การนำส่งสารฮอร์โมนเพศผู้ 17α -Methyltestosterone เข้าสู่เอ็มบริโอด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์เพื่อการแปลงเพศปลานิลเชิงพาณิชย์

Delivery of 17α -Methyltestosterone through Tilapia Embryos by Electrical Pulse Inductions for Commercial Sex Reversal

ศักย์ชิน บุญถวิล[1*], ธเนศ จันทเดช [1], พันธ์ทิมา งิมเกาะ[1], คทา จารุวงศ์รังสี[2] และ อดิสร เตือนตรานนท์ [2]

Sakshin Bunthawin [1*], Thanate Juntadech[1], Pantima Ngimkoh[1],

Kata Jaruwongrungsee[2] and Adisorn Tuantranont

[1] *หน่วยวิจัยชีวเทคโนโลยีของกลศาสตร์ไฟฟ้า วิทยาศาสตร์ฟิสิกส์ คณะเทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์*

[2] *ศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ*

[1]*Biotechnology of Electromechanics, Science of Physics, Faculty of Technology and Environment, Prince of Songkla University*

[2] *National Electronics and Computer Technology Center, National Science and Technology Development Agency*

Received : 11 March 2020

Revised : 28 May 2020

Accepted : 15 August 2020

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการแปลงเพศปลานิลให้เป็นเพศผู้เพื่อประโยชน์เชิงพาณิชย์โดยวิธีกระตุ้นเอ็มบริโอสายพันธุ์จิตรลดา (*Oreochromis niloticus* L., Chitralada) ระยะพัฒนาการ “segmentation” ถึง “pharyngula” (2-3 วันหลังปฏิสนธิ) ด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์รูปคลื่นสี่เหลี่ยม ชุดเงื่อนไขศักย์ไฟฟ้า 100-500 โวลต์ (ความเข้มสนามไฟฟ้า 25-125 กิโลโวลต์ เมตร$^{-1}$) อัตราส่วนสัญญาณบวกและศูนย์ 50:50 ไมโครวินาที (mark space ratio) คาบสัญญาณ 100 ไมโครวินาที จำนวนสัญญาณพัลส์ 3 ลูกคลื่น สารละลายที่ใช้กระตุ้นเอ็มบริโอผสมฮอร์โมนเพศผู้ 17α -Methyltestosterone (MT) เข้มข้น 1,000 – 100,000 ไมโครกรัม ลิตร$^{-1}$ ผลการวิจัยพบว่าเอ็มบริโอที่ผ่านการกระตุ้นด้วยเงื่อนไขศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ ความเข้มข้นสารละลาย MT ที่5,000 ไมโครกรัม ลิตร$^{-1}$ ให้ผลอัตราเพศผู้สูงสุด (male-sex reversal rate, MSR) ที่ 89.42%±2.28% อัตราการฟัก (hatching rate, HR) 93.33%±0.58% และอัตราการรอด (survival rate, SR) 87.49%±1.71% ตามลำดับ โดยชุดควบคุมมีอัตราเพศผู้และเมีย (off-spring rate, OSR) คือ 59.71%±3.00% และ 46.33%%±1.53% ตามลำดับ มีอัตราการฟัก (hatching rate, HR) 91.33%±1.53% และอัตราการรอด (survival rate, SR) 85.08%±4.16% (เพิ่มอัตราเพศผู้ได้มากกว่าเดิม 29.71%) ทำการตรวจสอบปริมาณฮอร์โมน MT ที่นำส่งเข้าสู่เอ็มบริโอด้วยเทคนิค LC-MS/MS และการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค “Quantitative real-time PCR” (qRT-PCR) ได้แก่ ยีนพัฒนาเพศผู้ (up-regulated genes) *amh*, *ar*, *dmrt1*, *bmp15*, *gfd9* ยีนพัฒนาเพศเมีย (down-regulated genes) *gsdf* และยีนที่แสดงออกต่อเนื่อง (housekeeping gene) *rpl13a* ตามลำดับ ทั้งนี้ชุดเอ็มบริโอที่ผ่านการกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพร้อมสารฮอร์โมนเพศ MT พบการแสดงออกของกลุ่มยีนพัฒนาเพศผู้

คำสำคัญ : ปลานิล ; อัตราแปลงเพศผู้ ; สนามไฟฟ้าแบบพัลส์ ; 17แอลฟ่า-เมทธิลเทสโทสเตอโรน ; ยีน

Abstract

The present study proposes an alternative technique of electrical sex reversal to enhance all-male sex reversal (MSR) of Nile tilapia using transient square pulse-electric fields for commercial benefits focusing on the study of mechanisms of electro-permibilization of 17α-Methyltestosterone (MT) androgen hormones through induced membrane of tilapia's embryo (*Oreochromis niloticus* L., Chitralada), during segmentation-pharyngula (2-3 days post fertilization). The technique were carried out for large-scale inductions of embryos suspensions with MT concentrations of 1,000 – 100,000 µg l^{-1} using square-pulse electric fields of amplitudes 100-500 volts (electric field intensities of 25-125 kV m^{-1}), 100 µs pulse-period (50:50 mark space ratio) and 3 square pulses, respectively. It was found that the most suitable conditions of 350 V with MT concentration of 5,000 µg l^{-1} gave the maximum rate of male-sex reversal rate (MSR) of 89.42%±2.28%, hatching rate (HR) of 93.33%±0.58% and survival rate (SR) of 87.49%±1.71%, respectively. The off-spring rate (OSR) of male and female in the control group were 59.71%±3.00% and 46.33%%±1.53%, respectively, with hatching rate (HR) of 91.33%±1.53% and survival rate (SR) of 85.08% ± 4.16% (increasing MSR of 29.71%). Verifications of MT delivery were carried out through LC-MS/MS technique and RNA expression profiles by extraction of total RNA from induced MT embryos. Genes of male-sex development (up-regulated genes) of *amh*, *ar*, *dmrt1*, *bmp15*, *gfd9* and down-regulated genes of *gsdf* (where house keeping genes of *rpl13a*) were investigated by Quantitative real-time PCR. The induced MT embryos with transient square pulse-electric fields showed expression of male-sex development genes.

Keywords : tilapia ; sex reversal rate ; pulse electric fields ; 17α-Methyltestosterone ; gene

*Corresponding author. E-mail : sakshin.b@phuket.psu.ac.th

บทนำ

ปลานิลเป็นสัตว์น้ำส่งออกสำคัญของประเทศและเป็นปลาเศรษฐกิจหลักของโลก ปัจจุบันความต้องการบริโภคปลานิลในตลาดโลกโดยเฉพาะในประเทศกลุ่มตะวันออกกลาง สหรัฐอเมริกา และยุโรป มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น ประเทศไทยส่งออกปลานิลไม่น้อยกว่า 4,000 ตันต่อปี คิดเป็น 52.7% ของผลผลิตการเลี้ยงสัตว์น้ำจืด (Department of Fisheries, 2017) ปลานิลที่มีขนาดน้ำหนักตัวมากจึงได้เปรียบในเชิงมูลค่า ทั้งนี้ปลาเพศผู้มีอัตราแลกเนื้อสูงและเจริญเติบโตเร็วกว่าเพศเมีย 25% (McAndrew, 1993) กอปรกับตัวเมียหยุดชะงักการเจริญเติบโตในขณะที่วางไข่ เกษตรกรจึงไม่เลี้ยงปลานิลรวมเพศในบ่อเดียวกันเพราะทำให้เจริญเติบโตช้าและเกิดโรคง่าย การเพาะเลี้ยงปลานิลเชิงพาณิชย์ในปัจจุบันทั้งหมดใช้วิธีบังคับเปลี่ยนเพศปลาให้เป็นเพศผู้ล้วน (ปลานิลหมัน “monosex”) ทั้งนี้ข้อมูลปัจจุบันฟาร์มปลานิลเชิงพาณิชย์จำนวน 300,000 แห่งทั่วประเทศ มีเพียงจำนวน 2,800 ฟาร์มที่ได้รับการรับรองมาตรฐานการเพาะเลี้ยง GAP (Good Agricultural Practice) และจำนวน 24,500 ฟาร์มที่ได้รับมาตรฐาน SL (Safety Level) คิดเป็น 9.1% ด้วยเหตุนี้ผู้ประกอบการส่วนใหญ่จึงเร่งปรับตัวพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงปลานิลแปลงเพศให้ได้ตามมาตรฐานโดยเฉพาะประเด็นลดการใช้สารฮอร์โมนเพศสังเคราะห์และยาปฏิชีวนะในกระบวนการเพาะเลี้ยง

ในอดีตถึงปัจจุบันกระบวนการเปลี่ยนเพศปลานิลให้เป็นเพศผู้เชิงพาณิชย์มีหลายวิธีได้แก่ (1) การแยกเพศด้วยมือ (hand sexing) อาศัยผู้ที่มีความชำนาญและประสบการณ์ในการดูเพศปลาเพื่อคัดแยกเพศผู้ออกจากเพศเมีย วิธีนี้ก่อให้เกิดการสูญเสียในระหว่างคัดแยกประมาณ 50% ของผลผลิตและมีข้อผิดพลาด 2.7%-10% (Chervinski and Rothbard, 1982) (2) การผสมข้ามพันธุ์ (hybridization) คือการผสมข้ามชนิดของปลาในตระกูลปลานิล เป็นวิธีให้ผลไม่สม่ำเสมอและไม่สะดวกต่อการควบคุมความบริสุทธิ์ของสายเลือดปลาและลูกปลาแต่ละรุ่น กอปรกับต้องอาศัยการติดเครื่องหมายด้วยเทคนิค “gel electrophoresis” และ HPLC ในการแยกหาการเรียงตัวของยีนหรือ DNA เพื่อการจำแนกชนิดจากสารพันธุกรรมของปลาจึงใช้ต้นทุนการดำเนินการสูง และ (3) การใช้ฮอร์โมนแปลงเพศ เป็นวิธีการที่เกษตรกรนิยมใช้อยู่ในปัจจุบัน เพราะไม่ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการเก็บพันธุ์ปลานิล ไม่ต้องคำนึงถึงสารพันธุกรรมหรือความบริสุทธิ์ของสายพันธุ์ปลา แบ่งเป็น 2 วิธีย่อย กล่าวคือ การให้ฮอร์โมนทางตรงและการให้ฮอร์โมนทางอ้อม วิธีทางตรงเป็นการให้ฮอร์โมนเพศเพศผู้สังเคราะห์แอนโดรเจน (synthetic androgen hormone) 17α -Methyltestosterone (MT) ผสมในอาหารให้ลูกปลากินในช่วงที่ยังไม่ปรากฏเพศวันละ 5 มื้อ ด้วยอัตราส่วนฮอร์โมนเพศ 60 มิลลิกรัมต่ออาหารปลา 1 กิโลกรัม ทำซ้ำต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 21-28 วัน สามารถเปลี่ยนเพศปลานิลให้เป็นเพศผู้ล้วนได้ไม่น้อยกว่า 86% สำหรับวิธีทางอ้อมเป็นวิธีที่ไม่ให้ลูกปลานิลสัมผัสกับฮอร์โมนโดยตรง ในอดีตใช้เพื่อรองรับการส่งออกคู่ค้าในบางประเทศที่มีข้อกีดกันทางการค้าประเด็นเรื่องการปนเปื้อนสารฮอร์โมนในเนื้อปลา วิธีนี้มีข้อเสียเพราะอาศัยกระบวนการที่ซับซ้อน ค่าใช้จ่ายสูง ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง ซึ่งมีโอกาสได้พ่อพันธุ์ปลาที่ดีมีเพียง 25% เท่านั้น (McAndrew, 1993)

วิธีดำเนินการแปลงเพศกับลูกปลานิลในปัจจุบันนิยมใช้สารฮอร์โมนเพศผู้สังเคราะห์ MT ผสมโดยตรงในอาหารปลา อย่างไรก็ดีวิธีดังกล่าวมีข้อด้อยบางประการ กล่าวคือกระบวนวิธีจัดเตรียมอาหารปลาเม็ดที่คลุกเคล้ากับสารฮอร์โมนเพศต้องมีการเก็บรักษาเพื่อหลีกเลี่ยงแสงแดดและอุณหภูมิ การให้อาหารผสมฮอร์โมนเพศแก่ลูกปลาต้องทำวันละ 5 รอบ ทำซ้ำ

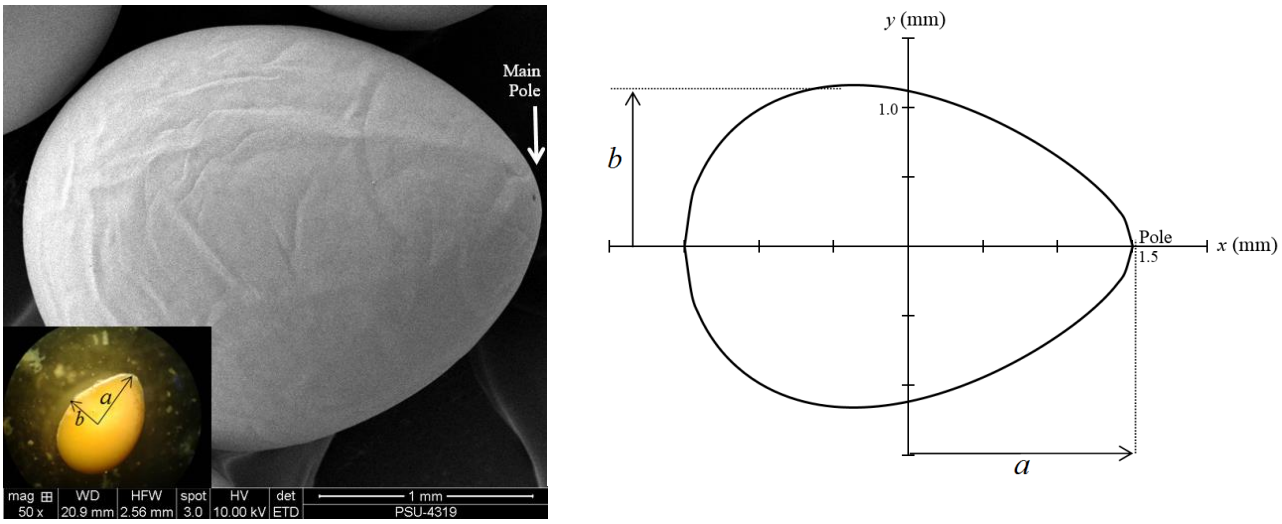
สม่ำเสมอต่อเนื่องกัน 21-28 วัน ซึ่งวิธีหว่านสุ่มอาหารเช่นนี้ไม่สามารถควบคุมผลการแปลงเพศกับปลาแต่ละตัวได้ ถือเป็นการแปลงเพศแบบกลุ่ม ประกอบกับการล้างทำความสะอาดบ่อเพื่อเปลี่ยนถ่ายน้ำต้องใช้แรงงานและค่าใช้จ่าย ทั้งนี้ระบบน้ำทิ้งจากฟาร์มส่วนมากเป็นระบบเปิด ประเด็นสารฮอร์โมนเพศสังเคราะห์ที่ตกค้างในน้ำทิ้งฟาร์มปลาก่อนระบายสู่แหล่งน้ำภายนอกจึงเป็นเรื่องที่ต้องพิจารณา ในบางประเทศมีข้อบังคับกรณีสารฮอร์โมนเพศตกค้างในน้ำทิ้งไม่เกิน 1 ไมโครกรัม ลิตร$^{-1}$ ต้องมีบ่อบำบัดน้ำแบบตกตะกอนและแบบผึ่งเพื่อลดปริมาณสารฮอร์โมนในน้ำก่อนนำกลับมาใช้ใหม่หรือทิ้งสู่ภายนอก (Green and Teichert, 2000) ผลจากการคำนวณเชิงสถิติการผลิตลูกปลานิลแปลงเพศรวมจำนวน 600 ล้านตัวในประเทศต่อปีพบการใช้สารฮอร์โมน MT โดยเฉลี่ย 0.02 มิลลิกรัมต่อการผลิตปลานิลเพศผู้ 1 ตัว เกษตรกรจึงต้องใช้สารฮอร์โมน MT ปริมาณสูงถึง 12 กิโลกรัม (สารฮอร์โมนเพศ MT เฉลี่ย 400 บาท/กรัม คิดเป็นมูลค่า 4.8 ล้านบาทต่อ 12 กิโลกรัม) หากพิจารณาในภาพรวมสารเคมีที่มีมูลค่าเหล่านี้ถูกผสมลงไปในอาหารเพาะเลี้ยง มีโอกาสปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อม แม้ว่า MT จะสลายตัวในน้ำได้ภายใน 7 วัน หลังสิ้นสุดการให้อาหาร MT แต่การเริ่มใช้อาหารผสม MT เพื่อการแปลงเพศลูกปลาในแต่ละชุดกระชังนั้นเริ่มไม่พร้อมกัน ทำให้ระยะสิ้นสุดการให้ MT จึงไม่พร้อมกัน อัตราการตกค้างและสลายตัวของ MT จึงเป็นวงจรที่ไม่สิ้นสุดตลอดระยะเวลาการเพาะเลี้ยงทั้งปี (Srisakultiew, 2003)

จากประเด็นปัญหาดังกล่าว ผู้วิจัยได้นำเสนอแนวทางการแปลงเพศปลานิลรูปแบบใหม่ด้วยวิธีไฟฟ้า (Bunthawin *et al*., 2015) ซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นครั้งแรกในการปรับเปลี่ยนรูปแบบการแปลงเพศปลานิลด้วยจุดประสงค์หลักเพื่อลดปริมาณการใช้ฮอร์โมนเพศผู้สังเคราะห์ 17α -Methyltestosterone (MT) ลดระยะเวลาการแปลงเพศ และลดลดต้นทุนการผลิตลูกปลานิลแปลงเพศให้น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้เพื่อให้สอดคล้องตามแนวทางการรับรองมาตรฐาน GAP โดยเริ่มศึกษาจากตัวอย่างปลานิลที่เพาะเลี้ยงในฟาร์มภาคใต้สายพันธุ์จิตรลดา ทดลองที่ระยะเอ็มบริโออาศัยหลักการขยายรูที่ผิวเยื่อหุ้มเซลล์ให้เปิดกว้างขึ้นชั่วขณะด้วยสนามไฟฟ้าแบบพัลส์สี่เหลี่ยมเพื่อนำส่งสารฮอร์โมนเพศผู้ MT ความเข้มข้นต่ำระดับไมโครกรัม/ลิตร นำร่องในงานวิจัยเฟสแรกโครงการ “การแปลงเพศปลานิลและปลาเศรษฐกิจด้วยเทคนิคขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ในสนามไฟฟ้าแบบพัลส์” ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (รหัสโครงการ NT-FD-B-22-EDS-19-56-02) ต่อมาได้รับทุนสนับสนุนจากโปรแกรมเซนเซอร์ของฝ่ายบริหารคลัสเตอร์และโปรแกรมวิจัยโครงการ “การแปลงเพศปลานิลด้วยเทคนิคไฟฟ้าจากต้นแบบสู่ระดับพร้อมใช้งานเชิงพาณิชย์” (รหัสโครงการ P15-50561) ได้รับการคัดเลือกเป็นผลงานเด่นของ สวทช. ประจำปี 2560 และได้รับรางวัลระดับชาติ “ผลงานที่น่าลงทุนที่สุด” (The most interesting technology for investment) งาน Thailand Tech Show 2017 จัดโดย สวทช. ร่วมกับกระทรวงวิทยาศาสตร์ โดยมีชุดต้นแบบ “อุปกรณ์แปลงเพศปลานิลด้วยวิธีไฟฟ้า” (Fish X-Change) ซึ่งกระตุ้นเอ็มบริโอในขั้วไฟฟ้าระบบปิด ใช้สนามไฟฟ้าพัลส์ซึ่งเป็นเทคโนโลยีสะอาด (green technology) สามารถควบคุมการปนเปื้อนสารเคมีสู่สิ่งแวดล้อม ลดต้นทุนการผลิตลูกปลานิลแปลงเพศ ลดปริมาณการใช้ฮอร์โมนน้อยลงกว่าวิธีที่เกษตรกรนิยมใช้กันอยู่ในปัจจุบัน 3,600 เท่า และลดระยะเวลาการแปลงเพศปลานิลจากวิธีเดิม 21-28 วัน เหลือเพียง 5-15 นาที (ลดลง 6,000 เท่า) ต่อชุดการทดลอง ตัวเทคโนโลยีในขณะนี้อยู่ในระหว่างการตรวจสอบและปรับปรุงประสิทธิภาพ

โครงการวิจัยนี้ทำการศึกษาผลการนำส่งสารฮอร์โมนเพศ 17α -Methyltestosterone (MT) ที่เข้าสู่ภายในเซลล์เอ็มบริโอด้วยวิธีไฟฟ้าเพื่อตรวจสอบปริมาณสารฮอร์โมนที่ถูกนำส่ง ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณฮอร์โมนกับตัวแปรทางไฟฟ้าเทียบกับอัตราการแปลงเพศผู้ อัตราการฟัก และอัตราการรอด โดยพิจารณาจาก “RNA expression profile” ของยีนที่เกี่ยวข้องด้วยวิธีสกัด total RNA จากเอ็มบริโอที่ได้รับฮอร์โมนเพศ MT ผ่านการกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ ทั้งนี้ยีนที่พิจารณาได้แก่ กลุ่มยีนที่มีปริมาณการแสดงออกแปรผลตามปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ที่ถูกนำส่งเข้าเซลล์ ได้แก่ กลุ่มยีนที่พบการแสดงออกมากขึ้นเกี่ยวข้องกับพัฒนาการเพศผู้ กลุ่มยีนเกี่ยวกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศ และกลุ่มยีนที่ลดการทำงานเกี่ยวข้องกับการสร้างรังไข่ ตามลำดับ ยีนสองกลุ่มแรกเป็นยีนที่สัมพันธ์กับการพัฒนาเพศผู้ในปลานิล และยีนกลุ่มสุดท้ายสัมพันธ์กับการพัฒนาเพศเมีย การแสดงออกของยีนทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์และสารฮอร์โมนเพศ โดยในส่วนของการตรวจสอบเชิงปริมาณของสารฮอร์โมนเพศที่ถูกนำส่งเข้าสู่เอ็มบริโอดำเนินการด้วยเทคนิค Liquid Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry (LC-MS/MS) เพื่อเปรียบเทียบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ที่อยู่ภายในเอ็มบริโอทั้งก่อนและหลังการกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าชุดเงื่อนไขต่างๆ ทั้งนี้เมื่อทราบกลไกการนำส่งสารฮอร์โมนเพศแล้วจึงขยายผลสู่กระบวนการพัฒนาผลงานเพิ่มประสิทธิภาพการแปลงเพศผู้ด้วยเงื่อนไขที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากการเพิ่มอัตราเพศผู้และอัตราการเปิดขยายรูที่ผิวเซลล์ที่สอดคล้องกับผลการตรวจสอบเป็นลำดับถัดไป

แบบจำลองทางไฟฟ้าของไข่ปลานิล (เอ็มบริโอ) และทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ไข่ปลานิลสายพันธุ์จิตรลดา (*Oreochromis niloticus* L., Chitralada) ระยะเอ็มบริโอช่วงอายุ 2-3 วันหลังปฏิสนธิมีสัณฐานทรงรี (ภาพที่ 1a) ระยะกึ่งแกนเอก (semi-major axis) ตามแนวแกน *x* มีค่าเฉลี่ย a =1.49 ± 0.07 มิลลิเมตร และระยะกึ่งแกนโท 2 ตามแนวแกน *y* (semi-minor axis) มีค่า b =1.05 ± 0.06 มิลลิเมตร (ภาพที่ 1b) ตามลำดับ



(a) (b)

ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพเอ็มบริโอ *O.niloticus* อายุระหว่าง “segmentation” ถึง “pharyngula” (2-3 วันหลังปฏิสนธิ) (a) สัณฐานทรงรีมีขนาดระยะกึ่งแกนเอก a =1.49 $\pm$ 0.07 มิลลิเมตร และกึ่งแกนโท b = 1.05 $\pm$ 0.06 มิลลิเมตร ค่าเฉลี่ย $\pm$ SD) และ (b) แบบจำลองทางไฟฟ้าของเอ็มบริโอ “Hen-egg RC model” สำหรับใช้ในการคำนวณค่าศักย์ไฟฟ้าสำหรับกระตุ้น

เมื่อเอ็มบริโออยู่ในสารละลายฮอร์โมนเพศและถูกกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ภายใต้เงื่อนไขทางไฟฟ้าที่เหมาะสม จะเกิดศักย์ไฟฟ้าเหนี่ยวนำตกคร่อมบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (induced transmembrane potential, ψ) การแพร่ผ่านของสนามไฟฟ้าในสารละลายก่อให้เกิดการเคลื่อนที่ของไอออนที่อยู่ในสารละลายผ่านเข้าสู่เซลล์ด้วยแรงไดอิเล็กโทรฟอเรติก (dielectrophoretic force) (Pohl, 1978; Bunthawin *et al*., 2007; Bunthawin *et al*., 2011) ตามลำดับ เปรียบเสมือนเยื่อหุ้มเซลล์พฤติกรรมตัวเป็นเก็บประจุไฟฟ้าในขณะที่มีกระแสไฟฟ้าไหลผ่านวงจรที่ประกอบด้วยตัวต้านทาน (R) และตัวเก็บประจุไฟฟ้า (C) ที่ต่อขนานกันเป็นชั้น (Bunthawin *et al*., 2007; Bunthawin *et al*., 2011; Bunthawin *et al*., 2015) โดยมีค่าความต้านทานรวม (อิมพิแดนซ์, impedance) ขึ้นตรงกับสมบัติไดอิเล็กทริกของเยื่อหุ้มเซลล์และไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ของเอ็มบริโอ ทั้งนี้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะโครงสร้างแบบ “phospholipid bilayer” ประกอบด้วยชั้นไขมันและโปรตีน จัดเป็นวัสดุไดอิเล็กทริกที่มีสภาพนำไฟฟ้าต่ำเมื่อเทียบกับสภาพนำไฟฟ้าของไซโทพลาสซึมและของสารละลายฮอร์โมนเพศที่อยู่ภายนอกเซลล์ ในสภาวะการณ์ที่เอ็มบริโอถูกกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ความเข้มสูงที่เหมาะสมจะทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดสภาวะไม่เสถียรจนสูญเสียสมบัติไดอิเล็กทริกชั่วขณะ (dielectric breakdown) (Tsong, 1991) ผลของแรงทางไฟฟ้าทำให้เกิดการขยายรูที่ผิวเซลล์กว้างขึ้น (ภาพที่ 2) ซึ่งสัมพันธ์ต่อการนำส่งสารฮอร์โมนเพศ MT ที่เป็นโมเลกุลขนาดใหญ่ที่อยู่ในสารละลายให้

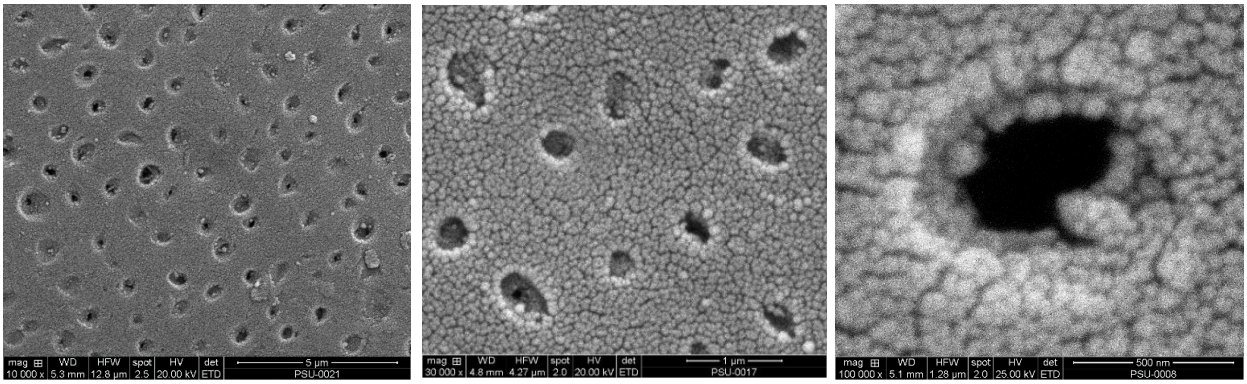
เคลื่อนที่รอดผ่านรูเข้าสู่ภายในเซลล์ได้โดยลำดับ ปรากฏการณ์ดังกล่าวเกิดขึ้นชั่วคราวภายใต้ห้วงระยะเวลาหนึ่งที่ได้รับผลกระทบจากสนามไฟฟ้า ถ้าหากสนามไฟฟ้ามีความเข้มไม่สูงเกินขีดจำกัดและมีค่าศักย์ไฟฟ้ากระตุ้นที่เหมาะสม รูที่ผิวเซลล์จะคืนสภาพกลับเมื่อไม่มีสนามไฟฟ้า (resealing pore) (Chang *et al*., 1992)

การคำนวณค่าศักย์ไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นให้เกิดการขยายรูที่ผิวเซลล์เอ็มบริโอเพื่อการนำส่งสารฮอร์โมนเพศ MT เข้าสู่ภายในเซลล์มีความสัมพันธ์กับค่าอิมพิแดนซ์เชิงซ้อน (complex impedance, Z^*) ซึ่งคำนวณจากแบบจำลองไฟฟ้า “Hen-egg RC model” (Bunthawin *et al*., 2015) ที่ขึ้นกับสมบัติไดอิเล็กทริกขององค์ประกอบส่วนต่างๆ ของเอ็มบริโอ (ตารางที่ 1) ทั้งนี้เอ็มบริโอมีเปลือกห่อหุ้ม (embryo shell หรือ chorion) บริเวณชั้นนอก δ_{om} มีความหนาประมาณ 5-6 ไมโครเมตร และชั้นใน (plasma membrane) δ_{im} มีความหนาประมาณ 6-8 นาโนเมตรตามลำดับ ลักษณะรูที่ผิวเซลล์กระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ ปากรูมีลักษณะปากปล่องภูเขาไฟ (volcano-shape pores) (ภาพที่ 2) โดยมีรูเอมบริโอขนาดใหญ่ (main pore) จำนวน 1 รูตั้งอยู่บริเวณปลายยอดด้านแหลมของเอ็มบริโอ (ภาพที่ 1a) พารามิเตอร์ทางไฟฟ้าที่ใช้กำหนดแบบจำลองได้แก่ สภาพนำไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (σ_{om}) สภาพนำไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (σ_{im}) สภาพนำไฟฟ้าของไซโทพลาซึมชั้นนอก (σ_{oc}) สภาพนำไฟฟ้าของไซโทพลาซึมชั้นใน (σ_{ic}) สภาพนำไฟฟ้าของสารละลายฮอร์โมน (σ_s) ค่าไดอิเล็กทริกของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (ε_{om}) ค่าไดอิเล็กทริกของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นใน (ε_{im}) ค่าไดอิเล็กทริกของไซโทพลาสซึมชั้นนอก (ε_{oc}) ค่าไดอิเล็กทริกของเยื่อไซโทพลาสซึมชั้นใน (ε_{ic}) และของสารละลายฮอร์โมน (ε_s) ตามลำดับ ที่ซึ่งสัมพันธ์กับค่าอิมพิแดนซ์เชิงซ้อน $Z_k^* = \left(\sigma_i + j\omega\varepsilon_0\varepsilon_i\right)^{-1}$ ขององค์ประกอบแต่ละส่วนของเซลล์เอ็มบริโอดังที่ได้อธิบายข้างต้น (เมื่อ $k = im,\ om,\ ic,\ oc,\ s$) เมื่อ $\varepsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12}$ (ฟารัด เมตร$^{-1}$) คือค่าไดอิเล็กทริกของสุญญากาศ นิพจน์ตัวแปรเหล่านี้ในรูปสมการศักย์ไฟฟ้าเหนี่ยวนำเยื่อหุ้มเซลล์ ψ_{RC}^{MEM} ตามแบบจำลอง (Bunthawin *et al*., 2015) ได้เป็น

$$\psi_{RC}^{MEM} = \left[\frac{Z_m^*}{(Z_c^* + Z_m^* + Z_s^*)} \frac{aE_{ext}}{1 - L_x} \right] \quad (1)$$

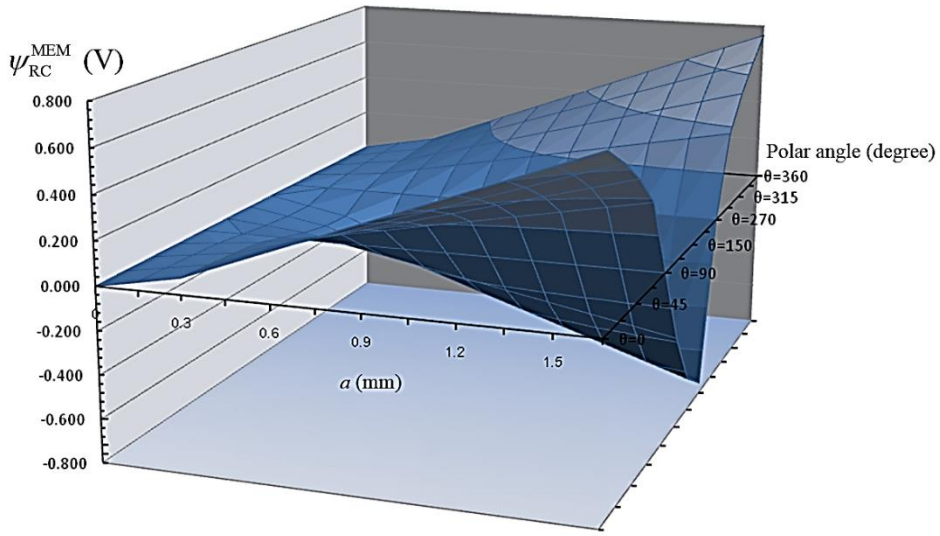
เมื่อ E_{ext} คือขนาดของความเข้มสนามไฟฟ้าจากภายนอก (ปริมาณสเกลาร์หน่วยโวลต์ต่อเมตร) มีค่าขึ้นกับศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนให้แก่ขั้วไฟฟ้า (V_{ext}) ซึ่งในการทดลองกำหนดระยะห่างของแผ่นขั้วไฟฟ้าคู่ขนานที่ระยะ 4 มิลลิเมตร L_k คือ “depolarization factor” (Bunthawin *et al*., 2007; Bunthawin *et al*., 2011) มีค่าขึ้นกับระยะกึ่งแกนเอก a และโท b ตามลำดับ (ภาพที่ 1b) ทั้งนี้ศักย์ไฟฟ้าเหนี่ยวนำตามสมการที่ 1 มีค่าสูงสุดที่บริเวณผิวเซลล์ปลายยอดของเอ็มบริโอส่วนที่อยู่ใกล้กับขั้วไฟฟ้า (ภาพที่ 3) และมีค่าแปรเปลี่ยนตามค่ามุมต่างๆ ที่บริเวณผิวเซลล์ (มุมวัดเทียบกับแนวแกน *x*) ในทางปฏิบัติเมื่อเพิ่มค่า V_{ext} จนทำให้ E_{ext} และ ψ_{RC}^{MEM} มีค่าสูงขึ้น หากปรับเพิ่มค่าให้สูงจนถึงสภาวะขีดเริ่ม “threshold pattern” รูที่ผิวเซลล์จะตอบสนองต่อสนามไฟฟ้าโดยเปิดขยายรูกว้างกว่าเดิมเป็นลำดับเท่า จนกระทั่งสิ้นสุดในกรณีที่ศักย์ไฟฟ้ามีค่าไม่เกินค่าวิกฤติ (critical potential) ซึ่งรูที่ผิวเซลล์จะหดตัวคืนกลับสู่สภาพเดิมภายหลังจากที่ไม่มีสนามไฟฟ้าตามกระบวนการแบบผันกลับ (reversible pore) (Chang *et al*., 1992) ทั้งนี้จากการคำนวณค่าศักย์วิกฤติของเยื่อหุ้มเซลล์จากแบบจำลองทาง

ไฟฟ้าโดยอาศัยข้อมูลในตารางที่ 1 และเงื่อนไขทางไฟฟ้าที่ทำให้เกิดสภาวะการขยายรูพบว่ามีค่า 0.21 โวลต์ ถึง 5.62 โวลต์ (Bunthawin *et al.*, 2015) ซึ่งสัมพันธ์กับศักย์ไฟฟ้าที่ป้อนให้กับขั้วไฟฟ้า V_{ext} ในช่วงประมาณ 300-400 โวลต์ ตรงกับขนาดความเข้มสนามไฟฟ้าภายนอก E_{ext} ≈ 75-100 กิโลโวลต์ เมตร$^{-1}$



(a) (b) (c)

ภาพที่ 2 ภาพถ่าย SEM ผิวเอ็มบริโอ *O. niloticus* ที่มีอายุระหว่าง “segmentation” ถึง “pharyngula” (2-3 วันหลังปฏิสนธิ) (a) ลักษณะกระจายตัวของรู (b) ความหนาแน่นรูต่อหน่วยพื้นที่ และ (c) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูของเอ็มบริโอของชุดศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ อัตราส่วนช่วงสัญญาณบวกและศูนย์ 50:50 ไมโครวินาที จำนวนพัลส์ 3 ลูกคลื่น



ภาพที่ 3 ศักย์ไฟฟ้าเหนี่ยวนำที่ผิวเซลล์เอ็มบริโอ ψ_{RC}^{MEM} คำนวณตามระยะกึ่งแกนเอก (แกน *x*) แปรผันตามตำแหน่งมุมต่างๆ บริเวณผิวเซลล์ที่พลอตโดยใช้พารามิเตอร์ทางไฟฟ้าจากตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ค่าไดอิเล็กทริกและสภาพนำไฟฟ้าของเอ็มบริโอสำหรับคำนวณ ψ_{RC}^{MEM} ในแบบจำลองทางไฟฟ้า

ตัวแปรทางไฟฟ้า (หน่วย)	ค่าที่ใช้คำนวณ ψ_{RC}^{MEM} ตามแบบจำลอง
σ_{ic} (ซีเมนส์ เมตร$^{-1}$)	0.10-0.50
σ_{im} (ซีเมนส์ เมตร$^{-1}$)	10^{-7}-10^{-5}
σ_{oc} (ซีเมนส์ เมตร$^{-1}$)	10^{-7}-10^{-5}
σ_{om} (ซีเมนส์ เมตร$^{-1}$)	10^{-7}-10^{-5}
σ_{s} (ซีเมนส์ เมตร$^{-1}$)	0.001-0.500
$\varepsilon_{ic} = \varepsilon_{oc}$	50-60
$\varepsilon_{im} = \varepsilon_{om}$	5-20
ε_{s}	78-80
δ_{im} (นาโนเมตร)	6-8
δ_{om} (ไมโครเมตร)	5-6

วิธีดำเนินการวิจัย

การจัดเตรียมเอ็มบริโอเพื่อกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้า

ไข่ปลานิล (เอ็มบริโอ) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือสายพันธุ์จิตรลดา (*Oreochromis niloticus* L., Chitralada) ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์สัตว์น้ำเพชรบุรี กองวิจัยและพัฒนาพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง และศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสงขลา มีระยะพัฒนาการช่วง “segmentation” ถึง “pharyngula” อายุ 2-3 วันหลังปฏิสนธิ (day post fertirization, dpf) ซึ่งพิสูจน์แล้วว่าเป็นช่วงระยะพัฒนาการที่ให้ผลดีที่สุด (Bunthawin *et al.*, 2015) คัดแยกเอ็มบริโอดีออกจากเอ็มบริโอเสียจากกลุ่มตัวอย่างและกำหนดขนาดรัศมีเซลล์เอ็มบริโอผ่านกล้องจุลทรรศน์เพื่อหาค่าเฉลี่ยและบันทึกข้อมูลเชิงสถิติ แบ่งชุดควบคุมสำหรับการทดลองที่ไม่เหนี่ยวนำด้วยไฟฟ้า (control) และชุดกระตุ้นด้วยศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นทดสอบในช่วง 100-500 โวลต์ บรรจุเอ็มบริโอในสารละลายสูตร HEPES-buffered sucrose solution (EPM, จดสิทธิบัตร) ที่มีส่วนผสมของสารละลายฮอร์โมนเพศแอนโดรเจน 17α -Methyltestosterone (MT) (Aldamex, CAS No. 58-18-4, Lot 201808002) สูตรส่วนผสม HEPES buffer (10 mM, pH 7.5 ปรับค่าด้วย NaOH) ความเข้มข้น 1,000 – 5,000 –100,000 ไมโครกรัม ลิตร$^{-1}$ บรรจุลงในช่องขั้วไฟฟ้าที่จัดเตรียมไว้ (ขั้วไฟฟ้าแบบแผ่นคู่ขนานหลายช่องวางห่างกัน 4 มิลลิเมตร ความจุเอ็มบริโอ 2,000 ฟอง) จ่ายสัญญาณไฟฟ้าพัลส์รูปคลื่นสี่เหลี่ยมที่มีคาบสัญญาณ (pulse duration) 100 ไมโครวินาที (ช่วงสัญญาณบวกและศูนย์ส่วนละ 50 ไมโครวินาที) จำนวน 3 ลูกคลื่น เมื่อทำการกระตุ้นแล้วเสร็จ แช่เอ็มบริโอไว้ในสารละลายเดิม 15 นาที (cooling down) เพื่อให้เกิดสภาพคืนตัว (resealing) จากนั้นแบ่งตัวอย่างไปถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope, SEM) เพื่อตรวจสอบลักษณะรูและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูที่

ปรากฏบนผิวเซลล์เอ็มบริโอแล้วเข้าสู่กระบวนการตรวจสอบปริมาณสารฮอร์โมนด้วยเทคนิค “Liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry” (LC-MS/MS) และตรวจสอบยืน “Quantitative real-time PCR” (qRT-PCR) โดยแบ่งกลุ่มตัวอย่างออกเป็นชุดการทดลองควบคุม (control) (จำนวน 700 ฟอง) และชุดศักย์ไฟฟ้า (ชุดละ 700 ฟอง) เมื่อกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าแล้วแบ่งตัวอย่างไปตรวจสอบ SEM (จำนวน 50 ฟองต่อชุด), qRT-PCR (จำนวน 50 ฟองต่อชุด), LC-MS/MS (จำนวน 500 ฟองต่อชุด เทียบเท่าเอ็มบริโอที่มีมวลรวม 5 กรัม) เอ็มบริโอส่วนที่เหลือจำนวน 100 ฟอง ถูกนำไปเพาะเลี้ยงให้ฟักเป็นลูกปลาเพื่อติดตามผลอัตราการฟัก อัตราการรอด และอัตราการแปลงเพศ ตามลำดับ บันทึกอัตราเพศผู้โดยธรรมชาติของชุดควบคุม (off-spring rate, OSR) อัตราการฟัก (hatching rate, HR) และอัตราการรอด (survival rate, SR) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ แสดงผลข้อมูลเชิงสถิติโดยคำนวณจากค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของแต่ละชุด (mean ± SD) เพาะเลี้ยงจนลูกปลามีอายุ 2-3 เดือนแล้วตรวจสอบเพศโดยวิธีตรวจถุงน้ำเชื้อเพื่อบันทึกอัตราการแปลงเพศผู้ (male sex reversal rate, MSR) ทั้งนี้ชุดอุปกรณ์กระตุ้นการขยายรูเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยสัญญาณไฟฟ้าอยู่ในระหว่างกระบวนการจดอนุสิทธิบัตร (เลขที่คำขอ 1503001629) และสูตรตั้งต้นของสารละลายพร้อมกระบวนการควบคุมเพศเอ็มบริโอด้วยเทคนิคทางไฟฟ้าอยู่ในระหว่างกระบวนการจดสิทธิบัตร (เลขที่คำขอ 1501006035 และเลขที่ใบประกาศ 162164)

การเตรียมตัวอย่างเอ็มบริโอสำหรับ qRT-PCR และ LC-MS/MS

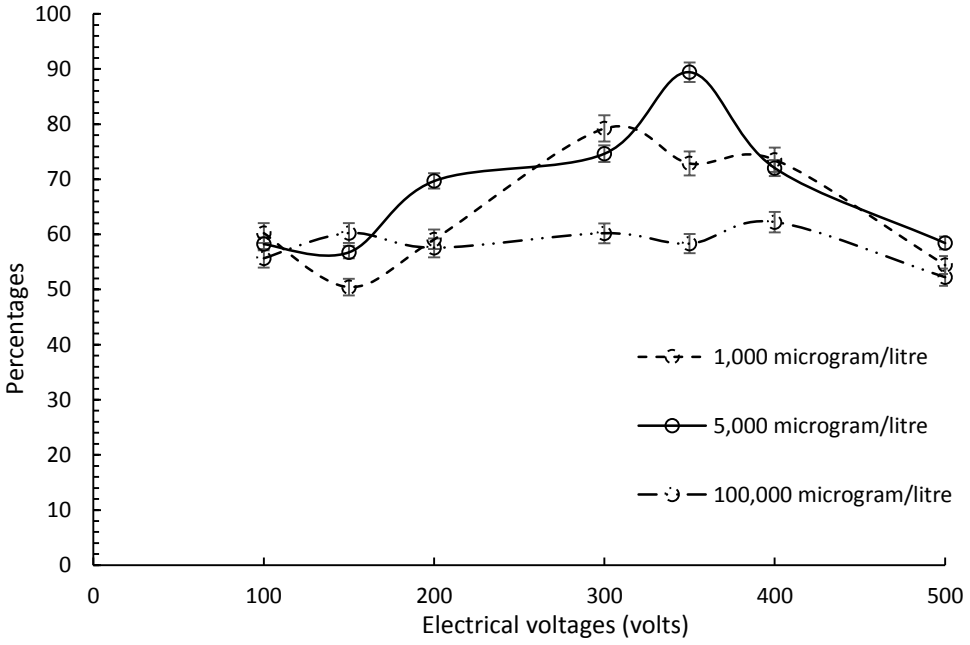
ตรวจสอบผลการนำส่งของสารฮอร์โมน MT ที่เข้าสู่เอ็มบริโอโดยพิจารณาจาก “RNA expression profile” ของยีนที่เกี่ยวข้องด้วยวิธีสกัด total RNA จากเอ็มบริโอที่ล้างด้วยสารละลาย Mannitol เข้มข้น 0.5 โมล จำนวน 1 ครั้ง เทสารละลาย Mannitol ออกแล้วเติมด้วย Trizol ในอัตราส่วน 500 มิลลิลิตร ต่อเอ็มบริโอจำนวน 5 ฟอง (เอ็มบริโอ 1 ฟองมีมวลเฉลี่ย 10.05 ± 0.79 มิลลิกรัม) แล้วบดเอ็มบริโอในแต่ละชุดเพื่อเก็บตัวอย่างรักษาไว้ในอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตรวจสอบยืนที่มีปริมาณการแสดงออกแปรผลตามปริมาณ MT ที่ถูกนำส่งเข้าสู่เซลล์ ด้วยเทคนิค Quantitative real-time PCR (qRT-PCR) เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ MT ทำการตรวจสอบเชิงปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ที่ถูกนำส่งเข้าสู่เอ็มบริโอด้วยเทคนิค Liquid chromatography mass spectrometry/mass spectrometry (LC-MS/MS) ซึ่งเป็นวิธีการตรวจวัดผลเชิงปริมาณโดยรายงานผลปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ในหน่วยไมโครกรัมต่อมวลหน่วยเอ็มบริโอ โดยใช้ตัวอย่างที่มีมวลรวม 5 กรัมต่อชุดการทดสอบ (เทียบเท่าเอ็มบริโอจำนวน 500 ฟอง) ชุดที่เลือกทำการทดสอบได้แก่ชุดควบคุมและชุดการทดลองศักย์ไฟฟ้า 300-350-400 โวลต์ ตามลำดับ

ผลการวิจัย

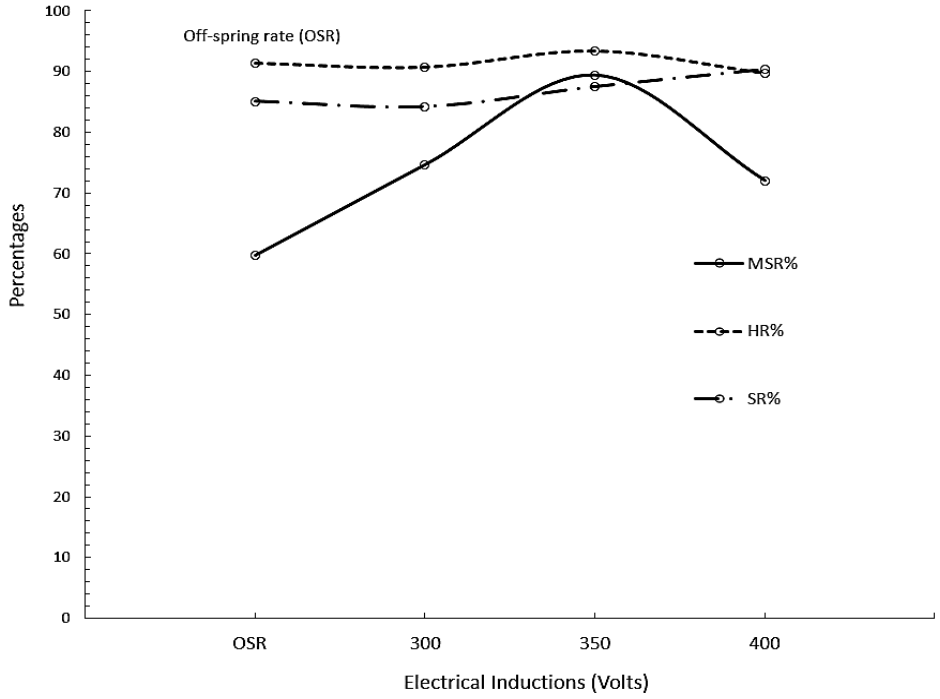
ผลของสนามไฟฟ้าต่อการขยายรูที่ผิวเซลล์เอ็มบริโอ

ผลการตรวจสอบเอ็มบริโอสายพันธุ์จิตรลดา (*Oreochromis niloticus* L., Chitralada) อายุในระยะ “segmentation” ถึง “pharyngula” (2-3 วัน หลังปฏิสนธิ) ของชุดควบคุม (control) ที่ไม่ได้ผ่านการกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพบว่ารูที่ผิวเซลล์เอ็มบริโอมีความหนาแน่นรู (pore density) 0.73±0.02 (รูต่อตารางไมครอน) เส้นผ่านศูนย์กลางรูเฉลี่ย 232±14 นาโนเมตร

ยอดขั้วปลายด้านแหลมของเอ็มบริโอมีรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 11.1±0.4 ไมโครเมตร ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่ารูปกติที่กระจายอยู่ตามผิวเอ็มบริโอ เมื่อกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์รูปคลื่นสี่เหลี่ยมชุดค่าศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้น 100-500 โวลต์ ความเข้มข้นสารละลายฮอร์โมน 1,000 – 5,000 –100,000 ไมโครกรัม ลิตร$^{-1}$ พบว่าชุดศักย์ไฟฟ้าในช่วง 300-400 โวลต์ ความเข้มข้นสารละลายฮอร์โมน 5,000 ไมโครกรัม ลิตร$^{-1}$ (ความเข้มสนามไฟฟ้าในช่วง 75-100 กิโลโวลต์ เมตร$^{-1}$ คาบสัญญาณ 100 ไมโครวินาที อัตราส่วนช่วงสัญญาณบวกและศูนย์ 50:50 ไมโครวินาที จำนวน 3 ลูกคลื่น) ให้อัตราการแปลงเพศผู้สูงอย่างมีนัยสำคัญ ทั้งนี้รูที่ผิวเอ็มบริโอเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้ามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู 662±24 นาโนเมตร ความหนาแน่นรูของชุดควบคุมและชุดกระตุ้นด้วยไฟฟ้าค่าดังกล่าวมีค่าใกล้เคียงกันกล่าวคือประมาณ 0.75 (รูต่อตารางไมครอน) โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรูเอมบริโอยังคงเท่าเดิม โดยผลการทดลองของศักย์ไฟฟ้าทุกชุดให้ผลอัตราการแปลงเพศผู้ อัตราการฟักและอัตราการรอดแบบไม่เชิงเส้น (non-linear regressions) ที่สูงกว่าชุดควบคุม



ภาพที่ 4 อัตราการแปลงเพศผู้ (MSR) ของชุดการทดลองสารละลายฮอร์โมน MT เข้มข้น 1,000-100,000 ไมโครกรัม ลิตร$^{-1}$ เงื่อนไขศักย์ไฟฟ้าเริ่มต้นทดสอบที่ช่วง 100-500 โวลต์ (คาบสัญญาณ 100 ไมโครวินาที จำนวน 3 ลูกคลื่น) เพื่อประเมินเงื่อนไขการทดลองที่เหมาะสมสำหรับอัตราการแปลงเพศ อัตราการฟัก และอัตราการรอดสูงอย่างมีนัยสำคัญ



ภาพที่ 5 อัตราการแปลงเพศผู้ (MSR) อัตราการฟัก (HR) อัตราการรอด (SR) และของชุดศักย์ไฟฟ้าช่วงที่ให้อัตราการแปลงเพศสูงอย่างมีนัยสำคัญ 300-350-400 โวลต์ (คาบสัญญาณ 100 ไมโครวินาที จำนวน 3 ลูกคลื่น สารละลายฮอร์โมน MT เข้มข้น 5,000 ไมโครกรัม ลิตร$^{-1}$) เปรียบเทียบผลกับชุดควบคุม (OSR)

ผลการตรวจสอบอัตราแปลงเพศผู้ อัตราการฟัก และอัตราการรอด

ผลการตรวจสอบการแปลงเพศปลานิล อัตราแปลงเพศผู้ (male-sex reversal rate, MSR) อัตราการฟัก (hatching rate, HR) และอัตราการรอด (survival rate, SR) ของชุดการทดลองควบคุม (control) และชุดการทดลองที่ใช้เงื่อนไขศักย์ไฟฟ้ากระตุ้น พบว่าชุดควบคุมมีอัตราเพศผู้และเมียโดยธรรมชาติ (off-spring rate, OSR) คือ 59.71%±3.00% และ 46.33%%±1.53% ตามลำดับ อัตราการฟัก (hatching rate, HR) 91.33%±1.53% และอัตราการรอด (survival rate, SR) 85.08%±4.16% สำหรับชุดการทดลองกระตุ้นด้วยศักย์ไฟฟ้าพบว่าชุดการทดลอง 350 โวลต์ให้ผลอัตราแปลงเพศผู้สูงสุด (MSR) ที่ 89.42%±2.28% อัตราการฟัก (hatching rate, HR) 93.33%±0.58% และอัตราการรอด (survival rate, SR) 87.49%±1.71% ตามลำดับ โดยใช้เงื่อนไขคาบสัญญาณพัลส์ 100 ไมโครวินาที (อัตราส่วนช่วงสัญญาณบวกและศูนย์ 50:50 ไมโครวินาที) จำนวนสัญญาณพัลส์ 3 ลูกคลื่น และสารละลายฮอร์โมน MT มีความเข้มข้น 5,000 ไมโครกรัม ลิตร$^{-1}$ ผลเปรียบเทียบแสดงดังภาพที่ 4 และ 5

ผลตรวจสอบการแสดงออกของยีนเพศ (qRT-PCR)

ผลทดสอบแบ่งเป็น 4 ชุด ได้แก่ชุดที่ไม่กระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าแบบมีสารฮอร์โมนเพศ MT (ชุดการทดลอง A) และแบบไม่มีสารฮอร์โมนเพศ (ชุดการทดลอง B) ชุดที่กระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าและมีสารฮอร์โมนเพศ MT (ชุดทดลอง C) และชุดที่กระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าและไม่มีสารฮอร์โมนเพศ (ชุดทดลอง D) ผลการวิจัยพบว่ามีการแสดงออกของยีนควบคุมในทุกชุดการทดลองแต่การแสดงออกของยีนเป้าหมายที่ใช้ในการพัฒนาเพศในเอ็มบริโอของชุดทดสอบทั้ง 4 ให้ผลแตกต่างกัน โดยชุดการทดลอง A และ B พบว่าให้ผลเหมือนกับกรณีชุดการทดลอง D เมื่อตรวจสอบ PCR products ของ up-regurated genes และ down-regurated genes พบว่าไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของยีนพัฒนาเพศผู้ ซึ่งชุดการทดลองเอ็มบริโอชุดที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้า A และ B ไม่มีผลต่อการพัฒนายีนเพศในเอ็มบริโอ ส่วนกรณีชุดที่กระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าและมีสารฮอร์โมนเพศ MT (ชุดทดลอง C) เพียงชุดเดียวที่พบยีนแสดงออกเพิ่มขึ้น 5 ยีน และยีนที่แสดงออกลดลงจำนวน 1 ยีน โดยยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 5 ยีนที่พบ ได้แก่ *amh, ar, dmrt1, gsdf* และ *hsd11b2* ยีนที่ลดการแสดงออกตรวจพบ 1 ยีน ได้แก่ *gsdf* และยีนที่แสดงออกอย่างต่อเนื่อง (control) ได้แก่ *rpl13a* ตามลำดับ

ผลการตรวจสอบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ 17α -Methyltestosterone (MT) ด้วยวิธี LC-MS/MS

ผลการตรวจสอบพบว่าชุดควบคุม (control) ไม่พบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม, LOD 10.00) ชุดการทดลองศักย์ไฟฟ้า 300 โวลต์ ตรวจพบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 51.87±1.11 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (LOD 10.00) คิดเทียบเป็นปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 0.52 x 10^{-3} ไมโครกรัมต่อฟอง หรือ 0.52 นาโนกรัมต่อฟอง ชุดการทดลองศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ ตรวจพบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 155.50±0.75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คิดเทียบเป็นปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 1.56 x 10^{-3} ไมโครกรัมต่อฟอง หรือ 1.56 นาโนกรัมต่อฟอง และชุดการทดลองศักย์ไฟฟ้า 400 โวลต์ ตรวจพบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 37.07±1.09 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คิดเทียบเป็นปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 0.37 x 10^{-3} ไมโครกรัมต่อฟอง หรือ 0.37 นาโนกรัมต่อฟอง ตามลำดับ ทั้งนี้เอ็มบริโอมีมวลเฉลี่ย 10.055 ± 0.79 มิลลิกรัมต่อฟอง และเอ็มบริโอจำนวน 1 กิโลกรัมเทียบเท่าจำนวน 99,502.49 ฟอง (±7.87%) ตามลำดับ

วิจารณ์ผลการวิจัย

ความสัมพันธ์ระหว่างการขยายรูที่ผิวเซลล์เอ็มบริโอกับอัตราการแปลงเพศ

ผลการวิจัยพบว่าชุดการทดลอง 350 โวลต์ ให้ผลอัตราเพศผู้ (male-sex reversal rate, MSR) และอัตราการฟัก (hatching rate, HR) มีค่าสูงกว่าชุดควบคุมและมีค่าสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองศักย์ไฟฟ้า 300 และ 400 โวลต์ กล่าวคือ MSR = 89.42%±2.28% และ HR = 93.33%±0.58% ตามลำดับ อย่างไรก็ดีอัตราการรอด (survival rate, SR) 87.49%±1.71% มีค่าเป็นรองจากชุดการทดลองศักย์ไฟฟ้า 400 โวลต์ ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบผล MSR กับ off-spring rate (OSR = 29.71%) พบว่าชุดการทดลอง 350 โวลต์ สามารถเพิ่มส่วนต่างให้มีเพศผู้ด้วยอัตราที่สูงขึ้นมากกว่าชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นเพศผู้ (Increasing Male-Sex Reversal Rate, IMSR) 29.71% ซึ่งสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบ

กับผลการทดลองชุดอื่น ทั้งนี้ชุดการทดลองศักย์ไฟฟ้าดังกล่าวให้ผลอัตราการแปลงเพศผู้ (MSR) อัตราการฟัก (HR) และอัตราการรอด (SR) ที่มีความสัมพันธ์แบบไม่เชิงเส้น (non-linear regressions) แบบสมการพหุนาม (ดีกรี 3) และพบว่าค่าทั้ง 3 มีความสัมพันธ์กับค่าศักย์ไฟฟ้าและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางรู (นาโนเมตร) แบบไม่เชิงเส้นเช่นเดียวกัน เมื่อเชื่อมโยงความสัมพันธ์เหล่านี้พบว่ามีความสอดคล้องกับกลไกการเปิดขยายรูที่มีลักษณะรูปแบบ “threshold pattern” หมายถึงเมื่อเพิ่มแรงดันศักย์ไฟฟ้าถึงค่าจำเพาะที่ประมาณ 300 โวลต์ รูที่ผิวเซลล์เอ็มบริโอจึงเกิดการตอบสนองโดยขยายตัวเปิดกว้างกว่าเดิมเป็นลำดับเท่า โดยตอบสนองสูงสุดที่ศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ แล้วลดการตอบสนองลงสิ้นสุดที่ประมาณ 400 โวลต์ (ภาพที่ 4 และ 5) เมื่อพิจารณาอัตราการแปลงเพศที่ให้ค่าสูงสุดซึ่งตรงกับศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ พบว่ามีความสัมพันธ์กับขนาดของรูที่ผิวเซลล์เอ็มบริโอที่เปิดกว้างมากสุด แต่อัตราส่วนระหว่างอัตราแปลงเพศต่อขนาดรูไม่ได้เป็นสัดส่วนแปรผันตรงกันกับขนาดของรูที่ขยายใหญ่ขึ้น กล่าวคือรูที่ขยายใหญ่ขึ้นจากเดิม 3 เท่าไม่ได้ทำให้อัตราแปลงเพศผู้มีค่าเพิ่มจากเดิม 3 เท่า แต่ผลกลับมีค่าสอดคล้องกับปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ที่ถูกตรวจพบในเอ็มบริโอด้วยวิธี LC-MS/MS โดยขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของรูเอ็มบริโอที่ผิวเซลล์ของชุดควบคุมมีค่าเฉลี่ย 232±14 นาโนเมตร และเมื่อผ่านการกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์พบว่ามีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 662±24 นาโนเมตร อย่างไรก็ดีผลของศักย์ไฟฟ้าไม่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนรูและความหนาแน่นรูที่ผิวเซลล์เอ็มบริโอยังคงเท่าเดิมในช่วง 0.73 – 0.78 (รูต่อตารางไมครอน) หมายถึงไม่พบการเพิ่มจำนวนรูที่เกิดใหม่ เป็นที่น่าสนใจว่าเมื่อพิจารณาจากภาพ SEM ภายหลังกระตุ้นเอ็มบริโอทุกชุดด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ตามเงื่อนไขไฟฟ้าพบว่ารูที่ผิวเอ็มบริโอมีความสะอาดมากกว่าเดิมโดยปราศจากเศษอนุภาคชีวภาพปกคลุม มีนัยว่าสนามไฟฟ้าพัลส์เงื่อนไขดังกล่าวอาจมีผลต่อการขจัดเศษอนุภาคชีวภาพที่ผิวเซลล์เอ็มบริโอ ลักษณะดังกล่าวอธิบายได้ด้วยหลักการแรงไฟฟ้าไดอิเล็กโทรฟอเรติก (dielectrophoretic force) ที่กระทำต่ออนุภาคชีวภาพที่ปกคลุมที่ผิวเซลล์ชีวภาพเมื่อเอ็มบริโออยู่ในสารละลายฮอร์โมนเพศ MT ซึ่งมีสภาพนำไฟฟ้าต่ำเมื่อถูกแรงไฟฟ้ากระทำจะทำให้อนุภาคชีวภาพเหล่านั้นเกิดการเคลื่อนที่ตามทิศของเกรเดียนต์ของสนามไฟฟ้า (electric field gradient) อันเกิดจากเซลล์เอ็มบริโอมีลักษณะทรงรีซึ่งเป็นกรณีที่ให้ผลคล้ายกับพฤติกรรมการเคลื่อนที่ของเซลล์ชีวภาพทรงรีในสนามไฟฟ้ากระแสสลับด้วยแรงไดอิเล็กโทรฟอเรติก (Bunthawin *et al*., 2010; Bunthawin *et al*., 2011; Bunthawin *et al*., 2013)

การแสดงออกของยีนพัฒนาเพศและปริมาณสารฮอร์โมน MT ที่ตรวจพบในเอ็มบริโอ

การแสดงออกของยีนที่พบในเอ็มบริโอชุดที่ถูกกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าและมีสารฮอร์โมนเพศ MT (ชุดทดลอง C) เพียงชุดเดียวที่พบยีนแสดงออกเพิ่มขึ้น 5 ยีน และยีนที่แสดงออกลดลงจำนวน 1 ยีน โดยยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 5 ยีนที่พบได้แก่ *amh*, *ar*, *dmrt1*, *bmp15, gfd9* และยีนที่ลดการแสดงออกตรวจพบ 1 ยีน ได้แก่ *gsdf* ซึ่งผลการตรวจสอบมีความเพียงพอในเชิงคุณภาพที่ใช้อ้างอิงถึงผลการนำส่งสารฮอร์โมนเพศผู้ MT ที่เข้าสู่ภายในเซลล์เอ็มบริโอด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ที่สัมพันธ์กับการแสดงออกของยีนพัฒนาเพศผู้ ในส่วนของการตรวจสอบเชิงปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ด้วยวิธี LC-MS/MS พบว่าชุดเอ็มบริโอที่กระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ 300-350-400 โวลต์ บ่งชี้ให้เห็นว่ามีปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT สูงกว่าของชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การกระตุ้นเอ็มบริโอด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์จึงมีความสัมพันธ์ต่อการนำส่งสารฮอร์โมนเพศเข้าสู่เอ็มบริโอ โดยชุดควบคุม (control) ตรวจไม่พบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ซึ่งเป็นไปตามที่คาดหมายเพราะชุดควบคุมไม่ได้

ถูกกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าและไม่มีสารฮอร์โมนเพศ MT ส่วนชุดการทดลองศักย์ไฟฟ้า 300 โวลต์ และ 400 โวลต์ ตรวจพบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT น้อยลงตามลำดับ ทั้งนี้ปริมาณ MT ที่ตรวจพบชุดศักย์ 350 โวลต์มีค่าสูงกว่าชุดอื่นถึง 3 เท่า สอดคล้องกับขนาดรูที่ขยายเพิ่มขึ้น 3 เท่า ซึ่งผลการตรวจสอบเชิงปริมาณด้วยวิธี LC-MS/MS เป็นผลยืนยันแสดงให้เห็นว่าสารฮอร์โมนเพศ MT ได้ถูกนำส่งเข้าสู่เอ็มบริโอด้วยปริมาณต่างๆ ตามเงื่อนไขทางไฟฟ้าที่ระบุ

กลไกการรอดผ่านรูของโมเลกุลสารฮอร์โมนเพศ MT และการแสดงออกของยีนพัฒนาเพศในเอ็มบริโอ

สารสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศผู้ 17α -Methyltestosterone (MT) ($C_{20}H_{30}O_2$) ในสภาวะปกติเป็นกลางทางไฟฟ้า เมื่ออยู่ในสารละลายที่มีสภาพนำไฟฟ้าต่ำและถูกกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าจะเกิดประจุไฟฟ้าและถูกแรงผลักทำให้เคลื่อนที่ด้วยแรงอิเล็กโทรฟอเรติก (electrophoretic force) อันเกิดจากอิทธิพลของสนามไฟฟ้ากระทำต่อไดอิเล็กทริก (Pohl, 1978) เกิดปรากฏการณ์การเคลื่อนที่ผ่านรูที่เยื่อหุ้มเซลล์สิ่งมีชีวิตที่เปิดขยายกว้างชั่วขณะตามทิศทางของเกรเดียนต์ของสนามไฟฟ้า (electric field gradient) ที่ซึ่งได้รับอิทธิพลจากสนามไฟฟ้าแบบไม่เอกรูป (non-uniform electric field) อันเกิดจากเซลล์เอ็มบริโอเป็นทรงรี (Bunthawin *et al*., 2010; Bunthawin *et al*., 2011) ทั้งนี้เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์เอ็มบริโอซึ่งมีโครงสร้างแบบฟอสโฟไลปิดไบเลเยอร์ (phospholipid bilayer) เกิดการขยายรูเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ ส่งผลให้เกิดการเคลื่อนที่ของสารฮอร์โมนเพศรอดผ่านรูโดยง่ายกว่าสถานะปกติเมื่อไม่มีสิ่งเร้ามากระตุ้น โดยสมมติฐานเมื่อสารฮอร์โมนเพศเข้าสู่ภายในเซลล์เอ็มบริโอจะเคลื่อนที่เข้าภายในและถุงไข่แดงที่อยู่ภายในไซโทพลาสซึมซึ่งมีตัวรับ (receptor) พาเข้าสู่นิวเคลียสตามลำดับ ทั้งนี้เมื่อเซลล์ได้รับสารฮอร์โมนเพศ MT แล้วจะมีการตอบสนองโดยกระตุ้นการแสดงออกของยีนจำเพาะบางกลุ่มที่ทำหน้าที่กระตุ้นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้โดยอาศัยยีนเป็นสาย DNA ที่ใช้เป็นแม่แบบ (template) ในการผลิต RNA (transcription) ซึ่งถูกใช้เป็นแม่แบบในการผลิตโปรตีน (translation) อย่างไรก็ตามการแสดงออกในระดับ “transcription” และ “translation” ของแต่ละยีนอาจไม่เท่ากันขึ้นกับสิ่งเร้าที่กระตุ้นเซลล์ ซึ่งกระบวนการเปลี่ยนเพศที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นในภายหลังจากที่เอ็มบริโอได้รับสารฮอร์โมนเพศมาสักระยะหนึ่ง ด้วยกลไกการจดจำเป้าหมายที่ถูกนำส่งเข้าสู่เซลล์ที่ซึ่งมีความเกี่ยวเนื่องกับการแสดงออกของยีนในระดับ RNA ของลูกปลานิลระยะแรกฟัก ทั้งนี้หากเทียบเคียงผลการศึกษาพบว่า “receptors” ของสารฮอร์โมนเพศ MT ในลูกปลานิลที่มี 2 isoform คือ “Alpha” และ “Beta AR” (androgen receptors) เมื่อ receptor จับตัวกับฮอร์โมนเพศ MT แล้วทำให้เกิด “conformational change” จับกันเองเป็น “dimer” แล้วเคลื่อนที่เข้าไปในนิวเคลียสในเอ็มบริโอเพื่อทำหน้าที่เป็น “transcription factor” ของยีนจำเพาะที่ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนเพศปลาในลำดับถัดมา เมื่อเทียบผลการศึกษากับรูปแบบการสังเคราะห์ฮอร์โมนและกลไกการทำงานในกรณีเอ็มบริโอม้าลาย (zebra fish) พบว่าสารฮอร์โมนเพศผู้ (androgen) ที่พบคือ 11-Ketotestosterone (11-KT) เป็นสารที่ได้จากตัวตั้งต้น 2 ตัวคือ “Androstenedione” และ “Testosterone” ด้วยการทำงานร่วมกันของเอนไซม์ 11β -Hydroxylase (Cyp11c1) และเอนไซม์ 11β -Hydroxysteroid dehydrogenase (Hsd11b2) โดยมีความใกล้เคียงกับสารฮอร์โมนเพศ 17α -Methyltestosterone (MT), 17α -Methyldihydrotestosterone, 17β -Trenbolone, Mibolerone และ Mesterolone ตามลำดับ หากเปรียบเทียบผลกับการศึกษาลูกปลาม้าลายแรกฟักที่ได้รับผลจากสารฮอร์โมนเพศผู้ 17α -Methyltestosterone (MT) พบการแสดงออกของยีนอื่นหลายตัวที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาเพศและการกำหนดเพศผู้ได้แก่ *amh, dmrt1, gsdf* และ *wt1a* รวมถึงยีนที่

เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ 11-Ketotestosterone ได้แก่ *cyp11c1*และ *hsd11b2* ในขณะเดียวกันพบว่ายีนเพศเมียหลายตัวที่ถูกกดการทำงานลง ส่วนใหญ่เป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของรังไข่ เช่น *bmp15, gdf9, figla, zp2.1* และ *zp3b* อย่างไรก็ดีการทำงานของสารฮอร์โมนเพศผู้ MT ที่ตัวอ่อนปลาได้รับโดยหลักการเชิงทฤษฎีจำเป็นต้องอาศัยโปรตีนเป็นตัวรับ (androgen receptor, AR) ที่ซึ่งตั้งอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ เมื่อเกิดการจับตัวระหว่างกันจะกระตุ้นให้ AR มีการเปลี่ยนโครงสร้าง (conformational change) เกิดการจับกันเป็นคู่ (dimer) แล้วจึงเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสพร้อมกันเพื่อทำหน้าที่ใหม่เป็น “transcription factor” เพื่อกระตุ้นการสังเคราะห์ยีนเป้าหมายเป็นลำดับต่อไป

สรุปผลการวิจัย

เอ็มบริโอสายพันธุ์จิตรลดา(*Oreochromis niloticus* L., Chitralada) ที่มีอายุในช่วงพัฒนาการ “segmentation” ถึง “pharyngula” (2-3 วัน หลังปฏิสนธิ) คือระยะที่ดีที่สุดในการแปลงเพศด้วยวิธีกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์ โดยชุดการทดลองที่ให้ผลอัตราแปลงเพศผู้สูงสุดคือชุดศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ คาบสัญญาณ 100 ไมโครวินาที (อัตราส่วนช่วงสัญญาณบวกและศูนย์ส่วนละ 50 ไมโครวินาที) จำนวน 3 ลูกคลื่น มีอัตราการแปลงเพศผู้ (MSR) 89.42%±2.28% อัตราการฟัก (hatching rate, HR) 93.33%±0.58% และอัตราการรอด (survival rate, SR) 87.49%±1.71% ตามลำดับ ผลการตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค qRT-PCR (Quantitative real-time PCR) พบว่าชุดศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ เมื่อสกัด RNA พบยีนแสดงออกเพิ่มขึ้นชัดเจน 5 ยีน และยีนที่แสดงออกลดลงจำนวน 1 ยีน โดยยีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้น 5 ยีนที่พบ ได้แก่ *amh, ar, dmrt1, bmp15, gfd9* ยีนที่ลดการแสดงออกตรวจพบ 1 ยีน ได้แก่ *gsdf* และยีนที่แสดงออกอย่างต่อเนื่อง (control) ได้แก่ *rpl13a* ทั้งนี้ผลตรวจสอบกับชุด 300 และ 400 โวลต์ พบการแสดงออกของยีนพัฒนาเพศไม่เด่นชัด ผลการตรวจสอบปริมาณสารฮอร์โมนเพศที่ถูกนำส่งในเอ็มบริโอด้วยเทคนิค LC-MS/MS (Chromatography Mass Spectrometry/Mass Spectrometry) พบว่าชุดควบคุม (control) ตรวจไม่พบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ชุดการทดลองศักย์ไฟฟ้า 300 โวลต์ ตรวจพบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 51.87±1.11 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คิดเทียบเป็นปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 0.52 x 10^{-3} ไมโครกรัมต่อฟอง หรือ 0.52 นาโนกรัมต่อฟอง ชุดการทดลองศักย์ไฟฟ้า 350 โวลต์ ตรวจพบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 155.50±0.75 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คิดเทียบเป็นปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 1.56 x 10^{-3} ไมโครกรัมต่อฟอง หรือ 1.56 นาโนกรัมต่อฟอง และชุดการทดลองศักย์ไฟฟ้า 400 โวลต์ ตรวจพบปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 37.07±1.09 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม คิดเทียบเป็นปริมาณสารฮอร์โมนเพศ MT ปริมาณ 0.37 x 10^{-3} ไมโครกรัมต่อฟอง หรือ 0.37 นาโนกรัมต่อฟอง ตามลำดับ

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์เทคโนโลยีอิเล็กทรอนิกส์และคอมพิวเตอร์แห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (รหัสโครงการ NT-FD-B-22-EDS-19-56-02) และทุนสนับสนุนจากโปรแกรมเซนเซอร์ฯ ของฝ่ายบริหารคลัสเตอร์และโปรแกรมวิจัยในโครงการ “การแปลงเพศปลานิลด้วยเทคนิคไฟฟ้าจากต้นแบบสู่ระดับพร้อมใช้

งานเชิงพาณิชย์" (รหัสโครงการ P15-50561) และทุนสนับสนุนจากโปรแกรมเซนเซอร์ฯของฝ่ายบริหารคลัสเตอร์และโปรแกรมวิจัยในโครงการ "การระบุตำแหน่งรวมถึงปริมาณฮอร์โมนเพศผู้และการแสดงออกของยีนพัฒนาเพศของปลานิลที่เป็นผลจากการกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าพัลส์" (รหัสโครงการ P18-50799 ดำเนินการ พ.ศ. 2562-2563) ขอขอบพระคุณนายกฤษณุพันธ์ โกเมนไปรินทร์ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาพันธุ์สัตว์น้ำเพชรบุรี และนายพรพนม พรหมแก้ว ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงน้ำจืดสงขลา กรมประมง สำหรับตัวอย่างเอ็มบริโอเพื่อการทดลอง และขอบคุณ ดร.ชมดาว สินธุวณิชย์ และทีมนักศึกษาห้องปฏิบัติการภาคภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ สำหรับความช่วยเหลือปฏิบัติการด้านชีวเคมี

เอกสารอ้างอิง

Bunthawin, S., Wanichapichart, P. and Gimsa, J. (2007). An investigation of dielectric properties of biological cells using RC-model, *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *29*(4), 1163-1181.

Bunthawin, S., Wanichapichart, P., Tuantranont, A. and Coster, H. G. L. (2010). Dielectrophoretic spectra of translational velocity and critical frequency for a spheroid in traveling electric fields, *Biomicrofluidics*, *4*(014102), 1-13 (Doi:10.1063/1.3294082).

Bunthawin, S. Raymond J. R. and Wanichapichart, P. (2011). Dielectrophoresis of *Tetraselmis* sp., a unicellular green alga, in travelling electric fields analyzed using the RC model for a spheroid. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, *33* (5), 585-597.

Bunthawin, S. and Raymond J. R. (2013). Simulation of translational dielectrophoretic velocity spectra of erythrocytes in traveling electric field using various volume models, *Journal of Applied Physics*, *113*(014701), 1-10 (Doi:10.1063/1.4773326).

Bunthawin, S., Sornsilpa, T., Tuantranont, A., Jaruwongrangsri, K. and Raymond J.R. (2015). Monosex-male sex reversal of Nile tilapia embryos using pulse-electric field inductions. *Computational and Theoretical Nanoscience*, *12*, 1-5.

Chang, D. C., Chassy, B. M., Saunders, J. A. and Sowers, A. E. (1992). *Guide to electroporation and electrofusion*. California: Academic Press.

Chervinski, J. and Rothbard, S. (1982). An aid in manually sexing tilapia. *Aquaculture*, *26,* 389.

Department of Fisheries. (2017). Fisheries Statistics of Thailand. In *Annual Report No.9/2019.* (pp. 40-74). Bangkok: Ministry of Agriculture and Cooperatives.

McAndrew, B. J. (1993). *Sex control in Tilapiines*. London: Blackwell.

Pohl, H. A. (1978). *Dielectrophoresis: The behavior of neutral matter in non-uniform electric fields*. Cambridge: Cambridge University Press.

Srisakultiew, P. (2003). Study on status of Nile tilapia sex reversal to reduce cost. In *Complete research report.* (pp. 11-12). Bangkok: Thailand Research Fund.

Tsong, T. Y. (1991). Electroporation of cell membranes. *Biophysical Journal*, *60*, 297-306.