การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata*

นางสาวจินตนา จินดาลิขิต

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
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	การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata*
โดย	นางสาวจินตนา จินดาลิขิต
ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ดร.นวลมณี พงศ์ธนา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

---------- คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

---------- ประธานกรรมการ

(อาจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมยง)

---------- อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์)

---------- อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(ดร. นวลมณี พงศ์ธนา)

---------- กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ณัฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์)

---------- กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

จินตนา จินดาลิขิต : การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* (TRIPLOID INDUCTION IN HOODED OYSTER *Saccostrea cucullata*) อ.ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ดร.นวลมณี พงศ์ธนา, 90 หน้า. ISBN 974-631-943-4

การศึกษาการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* แบ่งการศึกษาเป็น 3 ส่วน คือการศึกษาคาริโอไทป์ของหอยนางรมปากจีบ การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์และการเปรียบเทียบวิธีการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบ

ผลการศึกษาคาริโอไทป์ของหอยนางรมปากจีบพบว่ามีจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 20 แท่ง ซึ่งประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมตาเซนตริก 14 แท่ง และชนิดซับเมตาเซนตริก 6 แท่ง

การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์โดยการเหนี่ยวนำด้วยไซโตคาลาซินบีที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิโมลาร์ ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 15 นาที เริ่มเหนี่ยวนำภายหลังการปฏิสนธิ 15 นาที ที่อุณหภูมิ 29 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส ตรวจวัดผลผลิตของทริพลอยด์ด้วยการนับจำนวนโครโมโซมพบว่าหอยนางรมในระยะโทรโคฟอร์และอายุ 6 เดือน มีจำนวนทริพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 30 แท่ง และมีผลผลิตของทริพลอยด์เท่ากับ 45.34 $\pm$ 8.02 และ 3.55 $\pm$ 0.32 เปอร์เซนต์ตามลำดับ การทดลองนี้สรุปได้ว่ามีความเป็นไปได้ในการผลิตหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์ ที่อายุ 6 เดือนพบว่าหอยนางรมที่เป็นดิพลอยด์และทริพลอยด์มีอัตราการเติบโตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การเปรียบเทียบวิธีการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบ โดยการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิสามระดับคือ 35 37.5 และ 40 องศาเซลเซียส และระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 3 6 9 12 และ 15 นาที พบว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียสและระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 12 นาทีได้ผลผลิตของทริพลอยด์ในระยะโทรโคฟอร์สูงสุดเท่ากับ 40.11 $\pm$ 19.28 เปอร์เซนต์ สำหรับการเปรียบเทียบวิธีการเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ 29 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส การใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และการใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 6 และ 12 นาที พบว่าการใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ 29 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส และการใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตของทริพลอยด์สูงขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเหนี่ยวนำโดยมีผลผลิตของทริพลอยด์ที่ได้เท่ากับ 13.53 $\pm$ 1.22 และ 46.53 $\pm$ 13.67 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ แต่การใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตของทริพลอยด์ลดลงโดยมีผลผลิตของทริพลอยด์ที่ได้เท่ากับ 21.78 $\pm$ 11.58 เปอร์เซนต์ ดังนั้นในทางปฏิบัติได้ข้อสรุปว่าการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิสูงน่าจะมีความเหมาะสมกว่าการใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ 29 $\pm$ 1 องศาเซลเซียส และการใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อย่างไรก็ดีหลังจาก 6 เดือนไม่พบหอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์จากการเหนี่ยวนำโดยการใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ดังกล่าว

ภาควิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2537 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 ± 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 ± 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. Tripolid 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 ± 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 ลายมือชื่อนิสิต .....
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ทางทะเล ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอาจารย์ ดร.เจริญ นิติธรรมยง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ ดร.นวลมณี พงศ์ธนา รองศาสตราจารย์ณิฐารัตน์ ปภาวสิทธิ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล กรรมการที่กรุณาตรวจทานและให้คำปรึกษาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

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

ขอขอบพระคุณอาจารย์อัมรา คัมภิรานนท์ และคุณสมภพ รุ่งสุภา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำเอกสารวิชาการและความรู้ที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

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

ขอขอบคุณ คุณรัตนาวลี พูลสวัสดิ์ คุณไพโรจน์ ช้ายเกลี้ยง คุณสมศิริ หวังเจริญพร คุณสุชาดา บุญภักดี คุณไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์ และนักวิชาการที่กองประมงทะเลทุกท่านที่สนับสนุนและเป็นกำลังใจ

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเลและโครงการปรับปรุงผลผลิตหอยนางรมโดยใช้พันธุศาสตร์ผ่านผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยวิทยานิพนธ์ และสำนักงานคณะกรรมการพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (STDB) ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาและการวิจัยวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ตรวจทานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ และสุดท้ายขอขอบพระคุณบิดา มารดา และครอบครัวของข้าพเจ้าที่เป็นกำลังใจ และช่วยเหลืองานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ประสบความสำเร็จลุล่วงด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญตาราง.....ช

สารบัญรูป.....ช

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 และเปอร์เซนต์เนื้อโดยน้ำหนักของหอยนางรม ปากเรียบและหอยนางรมปากจีบที่เปลี่ยนแปลงตามฤดูกาล ประจำปี พ.ศ.2507....7
2 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้ไซโตคาลาซินบีในหอยนางรม.....25
3 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้คาเฟอีนในหอยสองฝา.....26
4 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้ความดันในหอยนางรม.....26
5 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้อุณหภูมิในหอยนางรม.....27
6 ความถี่ของจำนวนโครโมโซมในหอยนางรมปากจีบที่เป็นดิพลอยด์ในตัวอ่อนระยะโทรโคฟอร์และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน.....39
7 ความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมหอยนางรมปากจีบที่เป็นดิพลอยด์จำนวน 10 เซล...40
8 ลักษณะรูปร่างของโครโมโซมหอยนางรมชนิดต่าง ๆ.....41
9 ความถี่ของจำนวนโครโมโซมในหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์ในตัวอ่อนระยะโทรโคฟอร์และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน.....45
10 ความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์จำนวน 4 เซล...46
11 ปริมาณทริพลอยด์ อัตราการรอดและผลผลิตทริพลอยด์ของหอยนางรมปากจีบในตัวอ่อนระยะโทรโคฟอร์และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน.....47
12 ปริมาณทริพลอยด์ อัตราการรอดและผลผลิตของทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบระยะโทรโคฟอร์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิ โดยใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำต่างกัน และเริ่มเหนี่ยวนำ 15 นาทีภายหลังการปฏิสนธิ.....51
13 ปริมาณทริพลอยด์ อัตราการรอดและผลผลิตของทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบระยะโทรโคฟอร์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยคาเฟอีน โดยใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 6 และ 12 นาที และเริ่มเหนี่ยวนำ 15 นาทีภายหลังการปฏิสนธิ.....54

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 การแพร่กระจายของแหล่งหอยนางรมชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย.....5

2 วงจรชีวิตของหอยนางรม.....8

3 ลักษณะรูปร่างของโครโมโซมในระยะเมตาเฟส ซึ่งกำหนดโดยตำแหน่งของเซนโตรเมีย.....10

4 การแบ่งเซลแบบไมโอซีสของเซลสืบพันธุ์เพศผู้.....12

5 การพัฒนาการของไซโกตแบบปกติในเซลไข่หอยสองฝา.....16

6 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในระยะไมโอซีส I.....16

7 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในระยะไมโอซีส II.....17

8 การเหนี่ยวนำเตตระพลอยด์.....17

9 การผลิตทริพลอยด์โดยการใช้เตตระพลอยด์เป็นเพศเมียและดิพลอยด์เป็นเพศผู้.....18

10 การผลิตทริพลอยด์โดยการใช้ดิพลอยด์เป็นเพศเมียและเตตระพลอยด์เป็นเพศผู้.....18

11 สูตรโครงสร้างของไซโตคาลาซินบี.....21

12 สูตรโครงสร้างของโคลชิซิน.....22

13 สูตรโครงสร้างของคาเฟอีน.....23

14 คาริโอไทป์ของหอยนางรมปากจีบที่เป็นดิพลอยด์.....42

15 โครโมโซมของหอยนางรมปากจีบที่เป็นดิพลอยด์.....42

16 แผนภาพแสดงขนาดและลักษณะรูปร่างของโครโมโซมหอยนางรมปากจีบที่เป็นดิพลอยด์..43

17 คาริโอไทป์ของหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์.....48

18 โครโมโซมของหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์.....48

19 แผนภาพแสดงขนาดและลักษณะรูปร่างของโครโมโซมหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์.49

20 ผลผลิตของทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบระยะโทรโคฟอร์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิ (ก) 35°C (ข) 37.5°C และ (ค) 40°C โดยใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 3 6 9 12 และ 15 นาที และเริ่มเหนี่ยวนำ 15 นาที ภายหลังการปฏิสนธิ.....52

รูปที่ หน้า

21 ผลผลิตของทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบระยะโทรโคฟอร์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำด้วยคาเฟอีน (ก) การใช้คาเฟอีนที่อุณหภูมิ 29±1°C (ข) การใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิ 40°C และ (ค) การใช้อุณหภูมิ 40°C โดยใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 6 และ 12 นาที และเริ่มเหนี่ยวนำ 15 นาทีภายหลังการปฏิสนธิ.....55