

การเห็นยว่นำกริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata*



นางสาวจินตนา จินดาลิขิต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาคตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2538

ISBN 974-631-943-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I16658620

TRIPLOID INDUCTION IN HOODED OYSTER *Saccostrea cucullata*

Miss Jintana Jindalikit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science

Department of Marine Science

Graduate School

Chulalongkorn University

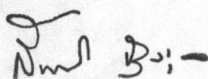
1995

ISBN 974-631-943-4



หัวข้อวิทยานิพนธ์ การเหนียวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจับ *Saccostrea cucullata*
โดย นางสาวจินตนา จินดาลิขิต
ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพลิมศักดิ์ จารยะพันธ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ดร. นวลมณี พงศ์ธนา

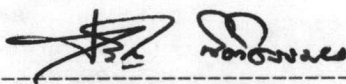
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาโทบัณฑิต



คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

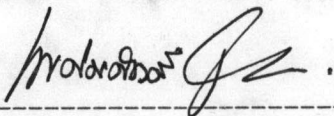
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ กุญสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



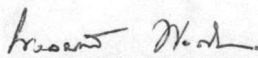
ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. เจริญ นิตยธรรมสง)



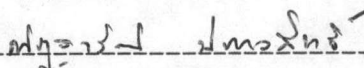
อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เพลิมศักดิ์ จารยะพันธ์)



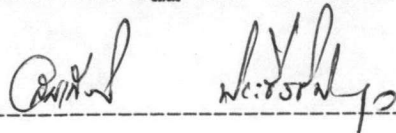
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. นวลมณี พงศ์ธนา)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ณิชฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์)



กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรฉัตรกุล)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสี่เหลี่ยมนี้เพียงแผ่นเดียว



จินตนา จินดาลิขิต : การเหนี่ยวนำทรพลอยด์ในหอยนางรมปากสืบ *Saccostrea cucullata* (TRIPLOID INDUCTION IN HOODED OYSTER *Saccostrea cucullata*)

อ.ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยคณบดี ดร.เฟดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.นวลมณี พงศ์ธนา, 90 หน้า. ISBN 974-631-943-4

การศึกษาการเหนี่ยวนำทรพลอยด์ในหอยนางรมปากสืบ *Saccostrea cucullata* แบ่งการศึกษาเป็น 3 ส่วน คือการศึกษาการโอโทปัยของหอยนางรมปากสืบ การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตหอยนางรมปากสืบที่เป็นทรพลอยด์และการเปรียบเทียบวิธีการเหนี่ยวนำทรพลอยด์ในหอยนางรมปากสืบ

ผลการศึกษาคาร์โอโทปัยของหอยนางรมปากสืบพบว่ามีความหนาแน่นโครโมโซมเท่ากับ 20 แท่ง ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริก 14 แท่ง และชนิดซิบเมตาเซนตริก 6 แท่ง

การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตหอยนางรมปากสืบที่เป็นทรพลอยด์โดยการเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรคาเลซินปีที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 15 นาที เริ่มเหนี่ยวนำภายหลังจากปฏิสนธิ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลผลิตของทรพลอยด์ด้วยการนับจำนวนโครโมโซมพบว่าหอยนางรมในระยะโทรโคเฟอรและอายุ 6 เดือน มีจำนวนทรพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 30 แท่ง และมีผลผลิตของทรพลอยด์เท่ากับ 45.34 ± 8.02 และ 3.55 ± 0.32 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ การทดลองนี้สรุปได้ว่ามีความเป็นไปได้ในการผลิตหอยนางรมปากสืบที่เป็นทรพลอยด์ ที่อายุ 6 เดือนพบว่าหอยนางรมที่เป็นดิพลอยด์และทรพลอยด์มีอัตราการเติบโตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การเปรียบเทียบวิธีการเหนี่ยวนำทรพลอยด์ในหอยนางรมปากสืบ โดยการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิสามระดับคือ 35 37.5 และ 40 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 3 6 9 12 และ 15 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 12 นาทีได้ผลผลิตของทรพลอยด์ในระยะโทรโคเฟอรสูงสุดเท่ากับ 40.11 ± 19.28 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการเปรียบเทียบวิธีการเหนี่ยวนำทรพลอยด์โดยใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส การใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และการใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 6 และ 12 นาที พบว่าการใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส และการใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตของทรพลอยด์สูงขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเหนี่ยวนำโดยมีผลผลิตของทรพลอยด์ที่ได้เท่ากับ 13.53 ± 1.22 และ 46.53 ± 13.67 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่การใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตของทรพลอยด์ลดลงโดยมีผลผลิตของทรพลอยด์ที่ได้เท่ากับ 21.78 ± 11.58 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นในทางปฏิบัติได้ข้อสรุปว่าการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิสูงน่าจะมีความเหมาะสมมากกว่าการใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ 29 ± 1 องศาเซลเซียส และการใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ตามหลังจาก 6 เดือนไม่พบหอยนางรมที่เป็นทรพลอยด์จากการเหนี่ยวนำโดยใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังกล่าว

ภาควิชา..... วิชาคณิศรทางทะเล.....
สาขาวิชา..... วิชาคณิศรทางทะเล.....
ปีการศึกษา..... 2537.....

ลายมือชื่อนิสิต.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

C325765 : MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD: TRIPLOID INDUCTION/ HOODED OYSTER/ *Saccostrea cucullata*/ KARYOTYPE
JINTANA JINDALIKIT : TRIPLOID INDUCTION IN HOODED OYSTER *Saccostrea cucullata*. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PADERMSAK JARAYABHAND, Ph.D., THESIS CO-ADVISOR : NUANMANEE PONGTHANA, Ph.D., 90 pp. ISBN 974-631-943-4.



The study of triploid induction in hooded oyster *Saccostrea cucullata* was divided into three parts. The first part was the examination of karyotype in this species. It was found that diploid chromosome number of this oyster was 20, which consisted of 14 metacentric chromosomes and 6 submetacentric chromosomes.

The second part was the induction of triploid by treating the zygotes with 0.5 mM Cytochalasin B for a period of 15 min at 15 min after fertilization and 29 ± 1 °C. The triploid yield was estimated by direct chromosome counting. Triploid oyster had 30 chromosomes. The observed triploid yields in trochophore and juvenile stages were 45.34 ± 8.02 and $3.55 \pm 0.32\%$, respectively. It was indicated that triploid in hooded oyster could possibly be induced. At 6 months old, growth rates of triploid and diploid oyster were not significantly different.

The third part was the comparison of triploid induction methods. The first method was the induction of triploid by high temperature shock at 35, 37.5 and 40 °C with 5 different duration times (3, 6, 9, 12 and 15 min) at 15 min after fertilization. The result showed that the most effective treatment for trochophore stage was at 40 °C for 12 min which gave the triploid yield of $40.11 \pm 19.28\%$. The second method was the induction of triploid with caffeine at 29 ± 1 °C, caffeine at 40 °C and temperature shock at 40 °C for 6 and 12 min at 15 min after fertilization. It was found that by increasing duration time from 6 to 12 min, the triploid yield were increased, when inducing with caffeine at 29 ± 1 °C and temperature shock at 40 °C. Triploid yield observed from induction with caffeine at 29 ± 1 °C, caffeine at 40 °C and temperature shock at 40 °C for 12 min starting 15 min after fertilization were 13.53 ± 1.22 , 21.78 ± 11.58 and $46.53 \pm 13.67\%$, respectively. Therefore, it was concluded from this study that high temperature shock at 40 °C was the most practical method to induce triploid in this species. However after 6 months, there was no triploid oyster induced by temperature shock at 40 °C.

ภาควิชา..... วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....

สาขาวิชา..... วิทยาศาสตร์ทางทะเล.....

ปีการศึกษา..... 2537.....

ลายมือชื่อนิสิต..... นันทนา จินดาลิกิต.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... นวนมณี พงษ์ธนา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... นวนมณี พงษ์ธนา.....



กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เจริญ นิตยธรรมสง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ดติมศักดิ์ จารยะพันธุ์ ดร.นวลมณี พงศ์ธนา รองศาสตราจารย์ณัฐวรัตน์ ปภาวสิทธิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรชติวรกุล กรรมการที่กรุณาตรวจทานและให้คำปรึกษา วิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ดติมศักดิ์ จารยะพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาและ ดร.นวลมณี พงศ์ธนา อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำเอกสารวิชาการและความรู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณอาจารย์อัมรา คัมภีรานนท์ และคุณสมภพ รุ่งสุภา ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำเอกสารวิชาการและความรู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณเอกพล อ่วมนุษ์ คุณไชยรัตน์ ศรีสะอาด คุณเดชา จันทะมาศ คุณสถาพร เจริญเด็ย คุณปริทัศน์ เจริญสิทธิ์ เจ้าหน้าที่สถานีวิจัยสัตว์ทะเลอ่างศิลา จ. ชลบุรี และนิสิตปริญญาโทภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเลทุกท่านที่สนับสนุนและช่วยเหลือในทุก ๆ ด้าน

ขอขอบคุณ คุณรัตนาวลี พูลสวัสดิ์ คุณไพโรจน์ ช้ายเกลี้ยง คุณสมศิริ หวังเจริญพร คุณสุชาดา บุญภักดี คุณไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์ และนักวิชาการที่กองประมงทะเลทุกท่าน ที่สนับสนุนและเป็นกำลังใจ

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลและโครงการปรับปรุงผลผลิต หอยนางรมโดยใช้พันธุศาสตร์ผ่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เพ็ดติมศักดิ์ จารยะพันธุ์ ที่ให้ทุนอุดหนุน การวิจัยวิทยานิพนธ์ และสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (STDB) ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และสุดท้ายขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และช่วยเหลืองานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ ประสบความสำเร็จล่วงด้วยดี



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญรูป.....	ซ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ.....	31
3. ผลการทดลอง.....	38
4. วิจารณ์ผลการทดลอง.....	56
5. สรุปและข้อเสนอแนะ.....	64
รายการอ้างอิง.....	68
ภาคผนวก.....	77
ประวัติผู้เขียน.....	90

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1	อัตราส่วนของเปลือกต่อเนื้อ และเปอร์เซ็นต์เนื้อโดยน้ำหนักของหอยนางรมปากเรียบและหอยนางรมปากจีบที่เปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล ประจำปี พ.ศ.2507.....7
2	การเห็นย่นาทรivolอยด์โดยการใช้ไฮโดรคลาซีนบีในหอยนางรม.....25
3	การเห็นย่นาทรivolอยด์โดยการใช้คาเฟอีนในหอยสองฝา.....26
4	การเห็นย่นาทรivolอยด์โดยการใช้ความดันในหอยนางรม.....26
5	การเห็นย่นาทรivolอยด์โดยการใช้อุณหภูมิจนในหอยนางรม.....27
6	ความถี่ของจำนวนโครโมโซมในหอยนางรมปากจีบที่เป็นดิพลอยด์ในตัวอ่อนระยะโทรโตฟอร์และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน.....39
7	ความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมหอยนางรมปากจีบที่เป็นดิพลอยด์จำนวน 10 เซล.....40
8	ลักษณะรูปร่างของโครโมโซมหอยนางรมชนิดต่าง ๆ.....41
9	ความถี่ของจำนวนโครโมโซมในหอยนางรมปากจีบที่เป็นทรivolอยด์ในตัวอ่อนระยะโทรโตฟอร์และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน.....45
10	ความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมหอยนางรมปากจีบที่เป็นทรivolอยด์จำนวน 4 เซล.....46
11	ปริมาณทรivolอยด์ อัตราการรอดและผลผลิตทรivolอยด์ของหอยนางรมปากจีบในตัวอ่อนระยะโทรโตฟอร์และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน.....47
12	ปริมาณทรivolอยด์ อัตราการรอดและผลผลิตของทรivolอยด์ในหอยนางรมปากจีบระยะโทรโตฟอร์ที่ได้จากการเห็นย่นาด้วยอุณหภูมิ โดยใช้เวลาในการเห็นย่นาต่างกัน และเริ่มเห็นย่นา 15 นาทีภายหลังการปฏิสนธิ.....51
13	ปริมาณทรivolอยด์ อัตราการรอดและผลผลิตของทรivolอยด์ในหอยนางรมปากจีบระยะโทรโตฟอร์ที่ได้จากการเห็นย่นาด้วยคาเฟอีน โดยใช้เวลาในการเห็นย่นา 6 และ 12 นาที และเริ่มเห็นย่นา 15 นาทีภายหลังการปฏิสนธิ.....54

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 การแพร่กระจายของแหล่งหอยนางรมชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย.....	5
2 วงจรชีวิตของหอยนางรม.....	8
3 ลักษณะรูปร่างของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส ซึ่งกำหนดโดยตำแหน่งของ เช่นโครเมียม.....	10
4 การแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้.....	12
5 การพัฒนาการของไซโทคแบบปกติในเซลล์ไข่หอยสองฝา.....	16
6 การเห็นสว่นาภิวลอสต์ในระยะไมโอซิส I.....	16
7 การเห็นสว่นาภิวลอสต์ในระยะไมโอซิส II.....	17
8 การเห็นสว่นาภิตระพลอสต์.....	17
9 การผลิตทริพลอสต์โดยการไข่เตตระพลอสต์เป็นเพศเมียและดิพลอสต์เป็นเพศผู้.....	18
10 การผลิตทริพลอสต์โดยการไข่ดิพลอสต์เป็นเพศเมียและเตตระพลอสต์เป็นเพศผู้.....	18
11 สูตรโครงสร้างของไซโตคาลาซินบี.....	21
12 สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน.....	22
13 สูตรโครงสร้างของคาเฟอีน.....	23
14 คาร์ิโอไทป์ของหอยนางรมปากจีบที่เป็นดิพลอสต์.....	42
15 โครโมโซมของหอยนางรมปากจีบที่เป็นดิพลอสต์.....	42
16 แผนภาพแสดงขนาดและลักษณะรูปร่างของโครโมโซมหอยนางรมปากจีบที่เป็นดิพลอสต์..	43
17 คาร์ิโอไทป์ของหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอสต์.....	48
18 โครโมโซมของหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอสต์.....	48
19 แผนภาพแสดงขนาดและลักษณะรูปร่างของโครโมโซมหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอสต์.	49
20 ผลผลิตของทริพลอสต์ในหอยนางรมปากจีบระยะโทรโอฟอ์ที่ได้จากการเห็นสว่นาภิวลอสต์ อุณหภูมิ (ก) 35°C (ข) 37.5°C และ (ค) 40°C โดยใช้เวลาในการ เห็นสว่นาภิวลอสต์ 3 6 9 12 และ 15 นาที และเริ่มเห็นสว่นาภิวลอสต์ 15 นาที ภายหลัง การปฏิสนธิ.....	52

- 21 ผลผลิตของทวีพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบระยะโทรโคฟอร์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วย
 คาเฟอีน (ก) การใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ $29 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (ข) การใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ
 40°C และ (ค) การใช้อุณหภูมิ 40°C โดยใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 6 และ
 12 นาที และเริ่มเหนี่ยวนำ 15 นาทีภายหลังการปฏิสนธิ.....55