



การจัดการความรู้

เรื่อง “การพัฒนาโครงการวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ”

ประจำปีงบประมาณ ๒๕๕๔

คณะทำงานจัดการความรู้

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธุ์กรรมสัตว์น้ำ

๒๕๕๔

คำนำ

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธกรรมสัตว์น้ำ มีหน้าที่และรับผิดชอบในการศึกษาค้นคว้าวิจัยทุกด้านที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีด้านพันธกรรมสัตว์น้ำ และพรรณไม้น้ำ ตั้งแต่งานวิจัยขั้นพื้นฐานและประยุกต์ไปจนถึงงานวิจัยและพัฒนาโดยใช้เทคโนโลยีชีวภาพเพื่อให้สามารถปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ และพรรณไม้น้ำให้มีลักษณะเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศ และเป็นสินค้าระดับคุณภาพที่สามารถแข่งขันในตลาดโลกได้ โดยองค์ประกอบของงานวิจัยเพื่อปรับปรุงและพัฒนาพันธุ์นั้น เริ่มตั้งแต่การวิจัยพัฒนาพันธุ์จากธรรมชาติให้เป็นพันธุ์เพาะเลี้ยงเพื่อการปรับปรุงพันธุ์ ศึกษาข้อมูลทางพันธุกรรมของลักษณะต่าง ๆ ที่สำคัญ โดยพิจารณาจาก ข้อมูลลักษณะที่แสดงออกให้เห็นภายนอก และข้อมูลทางพันธุกรรม ดำเนินการพัฒนางานวิจัยปรับปรุงพันธุ์ตลอดจนทดสอบพันธุ์ที่ผ่านการพัฒนาปรับปรุงในพื้นที่เพาะเลี้ยงจริงก่อนที่จะผลิตและกระจายพันธุ์ที่พัฒนาแล้วสู่ภาครัฐและเอกชน

ขบวนการขั้นตอนงานวิจัยปรับปรุงพันธุ์นั้น ต้องใช้ทั้งความรู้และระยะเวลายาวนานในการดำเนินการ อีกทั้งยังมีความเกี่ยวข้องเชื่อมโยงกับวิทยาการด้านอื่น ๆ หลากหลายสาขา โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เช่น การใช้ฮอร์โมนในการเพาะขยายพันธุ์ อาหารและโรค และความสมดุลทางชีวภาพในการเพาะเลี้ยง เป็นต้น ดังนั้นบุคลากรด้านวิจัยปรับปรุงพันธุ์ จึงจำเป็นต้องมีการพัฒนาความรู้ ความชำนาญในสาขาวิชาที่เกี่ยวข้อง เพื่อให้งานวิจัยพัฒนาปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำบรรลุผลตามเป้าประสงค์ของหน่วยงาน

สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธกรรมสัตว์น้ำ โดยคณะกรรมการจัดการความรู้ของสถาบันฯ จึงได้จัดทำแผน และดำเนินการจัดการความรู้ประจำปีงบประมาณ 2554 ในหัวข้อเรื่อง “การพัฒนาโครงการวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ” เพื่อรวบรวมองค์ความรู้ในวิทยาการสาขาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องมาบูรณาการกับงานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ เพื่อให้นักวิจัยสามารถนำไปพัฒนาโครงการวิจัยปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำในส่วนที่รับผิดชอบได้อย่างเหมาะสม ในการดำเนินงานตามแผนจัดการความรู้นั้น กิจกรรมสำคัญที่ต้องดำเนินการได้แก่ การสร้างและแสวงหาความรู้ ซึ่งสถาบันฯ ได้ดำเนินการโดยจัดฝึกอบรมหลักสูตร “การพัฒนาโครงการวิจัยเพื่อปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ” ให้กับบุคลากรของสถาบันฯ ระหว่างวันที่ 15-17 กุมภาพันธ์ 2554 ณ โรงแรมแอมบาสเดอร์ ซิตี้ จอมเทียน เมืองพัทยา จังหวัดชลบุรี โดยได้เชิญผู้ทรงคุณวุฒิสาขาวิชาต่าง ๆ จากทั้งภายในและภายนอกกรมประมง มาเป็นวิทยากรให้ความรู้แก่ผู้เข้ารับการฝึกอบรม และในโอกาสนี้ คณะกรรมการจัดการความรู้ฯ จึงได้จัดทำเอกสารฉบับนี้ขึ้น เพื่อรวบรวมความรู้และความเข้าใจในสาขาวิชาต่าง ๆ ที่ได้รับจากการฝึกอบรม และเผยแพร่ให้แก่บุคลากรของสถาบันฯ และผู้มีส่วนเกี่ยวข้อง เพื่อใช้เป็นแนวทางหรือนำไปประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ หรือพัฒนาโครงการวิจัยเพื่อการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ

ขอขอบคุณ ศ.ดร.อุทัยรัตน์ ณ นคร ผศ.ดร.ศร คุณวุฒิจิทธิณ รศ.ดร.สุภาวดี พุ่มพวง รศ.ดร.เมตติศักดิ์ จารย์พันธุ์ ดร.วงศ์ปฐม กมลรัตน์ ดร.จิราพร เกษรจันทร์ ดร.นฤพล สุขุมาสวิน และนายสมชาติ สุขวงศ์ ที่กรุณาให้การสนับสนุนการดำเนินการจัดการความรู้ด้วยการเป็นวิทยากรถ่ายทอดความรู้ในสาขาวิชาต่าง ๆ ให้กับบุคลากรของสถาบันฯ ความรู้ทั้งหมดที่ได้รับจากวิทยากรทุกท่าน ถือเป็นผลสำเร็จที่สำคัญอย่างยิ่งที่ได้จากการดำเนินการจัดการความรู้ประจำปีงบประมาณ 2554 ของสถาบันวิจัยและพัฒนาพันธกรรมสัตว์น้ำ

คณะกรรมการจัดการความรู้
สถาบันวิจัยและพัฒนาพันธกรรมสัตว์น้ำ
พฤษภาคม 2554

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	1
สารบัญ	2
แนวทางการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ	3
การปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ	9
การวิเคราะห์และประเมินผลที่ได้จากโปรแกรมการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์	19
การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม (Marker- Assisted Selection)	24
การปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำให้ทนทานต่อโรค	29
ระบบสืบพันธุ์และเทคนิคการใช้ฮอร์โมนในการเพาะพันธุ์ปลา	37
ระบบสมดุลทางชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	52
เทคนิคในการพัฒนางานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำเพื่อขอทุนวิจัย	56
ภาคผนวก	62
เอกสารแจกในการบรรยายโดยวิทยากร	63
1. แนวทางการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ	64
2. การปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ	72
3. Selective Breeding Program Evaluation	81
4. การวิเคราะห์ยีนควบคุมลักษณะปริมาณและการคัดเลือกด้วยเครื่องหมายพันธุกรรมในสัตว์น้ำ	88
5. Breeding improvement in aquaculture include	97
6. Fish Reproduction and Fish Breeding	110
7. ระบบสมดุลทางชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ	139
8. เทคนิคในการพัฒนางานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำเพื่อขอทุนวิจัย	149
คำสั่งแต่งตั้งคณะกรรมการ	156

แนวทางการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ

ในการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำมีข้อพิจารณาอยู่ 4 ด้าน ได้แก่

- ลักษณะที่ต้องการปรับปรุง
- ประชากรเริ่มต้น
- วิธีการปรับปรุงพันธุ์
- ความพร้อมของทรัพยากร

1. ลักษณะที่ต้องการปรับปรุง

ผู้ทำการปรับปรุงพันธุ์ต้องกำหนดลักษณะเป้าหมายที่ต้องการ สัตว์ที่ต้องการนำมาปรับปรุงลักษณะนั้นๆต้องมีความแปรปรวนหรือความหลากหลาย การกำหนดลักษณะที่จะปรับปรุง ถ้ากำหนดน้อยลักษณะจะก้าวหน้าเร็ว ถ้ากำหนดหลายลักษณะจะก้าวหน้าช้า ลักษณะเป้าหมายโดยทั่วไปในสัตว์น้ำ ได้แก่ อัตราการเจริญเติบโต ความต้านทานโรค เพอร์เซ็นต์ซาก ฯลฯ

2. ประชากรเริ่มต้น

- เป็นประชากรที่มีลักษณะดี
- มีฐานพันธุกรรมกว้าง
- เป็นประชากรที่มาจากโรงเพาะฟักมีการผสมระหว่างประชากร อย่างน้อย 2 รุ่นขึ้นไป และมีการเปรียบเทียบคุณสมบัติเพื่อจะได้ทราบข้อมูลว่ามีคุณสมบัติใดบ้าง และประชากรไหนที่ควรจะนำมาใช้ในกรณีที่ไม่มีการคัดเลือก จำเป็นต้องใช้ประชากรจากธรรมชาติโดยตรง ควรจะต้องนำประชากรธรรมชาติเหล่านั้นมาผสมระหว่างประชากรอย่างน้อย ๒ รุ่นขึ้นไปเช่นกัน

3. วิธีการปรับปรุงพันธุ์

การปรับปรุงพันธุ์สามารถทำได้ 4 วิธี ได้แก่

- วิธีการแบบ conventional
- Markers Assisted Selection
- Gene transfer
- Chromosome-set manipulation

ซึ่งในที่นี้จะกล่าวถึงเฉพาะวิธีการปรับปรุงพันธุ์ แบบ conventional

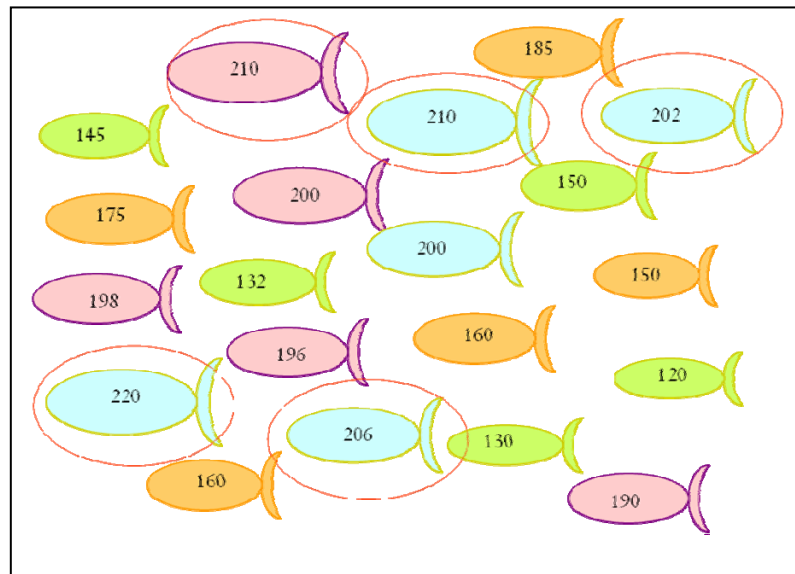
วิธีการแบบ conventional คือ วิธีแบบดั้งเดิม ซึ่งจะดำเนินการโดยดูจากลักษณะปรากฏ ได้แก่ การคัดเลือก (Selection) และการจัดระบบการผสมพันธุ์ (mating systems)

3.1 การคัดเลือก (Selection) ได้แก่ การเลือกสัตว์ที่จะนำมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ การคัดเลือกมี 3 วิธี ได้แก่ Mass selection, Family selection และ Within-family selection

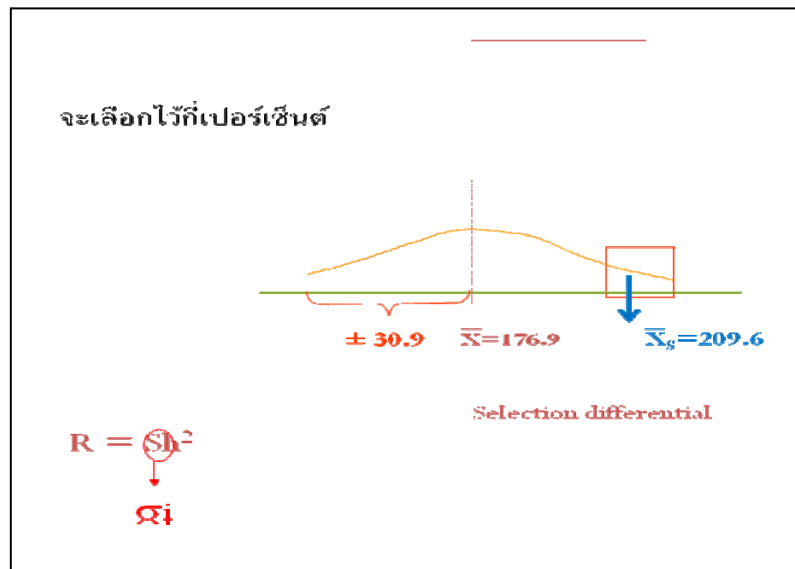
3.1.1 Mass selection

เป็นการคัดเลือกโดยดูประชากรแต่ละตัว ซึ่งจะพิจารณาจากลักษณะปรากฏของปลาที่จะคัดเพียงอย่างเดียว โดยคัดปลาที่โตดีที่สุดจากประชากรซึ่งเลี้ยงรวมกันมาเป็นพ่อแม่พันธุ์ การจะคัดจำนวนเท่าไร/กี่เปอร์เซ็นต์นั้น ขึ้นอยู่กับการกำหนดของนักวิจัยซึ่งต้องกำหนดไว้ก่อนทำการวิจัย

ถ้าการคัดเลือกมีความถูกต้องค่าเฉลี่ยในรุ่นลูกจะสูงกว่ารุ่นพ่อแม่



ภาพแสดงรูปแบบการคัดเลือกแบบ Mass selection



ภาพแสดง ตัวอย่างการกำหนดเปอร์เซ็นต์การคัดเลือก

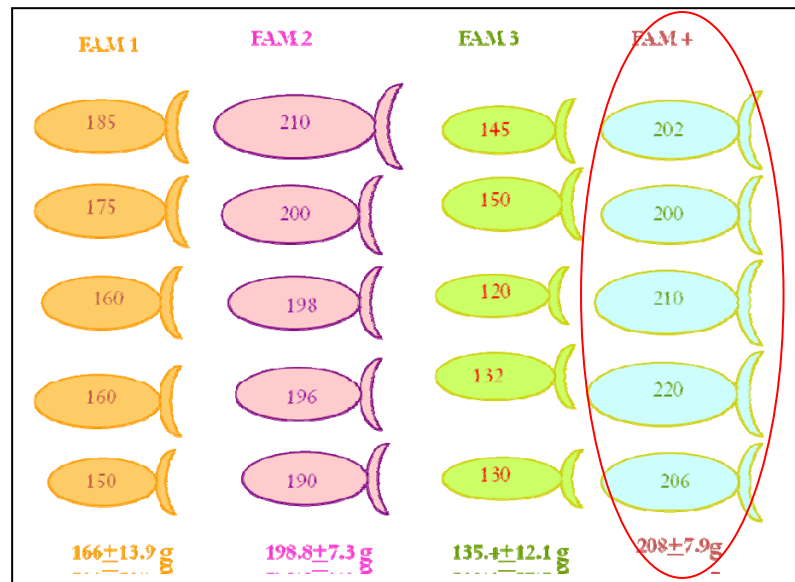
ข้อดี-ข้อเสีย ของ Mass selection

ข้อดี - ใช้ทรัพยากรน้อย

ข้อเสีย - ทำให้เกิดการผสมเลือดชิด (inbreeding) ได้ง่าย ซึ่งจะขึ้นอยู่กับจำนวนประชากร เริ่มต้น ถ้าใช้ประชากรน้อยจะมีโอกาสเกิดง่าย
- ถ้าเป็นลักษณะที่มีค่าอัตราพันธุกรรม (h^2) ต่ำ ความก้าวหน้าของการปรับปรุงจะน้อย

3.1.2 Family selection

เป็นการคัดเลือกทั้งครอบครัวและคัดทั้งทั้งครอบครัว คัดโดยทำการผสมปลาเป็นคู่ ๆ จากนั้นนำลูกจากแต่ละคู่ผสมมาแยกเลี้ยง เมื่อจะคัดก็พิจารณาจากค่าเฉลี่ยของลูกแต่ละครอบครัว โดยลักษณะของสัตว์แต่ละตัวไม่ได้นำมาพิจารณา เมื่อตัดสินใจเลือกครอบครัวใดก็จะเก็บไว้ทั้งครอบครัว ดังนั้นจำเป็นต้องเลี้ยงปลาจำนวนหลายๆครอบครัวแยกกัน เป็นวิธีการที่ต้องใช้แรงงานและบ่อจำนวนมาก



ภาพแสดงรูปแบบการคัดเลือกแบบ Family selection

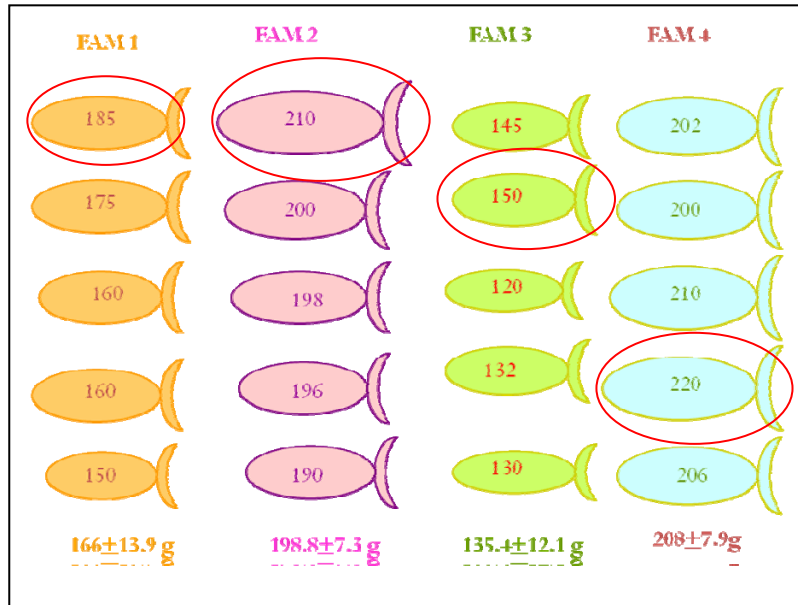
ข้อดี-ข้อเสีย ของ Family selection

ข้อดี - ให้ผลที่ดี แม้ว่าลักษณะนั้นจะมีค่าอัตราพันธุกรรมต่ำ
- สามารถควบคุมการผสมเลือดชิด (inbreeding) ได้

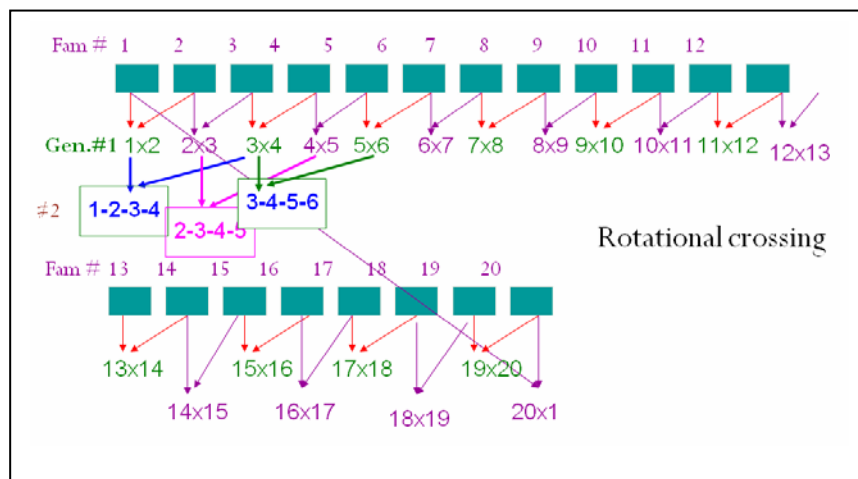
ข้อเสีย - ใช้ทรัพยากรเยอะมาก
- ต้องใช้ความสม่ำเสมอของสภาพแวดล้อม

3.1.3 Within-family selection

ทำการผสมปลาเป็นคู่ ๆ เช่นเดียวกับ Family selection จากนั้นทำการคัดเลือกโดย คัดปลาที่ โตดีที่สุด มาครอบครว้มาละ 1 คู่ นำปลาที่คัดเลือกมาทำการจับคู่ผสมแบบไม่ใช้ซ้ำตัวเดิม ตัวอย่างเช่น คัดเลือกปลามา 3 ครอบครัว : นำเพศเมียครอบครัว 1 ผสมกับเพศผู้ครอบครัว 2 เพศเมีย ครอบครัว 2 ผสมกับเพศผู้ครอบครัว 3 และ เพศเมียครอบครัว 3 ผสมกับเพศผู้ครอบครัว 1 (การจับคู่จะเป็น ลักษณะแบบวงกบินทาง)



ภาพแสดง รูปแบบการคัดเลือกแบบ Within-family selection



ภาพแสดง ตัวอย่างการจับคู่ผสมพันธุ์ ในการคัดเลือกแบบ Within-family selection

ข้อดี-ข้อเสีย ของ Within family selection

ข้อดี - ทำให้เกิดการผสมเลือดชิด (inbreeding) น้อย

- ใช้ทรัพยากรน้อยกว่าคัดเลือกแบบ Family selection

ข้อเสีย - ถ้าเป็นลักษณะที่มีค่าอัตราพันธุกรรม (h^2) ต่ำ ความก้าวหน้าของการปรับปรุงจะน้อย

2. การจัดระบบการผสมพันธุ์ (Mating systems) ได้แก่ การกำหนดวิธีการผสมพันธุ์ในการผลิตรุ่นต่อไป ซึ่งอาจจะเป็นการผสมภายในประชากรเดียวกัน หรือ ต่างประชากรก็ได้

แนวทางการเลือกระหว่าง Selection กับ Mating systems

ในการคัดเลือกเราจะเลือกใช้แนวทางใด ระหว่าง Selection กับ Mating systems จะพิจารณาจาก

1) ค่าอัตราพันธุกรรม (h^2) ($h^2 = V_A / V_P$)

ในกรณีที่ค่าอัตราพันธุกรรม (h^2) สูง ใช้วิธีการคัดเลือก (selection) แต่ถ้าลักษณะนั้นอยู่ภายใต้อิทธิพลของยีนซ่มใช้วิธีการจัดระบบการผสมพันธุ์ (mating systems)

พวกที่มีค่าอัตราพันธุกรรมสูง อุปมาได้ว่าคุณสมบัตินั้นๆ เช่น ความยาว เป็นคุณสมบัติของแต่ละอัลลีลเมื่อทำการผสมคุณสมบัติเหล่านั้นก็จะตามไปในรุ่นลูกด้วย แต่ถ้าลักษณะนั้นอยู่ภายใต้อิทธิพลของยีนซ่ม คุณสมบัตินั้นเป็นคุณสมบัติของจีโนไทป์ ซึ่งจะแสดงลักษณะแบบไหนในรุ่นลูกนั้นขึ้นอยู่กับอัลลีลที่จะไปจับทำให้คาดเดาไม่ได้ ทำให้ใช้วิธีการคัดเลือกไม่ได้ผล

2) วัตถุประสงค์เฉพาะ

แล้วแต่วัตถุประสงค์ของผู้ปรับปรุงพันธุ์ เช่น ผสมข้ามเพื่อต้องการรวมลักษณะของพ่อแม่พันธุ์เข้าด้วยกัน

วิธีการวัดความก้าวหน้า (การตอบสนองต่อการคัดเลือกพันธุ์)

1) เปรียบเทียบกับประชากรควบคุม

สุ่มประชากรจากประชากรเริ่มต้นไว้หนึ่งประชากร ดำเนินการ คัดเลือกหนึ่งประชากร แล้วนำประชากรทั้งสองมาเปรียบเทียบกัน วิธีการนี้มีข้อเสียตรงที่ประชากรควบคุมเองก็อาจจะเกิดการ ผสมเลือดชิด (inbreeding)

2) คัดเลือกแบบสองทิศทาง

คัดเลือกสองแบบไปพร้อมๆกัน เช่น คัดเลือกให้โต ก็คัดเลือกให้เล็กควบคู่กันไปด้วย ซึ่งตามทฤษฎีการคัดเลือกทั้งสองแบบควรให้ผลเท่ากัน

3) เปรียบเทียบกับสายพันธุ์อ้างอิง

เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่มีการใช้เลี้ยงกันในปัจจุบัน

4. ความพร้อมของทรัพยากร

ในการปรับปรุงพันธุ์อีกสิ่งหนึ่งที่เราควรให้ความสำคัญ คือ ความพร้อมของทรัพยากร ซึ่งประกอบด้วย

4.1 คน

ในคณะผู้ทำการวิจัยต้องมีนักปรับปรุงพันธุ์ อย่างน้อย ๑ คน

4.2 สถานที่

สถานที่ จำนวนบ่อ อุปกรณ์ต่างๆ ต้องเพียงพอต่อรูปแบบการคัดเลือกที่จะดำเนินการ มีแผนดำเนินการปรับปรุงที่เหมาะสม

4.3 งบประมาณ

มีงบประมาณเพียงพอต่อการดำเนินการ

4.4 สัตว์น้ำ

สัตว์น้ำที่จะปรับปรุงพันธุ์ได้ ต้องเป็นสัตว์ที่เราสามารถควบคุมวงจรชีวิตหรือสามารถเพาะพันธุ์ได้

ข้อควรระวังในการปรับปรุงพันธุ์แบบ conventional

- 1) การเกิดการผสมเลือดชิด (inbreeding) เนื่องจาก ขนาดประชากรทางพันธุกรรม (effective population size) ลดลง
- 2) มีวิธีการวัดความก้าวหน้าที่เหมาะสม
- 3) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างพันธุกรรมกับสิ่งแวดล้อม
- 4) Correlated response ต้องดูความสัมพันธ์ของลักษณะที่ปรากฏ เช่น คัดเตีโดยดูที่ความยาว ก็ต้องดูลักษณะอื่นๆ ควบคู่ไปด้วย เช่น ดุน้ำหนัก

การปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ

การปรับปรุงพันธุ์สัตว์ หมายถึง การจัดการทางพันธุกรรม (การคัดเลือก+การจับคู่ผสมพันธุ์) เพื่อให้สัตว์รุ่นลูก (โดยเฉลี่ย) มีลักษณะที่พึงประสงค์ดีกว่าสัตว์รุ่นพ่อแม่ (โดยเฉลี่ย)

การปรับปรุงพันธุ์สัตว์เริ่มที่การคัดเลือก จากนั้นจึงนำมาจับคู่ผสมพันธุ์ การปรับปรุงพันธุ์เป็นการคัดเลือกภายใต้เงื่อนไขของสภาพแวดล้อม เพราะฉะนั้นสิ่งที่นักปรับปรุงควรคำนึงถึง คือ สิ่งที่ได้จากการปรับปรุงจะเหมาะสมเฉพาะแต่ละสิ่งแวดล้อม กระบวนการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำประกอบด้วย

1. การกำหนดวัตถุประสงค์และแผนการปรับปรุงพันธุ์สัตว์

1.1 ลักษณะที่ผู้ผลิต/ผู้ใช้ประโยชน์ ต้องการปรับปรุงให้ดีขึ้นในรุ่นถัดมาคืออะไร

ซึ่งมีข้อควรพิจารณาอย่างน้อย 5 ข้อ ได้แก่

1.1.1 จำนวนลักษณะที่ต้องการ

1.1.2 ความสำคัญของแต่ละลักษณะ

1.1.3 ลักษณะนั้นต้องเป็นลักษณะที่วัดหรือประเมินค่าได้ เป็นลักษณะที่เปรียบเทียบได้ และต้องเปรียบเทียบได้อย่างยุติธรรม

1.1.4 ต้องทราบว่ามียุทธวิธีพันธุกรรมอยู่มาก/น้อยเพียงใด สัตว์ที่มีค่าอัตราพันธุกรรมสูง ลักษณะที่ปรากฏมีความสัมพันธ์กับพันธุกรรมมาก ลักษณะที่ปรากฏจะบอกความสามารถทางพันธุกรรมได้ค่อนข้างสูง

1.1.5 ลักษณะนั้นมีความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมกับลักษณะอื่นๆมากน้อยเพียงใด

1.2 ระดับของลักษณะที่ต้องการเป็นเท่าไร

นักปรับปรุงพันธุ์ต้องทราบว่าสัตว์รุ่นปัจจุบันมีข้อมูลพื้นฐานเท่าไร และในรุ่นถัดไปต้องการให้เพิ่มขึ้นเท่าไร เช่น ค่าพิสัยสูงสุด-ต่ำสุด ค่าความผันแปรทางพันธุกรรม ฯลฯ

1.3 ชนิดสัตว์ ประชากรสัตว์พื้นฐาน และการจัดการเป็นอย่างไร

นักปรับปรุงพันธุ์ต้องเข้าใจว่าลักษณะปรากฏของสัตว์ที่เราจะปรับปรุง เป็นอิทธิพลมาจากพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม การคัดเลือกเป็นการดำเนินการภายใต้เงื่อนไขสภาพแวดล้อมหนึ่งๆ ดังนั้น ผลที่ได้จะเฉพาะเจาะจงในแต่ละสภาพแวดล้อมนั้นๆ เช่น สภาพแวดล้อมในบ่อดิน กระชัง บ่อซีเมนต์ ชายฝั่งตะวันออก ชายฝั่งตะวันตก ทะเลน้ำลึก แม่น้ำ แหล่งน้ำ

$$\boxed{\text{ลักษณะที่ปรากฏ}} = \boxed{\text{พันธุกรรม} + \text{สิ่งแวดล้อม}}$$

1.4 แผนการคัดเลือกสัตว์พ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ (คัดเลือกอย่างไร คัดเลือกเท่าไร และแหล่งเป้าหมายสัตว์อยู่ที่ไหน)

1.4.1 คัดเลือกอย่างไร

การเลือกวิธีการคัดเลือกสามารถดำเนินการได้หลายอย่างตามประเด็นต่างๆ ดังนี้
ประเด็นที่ 1 แหล่งของข้อมูลที่ใช้พิจารณาในการคัดเลือก

- 1) ข้อมูลตัวสัตว์เอง ใช้วิธีการคัดเลือกแบบ Mass selection
- 2) ถ้าข้อมูลบรรพบุรุษหรือพันธุ์ประวัติ ใช้วิธีการคัดเลือกแบบ Pedigree Selection
- 3) ข้อมูลเครือญาติ ใช้วิธีการคัดเลือกแบบ Relatives Selection
- 4) ข้อมูลของลูก ใช้วิธีการคัดเลือกแบบ Progeny Selection ในส่วนของสัตว์น้ำ เนื่องจากสัตว์น้ำมีอายุสั้น จึงไม่ค่อยพบการพิจารณาข้อมูลในส่วนนี้

ประเด็นที่ 2 พิจารณาลักษณะของข้อมูลตามความแม่นยำของข้อมูล

ลำดับความแม่นยำของข้อมูลจากต่ำไปสูง มีดังต่อไปนี้

- 1) ข้อมูลที่ได้จากการสังเกตและประสบการณ์ (Observation)
- 2) ข้อมูลลักษณะที่ปรากฏ (Phenotypic value; Phenotypic average)
- 3) ข้อมูลความสามารถทางพันธุกรรม (Estimated Breeding Value)
- 4) ข้อมูลเครื่องหมายทางพันธุกรรม (Marker Information)
- 5) ข้อมูลพันธุกรรมระดับจีโนม (Genomic Information)

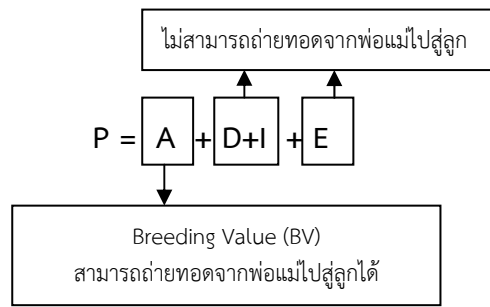
ประเด็นที่ 3 พิจารณาจากใคร

- 1) ตัวสัตว์เอง (เป็นรายตัว; Individual Selection)
- 2) พ่อพันธุ์สัตว์ (Sire Selection)
- 3) แม่พันธุ์สัตว์ (Dam Selection)
- 4) ครอบครัว (Family Selection)
- 5) สายพันธุ์ (Line Selection)

ในการเลือกวิธีการคัดเลือก ต้องมีข้อมูลความสามารถทางพันธุกรรมหรือลักษณะที่แสดงออกของตัวสัตว์นั้น เปรียบเทียบกับสัตว์ตัวอื่นๆ และต้องเปรียบเทียบได้อย่างไม่ลำเอียง ในกรณีที่ไม่มีข้อมูลตัวสัตว์ อาจต้องใช้ข้อมูลจากพ่อพันธุ์ซึ่งมีลูกหลายตัวมาเป็นตัวแทน

การคัดเลือกอย่างไรเป้าหมายหลักอยู่ที่ พันธุกรรมแบบบวกสะสมหรือยีนผลรวม เน้นให้ค่า additive effect ดีขึ้น ซึ่งเมื่อไปอยู่ในสภาพแวดล้อมไหนก็จะให้ผลที่ดีกว่าเดิม

$$P = G+E$$



- เมื่อ
- P คือ Phenotype
 - G คือ Genotype
 - E คือ Environment
 - A คือ Additive genetic effect (Breeding Value)
 - D คือ Domimance genetic effect
 - I คือ Epistasis genetic effect

1.4.2 คัดเลือกมาก/น้อยเท่าไร

จำนวนสัตว์ที่คัดเลือกขึ้นอยู่กับ

- 1) จำนวนสัตว์ที่ต้องการในรุ่นลูก ควรจะมีจำนวนเท่าไร
- 2) จำนวนสัตว์ทดแทนรุ่นพ่อแม่ ควรจะมีจำนวนเท่าไร
- 3) จำนวนสัตว์รุ่นพ่อแม่ที่มีให้คัดเลือก มีเท่าไร
- 4) กลุ่มสัตว์ที่จะถูกคัดเลือกมีความผันแปร/แตกต่างกันมาก/น้อยเพียงไร ควรเลือกประชากรที่มีความผันแปร หรือความแตกต่างที่เอื้อให้เราคัดเลือกสัตว์ตัวที่ดีที่สุด เพราะเมื่อคัดเลือกแล้ว สัตว์ที่คัดเลือกแล้วแตกต่างกับก่อนคัดเลือกพอสมควร
- 5) เป้าหมายในการสร้างความแตกต่างระหว่างรุ่น/กลุ่มสัตว์ก่อนและหลังการคัดเลือก

1.4.3 แหล่งเป้าหมายสัตว์อยู่ที่ไหน ต้องพิจารณาจาก $P = G+E$

ขึ้นอยู่กับว่า เราจะใช้ประโยชน์/พัฒนาพันธุกรรมที่ไหน

- 1) คัดเลือกสัตว์จากแหล่งที่มีสภาพแวดล้อมเดียวกัน/คล้ายคลึงกัน วิธีการนี้คั่งง่าย ผลสัมฤทธิ์ชัดเจน แต่ลักษณะแสดงออกของประชากรจะคล้ายคลึงกัน
- 2) คัดเลือกสัตว์จากต่างแหล่งที่มีสภาพแวดล้อมแตกต่างกัน
 การคัดเลือกโดยวิธีนี้ ให้พิจารณาว่า มีผลจาก
 - GxE หรือไม่
 - เปรียบเทียบได้อย่างยุติธรรมหรือไม่
 - แม่นยำหรือไม่

1.5 แผนการผสมพันธุ์ ระหว่างสัตว์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว

1.5.1 การจับคู่ผสมพันธุ์ (Design)

การจับคู่ผสมพันธุ์มีสิ่งที่จะต้องพิจารณา คือ

- 1) สัตว์เพศเมียควรได้รับการผสมพันธุ์กับเพศผู้ตัวใด
- 2) การใช้ประโยชน์จากพันธุกรรมที่คัดเลือกไว้แล้วให้เน้น Additive genetic effect ก่อน จากนั้นทำให้ Additive genetic effect ของสายพันธุ์นั้นนิ่ง แล้วจึงมาทำ Non-additive genetic effect โดยผสมระหว่างสายพันธุ์ให้เกิด heterosis

1.5.2 การผสมพันธุ์

รูปแบบในการผสมพันธุ์ ได้แก่

- 1) การปฏิสนธิ
- 2) การผสมจริงตามธรรมชาติ
- 3) การผสมเทียม/การใช้เทคโนโลยี

1.6 แผนการประเมินพันธุกรรม

ในแผนการประเมินพันธุกรรม นักปรับปรุงพันธุ์ต้องกำหนดว่าจะประเมินแบบใดที่ทำให้ทราบว่าลูกที่ปรับปรุงพันธุ์ดีกว่ารุ่นพ่อแม่ และวิธีการเลี้ยงดูไม่สร้างปัญหาในการเปรียบเทียบ กล่าวคือ การจัดการในรุ่นลูกและรุ่นพ่อแม่จะต้องไม่แตกต่างกันหรือใกล้เคียงกันให้มากที่สุด ในกรณีที่มีความแตกต่างกัน ก็ต้องหาสิ่งที่เชื่อมโยงการจัดการนั้น

แผนการประเมินพันธุกรรมควรประกอบด้วย

1.6.1 วิธีที่ใช้ในการประเมินพันธุกรรมสำหรับลักษณะที่ปรับปรุง การจะเลือกใช้วิธีใดนั้นขึ้นอยู่กับลักษณะ ชนิดสัตว์ และเงื่อนไขในการปรับปรุง เช่น Linear Prediction, Best Linear Unbiased Prediction

1.6.2 สิ่งที่ใช้ในการพิจารณา เช่น phenotype, EBV, genetic gain, genetic trend, or selection response

1.6.3 การกำหนดกลุ่มการจัดการที่ใช้ในการเปรียบเทียบ (Contemporary group) สัตว์ที่อยู่ในกลุ่มนั้นๆต้องเปรียบเทียบกันได้อย่างยุติธรรม

1.6.4 ข้อมูลและความถี่ที่จำเป็นต้องจัดเก็บ ข้อมูลที่จัดเก็บควรเป็นลักษณะที่สนใจ/ ต้องการปรับปรุง เช่น ข้อมูลพันธุ์ประวัติ (pedigree) ลักษณะแสดงออก (phenotype) และอื่นๆ

1.6.5 ระยะเวลาที่จะต้องประเมิน เป็นระยะเวลาที่รุ่นลูกหรือรุ่นถัดมาแสดงออกในลักษณะที่เราต้องการ ข้อมูลระยะเวลาที่ต้องทราบ เช่น วันเกิด วันผลิต

1.6.6 ความถี่ในการประเมิน

1.7 ความพร้อม ข้อจำกัด และความเป็นไปได้

- 1.7.1 การสนับสนุนเชิงนโยบาย (ความชัดเจน และความมั่นคง)
- 1.7.2 งบประมาณ (เพียงพอ และต่อเนื่อง)
- 1.7.3 บุคลากร (คุณสมบัติ จำนวน และความรับผิดชอบ)
- 1.7.4 ประชากรพื้นฐาน/เริ่มต้น (ขนาด และความหลากหลาย)
- 1.7.5 แผนการปรับปรุงพันธุ์ (ชัดเจน รัดกุม และเป็นไปได้ในเชิงปฏิบัติ)
- 1.7.6 เทคโนโลยีที่นำมาใช้ประโยชน์ (ความเหมาะสม ประสิทธิภาพ และความแม่นยำ)
- 1.7.7 อุปกรณ์ สถานที่ และการจัดการเพาะเลี้ยง (เพียงพอและเหมาะสม)
- 1.7.8 เวลา และความต้องการใช้ประโยชน์จากพันธุกรรม

2. การคัดเลือก การเปรียบเทียบ และความแม่นยำ

เป็นการคัดเลือกที่มีความสามารถทางพันธุกรรม (Additive genetic effect) เป็นเลิศดีกว่าเกณฑ์หรือสัตว์ตัวอื่น ซึ่งในการคัดเลือกนั้นการเปรียบเทียบต้องยุติธรรมไม่ลำเอียง มีความแม่นยำ มีความสัมฤทธิ์ผล และความก้าวหน้าทางพันธุกรรม

2.1 การคัดเลือก

2.1.1 การคัดเลือกกลุ่ม

จะพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม ค่าเฉลี่ยมี ๒ รูปแบบ ได้แก่

- 1) ค่าเฉลี่ยทางคณิตศาสตร์ (Mathematic mean) การจะใช้ค่าเฉลี่ยแบบนี้ กลุ่มแต่ละกลุ่ม ต้องมีจำนวนสมาชิกเท่ากัน/มีจำนวนซ้ำเท่ากัน และได้รับการจัดการที่เหมือนกัน
- 2) ค่าเฉลี่ยสี่สแควร์ (Least squares mean) เป็นค่าเฉลี่ยที่มีการปรับอิทธิพลที่เราควบคุมไม่ได้ ออก การใช้ค่าเฉลี่ยแบบนี้ กลุ่มแต่ละกลุ่มไม่จำเป็นต้องมีจำนวนสมาชิกเท่ากัน หรือได้รับการจัดการเหมือนกัน แต่ควรจะมีเชื่อมโยงซึ่งกันและกัน

2.1.2 การคัดเลือกรายตัว

จะพิจารณาความสามารถที่เบี่ยงเบนออกไปจากค่าเฉลี่ย

- 1) ความสามารถที่ปรากฏ ได้แก่ ข้อมูลตนเอง ข้อมูลบรรพบุรุษ ข้อมูลเครือญาติ และข้อมูลลูก
- 2) ความสามารถทางพันธุกรรม ได้แก่ Estimated Breeding Value, Selection Index, Marker, Genomic Breeding Value
- 3) ลักษณะที่เกิดซ้ำ Permanent environment effect, Producing ability, Repeatability

2.3 ความแม่นยำของการคัดเลือก (เช่นเดียวกับ หัวข้อที่ 1.4.1 ประเด็นที่ 2)

การดูหรือสังเกต → ข้อมูลลักษณะที่ปรากฏ → คุณค่าการผสมพันธุ์ → เครื่องหมายพันธุกรรม → จีโนม

ความแม่นยำของการคัดเลือกโดยพิจารณาจากลักษณะที่ปรากฏ ขึ้นอยู่กับ

2.3.1 อัตราพันธุกรรม (heritability, h^2) สำหรับลักษณะที่พิจารณา

อัตราพันธุกรรม (heritability, h^2) คือ

- 1) เป็นค่าของประชากร (population parameter) สัตว์ทุกตัวใช้ค่านี้ร่วมกัน (คำนวณจากความผันแปร $h^2 = V_A / V_P$)
- 2) เป็นค่าที่แสดงถึง ระดับความสัมพันธ์ระหว่างความผันแปรทางพันธุกรรมกับลักษณะที่ปรากฏ
- 3) เป็นค่าที่แสดงถึง ระดับความแตกต่างทางพันธุกรรมที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลักษณะที่ปรากฏ 1 หน่วย
- 4) ไม่ได้เป็นค่าที่บอกความสามารถในการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (ประชากรที่มี h^2 สูงกว่าไม่ได้หมายความว่าสัตว์ในประชากรนั้นจะมีความสามารถทางพันธุกรรมสูงกว่าประชากรที่มี h^2 ต่ำกว่า)

2.3.2 ความไม่ลำเอียงของความสามารถที่ปรากฏของสัตว์แต่ละตัว

2.3.3 ความแตกต่างสำหรับลักษณะที่พิจารณาของสัตว์แต่ละตัว ซึ่งยิ่งมาก การคัดเลือกยิ่งมี

ความชัดเจน

3. การจับคู่ผสมพันธุ์-ความเหมาะสม

การจับคู่ผสมพันธุ์แตกต่างจากการผสมพันธุ์ โดยที่เป้าหมายของการจับคู่ผสมพันธุ์ คือ การใช้ประโยชน์จากพันธุกรรมที่คัดเลือกไว้แล้ว ส่วนเป้าหมายการผสมพันธุ์ คือ การเพาะขยายพันธุ์ (การผสมติด)

ข้อพิจารณาเพื่อดูความเหมาะสมในการจับคู่ผสมพันธุ์

3.1 พิจารณาที่สมรรถภาพของสัตว์ (Based on animal performance)

3.1.1 Random Mating ผสมแบบสุ่มในกลุ่มประชากร

3.1.2 Positive Assortative Mating ผสมแบบคู่เหมือน เช่น โดดรีรอดสูง-โดดรีรอดสูง

3.1.3 Negative Assortative Mating ผสมแบบคู่ต่าง เช่น โดดรีรอดสูง-โดดรีรอดต่ำ

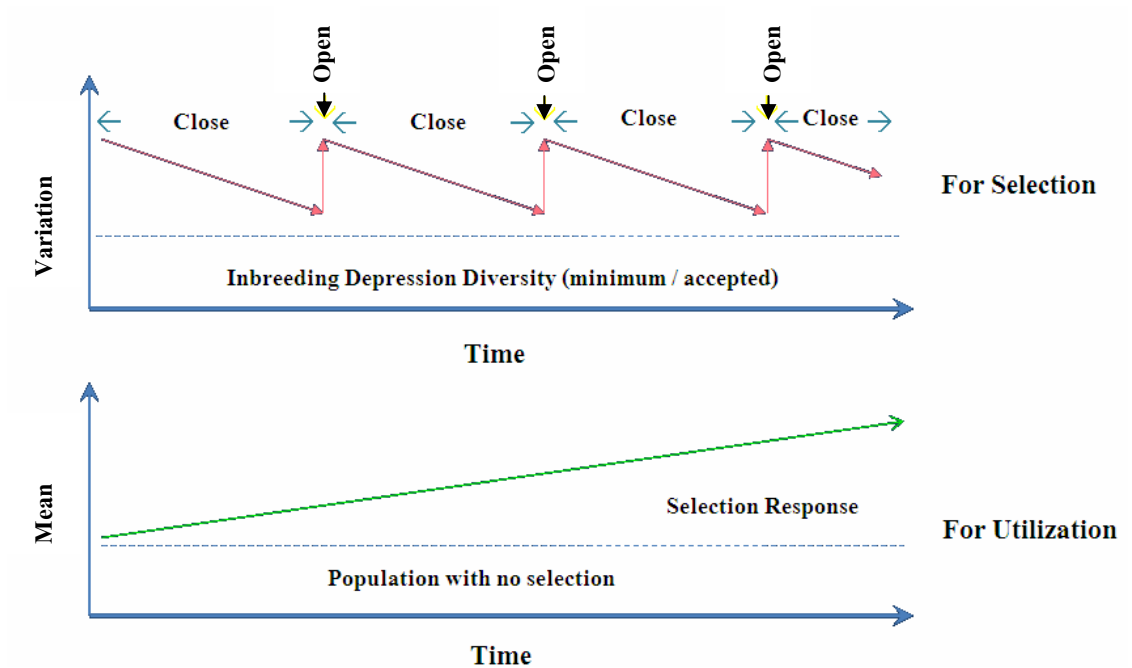
3.2 พิจารณาที่ความสัมพันธ์ทางเครือญาติ (Based on pedigree relationship)

3.2.1 Close breeding

- 1) Increase homozygosity (ผสมเพื่อเพิ่มความเหมือนของยีนในลักษณะที่ปรากฏ)
- 2) Inbreeding depression (เกิดผลเสียจากการผสมเลือดชิด)

3.2.2 Out breeding

- 1) Increase heterozygosity (ผสมเพื่อเพิ่มความแตกต่างของยีนในลักษณะที่ปรากฏ)
- 2) Heterosis เกิดขึ้นแล้วถ่ายทอดไม่ได้ และมีความเฉพาะเจาะจงในแต่ละสภาพแวดล้อม



ภาพแสดง การพิจารณาและจัดการพันธุกรรมระดับประชากร

4. การประเมินพันธุกรรมและการวัดผลสัมฤทธิ์การปรับปรุงพันธุ์

4.1 สิ่งที่ควรประเมิน

- 4.1.1 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อลักษณะที่สนใจ (Factor effecting the target traits)
- 4.1.2 ค่าประมาณลักษณะที่ปรากฏ (Phenotype value: PV)
- 4.1.3 ค่าทำนายความสามารถทางพันธุกรรม (Estimate breeding value :EBV)
- 4.1.4 ค่าเฉลี่ยระหว่างรุ่น (Average of the generations)
- 4.1.5 องค์ประกอบของความแปรปรวน (Variance Components Estimation: VCE)
- 4.1.6 พารามิเตอร์ของประชากร (heritability, correlation, repeatability, other descriptive stat)
- 4.1.7 แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม (genetic trends)
- 4.1.8 ผลตอบสนองต่อการคัดเลือก (Selection response)

4.2 ประชากรที่ศึกษา

การวัดว่า “สัตว์รุ่นลูก” มีลักษณะที่พึงประสงค์ ดีกว่า “สัตว์รุ่นพ่อแม่” ต้องใช้ “ค่าเฉลี่ย” ที่สามารถนำมาใช้ในการเปรียบเทียบได้อย่างไม่ลำเอียง

วิธีที่ใช้ในการประเมินประชากร

4.2.1 กรณีควบคุมทุกปัจจัยได้ดี และแต่ละกลุ่มมีสมาชิกจำนวนเท่ากัน ใช้ Mathematic means

4.2.2 ควบคุมได้บ้างบางปัจจัย หรือไม่ได้เลย แต่ข้อมูลมีความเชื่อมโยงทางพันธุกรรม ระหว่างกลุ่มการจัดการ (contemporary groups) ใช้ Least squares means

4.3 Best Linear Unbiased Prediction (BLUP)

เป็นเครื่องมือที่ใช้ในการคัดเลือก ซึ่งเชื่อว่าจะมีความแม่นยำกว่าการใช้ค่าเฉลี่ย การใช้ BLUP เป็นการใช้ประโยชน์จากข้อมูลต่อไปนี้

4.3.1 ใช้ประโยชน์จากข้อมูลความสัมพันธ์ทางเครือญาติ

4.3.2 ใช้ประโยชน์จากข้อมูลของสัตว์ทุกตัวที่มีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน

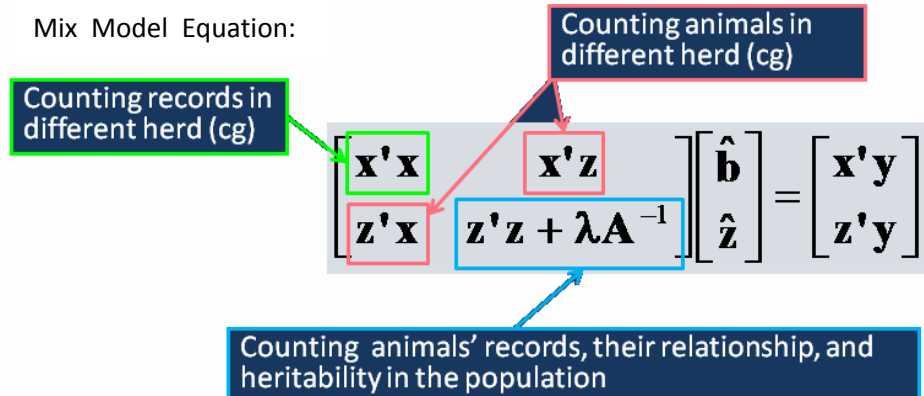
4.3.3 ใช้ประโยชน์จากหลักการของ Linear Model (correcting different effect for each other)

ข้อมูลที่จำเป็นสำหรับการใช้ Best Linear Unbiased Prediction (BLUP)

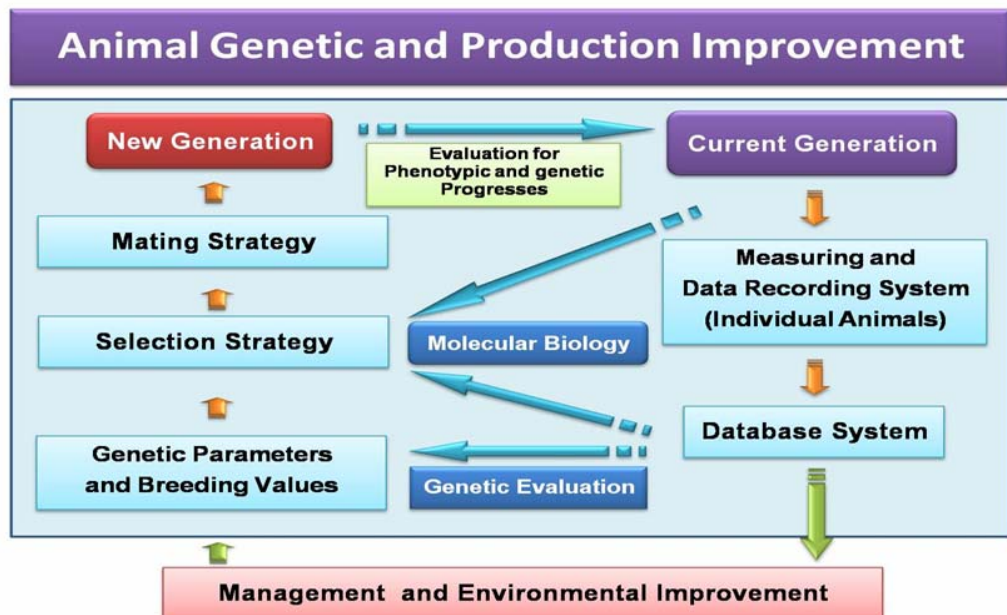
- ข้อมูลพันธุ์ประวัติ (Pedigree Information)
- ข้อมูลลักษณะที่ปรากฏ (Phenotypic Information)
- ข้อมูลอื่น ๆ ที่มี เช่น กลุ่มการจัดการ เพศ อายุ กลุ่มพันธุ์ ฯลฯ

หุ่นจำลองแบบผสม Mixed Model (fixed effect and random effect)

$$y = Xb + Zu + e$$



5. แนวคิดในการวิจัยพันธุศาสตร์และการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ



การวิเคราะห์และประเมินผลที่ได้จากโปรแกรมการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์

ความสำคัญของการติดตามความก้าวหน้าของการปรับปรุงพันธุ์ เป็นการทดสอบว่าวิธีการหรือโปรแกรมปรับปรุงพันธุ์มีประสิทธิภาพอย่างไร ซึ่งในการทำการปรับปรุงพันธุ์แต่ละครั้ง จะใช้เวลานานขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์น้ำ เช่น

- ปลานิล 1/2 - 1 ปี ต่อ 1 generation
- white sturgeon 40 ปี ต่อ 1 generation
- ปลาบึก 15 ปี ต่อ 1 generation

การติดตามความก้าวหน้าการปรับปรุงพันธุ์

การปรับปรุงพันธุ์แต่ละงานใช้เวลานานมาก เพราะฉะนั้นการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมตามโครงการปรับปรุงพันธุ์มีความสำคัญมาก จึงต้องดูว่าทำถูกต้อง ถูกทาง หรือใช้ประโยชน์ได้ดีหรือไม่ สิ่งที่ใช้วัดการตอบสนองของการปรับปรุงพันธุ์ คือ phenotype มี 2 ปัจจัย ได้แก่ปัจจัยที่เกิดจากพันธุกรรม คือ สิ่งที่เราต้องการปรับปรุง และปัจจัยที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม ทั้ง 2 ปัจจัยต้องทำร่วมกัน เนื่องจาก genotype environment interaction ในสัตว์น้ำเกิดเยอะมาก

การวางแผนในเรื่องของการตรวจวัดต้องคำนึงถึงทั้ง 2 ส่วน คือ genotype environment interaction ที่เกิดขึ้น การติดตามในเรื่องของการปรับปรุงพันธุ์ที่ต้องคำนึงถึง คือ ต้องทำบนพื้นฐานของประชากรที่มีขนาดเล็ก (small populations หรือ effective populations) คิดในเรื่องของยีนของพ่อแม่ปลาซึ่งผสมกันแล้วจะส่งผ่าน genetics ไปสู่ลูก ถ้าผสมแล้วไม่อยู่ในระบบของการปรับปรุงพันธุ์ ก็ไม่ใช่ effective populations เพราะฉะนั้นการทำงานกับประชากรที่มีขนาดเล็ก ก็จะมีปัญหาหลักใหญ่ๆ ในเรื่องของความไม่แน่นอนในหลายๆ ส่วน ซึ่งจะเกิด sampling error และการสุ่มตัวอย่างจำนวนเล็กน้อย โดยไม่เป็นตัวแทนของประชากร จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางพันธุกรรม

สิ่งที่ควรทราบ คือ การติดตามความก้าวหน้าทางพันธุกรรม ไม่ใช่เราคัดเลือกพันธุ์ 1 generation มาทดสอบแล้วบอกว่าดีหรือไม่ดี เพราะว่ามี sampling error เข้ามาเกี่ยวข้อง เพราะฉะนั้นเราจะต้องทดสอบความก้าวหน้าทางพันธุกรรมหลายๆ generation ถ้าทดสอบได้ 2-3 generation ทำให้ความก้าวหน้าที่จะนำเสนอชัดเจนขึ้น

การทดสอบความก้าวหน้าทางพันธุกรรม ต้องมีตัวควบคุม (control) ที่ดี ซึ่งในปัจจุบันมีเยอะและมีหลายวิธี ซึ่งตัวควบคุมที่ใช้กันบ่อยๆ มี 4 แบบ คือ

1. unselected control line คัดเลือกโดยวิธีการสุ่มมาจากประชากรพื้นฐานเดียวกัน สิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ ในเรื่องของ genetic environment interaction เพราะฉะนั้นทุกครั้งที่มีการเปรียบเทียบกัน ต้องดูโครงสร้างของพันธุกรรมของปลาทั้ง 2 สายต้องไม่แตกต่างกัน ถ้าแตกต่างกันเมื่อไหร่ G/E ก็จะไม่แตกต่างกันด้วย มีผลให้การเปรียบเทียบทางพันธุกรรมไม่ได้ผล หรือถ้าได้ผลก็จะเป็นการสุ่มน้อยทำให้เกิด sampling error การสุ่มต้องสุ่มแบบไม่ลำเอียง สุ่มค่อนข้างมาก และสุ่มแบบ random ซึ่งจะได้ผลค่อนข้างดี และต้องใช้ sampling ที่ดีด้วย

$$\begin{aligned} \text{สูตร } \Delta G &= P_{\text{selected}} - P_{\text{control}} \\ &= (G_{\text{selected}} + E_{\text{selected}}) - (G_{\text{control}} + E_{\text{control}}) \\ &= (G_{\text{selected}} - G_{\text{control}}) \end{aligned}$$

โดยที่ ΔG = genetic gain
 P = phenotype
 E = environment
 G = genotype

ข้อจำกัดของ unselected control line

1.1 พื้นที่และสิ่งอำนวยความสะดวกมีไม่มาก งบประมาณที่จะใช้เลี้ยงปลาใน ส่วน control line ค่อนข้างน้อยให้ความสนใจน้อย ถ้าเลี้ยงหลาย generation หรือ การเปรียบเทียบหลังจากที่ unselected control line ผ่านไปหลาย generation แล้วโครงสร้างพันธุกรรมของประชากรเดิมจะเปลี่ยนไปมากเมื่อเปรียบเทียบกับฐานประชากรเดิม เพราะฉะนั้นการเปรียบเทียบความก้าวหน้าจะไม่ใช้ตัวเลขที่ถูกต้อง ซึ่งปัญหานี้ควบคุมได้ แต่สิ้นเปลืองงบประมาณสูง จึงไม่มีคนทำ

1.2 สัตว์น้ำไม่ Domestication (เกิดจาก natural selection) ควบคุมไม่ได้ใน generation แรกๆ control line จะถูก natural selection อย่างรุนแรงจนมีการเปลี่ยนแปลง ก็จะไม่ใช้ประชากรพื้นฐานอีกต่อไป ปัญหานี้ควบคุมไม่ได้

ปัญหาทั้ง 2 ปัญหามีความสำคัญมาก การใช้ unselected control line เป็นวิธีการที่แย่ที่สุดในการใช้เป็นตัวเปรียบเทียบความก้าวหน้าทางพันธุกรรม แต่เป็นแบบที่นิยมใช้มากที่สุด

2. divergent selection หรือการคัดเลือกแบบ 2 ทิศทาง การประมาณค่า genetic gain จะค่อนข้างสูง สาเหตุที่สูงเนื่องจากการเป็น การ select 2 ส่วนที่แยกออกไป เนื่องจากมี selection เข้ามาประกอบ เพราะฉะนั้น bias selection จะน้อยกว่าการสุ่ม ตัวที่จะเลือกเป็น control line เป็น low line ในกรณีนี้จะใช้ได้ดีเมื่อลักษณะนั้นตอบสนองสำหรับ 2 ทิศทาง (low line, high line) เท่ากัน ซึ่งเป็นไปไม่ได้ จึงไม่ค่อยแม่นยำ การคัดเลือกแบบ 2 ทิศทาง ซึ่งมี low line และ high line แล้ว ค่า genetic gain เป็นครึ่งหนึ่งของความแตกต่างระหว่าง low line กับ high line คือเส้นกลาง ซึ่งวิธีนี้เป็นไปไม่ได้ ถ้าการตอบสนองไม่เท่ากันก็จะไม่อยู่ตรงกลาง จะเบี่ยงเบนขึ้นหรือลง และทำให้คิดว่า low line เป็น control line ทำให้ค่า genetic gain ที่ได้มีค่าเป็นสองเท่า

ข้อจำกัดของ divergent selection

2.1 ไม่ variate ในเรื่องของการเป็น control คือ การตอบสนอง 2 ทิศทางไม่เท่ากัน ใน high line ไม่มีปัญหา จะเกิดปัญหาในเรื่องของ low line ต้องมีการเอาใจใส่ดูแล เพื่อให้ line อยู่รอด

2.2 กรณีที่ใช้การคัดเลือกหลายคุณลักษณะพร้อมกัน ก็จะมีลักษณะของการตอบสนองแต่ละคุณลักษณะแตกต่างกัน บางคุณลักษณะไปทิศทางเดียวกัน บางคุณลักษณะไปในทิศทางตรงกันข้าม เพราะฉะนั้นการคัดเลือกโดยใช้ divergent selection บนพื้นฐานของลักษณะเดียว ก็จะทำให้เกิดปัญหาในการที่จะนำไปใช้เปรียบเทียบในอีกคุณลักษณะหนึ่ง ถ้าหากเป็น negative respond ก็จะเป็นการตอบสนองในทิศทางตรงกันข้ามกับคุณลักษณะที่คัดเลือก ก็จะไม่เป็น control line ที่ดี

3. repeated matings เป็นการเปรียบเทียบโดยใช้ปลาตัวเดิม (ถ้ายังมีชีวิตอยู่) แต่ถ้าตายแล้ว จะใช้น้ำเชื้อที่เก็บรักษาไว้

ข้อจำกัดของ repeated matings

3.1 อายุของปลามีความเกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของปลา ถึงแม้ genetic จะไม่แตกต่างกันก็ตาม เพราะประสิทธิภาพของปลาไม่ใช่แค่ genetic อย่างเดียว

3.2 ปลาตาย เพราะ generation ของการทดสอบใช้เวลานาน

ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์โดยวิธีแช่แข็ง cryopreservation มีบทบาทมากในการทดสอบวิธีนี้ เป็นวิธีการที่แนะนำให้ใช้ แต่ใช้ไม่ได้กับปลาทุกชนิด เพราะปลาบางชนิดไม่สามารถเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ได้

4. average breeders การคัดเลือกจากตรงกลาง เป็นเทคนิคที่ง่ายไม่ต้องเก็บรักษาพ่อแม่ปลาทุก generation เป็นการเปรียบเทียบกับ average ของปลา โดยเลือกปลากลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยตรงกลางมาเป็น control เปรียบเทียบประสิทธิภาพกับกลุ่มที่มีการคัดเลือก

ข้อจำกัดของ average breeders

4.1 เมื่อการตอบสนองไม่เท่ากัน เพราะฉะนั้นค่าเฉลี่ยของลักษณะหนึ่งอาจจะไม่ใช่ค่าเฉลี่ยของอีกลักษณะหนึ่ง

4.2 จำนวนพ่อแม่ปลาที่ใช้ในการคัดเลือกต้องมีจำนวนเพียงพอ คือ $N_e = 50$ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดปัญหา GxE เป็นตัวแทนของโครงสร้างพันธุกรรมในค่าเฉลี่ยที่ดี

แต่อย่างไรก็ตาม วิธีที่ 3 และ 4 เป็นวิธีที่แนะนำให้ใช้ และค่อนข้างสะดวก คือสิ้นเปลืองน้อยกว่า

การทดสอบพันธุ์แบบ on farm

คือ การทดสอบพันธุ์ที่ได้จากการปรับปรุงพันธุ์ในฟาร์มเกษตรกรโดยใช้วิธีการเลี้ยงและการจัดการในการเลี้ยงตามวิธีของเกษตรกร แต่ต้องมีการวางแผนการทดลอง แบบที่ถูกต้องตามหลักวิชาการ โดยมีจำนวนซ้ำ และวิธีการวางแผนงานทดลองที่ชัดเจน มีการออกแบบการทดลองเชิงวิทยาศาสตร์ หรือเชิงสถิติ เพื่อให้ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่ชัดเจน

ความสำคัญของจำนวนซ้ำ

จำนวนซ้ำที่เหมาะสมสำหรับการออกแบบการทดลอง ควรเท่ากับ 4 ซ้ำ ซึ่งเป็นระดับที่ปลอดภัยและให้ผลดี ถ้าเพิ่มเป็น 5-6 ซ้ำ มีผลเพียงการเพิ่ม statistical power ผลที่ได้จากการทดสอบไม่แตกต่างกันเมื่อเทียบกับ 4 ซ้ำ แต่มีการสูญเสียทรัพยากรที่มากกว่า ถ้าจำนวนซ้ำ เท่ากับ 2 ซ้ำ ไม่ถือว่าเป็นจำนวนซ้ำ เพราะจะมองไม่เห็น error ในการทดลอง แบบ CRD จำนวนซ้ำที่น้อยที่สุด คือ 3 ซ้ำ แต่ต้องมีการดูแลให้มีอยู่ครบทั้ง 3 ซ้ำจนจบการทดลอง

การวางแผนทดลอง

บ่อทดลองควรมีการกระจายครอบคลุมพื้นที่ฟาร์ม และต้องดูสภาพแวดล้อมของฟาร์ม เช่น การจราจร กระแสลม ทิศทางของแสงอาทิตย์ เป็นต้น การทดลองในฟาร์มขนาดเล็กจะไม่พบปัญหาเรื่องการวางแผนทดลอง แต่ในฟาร์มขนาดใหญ่จะมีปัญหามากเนื่องจากขนาดของหน่วยทดลอง มีความไม่สม่ำเสมอทำให้บ่อแต่ละบ่อมีความแตกต่างกันมาก การวางแผนบ่อไม่ควรมองที่ขนาดของบ่อ แต่ควรมองว่าบ่อแต่ละบ่อควรวางที่

ไหนบ้าง เพราะสภาพแวดล้อมของฟาร์มมีผลต่อผลการทดลอง โดยเฉพาะการวางแผนการทดลองแบบ CRD มีปัญหา มาก เพราะมีจำนวนซ้ำไม่มาก จึงต้องปรับปรุงการวางแผนการทดลองใหม่โดยต้องดูจาก lay out ของฟาร์ม

ความสำคัญของการสุ่ม

เนื่องจากพื้นที่ฟาร์มมีความแตกต่างกัน แต่ไม่สามารถทำการทดสอบได้ทุกเนื้อที่ของฟาร์ม ในการวางแผนการทดลองจึงต้องมีการสุ่มพื้นที่ของฟาร์มเพื่อให้เป็นตัวแทนที่ดี และลดปัญหาเรื่องความไม่สม่ำเสมอของสภาพแวดล้อมในฟาร์ม

การวางแผนการทดลองที่ดีในการทดสอบแบบ on farm

การออกแบบการทดลองที่ดีควรเป็นแบบ RCBD และทุกครั้งที่มีชุดทดลองหนึ่งต้องมีอีกชุดทดลองวางข้างๆ เสมอ โดยมีการสุ่มเป็นคู่ๆ ในการออกแบบชุดทดลองต้องดูอิทธิพลของสภาพแวดล้อมเป็นหลัก ว่าสิ่งแวดล้อมมีอิทธิพลมากน้อยแตกต่างกันอย่างไร เช่น ถ้าแสงแดดเป็นปัจจัยที่สำคัญ การวางผังบ่อทดลองต้องเป็นทิศตะวันออกไปสู่ทิศตะวันตก เป็นต้น การวางผังบ่ออาจเป็นชุดหรือเป็นแถวขึ้นกับลักษณะฟาร์ม และการวางบ่อทดลองเป็นแถวใช้ได้กับฟาร์มที่มีพื้นที่ยาว

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

การวิเคราะห์ผลใช้ วิธี ANOVA และวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละชุดทดลอง (paired comparison) ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่

- LSD Least Significant Difference ข้อมูลที่มีความแตกต่างกันน้อยจะมองเห็นความแตกต่าง
- TUKEY's Test มีความชัดเจนสูง ถ้าผลการทดลองมีความแตกต่างกันน้อย หรือไม่แตกต่างกันจริง จะยอมรับว่าไม่แตกต่างกัน
- Duncan Multiple Range Test ข้อมูลที่มีความแตกต่างกันน้อยจะมองเห็นความแตกต่าง

การตัดสินใจผลการทดลองว่า แตกต่างหรือไม่ ใช้การตัดสินใจที่ค่า P value

การทดสอบ แบบ on farm การทดสอบความแตกต่างควรใช้วิธี TUKEY's Test เพราะการทดสอบแบบ on farm มี environment เข้ามามีส่วนทำให้เกิดความแตกต่างเกิดขึ้น

การทดสอบ แบบ on station การทดสอบควรใช้วิธี Duncan Multiple Range Test หรือ LSD Least Significant Difference เพื่อดูความแตกต่างของ Variation

ค่าความน่าจะเป็น (probability level) หรือ ค่า P ระดับมาตรฐานจะใช้ที่ 0.05 หรือที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เป็นเกณฑ์ในการเปรียบเทียบ โดยทั่วไปมีการยอมรับความแตกต่างเมื่อมีค่า P value ตั้งแต่ 0.01-0.2 แต่ถ้าใช้สูงกว่า 0.05 ต้องมีคำอธิบายว่ามีปัจจัยใดที่มีผลทำให้เกิดความแตกต่าง ถ้าค่า P value น้อยยิ่งดีและชัดเจน ในการนำเสนอให้กล่าวว่ามี ความเชื่อมั่นเท่าใด เช่น ถ้าค่า $P < 0.01$ แสดงว่ามีความเชื่อมั่น 99 % ว่ามีความแตกต่าง

การเสนอผลงานให้แสดงค่า P value ในการทดสอบ เพื่อให้ผู้อ่านสรุปว่า มีความแตกต่างที่ความเชื่อมั่นเท่าใด และตัดสินใจโดยผู้อ่านเอง โดยเฉพาะการทดสอบแบบ on farm test เพราะมีสิ่งแวดล้อมมาเกี่ยวข้องสูงมาก

กรณีศึกษา

การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปลานิลจิตรลดา 3 ที่ผ่านการคัดเลือก กับไม่ผ่านการคัดเลือก (ความก้าวหน้าของการคัดเลือก) ใช้ control แบบ unselected line (ประสิทธิภาพ ใช้ได้จำกัด)

ผลที่ได้จากการคัดเลือกการเจริญเติบโตรุ่นที่ 1 - 3 พบว่า ความยาวของชุดควบคุมกับชุดคัดเลือก แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ น้ำหนักก็มีการพัฒนาขึ้นตามรุ่นของการปรับปรุง โปรแกรมการปรับปรุงพันธุ์ ยังให้ผลการตอบสนองการปรับปรุงพันธุ์ที่ดี จึงสามารถทำการปรับปรุงพันธุ์ได้อย่างต่อเนื่อง

ผลการวิเคราะห์รูปร่างของปลา truss network เป็นการวัดรูปร่างของปลาในรูปแบบของการวัด พื้นที่ผิวจะทำให้ได้รายละเอียดได้ดีกว่าการหาสัดส่วนความกว้างและความยาว ผลที่ได้คือรุ่นพ่อแม่รุ่นที่ 1, 2, 3 มีความแตกต่างของรูปร่างชัดเจน แต่มีข้อสงสัย คือ ผลที่ได้แต่ละรุ่นมีความแตกต่างกันและไม่คงที่ คือ ไม่ progressive แต่ผลสลับไปสลับมา เมื่อดูผลการตอบสนองต่อการคัดพันธุ์ พบว่า รุ่นที่ 1, 2, 3 ความยาว เพิ่มขึ้น แต่น้ำหนักกลับลดลง ถ้าปรับปรุงไปเรื่อยๆ จะทำให้ได้ปลานิลจิตรลดาที่ตัวยาวขึ้นเรื่อยๆ แต่น้ำหนัก ลดลง ดังนั้น เราต้องตั้งเป้าหมายว่าปรับปรุงพันธุ์เพื่ออะไร และให้มองผลการตอบสนอง การคัดปลาด้วย สายตาทำให้ได้ปลาที่มีตัวยาวแทนปลาที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น ดังนั้นต้องกลับมาดูวิธีการคัดเลือกปลาใหม่ โดยถ้าดู จากน้ำหนักที่ชั่งจากผู้ทำต่างคนทำ ความรีบในการทำงาน มีผลให้เกิดความคลาดเคลื่อนเพราะมีตัวแปร จำนวนมากที่มีผลต่อน้ำหนัก การคัดเลือกโดยการวัดความยาวอาจให้ความแม่นยำมากกว่าการชั่งน้ำหนัก ดังนั้นควรดูความสัมพันธ์ระหว่างสัดส่วนน้ำหนักกับความยาว ควรดู body length แทน body weight เป็น ตัวคัดเลือกปลา

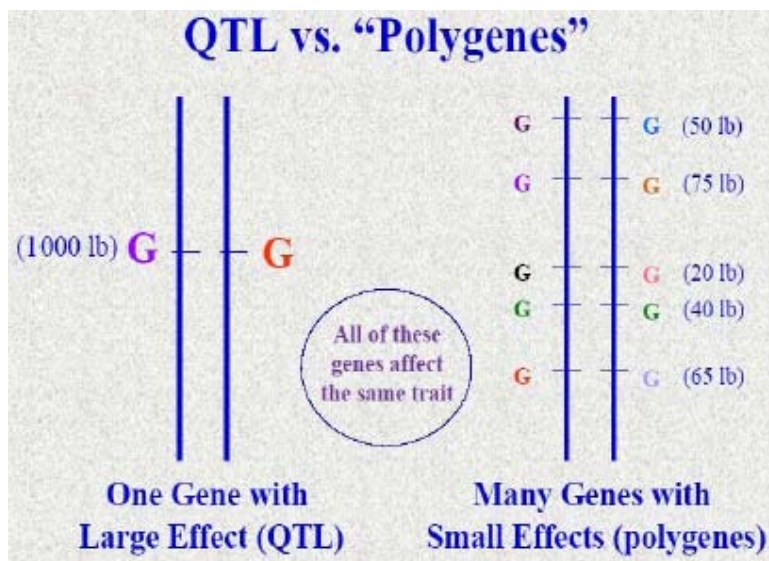
การคัดเลือกด้วยเครื่องหมายพันธุกรรม (Marker Assisted Selection)

Marker-assisted Selection (MAS) เป็นวิธีการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์แบบใหม่ ซึ่งเป็นการผสมผสานวิธีการคัดเลือกแบบดั้งเดิมเข้ากับการใช้เครื่องหมายพันธุกรรมในการคัดพ่อแม่พันธุ์ การคัดเลือกแบบ MAS จะมีความถูกต้องและเพิ่มความก้าวหน้าในการคัดเลือก (genetic progress) สูงกว่าการคัดเลือกแบบดั้งเดิม (trait-based selection) ที่ใช้ลักษณะที่ปรากฏ (phenotype) เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือก ซึ่งมีข้อจำกัดในการดำเนินการหลายประการได้แก่ ลักษณะที่มีอัตราพันธุกรรม (heritability) ต่ำ ลักษณะที่แสดงออกเฉพาะเพศ ลักษณะที่ไม่สามารถวัดได้ในปลาที่มีชีวิตเช่น คุณภาพเนื้อ เป็นต้น ทำให้ประสิทธิภาพในการคัดเลือกต่ำ ส่วนการคัดเลือกแบบ MAS จะพิจารณาจากเครื่องหมายพันธุกรรมที่กำหนดลักษณะที่แสดงออก ซึ่งไม่ได้ขึ้นอยู่กับอิทธิพลของสิ่งแวดล้อม เหมาะกับลักษณะที่มีอัตราพันธุกรรมต่ำ ทำให้ย่นระยะเวลาในการคัดเลือก ซึ่งสามารถทำได้ตั้งแต่ระยะตัวอ่อนหรือวัยรุ่นโดยไม่จำกัดเพศ ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการเลี้ยงปลาเพื่อดูลักษณะลูก ทำให้การคัดเลือกมีประสิทธิภาพสูงกว่าการคัดเลือกแบบดั้งเดิม

การคัดเลือกสัตว์น้ำโดยวิธี MAS จำเป็นต้องมีข้อมูลเบื้องต้น คือ ยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณ (quantitative trait loci หรือ QTL) โดยต้องอาศัยความสัมพันธ์ (linkage) กับเครื่องหมายพันธุกรรม (genetic marker) โดยวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ linkage ของประชากรนอกสายเลือดในครอบครัว full sibs หรือ half sibs จัดทำเป็นแผนที่โครโมโซม หรือแผนที่ยีนและยีนที่แสดงลักษณะเชิงปริมาณที่สนใจ

ยีนที่ควบคุมลักษณะปริมาณ (Quantitative Trait loci)

ยีนควบคุมลักษณะปริมาณ หรือ QTL จะมีอยู่เป็นจำนวนมาก กระจายอยู่ทั่วไปในจีโนมของสิ่งมีชีวิต สามารถแบ่งยีนออกได้เป็น 2 แบบ คือ ยีนที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกมาก (large effect) แต่มีเพียง 1 ตำแหน่ง (major gene) phenotype ที่แสดงออกจะปรากฏออกมามากและชัดเจน และยีนที่มีอิทธิพลต่อการแสดงออกน้อยแต่มีหลายตำแหน่ง (polygene) phenotype ที่ได้จะเป็นผลรวมของลักษณะที่ยีนแต่ละตัวแสดงออกมา major gene จะสามารถนำวิเคราะห์ และหาตำแหน่งได้ง่ายกว่า polygene (ภาพที่ 1)



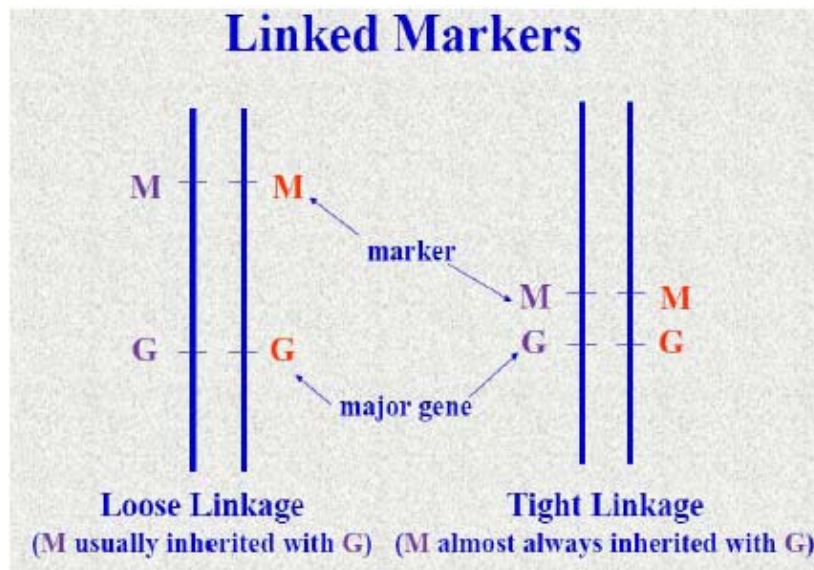
ภาพที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบระหว่าง major gene กับ polygenes

การวิเคราะห์เกี่ยวกับยีนที่ควบคุมลักษณะเชิงปริมาณของลักษณะที่สนใจเพื่อใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์จำเป็นต้องคำนึงถึงปัจจัยดังต่อไปนี้

1. จำนวนยีนที่ควบคุมลักษณะนั้นๆ ว่ามีกี่ยีนที่เข้ามาควบคุมลักษณะที่สนใจ
2. สามารถวัดอิทธิพลหรือผลของยีน (gene effects) ที่แสดงออกมาในรูปแบบผลบวก (additive) แบบ dominance หรือ แบบ epistasis (interaction with other genes)
3. วางตำแหน่ง QTL ที่ต้องการศึกษาว่าอยู่ที่ใดบนจีโนมของสัตว์น้ำที่ต้องการศึกษา โดยการวางตำแหน่งได้จะต้องมีแผนที่ยีนของสัตว์น้ำชนิดนั้นๆ

การศึกษา QTL ตาม model ทางพันธุศาสตร์โดยทั่วไปจะศึกษาที่ละ 1 ตำแหน่ง 2 อัลลีลซึ่งจะมีโอกาสเกิด genotype ได้ 3 แบบ (homozygous 2 แบบ และ heterozygous 1 แบบ) โดยการวิเคราะห์จะทำทั้ง 3 แบบ

การศึกษา QTL มีความจำเป็นต้องอาศัยความสัมพันธ์ (linkage) ระหว่างยีน QTL กับ ยีนที่เป็นเครื่องหมายพันธุกรรม เช่น microsatellite การที่ยีนทั้ง 2 ชนิดนี้อยู่ใกล้กันบนโครโมโซม จะเรียกว่า tight linkage เมื่อมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ยีนที่อยู่ใกล้กันจะได้รับการถ่ายทอดไปอยู่ในเซลล์สืบพันธุ์เดียวกัน ส่วนถ้ายีนทั้งสองชนิดอยู่ห่างกัน (loose linkage) เมื่อมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ยีนจะมีโอกาสถูกแยกออกจากกัน (ภาพที่ 2) เนื่องจากการศึกษา QTL ไม่สามารถระบุได้ว่ายีนมีลักษณะอย่างไร จึงต้องอาศัยความสัมพันธ์ระหว่าง QTL กับเครื่องหมายพันธุกรรม ซึ่งถ้าอยู่ใกล้กันจะสามารถใช้เครื่องหมายพันธุกรรมนั้นๆเป็นตัวตามว่า QTL อยู่ที่ตำแหน่งใด



ภาพที่ 2 แสดงการเปรียบเทียบระหว่าง tight linkage กับ loose linkage

การศึกษา QTL มีขั้นตอนในการศึกษาดังนี้

1. มีการสร้างประชากรเพื่อการเก็บข้อมูล
2. สร้างแผนที่ linkage
3. เก็บข้อมูล phenotype ลักษณะที่ต้องการ
4. การวิเคราะห์ QTL

การสร้างประชากรเพื่อศึกษา QTL

1. การสร้างจากประชากร inbred lines ซึ่งจะมีระดับ homozygosity สูงที่สุด ลักษณะที่แสดงออกจะเหมือนกันทั้งประชากร นำมาผสมกับประชากรที่มีลักษณะตรงกันข้าม เช่น ถ้ามีประชากรที่โตเร็ว ก็จะผสมกับประชากรที่โตช้าเนื่องจากมีอัลลีลที่ควบคุมลักษณะคนละอัลลีลกัน หรือการผสมข้ามชนิด ลูก F_1 ที่ได้จะมีลักษณะที่แสดงออกเหมือนกันหมด จำเป็นต้องนำมาผสมย้อนกลับ (backcross) เพื่อให้เกิดการแยกตัวของ phenotype และ genotype ของประชากรรุ่นถัดมา หรือจะเป็นการผสมระหว่าง F_1 ด้วยกันเองได้ F_2 intercross วิธีการนี้จะให้ผลที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดในแง่ของการทดสอบทางสถิติ
2. การผสมระหว่างประชากรนอกสายเลือด (outcross or segregating population) ในสัตว์น้ำจะนิยมใช้วิธีนี้ โดยสุ่มประชากรจากธรรมชาติ ซึ่งไม่ทราบความสัมพันธ์ระหว่างประชากรที่ใช้ โดยการใช้การวิเคราะห์ครอบครัวแบบ full-sib หรือ half-sib ในแง่ของการทดสอบทางสถิติจะต่ำกว่าการใช้ inbred lines เนื่องจากไม่ทราบว่ามีการอัลลีลที่ควบคุมลักษณะในประชากรนั้นๆ นอกจากนี้ยังไม่ทราบ linkage ระหว่าง marker กับ QTL ที่ต้องการศึกษา การวิเคราะห์จะซับซ้อนและใช้เวลามากกว่า

การค้นหาและวางตำแหน่ง QTL ในสัตว์น้ำส่วนใหญ่ใช้วิธีวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรมกับ QTL สามารถแบ่งออกเป็น การวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรม 1 ตำแหน่ง (single-marker analysis) และการวิเคราะห์เครื่องหมายพันธุกรรมขนานข้าง QTL (flanking-marker analysis หรือ interval mapping)

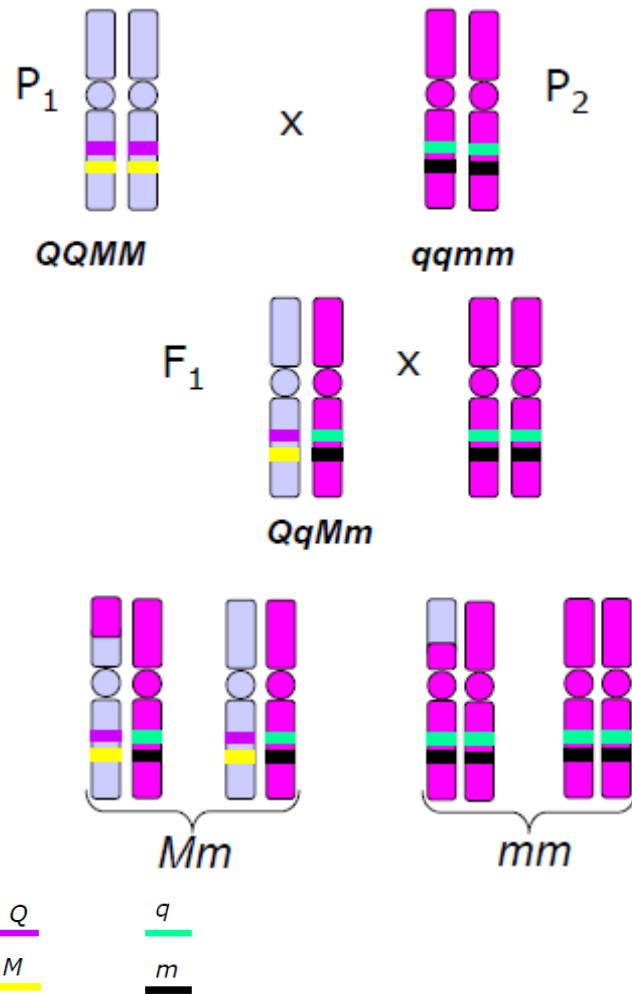
การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง QTL กับเครื่องหมายพันธุกรรม จะวิเคราะห์โดยใช้ สมการเส้นตรง โดยทดสอบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของลักษณะปริมาณ ระหว่างประชากรที่มีเครื่องหมายพันธุกรรมต่างกัน 2 กลุ่ม ด้วย t -test โดยตั้งสมมุติฐานว่า ถ้า QTL กับ เครื่องหมายพันธุกรรม ไม่มีความสัมพันธ์กันหรืออยู่คนละโครโมโซม ผลต่างของค่าเฉลี่ยลักษณะปริมาณที่วัดได้ของทั้งสองกลุ่มจะต้องเท่ากับ 0 แต่ถ้าไม่เท่ากับ 0 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า QTL กับเครื่องหมายพันธุกรรมมีความสัมพันธ์ (linkage) กัน

การวิเคราะห์ QTL กับเครื่องหมายพันธุกรรม 1 ตำแหน่งในประชากร backcross จะได้ค่า additive effect ของ QTL ที่ควบคุมลักษณะปริมาณนั้น ซึ่งค่า additive effect นี้จะบอกถึงอิทธิพลของ QTL ต่อลักษณะปริมาณนั้นๆ ส่วนในการวิเคราะห์ QTL ในประชากร F_2 มีความซับซ้อนมากกว่าการวิเคราะห์จากประชากร backcross โดยจะได้ค่า dominance effect ของ QTL เพิ่มขึ้นมา (ภาพที่ 3)

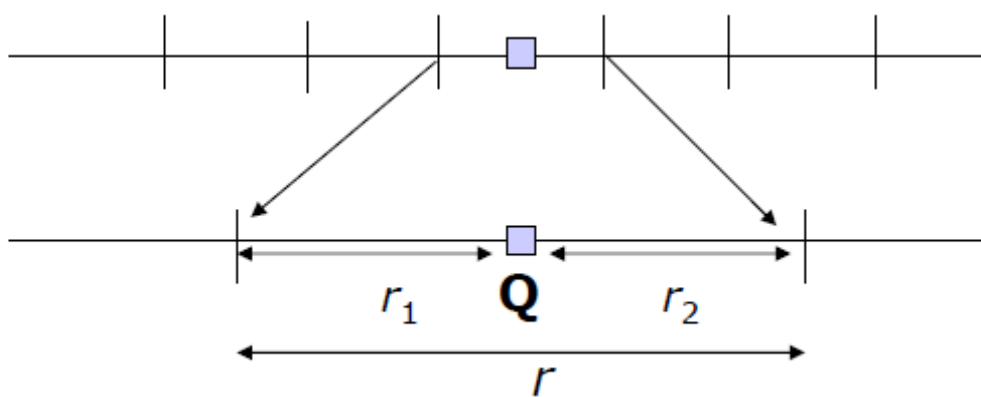
การวิเคราะห์ QTL ในประชากรนอกสายเลือด จะมีรูปแบบความสัมพันธ์ระหว่าง QTL กับ เครื่องหมายพันธุกรรมได้หลายรูปแบบเนื่องจากไม่ได้เกิดจากประชากร inbred line ละเอียดการศึกษาจะต้องศึกษาในครอบครัว half-sib หลายครอบครัว เพราะกำลังทางสถิติไม่เพียงพอ และต้องเลือกตัวพ่อแม่ที่มีเครื่องหมายพันธุกรรมที่เป็น heterozygous การทดสอบจะต้องทำที่ละครอบครัว

การวิเคราะห์ QTL กับเครื่องหมายพันธุกรรมที่ละ 1 ตำแหน่ง ไม่สามารถแยกได้ระหว่าง QTL ที่มีผลน้อยแต่อยู่ใกล้กับเครื่องหมายพันธุกรรมมาก กับ QTL ที่มีผลมากแต่อยู่ไกลจากเครื่องหมายพันธุกรรม

การวิเคราะห์ QTL โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรมขนานข้าง (interval mapping) เป็นการวิเคราะห์โครโมโซมที่ละช่วงจากแผนที่ที่มีการทำไว้ก่อนแล้ว การวิเคราะห์ที่นิยมใช้คือ maximum likelihood มีความซับซ้อนของสมการมากขึ้น ซึ่งจะทำให้มีความแม่นยำในการกำหนดตำแหน่ง QTL มากขึ้น (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 แสดงการถ่ายทอด QTL (Q, q) และ เครื่องหมายพันธุกรรม (M, m) ในประชากร backcross



ภาพที่ 4 แสดงการวิเคราะห์ QTL โดยใช้เครื่องหมายพันธุกรรม 2 ตำแหน่งที่อยู่ติดกันบนแผนที่ยีน เมื่อ Q เป็น QTL ที่ทำการศึกษา ที่อยู่ระหว่างเครื่องหมายพันธุกรรม 2 ตำแหน่งโดยมีระยะห่าง r_1 และ r_2

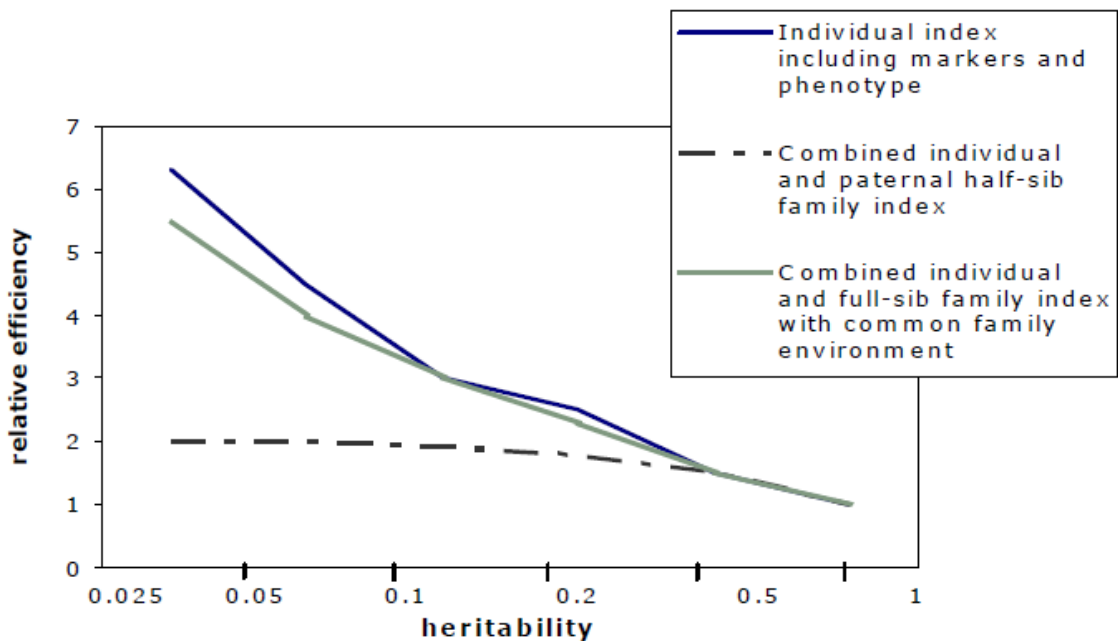
ตัวอย่างการศึกษา QTL ของลักษณะเศรษฐกิจในสัตว์น้ำ

1. การเจริญเติบโต มีการศึกษาใน Tilapia, Salmon, Scallop, Kuruma shrimp
2. Stress tolerance เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม
3. การต้านทานโรค มีการศึกษาใน Trout, Oyster, Japanese flounder
4. Late maturity มีการศึกษาใน Salmon
5. Spawning time มีการศึกษาใน Salmon
6. Fillet quality

ประสิทธิภาพของ MAS ต่อความก้าวหน้าของการคัดเลือก (genetic gain)

1. ค่า heritability ของ QTL ที่ควบคุมลักษณะที่ทำการศึกษามีค่าต่ำ MAS จะมีความก้าวหน้าของการคัดเลือกสูง
2. การคัดเลือกแบบดูลักษณะตัวเอง (individual index) จะมีประสิทธิภาพสูงกว่าการคัดเลือกแบบดูลักษณะครอบครัว
3. ลักษณะที่ต้องดูพี่น้องหรือลักษณะของลูก เช่น เปอร์เซ็นต์ซาก คุณภาพเนื้อ และความต้านทานโรค การใช้ MAS จะทำให้ความก้าวหน้าในการคัดเลือกสูงกว่าลักษณะที่วัดในพ่อแม่พันธุ์โดยตรง เช่น การเจริญเติบโต

Maximum relative efficiency of MAS as a function of heritability for the trait and experimental design



ภาพที่ 5 แสดงประสิทธิภาพของ MAS ระหว่างค่า heritability ของลักษณะที่ศึกษา กับการออกแบบการทดลอง

การปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำให้ทนทานต่อโรค

1. การเกิดโรคในสัตว์น้ำ

สัตว์น้ำที่เลี้ยงในฟาร์มมีโอกาสเกิดโรคได้มากกว่าสัตว์น้ำในธรรมชาติ โดยเฉพาะในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและมีเชื้อโรค การป้องกันการเกิดโรคจึงเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง สัตว์น้ำ โดยปรกติแล้วหากสัตว์น้ำมีสุขภาพดีและเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมจะมีโอกาสเกิดโรคน้อยมาก หากมีการเกิดโรคขึ้นจะมีสาเหตุมาจากปัจจัยต่างๆ เช่น การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำได้แก่ออกซิเจนที่ละลายน้ำมีค่าต่ำ การเปลี่ยนแปลงความเป็นกรดเป็นด่าง การเกิดก๊าซพิษและสารพิษ เช่น แอมโมเนีย ไฮโดรเจนซัลไฟด์ และปรอท เป็นต้น หรือเกิดจากภาวะการขาดสารอาหารบางชนิด เช่น การขาดโปรตีน วิตามิน และแร่ธาตุบางชนิด ประกอบกับการมีเชื้อโรคติดตามมา เช่น เชื้อรา พยาธิ แบคทีเรีย หรือไวรัส

ปัจจัยที่โน้มนำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำมี 3 ปัจจัย คือ

1.1 สัตว์น้ำ (host) ปัจจัยจากตัวสัตว์น้ำได้แก่ อายุ โดยเชื้อโรคบางชนิดจะไม่มีผลต่อสัตว์น้ำจนกว่าจะถึงอายุที่แสดงอาการ ชนิด (species) เชื้อโรคบางชนิดมีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดสัตว์น้ำ สายพันธุ์ (strain) สัตว์น้ำแต่ละสายพันธุ์มีความอ่อนไหวหรือต้านทานต่อเชื้อโรคแตกต่างกัน สภาพร่างกาย (physical condition) ของสัตว์น้ำ ขนาดของสัตว์น้ำ และความสามารถในการต้านทานโรคตามธรรมชาติของสัตว์น้ำ ในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำนั้น ควรมีการคัดเลือกสัตว์น้ำสายพันธุ์ดี (genetically improved fish) และปลอดโรค (certified specific pathogen-free) สัตว์น้ำแต่ละตัวมีความต้านทานโรคไม่เท่ากัน ซึ่งมีผลมาจากภูมิคุ้มกันเชื้อโรคของสัตว์น้ำนั้นๆ ภูมิคุ้มกันแบ่งออกเป็น 2 ระบบ คือ

- ภูมิคุ้มกันระบบน้ำ เป็นระบบที่ถูกสร้างขึ้นเมื่อมีการกระตุ้นจากเชื้อโรค ได้แก่ ไลโซไซม์ (lysozyme) และสารชนิดต่างๆ ที่หลั่งออกมาช่วยในการฆ่าเชื้อโรค
- ภูมิคุ้มกันระบบเซลล์ เป็นระบบที่มีมาโดยกำเนิด ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือด macrophage, monocyte และ lymphocyte เป็นกลุ่มที่สามารถกำจัดเชื้อได้โดยตัวของเซลล์เอง

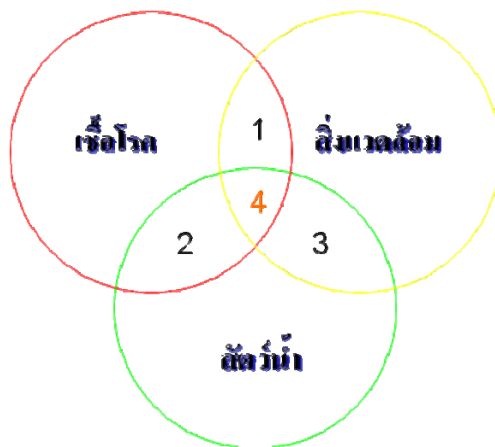
นอกจากนี้ยังมีภูมิคุ้มกันอีกระบบหนึ่งคือ antibody ที่เกี่ยวข้องโดยตรงกับการเพิ่มระดับภูมิคุ้มกันแล้วสามารถที่จะติดไปกับตัวปลาและบางครั้งสามารถถ่ายทอดไปสู่รุ่นลูกได้ ภูมิคุ้มกันชนิดนี้เกิดขึ้นจากส่วนที่เป็น B cell ถูกกระตุ้นจากเชื้อโรคหรือ antigen ที่เข้ามา antigen ที่เป็นโปรตีนจะทำให้ร่างกายผลิต B cell ออกมา เมื่อ B cell พบกับ antigen จะส่งสัญญาณให้เกิดการสร้าง antibody ไปทำลายเชื้อโรคแล้วเชื้อโรคนั้นจะถูกจดจำไว้ภายในตัวสัตว์น้ำนั้นๆ ดังนั้นเมื่อสัตว์น้ำได้รับเชื้อโรคชนิดเดียวกันอีกครั้งหนึ่ง สัตว์น้ำจะสร้าง antibody ตัวเดิมไปทำลายเชื้อโรคนั้นได้ ภูมิคุ้มกันระบบนี้จะมีผลต่อการคัดพันธุ์สัตว์น้ำต้านทานโรคในกรณีที่สัตว์น้ำนั้นได้รับการกระตุ้นจากเชื้อโรคและร่างกายได้จดจำเชื้อโรคนั้นมาก่อนแล้ว จะทำให้สัตว์น้ำนั้นต้านทานโรคได้ เมื่อนำสัตว์น้ำนั้นไปทดลองทำให้เกิดโรคตามกระบวนการคัดพันธุ์จะทำให้ผลที่ได้คลาดเคลื่อนไปได้

1.2 เชื้อโรค (pathogen) ได้แก่แบคทีเรีย และไวรัส เชื้อโรคเหล่านี้มีความรุนแรงของเชื้อ (virulence) หมายถึงปริมาณเชื้อที่น้อยที่สุดที่ทำให้สัตว์น้ำตายเร็วที่สุดไม่เท่ากัน และเชื้อโรคแต่ละชนิดยังแบ่งเป็นหลายสายพันธุ์ เช่น แบคทีเรีย *Streptococcus* มีหลายสายพันธุ์และมีความรุนแรงของโรคแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ เชื้อโรคแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

- **ไวรัส (virus)** เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีนิวคลีโอไทด์และโปรตีนเป็นองค์ประกอบ ไวรัสแต่ละชนิดมีสารพันธุกรรมเป็น DNA หรือ RNA ที่ถูกห่อหุ้มด้วยโปรตีนที่มีความสามารถผ่านเข้าออกเซลล์เจ้าบ้านได้ ไวรัสแต่ละชนิดจะเข้าทำลายเซลล์เจ้าบ้านที่เฉพาะเจาะจงกับไวรัสชนิดนั้นเพื่อเป็นที่ขยายพันธุ์และเพิ่มจำนวน โรคปลาหลายชนิดที่เกิดจากเชื้อไวรัสได้แก่ โรคลิมโฟซิสติส (lymphosystis) ที่เกิดจาก irridio virus ซึ่งเป็นไวรัสที่มี DNA เป็นสารพันธุกรรม โครงสร้างไวรัสชนิดนี้ไม่มีเปลือกหุ้ม มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 150–200 นาโนเมตร ปลาที่ติดเชื้อจะทำให้เซลล์ผิวหนังขยายตัวอย่างผิดปกติ โดยจะมีอาการคือมีตุ่มเล็กใสคล้ายเม็ดสาคูจับกันเป็นก้อนติดอยู่ตามครีบหลังและครีบท้อง ส่วนใหญ่จะพบโรคนี้นในปลากะพงขาว การป้องกันคือไม่ควรนำปลาเป็นโรคมารวมกับปลาปกติ และดูแลสุขภาพปลาให้แข็งแรงอยู่เสมอ โรค lymphosystis จะหายไปเองภายใน 1–3 เดือน โดยไม่ต้องใช้ยาหรือสารเคมี
- **แบคทีเรีย (bacteria)** เป็นสิ่งมีชีวิตจำพวกโปรคาริโอต (prokaryote) ที่ไม่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส แบคทีเรียพบได้ทั่วไปในทุกสภาพแวดล้อมตั้งแต่ในธารน้ำแข็งหรือในระดับลึกลงไปถึง 5 เมตรจากพื้นดินจนถึงที่มีอุณหภูมิสูงในน้ำพุร้อน แบคทีเรียโดยทั่วไปมีขนาดความยาว 1–10 ไมโครเมตร มีรูปร่างเป็นแท่งกลมหรือเป็นเกลียว หลายชนิดมีเปลือกหุ้ม ตัวอย่างแบคทีเรียที่ทำให้สัตว์น้ำเกิดโรคเช่น *Streptococcus iniae* ที่พบได้ทั้งในปลาน้ำจืดและปลาน้ำกร่อย ปลาที่ติดเชื้อจะมีลักษณะตาโปน ตาขุ่นขาว

1.3 สภาพแวดล้อม (environment) เนื่องจากปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น ดังนั้นสิ่งแวดล้อมจึงมีผลกระทบต่อค่อนข้างมากและจำเป็นต้องควบคุมสิ่งแวดล้อมให้เหมาะสมกับสัตว์น้ำแต่ละชนิด รวมไปถึงการควบคุมรูปแบบการเลี้ยง คุณภาพน้ำ ได้แก่ อุณหภูมิ ออกซิเจนที่ละลายน้ำ (DO) ความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) และแอมโมเนีย (NH₃) ซึ่ง NH₃ จะเป็นพิษมากขึ้นเมื่อ pH สูงขึ้น โภชนะของอาหารและการให้อาหาร ความหนาแน่นของปลาในบ่อ มลพิษจากแหล่งน้ำทั้งภายในและภายนอกฟาร์ม การจัดการสุขภาพ (hygiene) ฤดูกาล คุณภาพของสภาพแวดล้อมจะมีความสัมพันธ์ที่ผกผันกับสภาพการเกิดโรค กล่าวคือ หากสภาพแวดล้อมไม่ดีส่งผลให้ความรุนแรงของโรคเพิ่มขึ้น

ความสัมพันธ์ระหว่าง 3 ปัจจัย และการเกิดโรคในสัตว์น้ำ แสดงตามภาพที่ 1 ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 1 ปัจจัยหลัก 3 ปัจจัยที่ทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ

เมื่อปัจจัยทั้ง 3 ปัจจัยมาทับซ้อนกัน พื้นที่หมายเลข 4 จะเป็นพื้นที่ที่ก่อให้เกิดโรคขึ้น ซึ่งเป็นผลร่วมกันจากทั้ง 3 ปัจจัย

2. การตัดพันธุ์สัตว์น้ำต้านทานโรค

การตัดพันธุ์สัตว์น้ำต้านทานโรค เป็นการคัดเลือกในลักษณะที่สำคัญเชิงพาณิชย์ที่สำคัญอีกลักษณะหนึ่งนอกเหนือไปจากลักษณะเชิงพาณิชย์อื่นๆ เช่น การเจริญเติบโต คุณภาพเนื้อ การเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ผลิต การทนทานต่ออุณหภูมิและความเค็ม เป็นต้น การตัดพันธุ์ต้านทานโรคจะใช้ลักษณะอาการของโรคที่ปรากฏภายนอก หรือเรียกว่า “อาการ” เช่น ตาโปน เกิดหูด วายน้ำคางสว่าง เป็นต้น ตัวอย่างการตัดพันธุ์สัตว์น้ำต้านทานโรค ได้แก่โรค Infectious Pancreatic Necrosis (IPN) เป็นโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส IPNV ซึ่งเป็นไวรัสในวงศ์ Birnaviridae เป็นโรคที่สร้างความเสียหายอย่างมากในปลา trout (*Oncorhynchus spp.*) และปลา salmon (*Salmo spp.*) ลักษณะของโรคจะเกิดอย่างเฉียบพลันและทำให้เกิดการตายอย่างมากในลูกปลาวัยอ่อนและปลาขนาด fingerling อาการของโรคคือปลาจะวายน้ำคางสว่างและจมลงที่ก้นบ่อ ปลาจะตายภายในระยะเวลา 1 ชม. และอาจมีอาการของโรคอื่นๆ เช่นปลาไม่มีสีคล้ำลง มีการตกเลือดที่ส่วนท้อง

การตัดพันธุ์ปลาต้านทานโรค IPN เริ่มจากการศึกษาโดย Hill (1982) ซึ่งพบว่า ความต้านทานโรค IPN ในปลา rainbow trout (*O. mykiss*) มีความผันแปรในปลาแต่ละตัวและสายพันธุ์ จากการคัดปลาสายพันธุ์ต้านทานโรคตามกระบวนการคัดพันธุ์ผ่านไปเป็นเวลา 7-8 ปี เมื่อนำปลาเหล่านี้มาวิเคราะห์ทางพันธุกรรมโมเลกุล พบว่าปลาเหล่านี้มียืนต้านทานโรค IPN ต่อมาคณะผู้วิจัย Okamoto *et al* (1987, 1993) นำปลา rainbow trout มาทดลองเพื่อคัดปลาต้านทานโรค โดยทดลองใส่เชื้อ IPN (artificial infection) ให้กับลูกปลา โดยมีองค์ประกอบดังต่อไปนี้

- Virus strain (สายพันธุ์)	IPNV(Buhl)
- Virus titer (ความเข้มข้นของเชื้อโรค)	10^5 TCID ₅₀ /ml
- Fish weight (ขนาดน้ำหนักลูกปลาที่ทดลอง)เฉลี่ย	0.15 g
- Temperature (อุณหภูมิน้ำที่ทดลอง)	15±1 °C
- Experiment term (ระยะเวลาที่ทดลอง)	30 วัน

จากการทดลอง พบว่า ปลา rainbow trout 2 สายพันธุ์คือ RT101 เป็นสายพันธุ์ที่อ่อนไหวต่อเชื้อ IPN (highly sensitive to IPN) และสายพันธุ์ RT210 เป็นสายพันธุ์ที่มีความต้านทานโรคนี้ (resistance strain) โดยทำการทดลองตั้งแต่ปี 1979–1989 และทำการคัดเลือกผ่านไป 5 รุ่นจนได้ปลา rainbow trout สายพันธุ์ RT210 ที่ต้านทานโรค IPN ในที่สุด

3. การทำแผนที่พันธุกรรมและเครื่องหมายดีเอ็นเอที่เกี่ยวข้องกับความต้านทานโรคในสัตว์น้ำ

ปัจจุบันการคัดพันธุ์โดยใช้เทคโนโลยีทางด้านพันธุกรรมโมเลกุลเข้ามาช่วยเริ่มมีบทบาทมากขึ้นในสัตว์น้ำ เทคโนโลยีเหล่านี้ทำให้การคัดพันธุ์มีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้นและลดระยะเวลาการคัดพันธุ์ลงได้ การคัดพันธุ์สัตว์น้ำต้านทานโรคมักมีการนำศาสตร์ทางด้านพันธุกรรมโมเลกุล 2 แขนงคือ genetic linkage map และเครื่องหมายดีเอ็นเอ (DNA markers) ชนิดต่างๆ เข้ามาเป็นเครื่องมือช่วยในการคัดพันธุ์ ในการทำ Genetic linkage map สามารถใช้ประชากรสัตว์น้ำ 5 รุ่นก็จะสามารถทำ map ได้ ในสัตว์น้ำที่มีการทำ Genetic linkage map ส่วนใหญ่จะเป็นปลาในเขตหนาว ได้แก่ปลา rainbow trout (*O. mykiss*), Atlantic salmon (*Salmo salar*), Brown trout (*S. trutta*), Channel catfish (*Ictalurus punctatus*), ปลากลุ่ม Tilapia, ปลาไน (*Cyprinus carpio*), Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*), Yellowtail flounder (*Pleuronectes ferruginea*), กุ้ง Kuruma prawn (*Penaeus japonicus*) และกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) เป็นต้น ขั้นตอนการคัดพันธุ์สัตว์น้ำต้านทานโรคโดยใช้ genetic linkage map มีดังนี้

- 3.1 คัดเลือกเชื้อที่มีความรุนแรงของโรคสูง มีการตอบสนองของโรคสูง มีผลกระทบต่อเศรษฐกิจอย่างมาก เพื่อให้คุ้มค่างับแรงงาน เวลาและเงินทุนจำนวนมากที่ใช้ไปเพื่อการนี้
- 3.2 เตรียมและศึกษาเชื้อโรคที่เลือกมาทำการคัดพันธุ์ในด้านต่างๆ เพื่อให้เข้าใจเชื้อโรคชนิดนั้นให้มากที่สุด
- 3.3 รู้ลักษณะอาการของโรคหรือวิธีการของโรคที่เกิดขึ้นกับปลาชนิดนั้นๆ เพื่อใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดพันธุ์ เช่น การเกิดหูดเป็นอาการที่ปรากฏของโรค Lymphosystis เป็นต้น
- 3.4 จัดเตรียมตัวอย่างปลาเพื่อทดลองใส่เชื้อ (challenge test) ซึ่งจะต้องเป็นปลาที่ปราศจากเชื้อ หรือไม่เคยได้รับเชื่อนั้นมาก่อน (sterilized stock) เพื่อลดอิทธิจากปลาแต่ละตัวและเพื่อเป็นการมั่นใจว่าปลานั้นจะยังไม่มีภูมิต้านทานต่อเชื่อนั้นซึ่งจะทำให้การคัดพันธุ์เกิดข้อผิดพลาดได้
- 3.5 วางแผนการทดลองตามหลักทางสถิติและพันธุศาสตร์
- 3.6 นำตัวอย่างปลาที่เลือกไว้ มาทำ challenge test ด้วยเชื้อโรคที่คัดเลือกไว้ แล้วเลี้ยงปลาโดยควบคุมสภาพแวดล้อมที่เป็นธรรมชาติมากที่สุด เก็บตัวอย่างปลาที่รอดตายมาเลี้ยงจนเป็นพ่อแม่พันธุ์แล้วทำการเพาะพันธุ์ให้ได้ลูก นำปลารุ่นลูกที่ได้มาผสมพันธุ์กันเองภายในรุ่น ($F_1 \times F_1$) จนได้ลูกรุ่น F_2 แล้วนำมาทำ challenge test โดยควบคุมสภาพเหมือนที่ทำในรุ่นพ่อแม่ จากนั้นทำการเปรียบเทียบปลาที่มีความต้านทานเชื้อโรค (resistance) กับปลาที่อ่อนไหวต่อเชื้อโรค (sensitivity) และปลากลุ่มควบคุม (control) ได้รับเชื้อโรค 100% เพื่อเป็นกลุ่มสำหรับยืนยันว่า เชื้อโรคที่ใช้ทดสอบจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงและสามารถนำมาเปรียบเทียบกับปลาชุดที่ต่อต้านเชื้อโรคโดยเปรียบเทียบในระดับยีนได้ ยีนนี้เมื่อวิเคราะห์

ทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลจะตรวจไม่พบในปลาชุดที่อ่อนไหวต่อเชื้อโรค เมื่อคัดจนได้รุ่น ลูกประมาณ 3-4 รุ่น ก็จะนำไปทำ genetic linkage map ได้

4. ตัวอย่างเอกสารทางวิชาการด้านการคัดพันธุ์ต้านทานโรคที่ประสบความสำเร็จแล้ว

การวิเคราะห์ linkage ที่เกี่ยวข้องกับความทนทานโรคจากแบคทีเรีย *Streptococcus iniae* ในปลา Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) โดย Ozaki *et al.* (2010)

เชื้อ *Streptococcus iniae* เป็นแบคทีเรียก่อให้เกิดโรค Streptococcosis ที่เป็นปัญหาอย่างมากในปลา Japanese flounder อาการของโรคคือปลาจะมีตาขุ่นขาวหรือตาโปน แม้ว่าโรคนี้อาจสามารถป้องกันได้โดยใช้ยาปฏิชีวนะ oxytetracycline และวัคซีน แต่หากมีการพัฒนาสายพันธุ์ปลาต้านทานโรคนี้อาจสามารถลดการแพร่ระบาดของโรค ทำให้ลดการใช้จ่ายและวัคซีนลงได้ ในการวิจัยครั้งนี้ คณะผู้วิจัยได้นำเทคโนโลยีทางด้าน linkage analysis จากการใช้เครื่องหมาย microsatellite DNA โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจสอบยีนลักษณะปริมาณ (quantitative trait loci หรือ QTL) ที่เกี่ยวข้องกับการต้านทานการติดเชื้อแบคทีเรีย *S. iniae* ซึ่งจะเป็นการนำไปสู่การพัฒนาปลา flounder สายพันธุ์ต้านทานโรค Streptococcosis ต่อไป กระบวนการวิจัยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1) เตรียมเชื้อ *S. iniae* ที่สกัดจากปลา flounder ที่เป็นโรคแล้วนำไปทำให้เกิดโรค (artificial infection) ในปลา โดยวิธีฉีดเชื้อเข้าในช่องท้อง จากนั้นสกัดเชื้อจากปลาที่ตายจากโรคนี้นำเชื้อที่สกัดได้ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วเก็บแช่แข็งเพื่อเก็บไว้ใช้ทำ challenge test ต่อไป

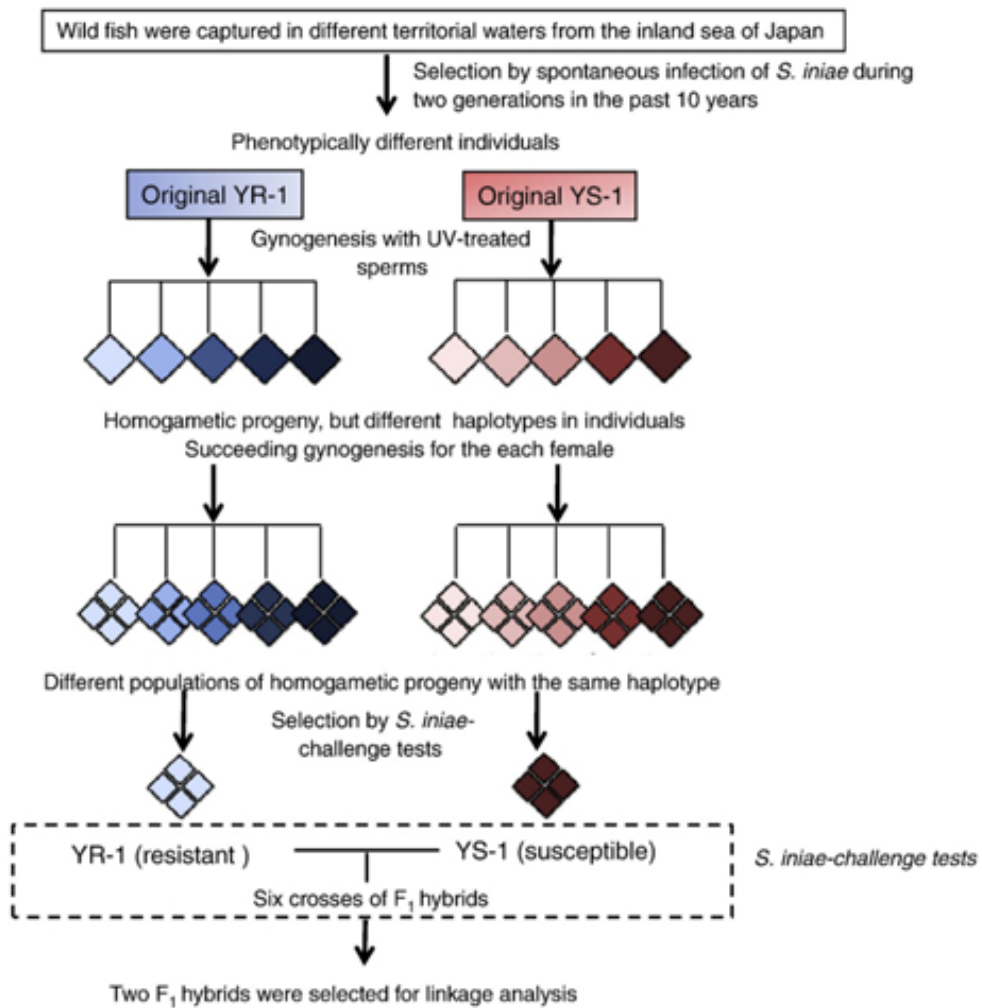
2) คัดเลือกปลาที่ไวต่อการติดเชื้อ (susceptible) และทนทาน (resistant) ต่อเชื้อ *S. iniae* และสร้างประชากรปลา heterozygous gynogenetic เพื่อทำ linkage analysis

ปลา flounder ที่ใช้มี 2 สายพันธุ์ คือ

- สายพันธุ์ YR-1 ที่มีอัตราการตายต่ำ เมื่อนำปลาไปทำให้เกิดโรคโดยการแช่ (dipping infection) และฉีด (injection infection) ปลาที่มีอัตราการตาย 50% และ 70% ตามลำดับ
- สายพันธุ์ YS-1 ที่มีอัตราการตายสูง เมื่อนำปลาไปทำให้เกิดโรคโดยการแช่ และฉีด ปลาที่มีอัตราการตาย 10% และน้อยกว่า 5% ตามลำดับ

ปลา 2 สายพันธุ์นี้ มาจากการคัดเลือก 2 รุ่น เป็นเวลานาน 10 ปี หลังจากนั้น ผู้วิจัยได้สร้างปลา gynogenetic diploids (ปลาที่ได้รับสารพันธุกรรมมาจากแม่ฝ่ายเดียวแล้วเหนี่ยวนำให้มีชุดโครโมโซมเป็น 2 ชุด) ของทั้ง 2 สายพันธุ์ ปลา gynogenetic รุ่นที่ 1 (homogametic progeny) ของแต่ละสายพันธุ์ เมื่อนำไปวิเคราะห์ทางพันธุกรรมโมเลกุล พบว่ามี haplotype แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงนำปลาในแต่ละ haplotype ไปทำ gynogenetic diploids รุ่นที่ 2 จนได้ปลา รุ่นที่ 3 ที่มี haplotype แตกต่างกันหลายกลุ่ม โดยแต่ละกลุ่มจะมี haplotype เดียวกันและมี genetic background เหมือนกัน ต่อจากนั้นผู้วิจัยได้สร้างปลาผสมรุ่นที่ 1 (F₁ hybrid) โดยใช้แม่ปลาสายพันธุ์ YR-1 (ทนทานเชื้อ, อัตราการตายต่ำ) ผสมกับพ่อปลาสายพันธุ์ YS-1 (ไวต่อการติดเชื้อ, อัตราการตายสูง) สร้างเป็นลูกผสมจำนวน 6 ครอบครัว (จากการทำ 6 cross) เพื่อนำไปทำ challenge test ด้วยเชื้อ *S. iniae* ต่อไป

กระบวนการสร้างปลา flounder สองสายพันธุ์ โดยการทำให้ gynogenetic diploid และการสร้างปลาลูกผสม แสดงตามภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กระบวนการสร้างปลาสายพันธุ์ YR-1 (ทนทานเชื้อ) สายพันธุ์ YS-1 (ไวต่อการติดเชื้อ) และปลา ลูกผสมรุ่นที่ 1 ที่จะใช้ทำ linkage analysis

3) ทำ challenge test ด้วยเชื้อ *S. iniae* และตรวจวัดการแสดงออกของโรค

ผู้วิจัยทำการทดสอบในปลาสายพันธุ์ YR-1, YS-1 และปลาลูกผสม ทำ challenge test 2 วิธี

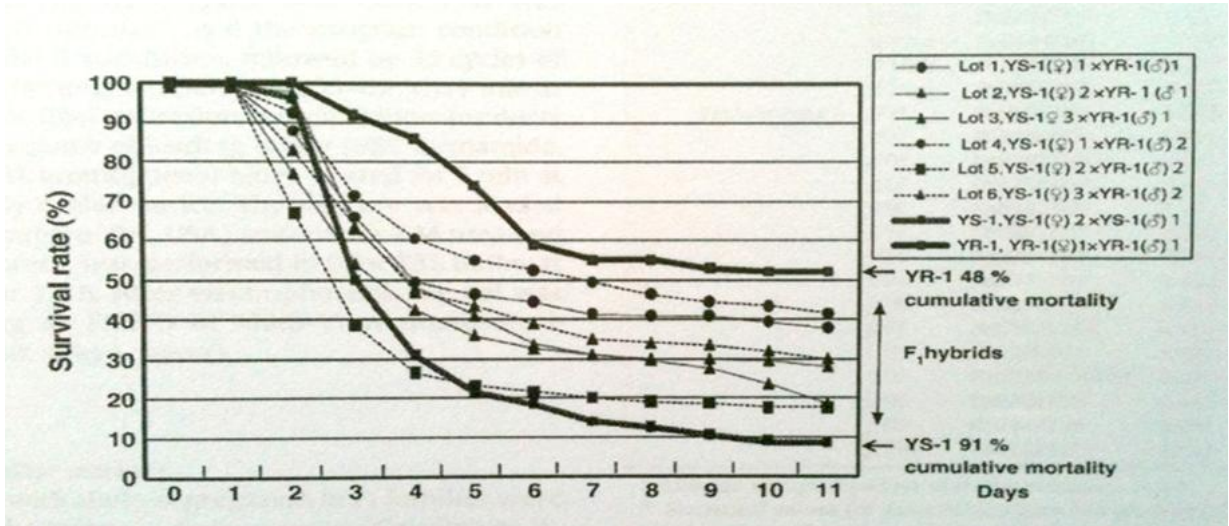
คือ

วิธีแช่ (dipping) และวิธีฉีด (injection) โดยใช้ปลาอายุ 6 เดือน ความยาวเฉลี่ย 15 ซม.

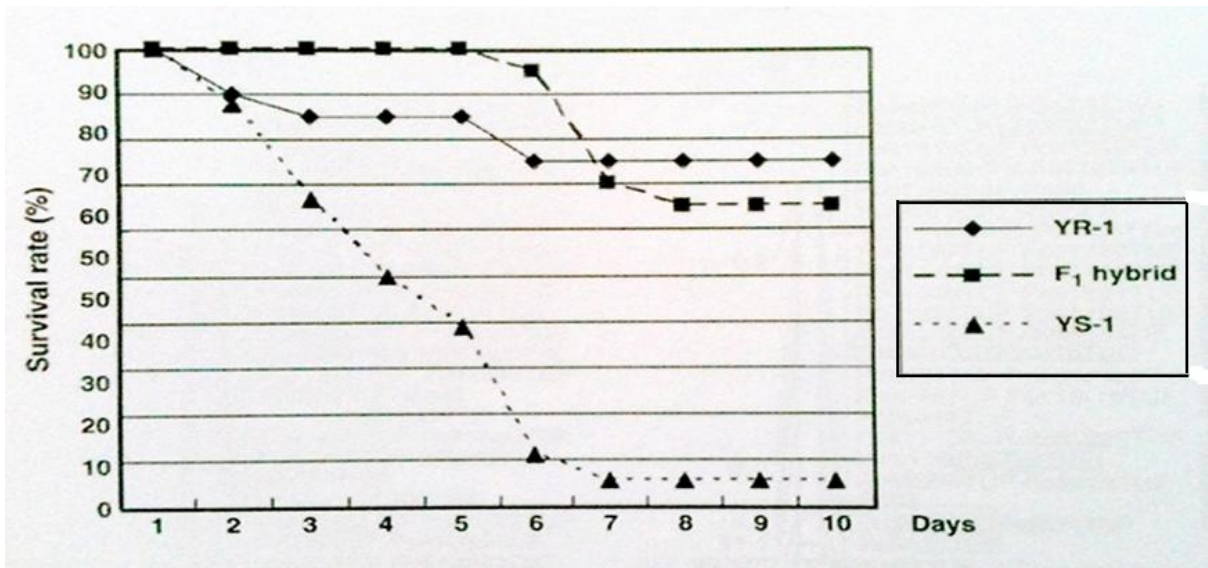
- วิธีแช่ โดยแช่ลงในสารละลายเชื้อที่ความเข้มข้น 2.0×10^6 colony-forming unit (CFU) /ml เป็นเวลานาน 1 ชม.
- วิธีฉีด โดยฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal) ในอัตราเชื้อเข้มข้น 5.0×10^3 CFU/ml ทำการทดลองที่อุณหภูมิ 25 °C และวัดอัตราการตายภายในระยะเวลา 11 วัน สำหรับวิธีแช่และ 10 วัน สำหรับวิธีฉีด ทำการยืนยันการตายว่าเป็นผลเนื่องมาจากเชื้อ *S. iniae* โดยเก็บเชื้อแบคทีเรียจากไตของปลาที่ตายแล้วไปวิเคราะห์ชนิด

ผลการทำ challenge test แสดงตามภาพที่ 3 และ 4 โดยพบว่า อัตราการตายสะสม (cumulative mortalities) ของปลา YR-1 และ YS-1 มีค่า 48 และ 91% ตามลำดับ ส่วนปลาลูกผสมทั้ง 6

cross (Lots 1-6) มีค่า 62, 72, 81, 58, 82 และ 70% ตามลำดับ อัตราการตายของปลาลูกผสมรุ่นที่ 1 นั้นมีค่าอยู่ระหว่างปลาสายพันธุ์ homogametic YR-1 และ YS-1 และผลการฉีดเชื้อเข้าช่องท้อง ปลา YR-1 YS-1 และปลาลูกผสมรุ่นที่ 1 (Lots 1) มีค่า cumulative mortalities ที่ 25% 95% และ 35% ตามลำดับ



ภาพที่ 3 อัตราการตายสะสม (cumulative mortality) ของปลา Japanese flounder สายพันธุ์ YR-1, YS-1 และปลาลูกผสม Lot1-6 จากการทำ challenge test ด้วยเชื้อ *S. iniae*



ภาพที่ 4 อัตราการตายของปลา Japanese flounder สายพันธุ์ YR-1, YS-1 และปลาลูกผสม Lot1-6 จากการทำ challenge test ด้วยเชื้อ *S. iniae*

ขั้นตอนต่อไปเป็นการวิเคราะห์ genotype ของปลาสายเทคนิคพันธุ์ YR-1, YS-1 และปลา ลูกผสม เพื่อจะวิเคราะห์หา markers ที่เกี่ยวข้องกับยีนต้านทานเชื้อโรค *S. iniae* ซึ่งจะนำไปสู่การคัดพันธุ์ แบบ marker assisted selection (MAS) ต่อไป รายละเอียดและผลการศึกษสามารถอ่านเพิ่มเติมได้ตาม เอกสารอ้างอิงดังต่อไปนี้

- Coimbra, M. R. M., K. Kobayashi, S. Koretsugu, O. Hasegawa, E. Ohara, A. Ozaki, T. Sakamoto, K. Naruse and N. Okamoto. 2003. A genetic linkage map of the Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture* 220: 203–218.
- Hill, B. J. 1982. IPN virus and its virulence. pp. 91–114 *In* Robert, R. J. (ed.) *Microbial Diseases of Fish*. Academic Press, London.
- Ozaki, A., H. Okamoto, T. Yamada, T. Matuyama, T. Sakai, K. Fuji, T. Sakamoto, N. Okamoto, K. Yoshida, K. Hatori, K. Araki and M. Okauchi. 2010. Linkage analysis of resistance to *Streptococcus iniae* infection in Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) *Aquaculture* 308: 562–567.
- Van Ooijen, J. W. 2004. MapQTL[®], software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Kyazma B.V. Wageningen, Natherlands.

ระบบสืบพันธุ์และเทคนิคการใช้ฮอร์โมนในการเพาะพันธุ์ปลา

1. พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ (maturation of the gonad)

1.1 พัฒนาการของไข่ (oogenesis)

พัฒนาการของไข่เกิดขึ้นในรังไข่ (ovary) เริ่มจากเซลล์เริ่มต้นคือ oogonia แบ่งเซลล์แบบ meiosis ไปเป็น oocyte ณ ปัจจุบัน ยังไม่ทราบว่ากลไกการควบคุมกระบวนการ oogenesis ว่าอยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนหรือไม่ oogenesis เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติภายในตัวปลาโดยไม่มีอิทธิพลจากปัจจัยภายนอกเข้ามาเกี่ยวข้อง Oogonia เป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่พบในรังไข่ปลาตลอดช่วงอายุ เป็นเซลล์ขนาดเล็กมากประกอบไปด้วยนิวเคลียสขนาดเล็กและ cytoplasm และเซลล์เยื่อหุ้มล้อมรอบหรือเรียกว่าฟอลลิเคิล (follicle) ที่มีชั้นเดียว เมื่อ oogonia พัฒนาไปเป็น primary oocyte เซลล์และนิวเคลียสจะมีขนาดใหญ่ขึ้น follicle ที่ล้อมรอบไข่จะสร้างผนังชั้นนอกขึ้นหนึ่งชั้นกลายเป็น 2 ชั้น ผนังชั้นนอกเรียกว่า theca และชั้นในเรียกว่า granulosa ซึ่งทั้งสองชั้นนี้จะมีบทบาทมากในพัฒนาการไข่ในขั้นต่อไป ผนังทั้ง 2 ชั้นจะมีการสร้าง ฮอร์โมนควบคุมพัฒนาการไข่ และจะสร้างฮอร์โมนแตกต่างกันไปตามผนังชั้นนอกและใน และตามระยะพัฒนาการของไข่ พัฒนาการไข่ แบ่งเป็นระยะต่างๆ ตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างนิวเคลียส cytoplasm และ follicle เป็น 6 ระยะคือ

1.1.1 ระยะ primary oocyte growth เป็นระยะที่ไม่ได้อยู่ในการควบคุมของฮอร์โมนโกรนาโดโทรปิน (gonadotropin) หรือใช้อักษรย่อว่า GtH ระยะนี้เซลล์ไข่จะขยายขนาดขึ้นจากเดิมหลายร้อยเท่า การเจริญของไข่ในระยะนี้จะเกิดจากปัจจัยภายในของไข่ (cytoplasm ขยายขึ้น) โดยไม่เกี่ยวข้องกับปัจจัยจากภายนอกเซลล์ เป็นระยะที่เรียกอีกชื่อหนึ่งว่า previtellogenic oocyte (vitellogenic = ไข่แดง) ระยะ primary oocyte growth จะเกิดขึ้นตลอดชีวิตของปลาที่มีการผสมพันธุ์วางไข่ทุกปี เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นกระจายทั่วทั้งรังไข่ มีข้อสังเกตคือ หากมีการตรวจพบเฉพาะไข่ระยะ previtellogenic oocyte ในปลาตัวใด แสดงว่าปลาตัวนั้นยังไม่อยู่ในวัยเจริญพันธุ์ (immature)

1.1.2 ระยะ yolk vesicle information เซลล์ไข่เกิด yolk vesicle ใน cytoplasm เมื่อย้อมสีไข่ตามกระบวนการ histology ในระยะนี้ จะเห็น yolk vesicle เป็นวงใสมีขนาดต่างๆ กันแทรกอยู่ใน cytoplasm ในช่วงต้นของระยะนี้จะเรียกว่า endogenous vitellogenesis เนื่องจากองค์ประกอบที่อยู่ใน yolk vesicle ไม่ใช่ไข่แดงแท้จริง และไม่ได้ออกมาจากสาร vitellogenin ระยะนี้จะอยู่ภายใต้การควบคุมของสิ่งแวดล้อมและฮอร์โมน โดยฮอร์โมน GtH I* จะมีบทบาทในการควบคุมให้ไข่เริ่มสร้าง yolk vesicle

*ฮอร์โมน GtH ในปลาแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ GtH I และ GtH II เป็นฮอร์โมนที่สร้างมาจากสมองส่วนไฮโปทาลามัสและต่อมใต้สมอง โดย GtH I และ II (เทียบได้กับฮอร์โมน Follicle Stimulation Hormone หรือ FSH และ Lutianizing Hormone หรือ LH ในมนุษย์ แต่มีโครงสร้างแตกต่างกัน) GtH I และ II จะมีบทบาทในพัฒนาการของไข่ระยะแรกและระยะปลายตามลำดับ

1.1.3 ระยะเวลา vitellogenesis (ระยะสะสมไข่แดง) เป็นระยะที่มีการสะสมไข่แดงซึ่งเป็นสาร vitellogenin (Vg) เป็นสารในกลุ่ม phospholipid สาร Vg ถูกสร้างที่ตับ* แล้วปลดปล่อยมาตามกระแสโลหิตแล้วไปสะสมเป็นไข่แดงที่แท้จริง กลายเป็น yolk globules อยู่ในเซลล์ไข่ โดยฮอร์โมน GtH I จะไปกระตุ้นให้ชั้น theca cell ของ follicle ผลิตฮอร์โมนกลุ่มสเตอรอยด์คือ testosterone (T)** แล้วจะถูกส่งไปยังชั้น granulosa จากนั้น GtH I จะไปกระตุ้นให้ granulosa เปลี่ยนเป็นฮอร์โมน T เป็น 17β -estradiol (E_2) ฮอร์โมน E_2 จะไปออกฤทธิ์ที่ตับโดยกระตุ้นให้ตับสร้างสาร Vg แล้วถูกส่งมาตามกระแสโลหิต จากนั้น GtH I จะไปกระตุ้นให้ไข่ดูดสาร Vg ไปสะสมในไข่ ไข่ที่อยู่ในระยะนี้จะขยายขนาดขึ้นจนมีขนาดใหญ่และรูปร่างเป็นทรงกลม นิวเคลียสมีตำแหน่งอยู่กึ่งกลางไข่และมีขนาดเล็กลงเมื่อเทียบกับขนาดไข่เมื่อย้อมสี Haematoxylin และ eosin ตามกระบวนการ histology จะสังเกตเห็น cytoplasm ของไข่ติดสีชมพูของสี eosin โดยปรกติแล้ว แม่ปลาที่เลี้ยงในบ่อดินถ้าเลี้ยงในสภาพแวดล้อมและให้อาหารที่มีโภชนาการเหมาะสม ไข่จะพัฒนาการจนมาหยุดอยู่ที่ระยะ vitellogenesis เพื่อคอยเวลาและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมหรือถูกฉีดยากระตุ้นด้วยฮอร์โมน เช่น GtH GnRH และ testosterone ไข่ก็จะพัฒนาต่อไป แต่หากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม คุณภาพอาหารไม่เพียงพอ ปลาอยู่ในสภาพหนาแน่น หรือเกิดความเครียด ไข่ในระยะนี้จะเริ่มสลายไปและถูกดูดซึมกลับสู่ร่างกาย

*มีข้อสังเกตคือ การศึกษาด้านระบบสืบพันธุ์จะมีการวัดดัชนีค่าหนึ่งคือ Hepatosomatic index หรือ HIS (ค่าสัดส่วนน้ำหนักตับเทียบกับน้ำหนักตัว) ทั้งนี้เนื่องจากก่อนระยะ vitellogenesis ตับจะสมบูรณ์มากเนื่องจากการสะสมไขมันไว้เพื่อสร้าง vitellogenin (เป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่มีการขุนแม่พันธุ์ให้ไข่จะไข่ได้ดีอุณหภูมิต่ำที่มีไขมันสูง) ดังนั้นค่า HSI จึงเป็นอีกค่าหนึ่งที่ใช้พิจารณาความสมบูรณ์พันธุ์ของปลาเพศเมียได้

**ปลาเพศเมียในระยะนี้มีฮอร์โมน testosterone ในรังไข่สูงสุด ดังนั้นฮอร์โมน testosterone ที่หลายคนเข้าใจว่าเป็นฮอร์โมนเพศผู้จึงมีความสำคัญต่อพัฒนาการไข่ เพราะถ้าไม่มีหรือฮอร์โมน T บกพร่องไปจะมีผลให้ปลาเพศเมียไม่สามารถพัฒนาการไข่ต่อไปได้

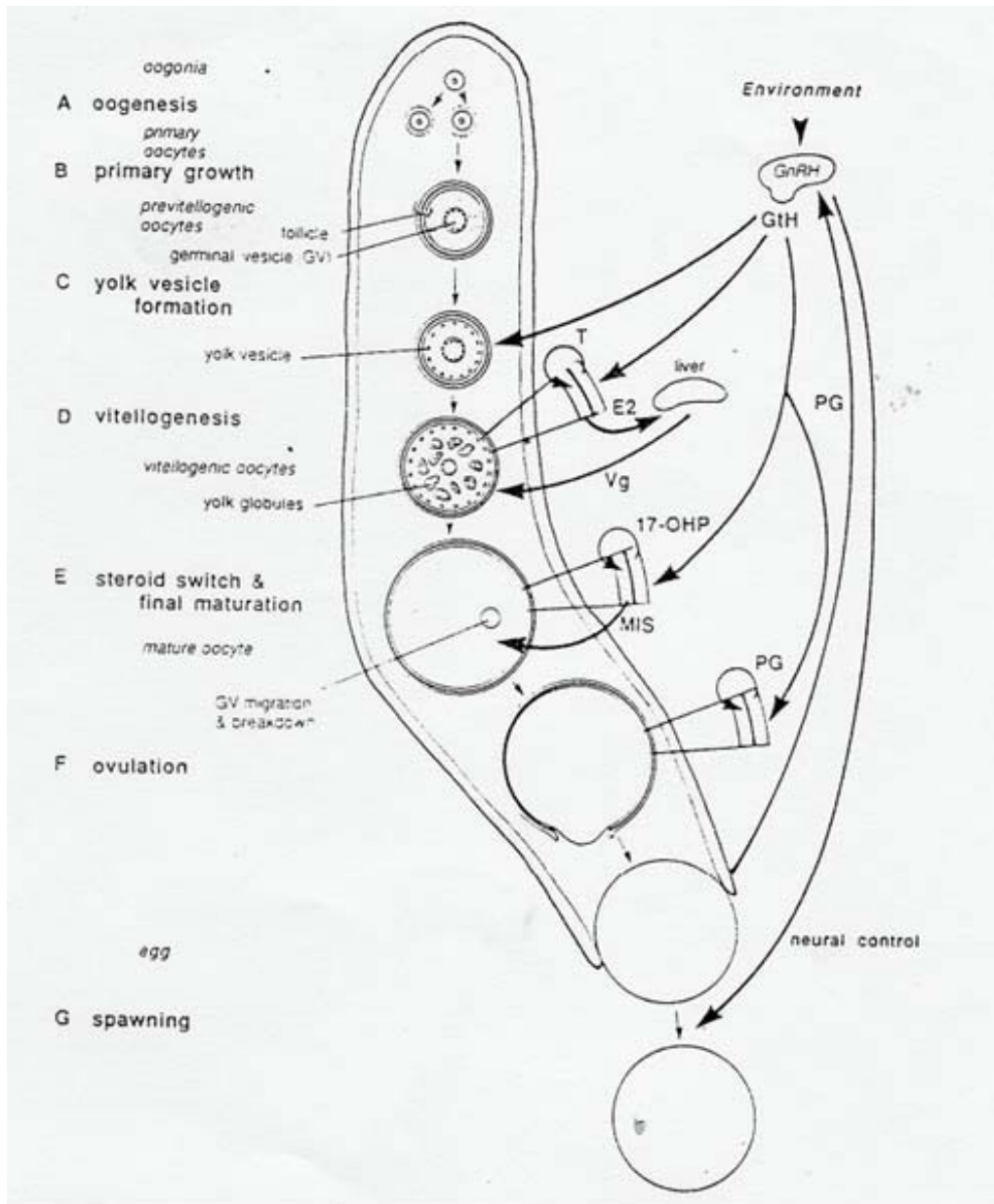
1.1.4 ระยะเวลา final maturation เป็นขบวนการพัฒนาไข่ที่จะเกิดขึ้นเมื่อสิ่งแวดล้อมเหมาะสม ในปลาแถบเขตร้อนในประเทศไทย กระบวนการนี้จะใช้ระยะเวลาสั้นๆ ประมาณไม่ถึง 4-24 ชั่วโมง ในขณะที่ปลาเขตหนาวบางชนิดอาจใช้เวลา 7 วันจนถึง 1 เดือน กระบวนการ final maturation นั้น การแบ่งเซลล์ meiosis ที่หยุดชะงักจะดำเนินการต่อไป นิวเคลียสของไข่จะเริ่มเคลื่อนที่ไปสู่ผนังไข่ด้าน animal pole หรือเรียกว่า Germinal Vesicle Migration (GVM) และต่อมานิวเคลียสจะแตกออก หรือเรียกว่า Germinal Vesicle Breakdown (GVBD) ซึ่งไข่ในระยะนี้เป็นไข่ที่สมบูรณ์ที่สุด การแบ่งเซลล์ meiosis จะสิ้นสุดและไข่จะหลุดออกจาก follicle หรือเกิดการตกไข่ (ovulation) กลายเป็นไข่ (egg) ที่พร้อมปฏิสนธิกับสเปิร์ม พัฒนาการของไข่ในระยะนี้ถูกควบคุมโดยฮอร์โมน GtH II (ในช่วงนี้จะตรวจพบ GtH II ในกระแสโลหิตมากกว่า GtH I) GtH II จะไปกระตุ้นให้ follicle สร้างฮอร์โมน maturation-inducing steroid (MIS) แทนการสร้างฮอร์โมน E_2 MIS ในปลาแทบทุกชนิดจะอยู่ในรูป progesterone ที่เรียกว่า $17\alpha,20\beta$ -dihydroxy-4-pregnen-3-one ($17,20P$) กระบวนการนี้เริ่มโดยฮอร์โมน GtH II ไปกระตุ้นให้ชั้น theca สร้าง 17α -progesterone ($17P$) แล้วถูกส่งไปที่ชั้น granulosa เปลี่ยนรูปเป็น $17,20P$

1.1.5 ระยะ ovulation (ตกไข่) เป็นระยะที่ไข่หลุดออกจาก follicle เข้าไปสู่ ovarian lumen และพร้อมที่จะถูกปลดปล่อยลงในน้ำเพื่อปฏิสนธิกับสเปิร์ม ในปลาส่วนใหญ่ ระยะนี้จะถูกควบคุมด้วยฮอร์โมน prostraglandin และต้องการ GtH II ปริมาณมาก โดย GtH II ในกระแสโลหิตจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงปลายระยะ vitellogenesis และเพิ่มขึ้นอีกในช่วงระยะ final maturation และ ovulation จนขึ้นถึงระดับสูงสุด (peak) เมื่อการผสมพันธุ์วางไข่ (spawning) สิ้นสุด

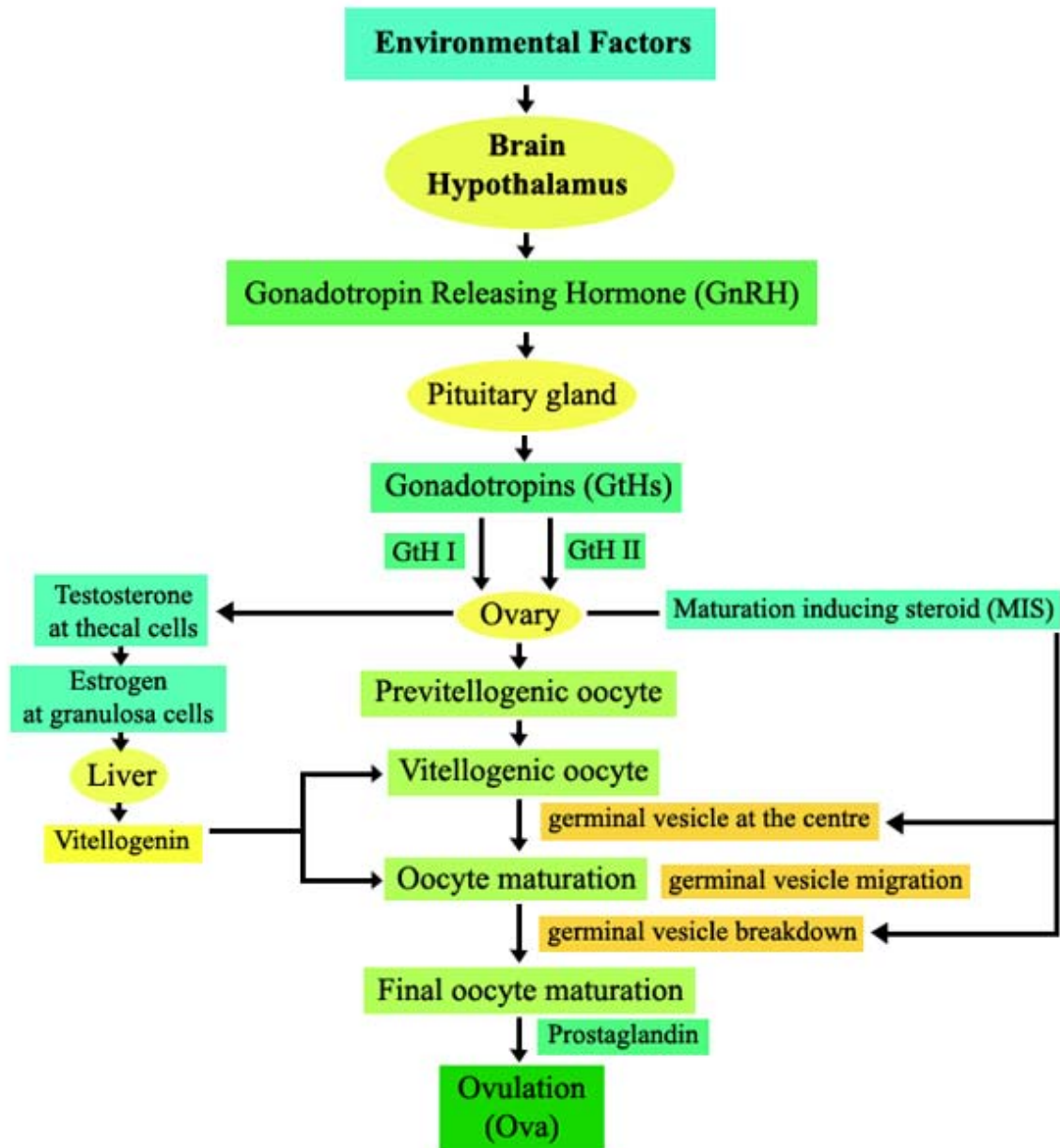
ข้อพึงสังเกตเกี่ยวกับพัฒนาการไข่ ปลาในกลุ่มที่ผสมพันธุ์วางไข่ครั้งเดียวในรอบปี (group synchronous) จะมีไข่ในระยะ previtellogenic oocyte มากหรือน้อยกว่าปลาที่วางไข่หลายครั้งในรอบปี (asynchronous) ซึ่งปลาในกลุ่มนี้จะมีไข่ทุกระยะพัฒนาการในปริมาณเท่าเทียมกัน ในปลาไข่จะพัฒนาการจนถึงระยะ vitellogenesis แล้วจะคอยจนมีเงื่อนไขที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิเปลี่ยนแปลง มีวัสดุสำหรับผสมพันธุ์วางไข่เช่นไข่ไม่ น้ำสำหรับให้ไข่ติด และการพบปลาเพศผู้ที่พร้อมผสมพันธุ์ เงื่อนไขเหล่านี้จะส่งผลให้ฮอร์โมน GtH II มีปริมาณเพิ่มขึ้นสูงสุด พร้อมกับไข่จะพัฒนาไปสู่ระยะ final maturation ระยะ ovulation และเกิดการผสมพันธุ์วางไข่ (spawning) กระบวนการทั้งหมดนี้จะใช้เวลาภายใน 24 ชั่วโมง ส่วนในปลาซัลมอนจะแตกต่างไปจากปลาใน โดยไข่จะเข้าสู่ระยะ final maturation และระยะ ovulation ก่อนจะมีเงื่อนไขหรือสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม

1.1.6 ระยะ regression และ atresia (ไข่ฝ่อ) regression ของไข่เป็นกระบวนการที่ไข่ส่วนที่เหลือหลังการ spawning ถูกดูดซึมกลับ (reabsorb) เข้าสู่ร่างกาย กระบวนการนี้ยังเกิดขึ้นในกรณีที่ปลาไม่ไข่แต่มีสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมทำให้ไข่ไม่เข้าสู่ระยะ final maturation และ spawning ส่วน atresia เป็นกระบวนการดูดซึมไข่บางเซลล์ในทุกๆ ระยะพัฒนาการกลับคืนสู่ร่างกายโดย granulosa cell phagocytosis ซึ่งมีสาเหตุมาจากสภาพการเลี้ยงที่ไม่เหมาะสม หรือแม่ปลาที่มีไข่ระยะ final maturation เกิดความเครียดขณะถูกจับ ปัจจุบันยังไม่ทราบว่าฮอร์โมนมาควบคุมกระบวนการ regression และ atresia หรือไม่

พัฒนาการของไข่และฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องสรุปได้ดังภาพที่ 1 และ 2 ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 1 พัฒนาการของไข่ภายในรังไข่



ภาพที่ 2 พัฒนาการไข่และฮอร์โมนที่เกี่ยวข้อง

1.2 พัฒนาการของสเปิร์ม

กระบวนการพัฒนาสเปิร์มเกิดขึ้นในอัณฑะ (testis) อัณฑะของปลา มีลักษณะคล้ายถุงพับซ้อนกัน โครงสร้างภายในประกอบไปด้วยเซลล์สืบพันธุ์ (germinal layer) ที่มีเซลล์สเปิร์ม (spermatogenic cells หรือ spermatocytes) พัฒนาการของสเปิร์มแบ่งเป็น 4 ระยะ คือ

1.2.1 spermatogenesis เป็นกระบวนการที่เซลล์เริ่มต้นคือ spermatogonia ซึ่งถูกล้อมรอบด้วยเซลล์ sertoli พัฒนาไปเป็น spermatocyte

1.2.2 spermiogenesis เป็นกระบวนการที่ spermatocyte พัฒนาไปเป็น สเปิร์มอย่างสมบูรณ์ (mature spermatozoa หรือ sperm cells)

1.2.3 spermiation เป็นกระบวนการที่ spermatiozoa ถูกปลดปล่อยออกจาก เซลล์ sertoli เข้าไปอยู่ใน lumen ของอัณฑะ

1.2.4 sperm hydration เป็นพัฒนาการระยะสุดท้าย spermatozoa จะถูกเจือจางด้วยน้ำหล่อเลี้ยงสเปิร์ม (seminal fluid) ที่ผลิตมาจากท่อน้ำเชื้อ (sperm duct) มีผลทำให้สเปิร์มระยะนี้มีสภาพเป็นน้ำเชื้อ (milt หรือ semen) ที่พร้อมจะปฏิสนธิกับไข่

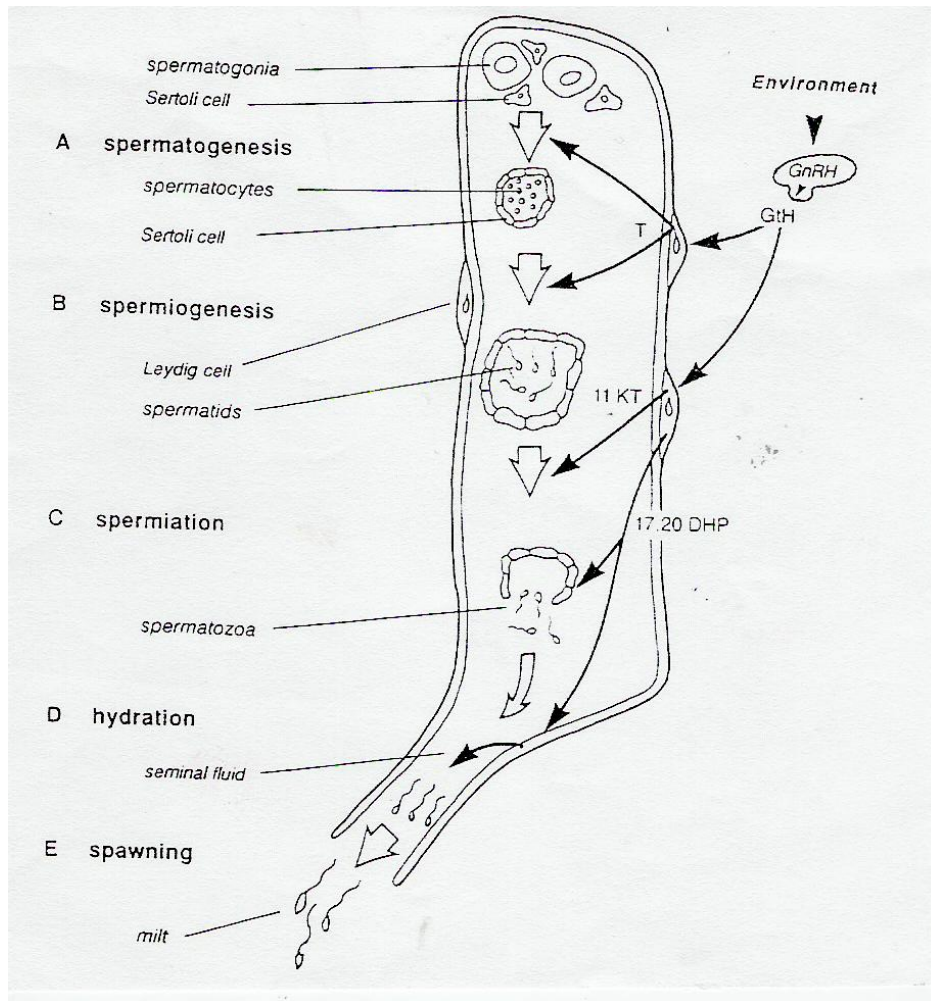
ในปลาเพศผู้หลายชนิดๆ นั้น สเปิร์มสามารถมีพัฒนาการได้แม้จะถูกเลี้ยงในที่กักขัง และปลาเพศผู้ในธรรมชาติจะมีสเปิร์มในระยะสุดท้ายในระยะเวลายาวนานกว่าปลาเพศเมียที่มีไข่แก่ สเปิร์มระยะสุดท้ายสามารถถูกเก็บไว้ในอัณฑะได้เป็นระยะเวลานานหลายๆ สัปดาห์ในช่วงฤดูผสมพันธุ์วางไข่ และในปลาหลายๆ ชนิด สเปิร์มระยะ spermiation ใช้เวลาพัฒนาเข้าสู่ระยะ sperm hydration เพียงช่วงเวลาสั้นๆ ก่อนการ spawning ในขณะที่ปลาเพศเมียนั้นการพัฒนาการไข่ในระยะ final maturation จะใช้ระยะเวลาที่ยาวนานกว่า

ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการของสเปิร์ม คือ GtH ไปกระตุ้นให้ leydig cells ในอัณฑะสร้างฮอร์โมน testosterone (T) และ T จะส่งผลให้ spermatogonia ที่ถูกล้อมรอบด้วย sertoli cells แบ่งเซลล์แบบ meiosis เป็น spermatocyte แต่ GtH ไม่มีผลต่อกระบวนการ spermatogenesis (spermatocyte พัฒนาเป็น spermatid)

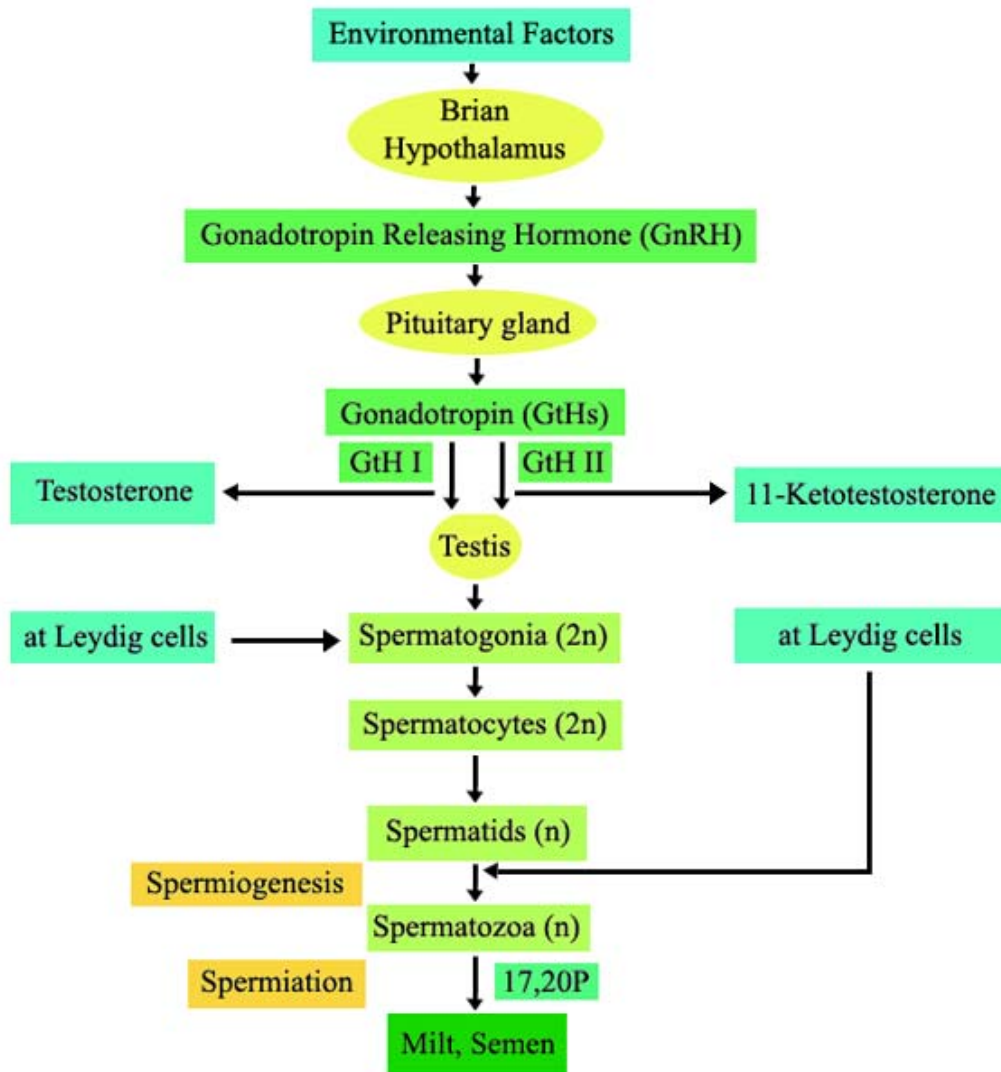
กระบวนการ spermiation เริ่มขึ้นจากการกระตุ้นด้วยฮอร์โมน 11-ketotestosterone (11KT) ที่สร้างจาก leydig cells โดยการควบคุมของ GtH จากนั้นฮอร์โมน 17,20P ที่สร้างมาจาก leydig cells เช่นเดียวกัน จะไปกระตุ้นให้มีการสร้าง seminal fluid ใน sperm duct และมีบทบาทเร่งกระบวนการ spermiation ปลาเพศผู้ที่มีสเปิร์มอยู่ในระยะ spermiation จะเป็นดัชนีชี้ว่าเป็นปลาที่พร้อมผสมพันธุ์ (ripe) กระบวนการ spermiation และ sperm hydration จะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการผสมพันธุ์วางไข่ และมักจะเกิดขึ้นพร้อมๆ กับปลาเพศเมียมีไข่ระยะ final maturation

ในกรณีที่สิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสมจนปลาเพศผู้มีน้ำเชื้อพัฒนาการไม่ถึงระยะสุดท้าย การใช้วิธีควบคุมสภาพแวดล้อม หรือการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมน มักจะทำให้สเปิร์มเข้าสู่ระยะ spermiation ได้ ฮอร์โมนที่ฉีดกระตุ้นมักจะใช้ในปริมาณต่ำกว่าที่ใช้ในปลาเพศเมีย และสามารถกระตุ้นให้สเปิร์มเข้าสู่ระยะ spermiation ได้หลายๆ ครั้ง ในปลาหลายๆ ชนิด

พัฒนาการสเปิร์มและฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องสรุปได้ดังภาพที่ 3 และ 4 ดังต่อไปนี้



ภาพที่ 3 พัฒนาการของสเปิร์มภายในอวัยวะ



ภาพที่ 2 พัฒนาการสเปิร์มและฮอร์โมนที่เกี่ยวข้อง

2. ฮอร์โมน Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH)

GnRH ถูกสร้างจากสมองส่วน nucleus lateralis tuberlis มีหน้าที่ส่งเสริมการสร้างฮอร์โมน gonadotropins (GtHs) GnRH เทียบเคียงได้กับ Lutanizing Hormone Releasing Hormon (LHRH) ในแง่ LHRH คือ GnRH ชนิดที่กระตุ้นให้สร้างเฉพาะ Lutanizing hormone (LH) อย่างไรก็ตาม GtHs ของปลาไม่ใช่ LH แต่จะเรียกว่า LH-like GnRH เป็นชื่อโดยทั่วไป (generic term) ถ้าจะเป็นการเฉพาะเจาะจงลงไปจะต้องใช้บอกแหล่งที่มา เช่น mammalian GnRH (จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม) avian GnRH (จากสัตว์ปีก) fish GnRH (จากปลา) เป็นต้น GnRH มีโครงสร้างประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 โมเลกุลต่อกัน GnRH จากสัตว์แต่ละกลุ่มจะมีกรดอะมิโนในบางตำแหน่งแตกต่างกันไปตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 โครงสร้าง GnRH ในสัตว์ชนิดต่างๆ

Species	กรดอะมิโน									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
ปลา Medaka	pGlu	His	Trp	Ser	Phe	Gly	Leu	Ser	Pro	GlyNH ₂
ปลา Seabream	pGlu	His	Trp	Ser	Try	Gly	Leu	Ser	Pro	GlyNH ₂
ปลา Herring	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Ser	Pro	GlyNH ₂
mammal	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Arg	Pro	GlyNH ₂
ปลา catfish	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Leu	Asn	Pro	GlyNH ₂
กบ frog	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Trp	Pro	GlyNH ₂
ไก่ chicken I	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Leu	Gln	Pro	GlyNH ₂
Guinea pig	pGlu	Tyr	Trp	Ser	Tyr	Gly	Val	Arg	Pro	GlyNH ₂
ปลา salmon	pGlu	His	Trp	Ser	Tyr	Gly	Trp	Leu	Pro	GlyNH ₂
ปลา dogfish	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Leu	Pro	GlyNH ₂
ไก่ chicken II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Gly	Trp	Tyr	Pro	GlyNH ₂
ปลา Lamprey I	pGlu	His	Trp	Ser	Leu	Gly	Trp	Lys	Pro	GlyNH ₂
ปลา Lamprey II	pGlu	His	Trp	Ser	His	Asp	Trp	Lys	Pro	GlyNH ₂

หมายเหตุ Arg=Arginine Asn=Asparagine Asp=Aspartic acid Glu=Glutamic acid Gly=Glycine His=Histidine Leu=Leucine
Phe=Phenylalanine Pro=Proline Ser=Serine Tyr=Tyrosine Val=Valine

ผลของ GnRH ที่มีต่อการหลั่ง GtH คือ GnRH ไปกระตุ้นให้มีปริมาณ GtH ในพลาสมา (น้ำเลือด) เพิ่มขึ้น ซึ่งผลมาจากเซลล์ที่สร้าง GtH คือ gonadotropic cells โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับ (receptors) ให้กับ gonadotropic cells ในปลา นั้น การให้ GnRH อย่างต่อเนื่องไม่สามารถหยุดระบบ GtH โดยอัตโนมัติได้ เหมือนกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ระบบการยับยั้งการหลั่ง GtH คือสาร Dopamine ซึ่งเป็นสาร neurohormone ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับ norepinephrine และ epinephrine ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการหลั่ง GtH จากต่อมใต้สมอง (Gonadotropin release inhibitory factor, GRIF) ของปลาได้

3. การเพาะพันธุ์โดยฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนและการตรวจสอบความพร้อมผสมพันธุ์วางไข่ของพ่อแม่ปลา (Practical hormone-induced breeding and Judging readiness in male and female fish)

3.1 การตรวจสอบความพร้อมวางไข่ของแม่ปลา

การเพาะพันธุ์โดยวิธีกระตุ้นด้วยฮอร์โมนอย่างมีประสิทธิภาพนั้น จะต้องตรวจสอบพัฒนาการเซลล์สืบพันธุ์ (maturity) ของปลา เพื่อให้ฮอร์โมนกระตุ้นให้ไข่เข้าสู่ระยะ final maturation จนถึงระยะ ovulation และเกิด spawning ต้องอาศัยข้อมูลที่ถูกต้องแม่นยำเกี่ยวกับระยะพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งจะนำไปสู่การใช้ฮอร์โมนได้อย่างถูกชนิดและในปริมาณน้อยที่สุดที่เกิดประสิทธิผลสูงสุด และฉีดกระตุ้นจำนวนน้อยที่สุด การตรวจสอบความพร้อมวางไข่ของปลาเพศเมียมี 2 เกณฑ์ คือ

3.1.1 ลักษณะภายนอก เช่นลักษณะช่วงท้องและติ่งเพศ วิธีการนี้เป็นวิธีที่ง่ายและรวดเร็ว ในปลาส่วนใหญ่ที่พร้อมวางไข่นั้น ไข่จะขยายขนาดและโครงสร้าง follicle จะหลวม (เพราะไข่ส่วนใหญ่หลุดออกมาจาก follicle) เกณฑ์ที่มักจะใช้สังเกตสำหรับปลาที่พร้อมวางไข่คือ ช่วงท้องขยายใหญ่และนิ่ม ติ่งเพศ (genital papilla) บวม การสังเกตลักษณะภายนอกมีข้อดีคือ

ทำให้ปลาเกิดความเครียดน้อยที่สุด แต่มีจุดด้อยคือต้องอาศัยผู้เชี่ยวชาญมีประสบการณ์ ไม่ค่อยประสบความสำเร็จในปลาชนิดใหม่ที่ไม่เคยเพาะพันธุ์มาก่อน และเป็นวิธีที่ไม่สามารถนำไปอ้างอิงทางวิชาการได้

3.1.2 การเก็บตัวอย่างไข่จากรังไข่ (gonadal biopsy) ทำโดยสอดท่อเข้าไปในรังไข่แล้วดูดไข่ออกมาหรือผ่าตัดบริเวณช่องท้องแล้วตัดชิ้นส่วนรังไข่ออกมา นำไข่ไปวัดเส้นผ่าศูนย์กลางไข่ การกระจายของไข่ขนาดต่างๆ รูปร่างไข่ และตำแหน่งนิวเคลียส เป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยาก แต่ข้อดีคือเป็นเกณฑ์มาตรฐานที่เชื่อถือได้ และเป็นวิชาการ เกณฑ์สำหรับใช้ตรวจสอบปลาที่พร้อมวางไข่คือ ถ้าไข่ส่วนใหญ่ยังมีนิวเคลียสอยู่กึ่งกลางไข่ มีไข่จำนวน 1 ใน 3 ที่นิวเคลียสเริ่มเคลื่อนที่ (migrating nuclei) และไข่ส่วนน้อยมีนิวเคลียสเคลื่อนไปติดผนังไข่และอยู่ในระยะ GVBD

ในช่วงที่ปลาตกไข่ระยะปลาย สัดส่วนของไข่ในระยะสุดท้ายจะเพิ่มขึ้นเป็น 50% ต่อไปจากระยะนี้ ไข่ในทุกระยะพัฒนาจะเริ่มขยายขนาดและเริ่มเข้าสู่กระบวนการดูดซึมน้ำกลับ (artetic) ถ้าหากว่าไม่ถูกกระตุ้นต่อให้เกิด ovulation และ spawning โดยทั่วไปปลาจะสร้างไข่ที่พร้อมปฏิสนธิ (viable eggs) หากหากมีการฉีดฮอร์โมนกระตุ้นในช่วงต้นและช่วงกลางของการพัฒนาไข่

การวัดเส้นผ่าศูนย์กลางและการกระจายขนาดของไข่ มีข้อดีคือวัดได้ง่าย เป็นเกณฑ์ชี้วัดความพร้อมวางไข่ในปลาหลายๆ ชนิด โดยนำไข่ไปแช่ในสารละลาย 5% phosphate-buffer formalin เพื่อให้ส่วนไข่โตพลาสซึมของไข่ใส แล้วนำไปวัดเส้นผ่าศูนย์กลางภายใต้กล้อง stereo microscope หรือใช้เวอร์เนียรฯ วัดโดยตรง การใช้เส้นผ่าศูนย์กลางไข่เป็นข้อมูลสำหรับกระตุ้นการตกไข่มีรายงานประสบความสำเร็จในปลาหลายๆ ชนิด ข้อมูลการกระจายของไข่ขนาดต่างๆ มีส่วนสำคัญในการเพาะพันธุ์ปลาบางชนิดเช่นปลานวลจันทร์ทะเล (milk fish) ซึ่งไข่จะมีเส้นผ่าศูนย์กลางเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยหลังสิ้นสุดระยะ vitellogenesis

การตรวจสอบรูปร่างไข่ (egg morphology) เช่น การตรวจสอบตำแหน่งนิวเคลียส นับจำนวนและขนาดของ yolk droplets เพื่อประเมินความพร้อมวางไข่ของปลา และการนับไข่ระยะต่างๆ เพื่อประเมินพัฒนาการโดยรวมของไข่ ต้องทำให้ cytoplasm ของไข่ใสเพื่อให้มองเห็นตำแหน่งนิวเคลียสได้อย่างชัดเจน สารละลายที่ใช้แช่ไข่เพื่อทำให้ cytoplasm ใสมีอยู่ 2 สูตรคือ

(1) Davidson fixation ประกอบด้วย 95% ethanol 30 มล. Formalin 20 มล. acetic acid 10 มล. และน้ำกลั่น 10 มล.

(2) Serra's fluid ประกอบด้วย ethanol:formalin:acetic acid = 4:4:2

น้ำยาทั้งสองสูตรนี้สามารถใช้ได้กับไข่สดและไข่ที่แช่ในน้ำยาฟอร์มาลินเข้มข้น 1% นานไม่เกิน 1 เดือน เมื่อนำไข่แช่ในน้ำยาจะมีผลทำให้ cytoplasm ใสในช่วงเวลาสั้นๆ ประมาณ 1-2 นาที หลังจากนั้นต้องเติมน้ำยาฯ ลงไปอีกเพื่อให้ cytoplasm ใสอยู่อีกประมาณ 4-5 นาที หลังจากนั้นสามารถเติมน้ำยาฯ ลงไปได้เรื่อยๆ

เกณฑ์การตรวจสอบตำแหน่งนิวเคลียสของไข่ แบ่งได้เป็น 4 ระยะ ตามระยะพัฒนาการไข่ คือ

- Central นิวเคลียสอยู่กึ่งกลางไข่
- Migrating นิวเคลียสเคลื่อนจากกึ่งกลางแต่ยังไม่ถึงขอบ (GVM)
- Peripheral นิวเคลียสเคลื่อนที่ไปติดขอบผนังไข่
- Absence นิวเคลียสสลายตัวหรือหายไป (GVBD) เป็นระยะที่ไข่พร้อมปฏิสนธิ

3.2 การตรวจสอบความพร้อมของฟอปลาที่จะผสมพันธุ์

ความพร้อมของฟอปลาที่จะผสมพันธุ์มักไม่ค่อยมีปัญหา เนื่องจากปลาเพศผู้ส่วนใหญ่สามารถสร้างน้ำเชื้อแม้จะถูกเลี้ยงในที่กักขัง นอกจากนี้ น้ำเชื้อยังสามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลา 2-3 วัน ในขณะที่การรักษาน้ำเชื้อมีความยุ่งยากกว่า ปลาเพศผู้ที่มีน้ำเชื้อสมบูรณ์สามารถดูจากลักษณะภายนอกดังต่อไปนี้

- ท้องนูน
- มีน้ำเชื้อไหลออกมาเมื่อรีดบริเวณท้อง
- แสดงลักษณะเพศขั้นที่สอง (secondary characteristics) อย่างเด่นชัด เช่น มีตุ่มซากที่แก้มและครีบในปลากลุ่ม cyprinids เป็นต้น

ปลาที่มีน้ำเชื้อสมบูรณ์ น้ำเชื้อจะเจือจางลง มีลักษณะไม่หนืดและไหลเหมือนน้ำ หากน้ำเชื้อมีเลือดปนแสดงว่าปลาตัวนั้นหมดน้ำเชื้อแล้ว

3.3 การใช้ฮอร์โมนกระตุ้นการผสมพันธุ์วางไข่

การใช้ฮอร์โมนแบ่งเป็น 3 วิธีคือ

3.3.1 วิธีฉีด (injection) ในรูปสารละลายฮอร์โมนในน้ำกลั่นหรือน้ำเกลือ

แบ่งเป็น 2 วิธีคือ

- ฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscularly, IM) เป็นวิธีฉีดที่ง่ายและอัตราฮอร์โมนที่ใช้จะเป็นมาตรฐานหากฉีดที่ตำแหน่งเดียวกันและที่ความลึกเข็มเท่ากัน ใช้ตัวทำละลายฮอร์โมนปริมาณน้อย (0.5-1.0 มล./กก.)
- ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneally, IP) การฉีดเข้าช่องท้องสามารถทำได้โดยแทงเข็มเข้าที่บริเวณช่องท้องหรือที่โคนครีบหูหรือครีบท้อง ข้อพึงระวังคือปลาต้องถูกวางยาสลบก่อนฉีด เพราะปลาจะต่อต้านฮอร์โมนที่ฉีดหากไม่วางยาสลบ การฉีดเข้าช่องท้องต้องอาศัยความชำนาญเพราะผู้ไม่ชำนาญอาจแทงเข็มทะลุเข้าไปในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ฮอร์โมนไม่ไปออกฤทธิ์ยังอวัยวะเป้าหมาย ข้อดีของวิธีนี้คือสามารถใช้ฮอร์โมนได้ในปริมาณสูง (2-3 มล./กก.) และฮอร์โมนไปออกฤทธิ์ที่อวัยวะสืบพันธุ์โดยตรง ในขณะที่การฉีดเข้ากล้ามเนื้อฮอร์โมนจะต้องเข้าไปในระบบโลหิตก่อนถึงอวัยวะเป้าหมาย มีผลให้ฮอร์โมนส่วนหนึ่งสูญเสียไป

3.3.2 วิธีฝัง (implantation) ในรูปฮอร์โมนอัดเม็ดในลักษณะทำให้ฮอร์โมนออกมาอย่างช้าๆ (slow-release) จากข้อจำกัดที่ว่าฮอร์โมนเมื่อฉีดเข้าในตัวปลา ฮอร์โมนจะเข้าไปในกระแสโลหิตภายในไม่กี่นาทีแล้วจะไปออกฤทธิ์ยังอวัยวะเป้าหมาย ส่วนหนึ่งจะถูกขับถ่ายออกไปจะมีเพียงฮอร์โมนส่วนหนึ่งที่ค้างอยู่ที่ถูกใช้ประโยชน์ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ดังนั้นจะเป็นประโยชน์ยิ่งขึ้น หากยาหรือฮอร์โมนสามารถคงอยู่ในตัวปลาได้นานเป็นสัปดาห์จนถึงเป็นเดือนได้โดยวิธีการฝัง

วิธีการที่จะทำให้ฮอร์โมนที่ถูกฝังออกฤทธิ์แบบเนิ่นนานมี 2 วิธี คือ

- บรรจุฮอร์โมนลงในหลอด silicone หรือ silastic เพื่อให้ฮอร์โมนแพร่ออกมาอย่างช้าๆ (slowly release)
- ผสมฮอร์โมนกับสาร binding materials ได้แก่ฮอร์โมนอัดเม็ดที่ผสมสาร cholesterol และ cellulose ผลจากการสลายตัวอย่างช้าๆ (slowly

break down) ของสารทั้งสองชนิดข้างต้นจะทำให้ฮอร์โมนค่อยๆ ถูกปล่อยออกมา

อัตราฮอร์โมนที่ใช้สำหรับฝังจะใช้ในอัตราสูงกว่าวิธีฉีด วิธีฝังในปลาส่วนใหญ่จะใช้สำหรับปลาที่ไข่ไม่เข้าสู่ระยะ final maturation ส่วนใหญ่ปลาที่ไข่เข้าสู่ระยะ final maturation จะใช้วิธีฉีด

3.3.3 วิธีให้กิน (dietary administration) ในรูปฮอร์โมนผสมอาหาร วิธีให้กินจะใช้กับปลาในกลุ่มไม่มีกระเพาะอาหารที่แท้จริง (agastric, stomachless) เช่นปลาในกลุ่ม cyprinids ปลากินพืชและปลาขนาดเล็ก วิธีการนี้มีข้อดีคือทำให้ปลาเกิดความเครียดน้อย

3.4 การใช้ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินกระตุ้นการวางไข่ (Using gonadotropin to induce breeding)

ฮอร์โมนโกนาโดโทรปินที่ใช้ฉีดกระตุ้นการวางไข่ในปลา เป็นโกนาโดโทรปินจากต่อมใต้สมองปลา (pituitary) การฉีดกระตุ้นด้วยวิธีนี้แบ่งเป็น

3.4.1 Hypophysation ฉีดต่อมใต้สมองบดละเอียด หรือ crude pituitary extracts (PG) ใช้ในกรณีที่ปลาที่จะเพาะมีปริมาณ GtH ไม่เพียงพอ วิธีการทั่วไปสำหรับปลาน้ำจืด ในปลาเทศเมียจะฉีด 1 ถึง 2 ครั้ง โดย 10% ของโดสที่ฉีดทั้งหมดจะไปกระตุ้นไข่เข้าสู่ระยะ GVM และเมื่อผ่านไป 6-12 ชม. ฮอร์โมนส่วนที่เหลือ 90% จะไปกระตุ้นไข่เข้าสู่ระยะ GVBD ovulation และ spawning ส่วนในปลาเทศผู้จะฉีดเพียงครั้งเดียวพร้อมกับปลาเทศเมียเข็มที่ 2 เพื่อกระตุ้นให้สเปิร์มเข้าสู่ระยะ sperm hydration วิธีนี้มีข้อเสียคือ ปลาที่ให้ต่อม (donor fish) จะต้องถูกฆ่า ปริมาณฮอร์โมนไม่เป็นมาตรฐานและไม่บริสุทธิ์เพราะใช้ต่อมใต้สมองทั้งอันมาบด (ไม่ได้สกัด GtH ออกมาใช้เพียงอย่างเดียว) และผลจากการฉีดยังไม่สามารถพยากรณ์ได้ว่าปลาจะตกไข่หรือไม่ ณ เวลาใด และมีรายงานว่าปลาบางชนิดสร้างระบบภูมิคุ้มกันต่อต้านต่อมใต้สมองที่ฉีดหลังจากฉีดหลายๆ ครั้ง

ต่อมใต้สมองสดควรเก็บจากปลาสมบูรณ์เพศโดยไม่จำกัดว่าจะเป็นเพศผู้หรือเมีย ปลาที่มีความสมบูรณ์เพศเท่าไรจะมีปริมาณ GtHs ในต่อมมากขึ้นเท่านั้น นำไปเก็บรักษาไว้ในอัลกอฮอล์หรือ สกัดน้ำมันออกโดยแช่ในอะซีโตนหลายๆ ครั้งภายในเวลา 24 ชั่วโมง นำไปตากให้แห้งที่อุณหภูมิห้องแล้วเก็บในหลอดปิดสนิทเก็บในที่มืด (แนะนำว่าควรใช้ต่อมสดจะมีประสิทธิภาพสูงสุด) ปัจจุบันมีต่อมใต้สมองสำเร็จรูปจำหน่ายทางการค้า เช่นต่อมใต้สมองบดแห้งของปลาไนและชลมน และเนื่องจาก GtHs เป็นโปรตีน ดังนั้นจึงอาจมีผลเฉพาะเจาะจงกับชนิดของปลา ยกเว้นต่อมๆ ปลาไน ซึ่งยอมรับกันว่าใช้ได้กับปลาทุกชนิด (universal donor)

3.4.2 GtH จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian GtH) GtH จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ใช้กันมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน Human chorionic gonadotropin (HCG) เป็น GtH ที่ผลิตจากรก (placenta) และสกัดได้จากปัสสาวะหญิงมีครรภ์ มีข้อดีคือ HCG มีความบริสุทธิ์สูง และสามารถเก็บรักษาได้นาน อย่างไรก็ตาม HCG มีโครงสร้างโมเลกุลแตกต่างจาก GtH ของปลา ดังนั้นจึงต้องใช้ในอัตราที่สูง mammalian GtH ใช้ได้ดีในปลาบางชนิด (ส่วนใหญ่เป็นปลาทะเล) ปลาบางชนิดไม่มีผลตอบสนองต่อ mammalian GtH นี้เลย มักจะใช้ร่วมกับต่อมใต้สมอง และภูมิคุ้มกันอาจมีผลต่อฮอร์โมนนี้เมื่อฉีดกระตุ้นหลายครั้งในปลาบางชนิด

3.4.3 ฮอร์โมน GnRH analogues GnRH (Gonadotropin releasing hormone) เป็นฮอร์โมนที่ไปกระตุ้นให้ต่อมใต้สมองหลั่งฮอร์โมน GtHs GnRH จึงเป็นฮอร์โมนอีกกลุ่มที่ใช้กันมากในการเพาะพันธุ์ปลา GnRH ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมถูกสกัดและทำให้บริสุทธิ์ (purified) ครั้งแรกเมื่อปี 1970 GnRH มีโครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยกรดอะมิโน 10 ชนิดต่อกันโดยมีหมู่ amine (NH₂) ต่อที่ตำแหน่งที่ 10 กรดอะมิโน 10 ชนิดที่พบในครั้งนั้นคือ Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂ (คำอธิบายคำย่อดูจากหมายเหตุของตารางที่ 1) เนื่องจาก GnRH มีโครงสร้างโมเลกุลที่ไม่ซับซ้อน ดังนั้นจึงง่ายต่อการสังเคราะห์ขึ้นมาและมีการดัดแปลงโดยเปลี่ยนกรดอะมิโนในบางตำแหน่ง เป็น GnRH analogues ที่มีฤทธิ์แรงขึ้นหรือมีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น ปัจจุบันสามารถสังเคราะห์ GnRH_a ได้มากกว่า 2,000 ชนิด GnRH_a ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในปลา มีอยู่ 2 ชนิด คือ

(1) เปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 10 จาก glycylamide (Gly-NH₂) เป็น ethylamide (NH-CH₂-CH₃) ซึ่งมีผลให้ GnRH_a ชนิดนี้มีประสิทธิภาพในการเกาะกับ receptor ของเซลล์ที่ผลิต GtH เพิ่มมากขึ้น

(2) เปลี่ยนกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 6 จากรูปแบบปกติคือ L-form เป็น D-form (เป็น mirror image ของ L-form) ซึ่งมีผลให้ GnRH_a ชนิดนี้มีประสิทธิภาพเหมือนกับแบบที่ 1 แล้วยังทนทานต่อการถูกย่อยด้วย enzyme

การกระตุ้นฯ โดยใช้ GnRH มีข้อดีคือ GnRH จะไปทำหน้าที่ในช่วงต้นของกระบวนการทางฮอร์โมนมีผลให้ปลาหลั่งฮอร์โมน GtH ที่เป็นของตัวมันเองออกมา GnRH ใช้ได้กับปลาทุกชนิดไม่มี species specific และเป็นฮอร์โมนที่ไม่ซับซ้อนและผลิตสังเคราะห์ได้ง่าย GnRH_a ส่วนใหญ่ผลิตออกมาในรูปผงแห้ง เมื่ออยู่ในรูปสารละลายจะสามารถเก็บไว้ได้นานหากเก็บแบบปลอดเชื้อ การละลายและเจือจาง GnRH_a ควรใช้น้ำกลั่นละลายเก็บแช่แข็งในรูปสารละลายเข้มข้น และต้องระมัดระวังในการใช้ (ใส่ถุงมือ) เพราะ GnRH_a มีผลกับมนุษย์เช่นเดียวกัน

3.5 กระบวนการยับยั้งการหลั่ง GtH ในปลา

การหลั่ง GtH ในปลากระดูกแข็ง (teleost) อยู่ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมน 2 ระบบ คือ 1) GnRH-stimulates และ 2) Dopamine-inhibits ซึ่งในการฉีดกระตุ้นปลานั้นจำเป็นต้องฉีดฮอร์โมน GnRH ในปริมาณมาก ซึ่งจะทำให้ระบบยับยั้งฮอร์โมนฯ คือระบบ Dopamine-inhibits เริ่มทำงาน ทำให้ระดับ GtH ลดลงจนพัฒนาการของไข่หยุดชะงัก ส่งผลให้การเพาะพันธุ์ปลาไม่ได้ผล ดังนั้นหากหยุดยั้งระบบที่ 2 ได้ จะทำให้พัฒนาการของไข่ดำเนินต่อไปจน spawning การยับยั้งการทำงานของ dopamine (ระบบที่ 2) สามารถทำได้โดย

3.5.1 ใช้ยาที่ไป block dopamine receptor ยาเหล่านี้ได้แก่ domperidone (motilium), pimozide, metoclopramide และ sulpiride เป็นต้น (domperidone เป็นยาที่มีราคาไม่แพงและมีประสิทธิภาพ และไม่ละลายน้ำแต่ละลายในตัวทำละลายอินทรีย์เช่น DMSO หรือ propylene glycol ยาชนิดนี้มีจำหน่ายโดยมีชื่อทางการค้าคือ motilium ส่วนยา metoclopramide เป็นยาที่มีราคาไม่แพงแต่ประสิทธิภาพจะต่ำกว่า domperidone เป็นยาที่ละลายน้ำได้ดี)

3.5.2 ใช้ยาที่ทำให้ dopamine ลดลงหรือหมดไป เช่น reserpine และ carbidopa

ปลาในกลุ่ม cyprinids มี dopamine effect ที่รุนแรงจึงจำเป็นต้องใช้ยาตามที่กล่าวมา และระบบการต่อต้านโดย dopamine มีมากหรือน้อยยังขึ้นกับระยะพัฒนาการอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาด้วย อัตรา GnRHa และ domperidone ที่ใช้ในปลาส่วนใหญ่จะฉีดเพียงเข็มเดียว ในอัตรา GnRHa 10–20 ug/kg ร่วมกับ domperidone 3–5 mg/kg ผสมฮอร์โมนและ domperidone ตามอัตราที่กำหนดไว้แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นเพื่อความสะดวกในการใช้งาน ฮอร์โมนชนิดอื่นๆ ที่ใช้กระตุ้นการผสมพันธุ์วางไข่ได้แก่ 17,20P และ 17P มีรายงานว่าใช้กระตุ้นการตกไข่ในปลาอุยักซ์ (Clarias gariepinus) ได้ผล แต่การใช้ฮอร์โมน 17P เพียงอย่างเดียวมักมีประสิทธิภาพต่ำ ต้องใช้ฮอร์โมน GtH ร่วมกับการใช้ domperidone

4. การวางแผนการทดลองทางด้านการฉีดกระตุ้นด้วยฮอร์โมนในปลา

ในกรณีที่เรามีปลาชนิดใหม่ที่ไม่เคยเพาะพันธุ์ด้วยวิธีใช้ฮอร์โมนกระตุ้นมาก่อน ควรจะต้องวางแผนการทดลองเพื่อหาชนิดและอัตราฮอร์โมนที่เหมาะสม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) หาชนิดฮอร์โมนที่เหมาะสม (most suitable hormone) และ 2) หาอัตราฮอร์โมนที่เหมาะสม (optimal dose) เกณฑ์มาตรฐานสำหรับการทดลองด้านนี้ ปลาทดลองจะต้องมีขนาด อายุ เท่าเทียมกัน และที่สำคัญคือต้องมีพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์อยู่ในระดับเดียวกัน ซึ่งได้แก่ การกระจายของไข่ขนาดต่างๆ ตำแหน่งนิวเคลียสของไข่ และคุณภาพน้ำเชื้อ (ปริมาณสเปิร์มที่เคลื่อนไหวหลังกระตุ้นด้วยน้ำจืด (ปลาน้ำจืด) หรือน้ำทะเล (ปลาทะเล)) จำนวนปลาที่ใช้ในการทดลองอย่างต่ำคือ 9 ตัวต่อหน่วยการทดลอง กระบวนการทดลองมีดังต่อไปนี้

การทดลองที่ 1 ชนิดฮอร์โมนที่เหมาะสม

แบ่งชุดการทดลองเป็น 5 กลุ่มคือ

- (1) กลุ่มควบคุม ใช้น้ำเกลือ (0.85–0.90% NaCl)
- (2) ต่อมใต้สมอง (hypophysation)
- (3) ฮอร์โมน GnRH(a)
- (4) สาร dopamine antagonist
- (5) ฮอร์โมน GnRH(a) + สาร dopamine antagonist

การทดลองที่ 2 เปรียบเทียบอัตราฮอร์โมนที่เหมาะสมที่ทดสอบแล้วจากการทดลองที่ 1

ยกตัวอย่างการวางแผนการทดลองหาอัตรา GnRH(a) และ dopamine antagonist ควรทำเป็นตารางแบบพบบันหมด (4x4) ตามตารางที่ 2 คือ

ตารางที่ 2 แบบแผนการทดลองเปรียบเทียบอัตราฮอร์โมนที่เหมาะสม

Dopamine antagonist (mg/kg)	GnRH(a) (ug/kg)			
	0	5	10	20
0	0+0	0+5	0+10	0+20
1	1+0	1+5	1+10	1+20
5	5+0	5+5	5+10	5+20
10	10+0	10+5	10+10	10+20

การทดลองที่ 3 ชนิดของของ GnRHa ชนิดต่างๆ ที่เหมาะสม

โดยให้อัตราของ dopamine antagonist คงที่ แล้วใช้ GnRHa ชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้

- (1) GnRH ชนิดที่ 1 + DA 1
- (2) GnRH ชนิดที่ 2 + DA 1
- (3) GnRH ชนิดที่ 3 + DA 1
- (4) GnRH ชนิดที่ 4 + DA 1
- (5) GnRH ชนิดที่ 5 + DA 1

การทดลองที่ 4 เปรียบเทียบประสิทธิภาพของ dopamine antagonist ชนิดต่างๆ ที่เหมาะสม

โดยให้อัตราฮอร์โมน GnRHa คงที่ แล้วใช้ dopamine antagonist ชนิดต่างๆ ดังต่อไปนี้

- (1) GnRH1+ DA ชนิดที่ 1
- (2) GnRH1+ DA ชนิดที่ 2
- (3) GnRH1+ DA ชนิดที่ 3
- (4) GnRH1+ DA ชนิดที่ 4
- (5) GnRH1+ DA ชนิดที่ 5

ข้อมูลพื้นฐาน บันทึกลง เพื่อนำไปวิเคราะห์ทางสถิติ คือ

- (1) Latency period (ช่วงเวลานับจากฉีดฮอร์โมนฯ จนปลาตกไข่) ใช้ ANOVA
- (2) Hormonal profile เช่นค่าความเข้มข้นฮอร์โมน GtH หรือ E₂ ในกระแสโลหิต ใช้ log transform และ ANOVA
- (3) จำนวน (สัดส่วน) ปลาที่วางไข่ ใช้สถิติแบบ non-parametric เช่น Fisher's exact test เป็นต้น
- (4) อัตราปฏิสนธิ ใช้ log transform non-parametric หรือ ANOVA
- (5) อัตราฟัก log transform non-parametric หรือ ANOVA
- (6) ต้นทุนการผลิต ระบุไว้เพื่อให้ผู้อ่านนำไปคำนวณความคุ้มค่าทางเศรษฐกิจ
- (7) อุดมภูมิตัว เป็นข้อมูลที่ต้องนำไปกำกับผลการทดลองทุกครั้ง เพื่อให้ผู้ที่มาอ่านบทวิจัยสามารถนำไปเปรียบเทียบหรือประยุกต์ใช้

หลักการทดลองที่มีการเพาะพันธุ์โดยวิธีผสมเทียม เพื่อให้การทดลองเป็นมาตรฐานจะต้อง

- (1) ใช้น้ำเชื้อรวม (pooled milt) จากปลาหลายๆ ตัวที่ทราบคุณภาพน้ำเชื้อ
- (2) ต้องทราบอัตราส่วนระหว่างน้ำเชื้อและไข่ และต้องใช้อัตราเดียวกันในทุกหน่วยการทดลอง
- (3) การผสมน้ำเชื้อและไข่ การล้าง และการฟัก จะต้องทำเหมือนกันน้ำที่ใช้ต้องปริมาณเท่ากันและในระยะเวลาเท่ากันในทุกหน่วยการทดลอง

ระบบสมดุลทางชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ในปัจจุบันสิ่งแวดล้อมมีความสำคัญต่อการเลี้ยงสัตว์น้ำ นักเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำควรมีความรู้ด้านสิ่งแวดล้อม การใช้พลังงาน และการแลกเปลี่ยนสารอาหารซึ่งกันและกัน ซึ่งเป็นวัฏจักรที่ดำเนินไปเป็นระบบภายใต้ความสมดุลของธรรมชาติ โดยมีองค์ประกอบสำคัญ 2 ส่วน คือ

1. องค์ประกอบที่ไม่มีชีวิต (Abiotic Components)
2. องค์ประกอบที่มีชีวิต (Biotic Components) ซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วน คือ

2.1 ผู้ผลิต (Producer) หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่สามารถสร้างอาหารได้เองโดยกระบวนการสังเคราะห์แสงจัดว่ามีความสำคัญมากเพราะเป็นส่วนที่เริ่มต้น เชื่อมต่อระหว่างส่วนประกอบที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต รวมทั้งพลังงานจากแสงอาทิตย์

2.2 ผู้บริโภค (Consumer) หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่ไม่สามารถสร้างอาหารเองได้

2.3 ผู้ย่อยสลาย (Decomposer) หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่สร้างอาหารเองไม่ได้ แต่ได้อาหารโดยการสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยสลายซากของสิ่งมีชีวิต ของเสีย กากอาหาร ให้เป็นสารที่มีโมเลกุลที่เล็กลงแล้วดูดซึมไปใช้บางส่วน ส่วนที่เหลือจะปล่อยออกสู่ระบบนิเวศน์

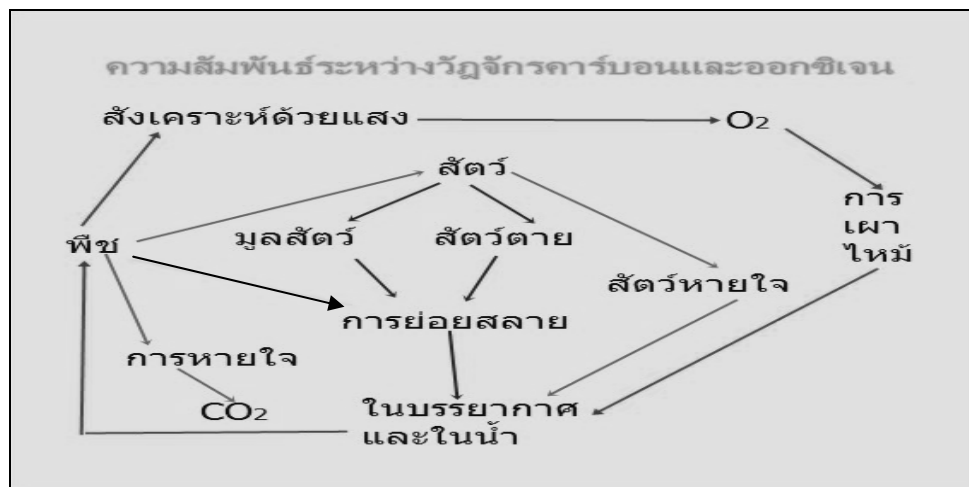
ในวัฏจักรพลังงานแสงอาทิตย์ส่องลงมาในน้ำเกิดผู้ผลิตขึ้นในบ่อ ได้แก่ พืชต่างๆ พืชหายใจโดยใช้ CO_2 และปล่อย O_2 ออกมา เมื่อพืชเหล่านั้นตายก็จะตกลงสู่พื้นบ่อ ผู้ย่อยสลายก็จะทำการย่อย ซึ่งจะมีการหายใจแล้วคาย CO_2

ผู้ย่อยสลายที่สำคัญ คือ แบคทีเรีย ซึ่งมี 2 พวก คือ

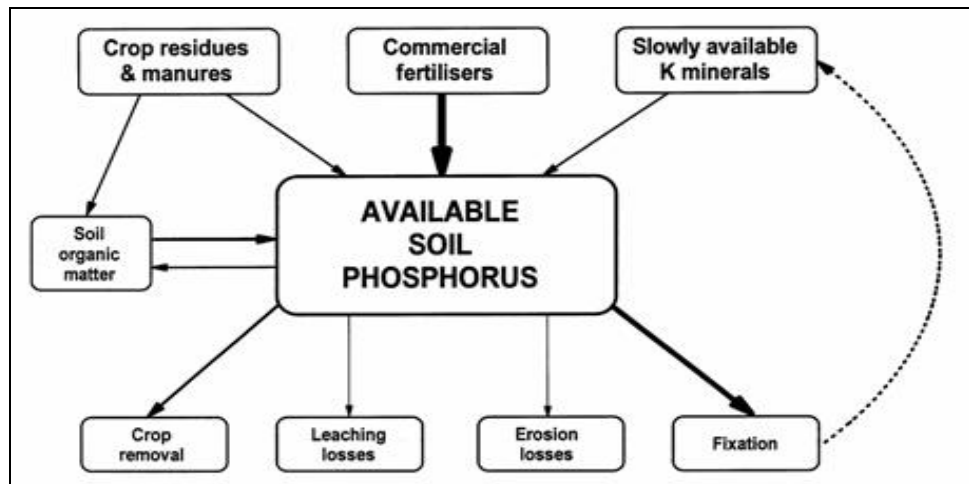
- 1) aerobic bacteria คือ แบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจน ทำให้เกิดแก๊สพิษกลายเป็นดี
- 2) anaerobic bacteria คือ แบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน

ในการเลี้ยงสัตว์น้ำ วัฏจักรที่มีผลกระทบต่อสัตว์น้ำ มี 5 วัฏจักร คือ

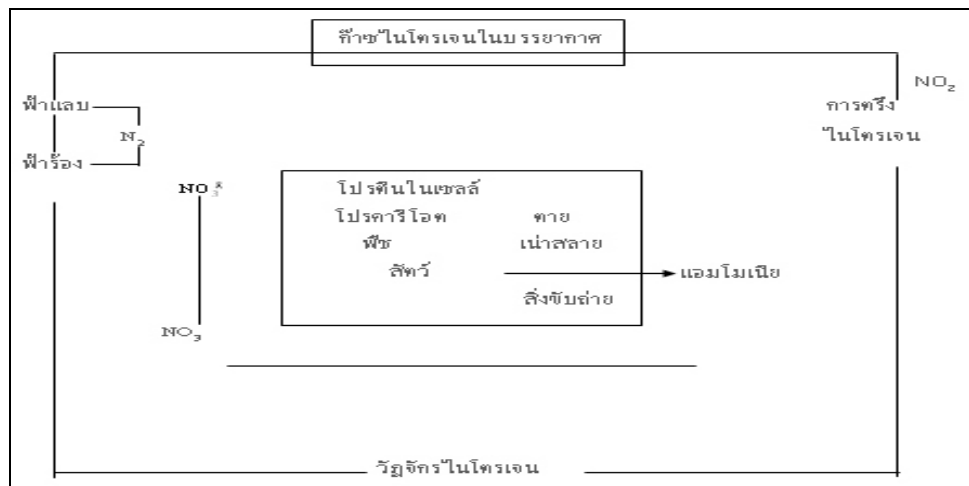
1. Carbon cycle



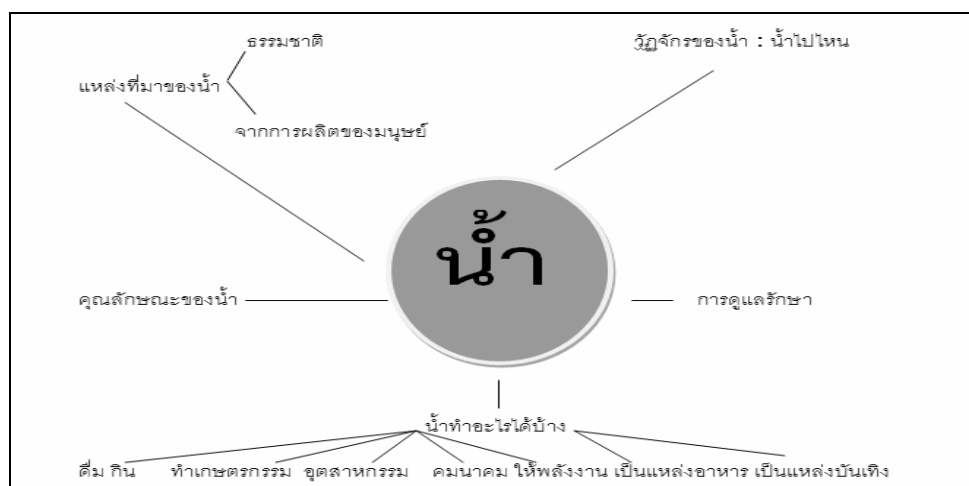
2. Phosphorus cycle



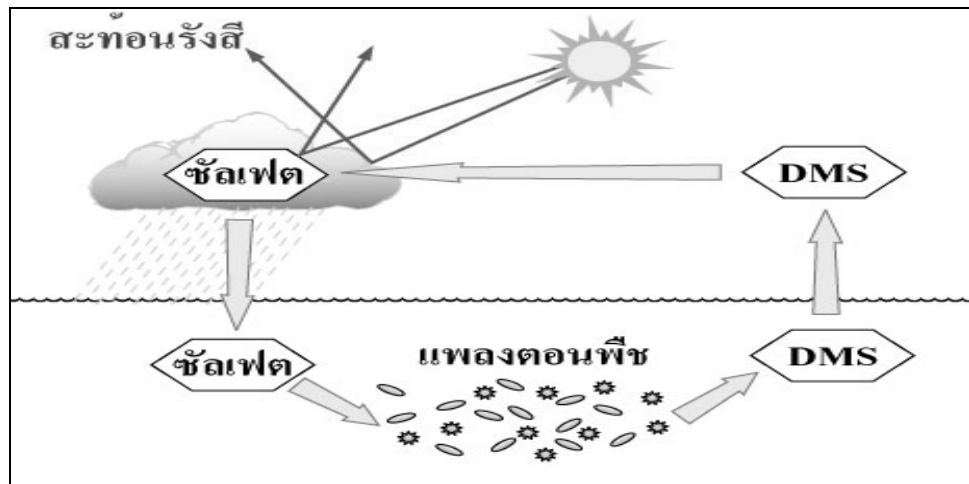
3. Nitrogen cycle



4. Water cycle



5. Sulfur cycle



โรงเพาะฟัก

- ระบบกรองน้ำทางชีวภาพ ในปัจจุบันการใช้วัสดุต่างๆ เช่นปะการัง ไบโอบอล และใยสังเคราะห์ได้เข้ามามีบทบาทสำคัญในการกรองน้ำแบบชีวภาพ เนื่องจากลักษณะรูพรุนเล็กของวัสดุดังกล่าวเป็นที่อยู่อาศัยของ aerobic bacteria ซึ่งจะเปลี่ยนแอมโมเนียในน้ำให้กลายเป็นไนไตรท์และไนโตรเจนตามลำดับ
- ในบ่อบำบัดน้ำเสีย เพื่อให้ น้ำดีขึ้น มีการอัดออกซิเจนลงไป เพื่อสร้างน้ำโคลนให้เกิดเป็นอนุภาคเล็กๆ ให้เป็นที่อยู่ของแบคทีเรีย เพื่อให้ aerobic bacteria มีที่เกาะทำงานและบำบัดน้ำได้สมบูรณ์

บ่อดิน

การหมุนเวียนของสารอินทรีย์ในระบบนิเวศน์ของบ่อดิน แบ่งออกเป็น ๒ ชั้น คือ

1. ชั้นน้ำ จะมีแบคทีเรียชนิดที่ใช้ออกซิเจนเพื่อย่อยสลายอินทรีย์สารต่างๆ
2. ชั้นดิน เป็นที่อยู่ของแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจน โดยโปรตีนมา่อยเกิดเป็นแอมโมเนีย และไฮโดรเจนซัลไฟด์

การกำจัดแอมโมเนียที่สะสมอยู่ในดินตะกอนบ่อดิน

- ตากบ่อให้แห้ง เพื่อให้พื้นดินบ่อสัมผัสกับอากาศ
- สนับสนุนให้เกิดกระบวนการกำจัดโดยแบคทีเรีย
- การสะสมของ NH_3 ให้เป็นไปอย่างต่อเนื่อง โดยการถ่ายเทน้ำอย่างสม่ำเสมอ เพื่อควบคุมปริมาณแพลงค์ตอนที่มีอยู่ไม่ให้มีมากเกินไป ไม่ควรใช้สารเคมีกำจัดแพลงค์ตอน แต่ควรใช้กระบวนการทางกายภาพกำจัด

ในประเทศไทยไม่ควรเลี้ยงสัตว์น้ำหนาแน่นเหมือนต่างประเทศ เพราะอุณหภูมิของน้ำในประเทศไทยสูงกว่าต่างประเทศ ในขณะที่อุณหภูมิสูงความเป็นพิษของแอมโมเนียจะยิ่งสูงขึ้น

พิษของน้ำที่มีผลต่อสัตว์น้ำ

pH 4.5	สัตว์น้ำตายทันทีในกรณีปลาทะเล แต่ปลาน้ำจืดจะทนทานได้ดีกว่า
pH 4.5-6.5	อัตราการอดน้อย โตช้า อัตราการกินอาหารต่ำ
pH 6.5-8.5	เจริญเติบโตได้ดี
pH 9.0	ให้ระวังความเป็นพิษของแอมโมเนีย

การตรวจหาค่าแอมโมเนียในน้ำ ให้ตรวจตอนกลางวัน ถ้า pH ของน้ำมากกว่า 6.5 ให้ตรวจหาค่าไฮโดรเจนซัลไฟด์ แต่ถ้าต้องการตรวจหาคาร์บอนไดออกไซด์ ให้ตรวจตอนเช้า

ข้อสังเกตของบ่อเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำที่ดี

- บ่อควรมีความลึกที่พอเหมาะ บ่อที่ลึกจะมีออกซิเจนน้อย
- ปริมาณแพลงก์ตอนในบ่อ บ่อที่มีแพลงก์ตอนมาก จะมีปริมาณออกซิเจนมาก
- น้ำที่ดีต้องมีสีโคลน เพราะโคลนจะเป็นที่อยู่ของแบคทีเรีย
- น้ำใสจะเลี้ยงกุ้งไม่รอด

เทคนิคในการพัฒนางานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำเพื่อขอกทุนวิจัย

ปัญหากับการแก้ปัญหา

การแก้ปัญหาต้องหาแนวทางที่ให้ผลดีที่สุด โดยใช้ความรู้ ความคิดสร้างสรรค์ และเป็นประโยชน์ต่อผู้มีส่วนเกี่ยวข้อง (stakeholders)

กระบวนการในการแก้ไขปัญหา

การแก้ไขปัญหาขึ้นกับระยะเวลา ความรุนแรงของปัญหา ผลกระทบที่เกิดขึ้น และกระบวนการแก้ปัญหา แบ่งได้เป็น 4 แบบ คือ

1. ปัญหาที่มีความจำเป็นเร่งด่วน เกิดผลกระทบรุนแรง แก้ไขปัญหาโดยใช้การตัดสินใจด้วยความรู้และประสบการณ์ โดยไม่ต้องทำการวิจัย ควรใช้วิธีการหาข้อมูล แล้วนำมาสรุป และตัดสินใจ
2. ปัญหาที่ไม่มีความจำเป็นเร่งด่วน ปัญหามีผลกระทบน้อย แต่ต้องใช้เวลาในการแก้ไขปัญหา แก้ไขปัญหาโดยการใช้เวลาในการค้นหาข้อเท็จจริงในบางส่วนจากตำรา
3. ปัญหาที่มีความรุนแรง และต้องอาศัยการตัดสินใจว่าควรแก้ปัญหาใดก่อน-หลัง แก้ไขปัญหาโดยการพิจารณาจากความจำเป็นก่อน- หลังของปัญหา
4. ปัญหาไม่เร่งด่วนมาก ในอนาคตอาจจะเกิดขึ้นหรือไม่เกิดขึ้น แต่ถ้าเกิดปัญหาจะเกิดผลกระทบรุนแรง แก้ไขปัญหาโดยวิเคราะห์หาแนวโน้ม/โอกาสการเกิดของปัญหาบางประเด็นในอนาคต โดยมีระยะเวลามามีส่วนเกี่ยวข้อง เช่น งานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์

การเขียนโครงการวิจัย ต้องมองว่างานวิจัยมีปัญหาแบบไหน ต้องรู้ที่มาและรู้ที่ไปของปัญหาด้วยการวิจัยที่สามารถทำนายอนาคต งานวิจัยแบบดังกล่าวต้องใช้เวลาในการทำให้ใช้ผลที่ได้นำไปแก้ไขปัญหาได้ ล่าช้า หรือมีแนวทางแก้ไขปัญหาคือแทนการใช้ผลการวิจัยแล้ว เช่น งานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์

การแก้ไขปัญหา

1. การระบุปัญหาที่ถูกต้อง
2. สร้างวิธีต่างๆในการแก้ปัญหา โดยพิจารณาว่าปัญหาสามารถแก้ไขได้ด้วยวิธีที่ดีที่สุด และแก้ตามลำดับความสำคัญก่อนหลังของปัญหา
3. ตัดสินใจในวิธีการแก้ปัญหา
4. ใช้วิธีแก้ปัญหานั้นที่เลือกได้
5. ประเมินผลที่รับ ซึ่งหลังจากประเมินผลอาจมีปัญหาต่อเนื่องเกิดขึ้นที่ต้องมีการแก้ปัญหาเพิ่มเติม

การแก้ปัญหาที่ดี ต้องมีการระบุปัญหาที่ถูกต้อง และเลือกวิธีการแก้ปัญหานั้นที่ถูกต้อง ผลลัพธ์ที่ได้จะถูกต้อง การระบุปัญหาที่ถูกต้องเป็นปัจจัยที่สำคัญในการทำการวิจัย และนำไปสู่ผลลัพธ์ที่ถูกต้อง

สรุปปัญหาเกี่ยวกับการแก้ไข้ปัญหา

1. การแก้ปัญหา ทำได้โดยอาศัยความรู้ ความคิดสร้างสรรค์ และมองการแก้ปัญหาในเชิงบวก
2. ความรู้ที่ได้จากการวิจัย ได้แก่ ความรู้จากการวิจัยระยะสั้น ระยะยาวและการสอบถามจากผู้มีประสบการณ์
3. การวิจัยเมื่อแล้วเสร็จต้องได้อะไรที่เพิ่มขึ้น ผลที่ได้อาจดีขึ้นหรือไม่ดีขึ้น ซึ่งสามารถใช้เป็นจุดระวังเพื่อใช้แก้ไข้ในการทำวิจัยครั้งต่อไป
4. การวิจัยต้อง ไม่ใช่การทำซ้ำ ถ้าเป็นงานวิจัยที่ทำแล้ว มาทำซ้ำต้องได้ผลที่แตกต่างจากที่ได้ทำมาแล้วมีการสังมองค์ความรู้ที่มาจากฐานแล้วเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ

การวิจัย (Research)

การวิจัย คือ กระบวนการค้นหาความรู้ ข้อเท็จจริงอย่างมีระเบียบ มีกฎเกณฑ์ในการรวบรวมข้อมูล วิเคราะห์และแปลความข้อมูลเพื่อแสวงหาคำตอบ สำหรับคำถามหรือประเด็นการศึกษาที่ตั้งไว้ ด้วยกระบวนการอันเป็นที่ยอมรับในแต่ละสาขาวิชา

ประเภทต่างๆ ของการวิจัย

1. แบ่งตามจุดมุ่งหมายของการวิจัย การวิจัยเชิงวิชาการ เพื่อให้ได้เอกสารทางวิชาการ การวิจัยประยุกต์ เพื่อให้ได้กระบวนการ หรือผลที่นำไปใช้ได้
2. แบ่งตามประโยชน์ของการวิจัย พยายามมองจากหลายๆ อย่าง แล้วมุ่งไปสู่จุดสุดท้ายที่สามารถเอาไปใช้ได้ ปัจจุบันมีการเอาจุดสุดท้าย อุปสงค์ หรือเป้าเป็นตัวตั้งแล้วย้อนกลับมาเรื่อยๆ เพื่อมาหาจุดเริ่มต้นว่าจะเริ่มตรงไหนขึ้นอยู่กับสาขาของงานวิจัย ซึ่งต้องมองให้ออกก็จะ เป็นข้อได้เปรียบในการได้ทุนวิจัย
3. แบ่งตามวิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล โดยที่งานวิจัยบางเรื่องทำในแลป และงานวิจัยบางเรื่องทำในภาคสนาม ซึ่งงานปรับปรุงพันธุ์ต้องอาศัยการทำงานบางส่วนในภาคสนาม และการทำงานในห้องทดลองมาผสานหรือบูรณาการร่วมกันให้ได้ การทำงานลักษณะนี้ต้องอาศัยคนที่มีความชำนาญและความสามารถแต่ละส่วนมาช่วยกัน
4. แบ่งตามลักษณะการวิเคราะห์ข้อมูล โดยผู้วิจัยศึกษาว่าจะเอาเครื่องมือชนิดไหนที่มีความเหมาะสมที่สุดมาใช้ ซึ่งต้องอาศัยผู้มีประสบการณ์ ความรู้รอบ
5. แบ่งตามลักษณะวิชาหรือศาสตร์ ปัจจุบันมีทั้งวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี สังคม เศรษฐศาสตร์ หรือการวิจัยแบบเคียงป่าเคียงไหล
6. แบ่งตามระเบียบวิธีวิจัย

ขั้นตอนของกระบวนการวิจัยอย่างเป็นระบบ

1. เลือกเรื่องและกำหนดปัญหาของการวิจัย เรื่องต้องชัดเจน
2. ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง
3. กำหนดกรอบทฤษฎี
4. การกำหนดวัตถุประสงค์ ตั้งสมมุติฐาน และกำหนดตัวแปร
5. การวางรูปแบบการวิจัย

6. การเตรียมเครื่องมือในการวิจัย
7. การกำหนดกลุ่มประชากรและกลุ่มตัวอย่าง
8. การเก็บรวบรวมข้อมูล
9. การเตรียมข้อมูล วิเคราะห์ข้อมูล และการแปลผล
10. การเขียนรายงาน

การเริ่มทำงานวิจัย

1. ตัวเองต้องมีใจที่แน่วแน่
2. กล้าที่จะเสี่ยง นำงานวิจัยที่คนอื่นทำแล้วมาต่อยอดและกล้าคิดเชิงรุกมากๆ
3. หากการเปลี่ยนแปลงที่แหวกแนว คิดนอกกรอบ และสร้างนวัตกรรม เช่น เรื่องพันธุกรรม ควรคิดนอกกรอบ ใช้ประสบการณ์จากตัวเองและผู้อื่น และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆเกิดขึ้น
4. ต้องมีวิสัยทัศน์ วิจัยเพื่อรองรับอนาคตในส่วนที่เกี่ยวข้อง โดยต้องคิดและทำควบคู่กัน
5. ใช้แนวทางในการแก้ไขปัญหาอย่างมีแบบแผนและเป็นระบบ
6. ผลักดันให้มีการสร้างสรรค์
7. เข้าร่วมอย่างสร้างสรรค์
8. ทำงานเป็นทีม

วิธีการระบุหัวข้องานวิจัยที่ถูกต้องและชัดเจน

1. เก็บรวบรวม วิเคราะห์ข่าวสาร และข้อมูลต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง โดยดูจากเอกสารอ้างอิงต่างๆ
2. ปรัชญาผู้ค้นเคยกับปัญหา เช่น ผู้อาวุโส/ ผู้รู้/ ผู้มีส่วนได้ส่วนเสีย
3. วิเคราะห์ปัญหาด้วยตนเอง และสอบถามประเด็นสำคัญ ด้วยการจดบันทึกประเด็นสำคัญต่างๆ
4. ยืนยันสิ่งที่พบโดยเฉพาะประเด็นที่สำคัญ
5. ตัดสินใจถ้าปัญหานั้นควรได้รับการแก้ไข โดยดูจากความเป็นไปได้ งบประมาณ คุณค่า และระยะเวลา
6. การตรวจเอกสารและรวบรวมข้อมูลเพิ่มเติมที่เฉพาะเจาะจงในแต่ละประเด็นปัญหา
7. สร้างสมมุติฐานแบบง่ายๆ และทดสอบสมมุติฐาน
8. ระดมความคิดเพื่อค้นหาเหตุอื่นๆและรวบรวมทางเลือกในการแก้ปัญหา และมีการแลกเปลี่ยนความรู้และประสบการณ์กับผู้อื่น

เครื่องมือที่จำเป็นในการวิจัย

ข้อเสนอโครงการวิจัย ให้นำความรู้ที่ได้ทั้งหมดมาขมวด แล้วคุยกับผู้ที่มีความถนัดในเรื่องอื่นๆ แล้วทำร่วมกันในหลายๆสาขา ไม่ควรจำกัดเฉพาะในสาขาของตัวเอง เพื่อนำไปสู่การได้ทุน

สิ่งที่ควรรู้ในการได้ทุนเพื่อขอทุนวิจัย

1. รู้เขา ได้แก่ แหล่งทุน รู้ว่าใครเป็นผู้ให้ทุน ประเภทของทุนที่ให้ ข้อกำหนดต่างๆ ระยะเวลา และงบประมาณที่ให้
2. รู้เรา ได้แก่ ความพร้อมด้านต่างๆ การทบทวนเอกสาร ศึกษานโยบาย การหาความร่วมมือในส่วนที่ตนขาด และหาความรู้เพิ่มเติมด้วยตัวเอง เช่นอ่านหนังสือ ควรหาทีมงานและมีส่วนร่วม

3. ตัวชี้วัดความสำเร็จ งานปรับปรุงพันธุ์ต้องใช้เวลาานาน แต่ผลที่ได้ในแต่ละระยะเวลาต้องมีผลงานออกมาว่าได้อะไร
4. แบบฟอร์มต่างๆ ในการเขียนขอทุนวิจัย ควรให้ถูกต้องตามแหล่งทุน
5. หาได้จาก WEB SITE อื่นๆ

แหล่งทุนวิจัยในประเทศเพื่อขอทุนวิจัย

1. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ [HTTP://WWW. NRCT.NET](http://www.nrct.net)
2. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย [HTTP://WWW. TRF.OR.TH](http://www.trf.or.th)
3. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ [HTTP://WWW. NSTDA.OR.TH](http://www.nstda.or.th)
4. ศูนย์พันธุวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ [HTTP://WWW. BIOTECH.OR.TH](http://www.biotech.or.th)
5. สำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) [HTTP://WWW. RDANEW.ARDA.OR.TH](http://www.rdanew.arda.or.th)

การวิจัยด้านปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ

การวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ ผู้ขอทุนวิจัยต้องสามารถชี้ให้เห็นถึงความสำคัญของงานวิจัย เพื่อนำไปสู่การได้รับทุน โดยต้องตอบปัญหา 3 ข้อนี้ คือ

1. ปัญหาคืออะไรและอยู่ที่ไหน
2. การปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำคืออะไร ความหมายการปรับปรุงพันธุ์ต้องเข้าใจตรงกัน
3. การปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำมีความสำคัญอย่างไร

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ ได้แก่

1. สัตว์น้ำหรือทรัพยากรมีชีวิต

ทรัพยากรมีชีวิตเป็นทรัพยากรที่ต้องมีการบริหารจัดการที่เหมาะสมเพื่อให้มีใช้อย่างยั่งยืน และได้เปรียบกว่าทรัพยากรที่ไม่มีชีวิตซึ่งใช้แล้วหมดไป เพราะฉะนั้นต้องมีการบริหารจัดการที่เหมาะสม โดยเฉพาะทรัพยากรประมงต้องมีการอนุรักษ์ เนื่องจากศักยภาพด้านการทำประมงสูง จนเกินกำลังผลิตตามธรรมชาติ ดังนั้นในอนาคตจึงต้องอนุรักษ์ทรัพยากรประมงภายในประเทศ และหันไปใช้ทรัพยากรภายนอกประเทศให้มากขึ้น (ประมงนอกน่านน้ำ) ซึ่งการอนุรักษ์ต้องใช้ความรู้ทางพันธุศาสตร์สูง รวมถึงต้องมีการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ซึ่งผลการใช้ทรัพยากรดังกล่าวมีผลทำให้การวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำมีความสำคัญเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ

2. ความหลากหลายทางชีวภาพ (Bio diversity) แบ่งออกเป็น 2 ส่วน

2.1 ความหลากหลายของระบบนิเวศน์ (Ecology diversity)

2.2 ความหลากหลายของชนิด (Species diversity)

สิ่งที่เห็นได้ชัด คือความหลากหลายทางชีวภาพที่ลดลงทั้งคุณภาพและปริมาณ ต้องมีมาตรการอย่างทันที่ทั้งที่ใช้ในการใช้ การอนุรักษ์ การฟื้นฟู และการสร้างใหม่ขึ้นมา ซึ่งงานด้านปรับปรุงพันธุ์สามารถสนับสนุนมาตรการต่างๆ ดังกล่าวได้

3. ความมั่นคงมนุษย์ (Human security) เป็นประเด็นสำคัญที่นำไปสู่การวิจัย ซึ่งมี 7 ประเด็น คือ

- 3.1 ความมั่นคงทางอาหาร (Food security) การเพิ่มขึ้นของประชากรในอนาคต ส่งผลให้ความต้องการอาหารเพิ่มขึ้น จึงต้องมีการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้มากยิ่งขึ้น
- 3.2 ความมั่นคงทางเศรษฐกิจ (Economic security) ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำไม่ได้มีความสำคัญเพียงเป็นแหล่งโปรตีนราคาถูก ซึ่งการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นส่วนที่มีความสำคัญ และมีการเติบโตทางเศรษฐกิจมากที่สุด และมีการเติบโตขึ้นเรื่อยๆ
- 3.3 ความมั่นคงทางสุขภาพ (Health security) ปัจจุบันอาหารจากทะเล และจากการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ เป็นโปรตีนที่มีคุณภาพ ซึ่งส่งผลดีต่อสุขภาพ
- 3.4 ความมั่นคงทางสิ่งแวดล้อม (Environmental security) การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำก่อให้เกิดปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมชัดเจนมาก
- 3.5 ความมั่นคงของบุคคล (Personal security)
- 3.6 ความมั่นคงของชุมชน (Community security)
- 3.7 ความมั่นคงทางการเมือง (Political security)

ประเด็นที่ 1 - 4 เป็นประเด็นที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ และมีความสำคัญสูงสุดในการขออนุมัติวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ ส่วนประเด็นที่ 5 - 7 เป็นประเด็นที่เกี่ยวข้องกับทางด้านการปกครอง

Outlook for aquaculture beyond 2000

หมายถึง การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในศตวรรษที่ 21 การปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ เป็นส่วนหนึ่งของการเพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยง เนื่องจาก

1. Good growth potential การเจริญเติบโตที่ดี มีสาเหตุจาก
 - 1.1 Increasing demand ความต้องการสัตว์น้ำที่เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ
 - 1.2 Emergence of the sector อุตสาหกรรมสัตว์น้ำไม่ได้หมายความว่าแค่การผลิตสัตว์น้ำอย่างเดียว ต้องมองเรื่องการขนส่ง การแปรรูป สารเคมี และการอนุรักษ์ด้วย
 - 1.3 Vertical and Horizontal expansion of production การผลิตสัตว์น้ำมีการขยายตัวทั้งในแนวดิ่งและแนวระนาบ คือเชิงลึก (รายละเอียดในแต่ละเรื่อง) และเชิงกว้าง (รายละเอียดในหลายๆ เรื่อง)
 - 1.4 Capture-based fisheries แม้ว่าผลผลิตทางการประมงมาจากการเพาะเลี้ยงเป็นส่วนใหญ่ แต่การจับสัตว์น้ำจากธรรมชาติก็ยังมีมีความสำคัญ
 - 1.5 Growing awareness of sustainability needs การให้ความสำคัญกับเรื่องของความยั่งยืนของกิจกรรมนั้นๆ
2. “Responsible aquaculture” คือ การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอย่างมีความรับผิดชอบ ต้องมีการบริหารจัดการผลผลิตที่ดี เช่น การดำเนินการให้ได้มาตรฐาน GAP, COC

Production management การจัดการผลผลิต ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

1. Environmental management การบริหารจัดการเชิงสิ่งแวดล้อม เช่น การจัดการรูปแบบน้ำ อาหาร การป้องกันสิ่งต่างๆ

2. Genetic management การบริหารจัดการเชิงพันธุกรรม ในงานวิจัยหลายๆ เรื่องใช้คำว่า Selective breeding program ต้องมองจากสิ่งที่เราเลี้ยง และสิ่งที่ป็นจากธรรมชาติ แบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

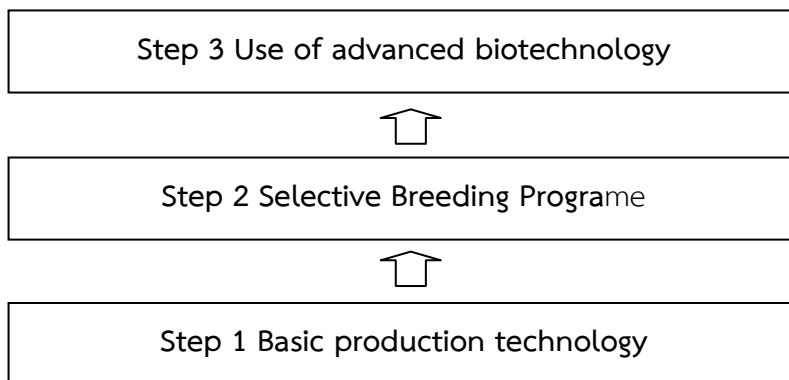
2.1 Passive genetic management การบริหารพันธุกรรมเชิงรับ คือ การจัดการพ่อแม่พันธุ์เชิงพันธุกรรม (genetics of broodstock management) แบ่งออกได้ 2 แบบ คือ Natural environment สภาพแวดล้อมทางธรรมชาติ ทรัพยากรหลักของความหลากหลายทางพันธุกรรมทางธรรมชาติที่จะใช้ประโยชน์ต่อไปได้ และ Aquaculture environment สภาพแวดล้อมในระบบเพาะเลี้ยง ซึ่งการบริหารพันธุกรรมเชิงรับต้องอาศัยทั้ง 2 แบบส่งเสริมซึ่งกันและกัน

2.2 Active genetic management การจัดการทางพันธุกรรมที่ใช้งานอยู่ คือความต้องการทรัพยากรพื้นฐานซึ่งต้องมาจากธรรมชาติ หรือ Genetic improvement program

การปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำต้องอาศัยทั้ง Passive และ Active เพราะถ้าหากสามารถเขียน proposal ของงานวิจัยที่ชี้ให้เห็นถึงความต่อเนื่องของเรื่องที่เราจะทำ ทำให้ได้รับความสนใจ

Research and Development steps for production management in aquaculture

หมายถึง การพัฒนางานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำเพื่อขอทุน มีขั้นตอนการวิจัยและพัฒนาสำหรับการบริหารจัดการผลผลิตในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ ถ้าเราจะทำเรื่องการบริหารจัดการผลผลิต ไม่ว่าจะเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดใดก็ตามในการเพาะเลี้ยง จะประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ตามแผนภูมิ R&D steps for production management in aquaculture คือ



1. Step 1 Basic production technology เทคโนโลยีการผลิตสัตว์น้ำขั้นพื้นฐาน ต้องประสบความสำเร็จ ต้องคุมให้ได้ มีผลในเรื่องของการบริหารธุรกิจ สิ่งแวดล้อมเป็นสิ่งสำคัญ เพราะสิ่งเดียวกันถ้าอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมือนกัน ผลที่ได้อาจจะต่างกัน สิ่งที่จะทำให้ Basic production technology สมบูรณ์ก็คือ การย้อนกลับหรือการเอาสิ่งต่างๆ ที่อยู่ในระบบการเลี้ยงมาทำให้เกิดกระบวนการ

2. Step 2 Selective Breeding Programe การคัดเลือกปรับปรุงพันธุ์ ต้องทำให้สอดคล้อง โดยเลือกว่าจะทำ Active หรือ Passive แบบไหน ขั้นตอนนี้มีมีความสำคัญ เพราะถ้าหากว่าขั้นตอนนี้เกิดขึ้นก่อน จะทำให้ stock ที่ทำ หรือวิธีการที่เลี้ยงเป็นไปในทางที่ไม่ชัดเจน

3. Step 3 Use of advanced biotechnology การใช้เทคโนโลยีชีวภาพช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการปรับปรุงพันธุ์

ภาคผนวก

เอกสารแจกในการบรรยายโดยวิทยากร

1. แนวทางการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ
โดย ศ.ดร. อุทัยรัตน์ ฌ นคร
2. การปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำโดย
โดย ผศ.ดร. ศกร คุณวุฒิมฤทธิธรณ
3. Selective Breeding Program Evaluation
โดย ดร. วงศ์ปฐม กมลรัตน์
4. การวิเคราะห์ยีนควบคุมลักษณะปริมาณและการคัดเลือกด้วย
เครื่องหมายพันธุกรรมในสัตว์น้ำ
โดย ดร. สุภาวดี พุ่มพวง
5. Breeding improvement in aquaculture include
โดย ดร. จีราพร เกษรจันทร์
6. Fish Reproduction and Fish Breeding
โดย ดร. นฤพล สุขุมาสวิน
7. ระบบสมดุลทางชีวภาพในการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ
โดย นายสมชาติ สุขวงศ์
8. เทคนิคในการพัฒนางานวิจัยด้านการปรับปรุงพันธุ์สัตว์น้ำ
เพื่อขอทุนวิจัย
โดย ดร. เผด็จศักดิ์ จารยะพันธุ์