การตรวจเอกสาร

การเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์

การเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มชุดของโครโมโซม (polyploidization) เป็นการจัดการชุดของโครโมโซม (Chromosome-set manipulation) ไปในทางเพิ่มจำนวนชุดขึ้น โพลีพลอยด์ที่มีการรายงานในสัตว์น้ำส่วนใหญ่จะเป็น ทริพลอยด์และเตตราพลอยด์ ในการเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์นั้นมีปัจจัยหลายประการที่จะกำหนดความสำเร็จของการเหนี่ยวนำ ปัจจัยเหล่านั้น ได้แก่

1. เวลาเริ่มช็อค การช็อคจะได้ผลเมื่อช็อคในขณะที่ไข่กำลังจะกำจัดโพลาร์บอดี หรือเมื่อไซโกตกำลังจะแบ่งเซลล์ครั้งแรก ดังนั้นจึงต้องทำการทดลองหาเวลาเริ่มช็อคที่เหมาะสมก่อนว่าจะเริ่มช็อคหลังการผสมไข่กับน้ำเชื้อเป็นเวลากี่นาที

2. ระยะเวลาในการช็อค หากช็อคด้วยเวลาสั้นเกินไป อัตราการเกิดโพลีพลอยด์จะต่ำ แต่อัตราฟักจะสูง เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการช็อคขึ้น อัตราการเกิดโพลีพลอยด์จะสูงขึ้นเรื่อย ๆ แต่อัตราฟักจะต่ำลง ระยะเวลาในการช็อคที่เหมาะสมจะเปลี่ยนไปตามอุณหภูมิระหว่างการช็อคด้วย หากช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำระยะเวลาในการช็อคก็จะต้องนานขึ้น เพราะการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ช้าลงตามอุณหภูมิ

3. วิธีการช็อคและระดับการช็อคที่เหมาะสม การช็อคสามารถทำได้หลายวิธี ได้แก่ การช็อคด้วยอุณหภูมิ ความดัน และสารเคมี การช็อคทั้ง 3 วิธีนี้มีประสิทธิภาพต่างกัน นอกจากนั้นระดับอุณหภูมิ ความดันและความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสม ก็จะแตกต่างกันไป (อุทัยรัตน์, 2543)

การเหนี่ยวนำให้เกิดทริพลอยด์ ในสัตว์น้ำสามารถทำได้โดยการช็อคเพื่อให้ไข่เก็บโพลาร์บอดี ไว้ (retention of polar body) โดยสามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ใน 2 ระยะ คือ

1. ระยะไมโอซิส ครั้งที่ 1 (meiosis I) ในการแบ่งเซลล์ไมโอซิสระยะที่ 1 นั้น โฮโมโลกัสโครโมโซมที่แยกจากกันชุดหนึ่งจะถูกเก็บไว้ในนิวเคลียสของไข่ อีกชุดหนึ่งจะถูกกำจัดออกมาเป็นโพลาร์บอดี อันที่ 1 (first polar body)

2. ระยะไมโอซิส ครั้งที่ 2 (meiosis II) การแบ่งเซลล์ไมโอซิสระยะที่ 2 จะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อตัวผู้เจาะผ่านผนังเซลล์ไข่ (vitelline membrane) โครโมโซมชุดหนึ่งก็จะถูกกำจัดออกไปเป็นโพลาร์บอดีอันที่ 2 ดังนั้นหากสามารถยับยั้งไม่ให้ไข่กำจัดโพลาร์บอดีชุดที่ 2 จะทำให้ตัพภะที่ได้มีโครโมโซม 3 ชุด วิธีการนี้เรียกว่า เป็นการเก็บรักษาโพลาร์บอดีชุดที่ 2 (retention of second polar body)

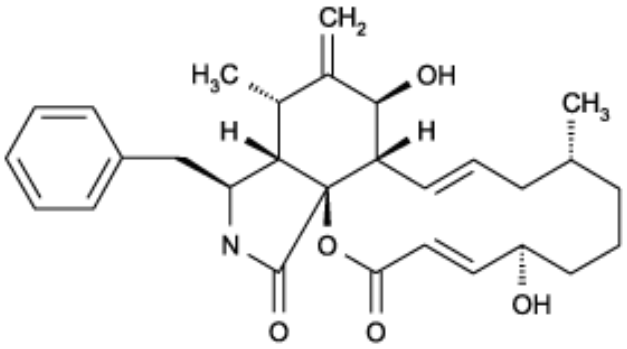
การเหนี่ยวนำให้เกิดเตตราพลอยด์ ในสัตว์น้ำยังสามารถทำได้โดยการช็อคเพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ครั้งแรกของไซโกต (suppression of first cleavage) การช็อคลักษณะนี้ทำได้ยาก สามารถทำได้ผลดีเมื่อช็อคด้วยความดันเท่านั้น (Thorgaard, 1986) เทคนิคการเหนี่ยวนำ polyploidy นี้ได้ถูกนำไปใช้ประโยชน์ในเชิงธุรกิจจนประสบผลสำเร็จอย่างมากในปลา เช่น Pacific salmon, Coho salmon (*Oncorhynchus kitsutch)*, Sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) (Thorgaard, 1983; Utter *et al.,* 1983; Teskeredzic *et al.,* 1993; Felip *et al.,* 1999) และกลุ่มหอยสองฝา เช่นหอยนางรม (*Crassostrea gigas*), European clam (*Ruditapes decussates* L.) (Cooper and Guo, 1989; Desrosiers *et al.,* 1993; Gerard *et al.,* 1994a,b, 1999; Guo *et al.,* 1996) เป็นต้น ส่วนในกุ้ง มีรายงานความสำเร็จเชิงการค้าในกุ้ง *P. chinensis* (Xiang,1991, 1992; Dai *et al.,* 1993; Bao *et al.,* 1994)

การช็อคด้วยสารเคมี (Chemical shock)

การช็อคด้วยสารเคมีสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มชุดของโครโมโซม เช่น โคลชิซิน (Colchicine) ไซโตคาลาซิน-บี (Cytochalasin-B) ไนตรัสออกไซด์ (Nitrous oxide) และยาสลบอื่น ๆ อีกหลายชนิด (Johnstone *et al.,* 1989) และการเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์โดยใช้สารเคมีนั้น นิยมใช้ Cytochalasin B (Bao *et al.,* 1994) และ 6-dimethylaminopurine (Xiang *et al.,* 2001) เป็นหลักการใช้สารเคมีในการเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์ในกุ้งมีน้อยมาก จากการรายงานของ Norris *et al.* (2005) โดยใช้ 6-Dimethylaminopurine ที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 150 $\mu mol/L^{-1}$ กับกุ้ง *Penaeus japonicus* (Bate) ระยะเวลาการช็อค 8-10 นาที หลังผสม 10 นาที มีอัตราเกิดทริพลอยด์เท่ากับ 37.45$\pm$21.63 และ 41$\pm$8.92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ Sellars *et al.* (2006) เหนี่ยวนำ ทริพลอยด์ในกุ้ง *P. japonicus* (Bate) ด้วย 6-Dimethylaminopurine ที่ระดับความเข้มข้น 200 µM ระยะเวลาการช็อค 4-5 นาที หลังผสม 1-3 นาที มีอัตราเกิดทริพลอยด์เท่ากับ 55.28$\pm$5.45 เปอร์เซ็นต์ในระยะเอ็มบริโอ และ 46.7$\pm$7.20 เปอร์เซ็นต์ในนอเพลียส และที่ระดับความเข้มข้น 200 µM ระยะเวลาการช็อค 16 นาที หลังผสม 1-3 นาที มีอัตราเกิดทริพลอยด์เท่ากับ 52.49$\pm$11.00 เปอร์เซ็นต์ในระยะเอ็มบริโอ และ 79.38$\pm$5.24 เปอร์เซ็นต์ในนอเพลียส ส่วน Cytochalasin B เป็น

สารที่นิยมใช้ในการเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ โดยเฉพาะในหอย เช่น หอยนางรมอเมริกัน (*Crassostrea gigas*), หอยตะโกรม (*Crassostrea lugubris*) หรือ หอยลาย (*Paphia undulata*) เป็นต้น นอกจากนั้นมีการใช้ในปลากลุ่มซัลโมนิดส์บางชนิด และในกุ้ง *Penaeus chinensis* แต่ยังไม่พบการรายงานการใช้ในกลุ่มของกุ้งก้ามกราม (ดังแสดงในตารางที่ 1) โดยระดับความเข้มข้นของ Cytochalasin B ที่ส่งผลต่อการเกิดโพลีพลอยด์น่าจะเกี่ยวข้องกับขนาดของไข่ ด้วย และพบว่า Cytochalasin B ไม่ได้ยับยั้งหรือทำลายสายใยสปินเดิลเหมือนกับการช็อควิธีอื่น แต่จะยับยั้งเฉพาะการแบ่งไซโตพลาสซึมโดยยับยั้งการสร้างไมโครฟิลาเมนท์ในผนังเซลล์ ดังนั้นนิวเคลียสจะแบ่งตัวตามปกติแต่ยังคงรวมกันอยู่ในเซลล์เดียวกัน ทำให้ได้เซลล์ที่มีสองนิวเคลียสหรือมากกว่า (Carter, 1967; Krishan, 1972) และเซลล์เหล่านี้เมื่ออยู่ในสภาพที่ไม่มี Cytochalasin B ก็จะกลายเป็นโพลีพลอยด์ (Defendi and Stocker, 1973; Hoehn *et al.,* 1973)

Cytochalasin B หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า Phomin มีสูตรโครงสร้างเป็น $C_{29}H_{37}NO_5$ เป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการเมตทาบอลิซึมของเชื้อรา มีฤทธิ์ในการยับยั้งกระบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Paralyze)ในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง เช่น กระบวนการ Locomotion, Phagocytosis และ Cytokinesis เป็นต้น โดย Cytochalasin B จะจับกับ actin ซึ่งจะไปยับยั้งกระบวนการ Polymerization (Stenesh., 1975)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของ Cytochalasin-B ($C_{29}H_{37}NO_5$)
ที่มา: Axxora (2006)

Cytochalasin B เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ แต่จะละลายใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) (Downing and Allen, 1987) ในการช็อคด้วย Cytochalasin B นั้นอุณหภูมิก็มีส่วนสำคัญ เพราะเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น Cytochalasin B จะเข้าจับบริเวณที่ออกฤทธิ์และแยกตัวออกมาได้เร็วขึ้น ซึ่งแน่นอนว่าผลการยับยั้งจะแตกต่างกันออกไป โดยทฤษฎีแล้วการเหนี่ยวนำด้วย Cytochalasin B มีแนวโน้มว่าจะให้ผลดีกว่าวิธีอื่น ๆ อาทิ การช็อคด้วยอุณหภูมิและความดัน เพราะ Cytochalasin B จะยับยั้งการแบ่งไซโตพลาสซึมโดยไม่มีผลกับขบวนการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม เมื่อเริ่มช็อคเซลล์ที่อยู่ในระยะการแบ่ง ไซโตพลาสซึม กระบวนการนี้ก็จะถูกยับยั้งก่อน ส่วนเซลล์ที่ยังมีนิวเคลียสอยู่ในระยะต้นของการแบ่งเซลล์ ก็ยังเกิดกระบวนการแบ่งเซลล์ต่อเนื่องไปได้เรื่อย ๆ และเมื่อถึงระยะเวลาการแบ่งไซโตพลาสซึมการแบ่งเซลล์จะถูกยับยั้งทำให้จำนวนไข่ที่เป็นโพลีพลอยด์น่าจะมีมากกว่า ส่วนการช็อคด้วยวิธีอื่นจะยับยั้งการเคลื่อนที่ของโครโมโซม กระบวนการต่าง ๆ ระหว่างการแบ่งเซลล์จึงถูกยับยั้งทันทีที่เริ่มช็อค ดังนั้นการช็อคจะได้ผลกับเซลล์ที่อยู่ในระยะที่เหมาะสมขณะเริ่มการช็อคเท่านั้น

ลักษณะของสัตว์ที่เป็นโพลีพลอยด์และทริพลอยด์

สัตว์ที่เป็นโพลีพลอยด์และทริพลอยด์ จะแสดงลักษณะที่สำคัญ 2 ประการดังนี้

1. เป็นหมันและการเจริญของระบบสืบพันธุ์ลดลง คือปลาไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ เนื่องจากโฮโมโลกัสโครโมโซม (homologous chromosome) ไม่สามารถเข้าคู่กันได้ในขบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

จากการศึกษาของ Van Eenennaam *et al.* (1990) พบว่าสภาพของปลาเฉาที่เป็นทริพลอยด์มีความสามารถในการขยายพันธุ์ลดลง ส่วนมากจะเป็นหมัน เช่นเดียวกับที่ Thompson *et al.* (1987) รายงานว่าปลาเฉาเพศผู้ที่เป็นทริพลอยด์สามารถผลิตน้ำเชื้อที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของไข่ได้ แต่ปริมาณของน้ำเชื้อที่ผลิตได้จะมีปริมาณเพียง 1 ใน 5 ของปลาเฉาเพศผู้ที่เป็นดิพลอยด์เท่านั้น ส่วนในปลาทริพลอยด์เพศเมียไม่สามารถสร้างไข่ได้ และปลาตะเพียนขาวที่เป็นทริพลอยด์ ในอัณฑะจะมี spermatozoa อยู่จำนวนน้อย เซลล์สืบพันธุ์ส่วนใหญ่อยู่ในระยะ spermatocytes และ spermatids (Na-Nakorn and Legrand ,1992) ปลา channel catfish (*Ictalurus punctatus*) พบว่าปลาทริพลอยด์ทั้งตัวผู้และตัวเมียจะเป็นหมัน ที่อัณฑะจะไม่พบเชื้อตัวผู้ และการเจริญของอัณฑะผิดปกติ ส่วนตัวเมียจะมีรังไข่เล็กกว่าปลา ดิพลอยด์อย่างเห็นได้ชัด และภายในไม่มี

เซลล์ไข่ (Wolters *et al.,* 1982a) ในกุ้ง พบว่ากุ้ง *Peneaus chinensis* ที่เป็นทริพลอยด์ เซลล์สืบพันธุ์ส่วนใหญ่ภายในอัณฑะอยู่ในระยะ spermatocytes และ spermatids และสเปิร์มมีลักษณะพิการ และกุ้งทริพลอยด์เพศเมีย เซลล์สืบพันธุ์จะอยู่ในระยะก่อนการสะสมโยล์ค มีรังไข่เล็กกว่ากุ้งดิพลอยด์อย่างเห็นได้ชัด (Li *et al.,* 2003a; Xiang *et al.,* 2006) จากการศึกษาของ Johnson *et al.* (1986) พบว่าในปลา coho salmon ที่เป็นดิพลอยด์และทริพลอยด์เมื่อถึงช่วงเจริญพันธุ์ปลาทริพลอยด์เพศผู้มีการเจริญของระบบสืบพันธุ์ลดลงโดยมีค่าเฉลี่ย (gonosomatic index: GSI) เป็น 35.70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับปลาดิพลอยด์ ส่วนปลาทริพลอยด์เพศเมียมีค่า GSI 11.80 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับปลาเพศเมียที่เป็นดิพลอยด์ แสดงว่ารังไข่ไม่มีการพัฒนา และ วรวุฒิ (2537) ศึกษาในปลาตะเพียนขาว พบว่าค่า GSI ของปลาทริพลอยด์ทั้งเพศผู้และเพศเมียต่ำกว่าปลาดิพลอยด์ ภายในอัณฑะพบเซลล์สืบพันธุ์ทุกระยะรวมทั้งสเปิร์มซึ่งมีจำนวนเพียงเล็กน้อย รังไข่มี โอโอไซท์พัฒนาอยู่ในระยะก่อนการสะสมโยล์ค ขณะที่ปลาดิพลอยด์มีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เป็นปกติ

2. อัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เนื่องมาจากว่าสัตว์ที่เป็นทริพลอยด์ส่วนใหญ่จะเป็นหมัน และเมื่อสัตว์เป็นหมันจะทำให้อัตราการเจริญเติบโต และประสิทธิภาพการใช้อาหารดีขึ้นมากกว่าสัตว์ที่เป็นปกติ (Cassani and Caton, 1985) เนื่องจากไม่ต้องแบ่งพลังงานบางส่วนไปใช้ในการสืบพันธุ์ โดยไม่หยุดชะงักหลังวัยเจริญพันธุ์ (อุทัยรัตน์, 2543) เช่น ปลานิล และ หอย 2 ฝาเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ในฤดูวางไข่ หอยจะมีอัตราการตายเพิ่มขึ้น ดังนั้นหากเหนี่ยวนำให้เกิดทริพลอยด์ และเป็นหมัน จะช่วยลดอัตราการตายลงได้ ทำให้หอยสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น เนื่องจากไม่ต้องนำโปรตีนที่สะสมไว้ไปใช้สร้างไข่และน้ำเชื้อ (Downing and Allen,1987) หรือ กุ้ง *Peneaus chinensis* ที่เป็นทริพลอยด์มีการเจริญเติบโตในระยะสมบูรณ์เพศดีกว่ากุ้งดิพลอยด์ และมีสัดส่วนเพศเมียต่อเพศผู้คิดเป็น 4:1 ในขณะที่กุ้งดิพลอยด์มีสัดส่วน 1:1 ส่วนกุ้งชนิดอื่นยังไม่มีการรายงาน (Li *et al.,* 2003a; Xiang *et al.,* 2006) จากการรายงานของ Wolters *et al.* (1982a) พบว่าปลา channel catfish ที่เป็นทริพลอยด์มีน้ำหนักมากกว่าปลาที่เป็นดิพลอยด์หลังจากมีอายุได้ 8 เดือนขึ้นไป โดยปริมาณการกินอาหารไม่แตกต่างกัน และอัตราการแลกเนื้อ (feed conversion ratio) ของปลาทริพลอยด์เมื่ออายุ 14 เดือนมีค่าดีกว่าปลาดิพลอยด์

นอกจากนี้ยังพบว่าสัตว์ที่เป็น เตตราพลอยด์จะมีอัตราการรอดตายต่ำ (Yamazaki and Goodier, 1993) แต่จะมีประโยชน์ในการนำไปผลิต สัตว์ให้มีจำนวนชุดโครโมโซมเป็นทริพลอยด์ โดยการผสมพันธุ์ระหว่างสัตว์ที่มีชุดโครโมโซมเป็นเตตราพลอยด์กับดิพลอยด์ จะได้ลูกออกมาเป็นทริพลอยด์ ซึ่งจะแข็งแรงกว่าพวกที่ได้จากการเหนี่ยวนำโดยตรง จากผลการทดลองผสมพันธุ์

ระหว่างเตตราพลอยด์กับดิพลอยด์ พบว่า สามารถผลิตลูกทริพลอยด์ได้ 100 เปอร์เซ็นต์ ในหอยนางรม (*Crassostrea gigas*), หอยนางรมลูกผสม (C. *gigas* × C. *ariakensis*), ปลาเรนโบว์เทราท์ (*Oncorhynchus mykiss*) และ ปลาคาร์พลูกผสม (*Crassius auratus* red var. × *Cyprinus carpio* L.) (Chourrout *et al.,* 1986; Guo and Allen, 1994; Guo *et al.,* 1996; Liu *et al.,* 2001; Huayong and Allen, 2002; Wang *et al.,* 2002)

การตรวจสอบสภาพโพลีพลอยด์

การตรวจสอบสภาพโพลีพลอยด์สามารถทำได้ 3 วิธีการดังนี้

1. การนับจำนวนโครโมโซม เป็นวิธีการที่บอกระดับโพลีพลอยด์ได้โดยตรง อย่างไรก็ตาม แม้วิธีการนี้จะบอกผลการเหนี่ยวนำได้แน่นอนที่สุดแต่ก็ต้องใช้เวลานาน มีรายงานการตรวจสอบสภาพโพลีพลอยด์โดยการนับจำนวนโครโมโซม โดย Dumas and Campos-Ramos (1999) ทำการทดลองการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ใน Pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei* Boone) พบว่า มีจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์เท่ากับ 71-116 แท่ง และกุ้งทริพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเท่ากับ 110-154 แท่ง ซึ่งกุ้ง *Litopenaeus vannamei* จะมีจำนวนโครโมโซม ดิพลอยด์ ไม่เกิน 100 และทริพลอยด์ จะมีจำนวนโครโมโซมไม่น้อยกว่า 120 แท่ง และ Li *et al.* (2003b) ได้ทำการทดลองหาวิธีการที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยใช้ความร้อนใน Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*) พบว่า กุ้งดิพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 88 แท่ง และกุ้งทริพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเท่ากับ 132 แท่ง

2. การวัดปริมาตรนิวเคลียสของเซลล์เม็ดเลือดแดงหรือปริมาตรของเม็ดเลือดแดง การศึกษาขนาดเซลล์และนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง พบว่าขนาดของเซลล์และนิวเคลียสของปลาโพลีพลอยด์มีขนาดเพิ่มขึ้น เป็นสัดส่วนกับการเพิ่มระดับของความเป็นโพลีพลอยด์โดยที่สัดส่วนระหว่างปริมาตรของเซลล์และนิวเคลียสไม่เปลี่ยนแปลง Beck and Biggers (1983) ศึกษาในปลาลูกผสมระหว่างปลาเฉาเพศเมีย กับปลาเล่ง (*Hypophthalmichthys nobilis* Rich.) พบว่านิวเคลียสและเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาลูกผสมที่เป็นทริพลอยด์ มีขนาดใหญ่กว่าปลาดิพลอยด์ที่เป็นพ่อแม่และลูกผสมที่เป็นดิพลอยด์ด้วย โดยมีปริมาตรของนิวเคลียสและเซลล์ เฉลี่ยเป็น 1.51 และ 1.67 เท่าตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับปลาลูกผสมที่เป็นดิพลอยด์ แต่สัดส่วนของปริมาตรของนิวเคลียสต่อปริมาตรของเซลล์ ทั้งปลาดิพลอยด์และทริพลอยด์ไม่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในปลา

อื่น ๆ เช่น ปลาเรนโบว์เทราท์, ปลาในสกุล Poeciliopsis และปลา channel catfish พบว่าปลาที่เป็นทริพลอยด์มีนิวเคลียสใหญ่กว่าปลาที่เป็นดิพลอยด์ (Thorgaard and Gall, 1979; Cimino, 1973; Wolters *et al.,* 1982b) ดังนั้นจึงสามารถใช้ปริมาตรนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดง บอกระดับจำนวนชุดของโครโมโซมได้

3. การวัดปริมาณ DNA ในเซลล์โดยใช้วิธีโฟลว์ ไซโตเมตรี (flow cytometry) โดยนำเอาอวัยวะที่สามารถสกัด DNA มาสกัดโดยใช้ Extraction buffer และ นำมาย่อยสลาย RNA ภายในเม็ดเลือดแดงด้วยเอนไซม์อาร์เอ็นเอส (RNAse) ก่อนการย้อม เนื่องจากสีย้อมดังกล่าวสามารถย้อมติด RNA ด้วย ซึ่งจะทำให้ผลการตรวจนับสูงกว่าความเป็นจริง ถ้าไม่ทำการย่อยสลาย RNA เสียก่อน แล้วเติมสีเรืองแสง Propidium iodide (PI) จากนั้นนำไปวัดด้วยเครื่องมือโฟลว์ ไซโตมิเตอร์ เครื่องจะแสดงกราฟของ ปริมาณ DNA ของเซลล์ ซึ่งจะปรากฏที่ตำแหน่งต่างกันตามปริมาณ DNA เมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานของกุ้งก้ามกรามดิพลอยด์ก็จะทราบได้ว่ากุ้งที่นำมาตรวจสอบเป็นทริพพลอยด์หรือไม่ (Dube *et al.,* 1991) หลักการทำงานของ โฟลว์ ไซโตเมตรี คือ การตรวจนับหรือวัดลักษณะจำเพาะของอนุภาค หรือ เซลล์ ที่กำลังไหลผ่านลำแสงเป็นแถวเรียงเดี่ยว โดยลักษณะที่สามารถนับหรือวัดได้โดยตรง คือขนาด (cell size) และองค์ประกอบภายใน (granularity) ข้อจำกัดของอนุภาค หรือ เซลล์ ที่จะสามารถใช้ โฟลว์ ไซโตเมตรีได้ จะต้องเป็นสารแขวนลอยเท่านั้น และเนื้อเยื่อต่าง ๆ จะต้องถูกทำให้แยกออกเป็นเซลล์ เดี่ยว ๆ ก่อน จึงจะสามารถตรวจสอบได้

การเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ในกุ้งก้ามกราม

กุ้งก้ามกราม เป็นกุ้งขนาดใหญ่ อยู่ในวงศ์ Palaemonidae กุ้งก้ามกรามเพศผู้และเพศเมียจะเริ่มแสดงลักษณะเพศที่แตกต่างกันเมื่อลูกกุ้งก้ามกรามมีอายุหลังจากระยะคว่ำนาน 45 วัน โดยเพศผู้จะมี ช่องทางออกของเซลล์สืบพันธุ์ (gonophores complex) ที่ด้านในของโคนขาเดินคู่ที่ 5 ส่วนตัวเมียจะมีช่องเปิดสำหรับไข่อยู่ที่โคนขาคู่ที่ 3 และในฤดูวางไข่ ภายในหัวของกุ้งเพศเมียจะมีสีแสดหรือสีแดงอมเหลืองเด่นชัด สำหรับเพศผู้จะไม่ปรากฏสีให้เห็น (วิกรม, 2549) เมื่อกุ้งก้ามกรามเจริญเต็มที่พร้อมที่จะสืบพันธุ์ พบว่า กุ้งก้ามกรามตัวผู้ มีต่อมผลิตน้ำเชื้อมีลักษณะเป็นพูแบน 2 พู ขนาดกว้างประมาณ 3 มิลลิเมตร ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร กุ้งก้ามกรามเพศเมียมีรังไข่ มีลักษณะเป็นพูแบน ๆ 2 พู ปลายทางด้านหน้าเชื่อมติดกัน

กุ้งก้ามกรามจะเริ่มผสมพันธุ์และวางไข่เมื่อมีอายุประมาณ 6 เดือน สามารถผสมพันธุ์และวางไข่ได้ตลอดปี เมื่อการผสมพันธุ์สิ้นสุดลง เพศเมียจะวางไข่ภายใน 3-20 ชั่วโมง หลังจากการผสมพันธุ์ มีพฤติกรรมต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ หลังวางไข่ 0-10 นาที เป็นช่วงการปฏิสนธิของไข่ บริเวณช่องอกและขาว่ายน้ำจะหุบเข้าหากันทำหน้าที่ป้องกันไข่ไม่ให้กระจายออกไปกับน้ำ ในขณะนี้ถ้าถูกรบกวน ไข่จะถูกสลัดทิ้ง เนื่องจากไข่ยังไม่เหนียว หลังการวางไข่ 11-35 นาที ปล้องลำตัวทั้ง 4 ปล้องทางด้านล่างจะมีไข่อยู่เต็มทุกปล้อง และขาว่ายน้ำคู่ที่ 5 จะทำหน้าที่พัดโบกน้ำให้ไหลผ่านเพื่อเพิ่มออกซิเจนให้แก่ไข่ หลังการวางไข่ 35-40 นาที ไข่กุ้งในระยะนี้เริ่มเหนียวจับตัวกันเป็นแผ่นและไม่สามารถแยกไข่ออกมาจากแม่กุ้งได้ หลังการวางไข่ 70 นาที ไข่กุ้งสามารถทนทานกับการสัมผัสได้ และสามารถแยกออกมาจากแม่กุ้งโดยไข่ไม่พองแตก (วิกรม, 2549) และไข่จะติดอยู่ที่หน้าท้องแม่นาน 17-21 วันก่อนที่จะฟักออกเป็นตัว จากการรายงานของ Damrongphol *et al.* (1991) พบว่า เซลล์ไข่ของกุ้งก้ามกรามได้รับการผสมพันธุ์ ไข่จะกำจัดโพลาร์บอดี อันที่ 1 หลังจากไข่ได้รับการผสม 5 นาที และการแบ่งเซลล์ในระยะอนาเฟส ของการแบ่งเซลล์ไมโอซิส ครั้งที่ 2 (meiosis II) จะเกิดขึ้นภายใน 10-15 นาที และ สิ้นสุดในระยะเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิน้ำ 25 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกันกับ Manush *et al.* (2006) ที่พบว่ากุ้งก้ามกรามกำจัดโพลาร์บอดี อันที่ 1 หลังจากไข่ได้รับการผสม 5-6 นาที ที่อุณหภูมิน้ำ 28 องศาเซลเซียส ซึ่งระยะเวลาต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้ว จะช่วยให้เราสามารถระบุเวลาที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำให้เป็นทริพลอยด์ ได้มากขึ้น

กุ้งก้ามกรามที่มีชุดโครโมโซม 2n จะมีจำนวนโครโมโซมทั้งหมด 118 แท่ง ประกอบด้วยโครโมโซมแบบ เมตาเซนตริก และซับเมตาเซนตริก (metacentric/submetacentric) ชนิดละ 45 แท่ง และแบบอะโครเซนตริก และทีโลเซนตริก (acrocentric/telocentric) ชนิดละ 14 แท่ง (Cha'vez Justo *et al.,* 1991) การปรับปรุงพันธุ์โดยใช้เทคนิคโพลีพลอยด์เข้ามาช่วยในการจัดชุดโครโมโซมในกุ้งยังมีน้อยมาก พบรายงานในการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในกุ้ง Pacific white shrimp, *Litopenaeus vannamei* (Boone) โดย Dumas and Campos-Ramos (1999) ด้วยการใช้อุณหภูมิต่ำที่ 10 องศาเซลเซียส กับไข่ *Litopenaeus vannamei* (Boone) หลังจากผสมกับน้ำเชื้อนาน 10 และ 12 นาทีโดยแช่นาน 10, 15 และ 20 นาทีสามารถทำให้เกิดทริพลอยด์ได้ และมีอัตราการรอดตาย 62-88 เปอร์เซ็นต์ และ เหนี่ยวนำการเกิดทริพลอยด์ใน Chinese shrimp, *Fenneropenaeus chinensis* โดยใช้อุณหภูมิที่สูงกว่าปกติ (29-32 องศาเซลเซียส) เหนี่ยวนำนาน 10 นาที โดยเริ่มหลังการผสม 18-20 นาที พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด ทริพลอยด์มากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ (Li *et al.,* 2003b) สำหรับกุ้งในสกุล *Macrobrachium* นั้น มีรายงานการเหนี่ยวนำเตตราพลอยด์ในกุ้ง *M. nipponense* โดยใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แช่นานน้อยกว่า 1.5 นาที หลังจากการผสมไข่กับน้ำเชื้อเป็นเวลานาน

210-230 นาทีได้เตตราพลอยด์ 36.8 เปอร์เซ็นต์ (Qiu *et al.,* 1997) และจากการศึกษาของ Damrongphol and Jaroensastraraks (2001) ได้ทำการทดลองเหนี่ยวนำโพลีพลอยดีในกุ้งก้ามกราม โดยใช้อุณหภูมิ 12 องศาเซลเซียส หลังจากการผสมไข่กับน้ำเชื้อเป็นเวลานาน 4 และ 6 ชั่วโมง ได้ลูกกุ้งก้ามกรามที่เป็นโพลีพลอยด์ เท่ากับ 12.3±5.3 และ 23.0±8.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และใช้อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส หลังจากการผสมไข่กับน้ำเชื้อเป็นเวลานาน 4 และ 6 ชั่วโมง ได้ลูกกุ้งกุ้งก้ามกรามที่เป็นโพลีพลอยด์ 11.5±8.2 และ 9.5±7.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าโพลีพลอยด์ที่ได้จากการเหนี่ยวอยู่ในสภาพโมเสค (Mosaic) คือ สภาพที่มีเซลล์โพลีพลอยด์ (เตตราพลอยดี) ปะปนอยู่กับเซลล์ดิพลอยด์