บทที่ 1

บทนำ

หอยนางรมปากจีบเป็นทรัพยากรสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ เพราะเนื้อหอยนางรมมีคุณค่าทางโภชนาการสูงสามารถแปรรูปเป็นอาหารกระป๋อง หอยนางรมรมควัน และน้ำมันหอย นอกจากนี้เปลือกหอยนางรมยังใช้เป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์และผลิตปูนขาว หอยนางรมปากจีบเป็นที่นิยมเลี้ยงกันมากบริเวณชายทะเลทางภาคตะวันออก และมีแนวโน้มการเพิ่มปริมาณการเลี้ยงขึ้นเรื่อย ๆ ในอนาคต แต่ผลผลิตที่ได้ยังไม่คุ้มค่าเท่าที่ควรเพราะหอยนางรมมีคุณภาพเนื้อไม่สม่ำเสมอ ผู้เลี้ยงหอยนางรมจึงไม่สามารถจำหน่ายหอยนางรมส่งขายได้ตลอดทั้งปี จากรายงานการศึกษาของ Downing และ Allen (1987) กล่าวสรุปไว้ดังนี้คือในขณะที่สัตว์น้ำผลิตเซลสืบพันธุ์จะทำให้คุณภาพของสัตว์น้ำลดลง เป็นสาเหตุของการตายและยับยั้งการเติบโต ซึ่งก่อปัญหาให้กับการจำหน่ายหอยนางรมในฟาร์มเลี้ยงหอยนางรมหลายแห่ง เช่นที่ฟาร์มเลี้ยงหอยนางรม *Crassostrea gigas* ในเมืองวอชิงตันและ *C.virginica* ในรัฐแมทซาชูเสต ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยที่ทางฟาร์มเลี้ยงหอยนางรมทั้ง 2 แห่งสามารถจำหน่ายหอยนางรมได้เฉพาะในช่วงที่ไม่มีการสืบพันธุ์วางไข่ ส่วนในช่วงที่หอยนางรมมีการสืบพันธุ์วางไข่คุณภาพเนื้อของหอยนางรมจะมีคุณภาพต่ำจึงไม่เป็นที่ต้องการของตลาด และจากการศึกษาของไพโรจน์ พรหมานนท์ (2512) ในหอยนางรมปากจีบที่บ้านแหลมแท่น จังหวัดชลบุรี โดยการประเมินคุณภาพเนื้อของหอยนางรม จากการตรวจวัดปริมาณเนื้อโดยน้ำหนักของหอยนางรมในรอบปีพบว่าปริมาณเนื้อโดยน้ำหนักของหอยนางรมมีความสัมพันธ์กับช่วงที่มีการสืบพันธุ์วางไข่ คือภายหลังจากหอยนางรมมีการสืบพันธุ์วางไข่ไปแล้วปริมาณเนื้อโดยน้ำหนักของหอยนางรมจะต่ำลง การที่หอยนางรมมีคุณภาพต่ำมากในช่วงที่มีการสืบพันธุ์วางไข่ เพราะประมาณ 55 เปอร์เซนต์ ของน้ำหนักตัวหอยนางรมเป็นส่วนของเซลสืบพันธุ์ซึ่งเป็นการยืนยันได้ว่าถ้าหอยนางรมมีการสืบพันธุ์และวางไข่ไปแล้ว เนื้อเยื่อภายในตัวหอยจะต้องลดลงอย่างแน่นอน จึงเป็นสาเหตุให้คุณภาพเนื้อของหอยนางรมต่ำลง (Perdue, quoted in Allen and Downing, 1986; Allen et al., 1989) จากปัญหาที่หอยนางรมมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอตลอดปีจึงได้มีการผลิตหอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์มาทดแทนหอยนางรมพันธุ์ปกติ เนื่องจากหอยนางรมทริพลอยด์มีการพัฒนาของเซลสืบพันธุ์ต่ำกว่าดิพลอยด์และไม่ปล่อยเซลสืบพันธุ์เมื่อถึงฤดูสืบพันธุ์วางไข่ เนื้อเยื่อของหอยนางรม

จึงไม่ลดลง ดังนั้นคุณภาพเนื้อหอยนางรมจึงสม่ำเสมอตลอดปี (Allen and Downing, quoted in Beaumont and Fairbrother, 1991) หอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์จึงได้ถูกเสนอให้เป็นสัตว์น้ำที่ได้จากการจัดการทางพันธุกรรมที่มีคุณค่าในการเพาะเลี้ยงตั้งแต่ปี ค.ศ. 1972 (Purdom, quoted in Allen et al., 1989)

วัตถุประสงค์

จากประเด็นปัญหาคุณภาพที่ไม่สม่ำเสมอของเนื้อหอยนางรมปากจีบ และการขาดข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญด้านคาริโอไทป์ในหอยนางรมปากจีบ การศึกษานี้ได้เน้นการหาวิธีที่เหมาะสมในการเหนี่ยวนำทริพลอยด์เพื่อให้สามารถนำไปใช้ปรับปรุงผลผลิตในการเพาะเลี้ยงหอยนางรมปากจีบ และใช้ข้อมูลคาริโอไทป์ของหอยนางรมปากจีบเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยา และเป็นประโยชน์ต่อการจัดการทางพันธุกรรมในหอยนางรมปากจีบต่อไปในอนาคต โดยมีวัตถุประสงค์ของการศึกษาดังนี้

1. ศึกษาคาริโอไทป์ของหอยนางรมปากจีบ
2. ศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์
3. เปรียบเทียบการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบโดยวิธีต่าง ๆ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สำรวจเอกสาร

ชีววิทยาของหอยนางรม

หอยนางรมปากจีบเป็นหอยนางรมพันธุ์เล็ก เรียกกันตามพื้นบ้านว่าหอยอีรมหรือหอยเจาะ เป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่งที่ใช้เนื้อเป็นอาหาร ส่วนเปลือกนำมาบดผสมในอาหารสัตว์หรือเผาไฟทำเป็นปูนขาว ทุกส่วนของหอยนางรมเป็นสิ่งที่มีราคา โดยเฉพาะเนื้อหอยนางรมเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีราคาแพง

อนุกรมวิธาน (Classification) ของหอยนางรมปากจีบ (Abbott and Dance, 1991)

Phylum Mollusca

Class Pelecypoda (Bivalvia)

Order Filibranchia

Family Ostreidae

Genus *Saccostrea*

Species *cucullata* Born, 1778

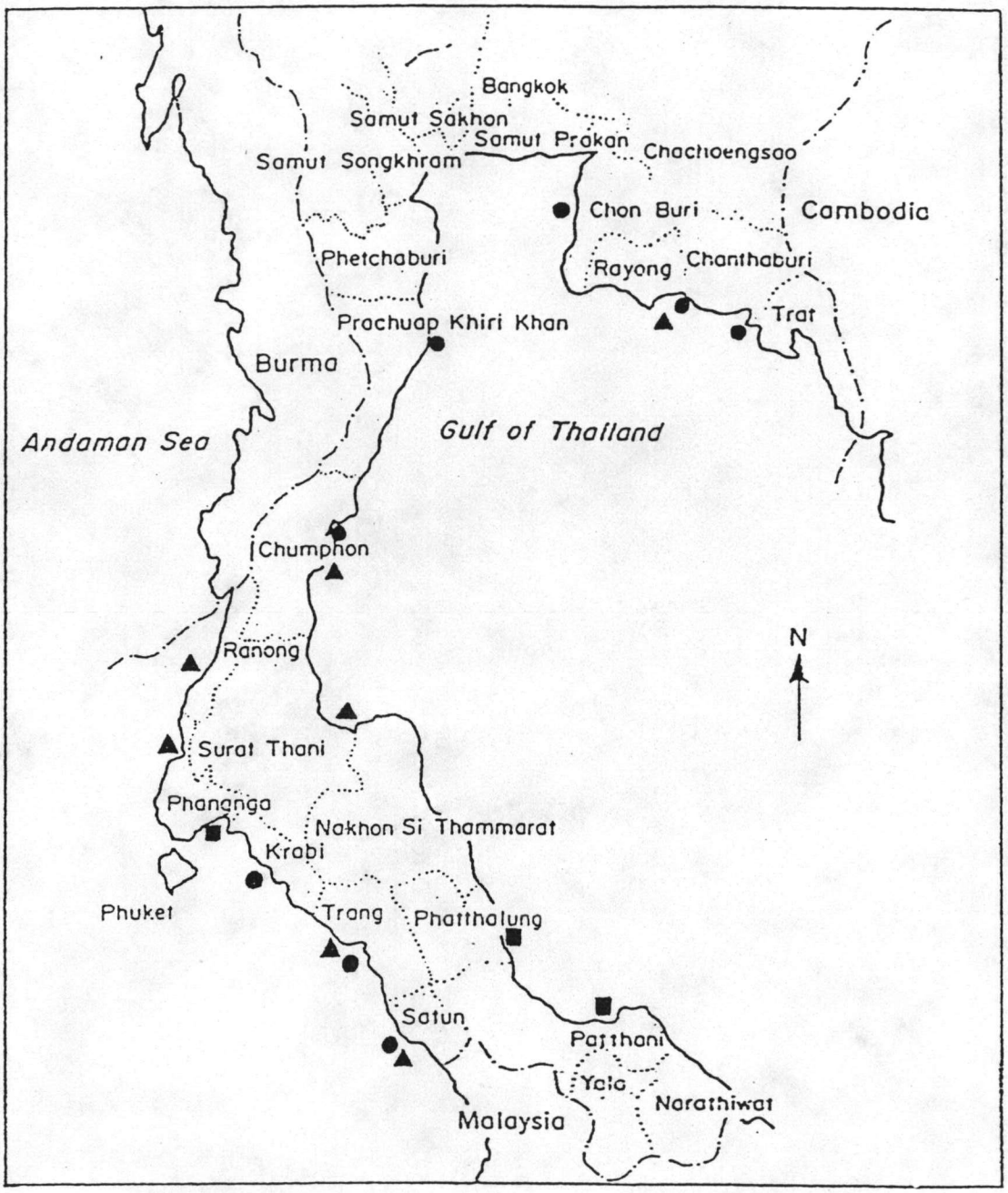
หอยนางรมปากจีบเป็นหอยสองฝาชนิดหนึ่ง ฝาด้านบนแบนราบ ฝาด้านล่างมีรูปร่างโค้งเว้าคล้ายถ้วยหรือจาน ฝาด้านหนึ่งจะติดอยู่กับวัสดุแข็ง ได้แก่ก้อนหิน ไม้หลัก และเปลือกหอยที่จมอยู่ในทะเล ฝาทั้งสองเชื่อมประสานกันด้วยบานพับ ส่วนปลายสุดของฝาบนทางด้านบานพับมีลักษณะค่อนข้างแหลมยื่นออกไปเล็กน้อย ผิวภายนอกของฝาทั้งสองมีสภาพเป็นแผ่นคล้ายเกล็ดเรียงซ้อนกันเป็นวงริ้วรอยนูนคล้ายลูกฟูกโดยเริ่มจากริมเปลือกถึงก้นหอย

หอยนางรมปากจีบอาศัยอยู่ตามชายฝั่งทะเลที่มีลักษณะเป็นหาดหินในบริเวณชายทะเลฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน ที่มีความเค็มของน้ำเปลี่ยนแปลงอยู่เสมอ และมีความเค็มของน้ำค่อนข้างต่ำ พบมากในจังหวัดชลบุรี ตราด จันทบุรี ประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร กระบี่ ตรังและสตูล (รูปที่ 1)

การสืบพันธุ์วางไข่ของหอยนางรม

หอยนางรมปากจีบมีเพศผู้และเพศเมียแยกกันคนละตัวเช่นเดียวกับหอยชนิดอื่น ๆ ไม่ปรากฏว่ามีรายงานใดหรือผู้ใดกล่าวถึงการจำแนกเพศของหอยนางรม โดยดูจากลักษณะภายนอกของเปลือกหอย แต่เราสามารถจำแนกเพศของหอยนางรมได้โดยการเปิดฝาออกตรวจอวัยวะเพศและสังเกตจากสีของอวัยวะเพศบริเวณรังไข่หรือถุงน้ำเชื้อ โดยรังไข่ของเพศเมียมีสีครีมเด่นชัด ส่วนเพศผู้นั้นมีสีค่อนข้างขาวคล้ายน้ำนม แต่ถ้าต้องการให้ทราบอย่างแน่ชัดต้องใช้วิธีผ่าตัดบริเวณรังไข่หรือถุงน้ำเชื้อ แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จึงสังเกตเห็นความแตกต่างของไข่และสเปิร์มได้อย่างชัดเจน ไข่ที่มีความสมบูรณ์เพศต้องมองเห็นนิวเคลียสได้ชัดเจนและมีสีเหลืองแก่หรือเหลืองอมแดง ส่วนสเปิร์มที่มีความสมบูรณ์เพศต้องมีการเคลื่อนไหวรวดเร็ว (Golfsoff, 1964) หอยนางรมที่สามารถทำการสืบพันธุ์วางไข่ได้มักมีอายุประมาณ 1 ปี และมีความยาวเฉลี่ยประมาณ 3 เซนติเมตร (มาโนช หงษ์พร้อมญาติ, 2510)

การสืบพันธุ์ของหอยนางรม หอยนางรมเป็นหอยที่มีการปฏิสนธิภายนอก เมื่อถึงฤดูสืบพันธุ์วางไข่ทั้งเพศเมียและเพศผู้จะทำการฉีดไข่และสเปิร์มไปในน้ำทะเลและผสมกันภายนอก โดยที่การสืบพันธุ์วางไข่ของหอยนางรมจะขึ้นกับความเหมาะสมของสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ ได้แก่ ปริมาณความเข้มข้นของออกซิเจนในน้ำ และปริมาณอาหาร (แพลงก์ตอน) เป็นต้น หอยนางรมที่อาศัยอยู่ในแหล่งเดียวกันจะไม่วางไข่พร้อมกันทุกตัว โดยในระยะแรกช่วงต้นฤดูวางไข่จะมีหอยที่ทำการวางไข่เป็นจำนวนน้อยและค่อย ๆ เพิ่มปริมาณของการวางไข่ขึ้นเรื่อย ๆ จนกระทั่งสภาพแวดล้อมต่าง ๆ อยู่ในสภาพที่เหมาะสม หอยนางรมจึงทำการสืบพันธุ์วางไข่สูงสุด หลังจากนั้นปริมาณการวางไข่ของหอยนางรมค่อย ๆ ลดลงจนสิ้นสุดฤดูกาลวางไข่ โดยปกติหอยนางรมในประเทศไทยมีการสืบพันธุ์วางไข่สูงสุดปีละ 2 ช่วง คือประมาณเดือนกุมภาพันธ์ถึงเมษายนครั้งหนึ่ง และเดือนกันยายนถึงพฤศจิกายนอีกครั้งหนึ่ง จากการศึกษาและสำรวจของนักวิชาการประมงในแหล่งน้ำธรรมชาติบริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออกได้แก่ จังหวัดระยอง จันทบุรี และตราด พบลูกหอยนางรมปากจีบตลอดทั้งปี โดยมีช่วงที่พบลูกหอยมาก 2 ช่วง คือระหว่างเดือนตุลาคมถึงมกราคม และเดือนพฤษภาคมถึงมิถุนายน เป็นที่น่าสังเกตว่าช่วงแรกมีปริมาณความ



รูปที่ 1 การแพร่กระจายของแหล่งหอยนางรมชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย

หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) ●;

หอยตะโกรมพันธุ์กรามขาว (*Crassostrea belcheri*) ▲ และ

หอยตะโกรมพันธุ์กรามดำ (*Crassostrea lugubris*) ■

ที่มา: Brohmanonda และคณะ (1988)

ชุกชุมของลูกหอยนางรมสูงกว่าช่วงหลัง ส่วนบริเวณก้นอ่าวแถบจังหวัดชลบุรีพบลูกหอยนางรมมากที่สุดปีละ 2 ช่วงเช่นกัน คือระหว่างเดือนมีนาคมถึงเมษายน และเดือนตุลาคมถึงธันวาคมยกเว้นบางปีที่สภาพแวดล้อมไม่อำนวยจึงมีการสืบพันธุ์วางไข่สูงสุดเพียงช่วงเดียว

จากการศึกษาของไพโรจน์ พรหมานนท์ (2512) ได้รายงานว่า ฤดูสืบพันธุ์วางไข่ในหอยนางรมพันธุ์เล็กที่บ้านแหลมแท่น จังหวัดชลบุรี โดยทั่วไปมีการสืบพันธุ์วางไข่อย่างมาก 2 ครั้งในรอบปี คือในเดือนเมษายนครั้งหนึ่ง และเดือนตุลาคมอีกครั้งหนึ่ง ในการศึกษาต่อมาของไพโรจน์ พรหมานนท์ ในปี พ.ศ.2512 ได้ทำการตรวจวัดอัตราส่วนของเปลือกต่อเนื้อในหอยนางรมพันธุ์เล็ก (ตารางที่ 1) พบว่าอัตราส่วนของเปลือกต่อเนื้อในหอยนางรมมีความสัมพันธ์กับช่วงที่มีการสืบพันธุ์วางไข่ โดยแนวโน้มของเปอร์เซนต์เนื้อโดยน้ำหนักของหอยนางรมทั้งสองชนิดที่ลดลงในเดือนพฤษภาคมและเดือนพฤศจิกายน นั้นสืบเนื่องมาจากเป็นระยะภายหลังการสืบพันธุ์วางไข่สูงสุด 2 ครั้ง ในรอบปี คือในเดือนเมษายนและเดือนตุลาคม สำหรับการเปลี่ยนแปลงของเปอร์เซนต์โดยน้ำหนักของหอยนางรมปากเรียบค่อย ๆ ลดลงในเดือนมิถุนายน และเดือนกรกฎาคม และลดลงต่ำสุดในเดือนสิงหาคม ส่วนในหอยนางรมปากจีบลดลงในเดือนกรกฎาคม และลดลงต่ำสุดในเดือนสิงหาคม

<u>พัฒนาการของตัวอ่อนและวงจรชีวิตของหอยนางรมปากจีบ</u>

ภายหลังจากหอยนางรมเพศผู้ และเพศเมียปล่อยเซลสืบพันธุ์ และเกิดการปฏิสนธิแล้ว มีวิวัฒนาการเปลี่ยนรูปร่างไปตามขั้นตอนต่าง ๆ (รูปที่ 2) ซึ่งแบ่งได้เป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้

1. เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และโพลาร์บอดีที่ 2 โดยโพลาร์บอดีที่ 1 เริ่มเกิดภายหลังจากการปฏิสนธิประมาณ 15 นาที

2. ระยะคัพภะเป็นระยะที่เริ่มจากไข่ที่ผสมแล้วเจริญเติบโตแบ่งตัวจาก 1 เป็น 2 และจาก 2 เป็น 4 เซล รวมทั้งระยะการแบ่ง segment ตั้งแต่ first ถึง sixth cleavage

3. ระยะตัวอ่อนแบ่งได้หลายระยะดังนี้

3.1 ระยะโทรโคฟอร์มีซิน (cilia) ช่วยในการเคลื่อนที่ ตัวอ่อนในระยะนี้จะมีอายุประมาณ 5 ถึง 6 ชั่วโมงและยังไม่กินอาหาร

3.2 ระยะ D-shape ตัวอ่อนในระยะนี้มีรูปร่างคล้ายตัว D เริ่มมีเมือกหุ้มตัวและมีบานพับที่มีลักษณะตรง 1 ด้าน บางทีเรียกระยะนี้ว่า straight hinge larvae ตัวอ่อนในระยะนี้มีอายุประมาณ 15 ชั่วโมงและเริ่มกินอาหาร

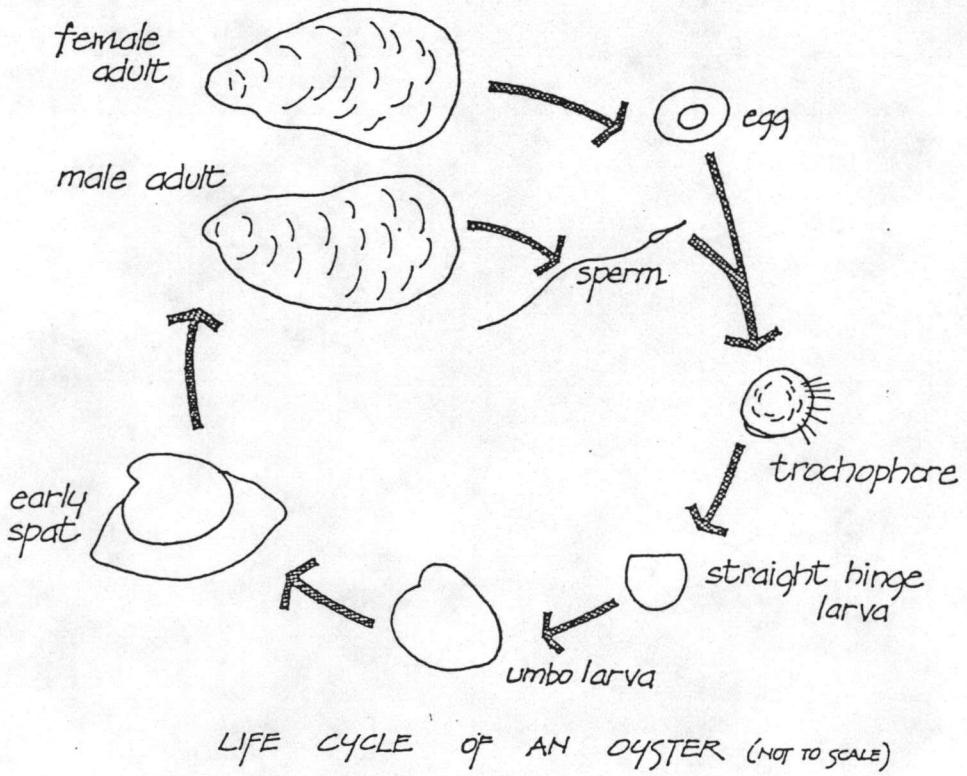
ตารางที่ 1 อัตราส่วนของเปลือกต่อเนื้อ และเปอร์เซนต์เนื้อโดยน้ำหนักของหอยนางรม ปากเรียบและหอยนางรมปากจีบที่เปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล ประจำปี พ.ศ.2507

เดือน พ.ศ.2507	หอยนางรมปากเรียบ *Crassostrea vitrefacta*		หอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata*	
	อัตราส่วน เปลือก/เนื้อ	เปอร์เซนต์ เนื้อโดยน้ำหนัก	อัตราส่วน เปลือก/เนื้อ	เปอร์เซนต์ เนื้อโดยน้ำหนัก
มกราคม	5.862	14.58	5.852	14.59
กุมภาพันธ์	5.751	14.81	5.754	14.81
มีนาคม	5.804	14.70	5.903	14.49
เมษายน	5.883	14.53	4.441	18.38
พฤษภาคม	7.567	11.67	4.712	17.51
มิถุนายน	9.101	9.90	5.816	14.67
กรกฎาคม	9.987	9.10	6.703	12.98
สิงหาคม	13.389	6.95	8.187	10.88
กันยายน	7.302	12.05	4.475	18.26
ตุลาคม	5.954	14.38	4.127	19.50
พฤศจิกายน	5.807	14.69	6.483	13.36
ธันวาคม	7.365	11.96	5.924	14.44

ที่มา: ไพโรจน์ พรมานนท์ (2512)

3.3 ระยะ Umbo เริ่มมีการสร้างเปลือกแข็งที่เรียกว่าก้นหอย การเติบโตของหอยนางรมระยะ Umbo สามารถแบ่งเป็น 3 ระยะคือ early umbo mid umbo และ advanced umbo

4. ระยะวัยเกล็ดเป็นระยะที่ต่อจากระยะ advanced umbo หอยนางรมในระยะนี้จะเจริญจนมีอวัยวะเกือบครบ คือมี adductor muscles ระบบย่อยอาหาร และใช้เท้าเคลื่อนที่ไปตามผิวหน้าดินเพื่อเสาะหาวัตถุที่เหมาะสมในการลงเกาะ หอยนางรมในระยะนี้มีอายุประมาณ 25 วัน หอยนางรมมีการลงเกาะช้าหรือเร็วขึ้นกับปริมาณอาหาร ความสมบูรณ์ของตัวอ่อน อุณหภูมิ ความเค็ม และคุณภาพน้ำ เป็นต้น



รูปที่ 2 วงจรชีวิตของหอยนางรม

ที่มา: Quayle (1973)

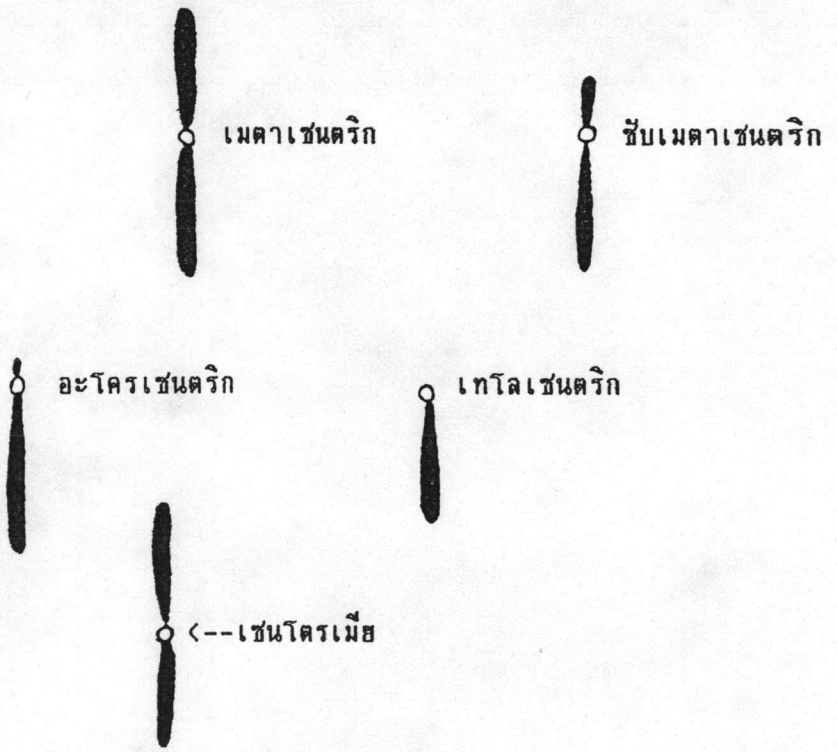
คาริโอไทป์

คาริโอไทป์ คือลักษณะของโครโมโซมที่มีจำนวน ขนาด และลักษณะรูปร่างจำเพาะและคงที่สำหรับสิ่งมีชีวิตในแต่ละสปีชีส์ และในสิ่งมีชีวิตสปีชีส์เดียวกันที่อาศัยอยู่ต่างกลุ่มประชากร กันการศึกษาคาริโอไทป์สามารถจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตได้เพราะการมีจำนวน ขนาด และลักษณะรูปร่างของโครโมโซมที่ต่างกัน ย่อมแสดงถึงการมีหน่วยทางพันธุกรรมที่ต่างกัน เพราะโครโมโซมซึ่งเป็นโครงสร้างอยู่ภายในนิวเคลียสของเซล จะประกอบด้วยหน่วยพันธุกรรม คือยีนกับโปรตีน โดยที่ยีนซึ่งอยู่บนโครโมโซมนี้มีหน้าที่ในการถ่ายทอดลักษณะทางพันธุกรรมจากพ่อแม่ผ่านไปยังลูก และโครโมโซมตัวหนึ่ง ๆ มียีนอยู่เป็นจำนวนมากและอยู่ในตำแหน่งที่เฉพาะและคงที่ในสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง ๆ การจำแนกชนิดของโครโมโซมพิจารณาจากตำแหน่งของจุดเซนโตรเมีย โดยที่โครโมโซมชนิดเมตาเซนตริกมีจุดเซนโตรเมียอยู่ตรงกลางหรือเกือบกึ่งกลางของโครโมโซม ทำให้ปลายทั้งสองข้างมีขนาดความยาวเท่ากันหรือเกือบเท่ากัน โครโมโซมชนิดอะโครเซนตริกหรือเทโลเซนตริกมีจุดเซนโตรเมียอยู่เกือบปลายสุดหรือเกือบปลายสุด ส่วนโครโมโซมที่มีจุดเซนโตรเมียอยู่ระหว่างจุดตรงกลางและจุดปลายเป็นโครโมโซมชนิดซับเมตาเซนตริก (รูปที่ 3)

คาริโอไทป์ของหอยนางรม

การศึกษาคาริโอไทป์ในหอยนางรมมีมากกว่าหอยสองฝาชนิดอื่น ๆ เพราะหอยนางรมเป็นสัตว์น้ำที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และมีศักยภาพในการจัดการทางพันธุกรรมสูง (Insua and Thiriot-Quievreux, 1991) หอยนางรมโดยส่วนใหญ่มีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 20 แท่ง (Beaumont and Fairbrother, 1991) ยกเว้นหอยนางรมบางชนิด เช่น หอยนางรม *Ostrea dendrostrea folium* จะมีจำนวนโครโมโซมเพียง 18 แท่ง(2n=18) (Ieyama, 1990 quoted in Insua and Thiriot-Quievreux, 1991) จากการศึกษาโครโมโซมในหอยนางรมครอบครัว *Ostreidae* ซึ่งประกอบด้วยหอยนางรมชนิด *C.gigas C. rhizophorae C. virginica O. lurida O. edulis* และ *O.equestris* (Longwell et al., 1967) พบว่าหอยนางรมทุกชนิดในที่กล่าวมาทั้งหมดมีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 20 แท่ง เท่ากัน แต่ลักษณะรูปร่างของโครโมโซมในหอยนางรมแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยส่วนใหญ่แล้วหอยนางรมมีโครโมโซม 2 ชนิด คือเมตาเซตริกและซับเมตาเซนตริก จากการศึกษาลักษณะรูปร่างของโครโมโซมในหอยนางรม *O. lurida* และ

O.denselamellosa พบโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริก 14 แท่ง และชนิดซับเมตาเซนตริก 6 แท่ง (Ahmed and Sparks, quoted in Insua and Thiriot-Quievreux, 1991) ในหอยนางรม *C. virginica* พบโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริก 12 แท่งและชนิดซับเมตา-เซนตริก 8 แท่ง (Longwell et al., 1967) และในหอยนางรมชนิด *C.gigas* พบโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริก 8 แท่ง และชนิดซับเมตาเซนตริก 12 แท่ง (Ahmed, 1975) หอยนางรม *O.edulis* มีโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริก 10 แท่ง และชนิดซับเมตาเซนตริก 10 แท่ง (Thiriot-Quievreux, quoted in Insua and Thiriot-Quieveux,1991) แต่มีหอยนางรมบางชนิดที่นอกจากมีโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริก และซับเมตาเซนตริกแล้ว ยังมีโครโมโซมชนิดเทโลเซนตริกและซับเทโลเซนตริก คือพบโครโมโซมชนิดซับเทโลเซนตริกในบางกลุ่มประชากรของหอยนางรมชนิด *O.edulis* (Thiriot-Quieveux, quoted in Insua and Thiriot-Quieveux, 1991) และพบโครโมโซมชนิดเทโลเซนตริกในหอยนางรม *O. dendrostrea folium* เป็นต้น



รูปที่ 3 ลักษณะรูปร่างของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส ซึ่งกำหนดโดยตำแหน่งของเซนโตรเมีย
ที่มา: วิสุทธิ์ ใบไม้ (2527)

การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรม

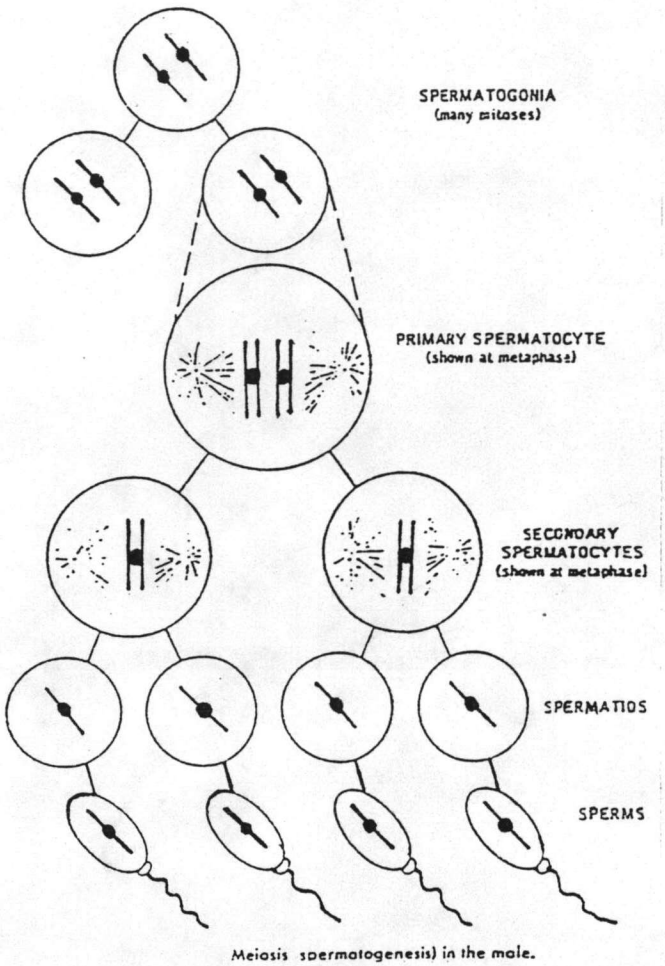
ตามปกติสิ่งมีชีวิตมักมีจำนวนโครโมโซมเป็นดิพลอยด์ (2n) และมีจำนวนโครโมโซมจำเพาะ และคงที่สำหรับสปีชีส์หนึ่งๆ แต่บางครั้งพบว่ามีสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนโครโมโซมแตกต่างไปจากจำนวนปกติ สาเหตุเกิดจากความผิดปกติในกระบวนการแบ่งเซลแบบไมโอซีสในแม่หรือในพ่อ ซึ่งอาจเกิดขึ้นในช่วงไมโอซีส I หรือในช่วงไมโอซีส II ยังผลให้เกิดเซลสืบพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซมมากหรือน้อยกว่าปกติ เมื่อเซลสืบพันธุ์ที่ผิดปกตินี้ผสมและปฏิสนธิกับเซลสืบพันธุ์ปกติจากเพศตรงข้าม ทำให้เกิดไซโกตที่มีจำนวนโครโมโซมผิดปกติซึ่งมีผลกระทบต่อการเจริญของเอมบริโอในลักษณะแตกต่างตามความผิดปกตินั้น ๆ การเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซมโดยมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นจากปกติหนึ่งชุด (2n+n = 3n) เรียกว่าทริพลอยด์ (triploid)

การแบ่งเซลเพื่อสร้างเซลสืบพันธุ์ของหอยนางรม

เซลประกอบด้วยไซโตพลาสซึม และนิวเคลียส เมื่อเซลมีการพัฒนาการจะเกิดการแบ่งเซลที่ประกอบด้วยการแบ่งนิวเคลียส (nuclear division หรือ karyokinesis) และการแบ่งไซโตพลาสซึม (cytoplasmic division หรือ cytokinesis) สลับกัน กระบวนการแบ่งนิวเคลียสประกอบด้วย การแบ่งนิวเคลียสเพื่อเพิ่มจำนวนเซลร่างกาย ซึ่งเรียกว่าการแบ่งเซลแบบไมโตซีสและการแบ่งนิวเคลียสเพื่อสร้างเซลสืบพันธุ์ ซึ่งเรียกว่าการแบ่งเซลแบบไมโอซีส ซึ่งมีการแบ่ง 2 ครั้ง ต่อเนื่องกัน โดยมีการจำลองตัวเพิ่มจำนวนโครโมโซมเป็น 2 เท่า เพียงครั้งเดียว ผลสุดท้ายของการแบ่งเซลแบบไมโอซีสนี้ได้เซลลูก 4 เซล และมีจำนวนโครโมโซมเป็นแฮพลอยด์ คือเหลือเพียงครึ่งหนึ่งของเซลแม่

1. สเปอร์มาโตจีนีซีส (spermatogenesis) เป็นแกมีโตจีนีซีสที่เกิดในเพศผู้ เมื่อถึงระยะเจริญพันธุ์จะมีสเปอร์มาโตโกเนียม (spermatogonium) เกิดขึ้นภายในเซมินิเฟอรัสทิวบูล (seminiferous tubule) สเปอร์มาโตโกเนียมเหล่านี้ได้เจริญเป็นเซลที่เรียกว่าสเปอร์มาโตไซต์ขั้นที่ 1 หรือไพรมารีสเปอร์มาโตไซต์ (primary spermatocyte :4n) จากนั้นมีการแบ่งตัวแบบไมโอซีสเกิดขึ้น เซลใหม่ที่ได้จากการแบ่งไมโอซีส I เรียกว่าสเปอร์มาโตไซต์ขั้นที่ 2 หรือเซกันดารีสเปอร์มาโตไซต์ (secondary spermatocyte) ซึ่งเมื่อมีการแบ่งเซลต่อไปในไมโอซีส II จะเกิดเซลเล็กๆ ที่เรียกว่าสเปอร์มาติด (spermatid) พอมาถึงระยะนี้แล้วไม่มีการแบ่งตัวต่อไปอีก แต่จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็นสเปิร์มอยู่ใน

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ และพร้อมที่จะถูกปล่อยออกมาเมื่อมีการผสมพันธุ์ (Allen et al., 1989) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 การแบ่งเซลแบบไมโอซีสของเซลสืบพันธุ์เพศผู้
ที่มา: ดัดแปลงจาก Beaumont และ Fairbrother (1991)

2. โอโอจีนีซีส (oogenesis) เป็นแกมีโตจีนีซีสที่เกิดในเพศเมีย เมื่อถึงระยะเจริญพันธุ์จะมีโอโอโกเนียม (oogonium) เกิดขึ้นมากมายภายในรังไข่ (ovary) และโอโอโกเนียมเหล่านี้ได้เจริญเป็นเซลที่เรียกว่าโอโอไซต์ชั้นที่ 1 หรือไพรมารี โอโอไซต์ (primary oocyte) ไพรมารี โอโอไซต์มีจำนวนโครโมโซม 4 ชุด (4n) และจะมีการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส I แต่ยังไม่สมบูรณ์จะหยุดอยู่ที่ระยะเมตาเฟส (Longo, quoted in Allen, 1987b) และยังไม่แบ่งเซลแบบไมโอซีส 2 ครั้งสมบูรณ์จนได้เซลไข่ (eggs) เหมือนกับเซลสืบพันธุ์ของเพศผู้ที่แบ่งตัวในระยะไมโอซีส 2 ครั้ง สมบูรณ์จนได้เซลสเปิร์มอยู่ภายใน

อวัยวะสืบพันธุ์และพร้อมที่จะถูกปล่อยออกมาเมื่อมีการผสมพันธุ์ (Allen et al., 1989) ไพรมารี โอโอไซต์จะมีการแบ่งเซลต่อเมื่อผสมกับเซลสเปิร์มแล้วจึงเกิดการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส I สมบูรณ์แล้วได้โพลาร์บอดีที่ 1 ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุดและเซกันดารี โอโอไซต์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุดและเกิดการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส II ได้โพลาร์บอดีที่ 2 ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุดและ female pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุดแล้วเกิดการรวมตัวของ female pronucleus กับ male pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุดได้นิวเคลียสแรกของเอมบริโอที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด ต่อจากนั้นเอมบริโอจึงแบ่งตัวแบบไมโตซีสเพื่อเพิ่มจำนวนเซล โดยจะเกิดคลีเวจตรงจุดกึ่งกลางของบริเวณที่เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และ 2 (วิสุทธิ์ ใบไม้, 2527; Allen et al.,1989) (รูปที่ 5)

วิธีการเหนี่ยวนำทริพลอยด์

ทริพลอยด์ในธรรมชาติเกิดขึ้นได้น้อยมากแต่สามารถผลิตขึ้นได้โดยใช้วิธีการจัดการโครโมโซม การผลิตทริพลอยด์มีความเหมาะสมกับสัตว์น้ำที่มีการปฏิสนธิภายนอก หรือสามารถผสมเทียมได้ โดยภายหลังจากไข่มีการปฏิสนธิกันตามแบบปกติแล้วจึงทำการยับยั้งการแบ่งเซลโดยการใช้สารเคมี ความดันและอุณหภูมิ เพื่อไม่ให้โพลาร์บอดีเกิดขึ้นในระยะไมโอซีส ซึ่งวิธีการนี้สามารถทำการยับยั้งการเกิดโพลาร์บอดีได้ 2 ระยะคือยับยั้งการเกิดโพลาร์บอดีที่ 1 ในระยะไมโอซีส I และยับยั้งการเกิดโพลาร์บอดีที่ 2 ในระยะไมโอซีส II นอกจากการยับยั้งโพลาร์บอดีแล้วการผลิตทริพลอยด์ยังสามารถกระทำได้โดยใช้ดิพลอยด์ผสมกับเตตระพลอยด์ (Allen, 1987b)

1. การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในระยะไมโอซีส I

การเหนี่ยวนำเกิดขึ้นภายหลังจากเซลไข่และเซลสเปิร์มที่มีการปฏิสนธิกันตามแบบปกติแล้วถูกยับยั้งไม่ให้โพลาร์บอดีที่ 1 หลุดออกไปในระยะไมโอซีส I จึงทำให้จำนวนโครโมโซมในเซลไข่ยังคงมี 4 ชุดเท่าเดิมเมื่อหยุดยับยั้งจึงมีการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส II ต่อเกิดโพลาร์บอดีที่ 2 ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุดและ female pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด แล้วเกิดการรวมตัวของ female pronucleus กับ male pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด ได้นิวเคลียสแรกของเอมบริโอที่มีจำนวนโครโมโซม 3 ชุด ต่อจากนั้นเอมบริโอจึงแบ่งตัวแบบไมโตซีสของทริพลอยด์โดยจะเกิดคลีเวจตรงจุดกึ่งกลางของบริเวณที่เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 (รูปที่ 6)

2. การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในระยะไมโอซีส II

วิธีการเกิดคล้ายกับการยับยั้งในระยะไมโอซีส I โดยทำการเหนี่ยวนำภายหลังจากเซลไข่ปฏิสนธิกับเซลสเปิร์มแล้วตามแบบปกติจนเกิดการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส I และได้โพลาร์บอดีที่ 1 เกิดขึ้นแล้วจึงยับยั้งการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส II เพื่อไม่ให้เกิดโพลาร์บอดีที่ 2 เกิดขึ้นและ female pronucleus ที่เกิดขึ้นในระยะนี้จะมีจำนวนโครโมโซม 2 ชุดแล้วเกิดการรวมตัวของ female pronucleus กับ male pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด ได้นิวเคลียสแรกของเอมบริโอที่มีจำนวนโครโมโซม 3 ชุด (รูปที่ 7) การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในระยะไมโอซีส I และ II โดยการใช้สารเคมี อุณหภูมิ และความดัน เป็นตัวเหนี่ยวนำนั้นเป็นที่นิยมนำมาใช้ในหอยนางรมหลายชนิด แต่ปริมาณของทริพลอยด์ที่ได้ไม่ถึง 100 เปอร์เซนต์ เพราะปริมาณของทริพลอยด์จะขึ้นกับปัจจัยต่าง ๆ ในระหว่างการเหนี่ยวนำ จึงได้มีการนำดิพลอยด์ผสมกับเตตระพลอยด์เพื่อเพิ่มปริมาณของทริพลอยด์ให้สามารถผลิตทริพลอยด์ได้ถึง 100 เปอร์เซนต์ (Beaumont and Fairbrother, 1991)

3. การผลิตทริพลอยด์โดยการผสมระหว่างดิพลอยด์และเตตระพลอยด์

การผลิตทริพลอยด์โดยการผสมระหว่างดิพลอยด์และเตตระพลอยด์ สามารถกระทำได้โดยการให้เพศใดเพศหนึ่งเป็นเตตระพลอยด์แล้วผสมกับดิพลอยด์โดยไม่ต้องยับยั้งการเกิดโพลาร์บอดีที่ 1 หรือโพลาร์บอดีที่ 2 โดยที่เตตระพลอยด์สามารถผลิตได้ดังนี้ คือภายหลังจากเซลไข่และเซลสเปิร์มปฏิสนธิกันตามแบบปกติ และเกิดนิวเคลียสแรกของเอมบริโอที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด แล้วจึงทำการยับยั้งการแบ่งเซลแบบไมโตซีสหรือคลีเวจระยะที่ 1 แล้วจึงได้เตตระพลอยด์ที่มีจำนวนโครโมโซม 4 ชุด (รูปที่ 8)

เตตระพลอยด์สามารถผลิตเซลสืบพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด ส่วนดิพลอยด์ผลิตเซลสืบพันธุ์ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด เมื่อปฏิสนธิกันแล้วจึงได้เอมบริโอที่มีจำนวนโครโมโซม 3 ชุด การผลิตทริพลอยด์สามารถใช้เตตระพลอยด์เป็นเพศผู้หรือเพศเมียก็ได้ โดยมีวิธีการเกิดทริพลอยด์ต่างกันดังนี้

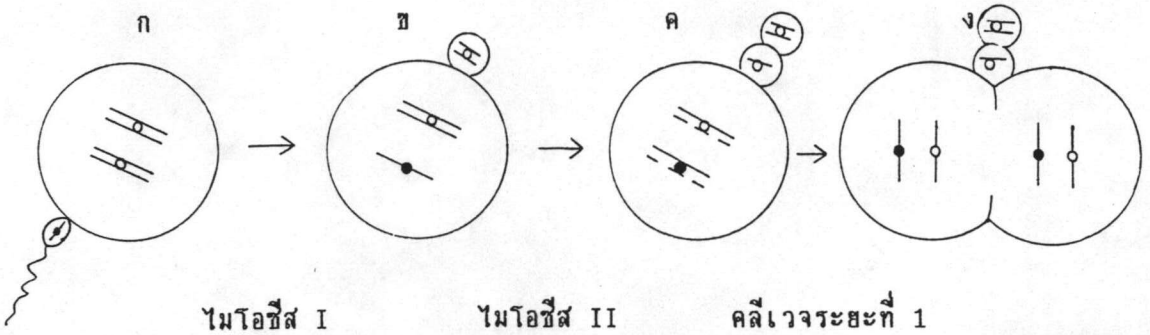
3.1 การผลิตทริพลอยด์โดยการใช้เพศเมียเป็นเตตระพลอยด์และเพศผู้เป็นดิพลอยด์

ไพรมารี โอโอไซต์ในเพศเมียเมื่อถูกปล่อยออกจากแม่พันธุ์จะมีจำนวนโครโมโซม 8 ชุด เมื่อผสมกับเซลสเปิร์มเกิดการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส I ได้โพลาร์บอดีที่ 1 ที่มีจำนวนโครโมโซม 4 ชุด และเซกันดารี โอโอไซต์ที่มีจำนวนโครโมโซม 4 ชุด เกิดการ

แบ่งเซลในระยะไมโอซีส II ได้โพลาร์บอดีที่ 2 ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด และ female pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด แล้วเกิดการรวมตัวของ female pronucleus กับ male pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด ได้นิวเคลียสแรกของเอมบริโอที่มีจำนวนโครโมโซม 3 ชุด (รูปที่ 9)

3.2 การผลิตทริพลอยด์โดยการใช้เพศเมียเป็นดิพลอยด์และเพศผู้เป็นเตตระพลอยด์

ไพรมารี โอโอไซต์ในเพศเมียเมื่อถูกปล่อยออกจากแม่พันธุ์จะมีจำนวนโครโมโซม 4 ชุด เมื่อผสมกับเซลสเปิร์มที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด เกิดการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส I ได้โพลาร์บอดีที่ 1 ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด และเซกันดารี โอโอไซต์ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด เกิดการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส II ได้โพลาร์บอดีที่ 1 ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด และfemale pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด แล้วเกิดการรวมตัวของ female pronucleus กับ male pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด ได้นิวเคลียสแรกของเอมบริโอที่มีจำนวนโครโมโซม 3 ชุด (รูปที่ 10) วิธีนี้เคยนำไปใช้กับสัตว์น้ำหลายชนิดและวิธีการนี้สามารถผลิตลูกที่เป็นหมันใน silkworms (*Bombyx mori*) ได้ถึง 100 เปอร์เซนต์ (Astaurov, quoted in Stanley et al., 1981) และในปลาเทร้าได้ถึง 100 เปอร์เซนต์ เช่นกัน (Chourrout et al., quoted in Cassani et al., 1990) และจากการศึกษาของ Myers และคณะ (1986) อ้างถึงใน Cassani และคณะ (1990) กล่าวว่าการเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยวิธีการนี้ในปลาซาลมอนจะมีการเติบโตเร็วกว่าทริพลอยด์ที่เกิดจากการยับยั้งในระยะไมโอซีส I และไมโอซีส II และจากรายงานของ Beaumont และ Fairbrother (1991) ก็แนะนำให้ใช้ดิพลอยด์ผสมกับเตตระพลอยด์ในหอยนางรม เพราะจะได้ลูกหอยที่เป็นทริพลอยด์ 100 เปอร์เซนต์ แต่มีปัญหาเกิดขึ้น คือลูกหอยที่เป็นเตตระพลอยด์มีอัตราการตายสูงและส่วนมากแล้วไม่สามารถเติบโตจนถึงตัวเต็มวัย



รูปที่ 5 การพัฒนาการของไซโกตแบบปกติในเซลไข่หอยสองฝา

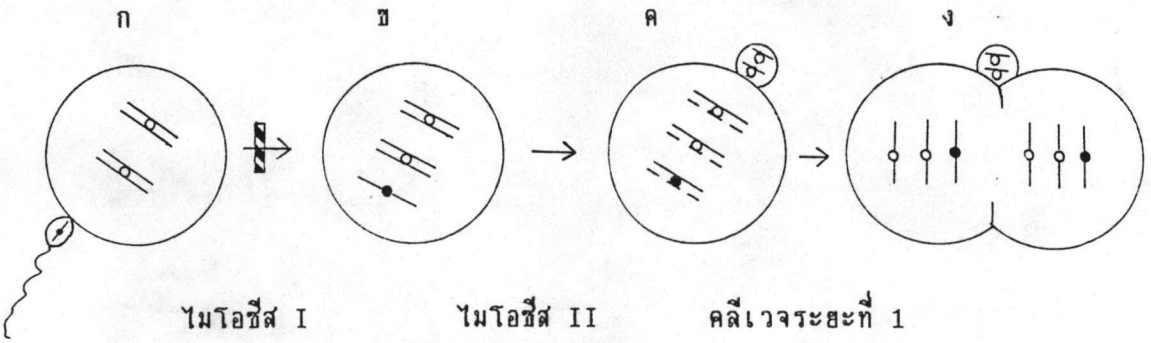
(ก) เซลไข่ที่ถูกปล่อยออกจากแม่พันธุ์อยู่ในระยะไพรมารี โอโอไซต์และผสมกับสเปิร์ม

(ข) แบ่งเซลในระยะไมโอซีส I เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และนิวเคลียสของสเปิร์มเข้าไปในเซลไข่

(ค) แบ่งเซลในระยะไมโอซีส II เกิดโพลาร์บอดีที่ 2 และ female pronucleus ซึ่งมีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด รวมตัวกับ male pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด

(ง) แบ่งเซลในระยะคลีเวจของดิพลอยด์ตรงจุดกึ่งกลางของบริเวณที่เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และ 2

ที่มา: ดัดแปลงจาก Beaumont และ Fairbrother (1991)



รูปที่ 6 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในระยะไมโอซีส I

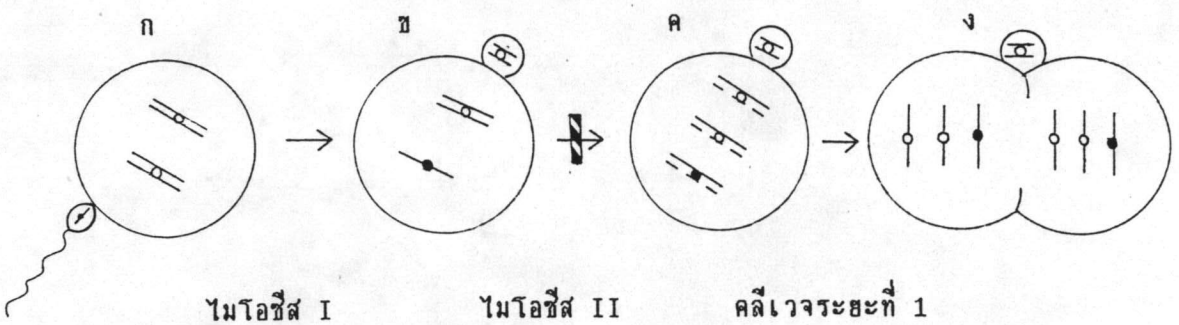
(ก) เซลไข่ที่ถูกปล่อยออกจากแม่พันธุ์อยู่ในระยะไพรมารี โอโอไซต์และผสมกับสเปิร์ม

(ข) ยับยั้งการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส I โครโมโซมทั้ง 4 ชุดยังคงอยู่ในเซลไข่ไม่เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และนิวเคลียสของสเปิร์มเข้าไปในเซลไข่

(ค) แบ่งเซลในระยะไมโอซีส II เกิดโพลาร์บอดีที่ 2 ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด และ female pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุดรวมตัวกับ male pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด

(ง) แบ่งเซลในระยะคลีเวจของทริพลอยด์ตรงจุดกึ่งกลางของบริเวณที่เกิดโพลาร์บอดีที่ 2

ที่มา: ดัดแปลงจาก Beaumont และ Fairbrother (1991)



รูปที่ 7 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในระยะไมโอซีส II

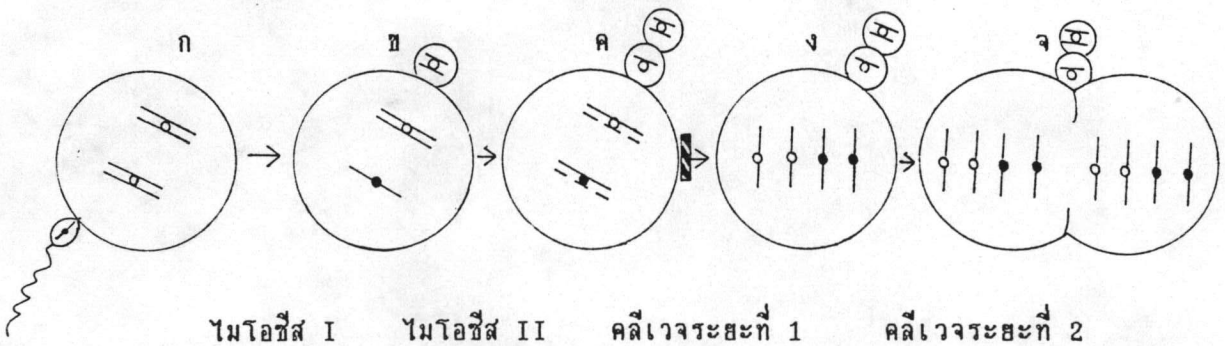
(ก) เซลไข่ที่ถูกปล่อยออกจากแม่พันธุ์อยู่ในระยะไพรมารี โอโอไซต์และผสมกับสเปิร์ม

(ข) แบ่งเซลในระยะไมโอซีส I เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และนิวเคลียสของสเปิร์มเข้าไปในเซลไข่

(ค) ยับยั้งการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส II โครโมโซมทั้ง 2 ชุด ยังคงอยู่ในเซลไข่ ไม่เกิดโพลาร์บอดีที่ 2 และได้ female pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุดรวมตัวกับ male pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด

(ง) แบ่งเซลในระยะคลีเวจของทริพลอยด์ตรงจุดกึ่งกลางของบริเวณที่เกิดโพลาร์บอดีที่ 1

ที่มา: ดัดแปลงจาก Beaumont และ Fairbrother (1991)



รูปที่ 8 การเหนี่ยวนำเตตระพลอยด์

(ก) เซลไข่ที่ถูกปล่อยออกจากแม่พันธุ์อยู่ในระยะไพรมารี โอโอไซต์และผสมกับสเปิร์ม

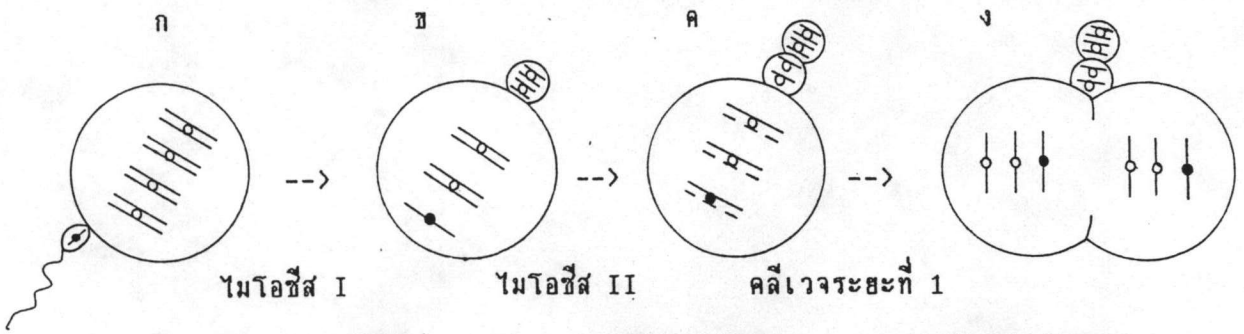
(ข) แบ่งเซลในระยะไมโอซีส I เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และนิวเคลียสของสเปิร์มเข้าไปในเซลไข่

(ค) แบ่งเซลในระยะไมโอซีส II เกิดโพลาร์บอดีที่ 2 และfemale pronucleus ผสมกับ female pronucleus

(ง) ยับยั้งการแบ่งเซลในระยะคลีเวจที่ 1

(จ) แบ่งเซลในระยะคลีเวจระยะที่ 2 ของเตตระพลอยด์ตรงจุดกึ่งกลางของบริเวณที่เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และ 2

ที่มา: ดัดแปลงจาก Beaumont และ Fairbrother (1991)



รูปที่ 9 การผลิตทริพลอยด์โดยการใช้เตตระพลอยด์เป็นเพศเมียและดิพลอยด์เป็นเพศผู้

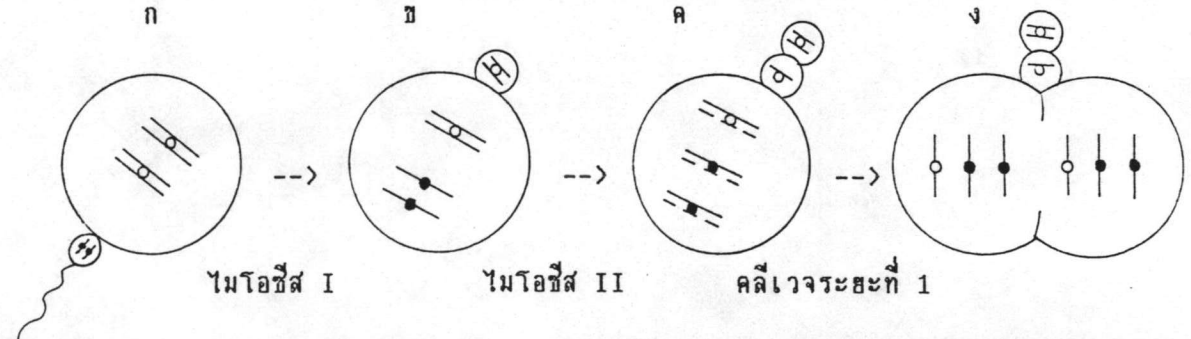
(ก) เซลไข่ที่ถูกปล่อยออกจากแม่พันธุ์อยู่ในระยะไพรมารี โอโอไซต์ที่มีจำนวนโครโมโซม 8 ชุด และผสมกับสเปิร์ม ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด

(ข) แบ่งเซลในระยะไมโอซีส I เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 ที่มีจำนวนโครโมโซม 4 ชุดและนิวเคลียสของสเปิร์มเข้าไปในเซลไข่

(ค) แบ่งเซลในระยะไมโอซีส II เกิดโพลาร์บอดีที่ 2 ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุดและ female pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุดและรวมตัวกับ male pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด

(ง) แบ่งเซลในระยะคลีเวจของทริพลอยด์ตรงจุดกึ่งกลางของบริเวณที่เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และ 2

ที่มา: ดัดแปลงจาก Beaumont และ Fairbrother (1991)



รูปที่ 10 การผลิตทริพลอยด์โดยการใช้ดิพลอยด์เป็นเพศเมียและเตตระพลอยด์เป็นเพศผู้

(ก) เซลไข่ที่ถูกปล่อยออกจากแม่พันธุ์อยู่ในระยะไพรมารี โอโอไซต์และผสมกับสเปิร์มที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด

(ข) แบ่งเซลในระยะไมโอซีส I เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และนิวเคลียสของสเปิร์มเข้าไปในเซลไข่

(ค) แบ่งเซลในระยะไมโอซีส II เกิดโพลาร์บอดีที่ 2 ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด female pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 1 ชุด และ male pronucleus ที่มีจำนวนโครโมโซม 2 ชุด

(ง) แบ่งเซลในระยะคลีเวจของทริพลอยด์ตรงจุดกึ่งกลางของบริเวณที่เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 และ 2

ที่มา: ดัดแปลงจาก Beaumont และ Fairbrother (1991)

ประโยชน์ที่ได้รับจากการผลิตทริพลอยด์

การผลิตทริพลอยด์เป็นการจัดการโครโมโซมที่มีคุณค่าต่อการเพาะเลี้ยงหอยนางรมเชิงพาณิชย์ เพราะว่าการเจริญของเซลสืบพันธุ์ในหอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์ถูกยับยั้งจึงส่งเสริมให้มีการเติบโตสูงขึ้น ดังนั้นคุณภาพเนื้อของหอยนางรมจึงคงที่ตลอดปีแม้กระทั่งในฤดูสืบพันธุ์วางไข่ การที่ทริพลอยด์เป็นหมันหรือมีพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ต่ำกว่าดิพลอยด์ เนื่องจากทริพลอยด์มีจำนวนโครโมโซมเป็นเลขคี่ เมื่อเซลที่มีหน้าที่สร้างเซลสืบพันธุ์เข้าสู่กระบวนการแบ่งเซลแบบไมโอซีส เพื่อสร้างเซลสืบพันธุ์การจับคู่ของโครโมโซมที่เป็นคู่กันเกิดขึ้นไม่ได้เพราะในระยะโปรเฟส I ของการแบ่งเซลแบบไมโอซีส โครโมโซมจะไม่มีคู่เหมือนทำให้โครโมโซมแยกไปที่ขั้วของเซลอย่างไม่เป็นระเบียบ และไม่สามารถพัฒนาต่อไปเป็นเซลสืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ได้ หอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์จึงเป็นหมัน (Stanley et al., 1981; Arai and Wilkins, 1987) จากการศึกษาพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ในหอยหลายชนิด พบว่าหอยที่เป็นทริพลอยด์มีพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ต่ำกว่าดิพลอยด์เช่นในหอยนางรม *C.virginica* และ *C.gigas* พบว่าในดิพลอยด์มีพัฒนาการของเซลสืบพันธุ์ปกติ ส่วนทริพลอยด์ในเพศผู้มีพัฒนาการของเซลสืบพันธุ์ได้ถึงระยะสเปอร์มาโตไซต์ และมีบางเซลที่สามารถพัฒนาไปเป็นสเปอร์มาติด แต่ก็ไม่สามารถพัฒนาไปเป็นสเปิร์มได้ ส่วนเซลสืบพันธุ์ในเพศเมียนั้นจะถูกยับยั้งมากกว่าในเพศผู้เพราะโดยส่วนใหญ่แล้วเซลสืบพันธุ์เพศเมียสามารถพัฒนาได้ถึงระยะแรกหรือโอโอโกเนียมเท่านั้น (Allen, 1987a) เนื่องจากหอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์ส่วนใหญ่เป็นหมัน การเพิ่มผลผลิตของหอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์ซึ่งเป็นพันธุ์ผิดปกติไปสู่ธรรมชาติจึงไม่มีปัญหาต่อสัตว์น้ำในธรรมชาติ เพราะทริพลอยด์ไม่สามารถเพิ่มปริมาณได้เองในธรรมชาติ (Beaumont and Fairbrother, 1991)

การผลิตทริพลอยด์ขึ้นมาเพราะคาดว่าจะมีการเติบโตที่ดีกว่าดิพลอยด์ (Purdom, 1983; Nagy, 1987) ตรงที่ทริพลอยด์ไม่มีพัฒนาการทางเพศแต่ไม่ได้เป็นผลมาจากการมีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นเป็น 3 ชุด เพราะในขณะที่มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นขนาดของนิวเคลียสจึงใหญ่ขึ้นแต่จำนวนของเซลกลับลดลง ดังนั้นทริพลอยด์จึงมีขนาดใกล้เคียงกับดิพลอยด์ (Swarup and Fankhauser,quoted in Valenti, 1975) ดังการทดลองของ Stanley และคณะ (1981) พบว่าขนาดของดิพลอยด์และทริพลอยด์ในหอยนางรม *C.virginica* ในช่วง 8 เดือนแรกก่อนวัยเจริญพันธุ์มีขนาดไม่แตกต่างกัน แต่การเติบโตของทริพลอยด์และดิพลอยด์จะเริ่มมีแตกต่างกันในช่วงที่ถึงวัยเจริญพันธุ์แล้วเท่านั้น ดังการศึกษาของ Allen (1986) พบว่าหอยนางรม *C.gigas* ที่เป็นทริพลอยด์ในวัยเจริญพันธุ์จะมีการเติบโต คุณภาพเนื้อและรสชาติที่ดี

กว่าหอยนางรมที่เป็นดิพลอยด์ในฤดูกาลสืบพันธุ์วางไข่

วิธีการเหนี่ยวนำทริพลอยด์

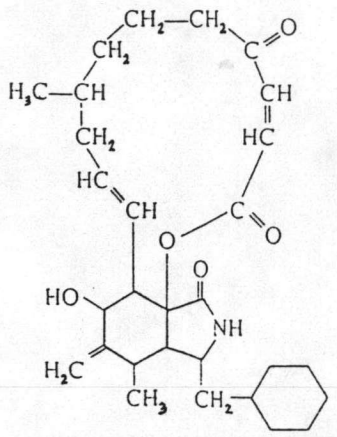
วิธีการเหนี่ยวนำทริพลอยด์มีหลายวิธี ได้แก่การใช้สารเคมี ความดัน และอุณหภูมิ

1. สารเคมี

1.1 ไซโตคาลาซินบี ซึ่งมีสูตรโครงสร้างในรูปที่ 11 มีน้ำหนักโมเลกุล 479.6 กรัม เป็นอนุพันธ์ของไซโตคาลาแซน ซึ่งประกอบด้วย ไซโตคาลาซิน (เอ, บี, ซี, ดี และ อี) ไซโตคาลาซินบี เป็นสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากเชื้อราชนิด *Helminthosporium dematoiderum* และ *Phoma exiqua* (Keeler and Anthony, 1983; Tamm, quoted in Allen, 1987b)

ไซโตคาลาซินบีที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการแบ่งไซโตพลาสซึมแต่ไม่ยับยั้งการแบ่งนิวเคลียส โดยสามารถยับยั้งการสร้างไมโครฟิลาเมนต์ที่เป็นองค์ประกอบของสายใยสปินเดิล (spindle fiber) (Avers and Copeland, quoted in Stanley et al., 1981; Schwartz and Miguel, 1981; Sheeler et al., 1980, 1983; Darnell et al., 1986; Smith and Wood, 1992) สารชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิค คือไม่สามารถละลายได้ในน้ำแต่สามารถละลา ได้ใน Dimethyl sulfoxide (DMSO) ซึ่งเป็นตัวทำละลายที่สามารถซึมผ่านเยื่อเซลได้ดี (Allen et al., 1989) เป็นที่นิยมและใช้ได้ดีในการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในไข่สัตว์น้ำเพราะไข่สัตว์น้ำไม่มีเปลือกแข็งหุ้มจึงทำให้น้ำหรือสารต่าง ๆ สามารถผ่านเข้าสู่เซลได้ง่าย ด้วยเหตุนี้ไซโตคาลาซินบีจึงถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการเกิดโพลาร์บอดีที่ 1 หรือโพลาร์บอดีที่ 2 ของการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส I และไมโอซีส II และการแบ่งเซลในระยะคลีเวจได้ดี ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับในหอยนางรมมีความเข้มข้นประมาณ 0.5-1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Schroeder,1976) จากการศึกษาที่ผ่าน ๆ มาพบว่ามีการใช้ไซโตคาลาซินบีในการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมหลายชนิด เช่น *C.virginica*, *C.gigas*,*O.edulis*, *C.lugubris* และ *Pinctada fucata martensii* (ตารางที่ 2) และในสัตว์น้ำชนิดอื่น ๆ อีกหลายชนิดเช่น ในหอยแครงชนิด *Spisula solidissima*, *Mercenaria mercenaria*, *Mulinia lateralis* (Beaumont and Fairbrother, 1991) *Mya arenaria* (Allen et al., 1986b; Allen, 1987a; Mason et al., 1988) หอยเชล *Argopecten irradians* (Tabarini, 1984) หอยแมลงภู่ *Mytilus*

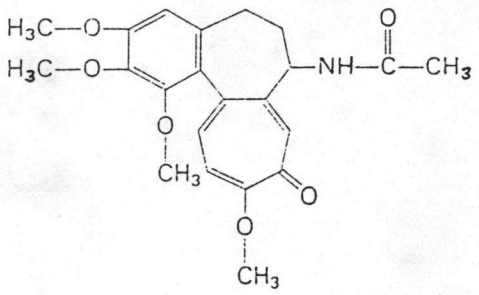
edulis (Yamamoto and Sugawara, 1988; Beaumont and Fairbrother, 1991) และในเนื้อเยื่อเจริญที่ได้จากการเพาะเลี้ยง (Dickerman and Goldman, quoted in Stanley et al., 1981) ข้อดีของวิธีนี้สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดทริพลอยด์ในหอยนางรมได้ดีและมีอัตราการรอดสูงพอสมควรแต่เป็นสารที่มีราคาแพงและมีความเป็นพิษสูง จึงปฏิบัติการได้ยากและมีผู้บริโภคบางกลุ่มไม่ยอมรับ (Allen et al., 1989)



รูปที่ 11 สูตรโครงสร้างของไซโตคาลาซินบี
ที่มา: Sheeler และ Bianchi (1983)

1.2 โคลชิซินซึ่งมีสูตรโครงสร้างในรูปที่ 12 เป็นสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากพืชชนิดหนึ่งชื่อ *Colchicum autumnale*

โคลชิซินที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการแบ่งนิวเคลียสแต่ไม่ยับยั้งการแบ่งไซโตพลาสซึม โดยสามารถยับยั้งการสร้างไมโครทูบูลที่เป็นองค์ประกอบของสายใยสปินเดิล (Avers, 1978; Copeland, quoted in Stanley et al., 1981; Schwartz and Miguel, 1981; Sheeler et al., 1980, 1983; Darnell et al., 1986; Smith and Wood, 1992) โคลชิซินเป็นสารที่นิยมและใช้ได้ดีในการเหนี่ยวนำโพลีพลอยด์ในพืชและที่ความเข้มข้นประมาณ 0.05 เปอร์เซนต์ สามารถยับยั้งการแบ่งเซลให้อยู่ในระยะเมตาเฟสเพื่อใช้ในการตรวจหาโครโมโซมและใช้ศึกษาคาริโอไทป์ในสัตว์น้ำหลายชนิด (Butcher and Goldman, 1974)

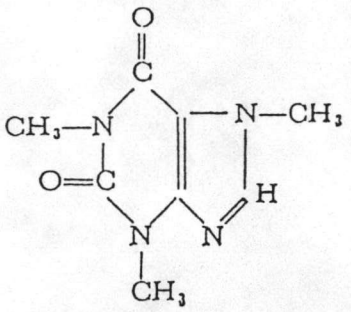


รูปที่ 12 สูตรโครงสร้างของโคลชิชิน
ที่มา: Sheeler และ Bianchi (1983)

1.3 คาเฟอีน (caffeine) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างในรูปที่ 13 เป็นผลึกสีขาว ไม่มีกลิ่น มีน้ำหนักโมเลกุล 194 กรัม เป็นสารอัลคาลอยด์ที่สกัดจากพืชเช่นจากเมล็ดกาแฟ เป็นต้น คาเฟอีนสามารถละลายน้ำได้ดีที่อุณหภูมิสูง (Sivetz, 1963)

คาเฟอีนที่ความเข้มข้นสูงสามารถยับยั้งการแบ่งนิวเคลียสแต่ไม่ยับยั้งการแบ่งไซโตพลาสซึม โดยสามารถยับยั้งการสร้างไมโครทูบูลที่เป็นองค์ประกอบของสายใยสปินเดิล (Avers, 1978; Copeland, quoted in Stanley et al., 1981; Schwartz and Miguel, 1981; Sheeler et al., 1980, 1983; Darnell et al., 1986; Smith and Wood,1992) จากการศึกษาที่ผ่าน ๆ มาพบว่ามีการใช้คาเฟอีนในการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยสองฝา (ตารางที่ 3) จากการทดลองของ Durand และคณะ (1990) ใช้คาเฟอีนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 1 3 6 10 และ 13 มิลลิโมลาร์ร่วมกับอุณหภูมิ 31.5 องศาเซลเซียส ในหอยนางรม *Pinctada fucta martensii* พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดโพลีพลอยด์ได้สูงสุด 35.8 เปอร์เซนต์ และมีอัตราการรอดเท่ากับ 67.56 63.51 47.30 22.97 และ 17.57 เปอร์เซนต์ ที่ 1 3 6 10 และ 13 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และการทดลองของ Yamamoto และคณะ อ้างถึงใน Beaumont และ Fairbrother (1991) ในหอยนางรม *C.gigas* โดยการใช้คาเฟอีนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ร่วมกับอุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถผลิตทริพลอยด์ได้มากกว่า 40 เปอร์เซนต์ ส่วนการศึกษาของ Scarpa และคณะ (1994) ในหอยแมลงภู่ *Mytilus galloprovincialis* พบว่าการใช้คาเฟอีนสามารถผลิตทริพลอยด์ได้ 71 เปอร์เซนต์ และการใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิสูงสามารถเพิ่มผลผลิตของทริพลอยด์ได้ โดยสามารถผลิตทริพลอยด์ได้ถึง 81 เปอร์เซนต์ ข้อดีของวิธีนี้ คือสามารถเหนี่ยว

นำให้เกิดทริพลอยด์ในหอยนางรมได้พอสมควร เป็นสารเคมีที่มีราคาถูกกว่าไซโตคาลาซินบีและมีความเป็นพิษต่ำจึงสามารถปฏิบัติการได้ง่ายกว่าแต่ลูกหอยที่ได้มีอัตราการรอดค่อนข้างต่ำ



รูปที่ 13 สูตรโครงสร้างของคาเฟอีน
ที่มา: Sivetz (1963)

1.4 อื่น ๆ เช่นคลอรอลไฮเดรตซีแนฟทีน ซัลฟานิลาไมด์ เอทีลเมอคิวิคลอไรด์ เฮกซาคลอไรด์ไซโคลเฮกเซน ซึ่งเป็นสารที่นิยมผลิตโพลีพลอยด์ในพืช (Butcher and Goldman, 1974)

2. การใช้ความดัน

ความดันสามารถยับยั้งการแบ่งไซโตพลาสซึมและการแบ่งนิวเคลียส โดยสามารถยับยั้งทั้งการสร้างไมโครฟิลาเมนต์และไมโครทูบูลที่เป็นองค์ประกอบของสายใยสปินเดิล (Allen, 1986; Downing and Allen, 1987) ต่อเมื่อลดความดันลงจนเท่าความดันปกติแล้วไซโกตจึงมีการแบ่งเซลต่อไปตามปกติ (Beaumont and Fairbrother, 1991) การใช้ความดันถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการเกิดโพลาร์บอดีที่ 1 หรือโพลาร์บอดีที่ 2 ของการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส I และไมโอซีส II และการแบ่งเซลในระยะคลีเวจได้ การใช้ความดันเคยใช้ได้ผลสำเร็จมาแล้วในหอยนางรมหลายชนิด (ตารางที่ 4) และในสัตว์น้ำอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่นหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis hahhai* (Arai et al., quoted in Beaumont and Fairbrother, 1991) ปลาซาลมอน *Salmo salar* L. (Benffy and Sutterlin, 1984; Chaiton and Allen,1985; Arai and Wilkins,1987) และปลาดุก *Clarias gariepinus* (Henken et al., 1987) เป็นต้น ข้อดีของการใช้ความดัน คือไม่มีความเป็น

พิษเหมือนอย่างวิธีการใช้สารเคมี จึงมีความปลอดภัยในการปฏิบัติการ แต่เครื่องมือมีราคาแพง และสามารถเหนี่ยวนำไข่ในแต่ละครั้งได้ในปริมาณน้อย (Chaiton and Allen, 1985)

3. การใช้อุณหภูมิสูง

อุณหภูมิสูงสามารถยับยั้งการแบ่งไซโตพลาสซึม (cytokinesis) และการแบ่งนิวเคลียสโดยการยับยั้งทั้งการสร้างไมโครฟิลาเมนต์และไมโครทูบูล ที่เป็นองค์ประกอบในสายใยสปินเดิล (Allen, 1986; Downing and Allen, 1987) ต่อเมื่อลดอุณหภูมิให้เท่ากับอุณหภูมิปกติแล้วไซโกตจึงมีการแบ่งเซลต่อไปตามปกติ (Beaumont and Fairbrother, 1991) อุณหภูมิถูกนำมาใช้ในการยับยั้งการเกิดโพลาร์บอดีที่ 1 หรือโพลาร์บอดีที่ 2 ของการแบ่งเซลในระยะไมโอซีส I และไมโอซีส II และการแบ่งเซลในระยะคลีเวจ การใช้อุณหภูมิเป็นตัวเหนี่ยวนำได้ประสบความสำเร็จมาแล้วในหอยนางรมหลายชนิด (ตารางที่ 5) และในสัตว์น้ำอื่น ๆ เช่นปลาเทร้า (Arai and Wilkins, 1987) ปลาซาลมอน (Benfey and Sutterlin, 1984) ปลาดุก *Clarias gariepinus* 26 (Benfey and Sutterlin, 1984) ข้อดีของวิธีนี้ คือไม่มีความเป็นพิษ ปฏิบัติการได้ง่าย สามารถทำได้ในคราวละมาก ๆ และปลอดภัยกว่าการใช้สารเคมีมีต้นทุนการผลิตต่ำ และผู้บริโภคยอมรับมากกว่าวิธีการใช้สารเคมี แต่ลูกหอยที่ได้มีอัตราการรอดค่อนข้างต่ำ (Beaumont and Fairbrother, 1991)

ตารางที่ 2 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้ไซโตคาลาซินบีในหอยนางรม

ชนิดของหอยนางรม	ความเข้มข้น มก./ล.	ระยะเวลาภายหลังการปฏิสนธิ (นาที)	ระยะเวลาเวลาในการเหนี่ยวนำ (นาที)	อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณของทริพลอยด์ (%)	สภาวะที่ให้ผลดีที่สุด	ผู้วิจัย
Crassostrea gigas	1.0	30	15	20	96.3	-	Allen and Downing(1986)
	1.0	0-45	15	18-28	100	30-45 นาที หลังการปฏิสนธิ (ที่อุณหภูมิ 25°C)	Allen et al. (1986a)
	1.0	0-120	15	18-25	90	-	Downing and Allen(1987)
	-	30	15	-	50	-	Downing (1988)
	-	15-55	15	18	75	40-55 นาที หลังการปฏิสนธิ	Stephens and Downing (1988)
	0.1-1.0	10-30	20	19	67.2	0.5 มก./ล.และ 10 นาทีหลังการปฏิสนธิ	Yamamoto et al. (1988)
	-	MI, MII	-	25	-	-	Cooper and Guo (1989)
	-	20	15	25	100	-	Downing (1989)
	-	MI, MII	-	25	-	-	Guo et al. (1989)
C. virginica	0.1-1.0	0-15	20	-	50	-	Stanley et al. (1981)
	0.1-1.0	15-30	20	-	74	-	
C. lugubris	0.5-1.0	5-30	15	-	77	0.1 มก./ล.	Roongratri and Youngvarichset (1991)
Ostrea edulis	1.0	MI 30-35	20	-	70	-	Gendreau and Grizel (1990)
	1.0	MII 30-35	20	-	70	-	
Pinctada fucata martensii	0.1-0.5	20-50	15	-	100	0.5 มก./ล.	Wada et al.(1989)
	0.1-0.5	20-50	15	-	80	0.1 มก./ล.	Wada et al.(1989)
	0.5	5-20	15	-	65.4	-	Uchimura et al.(1989)

MI คือไมโอซีส I

MII คือไมโอซีส II

ตารางที่ 3 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้คาเฟอีนในหอยสองฝา

ชนิดของหอยสองฝา	ความเข้มข้น มก./ล.	ระยะเวลาภายหลังการปฏิสนธิ (นาที)	ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ (นาที)	อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณของทริพลอยด์ (%)	ผู้วิจัย
Crassostrea gigas	1-13 10	MII 12-24 -	12 -	31.5 34	38 -	Durand et al. (1990)
Mytilus galloprovincialis	15 15	20 20	15 15	30 อุณหภูมิห้อง	81 71	Scarpa et al. (1994)

MII คือไมโอซีส II

ตารางที่ 4 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้ความดันในหอยนางรม

ชนิดของหอยนางรม	ระดับของความดัน	ระยะเวลาภายหลังการปฏิสนธิ (นาที)	ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ (นาที)	ปริมาณของทริพลอยด์ (%)	ผู้วิจัย
Crassostrea gigas	6000-8000 psi	10	10	57	Chaiton and Allen (1985)
Pinctada fucada	200-250 kg/cm^3	MI 5-7	10	76	Shen et al.(1993)
martensii	200-250 kg/cm^3	MII 17-19	10	76	Shen et al.(1993)

MI คือไมโอซีส I

MII คือไมโอซีส II

ตารางที่ 5 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้อุณหภูมิในหอยนางรม

ชนิดของหอยนางรม	ระยะเวลาภายหลังการปฏิสนธิ (นาที)	ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ (นาที)	อุณหภูมิ (°C)	ปริมาณของทริพลอยด์ (%)	สภาวะที่ให้ผลดีที่สุด	ผู้วิจัย
Crassostrea gigas	15-60	10	0	67	15 นาทีหลังการปฏิสนธิ	Yamamoto et al. (1988)
	15-60	10	35	68.3	20 นาทีหลังการปฏิสนธิ	
	MI 10-15	10-20	30-38	60	-	Quillet and Panelay (1986)
	MII 35-40					
	20-55	10-15 (3 นาทีสำหรับอุณหภูมิ 40°C)	32-40	83.3	MII 45 นาทีหลังการปฏิสนธิที่ 37°C และระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 15 นาที	Yamamoto et al. (1988)
	20-55	10-15	32-40	90	MI 15 นาทีหลังการปฏิสนธิที่ 37°C และระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 15 นาที	Yamamoto et al. (1988)
C.belcheri	10-40	5-10	35-42	43.3		Silapajarn(1993)
	10-40	15-20	3-10	35.28		
Pinctada fucata martensii	5-15	15	-	52	6.5 °C	Wada et al.(1989)
	5-15	15	-	-	5.2 °C	
	9	15	6-7	-	-	Uchimura et al. (1989)

MI คือไมโอซีส I

MII คือไมโอซีส II

วิธีการตรวจสอบการเป็นทริพลอยด์

การตรวจสอบการเป็นทริพลอยด์สามารถกระทำได้หลายวิธี ดังนี้

1. การนับจำนวนโครโมโซม เป็นวิธีที่ตรวจสอบการเป็นทริพลอยด์ได้โดยตรง และมักใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับวิธีการอื่น ๆ เป็นวิธีที่ให้ผลแน่นอนแต่ใช้เวลาในการดูโครโมโซมมาก การนับจำนวนโครโมโซมสามารถกระทำได้ในตัวอย่างหลายระยะ (stages) เช่นในไข่, ตัวอ่อนในระยะโทรโคฟอร์ และเนื้อเยื่อในระยะวัยเกล็ดและตัวเต็มวัย โดยการนำตัวอย่างมาแช่ในสารละลายโคลชิชิน สารละลายโคลชิชินสามารถยับยั้งการแบ่งเซลแบบไมโตซีสของเซลไว้ที่ระยะเมตาเฟส จึงทำให้จำนวนโครโมโซมในระยะเมตาเฟสมีมาก เพราะในระยะเมตาเฟสนี้โครโมโซมจะขดพันกันแน่นทำให้แต่ละโครโมโซมปรากฏเห็นเป็นคู่ชัดเจนทำให้ง่ายต่อการนับจำนวนโครโมโซม และศึกษาลักษณะคาริโอไทป์ของโครโมโซมได้อย่างชัดเจน ในระยะเมตาเฟสนี้โครโมโซมจะเริ่มเข้ามาเรียงตัวกันที่กึ่งกลางของสายใยสปินเดิล แต่สารละลายโคลชิชินจะไปทำลายสายใยสปินเดิลเป็นผลให้ไม่สามารถดึงโครโมโซมไปที่ขั้วเซลได้ การแบ่งเซลจึงถูกยับยั้งอยู่ที่ระยะเมตาเฟส แล้วจึงนำตัวอย่างมาแช่ในสารละลายไฮโปโทนิค เช่นโปตัสเซียม-คลอไรด์ (KCl) หรือน้ำที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าสารละลายภายในเซล เช่นน้ำทะเลเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันเพราะจะขึ้นกับชนิดของตัวอย่างสารละลายไฮโปโทนิคสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลจึงทำให้เซลเต่งแล้วนำไปแช่ในสารละลาย carnoy ที่ประกอบด้วยกรดอะซีติก 1 ส่วน และเมธานอล 3 ส่วน เพื่อรักษาให้องค์ประกอบของเซลไม่ให้ถูกทำลาย (ทุกครั้งที่ใช้จะต้องเตรียมใหม่ และเย็น) หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปหยดบนกระจกสไลด์แล้วย้อมสีที่มีคุณสมบัติย้อมติดโครโมโซมเช่นสี Giemsa แล้วจึงนำไปตรวจนับจำนวนโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทริพลอยด์จะมีจำนวนโครโมโซมเป็น 1.5 เท่าของดิพลอยด์ (Yamamoto and Sugawara, 1988; Beaumont and Fairbrother, 1991)

2. Flow Cytometry ตัวอย่างของเซลที่นำมาทดลองจะใช้เซลจากน้ำเลือด (Haemolymph) และเนื้อเยื่อจากแมนเดิล (mantle) ไซฟอน (siphon) และ foot เป็นต้น วิธีนี้ต้องใช้เนื้อเยื่อสดหรือแช่เย็น แล้วจึงนำตัวอย่างเซลย้อมด้วยสีชนิดเรืองแสง เช่นโปรดิเดียมไอโอไดด์ (prodidium iodide) หรือ DAPI ซึ่งเป็นสีย้อมที่มีคุณสมบัติย้อมติดเฉพาะส่วนของดีเอ็นเอ และ อาร์เอ็นเอ เมื่อย้อมเซลแล้วนำไปกระตุ้นด้วยเลเซอร์ แล้วจึงนำไปอ่านค่าความเข้มของการเรืองแสงของเซลนั้น ๆ ได้จากเครื่อง cytofluorographic analyzer โดยปกติแล้วใช้เม็ดเลือดแดงของไก่ (chicken erythrocytes) เป็นมาตรฐานในการ

เปรียบเทียบ (Allen, quoted in Beaumont and Fairbrother, 1991) ค่าการเรืองแสงของทริพลอยด์จะสูงกว่าดิพลอยด์ และมีค่าประมาณ 1.5 เท่าของดิพลอยด์ วิธีนี้สะดวกรวดเร็วและแม่นยำมาก (Allen, quoted in Beaumont and Fairbrother, 1991) และเคยใช้ได้ผลมาแล้วในตัวอ่อนที่มีขนาด 250 ไมโครเมตร (Chaiton and Allen, quoted in Beaumont and Fairbrother, 1991) และตัวอ่อนในระยะโทรโคฟอร์ (Allen, quoted in Beaumont and Fairbrother, 1991)

3. การวัดขนาดนิวเคลียส ขนาดของนิวเคลียสเพิ่มขึ้นตามจำนวนชุดของโครโมโซมที่เพิ่มขึ้น จากความแตกต่างของขนาดนิวเคลียสนี้เองจึงได้นำวิธีนี้มาใช้ในตรวจสอบการเป็นทริพลอยด์ ตัวอย่างถูกนำมาวัดขนาดของนิวเคลียสด้วยกล้องจุลทรรศน์หรือ Coulter Counter นิวเคลียสของเซลที่เป็นทริพลอยด์จะมีขนาดเป็น 1.5 เท่าของดิพลอยด์ (Beaumont and Fairbrother,1991) วิธีนี้เคยใช้และได้รับความสำเร็จมาแล้วในการจำแนกชนิดของพลอยด์ดีในปลาซาลมอน (Benfey and Sutterlin, 1984) และในปัจจุบันเริ่มนิยมนำมาใช้กับสัตว์น้ำจำพวกหอย (Beaumont and Fairbrother,1991)

4. Microfluorometry ใช้หลักการเปรียบเทียบความเข้มของการเรืองแสงของเซลที่ติดสีย้อม DAPI (4´-6-diamidino-2-phenylindole) DAPI เป็นสารอะโรมาติกฟลูออโรโครม (aromatic fluorochrome) สามารถย้อมติดสีได้ดีบนอะดีนีน (adenine) และไทมีน (thymine) ที่เป็นคู่เบสของดีเอ็นเอ หลังจากนิวเคลียสของเซลถูกย้อมด้วย DAPI แล้วจึงนำไปกระตุ้นด้วยแสงอุลตราไวโอเลตที่ระดับความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร แล้วนำไปวัดด้วยเครื่องวัดแสง (photometer) ความเข้มของการเรืองแสงแปรผันตามปริมาณของดีเอ็นเอ และแสดงออกมาเป็นฮีสโตแกรม (histogram) (Komaru, et al,quoted in Beaumont and Fairbrother, 1991)

5. Electrophoresis วิธีนี้ไม่เป็นที่นิยมมากนักในการใช้จำแนกชนิดของโพลีพลอยด์แต่ electrophoresis สามารถบอกความแตกต่างระหว่างดิพลอยด์และทริพลอยด์ โดยการดูจาก isozymes patterns (Allen et al., quoted in Chaiton and Allen, 1985)

Allen และคณะ (1982) อ้างถึงใน Beaumont และ Fairbrother (1991) ใช้วิธีนี้เปรียบเทียบกับการนับจำนวนโครโมโซม พบว่าการใช้ Electrophoresis สามารถทำได้รวดเร็วกว่าในกรณีที่มีตัวอย่างมาก ๆ โดยทดลองใน *Mya arenaria* พบว่าจีโนไทป์ของดิพลอยด์สามารถแยกจากจีโนไทป์ของทริพลอยด์โดยความเข้มสีของ electromorphs โดยที่ทริพลอยด์จะมี 3 electromorphs

6. การนับจำนวนของโพลาร์บอดี การนับจำนวนของโพลาร์บอดีสามารถใช้ได้ดีกับสัตว์น้ำที่สามารถมองเห็นโพลาร์บอดีได้ชัดเจน เป็นวิธีที่สะดวกและรวดเร็ว สำหรับการประเมินปริมาณทริพลอยด์ที่เกิดขึ้น การผลิตทริพลอยด์จะยับยั้งไม่ให้เกิดโพลาร์บอดีที่ 1 ในระยะไมโอซีส I หรือยับยั้งไม่ให้เกิดโพลาร์บอดีที่ 2 ในระยะไมโอซีส II ดังนั้นทริพลอยด์ที่ได้ต้องมีโพลาร์บอดีเพียงหนึ่งอันเท่านั้น วิธีนี้สามารถใช้ประเมินปริมาณของทริพลอยด์ที่เกิดขึ้นในหอยเชล *Pecten maximus* และหอยนางรมชนิด *Pinctada radiata* ได้ แต่วิธีนี้ไม่เหมาะสมในหอยแครง *Tapes semidecussatus* และหอยแมลงภู่ *Mytilus edulis* เพราะสังเกตเห็นโพลาร์บอดีที่ชัดเจนได้ยาก (Beaumont and Kelly, quoted in Beaumont and Fairbrother, 1991) นอกจากนี้ Stephens และ Downing อ้างถึงใน Beaumont และ Fairbrother (1991) ได้ใช้ DAPI ช่วยในการตรวจสอบโพลีพลอยด์ในเอมบริโอของหอยนางรม *C.gigas* เพราะ DAPI จะช่วยให้มองเห็นโพลีพลอยด์ได้ชัดเจนขึ้น