วิจารณ์ผล

ผลของ Cytochalasin B ต่ออัตราฟักของไข่กุ้งก้ามกราม

ผลจากการทดลองครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าระดับความเข้มข้นของ Cytochalasin B ส่งผลต่ออัตราการฟักของลูกกุ้งก้ามกราม โดยพบว่าระดับความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด และสูงที่สุด คือ 0.2 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ทำให้ไข่กุ้งมีอัตราการฟักต่ำที่สุด การที่ระดับของความเข้มข้นของ Cytochalasin B ที่ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟักลดต่ำลง อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษของ Cytochalasin B ต่อเซลล์ของไข่กุ้งก้ามกราม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bao *et al.* (1994) ที่พบว่าไข่ของกุ้ง *Penaeus chinensis* สามารถเหนี่ยวนำให้เป็นทริพลอยด์โดยใช้สารเคมี Cytochalasin B และพบความเสียหายเกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์ไข่ และไข่จะแตกเปิดออกมาภายนอก ส่งผลให้มีอัตราการฟักต่ำ และจากการรายงานของ Allen *et al.* (1982) รายงานถึงลักษณะการแบ่งเซลล์ไข่ของ *Mya areneria* (L.) ที่ผิดปกติ เมื่อได้รับ Cytochalasin B ซึ่งส่งผลให้อัตราการรอดตายของตัวอ่อนต่ำลง นอกจากนี้ Dumas and Campos-Ramos (1999)ได้ทดลองใช้สารเคมี Cytochalasin B ระดับความเข้มข้น 0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร ละลายใน dimethyl sulphoxide (DMSO) กับไข่ Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) หลังจากผสมกับน้ำเชื้อนาน 13 นาทีโดยแช่นาน 10 และ 15 นาที พบว่าไม่สามารถทำให้เกิด ทริพลอยด์ได้ เพราะว่าตัวอย่างไข่ทดลองจะตายก่อนถึงระยะ blastula-gastrula แต่ในการทดลองครั้งนี้จะพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ Cytochalasin B ที่ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ทำการเหนี่ยวนำในกุ้งก้ามกรามสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดทริพพลอยด์ได้และมีอัตราการฟักดีกว่าการทดลองดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องจากว่า ชนิดของกุ้ง และขนาดของไข่ที่แตกต่าง น่าจะมีผลทำให้การทำงานของ Cytochalasin B แตกต่างกันไปด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า Cytochalasin B จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งชีวิต และพบว่าระดับความเข้มข้นที่มากกว่า 2.5 มิลลิกรัมต่อลิตร จะทำให้เกิดอันตรายต่อมนุษย์ได้ (Bao *et al.,* 1994; Lewis, 2000) อย่างไรก็ตามในการทดลองครั้งนี้ พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของ Cytochalasin B ที่ต่ำที่สุด คือ 0.2 และ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีอัตราการฟักต่ำกว่าชุดที่เหนี่ยวนำด้วย Cytochalasin B ความเข้มข้น 0.4 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการทำงานของ Cytochalasin B เอง โดย Cytochalasin B จะยับยั้งเฉพาะการแบ่งไซโตพลาสซึมโดยยับยั้งกระบวนการสร้างไมโครฟิลาเมนท์ในผนังเซลล์ ดังนั้นเมื่อระดับความเข้มข้นของ Cytochalasin B น้อยเกินไปอาจจะทำให้การแบ่งเซลล์ของไซโตพลาสซึม ไม่สมบูรณ์ และเซลล์ผิดปกติ ส่งผลให้อัตราการฟักต่ำ ซึ่ง

สอดคล้องกับการรายงานของ Carter (1967) และ Krishan (1972) ที่รายงานว่าระดับความ Cytochalasin B ที่ต่ำเกินไปจะทำให้การแบ่งเซลล์ไม่สมบรูณ์

ผลจากการทดลองครั้งนี้พบว่า dimethyl sulphoxide ที่ระดับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไม่ส่งผลต่ออัตราการฟักของไข่กุ้งก้ามกราม ซึ่งขัดแย้งกับการรายงานของ Stepto and Cook (1998) ที่รายงานว่าในการเหนี่ยวนำให้เกิดทริพลอยด์ใน South African abalone มีอัตราการรอดต่ำเนื่องมาจากความเป็นพิษของ Cytochalasin B (0.5 mg/l) และ dimethyl sulfoxide (0.001%) ซึ่งเป็นระดับที่ต่ำกว่าการทดลองครั้งนี้มาก สาเหตุที่ทำให้การทดลองครั้งนี้ dimethyl sulphoxideที่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไม่ส่งผลต่ออัตราการฟักของไข่กุ้งก้ามกราม อาจเนื่องมาจากขนาดของไข่กุ้งก้ามกรามมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6-0.8 มิลลิเมตร (กรมประมง, 2545ข) ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าไข่ของ South African abalone มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.19 มิลลิเมตร ทำให้ dimethyl sulfoxide ที่ระดับ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ของไข่กุ้งก้ามกรามถึงแม้ว่าจะใช้ในระดับที่สูงกว่าก็ตาม

ผลของ Cytochalasin B ต่ออัตราการเกิดโพลีพลอยด์

จากผลการทดลองดังกล่าวจะพบว่าระดับความเข้มข้นของ Cytochalasin B ที่ทำให้เกิดโพลีพลอยด์สูงสุดในกุ้งก้ามกราม คือ 0.4 มิลลิกรัมต่อลิตร มีจำนวนชุดโครโมโซมที่เป็นโพลีพลอยด์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ และระดับความเข้มข้นที่ทำให้เกิดทริพลอยด์สูงที่สุด คือ 0.3 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 87.50 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังพบว่า ระดับความเข้มข้นของ Cytochalasin B ที่ 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร จะพบจำนวนชุดโครโมโซม ทั้งที่เป็น ทริพลอยด์ และ เตตราพลอยด์ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่ระดับความเข้มข้นของ Cytochalasin B ที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้เยื่อบุผิวของไข่บางลง ทำให้สเปิร์มสามารถเข้าผสมกับไข่ได้หลายตัว (polyspermy) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Lynn and Clark (1983) ที่ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเข้าผสมของสเปิร์ม กับ ไข่ของกุ้งก้ามกราม พบว่าไข่ 1 ฟอง สามารถผสมกับสเปิร์ม ได้ถึง 5 ตัว ดังนั้นเมื่อผิวของไข่บางลง จึงทำให้สเปิร์มสามารถเข้าผสมได้มากขึ้น และจากลักษณะดังกล่าวยังสามารถอธิบายสาเหตุที่ทำให้ไข่จากแม่กุ้งในชุดการทดลองเดียวกันแต่พบชุดจำนวนโครโมโซมทั้ง ทริพลอยด์ และเตตราพลอยด์ (Longo, 1972; Peaucellier *et al.,* 1974) และสอดคล้องกับการทดลองของ Stepto and Cook (1998) ที่ทำการเหนี่ยวนำด้วย Cytochalasin Bระดับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร กับ South African abalone ที่พบว่ามีจำนวนชุดโครโมโซม ทั้งที่เป็นดิพลอยด์ ทริพลอยด์ และเตตราพลอยด์ นอกจากนี้อาจมีสาเหตุมาจากการล้างทำความสะอาดเพื่อกำจัด Cytochalasin B ที่ติดมากับไข่ออกไม่หมด ดังนั้นเมื่อการช็อคสิ้นสุดลง Cytochalasin B ที่ตกค้างอยู่ส่งผลต่อการยับยั้งการแบ่งเซลล์

ครั้งแรกของไซโกต (Suppression of first cleavage) ทำให้ชุดการทดลองเดียวกันพบชุดจำนวนโครโมโซมทั้ง ทริพลอยด์ และเตตราพลอยด์

ผลจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าระดับความเข้มข้นของ Cytochalasin B ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้ดีที่สุด คือ ช่วง 0.3-0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่มีอัตราการเกิดโพลีพลอยด์ เท่ากับ 77.78 ± 44.09 ถึง 100 ± 0.00 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ Cytochalasin B ในระดับเดียวกันนี้ (0.5 และ 1 มิลลิกรัมต่อลิตร) ไม่สามารถทำให้เกิดทริพลอยด์ใน Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) (เริ่มเหนี่ยวนำหลังจากผสมกับน้ำเชื้อนาน 13 นาที แช่นาน 10 และ 15 นาที) เพราะว่าตัวอย่างไข่ทดลองจะตายก่อนถึงระยะ blastula-gastrula (Dumas and Campos-Ramos, 1999) ทั้งนี้อาจเนื่องจากความแตกต่างในเรื่อง ชนิดของสัตว์ทดลอง และขนาดของไข่ น่าจะส่งผลต่อประสิทธิภาพของ Cytochalasin B ในการเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์แตกต่างกันไปด้วย

จากผลการทดลองครั้งนี้พบว่าในการเหนี่ยวนำไม่พบการเกิดโมเสค ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Damrongphol *et al.* (1991) ที่ทำการเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกุ้งก้ามกรามโดยใช้อุณหภูมิ อาจเนื่องมาจากว่า การเหนี่ยวนำด้วย Cytochalasin B จะยับยั้งการแบ่งไซโตพลาสซึมโดยยับยั้งการสร้างไมโครฟิลาเมนท์ในผนังเซลล์ ซึ่งไม่มีผลกับขบวนการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม ทำให้ไม่พบการเกิดโมเสค เมื่อเริ่มช็อคเซลล์ที่อยู่ในระยะการแบ่งไซโตพลาสซึมก็จะถูกยับยั้งก่อน ส่วนเซลล์ที่ยังมีนิวเคลียสอยู่ในระยะต้นของการแบ่งเซลล์ก็ยังเกิดขบวนการแบ่งเซลล์ต่อเนื่องไปได้เรื่อย ๆ และเมื่อถึงระยะเวลาการแบ่งไซโตพลาสซึมการแบ่งเซลล์จะถูกยับยั้ง ทำให้จำนวนไข่ที่เป็นโพลีพลอยด์ ซึ่งมีแนวโน้มให้ผลดีกว่าวิธี การช็อคด้วยอุณหภูมิ ที่จะยับยั้งหรือทำลายสายใยสปินเดิล ซึ่งจะยับยั้งการแบ่งเซลล์ของโครโมโซม ทำให้พบการเกิดโมเสคขึ้น

ผลของ ปัจจัยร่วมระหว่างระยะเวลาหลังการผสมไข่กับน้ำเชื้อ กับระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ ไม่ส่งผลต่อการเกิดทริพลอยด์ของไข่กุ้งก้ามกราม อาจเนื่องจากการที่ระยะเวลาหลังการผสมไข่กับน้ำเชื้อ 15-30 นาที ยังเป็นช่วงเวลาที่อาจมีการแบ่งเซลล์ไมโอซิสระยะที่ 2 และกำจัดโพลาร์บอดี ชุดที่ 2 ออกไป โดยจากการรายงานของ Damrongphol *et al.,* (1991) พบว่า เมื่อได้รับการผสมพันธุ์ กุ้งก้ามกรามจะสิ้นสุดการแบ่งเซลล์ไมโอซิส ครั้งที่ 2 ในระยะเวลา 20 นาที แต่ผลที่ได้มีความแปรปรวนสูงมากเพราะเมื่อทำการตรวจสอบหลายครั้งในสภาพแวดล้อมเดิม พบว่าระยะเวลาในการแบ่งเซลล์ไมโอซิสระยะที่ 2 และกำจัดโพลาร์บอดีชุดที่ 2 ใช้เวลาแตกต่างกันออกไป ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องมาจาก สภาพแวดล้อมและความสมบูรณ์ของแม่พันธุ์ที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำในการทดลองครั้งนี้อาจใกล้เคียงกันมาก เกินไป ส่งผลให้การ

เหนี่ยวนำให้เกิดทริพลอยด์ของไข่กุ้งก้ามกรามไม่แตกต่างกัน หรืออาจเกิดจากช่วงระยะเวลาที่กำหนดทั้งระยะเวลาหลังการผสมไข่กับน้ำเชื้อ และระยะเวลาในการเหนี่ยวนำไม่ครอบคลุมต่อการกำจัดโพลาร์บอดีชุดที่ 2 ออกไป

การตรวจสอบการเกิดทริพลอยด์

การตรวจสอบลูกกุ้งโพลีพลอยด์โดยใช้วิธีโฟลว์ไซโตเมตรี พบว่าลูกกุ้งก้ามกรามที่มีชุดโครโมโซมเป็น ดิพลอยด์ มีสัดส่วนของ DNA content มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.97 $\pm$ 0.13 ลูกกุ้งก้ามกรามที่มีชุดโครโมโซมเป็น ทริพลอยด์ มีสัดส่วนของ DNA content มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.47 $\pm$ 0.14 และลูกกุ้งก้ามกรามที่มีชุดโครโมโซมเป็น เตตราพลอยด์ จะมีสัดส่วนของ DNA content มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.95 $\pm$ 0.17 ช่วงเวลาที่เหมาะสมต่อการตรวจสอบการเกิดทริพลอยด์ ด้วยเครื่องโฟลว์ไซโตเมตรี คือไข่กุ้งก้ามกรามที่ผ่านการเหนี่ยวนำมาแล้ว 8 วัน ซึ่งเป็นตัวอย่างของไข่กุ้งที่มีการผสมกันอย่างสมบูรณ์แล้วและพัฒนาจนเห็นจุดตาอย่างชัดเจน และสอดคล้องกับการศึกษาของ Damrongphol *et al.* (1990) ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยงเอมบริโอของกุ้งก้ามกราม พบว่าไข่กุ้งที่พัฒนาจนเห็นจุดตาอย่างชัดเจน จะมีอายุหลังการผสม 8 วันขึ้นไป และในการตรวจสอบโพลีพลอยด์ ด้วยเครื่องโฟลว์ไซโตเมตรี สิ่งที่สำคัญที่สุด คือ สีที่ใช้ย้อม DNA ต้องเป็นสีที่จำเพาะกับเครื่อง โฟลว์ ไซโตเมตรี ดังนั้นในการตรวจสอบควรใช้สีย้อม DNA ที่เครื่องมือระบุ และใช้สีย้อมที่เตรียมไว้นานไม่เกิน 12 ชั่วโมง และตัวอย่างที่เติม Extraction buffer ต้องทิ้งไว้นาน 3 นาทีก่อนที่จะนำมาย้อมสี เพราะปริมาณ DNA จึงจะมีปริมาณมากพอที่จะทำการตรวจสอบด้วยเครื่องมือโฟลว์ ไซโตมิเตอร์ได้ และในการเตรียมตัวอย่างทุกครั้งต้องทำในที่มืดเพราะสีย้อมจะมีความไวแสงมาก เมื่อสีย้อมโดนแสงจะเสื่อมสภาพทำให้การย้อมไม่ติดเซลล์ และตัวอย่างที่เตรียมต้องเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อป้องกันการเสื่อมสภาพของเซลล์

ผลการตรวจนับโครโมโซมพบว่า กุ้งก้ามกรามมีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ เท่ากับ 104-118 แท่ง สอดคล้องกับการรายงานของ Cha'vez Justo *et al.* (1991) ที่การศึกษาคารีโอไทพ์ของกุ้งก้ามกราม พบว่า กุ้งก้ามกรามมีจำนวนโครโมโซมที่เป็นดิพลอยด์ เท่ากับ 118 แท่ง ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ เมตาเซนตริก และซับเมตาเซนตริก (metacentric/submetacentric) ชนิดละ 45 แท่ง และแบบอะโครเซนตริก และทีโลเซนตริก (acrocentric/telocentric) ชนิดละ 14 แท่ง และในการทดลองครั้งนี้กลุ่มที่ผ่านการเหนี่ยวนำให้เกิดทริพลอยด์ได้สำเร็จ มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเท่ากับ 165-182 แท่ง โดยมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากปกติอีก 1 ชุด นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเพื่อหาจำนวนของชุดโครโซมที่เป็นทริพลอยด์ ในกุ้งชนิดอื่นๆ เช่น Dumas and Campos-Ramos (1999)

พบว่าใน Pacific white shrimp มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 71-116 แท่ง และกุ้งทริพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 110-154 แท่ง และ Li *et al.* (2003b) ได้ทำการเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยใช้ความร้อนใน Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) พบว่ากุ้ง ดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 88 แท่งและกุ้งทริพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเท่ากับ 132 แท่ง วิธีการตรวจสอบทริพลอยด์โดยการนับโครโมโซมนี้ แม้จะเป็นวิธีที่ใช้เวลานาน และค่อนข้างยาก โดยเฉพาะในกุ้ง เนื่องจากกุ้งมีจำนวนโครโมโซมมาก แต่วิธีการนี้ก็เป็นที่นิยม อย่างน้อยก็เป็นการยืนยันผลการตรวจวัดโดยวิธีอื่นได้เป็นอย่างดี