

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการ

ก. การศึกษาคาร์ิโอไทป์ของหอยนางรมปากจีบ

ทำการศึกษาคาร์ิโอไทป์ในตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ 2 ระยะเวลาคือตัวอ่อนในระยะ  
โทรโคเฟอรอายุ 5-6 ชั่วโมงและลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน โดยมีขั้นตอนการศึกษาดังนี้

การเตรียมตัวอย่าง

1. นำหอยนางรมที่ได้จากการเพาะเลี้ยงที่สถานีวิจัยสัตว์ทะเลอ่างศิลา ภาควิชา  
วิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดชลบุรีมาเลี้ยงต่อบริเวณชายฝั่งธรรมชาติ  
ที่คลองบางโพรงซึ่งอยู่ใกล้กับสถานีวิจัย จนกระทั่งหอยนางรมอยู่ในระยะเจริญพันธุ์และมีความ  
สมบูรณ์เพศเต็มที่จึงนำมาเป็นพ่อแม่พันธุ์สำหรับการทดลองนี้

2. เตรียมเซลล์สืบพันธุ์โดยนำตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์มาล้างเปลือกให้สะอาดแล้วทำการ  
ผ่าตัดและใช้หลอดดูดชนิดปลายแหลมดูดเซลล์สืบพันธุ์หยดลงบนกระจกสไลด์เพื่อแยกไข่และสเปิร์ม  
คัดเลือกเฉพาะไข่กับสเปิร์มที่มีคุณภาพโดยการตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งในเพศเมียต้องมี  
ไข่ขนาดใหญ่และเห็นนิวเคลียสชัดเจนและเพศผู้ต้องมีสเปิร์มที่เคลื่อนไหวรวดเร็ว จากนั้นจึงรีด  
เซลล์สืบพันธุ์ลงในน้ำทะเลที่ผ่านการกรองด้วยไส้กรองขนาด 1 ไมครอน

3. ปฏิสนธิโดยนำไข่ผสมกับสเปิร์มและปล่อยให้ปฏิสนธิเป็นเวลา 5 นาที จึงกรอง  
สเปิร์มที่มากเกินไปออกโดยการใช้อุปกรณ์กรองขนาด 20 ไมครอน

4. นำไข่ซึ่งผ่านการปฏิสนธิไปเลี้ยงต่อบนอ่างอนุบาลขนาด 1,000 ลูกบาศก์ลิตร  
จนมีพัฒนาการถึงระยะโทรโคเฟอร จึงสุ่มตัวอย่างในระยะนี้ไปหาโครโมโซมและเลี้ยงลูกหอย  
นางรมในส่วนที่เหลือด้วยความหนาแน่นประมาณ 5 ตัวต่อมิลลิลิตร เปลี่ยนน้ำทุก ๆ 3 วัน และ  
ให้ *Isochysis galbana* *Chaetoceros calcitrans* และ *Tetraselmis* sp. เป็น  
อาหารวันละ 2 ครั้ง ในเวลาเช้าและเย็น ครั้งละประมาณ 500 มิลลิลิตร จนมีอายุ 6 เดือน  
จึงสุ่มตัวอย่างในระยะนี้ไปหาโครโมโซม

### วิธีการหาโครโมโซม

#### 1. วิธีการหาโครโมโซมในระยะโทรโอฟอร์

- 1.1 นำตัวอย่างในระยะโทรโอฟอร์แช่ในสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 2-3 ชั่วโมง
- 1.2 ล้างสารละลายโคลชิซินออกจากตัวอย่างประมาณ 2-3 ครั้ง ให้สะอาดด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการกรองแล้ว
- 1.3 นำตัวอย่างแช่ในสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.075 โมลาร์เป็นเวลา 40 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (คนบ่อย ๆ เพื่อไม่ให้ตัวอย่างตกตะกอน)
- 1.4 ทำให้ตัวอย่างตกตะกอนโดยใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์หมุนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 1.5 คูดสารละลาย KCl ออก โดยใช้หลอดดูดชนิดปลายแหลม
- 1.6 ใส่น้ำสารละลาย carnoy คนเบา ๆ แล้วจึงทำให้ตัวอย่างตกตะกอนอีกครั้งโดยใช้เครื่องเซนตริฟิวจ์หมุนด้วยความเร็ว 100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที
- 1.7 คูดตัวอย่างที่กั้นหลอดประมาณ 2 หยด แล้วเติมกรดอะซิติกที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 10-15 หยด ทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที
- 1.8 นำตัวอย่างไปหยดบนกระจกสไลด์ซึ่งวางไว้บนแผ่นความร้อน (hot plate) ที่อุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียส โดยหยดสูงจากแผ่นกระจกสไลด์ประมาณ 30 เซนติเมตร
- 1.9 นำสไลด์ไปย้อมในสารละลาย Giemsa ที่ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 30 นาที
- 1.10 ล้างกระจกสไลด์ด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง
- 1.11 ทิ้งให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง แล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยใช้กำลังขยายต่ำ 40-100 เท่า เพื่อหาบริเวณที่มีเซลล์อยู่ จากนั้นจึงเพิ่มกำลังขยายเป็น 400-1,000 เท่าจนสามารถเห็นโครโมโซมได้ชัดเจน

#### 2. วิธีการหาโครโมโซมในลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน

- 2.1 นำตัวอย่างลูกหอยนางรมปากจับแช่ในน้ำผสมสำหรับยาสีเซลเดียวที่มีความเข้มข้นของสารละลายโคลชิซิน 0.05 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง ซึ่งในการทดลองนี้ใช้สารยาสีเซลเดียวชนิด *Tetraselmis* sp. และ *Isochysis galbana* ขณะแช่ตัวอย่าง

ต้องให้อากาศเบา ๆ

2.2 ล้างสารละลายโคลชิซินออกจากตัวอย่างประมาณ 2-3 ครั้ง ให้สะอาด  
ด้วยน้ำทะเลที่ผ่านการกรองแล้ว

2.3 ผ่าตัด และแกะเปลือกหอยนางรมออก

2.4 นำตัวอย่างแช่ในสารละลาย KCl 0.075 โมลาร์เป็นเวลา 40 นาที  
ที่อุณหภูมิห้อง

2.5 คูดสารละลาย KCl ออก โดยใช้หลอดดูดชนิดปลายแหลม

2.6 ใส่สารละลาย carnoy คนเบา ๆ และเปลี่ยนสารละลาย carnoy  
หลาย ๆ ครั้งเพื่อชะล้างสิ่งสกปรกต่าง ๆ ที่ติดมากับตัวอย่างรวมทั้งอาหารในกระเพาะของ  
ตัวอย่างที่แตกออกมา

2.7 นำตัวอย่างที่เก็บรักษาไว้ในสารละลาย carnoy ตัดเฉพาะส่วนของ  
เหงือกให้มีขนาดประมาณ 1 ตารางมิลลิเมตร ใส่ในหลุมบด เติมกรดอะซีตริกที่ความเข้มข้น  
50 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 1-2 หยด และใช้ปลายแท่งแก้วคนสารบดตัวอย่างให้ละเอียดแล้วจึง  
เติมกรดอะซีตริกที่ความเข้มข้นเท่าเดิมอีกจนเต็มหลุม ทิ้งไว้เป็นเวลาประมาณ 5 นาที

2.8 ใช้หลอดดูดชนิดปลายแหลมดูดน้ำตัวอย่างเฉพาะส่วนบนของหลุมบด ใน  
ขั้นตอนต่อไปปฏิบัติเช่นเดียวกับวิธีการหาโครโมโซมในระยะโทรโอฟอร์ทัวซั 1.8-1.11 (ใน  
ข้อ ก. การศึกษาคาริโอไทป์ของหอยนางรมปากจับ)

### วิธีการศึกษาคาริโอไทป์

การศึกษาคาโรไทป์นี้จะศึกษาจำนวน ขนาดและลักษณะรูปร่างของโครโมโซม

1. ตรวจนับจำนวนโครโมโซมในระยะเมตาเฟสจำนวน 3 เซลล์ต่อ 1 ตัวอย่าง  
จากตัวอย่างในระยะโทรโอฟอร์ทัวซัจำนวน 50 ตัวอย่าง และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือนจำนวน  
50 ตัวอย่าง

2. คัดเลือกโครโมโซมในระยะโทรโอฟอร์ทัวซัจำนวน 10 เซลล์ ที่มีลักษณะสมบูรณ์  
กระจายตัวดี และโครโมโซมมีการหดตัวไม่มากเกินไปจนแบ่งแยกความยาวของแขนสั้นและแขน  
ยาวลำบาก วัดความยาวของแขนโครโมโซม เพื่อนำมาศึกษาลักษณะรูปร่างของโครโมโซม

3. นำโครโมโซมที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการและย้อมติดสี Giemsa ชัดเจนมาถ่าย  
รูปด้วยกำลังขยาย 500 เท่า ใช้ฟิล์มสีมีความไวแสง 100 หรือ 200 และนำรูปถ่ายขนาด  
4x6 นิ้ว มาขยายอีก 2 เท่า

4. วัดความยาวของแขนโครโมโซม (LT) โดยวัดความยาวแขนสั้น (short arm: Ls) และความยาวของแขนยาว (long arm: Ll) ของแท่งโครโมโซม จากตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ถึงปลายสุดของแขนแต่ละข้าง เนื่องจากโครโมโซมมี 2 โครโมติด ดังนั้นค่า Ls และ Ll จึงต้องเป็นค่าเฉลี่ย ค่าความยาวของแขนโครโมโซม (LT) เท่ากับค่าเฉลี่ยความยาวของแขนสั้นรวมกับแขนยาว

5. คำนวณหาค่า Relative Length (R.L.) และค่า Centrometric Index (C.I.) โดยใช้สูตร

$$C.I. = Ll/LT$$

$$R.L. = LT/\Sigma LT$$

$$LT = Ls + Ll$$

และจับคู่โครโมโซมคู่เหมือน (homologous chromosome) โดยโครโมโซมที่มีค่า R.L. และ C.I. ใกล้เคียงกันเป็นโครโมโซมที่เป็นคู่เหมือนกัน และจำแนกชนิดของโครโมโซมจากค่า C.I. ตามวิธีของ Chen และ Ruddle (1970) อ้างถึงใน Sungpetch (1993) โดย

โครโมโซมชนิด Metacentric chromosome มีค่า C.I. อยู่ระหว่าง 0.50-0.59

โครโมโซมชนิด Submetacentric chromosome มีค่า C.I. อยู่ระหว่าง 0.60-0.75

โครโมโซมชนิด Acrocentric chromosome มีค่า C.I. อยู่ระหว่าง 0.76-1.00

หรือ Telocentric chromosome

6. นำรูปถ่ายของโครโมโซมมาตัด จับคู่ และเรียงตามความยาวของโครโมโซม โดยให้มีจุดของเซนโทรเมียร์ตรงกัน

## ข. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตทอสนางรมปากจับที่เป็นทริพลอยด์

ทำการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในทอสนางรมปากจับด้วยไซโตคาลาซินบี ซึ่งเป็นวิธีที่เคยใช้ได้ผลมาแล้วในทอสนางรมหลายชนิด โดยตรวจนับปริมาณของทริพลอยด์ที่เกิดขึ้นในตัวอ่อนระยะโทรโคฟอร์อายุ 5-6 ชั่วโมง และลูกทอสนางรมอายุ 6 เดือน เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตทอสนางรมปากจับที่เป็นทริพลอยด์ หลังจากนั้นนำโครโมโซมที่ได้จากตัวอย่างทอสนางรมที่เป็นทริพลอยด์ไปศึกษาคาร์ิโอไทป์

### การเหนี่ยวนำทริพลอยด์

1. ปฏิบัติเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างหัวข้อ 1-3 (ในข้อ ก. การศึกษา คาร์โบไฮเดรตของหอยนางรมปากจีบ) และในระหว่างที่มีการปฏิสนธิต้องควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ระหว่าง  $29 \pm 1$  องศาเซลเซียส และความเค็มอยู่ระหว่าง 26-28 ส่วนในพันส่วน

2. เหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วยไฮโดรคาลาซินบี โดยนำไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิใส่ในถุงกรองขนาด 20 ไมครอน ภายหลังจากปฏิสนธิเป็นเวลา 15 นาที จึงนำไปเหนี่ยวนำด้วยไฮโดรคาลาซินบีที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 15 นาที และล้างด้วย Dimethyl sulfoxide ที่ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ เป็นเวลา 20 นาที

3. นำไข่ซึ่งผ่านการปฏิสนธิไปเลี้ยงต่อ โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างหัวข้อ 4 (ในข้อ ก. การศึกษา คาร์โบไฮเดรตของหอยนางรมปากจีบ) หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างจากตัวอ่อนในระยะโทรโคฟอร์อายุ 5-6 ชั่วโมง และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน ในกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำทริพลอยด์และกลุ่มควบคุมไปหาจำนวนโครโมโซม โดยการหาโครโมโซมในลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน ได้ทำการแยกลูกหอยนางรมออกเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มขนาดเล็กและกลุ่มขนาดใหญ่ เพื่อใช้เปรียบเทียบการเติบโตระหว่างหอยนางรมที่เป็นดิพลอยด์และทริพลอยด์

#### 4. หาผลผลิตของทริพลอยด์

4.1 นับจำนวนโครโมโซมเฉพาะเซลล์ที่ไม่แตกจนโครโมโซมปนกัน โดยเลือกเซลล์ที่เห็นขอบเซลล์ชัดเจนหรือเห็นโครโมโซมกระจายเป็นวงกลมและไม่ซ้อนทับกัน ตรวจนับจำนวนโครโมโซมจำนวน 3 เซลล์ ต่อ 1 ตัวอย่าง จากตัวอ่อนในระยะโทรโคฟอร์จำนวน 103 ตัวอย่าง และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน จำนวน 219 ตัวอย่าง

4.2 จำแนกชนิดของพลอยด์ดี โดยกำหนดให้หอยนางรมที่มีจำนวนโครโมโซม 15-24 แท่งเป็นชนิดดิพลอยด์ และ 25-34 แท่งเป็นชนิดทริพลอยด์

4.3 คำนวณหาผลผลิตของทริพลอยด์ (yield) ของหอยนางรมปากจีบในตัวอ่อนระยะโทรโคฟอร์และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน โดยใช้สูตร

$$\text{ผลผลิตของทริพลอยด์ (\%)} = \frac{\text{ปริมาณของทริพลอยด์ (\%)} \times \text{อัตราการรอด (\%)}}{100}$$

โดยคำนวณปริมาณของทริพลอยด์ได้จากสูตร

$$\text{ปริมาณของทริพลอยด์ (\%)} = \frac{\text{จำนวนตัวอย่างที่เป็นทริพลอยด์} \times 100}{\text{จำนวนตัวอย่างทั้งหมด}}$$

และคำนวณอัตราการรอด โดยการสุ่มตัวอย่างหอยนางรม 3 ครั้ง ในตัวอย่างระยะเริ่มต้น ตัวอย่างระยะโทรโคฟอร์และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือนและนำไปคำนวณอัตราการรอดโดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการรอด (\%)} = \frac{(\text{จำนวนตัวอย่างระยะเริ่มต้น} - \text{จำนวนตัวอย่างในระยะต่าง ๆ}) \times 100}{\text{จำนวนตัวอย่างระยะเริ่มต้น}}$$

### การศึกษาการโอโตปี

นำโครโมโซมที่ได้จากตัวอย่างหอยนางรมที่เป็นทริพลอยด์มานับจำนวนโครโมโซม โดยนับจำนวนโครโมโซม 3 เซล ต่อ 1 ตัวอย่าง จากตัวอย่างในระยะโทรโคฟอร์จำนวน 103 ตัวอย่างและลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน จำนวน 219 ตัวอย่าง หลังจากนั้นคัดเลือกโครโมโซมในระยะโทรโคฟอร์ที่มีลักษณะสมบูรณ์จำนวน 4 เซล มาศึกษาขนาดและลักษณะรูปร่างของโครโมโซม โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับวิธีการศึกษาการโอโตปีหัวข้อ 1-6 (ในข้อ ก. การศึกษาการโอโตปีของหอยนางรมปากจีบ)

### ค. การเปรียบเทียบวิธีการเห็นขนานทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบ

แบ่งการทดลองเป็น 2 ตอน ตอนที่ 1 การเห็นขนานทริพลอยด์ในหอยนางรมปากจีบ ด้วยอุณหภูมิและระยะเวลาในการเห็นขนานต่าง ๆ กัน เพื่อหาอุณหภูมิและระยะเวลาในการเห็นขนานที่เหมาะสมกับหอยนางรมปากจีบ และตอนที่ 2 การเห็นขนานทริพลอยด์โดยการใช้อุณหภูมิสูงเปรียบเทียบกับการใช้คาเฟอีนและการใช้คาเฟอีนร่วมกับอุณหภูมิสูง

1. เห็นขนานทริพลอยด์โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการเตรียมตัวอย่างหัวข้อ 1-3 (ในข้อ ก. การศึกษาการโอโตปีของหอยนางรมปากจีบ) และในระหว่างที่มีการปฏิบัติงานต้องควบคุมอุณหภูมิของน้ำให้อยู่ระหว่าง  $29 \pm 1$  องศาเซลเซียส และความเค็มอยู่ระหว่าง 26-28 ส่วนในพันส่วน

2. นำไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิใส่ในถุงกรองขนาด 20 ไมครอน ภายหลังจากการปฏิสนธิเป็นเวลา 15 นาที จึงนำไปเหนี่ยวนำทริพลอยด์

2.1 เหนี่ยวนำทริพลอยด์โดยการใช้อุณหภูมิ 35 37.5 และ 40 องศาเซลเซียสและระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 3 6 9 12 และ 15 นาที โดยควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ด้วยเครื่องควบคุมอุณหภูมิซึ่งสามารถวัดอุณหภูมิได้ถึงจุดศนิยม 2 ตำแหน่ง และทำการทดลอง 2 ครั้ง

2.2 เหนี่ยวนำทริพลอยด์ โดยการใช้คาเฟอีนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ที่อุณหภูมิห้อง (29+1 องศาเซลเซียส) การใช้คาเฟอีนที่ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ร่วมกับอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และการใช้อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส โดยใช้ระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 6 และ 12 นาที และทำการทดลอง 2 ครั้ง

3. นำไข่ที่ผ่านการปฏิสนธิไปอนุบาลต่อในถังพลาสติกขนาด 10 ลิตร จนมีพัฒนาการถึงระยะโทรโคฟอร์ จึงสุ่มตัวอย่างในระยะโทรโคฟอร์ที่อายุประมาณ 5-6 ชั่วโมง ไปหาจำนวนโครโมโซม อัตราการรอดและผลผลิตของทริพลอยด์ โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการเหนี่ยวนำทริพลอยด์หัวข้อ 4 (ในข้อ ๒. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์)

4. เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยสำหรับผลผลิตของทริพลอยด์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำที่อุณหภูมิและระยะเวลาในการเหนี่ยวนำต่าง ๆ โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of Variance) (ศิริชัย พงษ์วิชัย, 2537) โดยแปลงข้อมูลอัตราส่วนผลผลิตของทริพลอยด์ด้วยวิธี angular transformation เพื่อให้ข้อมูลมีการกระจายแบบ normal distribution ก่อนที่จะนำมาเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (Snedecor, 1967) โดยใช้สูตร

$$\text{Angle} = \text{Arcsin} \sqrt{\text{proportion}}$$

5. นำวิธีการเหนี่ยวนำที่ดีที่สุดมาใช้เหนี่ยวนำลูกหอยนางรมปากจีบและอนุบาลลูกหอยนางรมจนมีอายุ 6 เดือน จึงทำการสุ่มตัวอย่างจากตัวอ่อนในระยะโทรโคฟอร์อายุ 5-6 ชั่วโมง และลูกหอยนางรมอายุ 6 เดือน ไปหาจำนวนโครโมโซม อัตราการรอดและผลผลิตของทริพลอยด์ โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับการเหนี่ยวนำทริพลอยด์หัวข้อ 4 (ในข้อ ๒. การศึกษาความเป็นไปได้ในการผลิตหอยนางรมปากจีบที่เป็นทริพลอยด์)