วิธีการ

การเตรียมพ่อแม่พันธุ์

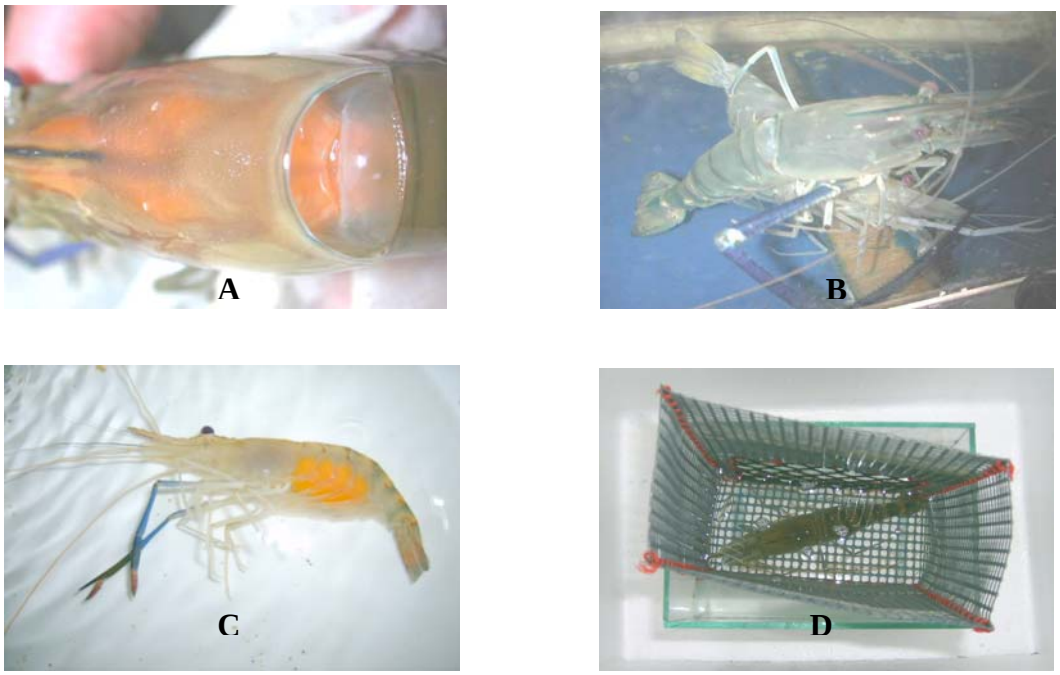
พ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้นำมาจาก ศูนย์วิจัยสัตว์น้ำจืด บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) ทำการคัดเลือกพ่อพันธุ์ที่สมบูรณ์เพศ จำนวน 30 ตัว โดยเลือกกุ้งที่มีก้ามขาเดินคู่ที่ 2 เป็นสีฟ้า (blue claw) อายุประมาณ 6-7 เดือน น้ำหนัก 60-80 กรัม และเลือกแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์เพศ อายุประมาณ 5-6 เดือน น้ำหนัก 35-50 กรัม จำนวน 150 ตัว

นำพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามมาปรับสภาพในถังไฟเบอร์ขนาดความจุ 2 ลูกบาศก์เมตร อุณหภูมิน้ำ 28-30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน แยกเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์กุ้งก้ามกรามในตู้ขนาด 30 x 60 x 30 เซนติเมตร น้ำลึก 30 เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 54 ลิตร แบ่งตู้ทดลองออกเป็น 4 ช่องโดยใช้ PE พลาสติกเป็นตัวกั้น นำกุ้งก้ามกรามมาปล่อยในตู้ทดลองอัตราส่วน พ่อพันธุ์ 1 ตัวต่อแม่พันธุ์ 3 ตัว ต่อตู้ ปิดด้านหน้าและหลังตู้ทดลองโดยใช้สแลนสีดำ

ให้อาหารสำเร็จรูปเบอร์ 9044 (ระดับโปรตีน 32%) ในอัตรา 1% ต่อน้ำหนักตัว ให้ 2 มื้อต่อวัน เวลา 8.00 และ 16.00 น. และเสริมอาหารด้วย Vitamin C และ น้ำมันปลา เก็บข้อมูลคุณภาพน้ำ อุณหภูมิ, pH และ DO ทุกวัน และ Ammonia, Nitrite, Alkalinity และ Hardness ทุก 3 วัน

การผสมพันธุ์และการเก็บตัวอย่างไข่

นำแม่กุ้งที่ลอกคราบ และมีไข่สีเหลืองบริเวณหัว มาผสมพันธุ์กับกุ้งตัวผู้ ในตู้ขนาด 30 x 60 x 30 เซนติเมตร น้ำลึก 30 เซนติเมตร ปริมาตรน้ำ 54 ลิตร จำนวน 30 ตู้ โดยอัตราการปล่อย เพศผู้ 1 ตัว ต่อเพศเมีย 1 ตัว ต่อ 1 ตู้ทดลอง และปล่อยทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง จากนั้น ตรวจสอบถุงน้ำเชื้อในบริเวณหน้าอกของกุ้งตัวเมีย (ขาเดินคู่ที่ 3) หากพบถุงน้ำเชื้อ ก็นำกุ้งตัวผู้ออกจากตู้ทดลอง และสังเกตสีของไข่ เมื่อไข่ของกุ้งตัวเมียเคลื่อนจากหัวไปยังหน้าท้อง (ซึ่งเป็นไข่ที่ได้รับการผสมนาน 15-20 นาที) ให้นำแม่กุ้งไปทำการเหนี่ยวนำให้เกิดทริพลอยด์ตามวิธีการที่กำหนด (ดังแสดงในภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 ลักษณะกุ้งตัวเมียที่หัวเหลืองที่พร้อมผสมพันธุ์ (A) และนำมาปล่อยในตู้กระจกเพื่อให้กุ้งตัวผู้ผสมพันธุ์กุ้งตัวเมียที่เพิ่งลอกคราบ(B) เมื่อกุ้งตัวเมียที่มีไข่เต็มท้องและได้รับการผสมกับน้ำเชื้อพร้อมที่จะนำมาเหนี่ยวนำไข่จะอยู่บริเวณหน้าท้องและมีสีเหลืองเข้ม (C) จากนั้นนำกุ้งตัวเมียมาทำการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี Cytochalacin B (D)

การเหนี่ยวนำให้เกิดทริพลอยดี

ศึกษาอายุของไข่หลังการผสมกับน้ำเชื้อ ที่เหมาะสมในการเริ่มการเหนี่ยวนำ ระยะเวลาและระดับความเข้มข้นของสารเคมีที่เหมาะสม ในการเหนี่ยวนำให้กุ้งก้ามกรามมีโครโมโซม 3 ชุด

การเหนี่ยวนำด้วย Cytochalasin B (Sigma, C6762) ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Dumas and Campos-Ramos (1999) แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ปัจจัย ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 คือ ที่ระดับความเข้มข้นของ Cytochalasin B 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยละลายใน dimethyl sulphoxide (DMSO) 0.1 %

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาหลังไข่ผสมกับน้ำเชื้อนาน 15-20, 21-25 และ 26-30 นาที (Damrongphol *et al.,* 1991)

ปัจจัยที่ 3 คือ ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำที่ 10 และ 15 นาที โดยนำแม่กุ้งก้ามกรามที่ไข่ติดหน้าท้องและได้รับการผสมน้ำเชื้อจากตัวผู้แช่ทั้งตัวลงในสารเคมีที่เตรียมไว้ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตามปัจจัยที่ 1 โดยเริ่มแช่หลังไข่ผสมกับน้ำเชื้อเป็นระยะเวลาต่างๆกัน (ปัจจัยที่ 3) หลังการเหนี่ยวนำ นำแม่กุ้งไปเลี้ยงในถังพลาสติก ปริมาตรน้ำ 15 ลิตร

กลุ่มควบคุมแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มควบคุมชุดที่ 1 นำแม่กุ้งก้ามกรามที่ไข่ติดหน้าท้องและได้รับการผสมน้ำเชื้อจากตัวผู้นาน 15-20, 21-25 และ 26-30 นาที แช่ในสารละลาย dimethyl sulphoxide (0.1%) นาน 10 และ 15 นาที โดยการแช่ทั้งตัวลงในสารเคมีที่เตรียมไว้ จากนั้นนำไปเลี้ยงในถังพลาสติก ปริมาตรน้ำ 15 ลิตร

กลุ่มควบคุมชุดที่ 2 นำแม่กุ้งก้ามกรามที่ไข่ติดหน้าท้องและได้รับการผสมน้ำเชื้อจากตัวผู้นาน 15-20, 21-25 และ 26-30 นาที นำไปเลี้ยงในถังพลาสติก ปริมาตรน้ำ 1ลิตร

การนับอัตราการฟัก

นำกุ้งก้ามกรามที่มีไข่และผ่านการช็อคด้วยสารเคมีมาเลี้ยงในถังพลาสติก ปริมาตรน้ำ 15 ลิตร ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป วันละ 2 ครั้ง แม่กุ้งก้ามกรามจะใช้เวลาในการฟักไข่ ประมาณ 17-21 วัน ก่อนที่ไข่กุ้งจะฟักออกเป็นตัว และคำนวณหาปริมาณของไข่กุ้งที่ติดในหน้าท้องแม่กุ้ง ก่อนการฟักออกเป็นตัว จากสูตรของ อำพน และคณะ (2510)

$$\text{Log } F = -2.3686 + 3.1703 \text{ Log} L$$

เมื่อ F = จำนวนไข่ (ฟอง)

L = ความยาวลำตัว (มิลลิเมตร)

นับอัตราการฟัก โดยสุ่มนับจำนวนตัวของลูกกุ้งที่ออกมาโดยใช้ช้อนตวงที่เจาะรูและนับจำนวนจริง 1 ช้อน จากนั้นนับจำนวนทั้งหมดที่มีและเทียบกลับเพื่อหาจำนวนจริง เพื่อประเมินอัตราการฟัก (hatching rate) ดังนี้

$$\text{อัตราการฟัก} = \frac{\text{จำนวนลูกกุ้งที่ได้}}{\text{จำนวนไข่ที่ได้}} \times 100$$

การตรวจสอบสภาพโพลีพลอยด์

ตรวจสอบสภาพโพลีพลอยด์ โดยวัดปริมาณ DNA ในเซลล์โดยใช้วิธีโฟลว์ไซโตเมตรี โดยนำไข่กุ้งก้ามกรามที่ผ่านการเหนี่ยวนำและมีอายุ 8 วัน มาทำการตรวจสอบ โดยทำการตรวจสอบ ไข่จากแม่กุ้งทุกตัวที่ทำการทดลอง และการเตรียมตัวอย่างดัดแปลงจากวิธีของ Norris *et al.* (2005) โดยมีขั้นตอนและวิธีการ ดังนี้

(1) นำไข่กุ้งก้ามกรามที่สุ่มดึงมาจากหน้าท้องของแม่กุ้งบริเวณปล้องที่ 1 ในแนวลึก และชั่งลงในหลอด Eppendorf ขนาด 1.5 ml จำนวน 0.1 g (10% ของไข่ทั้งหมด) มาบดละเอียดใน Extraction buffer 500 µl ทิ้งไว้ 30-60 วินาที และนำมากรองผ่าน Celltrics 50 µm ลงในหลอดทดลอง ขนาด 3 ml

(2) เติมสารละลาย staining solution 2 ml (CyStain PI Absolut P Code 05-5022) ลงในหลอดทดลอง แช่ทิ้งไว้ 30-60 นาที ทุกขั้นตอนต้องทำที่อุณหภูมิ 4 ºC และต้องทำในที่มืดเพื่อป้องกันแสง

(3) การวัดปริมาณ DNA นำหลอดทดลองมาตรวจวัดปริมาณ DNA ในเซลล์โดยใช้วิธีโฟลว์ไซโตเมตรี (flow cytometry-red channel) เครื่อง (BD FACSCanto) จะแสดงกราฟปริมาณ DNA ของเซลล์ และปรากฏตำแหน่งต่าง ๆ กันตามปริมาณ DNA เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกุ้งก้ามกรามดิพลอยด์ นำค่า PI-A Mean ที่ได้มาคำนวณหาสัดส่วนปริมาณ DNA ที่พบภายในเซลล์ จากสูตร ของ Liu *et al.* (2001) ดังนี้

$$\text{Ratio DNA content} = \frac{\text{[DNA content in treatment]}}{\text{[DNA content in control]}}$$

ตรวจนับจำนวนโครโมโซม โดยดัดแปลงจากวิธีการของ Chen and Ebeling (1968); Cha'vez Justo *et al.* (1991) และ Nanda *et al.* (1995) มีขั้นตอนวิธีการดังนี้

(1) นำกุ้งก้ามกรามที่ศึกษาน้ำหนักประมาณ 30 กรัม มาตัดขาเดินคู่ที่ 2 และแยกเลี้ยงในตู้กระจกเป็นเวลา 1 สัปดาห์

(2) ตัดส่วนของขาเดินคู่ที่ 2 ที่งอกออกมาใหม่ ซึ่งมีความยาวประมาณ 4 มิลลิเมตร นำมาแช่ในสารละลาย Colchicine 0.05 เปอร์เซ็นต์ นาน 30 นาที

(3) นำขาเดินที่ตัดออกมา แช่ในสารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.9 เปอร์เซ็นต์ นาน 35 นาที

(4) การตรึงโครโมโซม เพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงและรักษาสภาพเนื้อเยื่อให้อยู่ในสภาพสมบูรณ์ โดยแช่ในน้ำยาคงสภาพ (fixative solution) ที่เตรียมขึ้นใหม่ ซึ่งประกอบด้วย เอธานอล (ethanol): กรดอะซิติก (acetic acid) สัดส่วน 3:1 แช่อย่างน้อย 2 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 30 นาที

(5) การเตรียมสไลด์ นำเนื้อเยื่อออกจากน้ำยาคงสภาพ วางบนกระดาษกรองเพื่อซับเอาน้ำยาออก แช่ในกรดอะซิติก 50 เปอร์เซ็นต์ บดก้ามกุ้งก้ามกรามที่งอกใหม่ให้ละเอียด ใช้ pasteur pipette ดูดสารละลายที่มีเซลล์กระจายอยู่ไปเป่าบนสไลด์ที่สะอาด และมีอุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส แล้วรีบดูดสารละลายกลับ การเป่าพยายามให้บางที่สุด เพื่อให้เซลล์กระจายไม่ทับกันหนาทึบ โดยให้มีสไลด์ละ 2-3 วง เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 เซนติเมตร

(6) การย้อมสี นำสไลด์ที่แห้งแล้วแช่ใน Giemsa เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ใน 0.1 โมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่ pH 6.8 นาน 1 ชั่วโมง ล้างสีที่มากเกินออกด้วยน้ำกลั่น แล้วทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจหาโครโมโซม

(7) การตรวจนับโครโมโซม นำสไลด์ที่ย้อมสีแล้วมาตรวจหาโครโมโซม ด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 1000 เท่า เพื่อหาเซลล์ในระยะเมตาเฟต ที่มีโครโมโซมกระจายตัวดี ไม่ซ้อนทับกัน จากเซลล์ทั้งหมดจำนวน 10 เซลล์ต่อตัวอย่าง 1 ตัว

การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

วิเคราะห์อัตราการฟัก อัตราการเกิดทริพลอยดี ตามแบบการวางแผนการทดลองแบบแฟกตอเรียล โดยจัดสิ่งทดลองแบบสุ่มตลอด (7 x 3 x 2 factorial in CRD) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's new multiple range tests (SPSS 11.5)

สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

ทำการทดลองที่ศูนย์วิจัยสัตว์น้ำจืด บริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหาร จำกัด (มหาชน) สุพรรณบุรี และห้องปฏิบัติการพันธุศาสตร์สัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เริ่มการทดลองเดือน มกราคม 2549 สิ้นสุดการทดลองเดือน มกราคม 2550