.38±12.33
MT immersion	57.25±23.09	49.24±2.94
MT+ DC 1 ครั้ง	72.41±1.36	51.26±4.68
MT + DC 3 ครั้ง	68.31±5.37	53.59±8.49
MT + DC 5 ครั้ง	59.98±6.45	54.42±7.66
MT + DC 7 ครั้ง	46.26±8.77	54.95±3.00
P-value	0.296	0.829

หมายเหตุ: Control – คือ ชุดควบคุมที่ฟักไข่ในกระปุก 1 ลิตรโดยไม่ใส่ MT และไม่ได้อยู่บนโต๊ะขยับฯ
Control + DC คือชุดการทดลองที่อยู่ในถาดทดลองบนโต๊ะขยับฯใส่ DC แต่ไม่ใส่ MT
MT immersion คือชุดการทดลองที่แช่ใน MT 500µg/L บนโต๊ะขยับฯ โดยไม่ใส่ DC
MT+DC คือชุดการทดลองที่แช่ MT 500µg/L และใส่ DC จำนวน 1, 3, 5 หรือ 7 ครั้ง

จากนั้นทำการทดลองใช้ DC เหนี่ยวนำเพศปลานิลในครั้งที่ 3 และ ครั้งที่ 4 ด้วยวิธีการในลักษณะเดียวกันกับแผนการทดลองในตารางที่ 15 แต่ดำเนินการกับลูกปลานิลวัยอ่อนที่อายุ 5 – 7dpf (ตารางที่ 16) และอายุ 7-10 dpf (ตารางที่ 17) โดยใช้ DC 12 โวลต์ 2 วินาที พัก 10 นาที พบว่าวิธีการที่ใช้ยังไม่ส่งผลต่อการเหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้แต่อย่างใด

ตารางที่ 16 ผลการใช้ DC 12 โวลต์ 2 วินาที พัก 10 นาทีร่วมกับ MT (500µg/L) เหนี่ยวนำเพศปลานิล (5-7dpf) ที่ความหนาแน่น 1,012 ตัว/100 มิลลิลิตร

ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (%)	ลูกปลาเพศผู้ (%)
Control -	76.28±8.60	58.29±11.89
Control + DC	83.47±14.09	66.51±7.82
MT immersion	86.76±5.22	63.04±2.62
MT+ DC 1 ครั้ง	82.71±2.57	51.33±8.67
MT + DC 3 ครั้ง	76.65±16.84	59.77±1.09
MT + DC 5 ครั้ง	77.04±7.46	54.78±6.22
P-value	0.738	0.216

หมายเหตุ: Control – คือ ชุดควบคุมที่ฟักไข่ในกระปุก 1 ลิตรโดยไม่ใส่ MT และไม่ได้อยู่บนโต๊ะขยับฯ
Control + DC คือชุดการทดลองที่อยู่ในถาดทดลองบนโต๊ะขยับฯ ใส่ DC แต่ไม่ใส่ MT
MT immersion คือชุดการทดลองที่แช่ใน MT 500µg/L บนโต๊ะขยับฯ โดยไม่ใส่ DC
MT+DC คือชุดการทดลองที่แช่ MT 500µg/L และใส่ DC จำนวน 1, 3 หรือ 5 ครั้ง

ตารางที่ 17 ผลการใช้ DC 12 โวลต์ 1-2 วินาที พัก 10 นาทีร่วมกับ MT เหนี่ยวนำเพศปลานิล (7-10dpf) ที่ความหนาแน่น 579 ตัว/100 มิลลิลิตร

ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (%)	ลูกปลาเพศผู้ (%)
Control -	86.68±0.28	51.95±5.22
Control + DC	83.12±11.96	56.31±5.72
MT immersion	84.56±2.95	56.84±8.82
MT+ DC 1 ครั้ง	77.95±5.88	64.38±5.19
MT + DC 3 ครั้ง	77.95±5.88	55.45±5.54
MT + DC 5 ครั้ง	77.32±15.92	55.98±4.65
P-value	0.832	0.319

หมายเหตุ: Control – คือ ชุดควบคุมที่ฟักไข่ในกระปุก 1 ลิตรโดยไม่ใส่ MT และไม่ได้อยู่บนโต๊ะขยับฯ
Control + DC คือชุดการทดลองที่อยู่ในถาดทดลองบนโต๊ะขยับฯ ใส่ DC แต่ไม่ใส่ MT
MT immersion คือชุดการทดลองที่แช่ใน MT 500µg/L บนโต๊ะขยับฯ โดยไม่ใส่ DC
MT+DC คือชุดการทดลองที่แช่ MT 500µg/L และใส่ DC จำนวน 1, 3 หรือ 5 ครั้ง

การทดลองใช้ DC เหนี่ยวนำเพศลูกปลานิลต่อ โดยใช้ DC 12 โวลต์แบบเป็นชุด คือ 1 ชุดเท่ากับการใส่ DC จำนวน 3 ครั้ง มีการพักระหว่างครั้งประมาณ 5 – 10 วินาที เมื่อใส่ DC ครบ 1 ชุด (3 ครั้ง) จะพักระหว่างชุด 15 นาที ก่อนที่จะใส่ DC ชุดต่อไป ทำการทดลองใช้ DCแบบเป็นชุดในปลานิลไปแล้ว 8 ครั้ง แต่จะเก็บผลได้เพียง 2 การทดลอง พบว่าการใช้ DC แบบนี้ยังไม่ส่งผลต่อการเหนี่ยวนำเพศ (ตารางที่ 18, 19)

ตารางที่ 18 ผลการใช้ DC 12 โวลต์ แบบเป็นชุด ชุดละ 3 ครั้งเหนี่ยวนำเพศลูกปลานิลอายุ 5 – 7 วัน ที่ความหนาแน่น 604 ตัว/100 มิลลิลิตร เก็บผลเพศปลาที่อายุ 2 เดือนหลังการผสม

ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (%)	ลูกปลาเพศผู้ (%)
Control -	84.58± 8.77	49.82± 8.57
Control + DC	82.41± 3.58	56.52± 2.95
MT immersion	80.00± 4.24	56.03±14.17
MT+ DC 1 ชุด	79.40± 4.45	59.01± 1.64
MT + DC 3 ชุด	81.94±10.69	56.13± 8.67
MT + DC 6 ชุด	81.73± 2.40	60.47±15.84
MT + DC 9 ชุด	84.72± 3.77	49.21± 2.88
P - value	0.881	0.716

หมายเหตุ: Control – คือ ชุดควบคุมที่ฟักไข่ในกระปุก 1 ลิตรโดยไม่ใส่ MT และไม่ได้อยู่บนโต๊ะขยับฯ
Control + DC คือชุดการทดลองที่อยู่ในถาดทดลองบนโต๊ะขยับฯ ใส่ DC แต่ไม่ใส่ MT
MT immersion คือชุดการทดลองที่แช่ใน MT 500µg/L บนโต๊ะขยับฯ โดยไม่ใส่ DC
MT+DC คือชุดการทดลองที่แช่ MT 500µg/L และใส่ DC แบบเป็นชุด แต่ละชุดเหนี่ยวนำด้วย DC 1-2 วินาที จำนวน 3 ครั้ง/ชุด รวม 1, 3, 6 หรือ 9 ชุด

ตารางที่ 19 ผลการใช้ DC 12 โวลต์ แบบเป็นชุดละ 3 ครั้งเหนี่ยวนำเพศลูกปลานิลอายุ 7 – 10 วัน ที่ความหนาแน่น 604 ตัว/100 มิลลิลิตร

ชุดการทดลอง	อัตรารอดตาย (%)	ลูกปลาเพศผู้ (%)
Control -	83.98± 2.04[a]	55.83± 12.58
Control + DC	75.74± 4.91[a]	52.12± 5.06
MT immersion	83.95± 4.26[a]	58.77± 5.08
MT+ DC 1 ชุด	63.23± 1.09[b]	57.22± 11.07
MT + DC 3 ชุด	84.67±4.94[a]	51.67± 9.60
MT + DC 6 ชุด	84.28± 3.08[a]	51.69±13.86
MT + DC 9 ชุด	61.91± 8.70[b]	47.35± 11.08
P - value	0.000	0.839

หมายเหตุ: Control – คือ ชุดควบคุมที่ฟักไข่ในกระปุก 1 ลิตรโดยไม่ใส่ MT และไม่ได้อยู่บนโต๊ะขยับฯ
Control + DC คือชุดการทดลองที่อยู่ในถาดทดลองบนโต๊ะขยับฯ ใส่ DC แต่ไม่ใส่ MT
MT immersion คือชุดการทดลองที่แช่ใน MT 500µg/L บนโต๊ะขยับฯ โดยไม่ใส่ DC
MT+DC คือชุดการทดลองที่แช่ MT 500µg/L และใส่ DC แบบเป็นชุด แต่ละชุดเหนี่ยวนำด้วย DC 1-2 วินาที จำนวน 3 ครั้ง/ชุด รวม 1, 3, 6 หรือ 9 ชุด

ผู้วิจัยได้นำวิธีการใช้ไฟ DC 12V มาเหนี่ยวนำเพศปลาหมอไทย ดำเนินการที่ขอนแก่นฟาร์ม พบว่ามีปัญหาผ้าโอล่อนแก้วขาด ทำให้มีลูกปลาทดลองเหลือน้อยมาก อัตรารอดตายไม่ถึงร้อยละ 1 (0.43 – 0.73%) เป็นเพราะผู้วิจัยขาดประสบการณ์ด้านการอนุบาลลูกปลาหมอไทย ลูกปลาวัยอ่อนมีขนาดเล็กมาก ลูกปลาที่ฟักจากไข่จะมีความยาวเพียง 2-3 มิลลิเมตร เท่านั้น ระหว่างการแช่ไม่พบการตายของลูกปลา ปัญหาเกิดขึ้นเมื่อย้ายไปอนุบาลในกระชังในบ่อดิน ที่ต้องใช้อาหารธรรมชาติ เพราะลูกปลามีปากเล็กและมีการกินกันเองสูง การอนุบาลลูกปลาหมอไทยแปลงเพศในบ่อดินของขอนแก่นฟาร์มทั่วไป มีอัตรารอดตายประมาณร้อยละ 10 เท่านั้น อย่างไรก็ดี ผลการเก็บเพศลูกปลาที่มีทั้งหมดในกระชัง พบว่าลูกปลาที่เหนี่ยวนำเพศด้วยไฟฟ้าจำนวน 3 หรือ 6 ชุด พบว่าได้ลูกปลาเพศเมียร้อยละ 33.44 – 39 ขณะที่การเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า 9 ชุดได้เพศเมียร้อยละ 44.79 แต่ผลการเหนี่ยวนำเพศด้วยไฟฟ้านี้ ต่ำกว่าการแช่และให้อาหารผสมฮอร์โมนในบ่อดินด้วยที่พบว่าได้ลูกปลาเพศเมียร้อยละ 78.43 (ตารางที่ 20) แสดงว่าการแช่ฮอร์โมนโดยลำพังยังไม่ส่งผล แต่การใช้อาหารผสมฮอร์โมนอนุบาลลูกปลาในบ่อดินต่างหาก ที่ช่วยเหนี่ยวนำเพศลูกปลาหมอไทยให้เป็นเพศเมีย อย่างไรก็ดี การใช้ไฟฟ้าเหนี่ยวนำเพศปลาหมอไทยคงต้องทำซ้ำ แต่ควรพัฒนาวิธีการให้สามารถใช้กับปลานิลให้ได้ผลก่อน จึงจะนำมาขยายผลในปลาหมอไทยต่อไป

ตารางที่ 20 ผลการใช้ DC 12 โวลต์ แบบเป็นชุดละ 3 ครั้งเหนี่ยวนำเพศลูกปลาหมอไทยอายุ 1 วันหลังฟักที่ความหนาแน่น 1,553 ตัว/100 มิลลิลิตร

ชุดการทดลอง	เพศผู้ (%)	เพศเมีย (%)	เพศผู้+เพศเมีย(%)	อัตรารอด (%)
E2 immersion	57.37± 7.30	39.33± 4.18	3.31±3.32	0.68±0.37
E2imm +DC 3 set	55.02± 6.13	39.07± 4.18	5.91±7.19	0.63±0.41
E2imm +DC 6 set	59.13±13.40	33.44±12.66	7.42±1.07	0.43±0.19
E2imm +DC 9 set	54.78± 7.46	44.79± 7.61	3.43±2.24	0.73±0.12
E2imm + oral	17.65	78.43	3.92	~10

หมายเหตุ: E2 immersion = การแช่ลูกปลาในสารละลายเอสโตรเจน (500ug/L) นาน 4 วัน
E2+DC 3 sets = การแช่ E2 ร่วมกับใช้ DC 12 V เหนี่ยวนำ 3 ชุด ชุดละ 3 ครั้ง
E2+DC 6 sets = การแช่ E2 ร่วมกับใช้ DC 12 V เหนี่ยวนำ 6 ชุด ชุดละ 3 ครั้ง
E2+DC 9 sets = การแช่ E2 ร่วมกับใช้ DC 12 V เหนี่ยวนำ 9 ชุด ชุดละ 3 ครั้ง
E2imm + oral = การแช่ E2 นาน 3-4 วัน จากนั้นย้ายลูกปลาอนุบาลูในบ่อดิน ระยะแรกให้กินอาหารธรรมชาติจำพวกไรแดงและโรติเฟอร์ที่เตรียมไว้ล่วงหน้า จากนั้นใช้ปลาป่นผสม E2 120 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม เป็นอาหารอนุบาลลูกปลาในบ่อดินนาน 21 วัน

5. วิจารณ์ผล

การใช้ฮอร์โมนเปลี่ยนเพศปลามีมาช้านาน ตั้งแต่ปี 1958 ที่ปรากฏในรายงานของ Yamamoto (1969) ปัจจุบันมีการใช้วิธีการนี้กันมากในปลานิล ในประเทศไทยมีการนำมาใช้โดยสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (Asian Institute of Technology; AIT) พัฒนาวิธีการทำในตู้กระจกหรือบ่อซีเมนต์ เปลี่ยนมาทำการให้อาหารแปลงเพศปลาในกระชังที่กางในบ่อดิน เพื่อลดปัญหาแรงงานล้างทำความสะอาดตู้หรือบ่อซีเมนต์ทุกวัน วิธีการนี้ Bhujel (1998) รายงานว่ามีประสิทธิภาพแปลงเพศปลานิลได้ร้อยละ 86 – 100 แต่วิธีการนี้ มีการใช้ฮอร์โมนค่อนข้างมาก โครงการ "การศึกษาสถานภาพการแปลงเพศปลานิลเพื่อลดต้นทุนการผลิต" สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ดำเนินการในปี พ.ศ. 2544 - 2546 ทำการทดลองแปลงเพศปลานิลโดยวิธีแช่ ด้วยประสงค์ที่จะลดต้นทุนการใช้ฮอร์โมนลง พบว่าวิธีการแช่แปลงเพศปลานิลมีความไวต่อการแช่เหนี่ยวนำเพศที่ 3 อายุ คือ 2 (ระยะไข่ปลา), 5 (ระยะฟักเป็นตัวแดง) และ 11 วันหลังการผสม (ระยะลูกปลาตัวดำ; เพ็ญพรรณและคณะ, 2544ก) สามารถลดการใช้ฮอร์โมนเหลือเพียงร้อยละ 3.25 ของวิธีผสมในอาหาร ทำให้มีต้นทุนเพียงร้อยละ 5.36 ของต้นทุนที่ใช้วิธีผสมฮอร์โมนในอาหาร (เพ็ญพรรณและคณะ, 2544ข) เป็นวิธีที่คิดเฉพาะค่าฮอร์โมนและแอลกอฮอร์เท่านั้น ยังไม่ได้รวมค่าแรงงานที่ต้องใช้ให้อาหารผสมฮอร์โมนแก่ลูกปลาวันละ 5 ครั้ง นาน 21 – 28 วัน หากรวมค่าแรงงาน

ดังกล่าวไปด้วย น่าจะทำให้วิธีการแช่แปลงเพศปลานิล มีต้นทุนที่ต่ำกว่าวิธีการใช้ฮอร์โมนผสมในอาหาร ประมาณ 200 – 1,000 เท่า (Pandian and Kirankumar, 2003) อย่างไรก็ดี โครงการ “การศึกษาสถานภาพการแปลงเพศลูกปลานิลเพื่อลดต้นทุนการผลิต” นี้ มีประสิทธิภาพแปลงเพศลูกปลานิลเพศผู้ได้ร้อยละ 85 – 90 เฉพาะที่ความหนาแน่นต่ำ (35 – 40 ฟอง/ลิตร) ขณะที่วิธีการแช่ที่ความหนาแน่นสูงบนโต๊ะขยับสารละลาย (อนุสิทธิบัตร หมายเลข 5254 สามารถแช่ไข่ได้สูงถึง 20,000 ฟอง/ลิตร มีประสิทธิภาพในการแปลงเพศได้ร้อยละ 75 – 80, เพ็ญพรรณ, 2546) ซึ่งต่ำกว่ามาตรฐานการแปลงเพศต้องการเพศผู้ร้อยละ 95 ที่ยอมรับกันทั่วไป ส่งผลให้วิธีการนี้ยังไม่ได้ถูกใช้เชิงการค้าทั้งที่มีเกษตรกรให้ความสนใจติดต่อสอบถามมา

ต่อมาโครงการ “การเพิ่มประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้” (ดำเนินการในปี พ.ศ. 2555 – 2556 เลื่อนการส่งรายงานถึงสิ้นปี 2557) ทดลองใช้สารเพิ่มการซึมผ่าน 3 ชนิดประกอบด้วย oleic acid (OA), propylene glycol (PG) และ dimethylsulfoxside (DMSO) ที่ความหนาแน่นต่ำ (40 ฟอง/ลิตร) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมถึง 5 - 7 ชุด ประกอบด้วย 1)ชุดควบคุมที่ไม่สัมผัสฮอร์โมนและสารละลายใดๆ (control-), ชุดควบคุมที่สัมผัสเฉพาะสารละลายบางชนิดที่ใช้ประกอบด้วย 2) ชุดควบคุมที่สัมผัสแอลกอฮอร์ (control+alcohol), 3)ชุดควบคุมที่สัมผัส OA (control+OA), 4) ชุดควบคุมที่สัมผัส PG (control+PG), 5) ชุดควบคุมที่สัมผัส DMSO (control+DMSO) 6) ชุดควบคุมที่ใช้ฮอร์โมนผสมในอาหารอนุบาลลูกปลานาน 21 วัน และ 7)ชุดควบคุมที่ใช้วิธีการแช่ในสารละลายฮอร์โมนโดยลำพัง เพื่อใช้ประโยชน์ในการเปรียบเทียบ พบว่าชุดควบคุมเหล่านี้ให้เพศผู้ที่สูงกว่าการใช้สารเพิ่มการซึมผ่านร่วมกับฮอร์โมน ซึ่งเป็น paradox สอดคล้องกับการทดลองแช่ที่ความหนาแน่นสูง (20,000 ฟอง/ลิตร) ที่ให้ผลเป็น paradox ในลักษณะเดียวกัน paradox นี้ อาจจะเกิดจากการได้รับฮอร์โมนหรือปัจจัยบางอย่างที่มากเกินไป ส่งผลในทางตรงข้ามกับผลที่ต้องการ (Solar and Donaldson, 1985; Piferrer and Donaldson, 1991 และ Devlin and Nagahama, 2002) หรือการใช้สารเพิ่มการซึมผ่านยังไม่สามารถทำให้ฮอร์โมนซึมผ่านเข้าไข่หรือตัวลูกปลาได้ ทำให้สารเคมีที่ใช้เพิ่มการซึมผ่านไม่แสดงผล ทั้งที่ใช้ความพยายาม แรงงาน งบประมาณ และที่สำคัญคือเวลาไปเกือบ 2 ปี ผู้วิจัยจึงหยุดการทดลองเหล่านี้ไว้ก่อน เพราะว่าการใช้สารเพิ่มการซึมผ่านคงจะไม่สามารถใช้งานโดยลำพังร่วมกับฮอร์โมนเท่านั้น เนื่องจากสเตียรอยด์ฮอร์โมน มีโมเลกุลขนาดใหญ่ (Mills and Cross, 2006) ควรจะใช้ร่วมกับปัจจัยกายภาพภายนอกประเภทต่างๆ เช่น ultrasound (Athauda, 2000; Bart *et al*., 2003) หรือปัจจัยการใช้ไฟฟ้าเหนี่ยวนำแบบ electroporation (Mills and Cross, 2006; Wong, 2014) ดังรายงานของ รศ. ดร. ศักย์ชิน บุญถวิล ที่ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจาก สวทช ให้ดำเนินโครงการ “การแปลงเพศปลานิลและปลาเศรษฐกิจด้วยเทคนิคขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ในสนามไฟฟ้าแบบพลัส์” ได้นำเสนอผลงานใน The 9th Annual Conference of the Thai Physics Society, Siam Physics Congress 2014 ที่ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน จังหวัดนครราชสีมา ระหว่างวันที่ 26 – 29 มีนาคม 2557 มีการออกแบบเครื่อง sequential signal pulse-

generator (SPG) ที่มีช่องว่างขนาด 4 มิลลิเมตร สำหรับกรอกไข่ปลาอายุ 2-3 วันหลังการผสม จำนวน 50 ฟอง ก่อนปล่อยไฟฟ้าที่แรงเคลื่อน 0.25 – 87.5 kV/m นาน 5 – 1,000μs จำนวน 1 – 5 square-pulse ผ่าน electroporation medium (EPM) 50 มิลลิลิตร การใส่ไฟฟ้าเข้าไป ส่งผลทำให้รูเยื่อหุ้มเซลล์ที่เปลือกไข่ปลานิลขยายออก ทำให้โมเลกุลของสเตียรอยด์ฮอร์โมนสามารถผ่านเซลล์เปลือกไข่ปลาเข้าไปโดยง่าย การใช้ electroporation แบบนี้ รศ. ดร. ศักดิ์ชินรายงานว่าลูกปลามีการตายเพียงเล็กน้อย (5%) มีอัตรารอดตายร้อยละ 75 ได้ลูกปลาเพศผู้ร้อยละ 91.25 อย่างไรก็ดี เครื่อง SPG และสารละลาย EPM ของ รศ. ดร. ศักดิ์ชิน กำลังอยู่ในขั้นตอนการจดสิทธิบัตร เครื่อง SPG นี้ใช้ได้เฉพาะไข่ปลาขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 3 มิลลิเมตรเท่านั้น ถ้าไข่ปลามีขนาดเล็กกว่านี้ อาจจะส่งผลต่อประสิทธิภาพที่จะได้ ขณะนี้กำลังอยู่ในขั้นตอนการพัฒนาเครื่องให้มีขนาดใหญ่เพื่ออุตสาหกรรมแปลงเพศปลานิลต่อไป แต่อย่างไรก็ดี ทั้งเครื่องมือและวิธีการของ รศ. ดร. ศักดิ์ชิน จะใช้ได้เฉพาะกับไข่ปลาเท่านั้น ไม่น่าจะสามารถใช้กับลูกปลานิลวัยอ่อนระยะต่างๆ เช่น ระยะที่ไข่ฟักเป็นตัวใหม่ๆ (ระยะตัวแดง) และลูกปลานิลอายุประมาณ 7 – 10 วันหลังการผสม (ระยะตัวดำ) หรือลูกปลาระยะก่อนเริ่มการกินอาหาร ที่มักพบเสมอในการเก็บไข่จากปากแม่ปลานิล

ในกิจกรรมที่ 1.3 เป็นการทดลองใช้สารเพิ่มการซึมผ่านร่วมกับปัจจัยกายภาพ (electricity) แต่ผู้วิจัยตัดสินใจยังไม่ใช้สารเพิ่มการซึมผ่านในการทดลองนี้ โดยศึกษาวิจัยเฉพาะปัจจัยกายภาพคือไฟฟ้าเพียงอย่างเดียวก่อน เพราะยังไม่มีข้อมูลพื้นฐานในเรื่องนี้ จึงออกแบบถาดทดลองการเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าขึ้นมา โดยใส่ลวดอลูมิเนียมขดไว้ที่พื้นก้นถาด พร้อมกับทำขั้วสำหรับหนีบคีบสายไฟขั้วบวกและขั้วลบ (รูปที่ 1) จากการทดลอบเบื้องต้น เมื่อใส่ DC ที่แรงเคลื่อน 6 และ 12 โวลต์ พบว่าจะมีปฏิกิริยาเป็นฟองก๊าซเล็กๆ เกาะที่เส้นลวดหลังการใส่ DC เพียงไม่กี่วินาที ถ้าใส่ DC ลงในถาดหรือสารละลายประมาณ 2 – 10 นาที จะทำให้อลูมิเนียมจากเส้นลวดละลายออกมา เปลี่ยนสีสารละลายในถาด ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบต่อคุณภาพ ประสิทธิภาพ หรือคุณสมบัติของสารละลายฮอร์โมนที่ใช้ จึงต้องเปลี่ยนแผนการทดลองที่วางไว้ว่าจะใส่ไฟฟ้านาน 5, 15, 30 และ 60 นาที เป็นการเหนี่ยวนำด้วย DC 12 โวลต์ ในระยะสั้นๆ เพียง 1 - 2 วินาที พัก 5 - 10 วินาที จำนวน 1, 3, 6, 9, 12, 15 ครั้ง พบว่าการใส่ DC มากกว่า 6 ครั้งทำให้ไข่เสีย จึงต้องลดจำนวนการให้ DC ลง อย่างไรก็ดี ผลการตรวจเช็ดเพศลูกปลาจากการทดลอง DC จำนวน 4 การทดลองในระยะไข่ (2dpf), ลูกปลา (5 – 7dpf และ 7 – 10dpf) พบว่าวิธีการใช้ DC ดังกล่าว ไม่มีผลต่อเพศลูกปลา จึงทดลองวิธีการให้ DC 12 โวลต์แบบเป็นชุด คือ ทำการให้ DC 12 โวลต์ จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 1-2 วินาที พัก 3 – 10 วินาที นับเป็น 1 ครั้ง ทำ 3 ครั้งนับเป็น 1 ชุด มีการพักระหว่างชุด 15 นาที วิธีการให้ DC แบบชุดนี้ ทำการทดลองไปแล้วในไข่และลูกปลา รวม 5 ครั้ง แต่สามารถเก็บผลการทดลองได้เพียง 2 การทดลองเท่านั้น พบว่าวิธีการใช้กระแสไฟฟ้า DC ที่ใช้ยังไม่ส่งผลต่อการเหนี่ยวนำเพศปลา อย่างไรก็ดี วิธีการใช้ DC เหนี่ยวนำเพศปลานิลนี้ ต้องใช้ร่วมกับโต๊ะขยับสารละลายที่เป็นอนุสิทธิบัตร หมายเลข 5254 ถ้าสามารถพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำเพศได้สำเร็จ จะสามารถใช้เหนี่ยวนำเพศปลานิลทุกระยะ คือระยะไข่

ระยะลูกปลาตัวแดง และระยะลูกปลาตัวดำ การใช้ไฟ DC ร่วมกับโต๊ะขยับสารละลายเพียง 1 ชุด จะสามารถเหนี่ยวนำเพศปลานิลแบบอุตสาหกรรมได้โดยง่าย โรงเพาะฟักปลานิลแปลงเพศที่มีอยู่ในปัจจุบันสามารถซื้อโต๊ะฯและอุปกรณ์ไปวางในโรงเพาะฟักของตนเอง ทำการเหนี่ยวนำเพศได้ทั้งไข่และลูกปลาที่อยู่ในถาดคนละใบ เมื่อเหนี่ยวนำเสร็จ ย้ายไข่หรือลูกปลา ไปฟักในขวดหรือถาดที่มีได้ตามปกติ เมื่อลูกปลาเริ่มกินอาหาร สามารถย้ายไปอนุบาลในบ่อดิน ในกระชังที่กางในบ่อดินหรือบ่อซีเมนต์ได้ โดยไม่ต้องใช้ฮอร์โมนผสมในอาหารอีกต่อไป หากพัฒนาวิธีการเหนี่ยวนำเพศแบบนี้ได้สำเร็จ ต้นทุนฮอร์โมนจะลดลงเหลือเพียงร้อยละ 3.25 ของวิธีผสมในอาหารเท่านั้น ส่วนเครื่อง SPG และสารละลาย EPM ของ รศ.ดร. ศักดิ์ชินนั้น ใช้วิศวกรเป็นผู้ออกแบบ ขาดองค์ความรู้ด้านชีววิทยาและการจัดการโรงเพาะฟักปลานิล ซึ่งจะทำให้มีความเหมาะสมกับโรงเพาะฟักปลานิลของไทยค่อนข้างยาก ดังนั้น โครงการเพิ่มประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำเพศปลานิลนี้ จึงควรที่จะดำเนินการต่อให้ประสบผลสำเร็จ เพราะดำเนินการทดลองมามากแล้ว คือตั้งแต่ปี พ.ศ. 2543 เป็นต้นมา ผู้วิจัยพัฒนาโต๊ะขยับสารละลายที่จดอนุสิทธิบัตรเป็นนวัตกรรมตั้งแต่ปี พ.ศ. 2546 แต่ยังไม่ได้ใช้ประโยชน์ ในโครงการปัจจุบันได้พัฒนาโต๊ะขยับฯต่อ ให้มีน้ำหนักเบาและสะดวกในการใช้งานมากขึ้น (รูปที่ 2) แต่ผู้วิจัยควรหาวิธีการตรวจวัดผลให้เร็วขึ้นแทนที่จะรอวัดผลที่การเก็บเพศปลาที่ใช้เวลานานถึง 2 เดือน หากโครงการนี้ประสบผลสำเร็จ นอกจากจะสามารถลดปริมาณการใช้ฮอร์โมนได้อย่างมากแล้ว วิธีการเหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้าบนโต๊ะขยับฯ นี้ น่าจะสามารถใช้ให้วัคซีนแทนวิธีการฉีดในปัจจุบันได้ด้วย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมปลานิลของไทยและของโลกได้ในอนาคต

ส่วนปัญหาการตรวจวัดระดับฮอร์โมนของโครงการนี้ เป็นประเด็นสำคัญอีกประการหนึ่งผู้วิจัยพบว่า วิธีการตรวจวัดระดับเทสทอสเตอโรนโดยวิธี electrochemiluminescence (ECLIA) ที่ใช้ในการตรวจวัดตัวอย่างเลือดในมนุษย์ อาจจะไม่เหมาะกับการตรวจวัดตัวอย่างฮอร์โมนในสารละลายน้ำจากการทดลองหลังจากใช้ชุดตรวจสอบไปแล้ว 3 ชุด ใช้งบประมาณไปประมาณ 90,000 บาท แต่อย่างไรก็ดีประเด็นนี้มีความสำคัญมาก ที่จะต้องหาวิธีตรวจวัดต่อไปให้ได้ เพราะจะต้องพัฒนาวิธีการจัดการน้ำทิ้งฮอร์โมน ไม่ให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม ปัญหานี้ควรจะดำเนินการหลังจากการพัฒนาวิธีการเหนี่ยวเพศปลานิลด้วยไฟฟ้าให้สำเร็จก่อน ซึ่งต้องใช้ทั้งคน งบประมาณ และเวลาในการดำเนินการค่อนข้างมาก แต่คำตอบที่ได้ จะมีความสำคัญยิ่งต่อการขยายตัวและความยั่งยืนของอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลานิลในอนาคต

6. เอกสารอ้างอิง

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว. 2546. การศึกษาสถานภาพการแปลงเพศลูกปลานิลเพื่อลดต้นทุนการผลิต. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.).

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว. 2553. ฮอร์โมนในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. ตำรา. คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว, สุภัทรา อุไรวรรณ์ และอาภรณ์ โพธิ์พงศ์วิวัฒน์. 2551. การรวบรวมความรู้และประสบการณ์ระบบการตลาดข้อตกลง: (Contract Farming) ในประเทศไทย: กรณีศึกษาปลานิล. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย.

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว, วิรัช จิ๋วแหยม และสมสมร แก้วบริสุทธิ์. 2555. การพัฒนาระบบการจัดการฟาร์มปลานิล. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

เพ็ญพรรณ ศรีสกุลเตียว, วงศ์ปฐม กมลรัตน์, นฤพล สุขุมาสวิน, สมศรี งามวงศ์ชน, วัฒนะ ลีลาภัทร, สุชิน ทองมี และ เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์. 2544. อายุปลานิลที่เหมาะสมกับการแปลงเพศเป็นเพศผู้โดยวิธีแช่: ไข่จากแม่เดี่ยวและแม่รวม. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 39. สาขาประมง. หน้า 121-128.

เรณู สิริมงคลถาวร, ปวีณา ผิวขำ, พินพลไชย และธนดล นวลจันทร์. 2546. การเลี้ยงปลานิลแบบพัฒนาในกระชังในอ่างเก็บน้ำน้ำหมานตอนบน จังหวัดเลย. เอกสารวิชาการฉบับที่ 2/2546. กองประมงน้ำจืดม กรมประมง. 26 หน้า.

ศูนย์สารสนเทศกรมประมง. 2553. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย ปี พ.ศ. 2551. ฝ่ายสถิติและสารสนเทศการประมง, กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

ศูนย์สารสนเทศกรมประมง. 2557. สถิติการประมงแห่งประเทศไทย ปี พ.ศ. 2555. ฝ่ายสถิติและสารสนเทศการประมง, กรมประมง. กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

Arslan, T. and R. P. Phelps. 2003. Masculinization of bluegill *Lepomis macrochirus* by multiple androgen immersion and effect of percutaneous permeation enhancers. Journal of the World Aquaculture Society. 34:3:403-411.

Athauda, A.R.S.B. 2000. Ultrasound – immersion techniques to improve the efficiency of sex reversal of male tilapia population. Master of Science thesis, School of Environment Resources and Development, Asian Institute of Technology. Bangkok, Thailand.

Azagury, A., L. Khoury, G. Enden, and J. Kost, 2014. Ultrasound mediated transdermal drug delivery. Advance Drug Delivery Review. Jun; 72: 127 – 143.

Baker, I. J., I. I. Solar and E. M. Donaldson. 1988. Masculinization of chinook salmon (*Oncorhynchus tshawycha*) by immersion treatment using 17alpha-methyltestosterone around the time of hatching. Aquaculture. 72:3-4:359-369.

Baras, E., B.Jacobs and C. Melard. 2001. Effect of water temperature on survival, growth and phenotypic sex of mixed (XX-YY) progenies of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquaculture. 192: 187-199.

Bart, A.N., A.R.S.B. Athauda, M.S. Fitzpatrick and W.M. Contreras-Sanchez. 2003. Ultrasound enhanced immersion protocols for masculinization of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. Journal of the World Aquaculture Society. 34:2:210-216.

Bhujel, R. 1998. Fry quality is the main factor behind the success of AIT's joint venture tilapia hatchery. AASP Newsletter. Asian Institute of Technology (AIT):3(2)3-4.

Buddle, C.R. 1984. Androgen-induced sex-inversion of Oreochromis (Trevavas) hybrid fry stocked into cages standing in an earthen pond. Aquaculture. 40:233-239.

Bunthawin, S., T. Sornsilapa, K. Jaruwongrungsee, T. Sriveerachai, T. Kuljittichanok and R.J. Ritchie. 2014. Monosex-male reversal of Nile tilapia's egg using pulse- electric field inductions. Siam Physics Congress 2014. The 9th Annual Conference of the Thai Physics Society. March 26 -29, 2014. Rajamangala University of Technology Isan, Nakorn Rachasima, Thailand. Book of Abstract. p. 84.

Devlin, R.H. and Y. Nagahama. 2002. Sex determination and sex differentiation in fish: an overview of genetic, physiological, and environmental influences. Aquaculture. 208:191 – 364.

Ezaz, M.T., J.M. Myer, S.F. Powell, B.J. McAndrew, and D.J. Penman. 2004. Sex ratio in the progeny of androgenetic YY male Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture. 232:205-214.

Fitzpatrick, M. S., W. M. Contreras-Sanchez, R. H. Miston, M. Lucero, G. W. Feist and C. B. Schreck. 1999. Steroid immersion for mazculinization of tilapia: Immersion for tilapia fry in MDHT. page 73-74 in K. McElwee, D. Burke, M. Niles and H. Egna, editors. Sixteenth Annual Technical Report. Pond Dynamics/ Aquaculture CRSP, Oregon State University, Corvallis, Oregon, USA.

Guerrero, R.D. 1975. Use of androgens for the production of all-male *Tilapia aurea* (Steindachner). Trans.Am.Fish.Soc. 104:342-348.

Guerrero, R.D. and W.L. Shelton. 1974. An aceto-carmine squash method of sexing juvenile fishes. Prog.Fish.Cult. 36:56.

Hunter, G..A. and E.M. Donaldson. 1983. Hormonal sex control and its application to fish culture. In: Hoar, W.S. Randall, D.S. and Donaldson, E.M. (eds.) 1983. Fish Physiology. Volume 9. Academic Press. New York. P. 223 – 303.

Kaliba, AR., K.O. Osewe, E.M. Senkondo, B.V. Mnembuka, and K. K. Quagrainie. 2006. Economic analysis of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) production in Tanzania. Journal of the World Aquaculture Society. 37:4:464-473.

Little, D. C., C. K. Lin and W. A. Turner. 1995. Commercial scale tilapia fry production in Thailand. World Aquaculture. 26(4):20-24.

Mair, G. C., J. S. Sbucay, D.O.F. Skibinski, T. A. Abella and J. A. Beardmore. 1997. Genetic manipulation of sex ratio for the large-scale production on all male tilapia, Oreochromis niloticus. Canadian Journal of Fish Aquaculture Science. 54:2:396-404.

McAndrew, B. 1993. Sex control in tilapiines. p. 87-98. in J.F. Muir and R.J. Roberts, editors. Recent advances in aquaculture. Institute of Aquaculture. Oxford. Blackwell Scientific Publications.

Mills, P.C. and S.E. Cross. 2006. Transdermal drug delivery: basic principles for the veterinarian. The Veterinary Journal. 172: 218-233.

Naik, A., Y.N. Kalia, and R.H. Guy, 2000. Transdermal drug delivery: overcoming the skin's barrier function. Phamuceutical science & technology today (PSTT)3:9:318-326.

Pandian, T.J. and S. Kirankumar, 2003. Recent advances in hormonal induction of sex-reversal in fish. Journal of Applied Aquaculture. 13:3-4:205-230.

Piferrer, F. and E.M. Donaldson. 1989. Gonadal differentiation in coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*, after a single treatment with androgen or estrogen at different stages during ontogenesis. Aquaculture. 77:251-262.

Piferrer, F. and E. M. Donaldson. 1991. Dosage- dependent differences the effect of aromatizable and non-aromatizable androgens on the resulting phenotype of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) Fish Physiol Biochem, 9:145 – 150.

Piferrer, F. and E. M. Donaldson. 1993. Sex control in Pacific salmon. page 67-77 In: J.F. Muir and R.J. Roberts, editors. Recent advances in aquaculture. Institute of Aquaculture. Oxford. Blackwell Scientific Publications.

Ponza, P., D. C. Little and C. BoonthamJinda. 1996. Effect of the timing of treatment onset after hatching on the efficacy of 17α methyltestosterone for masculinization of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) fry. page 314-315. In: R.L. Crewell editor. World Aquaculture'96. The 1996 Annual meeting of the World Aquaculture Society. Bangkok, Thailand.

Solar, I.I. and E.M. Donaldson. 1985. Use of methyltestosterone for masculinization and sterilization cultured rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson. Fisheries Research Board of Canada. 9p.

Tayamen, M. M. and W. L. Shelton. 1978. Inducement of sex reverse in Sarotherodon niloticus (Linnaeus). Aquaculture. 14:349-354.

Wong, T.W. 2014. Electrical, magnetic, photomechanical and cavitational waves to overcome skin barrier for transdermal drug delivery.

Yamamoto, T. 1969. Sex differentiation. page 117-159 in W. S. Hoar and D. J. Randall editors. Fish Physiology. Volume. III: Poison. Academic Press, Boston, USA.

สัญญาเลขที่ RDG 5520076

โครงการ “การเพิ่มประสิทธิภาพวิธีการแช่เหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้”

วัตถุประสงค์	กิจกรรมที่วางแผน	กิจกรรมที่ดำเนินการ	ผลที่ได้รับ
1. พัฒนาวิธีการแช่เหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้ที่มีประสิทธิภาพสูง (95% ขึ้นไป)	1.1 ประสิทธิภาพของสารเพิ่มการซึมผ่านต่อการเหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้ที่ความหนาแน่นต่ำ	1.1 ดำเนินการตามแผน	1.1 ไม่สำเร็จ
	1.2 การใช้สารเพิ่มการซึมผ่าน ความถี่ และการแช่เหนี่ยวนำเพศปลานิลที่ความหนาแน่นสูง	1.2 ดำเนินการตามแผน	1.2 ไม่สำเร็จ
	1.3 การใช้สารเพิ่มการซึมผ่านร่วมกับการใช้ปัจจัยกายภาพเหนี่ยวนำปลานิลเพศผู้ที่ความหนาแน่นสูง	1.3 ดำเนินการเฉพาะการใช้ปัจจัยกายภาพคือไฟฟ้า	1.3 ไม่สำเร็จ
	1.4 การทดสอบผลการเหนี่ยวนำเพศปลานิลภาคสนาม	1.4 ดำเนินการตามแผน	1.4 ไม่สำเร็จ
2. การทดสอบวิธีการเหนี่ยวนำเพศกับปลาหมอไทย	2.1 การทดสอบผลการเหนี่ยวนำเพศปลาหมอไทย	2.1 ดำเนินการตามแผน	2.1 ไม่สำเร็จ
3. เผยแพร่ข้อมูลสู่สาธารณะ	3.1 ฝึกอบรมวิธีการเพิ่มประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำเพศโดยวิธีแช่ด้วยโต๊ะขยับสารละลาย	3.1 ไม่ได้ดำเนินการ	3.1 ไม่ได้ดำเนินการ