

การทดลองเบื้องต้นในการเหนี่ยวนำให้เพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซมด้วย ความเย็นในปลาดุกด้าน¹

A Preliminary Study on Induction of Polyploidy in *Clarias batrachus* L. by Cold Shock.

อุทัยรัตน์ ฌ นกร วิทย์ ธารชลาณุกิจและประทักษ์ ตาบทิพย์วรรณ²
Uthairat Na-Nakorn, Wit Tarnchalanukit and Prathak Tabthipwon

ABSTRACT

The two cold shock experiments were conducted in *Clarias batrachus* L. using temperature of 7 ± 2 degree Celcius. Eggs were shocked 0, 10 and 15 minutes after artificial insemination with the shock duration of 10 and 30 minutes. The results showed that almost every group of shocked eggs yielded tetraploid fry excepted the groups using eggs of 0 and 15 minutes after insemination with 30 minutes shock duration. The shock duration of 10 minutes gave better hatching and survival rates. The conclusion was drawn that the temperature of 7 ± 2 degree Celcius, although produced tetraploid but led to low survival rates of fry. Attempts should be made in order to get more suitable temperature, and shock duration should be less than 30 minutes.

บทคัดย่อ

จากการทดลองชักไข่ปลาดุกด้านด้วยความเย็น 7 ± 2 องศาเซลเซียส โดยใช้ไข่อายุ 0, 10 และ 15 นาทีหลังการผสมเทียม ช็อคนาน 10 และ 30 นาที ทำการทดลอง 2 ครั้ง พบว่าไข่ที่ชักทุกชุดการทดลอง ยกเว้นไข่อายุ 0 และ 15 นาทีที่ช็อคนาน 30 นาที ให้ลูกที่มีโครโมโซม 4 ชุด ไข่ที่ผ่านการช็อคนาน 10 นาที มีอัตราฟักและอัตราการรอดของลูกปลาดีกว่ากลุ่มที่ช็อคนาน 30 นาที จากผลการทดลองสรุปได้ว่า อุณหภูมิที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ แม้จะเหนี่ยวนำให้เกิดเตตราพลอยด์ได้ แต่ให้อัตรารอดต่ำ น่าจะได้ทดลองหาช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมกว่านี้ ส่วนช่วงเวลาในการช็อคนั้นควรจะสั้นกว่า 30 นาที

คำนำ

การเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์ (polyploid)

คือ การเพิ่มจำนวนชุดของโครโมโซม มีการทดลองกับปลาหลายชนิดในต่างประเทศ อาทิ ปลาซันแนล แกทพิช (*Ictalurus punctatus*) ปลากลุ่มซัลโมนิด์ส (Salmonids) ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) (Myers, 1986) ปลาไน (*Cyprinus carpio* L.) (Taniguchi *et al.*, 1986) เป็นต้น จุดประสงค์ของการทดลองส่วนใหญ่ก็เพื่อให้ได้ปลาโพลีพลอยด์ที่เจริญเติบโตเร็วกว่าปลาปกติ ซึ่งถึงแม้ว่าการทดลองส่วนใหญ่จะได้ผลไม่ดั่งใจ โดยปลาโพลีพลอยด์ที่ได้มักจะเจริญเติบโตไม่ดี และปลาที่มีโครโมโซมสามชุดจะเป็นหมันอย่างไรก็ตามปลาเหล่านี้มีข้อดีคือ ไม่ชะงักการเจริญเติบโตเมื่ออายุถึงวัยเจริญพันธุ์เป็นประโยชน์ต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดปลาเพศเมียล้วน โดยขบวนการไข่โนเจนซิส (gynogenesis)

การเหนี่ยวนำให้เพิ่มชุดของโครโมโซมในปลากระทำได้หลายวิธี เช่น การชักไข่ที่ได้จากการผสม

¹ ผลการวิจัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของโครงการวิจัยที่ พ-ล 4.26 เรื่องการปรับปรุงพันธุ์ปลาที่สำคัญทางเศรษฐกิจ ซึ่งได้รับเงินอุดหนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่ง มก.

² ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เทียมด้วยความร้อน ความเย็น ความดันหรือสารเคมี การเพิ่มจำนวนโครโมโซมเกิดขึ้นได้ 2 กรณี ถ้าเป็นไข่ที่รับเชื้อตัวผู้เข้าสู่เซลล์แล้ว แต่ยังไม่ปฏิสนธิ การซ็อกจะไปยังยังไมให้กำจัดโพลาร์ บอดีทิ้งไป (retention of second polar body) ไข่จึงยังมีโครโมโซม 2 ชุด เมื่อปฏิสนธิกับเชื้อตัวผู้ก็จะได้คัพภะที่มีโครโมโซม 3 ชุด ในกรณีที่ไข่เกิดการปฏิสนธิแล้ว หากทำการเหนี่ยวนำก่อนการแบ่งเซลล์ครั้งแรกจะมีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์ดังกล่าว (suppression of first cleavage) ทำให้ได้คัพภะมีโครโมโซมสี่ชุด

การทดลองในครั้งนี้มีจุดประสงค์ที่จะศึกษาความเป็นไปได้ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มชุดของโครโมโซมในปลาตุ๊กตาด่าน (*Clarias batrachus* L.) ซึ่งเป็นปลาที่สำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยโดยใช้ความเย็น เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ปรับปรุงพันธุ์ปลาตุ๊กตาด่านต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

ปลาทดลอง กัดแม่ปลาตุ๊กตาด่านที่มีไข่แก่จัดโดยสังเกตจากลักษณะท้องอูมพอประมาณ ดังเพศผู้มีสีชมพูเรื่อย ๆ ปลาเพศผู้กัดปลาที่ไม่อ้วนจนเกินไปและดังเพศก่อนข้างผู้มีสีชมพูเรื่อย ๆ กระตุ้นการตกไข่โดยใช้ต่อมได้สมองจากปลาชนิดเดียวกันนำมาบดกับน้ำกลั่น ฉีดในอัตราปลาต่อม 1 กิโลกรัมต่อแม่ปลาน้ำหนักเท่ากัน (1 โดส) เป็นเข็มแรก เว้นระยะ 6 ชั่วโมง จึงฉีดครั้งที่สองในอัตราปลาต่อม 2 กิโลกรัมต่อแม่ปลา 1 กิโลกรัม (2 โดส) พร้อมกับการฉีดเข็มที่ 2 นี้ ฉีดปลาเพศผู้ด้วยต่อมได้สมองบดในอัตราปลาต่อม 0.5 กิโลกรัมต่อปลาเพศผู้ 1 กิโลกรัม (0.5 โดส) หลังการฉีดเข็มที่สอง 10 ชั่วโมง ริดไข่จากปลาตัวเมีย จากนั้นผ่าตัดนำอวัยวะของปลาเพศผู้มาแช่ในน้ำเกลือ 0.6 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปผสมกับไข่ที่รีดได้ ไข่ที่ได้ทำการทดลอง 2 ครั้ง โดยแต่ละครั้งแบ่งกลุ่มทดลองเป็น 7 กลุ่ม ซึ่งสรุปไว้ดัง Table 1

อุปกรณ์ทำความเย็น ใช้ตู้เย็นขนาด 6.5 ลูกบาศก์เมตรซึ่งควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 7 ± 2 องศาเซลเซียส นำเพตริดิช (petri dish) จำนวน 6 ใบ บรรจุน้ำแล้ว ปรกด้วยแผ่นโฟม เพื่อควบคุม

อุณหภูมิของน้ำภายในไม่ให้เปลี่ยนแปลงเร็วนัก นำเพตริดิชที่ตั้งกล่าวแช่ไว้ในตู้เย็นจนอุณหภูมิลดลงจนกระทั่งที่ 7 ± 2 องศาเซลเซียส เมื่อเริ่มการทดลองสุ่มไข่หลังการผสมที่มีอายุต่าง ๆ กันโรยลงบนแผ่นผ้าโอล่อนแก้วขนาดเล็กกว่าเพตริดิช เล็กน้อย แล้วนำไปใส่ในเพตริดิช ที่มีน้ำอุณหภูมิดังกล่าว นำไปพักในตู้เย็น เมื่อได้เวลาตามที่กำหนด นำไข่ดังกล่าวมาพักในอุณหภูมิน้ำปกติ โดยพักในกระชังผ้าโอล่อนแก้วที่ตรงไว้ในบ่อให้อากาศตลอดเวลา เมื่อลูกปลาฟักออกเป็นตัว นับอัตราฟัก

Table 1 Time after insemination and shock duration of eggs in each treatment (shock temperature of 7 ± 2 degree Celcius)

treatment no.	time after insemination (min.)	shock duration (min)
1	incubate in ambient temperature	
2	0	10
3	0	30
4	10	10
5	10	30
6	15	10
7	15	30

การอนุบาลลูกปลา ลูกปลาในระยะ 10 วันแรกอนุบาลด้วยตัวอ่อนของไรสีน้ำตาล (artemia) หลังจากนั้นจึงให้กินไรแดงไปจนมีขนาดประมาณ 2 นิ้ว (45 วัน) นำไปตรวจสอบจำนวนโครโมโซม

วิธีการตรวจนับโครโมโซม ใช้วิธีการที่ดัดแปลงจาก Kligerman and Bloom (1977) โดยนำปลามาแช่สารละลาย 0.01% colchicine นาน 6 ชั่วโมงให้อากาศตลอดเวลา จากนั้นนำปลาฆ่าและตัดส่วนเหงือกออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ นำไปแช่ใน 0.5% โพตัสเซียมคลอไรด์ 30 นาที เก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ใน Carnoy fixative (3 absolute alcohol : 1 glacial acetic acid) การเตรียมสไลด์ทำโดยนำเนื้อเยื่อที่แช่ fixative ออกแล้ววางลงในสไลด์ที่หลุมหยด 50% acetic acid 2-3 หยด ขยี้เนื้อเยื่อให้กระจาย นำสารละลายเซลล์ที่ได้ไป

เป่าลงบนแผ่นสไลด์อื่น ๆ (อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) ย้อมด้วยสี giemsa (4% giemsa ใน 0.01 M phosphate buffer pH 6.8) นาน 1 ชั่วโมง ตรวจนับโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์และถ่ายภาพ

ผล และวิจารณ์

อัตราฟักและอัตราการรอดไข่ที่ผ่านการซ็อกด้วย ความเย็นทุกกลุ่มการทดลอง มีอัตราฟักและอัตราต่ำ (Table 2 and 3) โดยกลุ่มการทดลองที่ 2 (0, 10) มีอัตราฟัก 11.56 และ 65.43 เปอร์เซ็นต์ อัตรารอด 11.10 และ 2.47 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองครั้งที่ 1

และ 2 ตามลำดับ กลุ่มการทดลองที่ 3 (0, 30) มีอัตราฟักเป็น 0 และ 0.6 จากการทดลอง 2 ครั้ง แต่ลูกปลาที่ฟักออกเป็นตัวในการทดลองครั้งหลังตายหมดในเวลาต่อมา กลุ่มการทดลองที่ 4 (10, 10) ฟักออกเป็นตัว 42.76 และ 31.00 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอัตราการรอดเท่ากับ 1.06 และ 23.12 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มการทดลองที่ 5 (10, 30) มีอัตราฟัก 39.64 และ 0.44 เปอร์เซ็นต์ และอัตราการรอด 1.72 และ 33.33 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มการทดลองที่ 6 (15, 10) ให้อัตราฟัก 2.29 และ 2.74 เปอร์เซ็นต์ อัตรารอด 20.00 และ 17.65 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มการทดลองที่ 7 (15, 30) ฟักออกเป็นตัว 4.82

Table 2 Hatching rates (%), survival rates at 45 days (%), estimated from the total number of hatchlings) and survival rates at 45 days (%), estimated from the total number of eggs) obtained in experiment 1.

treatment no	time after insemination (min.)	shock duration (min.)	number of eggs	hatching rate (%)	survival rate (% total hatchling)	survival rate (% total eggs)
1	control	—	395	83.54	20.00	16.70
2	0	10	856	11.56	11.10	1.28
3	0	30	840	0.00	—	0.00
4	10	10	442	42.76	1.06	0.45
5	10	30	439	39.64	1.72	0.68
6	15	10	437	2.29	20.00	0.46
7	15	30	436	4.82	0.00	0.00

Table 3 Hatching rates (%), survival rates at 45 days (%), estimated from the total number of hatchlings) and survival rates (%), estimated from the total number of eggs) obtained in experiment 2.

treatment no.	time after insemination (min.)	shock duration (min.)	number of eggs	hatching rate (%)	survival rate (% total hatchlings)	survival rate (% total eggs)
1	control	—	724	73.48	12.78	9.39
2	0	10	619	65.43	2.47	1.62
3	0	30	827	0.60	0.00	0.00
4	10	10	558	31.00	23.12	7.17
5	10	30	680	0.44	33.33	0.14
6	15	10	621	2.74	17.65	0.48
7	15	30	593	0.00	—	0.00

เปอร์เซ็นต์ในการทดลองครั้งที่ 1 แต่ลูกปลาตายหมด ส่วนในการทดลองที่ 2 ไข่ไม่ฟักเป็นตัว

การที่ไข่ซึ่งผ่านการซ็อก ฟักออกเป็นตัวน้อย อาจจะเนื่องจากอุณหภูมิที่ใช้ซ็อกไข่ต่ำเกินกว่าที่ไข่ปลา จะทนได้ ปรากฏการณ์เช่นนี้พบในการซ็อกไข่ปลาแทบ ทุกชนิด อาทิ ปลาบรูก เทราท์ (*Salvelinus fontinalis*) (Lemoine and Smith, 1980) อัตรารอดในการทดลอง ทั้ง 2 ครั้ง มีความแปรปรวนค่อนข้างสูง ทั้งนี้อาจจะเนื่อง จากปัจจัยหลายประการ เช่น คุณภาพของไข่ปลาที่ใช้ ทดลองแตกต่างกัน (Lincoln *et al.*, 1974) ไข่ปลาใน กลุ่มควบคุม ซึ่งในการทดลองครั้งแรกให้อัตราฟัก 83.54 เปอร์เซ็นต์ อัตรารอด 20 เปอร์เซ็นต์ ในการ ทดลองครั้งหลังให้อัตราฟักเพียง 73.48 เปอร์เซ็นต์ อัตรารอด 12.78 เปอร์เซ็นต์ ความแตกต่างนี้จะยังเห็น ได้ชัดเจน เมื่อพิจารณาเปอร์เซ็นต์ลูกปลาที่รอดชีวิต จำนวนไข่ทั้งหมด ซึ่งเท่ากับ 16.70 และ 9.39 เพอร์- เซนต์ การที่อัตรารอดมีค่าต่ำเช่นนี้เป็นปัญหาของการ เพาะพันธุ์ปลาดุกดำโดยการผสมเทียม (อุทัยรัตน์ และวิทย์, 2527) ซึ่งอาจมีสาเหตุจากอาหารที่ให้มีขนาด ไข่เหมาะสมกับขนาดของลูกปลาซึ่งเล็กมาก นอกจากนั้น แล้วความผันแปรของอุณหภูมิขณะซ็อกไข่ก็น่าจะเป็น สาเหตุหนึ่งของความแปรปรวนดังกล่าว

แม้การทดลองในครั้งนี้จะยังมีความแปรปรวนของ อัตราฟักตลอดจนอัตรารอด ทำให้ไม่สามารถสรุปผล แปรอนันได้ แต่จะพอมองเห็นได้คร่าว ๆ ว่า การซ็อกไข่ เป็นเวลานานเกินไป จะมีผลให้อัตรารอดของคัพจะต่ำ ลง (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในปลา หลายชนิด เช่น ชันแนล แคทฟิช (Wolter *et al.*, 1981) จากการทดลองนี้พบว่าการซ็อกนาน 10 นาที ได้ผลดีกว่า การซ็อกนาน 30 นาที

การเกิดโพลีพลอยด์ จากการตรวจสอบจำนวน โครโมโซมของปลาชุดควบคุมพบว่ามีความโครโมโซม 52 แท่ง (Table 4) ตรงกับที่ Denton (1973) รายงาน ไว้

จำนวนโครโมโซมของชุดการทดลองที่ใช้ไข่ ซึ่งมีอายุหลังการผสมกับน้ำเชื้อ 0 นาที เหนียวนำด้วยความ เย็น 10 นาที พบว่าจากตัวอย่างปลา 11 ตัว นับ จำนวนโครโมโซมได้ต่าง ๆ กัน ตั้งแต่ 78-98

โครโมโซมในการทดลองที่ 1 และ 78-100 โครโมโซม จากปลา 10 ตัว ในการทดลองที่ 2

ส่วนชุดการทดลองที่ใช้ไข่หลังการผสม 10 นาที เหนียวนำด้วยความเย็น 10 นาที ในการทดลองที่ 1 พบว่าตัวอย่างที่เหลือ 2 ตัว นับจำนวนโครโมโซมได้ ในช่วง 83-100 โครโมโซม ส่วนในการทดลองที่ 2 ศึกษาตัวอย่าง 6 ตัวอย่าง จำนวนโครโมโซมอยู่ใน ช่วง 86-104 โครโมโซม

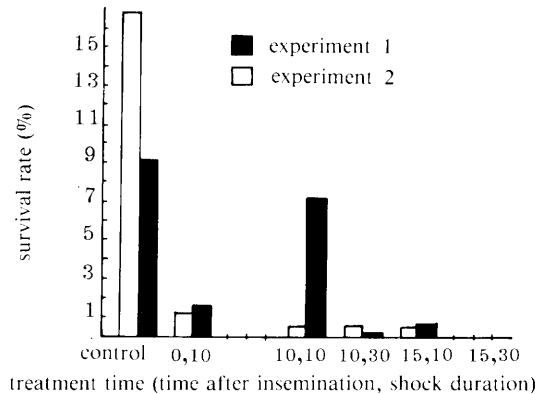


Figure 1 Histograms show survival rates at 45 days (from the total number of eggs) obtained in experiment 1 and 2

Table 4 Chromosome counts of fish in the control group.

no. of fish	chromosome number											total number of cells
	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	
3	1	-	4	3	1	4	17	6	3	1	1	41

ชุดการทดลองที่ใช้ไข่หลังการผสม 10 นาที เหนียวนำด้วยความเย็น 30 นาที นับจำนวนโครโมโซม ได้ในช่วง 81-104 จากปลา 3 ตัว ในการทดลองที่ 1 และ 92-96 โครโมโซมจากปลา 1 ตัว ในการทดลอง ที่ 2 จำนวนโครโมโซมอยู่ในช่วงใกล้เคียงกับชุดการ ทดลองที่ใช้ไข่หลังการผสม 15 นาที และเหนียวนำ ด้วยความเย็น 10 นาที (83-99 ; 86-98 จากการ ทดลองที่ 1 และ 2 ตามลำดับ) ภาพโครโมโซมของปลา ที่ซ็อกด้วยความเย็น แสดงไว้ใน (Figure 2) ส่วนชุดการ ทดลองอื่น ๆ นั้น ไม่มีตัวอย่างเหลืออยู่

ความแปรปรวนของจำนวนโครโมโซมที่เกิดขึ้น

คาดว่าจะเป็ความแปรปรวนเนื่องจากเทคนิคการเตรียม สไลด์มากกว่าอย่างอื่น ทั้งนี้เพราะโครโมโซมของปลา ลูกดำนมีขนาดเล็กมาก ทำให้สูญหายระหว่างการเตรียม สไลด์ หรือนับคลาดเคลื่อนได้ง่าย แต่อย่างไรก็ตาม คาดว่า ลูกปลาเหล่านี้จะเป็นเตตราพลอยด์ทั้งหมด ทั้งนี้เพราะจำนวนโครโมโซมที่นับได้อยู่ในช่วงสูงกว่าจำนวน 3n (78) ทั้งสิ้น ซึ่งเตตราพลอยด์นี้ น่าจะเกิด จากการแบ่งเซลล์ครั้งแรก (first cleavage) ถูกยับยั้งจึงมี จำนวนโครโมโซมเพิ่มเป็น 4 ชุด (Chourrout, 1984) เป็นที่น่าแปลกใจว่าไข่ซึ่งเพิ่งผสมกับน้ำเชื้อใหม่ ๆ แล้วนำไปช็อก (ชุดการทดลองที่ 2) ให้ลูกเตตรา-พลอยด์เช่นเดียวกัน ทั้ง ๆ ที่โดยปกติแล้วมักจะเกิด ทริพลอยด์ ดังเช่นในการทดลองในปลาซันแนล แคทฟิช (Wolters *et al*, 1981) และในเรนโบว์ เทราท์ (*Salmo gairdneri*) (Thorgaard and Jazwin, 1981)- ในการทดลองครั้งนี้ อาจจะเป็นไปได้ว่าการที่อุณหภูมิ น้ำ สูง (27-30 องศาเซลเซียส) จะทำให้ไข่เจริญเร็วจน สามารถก้ำจัดโพลาร์บอดี ไปในเวลาอันสั้น หรืออาจ

เป็นเพราะการช็อกไม่ได้อุณหภูมิต่ำเท่าที่ต้องการใน ระยะแรก ๆ (เนื่องจากอุปกรณ์ทำความเย็นมีประสิทธิภาพไม่ดีพอ) ไข่จึงมีเวลาแบ่งเซลล์ก้ำจัดโพลาร์บอดี และเกิดการปฏิสนธิก็จะได้ไซโกตซึ่งมีโครโมโซม 2 ชุดและในที่สุดอุณหภูมิจะลดลงพอเหมาะพอดีกับที่ กัพพะกำลังจะแบ่งเซลล์การทดลองของโครโมโซมจะยับ ยั้งการแบ่งแยกไซโตพลาสซึม ทำให้โครโมโซมของ ไซโกตที่เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าแล้ว ยังคงอยู่ภายในเซลล์ เดียวกันจึงทำให้ได้คัพพะเป็นเตตราพลอยด์ได้

สรุป

จากการทดลอง สรุปได้ว่า การช็อกไข่ปลาลูกดำน ด้วยความเย็น มีแนวโน้มที่จะให้ปลาเป็นเตตราพลอยด์ คือมีโครโมโซม 4 ชุด โดยควรจะศึกษาต่อไปเพื่อหา อุณหภูมิที่เหมาะสม เพื่อให้ได้อัตรารอดของลูกปลา สูงขึ้น ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมน่าจะอยู่ในช่วงที่สูงกว่า 7-2 องศาเซลเซียส สำหรับช่วงเวลาการช็อกควรจะ ต่ำกว่า 30 นาที

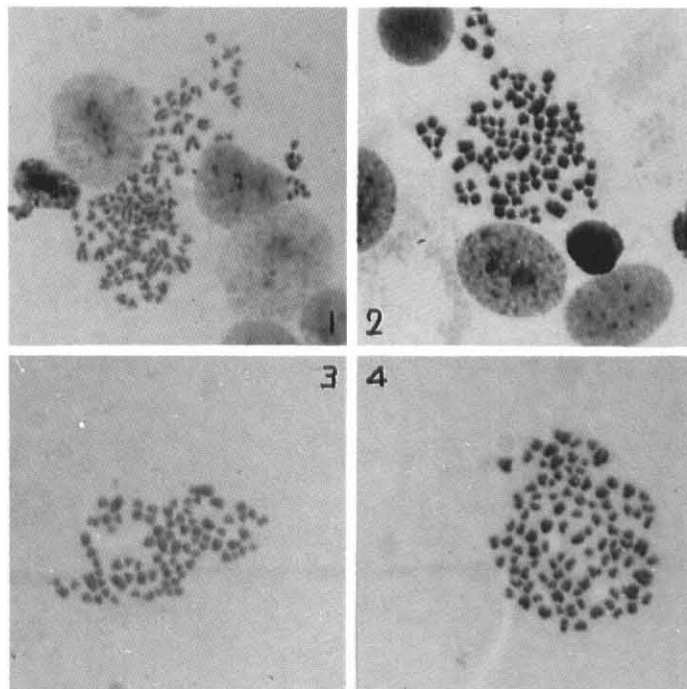


Figure 2 Chromosomes of *Clarias batrachus* L. treated with cold shock with various time after insemination and shock duration

- (1) 0 minutes after insemination, 10 minutes shock duration
- (2) 10 minutes after insemination, 10 minutes shock duration
- (3) 10 minutes after insemination, 30 minutes shock duration
- (4) 15 minutes after insemination, 10 minutes shock duration

คำขอบคุณ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ ดร.รัชนี จำปาเทศ ที่ให้คำแนะนำในการปรับปรุงเทคนิคโครโมโซม การทดลองครั้งนี้ได้รับความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจากคุณสมใจ วายา-มานนท์ จึงใคร่ขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

เอกสารอ้างอิง

อุทัยรัตน์ ณ นคร และวิทย์ ธารชลาณกิจ. 2527. รายงานความก้าวหน้าโครงการวิจัยที่ พ-ล 4.26 ประจำปี 2527. ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ, คณะประมง. 2 หน้า.

Chourrout, D. 1984. Pressure-induced retention of second polar body and suppression of first cleavage in rainbow trout : Production of all-triploids, all-tetraploids, and heterozygous and homozygous diploid gynogenetics. *Aquaculture*, 36 : 111-126.

Denton, T.E. 1973. *Fish Chromosome Methodology*. Charles C. Thomas Publisher, Illinois. 166 p.

Kligerman, A.D. and S.E. Bloom. 1977. Rapid chromosome preparations from solid tissues of fishes. *J. Fish. Res. Board Can.* 34 : 266-269.

Lemoine Jr., H.L. and L.T. Smith. 1980. Polyploidy induced in brook trout by cold shock. *Trans. Am. Fish. Soc.* 109 626-631.

Lincoln, R.F., D. Aulstad and A. Grammeltvedt. 1974. Attempted triploid induction in Atlantic salmon (*Salmo salar*) using cold shocks. *Aquaculture* 4 : 287-297.

Myers, J.M. 1986. Tetraploid induction in *Oreochromis* spp. *Aquaculture* 57 : 281-288.

Taniguchi, N., A. Kijima, T. Tamura, K. Takegami and I. Yamasaki. 1986. Color, growth and maturation in ploidy manipulated fancy carp. *Aquaculture* 57 : 321-328.

Thorgaard, G.H. and M.E. Jazwin. 1981. Polyploidy induced by heat shock in rainbow trout. *Trans. Am. Fish. Soc.* 110 : 546-550.

Wolters, W.R. G.S. Libey and C.L. Chrisman. 1981. Induction of triploidy channel catfish. *Trans. Am. Fish. Soc.* 110 : 310-312.