



รายงานการวิจัย

การผลิตลูกหอยตะโกรมครามขาว (*Crassostrea belcheri*)
แบบทรिพลอยด์จากโรงเพาะฟัก
Triploid Tropical Oyster (*Crassostrea belcheri*)
Production from a Hatchery

สุวัจน์ ธีณรส	Suwat Tanyaros
อลงกลด แทนอมทอง	Alongklod Tanomtong
วรพร ธารางกูร	Woraporn Tarangkoon
สุพัชชา ชูเสียงแจ้ว	Supatcha Chooseangjaew

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

งบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2558



รายงานการวิจัย

การผลิตลูกหอยตะเภากรมขาว (*Crassostrea belcheri*)
แบบทรिพลอยด์จากโรงเพาะฟัก
Triploid Tropical Oyster (*Crassostrea belcheri*)
Production from a Hatchery

คณะผู้วิจัย

สุวัจน์ ธีญรส	Suwat Tanyaros
อลงกลด แทนอมทอง	Alongklod Tanomtong
วรพร ธารางกูร	Woraporn Tarangkoon
สุพัชชา ชูเสียงแจ้ว	Supatcha Chooseangjaew

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณแผ่นดิน พ.ศ. 2558

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในครั้งนี้สำเร็จบรรลุตามวัตถุประสงค์ได้ด้วยความอนุเคราะห์จากหลายฝ่าย คณะผู้วิจัยใคร่ขอขอบคุณคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมงในการเอื้อเฟื้อและการสนับสนุนการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในโรงเพาะฟักหอยทะเล

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ นางสาวสุภาวดี แซ่ภู และนายณัฐวุฒิ คิตรอบ ที่ช่วยเหลือในการเก็บตัวอย่างและวิเคราะห์ข้อมูลตลอดระยะเวลาการศึกษา งานวิจัยนี้ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย จากงบประมาณแผ่นดินประจำปี พ.ศ. 2558

คณะผู้วิจัย

สิงหาคม 2562



การผลิตลูกหอยตะไคร้กรมกรวมขาว (*Crassostrea belcheri*) แบบทรูปลอยด์จากโรงเพาะฟัก

สุวัจน์ ธีธรรส¹ อลงกลด แทนอมทอง² วรพร ธารางกูร¹ และสุพัชชา ชูเสียงแจ้ว³

บทคัดย่อ

การผลิตลูกหอยตะไคร้กรมกรวมขาวแบบทรูปลอยด์จากโรงเพาะฟัก ด้วยสาร 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน แบ่งการศึกษาออกเป็น 3 ส่วน ดังนี้ (1) ลักษณะคาร์ิโอไทป์ของพ่อแม่พันธุ์หอยตะไคร้กรมกรวมขาว เตรียมโครโมโซมด้วยวิธีทางตรงจากเนื้อเยื่อเหงือก ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบนอร์ ผลการศึกษาพบว่าจำนวนดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 20 แท่ง และมีจำนวนแขนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 40 ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกทั้งหมด แบ่งเป็นโครโมโซมขนาดใหญ่ 10 แท่ง และขนาดกลาง 10 แท่ง โครโมโซมเครื่องหมาย คือโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ซึ่งอยู่บริเวณปลายแขนข้างสั้นของโครโมโซมคู่ที่ 10 (2) ศึกษาปัจจัยการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์ด้วย 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของ 6-DMAP (100, 200 และ 300 μM) ระยะเวลาหลังการผสม (30, 40 และ 50 นาที) และระยะเวลาการเหนี่ยวนำ (5 และ 10 นาที) เตรียมโครโมโซมด้วยวิธีทางตรงจากตัวอ่อนระยะโทรโคฟอร์ ผลการตรวจสอบพบว่า ค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์ทรูปลอยด์อยู่ระหว่าง 43.85 ± 12.28 ถึง 86.99 ± 2.45 ที่ระดับความเข้มข้น 100 μM 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีนที่ 30 นาทีหลังการผสมและระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 10 นาที ให้ผลเปอร์เซ็นต์ทรูปลอยด์สูงกว่าระดับอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อัตรารอดสูงสุดพบในกลุ่มชุดควบคุม ($54.00 \pm 7.45\%$) ขณะที่อัตรารอดหน่วยการทดลองอื่นอยู่ในช่วง 34.13 ± 5.11 ถึง $54.00 \pm 2.74\%$ ค่าเฉลี่ยผลผลิตทรูปลอยด์อยู่ในช่วง 21.12 ± 6.80 ถึง $43.68 \pm 2.44\%$ จากผลการทดลองพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 100 μM 50 นาทีหลังการผสมและระยะเวลาการเหนี่ยวนำ 5 นาที มีค่าผลผลิตทรูปลอยด์สูงสุด ($p < 0.05$) จากการศึกษาตรวจสอบโครโมโซมพบว่าทรูปลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 30 ประกอบด้วยโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกทั้งหมด นอกจากนี้การเหนี่ยวนำทรูปลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีนยังตรวจพบชุดโครโมโซมที่เป็นสี่ชุด (เตตราพลอยด์) และห้าชุด (เพนตะพลอยด์) ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 40 และ 50 แท่งตามลำดับ และ (3) ศึกษาพัฒนาการในระยะต่างๆของลูกหอยตะไคร้กรมกรวมขาวจากการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์โดยเลือกชุดการทดลองที่ให้ผลผลิตทรูปลอยด์สูงสุดจากการศึกษาข้างต้นมาทำการศึกษา พบว่า ลูกหอยในระยะวัยอ่อนจนถึงระยะลงเกาะจากชุดควบคุมมีอัตรารอดที่ดีกว่าชุดการเหนี่ยวนำ ($p < 0.05$) ขณะที่การเจริญเติบโตทั้งด้านความยาวและความกว้างของลูกหอยทั้ง 2 ชุดการทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p > 0.05$) จากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำมาพัฒนาต่อเพื่อให้ได้ลูกพันธุ์ที่มีการเจริญเติบโตเร็วและคุณภาพผลผลิตเป็นที่ต้องการของตลาด เพื่อรองรับการพัฒนาอุตสาหกรรมเลี้ยงหอยนางรมในเชิงพาณิชย์ต่อไป

¹อาจารย์ สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.สิเกา จ.ตรัง

²อาจารย์ สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อ.เมือง จ.ขอนแก่น

³อาจารย์ สาขาเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.สิเกา จ.ตรัง

Triploid Tropical Oyster (*Crassostrea belcheri*)

Production from a Hatchery

Suwat Tanyaros¹ Alongklod Tanomtong² Woraporn Tarangkoon¹
and Supatcha Chooseangjaew³

Abstract

Production of triploid from hatchery in the tropical oyster (*Crassostrea belcheri* Sowerby, 1871) using 6-Dimethylaminopurin (6-DMAP) was separated into third parts. The first part was examined the karyotype in this species. The chromosomes were directly prepared from gills tissue then stained by conventional staining and Ag-NOR banding techniques. The results revealed that the diploid chromosome number was 20 and fundamental number (NF) was 40. All karyotypes comprised of metacentric chromosomes. One position of NORs was presented on the short arm of chromosomes pairs ten. The second part, induction of triploid by 6-DMAP was examined. The result showed that average of triploid percentage varied from 43.85 ± 12.28 to $86.99 \pm 2.45\%$. Highest triploid percentage was found at 100 μM 6-DMAP, 30 min after fertilization and 10 min exposure ($p < 0.05$). Highest survival rate was showed in control group ($54.00 \pm 7.45\%$), while mean average survival rate was ranged 34.13 ± 5.11 to $54.00 \pm 2.74\%$ in other treatments. Yield of triploid from each treatment was ranged from 21.12 ± 6.80 to $43.68 \pm 2.44\%$. The best yield of triploid was founded at concentration 100 μM , 50 min after fertilization and 5 min duration. Metaphase of triploid chromosome number was 30 and the karyotype comprised all metacentric chromosomes. Moreover, the triploid induction using 6-DMAP was presented four set chromosomes (tetraploid, $4n$) and five set chromosomes (pentaploid, $5n$), the chromosome numbers were 40 and 50, respectively. The final part, high production triploid from above described in the second part was selected for this experiment. Development of larvae in each stage were estimated. The result showed that the high survival rate in control group than triploid induction group ($p < 0.05$) while the both of growth rate, width and length shell showed non significance in two group ($p > 0.05$). The result from this study can be adopted to oyster seed development on obtained fast growth and high production quality to market size and support the development of commercial oyster farming industry.

¹Department of Marine Science, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang.

² Department of Biology, Faculty of Science, Khon Kaen University, Muang, Khon Kaen.

³Department of Fisheries Technology, Faculty of Science and Fisheries Technology. Rajamangala University of Technology Srivijaya, Sikao, Trang

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ข
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญภาพ	ฅ
บทนำ	1
วิธีการดำเนินงานวิจัย	3
ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย	12
สรุปผลการวิจัย	37
ข้อเสนอแนะ	38
เอกสารอ้างอิง	39



สารบัญตาราง

ตารางที่ 1.	การจำแนกชนิดของโครโมโซมโดยอาศัยอัตราส่วนระหว่างแขนข้างยาวต่อแขนข้างสั้น	7
ตารางที่ 2.	แสดงค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น, ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว, ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT), ค่า relative length (RL), ค่า centromeric index (CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ของ RL และ CI จากเซลล์ระยะเมทาเฟส 20 เซลล์ของหอยตะโกรมกรามขาว (<i>Crassostrea belcheri</i> , $2n=20$)	18
ตารางที่ 3.	เปอร์เซ็นต์ทวีพลอยด์ อัตรารอดและผลผลิตของทวีพลอยด์ของหอยตะโกรมกรามขาวด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน	21
ตารางที่ 4.	ผลผลิตทวีพลอยด์จากการเหนี่ยวนำทวีพลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีนที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน	25
ตารางที่ 5.	เปอร์เซ็นต์โพลีพลอยด์จากการเหนี่ยวนำทวีพลอยด์ในหอยตะโกรมกรามขาวด้วยสาร 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีนในระยะโทรโคพอร์	27
ตารางที่ 6.	แสดงค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น, ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว, ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT), ค่า relative length (RL), ค่า centromeric index (CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ของ RL และ CI จากเซลล์ระยะเมทาเฟส 20 เซลล์ของหอยตะโกรมกรามขาว (<i>Crassostrea belcheri</i> , $3n=30$)	30

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1.	การฉีตสารโคลชิซิน เข้าตัวหอย	3
ภาพที่ 2.	อวัยวะเหงือกของหอยตะกรมกรามขาว <i>C. belcheri</i>	4
ภาพที่ 3.	เมทาเฟสของหอยตะกรมกรามขาว (<i>C. belcheri</i>), $2n=20$ จากการเหนี่ยวนำ ทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบธรรมดาสเกล บาร์ 5 ไมโครเมตร	13
ภาพที่ 4.	คาริโอไทป์ของหอยตะกรมกรามขาว (<i>C. belcheri</i>), $2n=20$ จากการ เหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบ ธรรมดา	14
ภาพที่ 5.	เมทาเฟสของหอยตะกรมกรามขาว (<i>C. belcheri</i>), $2n=20$ จากการเหนี่ยวนำ ทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบนอร์ สเกลบาร์ 5 ไมโครเมตร จุดที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งของนอร์	14
ภาพที่ 6.	แสดงคาริโอไทป์ของหอยตะกรมกรามขาว (<i>C. belcheri</i> , $2n=20$) ด้วยวิธีการ ย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบนอร์ สเกลบาร์ 5 ไมโครเมตร	15
ภาพที่ 7.	อิดิโอแกรมมาตรฐานของหอยตะกรมกรามขาว (<i>Crassostrea belcheri</i> , $2n=20$) ด้วยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบธรรมดา	16
ภาพที่ 8.	อิดิโอแกรมมาตรฐานของหอยตะกรมกรามขาว (<i>Crassostrea belcheri</i> , $2n=20$) ด้วยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบนอร์ ตำแหน่งที่ลูกศรชี้คือ ตำแหน่งของนอร์	17
ภาพที่ 9.	ผลของระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ 6-ไดเมทิวอะมิโนพิวรีนต่อเปอร์เซ็นต์ ทริพลอยด์การเหนี่ยวนำในหอยตะกรมกรามขาว	22
ภาพที่ 10.	แสดงโพลีพลอยด์โครโมโซม : (A) ดิพลอยด์ ($2n = 20$); (B) ทริพลอยด์ ($3n = 30$); (C) เตตราพลอยด์ ($4n = 40$); (D) เพนตะพลอยด์ ($5n = 50$).	28
ภาพที่ 11.	เมทาเฟสของหอยตะกรมกรามขาว (<i>C. belcheri</i>), $3n=30$ จากการ เหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบ ธรรมดา	29
ภาพที่ 12.	คาริโอไทป์ของหอยตะกรมกรามขาว (<i>C. belcheri</i>), $3n=30$ จากการ เหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบ ธรรมดา	29

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ 13. เมทาเฟสของหอยตะไกรมกรามขาว (<i>C. belcheri</i>), $4n=40$ จากการ เหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบ ธรรมดา	31
ภาพที่ 14. คาริโอไทม์ของหอยตะไกรมกรามขาว (<i>C. belcheri</i>), $4n=40$ จากการ เหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบ ธรรมดา	31
ภาพที่ 15. เมทาเฟสของหอยตะไกรมกรามขาว (<i>C. belcheri</i>), $5n=50$ จากการ เหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบ ธรรมดา	32
ภาพที่ 16. คาริโอไทม์ของหอยตะไกรมกรามขาว (<i>C. belcheri</i>), $5n=50$ จากการ เหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบ ธรรมดา	32
ภาพที่ 17. อัตรารอดตายของลูกหอยตะไกรมกรามขาวที่อนุบาลในโรงเพาะฟักจาก การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีนและชุดควบคุม	34
ภาพที่ 18. การเจริญเติบโตด้านความยาวของลูกหอยตะไกรมกรามขาวที่อนุบาลในโรง เพาะฟักจากการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิวอะมิโนพิวรีนและ ชุดควบคุม	35
ภาพที่ 19. การเจริญเติบโตด้านความกว้างของลูกหอยตะไกรมกรามขาวที่อนุบาลในโรง เพาะฟักจากการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิวอะมิโนพิวรีนและ ชุดควบคุม	36

บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

เทคโนโลยีการผลิตหอยนางรมด้วยวิธีการจัดการโครโมโซม (chromosome manipulation) ได้พัฒนาขึ้นในหลายประเทศและได้ถูกนำมาใช้การผลิตหอยนางรมเชิงพาณิชย์ เช่น สหรัฐอเมริกา แคนาดา ออสเตรเลีย และญี่ปุ่น การศึกษาการผลิตหอยนางรมทรูปลอยด์ได้มีการทำกันในหอยนางรมหลายชนิด เช่น *Crassostrea gigas* (Allen and Downing, 1986; Allen and Downing, 1990; Guo et al. 1996; Nell and Perkins, 2005), *C. virginica* (Stanley et al. 1981; 1984; Allen and Bushek, 1992), *Saccostrea glomerata* (เดิม *S. commercialis*) (Nell et al. 1994; Hand et al. 1998; Hand and Nell, 1999; Hand et al. 1999), *Ostrea edulis* (Gendreau and Grizel, 1990; Hawkins et al. 1994) และ *C. madrasensis* (Mallia et al. 2006) เป็นต้น การศึกษาการผลิตหอยนางรมทรูปลอยด์เกิดขึ้นในปี ค.ศ. 1980 และนำมาใช้ผลิตในเชิงพาณิชย์ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1985 เป็นต้นมา จนกลายเป็นส่วนสำคัญของอุตสาหกรรมการเลี้ยงหอยนางรมในแถบฝั่งตะวันตกของทวีปอเมริกาเหนือ (Chew, 1994) หอยนางรมทรูปลอยด์เจริญเติบโตเร็ว เนื่องจากความเป็นหมันทำให้กว่าครึ่งหนึ่งของพลังงานที่ใช้ในกระบวนการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) ถูกนำมาใช้เพื่อการเจริญเติบโตแทน (Hawkins et al. 1994; Nell and Perkins, 2005) สำหรับในประเทศไทยมีการทดลองผลิตลูกหอย ทรูปลอยด์จนประสบผลสำเร็จในหอยนางรมหลายชนิด เช่น *S. cucullata* (จินตนา, 2538; Jarayabhand and Jindalikit, 1992; Jarayabhand et al. 1994), *C. lugubris* (Roongratri and Youngvanichset, 1991) และ *C. belcheri* (Silapajarn, 1994) แต่เป็นการศึกษาทดลองเหนี่ยวนำในห้องปฏิบัติการเท่านั้นและยังไม่สามารถผลิตลูกหอยให้มีชีวิตรอดจนถึงโตเต็มวัย ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าการผลิตหอยตะโกกรมกรามขาวแบบทรูปลอยด์ในโรงเพาะฟัก เป็นแนวทางการในการพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงหอยนางรมของประเทศไทย เพื่อให้ได้ลูกพันธุ์สำหรับการเลี้ยงที่มีการเจริญเติบโตเร็วและคุณภาพผลผลิตเป็นที่ต้องการของตลาด เพื่อรองรับการพัฒนาอุตสาหกรรมการเลี้ยงหอยนางรมในเชิงพาณิชย์ต่อไป

ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวคิดของโครงการวิจัย

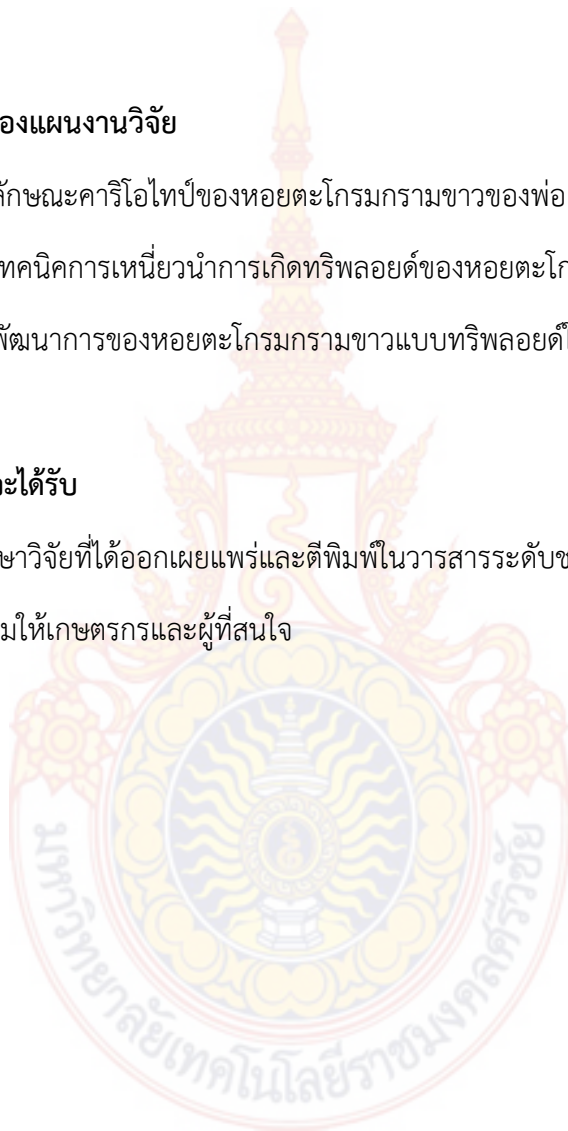
การปรับปรุงพันธุ์หอยตะไกรมกรามขาวแบบการเพิ่มชุดโครโมโซมหรือทริพลอยด์ทำให้เป็นหมันและไม่สามารถสืบพันธุ์ได้ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการใช้อาหารไปสร้างการเจริญเติบโตของร่างกายเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้หอยตะไกรมกรามขาวมีการเจริญเติบโตเร็ว

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะการไอโทปของหอยตะไกรมกรามขาวของพ่อแม่พันธุ์
2. เพื่อศึกษาเทคนิคการเหนี่ยวนำการเกิดทริพลอยด์ของหอยตะไกรมกรามขาว
3. เพื่อศึกษาพัฒนาการของหอยตะไกรมกรามขาวแบบทริพลอยด์ในระยะอ่อน ระยะลงเกาะ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลการศึกษาวิจัยที่ได้เผยแพร่งานและตีพิมพ์ในวารสารระดับชาติหรือนานาชาติ
2. จัดฝึกอบรมให้แก่เกษตรกรและผู้สนใจ



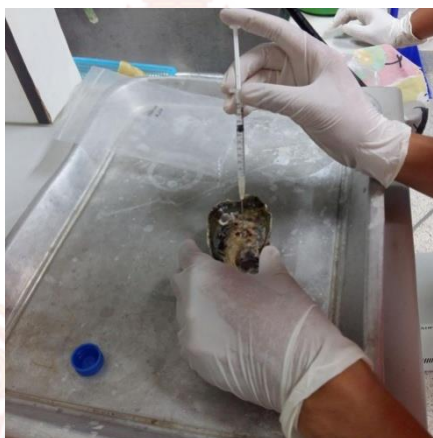
วิธีดำเนินการวิจัยและสถานที่ทำการทดลอง

1. การศึกษาการโอโทปป์ของพ่อแม่พันธุ์หอยตะโกรมครามขาว

เตรียมโครโมโซมโดยวิธีตรง ดัดแปลงจากวิธีการของ (Khruanet et al. 2013; Wang et al. 2004)

1.1 นำตัวอย่างหอยตะโกรมครามขาว *Crassostrea belcheri* ที่มีขนาดเปลือกประมาณ 8-10 เซนติเมตร มาเลี้ยงไว้เพื่อให้หอยได้ปรับสภาพอย่างน้อยเป็นเวลา 3-5 วัน และใช้หอยนางรม 10 ตัว เพื่อทำการทดลอง

1.2 ฉีดโคลชิซินความเข้มข้น 0.1 % เข้าบริเวณกล้ามเนื้อภายในตัวหอยทดลอง จากนั้นทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การฉีดสารโคลชิซิน เข้าตัวหอย

1.3 เมื่อครบเวลาแล้ว ทำการผ่าตัดเอาตัวอย่างเหงือก (ภาพที่ 2) โดยเติมสารละลายไฮโปโทนิก ซึ่งใช้โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.075 M เติมให้ได้ปริมาณ 8 มิลลิลิตร เขย่าให้ตะกอนเซลล์กับสารละลายเข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 40 นาที



ภาพที่ 2 อวัยวะเหงือกของหอยตะโกรมครามขาว *C. belcheri*

1.4 เมื่อป่มครบเวลา ให้นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,600 รอบ/นาที เป็นเวลา 8 นาที ดูดส่วนใส ด้านบนทิ้ง แล้วนำมาผ่านการตรึงเซลล์ขั้นแรก (refixation) โดยค่อย ๆ หยดน้ำยาตรึงเซลล์ (fixative) ที่แช่เย็นลงไป ในหลอดปั่นเหวี่ยงช้า ๆ พร้อมกับเขย่าหลอดเบา ๆ จนได้ปริมาตรในหลอด 8 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,600 รอบ/นาที เป็นเวลา 8 นาที และดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง

1.5 ทำการตรึงเซลล์อีกครั้ง โดยค่อย ๆ หยดน้ำยาตรึงเซลล์ที่แช่เย็นลงในหลอดปั่นเหวี่ยงช้า ๆ เขย่าให้ตะกอนเซลล์ และน้ำยาตรึงเซลล์ผสมกัน เติมน้ำยาตรึงเซลล์จนได้ปริมาตรในหลอด 7 มิลลิลิตร นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1,600 รอบ/นาที เป็นเวลา 8 นาที ดูดส่วนใสด้านบนทิ้ง

1.6 ทำซ้ำในขั้นตอนที่ 5 จนได้ตะกอนเซลล์สีขาวขุ่น จากนั้นดูดน้ำยาตรึงเซลล์ทิ้ง ให้เหลือไว้ ประมาณ 3-4 มิลลิลิตร เขย่าตะกอนเซลล์กับสารละลายที่เหลือให้เข้ากัน

1.7 ใช้หลอดดูดตะกอนเซลล์ประมาณ 0.2 มิลลิลิตร หยดลงบนแผ่นสไลด์ที่แห้งสะอาด อุณหภูมิ 45-55⁰C จำนวน 1-2 หยดต่อสไลด์ 1 แผ่นทิ้งสไลด์ให้แห้ง และนำไปย้อมสี

2. การย้อมสีโครโมโซม

2.1 การย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดา

2.1.1 นำสไลด์ที่หยดตะกอนเซลล์ และทิ้งไว้ให้แห้งแล้วมาย้อมด้วยสีจิมซ่า 20% (ชนิด stock Giemsa's solution) เป็นเวลา 20 นาที

2.2.2 ล้างสีออกโดยจุ่มสไลด์ขึ้นลงในน้ำกลั่น ทิ้งสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (compound microscope)

2.2 การย้อมแถบสีแบนเนอร์

2.2.1 อบสไลด์ที่มีเซลล์ทดลองที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง

2.2.2 หยดซิลเวอร์ไนเตรท 50% ลงบนสไลด์ 2 หยด และหยดเจลาติน 2% 4 หยดลงบนสไลด์ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์แล้วนำเข้าตูบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5-10 นาที

2.2.3 นำสไลด์ออกมาจุ่มในน้ำกลั่นเพื่อให้กระจกปิดสไลด์หลุดออก และเป็นการหยุดปฏิกิริยาของซิลเวอร์ไนเตรต แล้วนำสไลด์มาล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Howell and Black, 1980)

3. การตรวจสอบโครโมโซม การจัดแคริโอไทป์ และการทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน

การตรวจสอบโครโมโซม จัดทำแคริโอไทป์ และอิดิโอแกรมมาตรฐาน ดัดแปลงจากวิธีการของ Turpin and Lejeune (1965)

3.1 การตรวจสอบโครโมโซม

เลือกเซลล์ที่มีโครโมโซมระยะเมทาเฟสกระจายตัวดีไม่ซ้อนทับกัน นำมาถ่ายภาพโครโมโซมโดยใช้เลนส์วัตถุ (objective lens) กำลังขยาย 1000X เพื่อตรวจนับจำนวนโครโมโซมจากภาพถ่ายโครโมโซม จำนวน 100 เซลล์ ความถี่ของจำนวนโครโมโซมที่พบมากที่สุด จะเป็นค่าของจำนวนโครโมโซมดิพลอยด์ของสิ่งมีชีวิตนั้น ๆ จากนั้นจับคู่โครโมโซมที่เหมือนกัน (homologous chromosome) และศึกษาโครโมโซมโดยการหาค่าความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (long arm; Ll) ความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น (short arm; Ls) และคำนวณหาความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง

(total length; LT, $LT = LL + Ls$) คำนวณค่า relative length (RL) และ centromeric index (CI) เพื่อระบุชนิดของโครโมโซม และนำค่าที่ได้ไปใช้ประกอบในการจัดทำแคโรไทป์ และอิดิโอแกรม

3.2 การจัดทำแคโรไทป์

3.2.1 เลือกเซลล์ที่ถ่ายภาพมาแล้วสำหรับนำมาจัดแคโรไทป์จำนวน 20 เซลล์โดยเป็นเซลล์ที่โครโมโซมมีการกระจายตัวดี มีจำนวนโครโมโซมที่เท่ากับจำนวนโครโมโซมของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นที่ได้สรุปไว้แล้วโครโมโซมมีลักษณะไม่หดรัดมากเกินไป

3.2.2 นำภาพโครโมโซมที่เลือกมาตัดโครโมโซมแต่ละแท่ง โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ประยุกต์โฟโต้ชอป (Photoshop) จับคู่โครโมโซมคู่เหมือนโดยทำการกำหนดตำแหน่งของเซนโทรเมียร์ จากนั้นวัดค่าความยาวแขนข้างสั้น ค่าความยาวของแขนข้างยาว นำค่าที่ได้มาคำนวณค่าความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่งจับคู่โครโมโซมที่มีแขนข้างยาวแต่ละข้างและความยาวทั้งแท่งที่ใกล้เคียงกันที่สุด หรือโดยการคำนวณหาค่า relative length (RL) เพื่อช่วยในการจับคู่โครโมโซม ซึ่งค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุกๆเซลล์มีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{ค่า relative length (RL)} = \frac{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}{\text{ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมทุกแท่ง (\sum LT)}}$$

การใช้ค่า RL นี้สามารถช่วยในการจับคู่โครโมโซมได้แน่นอนกว่าการใช้ค่าความยาวของโครโมโซม เพราะค่า RL ของโครโมโซมแต่ละแท่งจะคงที่ในทุก ๆ เซลล์ ส่วนค่าความยาวของโครโมโซมจะแตกต่างกันไปในเซลล์แต่ละเซลล์

3.2.3 การกำหนดชนิดโครโมโซมแต่ละคู่โดยใช้ค่า centromeric index (CI) ในการพิจารณา มีสูตรคำนวณดังนี้ (ตารางที่ 2)

$$\text{ค่า centromeric index (CI)} = \frac{\text{ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว (LL)}}{\text{ความยาวของโครโมโซมแต่ละแท่ง (LT)}}$$

ตารางที่ 1 การจำแนกชนิดของโครโมโซมโดยอาศัยอัตราส่วนระหว่างแขนข้างยาวต่อแขนข้างสั้น

อัตราส่วนระหว่างแขนยาวต่อแขนสั้น	ชนิดของโครโมโซม	สัญลักษณ์
0.500-0.599	เมตาเซนทริก	M
0.600-0.699	ซับเมทาเซนทริก	SM
0.700-0.899	อะโครเซนทริก	A
0.900-1.00	เทโลเซนทริก	T

3.2.4 กำหนดขนาดของโครโมโซมแต่ละคู่ โดยโครโมโซมคู่ที่ใหญ่ที่สุดเป็นคู่ที่ 1 และโครโมโซมที่เล็กที่สุดเป็นคู่สุดท้ายแบ่งออกเป็น 3 ขนาด คือ ขนาดใหญ่ (large) ขนาดกลาง (medium) และขนาดเล็ก (small) ดังนี้

โครโมโซมขนาดใหญ่ คือ โครโมโซมที่มีขนาดความยาวมากกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่ที่สุดกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด มีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{Large} > \frac{\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ 1} + \text{LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2}$$

โครโมโซมขนาดกลางคือ โครโมโซมที่มีขนาดความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของผลบวกความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่ที่สุดรวมกับโครโมโซมคู่เล็กที่สุด มีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{Medium} < \frac{\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ 1} + \text{LT เฉลี่ยคู่สุดท้าย}}{2}$$

โครโมโซมขนาดเล็กคือ โครโมโซมที่มีขนาดความยาวน้อยกว่าครึ่งหนึ่งของความยาวเฉลี่ยของโครโมโซมคู่ใหญ่ที่สุด มีสูตรคำนวณดังนี้

$$\text{Small} < \frac{\text{LT เฉลี่ยคู่ที่ 1}}{2}$$

3.2.5 จัดเรียงแคริโอไทป์ โดยนำโครโมโซมแต่ละคู่มาเรียงกันแยกเป็นคู่จากขนาดใหญ่ที่สุดเรียงไปหาขนาดเล็กที่สุด โดยการเรียงนั้นจะกำหนดเส้นตรงขึ้นมาแล้ววางตำแหน่งให้เซนโทรเมียร์ทับลงบนเส้นตรงและให้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์ตรงกัน ให้แขนข้างสั้นอยู่ด้านบน แขนข้างยาวอยู่ล่าง กำหนดหมายเลขคู่โครโมโซม เรียงจาก 1, 2, 3...ตามลำดับ จนถึงคู่สุดท้าย

3.3 การทำอิดิโอแกรมมาตรฐาน

3.3.1 จัดทำอิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาโดยใช้ค่าความยาวเฉลี่ยจากการวัดทั้ง 20 เซลล์ จัดเรียงโครโมโซมจากแห่งใหญ่ไปหาแห่งเล็ก กำหนดหมายเลขคู่โครโมโซมแต่ละคู่

3.3.2 จัดทำอิดิโอแกรมจากเทคนิคการย้อมสีโครโมโซมจากเทคนิคการย้อมแถบสีแบบนอร์ โดยจัดเรียงโครโมโซมจากแห่งใหญ่ไปหาแห่งเล็ก กำหนดหมายเลขคู่โครโมโซมแต่ละคู่ทำสัญลักษณ์นอร์โดยการใส่รูปวงกลมสีดำบริเวณแขนโครโมโซมตรงตำแหน่งที่พบนอร์

2. เพื่อศึกษาเทคนิคการเหนี่ยวนำการเกิดทริพลอยด์ของหอยตะไกรมกรามขาวด้วย

6-DMAP

2.1 การเตรียมพ่อแม่พันธุ์หอยตะไกรมกรามขาว

นำพ่อแม่พันธุ์หอยตะไกรมกรามขาวที่ซื้อมาจากฟาร์มเลี้ยงหอยตะไกรมกรามขาว เอกชนใน อ. กันตัง จ.ตรัง มาซัดและล้างทำความสะอาดสิ่งสกปรกต่างๆ บริเวณเปลือก ทำการขุนในระบบน้ำหมุนเวียนแบบกึ่งปิด (Semi-closed recirculation system) ให้อาหารสาหร่ายเซลล์เดียว *I. galbana*, *C. calcitrans* และ *T. suecica*. ในอัตราส่วน 3 เปอร์เซ็นต์ โดยคำนวณการให้ตามน้ำหนักแห้งของเนื้อหอย (dry meat weight) ตามวิธีการของ Helm และ Bourne (2004) เปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 2 วัน ในช่วงเวลาทำการขุนต้องตรวจดูความสมบูรณ์ของไข่และน้ำเชื้อของพ่อแม่พันธุ์เป็นประจำ โดยใช้วิธีส่องตัวอย่างหอยมาผ่าแล้วเขียนเซลล์สืบพันธุ์มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ทำการขุนพ่อแม่พันธุ์ในระบบจนกว่าหอยจะสมบูรณ์เพศอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 3-4 สัปดาห์

2.2 การกระตุ้นการผสมพันธุ์และวางไข่

นำพ่อแม่พันธุ์หอยตะไกรมกรามขาวที่มีความสมบูรณ์ มากระตุ้นการผสมพันธุ์โดยใช้ อุณหภูมิ (Temperature shock) นำไข่และสเปิร์ม (จากพ่อพันธุ์หลายตัว) มาผสมกันในสัดส่วนอัตรา 8 : 1 ตามวิธีการของ คเชนทร (2544) จากนั้นนำไข่ที่ได้รับการผสมไปทำการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ต่อไป

2.3 การเหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6-DMAP และการประเมินทริพลอยด์

นำไข่ที่ได้รับการผสมใส่ในภาชนะที่ทำการทดลองที่มีขนาด 50 ลิตร โดยใช้ความหนาแน่นของลูกหอย 15 ตัว/มิลลิลิตร ทำการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ สารเคมี 6-DMAP ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Gerard et al. (1994) แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ปัจจัย คือ ระยะเวลาหลังการผสมไข่ และเวลาในการเหนี่ยวนำ ระดับความเข้มข้นของ 6-DMAP เมื่อลูกหอยอายุ 24 ชั่วโมง หรือเข้าสู่ระยะ D-shape ทำการเก็บตัวอย่าง คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของทริพลอยด์ของลูกหอยระยะวัยอ่อนหรืออายุ 1 วัน ด้วยวิธีการนับโครโมโซมในระยะเมตาเฟส ตามวิธีการของ Thomas et al. (2006)

3. การศึกษาพัฒนาการของหอยตะไคร่กรมกรามขาวแบบทรูปลอยต์ในระยะวัยอ่อน ระยะลง เกาะและเมตามอร์ฟอซิส

3.1 การอนุบาลลูกหอย

เลือกวิธีการที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตลูกหอยตะไคร่กรมกรามขาวแบบทรูปลอยต์จากผลการทดลองที่ได้ตามข้อ 2.3 มาทำการผลิตลูกหอยเพื่อศึกษาพัฒนาการในระยะอ่อนแบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ

ก. ระยะ D-shape เมื่อไข่และสเปิร์มมีการปฏิสนธิเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ลูกหอยจะเริ่มมีการกินอาหาร โดยจะให้อาหารเป็นสาหร่ายเซลล์เดียวชนิด *Isochrysis galbana* โดยอาหารที่ให้จะให้ในปริมาณ 15,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อวัน ทำการทดลองในถังอนุบาลขนาด 50 ลิตร โดยใช้ความหนาแน่นของลูกหอย 15 ตัวต่อมิลลิลิตร ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกๆ 2 วัน พร้อมกับสุ่มตรวจนับปริมาณ เพื่อคำนวณหาอัตราการตายและสู่มวัดขนาดของลูกหอยและพัฒนาการ ความผิดปกติต่างๆของลูกหอยจนเข้าสู่ระยะ Umbo ดำเนินการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ

ข. ระยะ Umbo ระยะนี้ทำการทดลองโดยใช้สาหร่ายเซลล์เดียว 2 ชนิดเป็นอาหาร คือ *I. galbana* และ *Chaetoceros calcitran* ในอัตรา 50:50 โดยอาหารที่ใช้จะใช้ในปริมาณ 25,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรต่อวัน ทำการทดลองในถังอนุบาลขนาด 50 ลิตร โดยใช้ความหนาแน่นของลูกหอย 10 ตัวต่อมิลลิลิตร ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกๆ 2 วัน พร้อมกับสุ่มตรวจนับปริมาณ เพื่อคำนวณหาอัตราการตายและสู่มวัดขนาดของลูกหอยและพัฒนาการ ความผิดปกติต่างๆของลูกหอยจนเข้าสู่ระยะ Eyed larvae ดำเนินการทดลองโดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ เมื่อลูกหอยเข้าสู่ระยะ Pediveliger จะนำลูกหอยไปลงเกาะในระบบลงเกาะต่อไป

5 การวิเคราะห์ข้อมูล ข้อมูลจากการทดลองทั้งหมดจะถูกนำมาทดสอบ Normality ก่อนนำมาทดสอบความแตกต่างทางสถิติ (ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี New Duncan Multiple Rang Test (DMRT)



ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

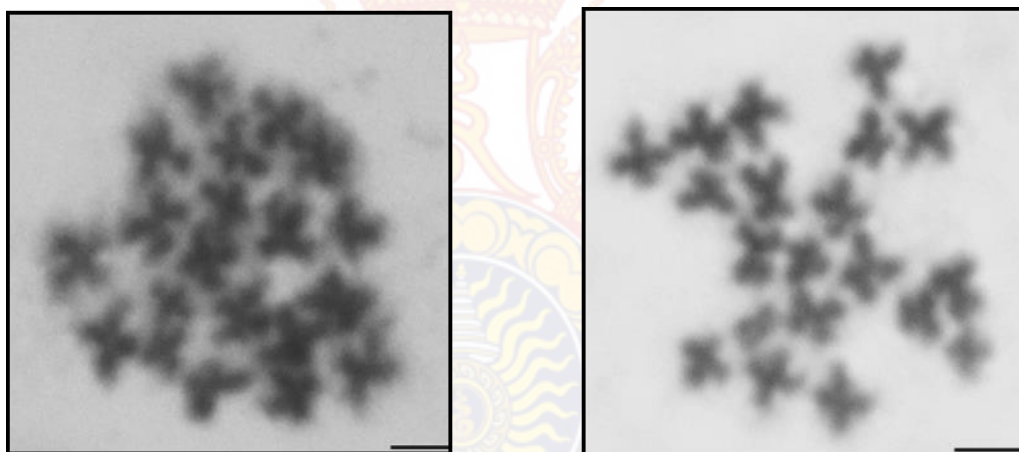
การศึกษาการผลิตลูกหอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri* Sowerby 1871) แบบทรูปลอยด์จากโรงเพาะฟัก ด้วยการเพิ่มชุดโครโมโซมแบ่งออกเป็นส่วนต่างๆ คือ ศึกษาลักษณะคาริโอไทป์ของพ่อแม่พันธุ์หอยตะโกรมกรามขาว ศึกษาเทคนิคการเหนี่ยวนำการเกิดทรูปลอยด์ของหอยตะโกรมกรามขาวด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน และศึกษาพัฒนาการของหอยตะโกรมกรามขาวแบบทรูปลอยด์ในระยะวัยอ่อนในโรงเพาะฟัก

4.1 ศึกษาลักษณะคาริโอไทป์ของพ่อแม่พันธุ์หอยตะโกรมกรามขาว

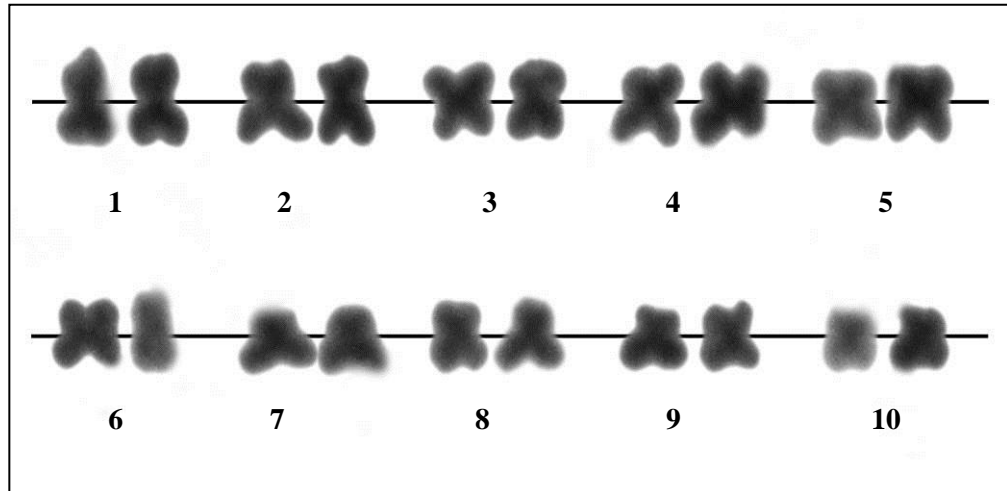
จากการศึกษาลักษณะของคาริโอไทป์และอิตีโอแกรมมาตรฐานของพ่อแม่พันธุ์หอยตะโกรมกรามขาว จากฟาร์มเอกชนใน อ. กันตัง จ.ตรัง เตรียมโครโมโซมด้วยวิธีทางตรงจากเนื้อเยื่อเหงือก ย้อมสีโครโมโซมแบบธรรมดาและแถบสีแบบบอร์ ผลการศึกษาจากเซลล์ระยะเมทาเฟสพบว่า จำนวนดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 20 แท่ง (ภาพที่ 3) และเมื่อนำเซลล์ระยะเมทาเฟส 20 เซลล์ของหอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*, $2n=20$) มาจัดเรียงคาริโอไทป์และหาค่าเฉลี่ยจากการวัดขนาด ความยาว ของโครโมโซมแต่ละแท่งเพื่อหาชนิดและขนาดของโครโมโซมแต่ละแท่งพบว่า โครโมโซมทั้ง 20 แท่ง มีจำนวนแขนโครโมโซมพื้นฐานเท่ากับ 40 เป็นชนิดเมทาเซนทริกทั้งหมด และมีขนาด 2 ขนาด โดยที่ คู่ที่ 1-5 มีขนาดใหญ่ และคู่ที่ 6-10 มีขนาด กลาง (ภาพที่ 4 และ 7) และ (แสดงดังตารางที่ 2) ซึ่งสอดคล้องกับ (Cross et al. 2003., Koedprang and Wattanakul, 1996) ขณะที่คาริโอไทป์ของหอยนางรมใน family Ostreidea ส่วนใหญ่เป็นชนิดเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริก (Pereira et al. 2011) ความแตกต่างกันของจำนวนและตำแหน่งของคู่โครโมโซมเมทาเซนทริกและซับเมทาเซนทริกในคาริโอไทป์ขึ้นอยู่กับสภาพพื้นที่ เทคนิคในการเตรียมโครโมโซม เช่น ความเข้มข้นและระยะเวลาในการแช่สารโคลชิซิน (Li and Havenhand, 1997; Leitao et al. 1999a; Thiriot-Quievreux, 2002)

โครโมโซมเครื่องหมายคือโครโมโซมที่มีตำแหน่งนอร์ซึ่งโครโมโซมเครื่องหมายของหอยตะโกรม
 กรามขาวพบว่ามีเพียง 1 ตำแหน่งซึ่งจากการตรวจสอบเซลล์ในระยะเมทาเฟสและนำมาจัดเรียง
 คาร์ิโอไทป์และอิดิโอแกรมพบว่าตำแหน่งของโครโมโซมเครื่องหมายอยู่บริเวณปลายแขนข้างสั้นของ
 โครโมโซมคู่ที่ 10 (แสดงดังภาพที่ 5-6 และ 8) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ (Cross et al. 2003)
 ในหอยนางรม *C. angulate* และ *C. gigas* (Leitao et al. 1999a; Thirirot-Quievreux, 2002).
 ปกติตำแหน่งนอร์ของหอยนางรมกลุ่ม Ostreidae สามารถพบเพียง 1-3 คู่ เท่านั้น ตำแหน่งนอร์
 สามารถแสดงถึงความสัมพันธ์ทางสายวิวัฒนาการได้ และสิ่งมีชีวิตจำพวกหอยที่มีตำแหน่งนอร์เพียง
 1 ตำแหน่ง ถือเป็นกลุ่มพวกโบราณ ซึ่งสามารถเขียนสูตรคาร์ิโอไทป์ของหอยตะโกรมกรามขาวได้ดังนี้

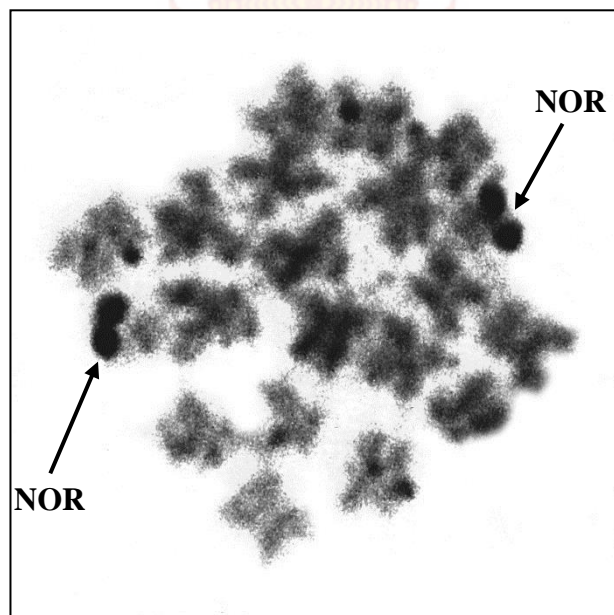
$$2n (20) = L_{10}^m + M_{10}^m$$



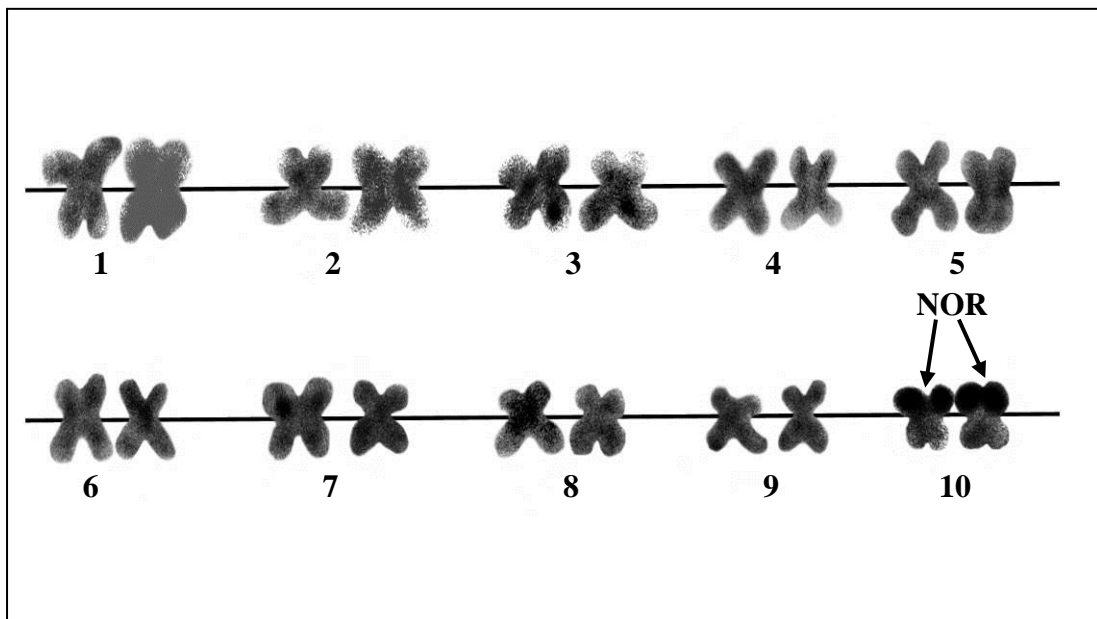
ภาพที่ 3. เมทาเฟสของหอยตะโกรมกรามขาว (*C. belcheri*), $2n=20$ จากการเหนี่ยวนำ
 ทริพลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบธรรมดาสเกลบาร์
 5 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4. คาร์ิโอไทป์ของหอยตะโกรมครามขาว (*C. belcheri*), $2n=20$ จากการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบธรรมดา

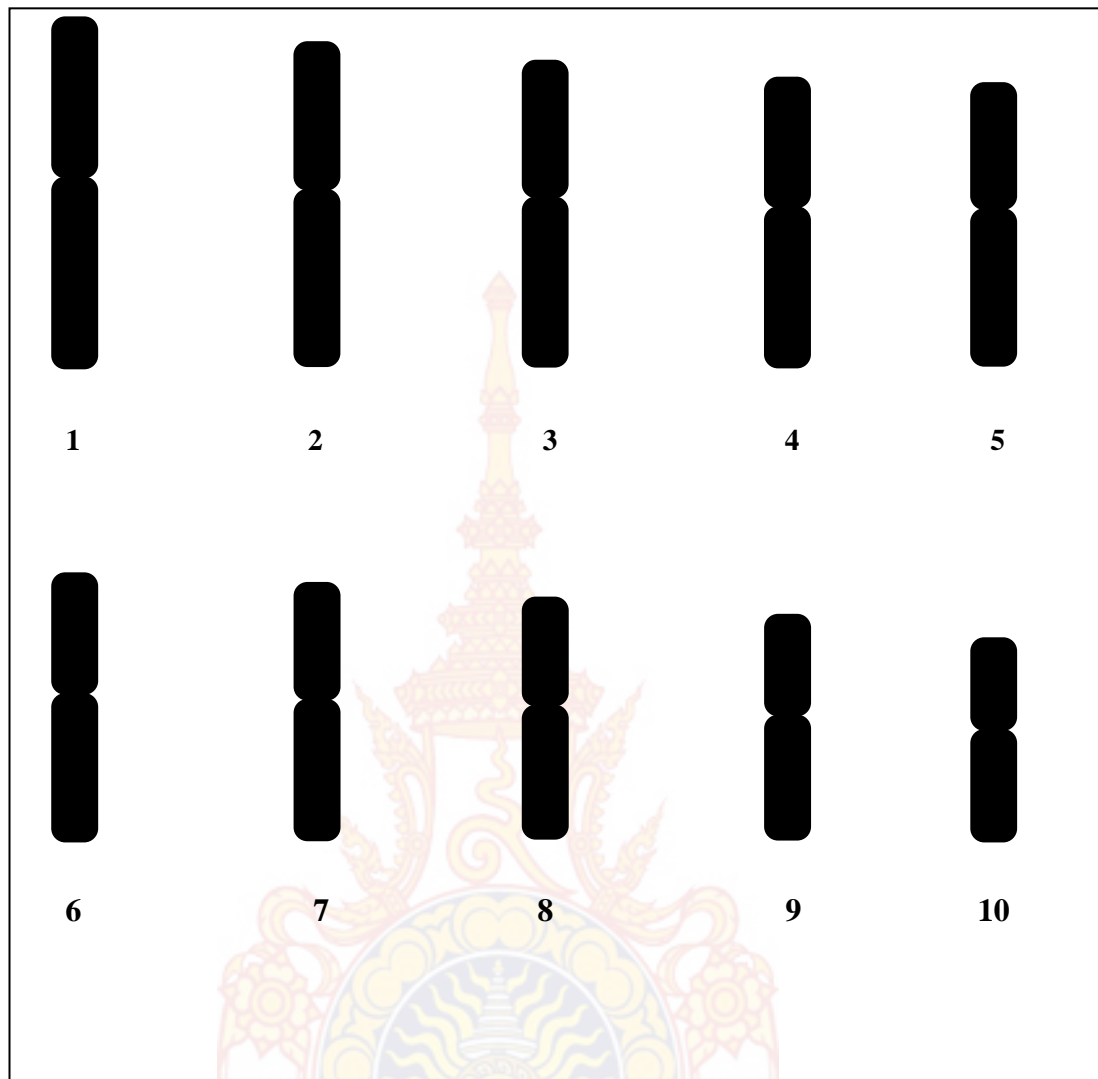


ภาพที่ 5. เมทาเฟสของหอยตะโกรมครามขาว (*C. belcheri*), $2n=20$ จากการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบนอร์ สเกลบาร์ 5 ไมโครเมตร จุดที่ลูกศรชี้คือตำแหน่งของนอร์

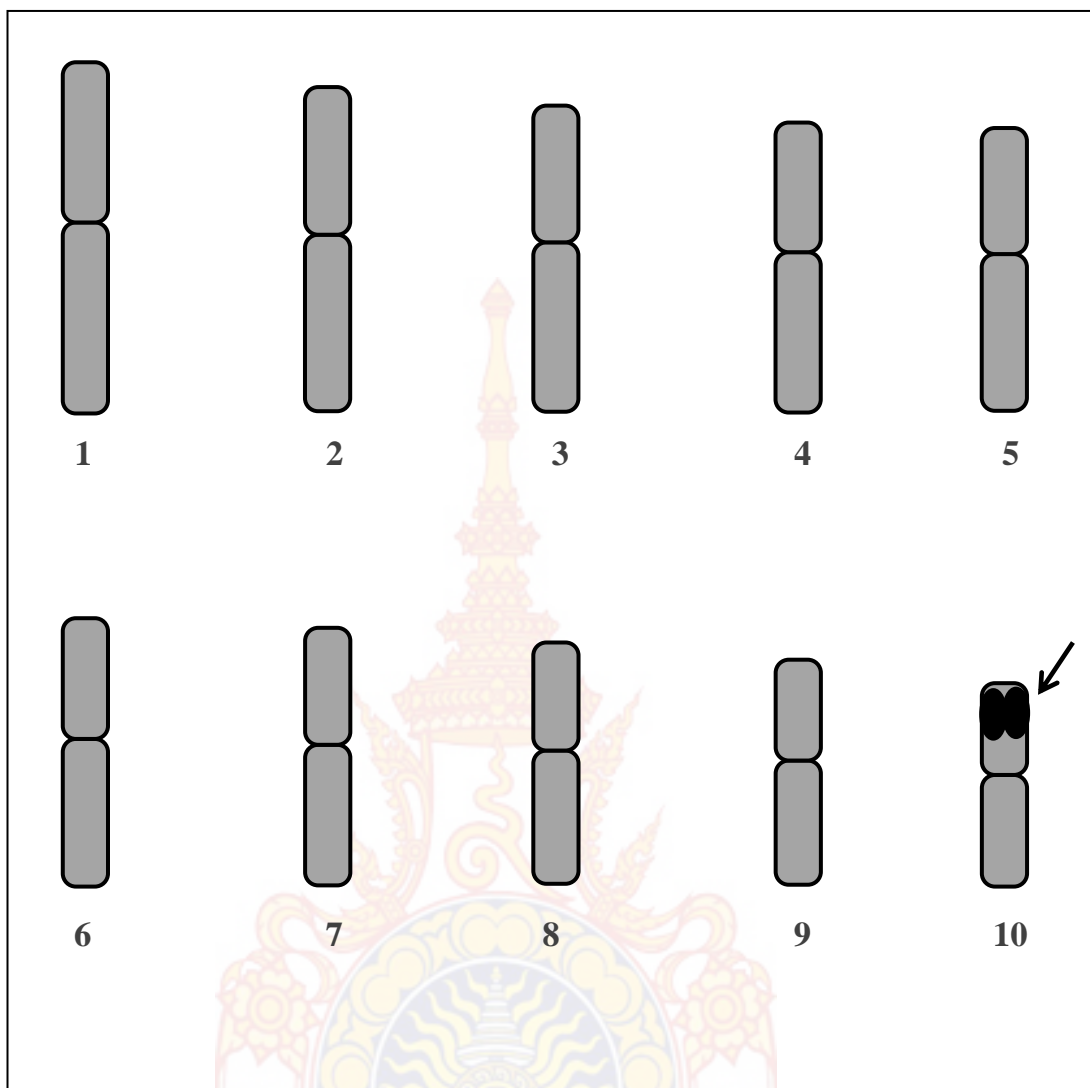


ภาพที่ 6 แสดงคาริโอไทป์ของหอยตะไกรมกรามขาว (*C. belcheri*, $2n=20$) ด้วยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบบอร์ สเกลบาร์ 5 ไมโครเมตร





ภาพที่ 7 อิติโอแกรมมาตรฐานของหอยตะไกรกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*, $2n=20$)
 ด้วยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 8 อิติโอแกรมมาตรฐานของหอยตะไกรกรมขาว (*Crassostrea belcheri*, $2n=20$)
 ด้วยวิธีการย้อมสีโครโมโซมแถบสีแบบนอร์ ตำแหน่งที่ลูกศรชี้ คือตำแหน่งของนอร์

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น, ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว, ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT), ค่า relative length (RL), ค่า centromeric index (CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ของ RL และ CI จากเซลล์ระยะเมทาเฟส 20 เซลล์ของหอยตะกรมครามขาว (*Crassostrea belcheri*, 2n=20)

คู่ที่	Ls	Ll	LT	RL ±SD	CI±SD	ขนาดโครโมโซม	ชนิดโครโมโซม
1	1.571	1.893	3.464	0.129±0.009	0.551±0.037	ใหญ่	เมทาเซนทริก
2	1.453	1.751	3.203	0.118±0.005	0.548±0.029	ใหญ่	เมทาเซนทริก
3	1.346	1.670	3.016	0.111±0.004	0.552±0.032	ใหญ่	เมทาเซนทริก
4	1.267	1.590	2.857	0.105±0.004	0.556±0.023	ใหญ่	เมทาเซนทริก
5	1.246	1.538	2.784	0.102±0.003	0.551±0.018	ใหญ่	เมทาเซนทริก
6	1.187	1.463	2.651	0.098±0.004	0.552±0.021	กลาง	เมทาเซนทริก
7	1.142	1.392	2.534	0.093±0.004	0.55±0.033	กลาง	เมทาเซนทริก
8	1.063	1.320	2.383	0.088±0.005	0.555±0.040	กลาง	เมทาเซนทริก
9	0.989	1.227	2.216	0.082±0.004	0.55±0.043	กลาง	เมทาเซนทริก
10*	0.921	1.096	2.016	0.075±0.007	0.54±0.034	กลาง	เมทาเซนทริก

หมายเหตุ: * = โครโมโซมที่มีตำแหน่งของนอร์

4.2 ผลการเกิดทริพลอยด์ของหอยตะกรมครามขาวด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน

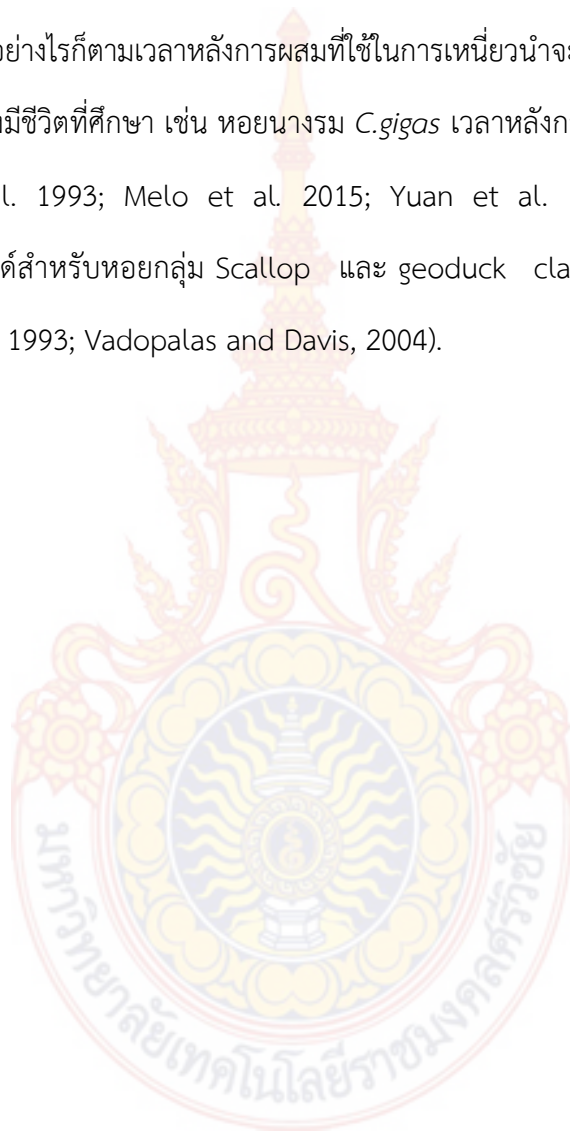
4.2.1 เปอร์เซ็นต์การเกิดทริพลอยด์จากการเหนี่ยวนำ

จากการวิจัยในครั้งนี้เป็นการรายงานครั้งแรกในการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยตะกรมครามขาว *C.belcheri* ด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน ในประเทศไทย การศึกษาจำนวนมากในการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยสองฝา เช่น หอย abalone (De Beer, 2004; Li et al. 2007; Stepto and Cook, 1998; Wang et al. 1990), หอย clam (Dufy and Diter, 1990; Vadopalas and Davis, 2004; Yang and Guo, 2006), หอย oyster (Barber et al. 1992; Downing and Allen Jr, 1987; Durand et al. 1990; Gerard et al. 1999), and หอย scallop (Desrosiers et al. 1993; Komaru et al. 1988; Toro et al. 1995) ทั้งวิธีทางเคมีและกายภาพ ซึ่งในแต่ละวิธีให้ผลลัพธ์เปอร์เซ็นต์การเกิดทริพลอยด์ที่แตกต่างกัน

จากการทดลองการเหนี่ยวนำทรูฟลอยด์ในหอยตะไคร่กรมกรามขาวด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีนในครั้งนี้อย่างประกอบด้วยปัจจัยหลัก 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นของสาร 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน 3 ระดับ คือ 100, 200 และ 300 ไมโครโมล ระยะเวลาหลังการผสม 3 ระดับ คือ 30 , 40 และ 50 นาที และเวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ 2 ระดับ คือ 5 และ 10 นาที จากการทดลองพบว่า เปอร์เซ็นต์ของทรูฟลอยด์จากการเหนี่ยวนำในแต่ละชุดการทดลองมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยที่ระดับความเข้มข้นของสาร 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน 100 ไมโครโมล เวลาหลังจากการผสมเป็นเวลา 30 นาที เหนี่ยวนำเป็นเวลา 10 นาที มีเปอร์เซ็นต์ของทรูฟลอยด์สูงสุดเท่ากับ 86.99 ± 2.45 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Thomas et al. (2006) ทำการศึกษาการเหนี่ยวนำทรูฟลอยด์ในหอยนางรม *C. madrasensis*. ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล และผลการศึกษาไม่มีความแตกต่างกันกับระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมล เวลาหลังจากการผสมเป็นเวลา 30 นาที เป็นเวลา 5 นาที และระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมล เวลาหลังจากการผสมเป็นเวลา 50 นาที เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์ของทรูฟลอยด์เท่ากับ 83.01 ± 1.56 และ 81.00 ± 5.29 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 300 ไมโครโมล เวลาหลังจากการผสมเป็นเวลา 30 นาที เป็นเวลา 10 นาที มีเปอร์เซ็นต์การเกิดทรูฟลอยด์ต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 43.85 ± 12.28 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 3) ขณะที่การศึกษาของ Desrosiers et al. (1993) ที่ระดับความเข้มข้น 300 ไมโครโมล ให้ผลเปอร์เซ็นต์ของทรูฟลอยด์ในหอย *C. gigas* สูงสุด เท่ากับ 90 % นอกจากนี้จากการศึกษาของ Gerard et al. (1994); Melo et al. (2015) ให้ผลทรูฟลอยด์เท่ากับ 85 และ 56.49 % ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้น 450 ไมโครโมล เมื่อทำการทดสอบทางสถิติ พบว่า เวลาหลังการผสม และระยะเวลาในการเหนี่ยวนำไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ทรูฟลอยด์ในการเหนี่ยวนำทรูฟลอยด์ในหอยตะไคร่กรมกรามขาวด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน ยกเว้นความเข้มข้นของสาร 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน ซึ่งพบว่าที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมล มีค่าเปอร์เซ็นต์ของทรูฟลอยด์สูงสุดและมีความแตกต่างทางสถิติกับความเข้มข้นอื่น ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าระดับความเข้มข้นของสาร 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน มีความสัมพันธ์แบบเชิงลบกับเปอร์เซ็นต์การเกิดทรูฟลอยด์ในหอยตะไคร่กรมกรามขาว (ภาพที่

9) สอดคล้องกับการศึกษาของ Gerard et al. (1994); Zhang et al. (1998) เปอร์เซ็นต์ของทริพลอยด์จะลดลงเมื่อระดับความเข้มข้นของสารที่เหนี่ยวนำเพิ่มสูงสุดขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่าเวลาหลังการผสมเป็นอีกปัจจัยที่มีความสำคัญต่อเปอร์เซ็นต์ทริพลอยด์จากการศึกษาในครั้งนี้ 30 นาทีหลังการผสมเป็นเวลาที่เหมาะสมต่อเปอร์เซ็นต์ทริพลอยด์ในหอยตะไกรกรมกรามขาว อย่างไรก็ตามเวลาหลังการผสมที่ใช้ในการเหนี่ยวนำจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่ศึกษา เช่น หอยนางรม *C.gigas* เวลาหลังการผสมอยู่ในช่วง 10-32 นาที (Desrosiers et al. 1993; Melo et al. 2015; Yuan et al. 1999) ขณะที่เวลาที่ใช้ในการเหนี่ยวนำทริพลอยด์สำหรับหอยกลุ่ม Scallop และ geoduck clam อยู่ในช่วง 55-70 นาที (Desrosiers et al. 1993; Vadopalas and Davis, 2004).

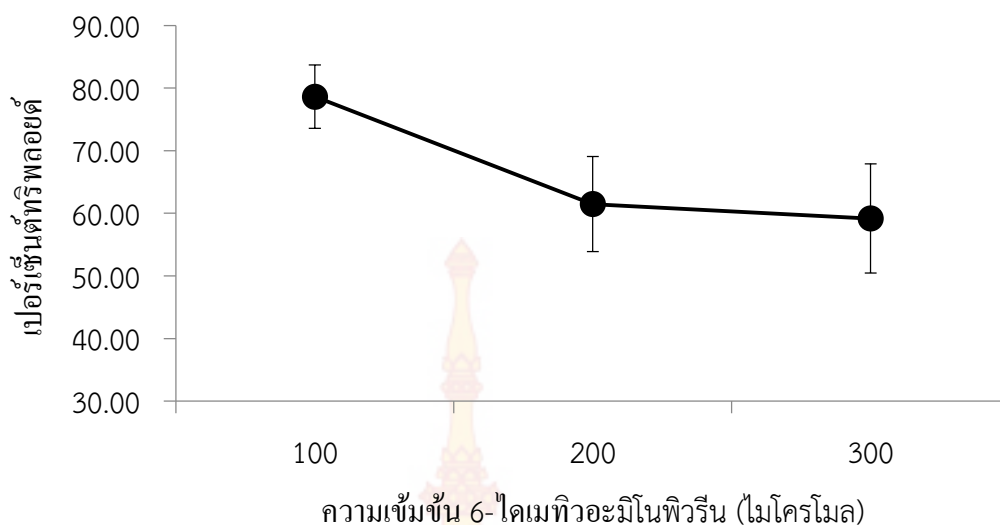


ตารางที่ 3 เปอร์เซ็นต์ทรिพลอยด์ อัตรารอดและผลผลิตของทริพลอยด์ของหอยตะไกรกรมขาว ด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน

ความเข้มข้น (μM)	เวลาหลังการผสม (นาที)	ระยะเวลา เหนี่ยวนำ (นาที)	3n (%)	อัตรารอด (%)	ผลผลิตของทริพลอยด์ (%)
ชุด ควบคุม	-	-	-	54.00 \pm 7.45 ^a	-
	30	5	83.01 \pm 1.52 ^{ab}	43.88 \pm 16.99 ^{abc}	36.40 \pm 14.13 ^{ab}
100	40	10	86.99 \pm 2.45 ^a	35.63 \pm 6.29 ^{bc}	31.05 \pm 5.92 ^{bc}
		5	74.06 \pm 12.85 ^{cd}	48.00 \pm 10.03 ^{abc}	36.05 \pm 12.44 ^{ab}
200	50	10	79.52 \pm 4.59 ^{bc}	45.00 \pm 6.36 ^{abc}	35.63 \pm 3.94 ^{ab}
		5	81.00 \pm 5.29 ^{ab}	54.00 \pm 2.74 ^a	43.68 \pm 2.44 ^a
	30	10	67.09 \pm 3.63 ^{de}	46.60 \pm 13.96 ^{abc}	30.85 \pm 7.84 ^{bc}
		5	63.16 \pm 4.54 ^{de}	53.25 \pm 16.27 ^a	33.91 \pm 11.91 ^{abc}
300	40	10	65.10 \pm 6.24 ^{de}	53.25 \pm 6.76 ^a	34.51 \pm 3.63 ^{abc}
		5	58.39 \pm 10.73 ^e	40.13 \pm 9.20 ^{abc}	24.13 \pm 9.51 ^{bc}
	50	10	56.81 \pm 11.80 ^e	52.50 \pm 7.65 ^a	29.58 \pm 6.63 ^{bc}
		5	61.57 \pm 6.71 ^e	49.50 \pm 9.41 ^{ab}	30.85 \pm 8.93 ^{bc}
	30	10	63.75 \pm 5.54 ^{de}	40.13 \pm 8.43 ^{abc}	25.33 \pm 4.01 ^{bc}
		5	64.97 \pm 5.19 ^{de}	52.87 \pm 3.75 ^a	34.25 \pm 1.94 ^{abc}
40	10	5	43.85 \pm 12.28 ^f	50.63 \pm 6.41 ^{ab}	22.29 \pm 6.97 ^c
		5	56.91 \pm 9.01 ^e	46.88 \pm 7.39 ^{abc}	26.36 \pm 3.58 ^{bc}
	50	10	56.85 \pm 8.69 ^e	45.00 \pm 4.24 ^{abc}	25.65 \pm 5.14 ^{bc}
		5	63.80 \pm 12.45 ^{de}	34.13 \pm 5.11 ^c	21.12 \pm 6.80 ^c
	10	68.58 \pm 4.72 ^{cde}	37.13 \pm 4.31 ^{bc}	25.52 \pm 3.88 ^{bc}	

หมายเหตุ: - ชุดควบคุมเป็นดิพลอยด์ทั้งหมด ค่าเฉลี่ย \pm SD.

ตัวอักษรในแนวตั้งแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)



ภาพที่ 9 ผลของระดับความเข้มข้นต่างๆ ของ 6-ไดเมทิวอะมิโนพิวรีนต่อเปอร์เซ็นต์ ทรูปลอยด์การเหนี่ยวนำในหอยตะไกรกรมกรามขาว

4.2.2 อัตราการรอดในระยะโทรโคพอร์จากการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์ในหอยตะไกรกรมกรามขาวด้วยสาร 6-ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน พบว่าอัตราการรอดของตัวอ่อนในระยะโทรโคพอร์ มีความแตกต่างกันทางสถิติในแต่ละหน่วยการทดลอง ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบตัวอ่อนมีการพัฒนาอยู่ในระยะยบลาสทูลาและแกสทูลาบางส่วนและตายในที่สุด อัตราการรอดของตัวอ่อนในทุกการทดลองอยู่ในช่วง 34.13 ± 5.11 ถึง 54.00 ± 2.74 เปอร์เซ็นต์ อัตราการรอดที่สูงสุดของตัวอ่อนระยะโทรโคพอร์พบในชุดทดลองชุดควบคุม แต่พบว่าไม่มีความแตกต่างกันกับ 5 ชุดการทดลอง คือ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล 50 นาทีหลังการผสม เหนี่ยวนำเป็นเวลา 5 นาที (54.00 ± 2.74 %); ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล, 30 นาทีหลังการผสม เหนี่ยวนำเป็นเวลา 5 นาที (53.25 ± 16.27 %); ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล 30 นาทีหลังการผสม เหนี่ยวนำเป็นเวลา 10 นาที (53.25 ± 6.76 %); ความเข้มข้น 200 ไมโครโมล 40 นาทีหลังการผสม เหนี่ยวนำเป็นเวลา 10 นาที (52.50 ± 7.65 %) และ ความเข้มข้น 300 ไมโครโมล 30 นาทีหลังการผสม เหนี่ยวนำเป็นเวลา 5 นาที (52.87 ± 3.75 %) ตามลำดับ ขณะที่การศึกษาของ Thomas et al. (2006),

พบว่า อัตราการรอดของลูกหอยนางรม *C.madrasensis* อายุ 1 วัน เท่ากับ 59.52 % ที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมล ซึ่งจากการศึกษาในครั้งนี้ผลการทดลองอัตราการรอดของลูกหอยสูงกว่าผลการทดลองที่ดีที่สุดของการเหนี่ยวนำทรานส์ฟอรัคชันในหอยชนิดอื่น Geoduck clams, *Panopea abrupta* (Vadopalas and Davis, 2004) ที่ระดับความเข้มข้น 600 ไมโครโมล และในกลุ่ม abalone, *Haliotis rubra* (Liu et al. 2004) ที่ระดับความเข้มข้น 150 ไมโครโมล ซึ่งมีอัตราการรอดเพียง 30 % นอกจากนี้พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 300 ไมโครโมล 50 นาทีหลังการผสม เหนี่ยวนำเป็นเวลา 5 นาที พบอัตราการรอดของตัวอ่อนระยะโทรโคฟอร์ต่ำที่สุด ($34.13 \pm 5.11\%$) (ตารางที่ 3) จากการทดลองให้ผลการทดลองที่ต่ำกว่าหลายการทดลองทั้งนี้เนื่องมาจากเซลล์สืบพันธุ์ที่ใช้มาจากการผสมเทียม ซึ่งคุณภาพของเซลล์ไข่และสเปิร์มไม่สมบูรณ์ส่งผลให้การพัฒนาที่ไม่พร้อมกัน (Gerard et al. 1999) อีกทั้งด้านการจัดการเซลล์สืบพันธุ์ระหว่างการทดลองหลังจากเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีควรจะมีการล้างด้วยน้ำทะเลปกติซ้ำหลายๆครั้งเพื่อล้างสารเคมีออก

การทดลองสอบทางสถิติพบว่าระยะเวลาในการเหนี่ยวนำไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละหน่วยการทดลองต่ออัตราการรอดของในหอยตะเภากรมกรามขาว ขณะที่การทดลองของ Desrosiers et al. 1993; Vadopalas and Davis, 2004; Zhang et al. 1998) พบว่าเมื่อลดระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ อัตราการรอดของตัวอ่อนและการพัฒนาที่ผิดปกติ นอกจากนี้พบว่าระดับความเข้มข้นของสารเคมี และเวลาหลังการผสมเซลล์สืบพันธุ์เป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่ออัตราการรอดของหอยตะเภากรมกรามขาว สอดคล้องกับ Jackson et al. (2003); Thomas et al. (2006); Zhang et al. (1998) ที่ระดับความเข้มข้นของสาร 6-ไดเมทิล อะมิโนพิวรีน เพิ่มขึ้นอัตราการรอดในตัวอ่อนหอยนางรม *C. madrasensis*, ระยะวัยลีเจอร်ของ *H. discus hannai* และ scallop, *Placopecten magellanicus* จะลดลง

4.2.3 ผลผลิตทริพลอยด์ในระยะโทรโคฟอร์จากการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน

ผลผลิตทริพลอยด์ของหอยตะไกรกรมขาวในระยะโทรโคฟอร์จากการเหนี่ยวนำพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการศึกษาพบว่าผลผลิตทริพลอยด์อยู่ในช่วง $21.12 \pm 6.80 - 43.68 \pm 2.44$ % โดยมีค่าผลผลิตสูงสุดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล 50 นาทีหลังการผสม เหนี่ยวนำเป็นเวลา 5 นาที (43.68 ± 2.44 %) ซึ่งผลผลิตทริพลอยด์จากการศึกษาในครั้งนี้ต่ำกว่าการศึกษาอื่น เช่น หอยนางรม *C. madrasensis* เท่ากับ 66.6% (Thomas et al. 2004) *C. gigas* เท่ากับ 84-99 % (Gerard et al. 1994; Gerard et al. 1999 และ Desrosiers et al. 1993) และหน่วยการทดลองที่มีผลผลิตทริพลอยด์ต่ำที่สุดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล 50 นาทีหลังการผสม เหนี่ยวนำเป็นเวลา 5 นาที (21.12 ± 6.80 %) (ตารางที่ 3)

จากการทดลองพบว่าปัจจัยหลักที่มีผลต่อผลผลิตของทริพลอยด์ในระยะโทรโคฟอร์ คือ ความเข้มข้นของสาร 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน ซึ่งพบว่าเปอร์เซ็นต์ของผลผลิตทริพลอยด์มีการแปรผันตามระดับความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำ

การศึกษาพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารเหนี่ยวนำ 100 ไมโครโมล (35.61%) มีค่าผลผลิตทริพลอยด์สูงสุด 200 ไมโครโมล (29.72%) และ 300 ไมโครโมล (26.03%) ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้น 200 และ 300 ไมโครโมล พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (ตารางที่ 3) นอกจากนี้พบว่าสัดส่วนของทริพลอยด์ที่ได้มีแนวโน้มลดลงเมื่อการพัฒนาของเซลล์ไม่สืบพันธุ์เกิดขึ้นไม่พร้อมกัน (Allen et al. 1989)

ตารางที่ 4 ผลผลิตทริพลอยด์จากการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีนที่

ความเข้มข้นแตกต่างกัน

ความเข้มข้นสาร 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน (ไมโครโมล)	ผลผลิตทริพลอยด์ (เปอร์เซ็นต์)
100	35.6121±8.9815 ^a
200	29.7163±8.1439 ^b
300	26.0312±6.0731 ^b

หมายเหตุ: - ค่าเฉลี่ย ±SD.

ตัวอักษรในแนวตั้งแสดงค่าเฉลี่ยที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

4.2.4 ผลผลิตโพลีพลอยด์ที่ได้จากการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วยสาร 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน

จากผลการศึกษาการเหนี่ยวนำทริพลอยด์ในหอยตะกรรรมขาวด้วยสาร 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีนในระยะโทรโคฟอร์ พบว่าตรวจพบทั้งโครโมโซม 2 ชุด 3 ชุด 4 ชุด และ 5 ชุด ผลผลิตที่เป็นชุดโครโมโซมที่เป็น 4 ชุด (เตตราพลอยด์) และ 5 ชุด (เพนตะพลอยด์) สามารถพบได้ในทุกหน่วยการทดลอง ยกเว้นชุดควบคุม ซึ่งพบว่าผลของเตตราพลอยด์และเพนตะพลอยด์ในระยะโทรโคฟอร์มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยพบเปอร์เซ็นต์ของเตตราพลอยด์ที่สูงที่สุดในระดับความเข้มข้นที่ 200 ไมโครโมล 40 นาทีหลังการผสม เหนี่ยวนำเป็นเวลา 10 นาที (31.94±13.86%) และค่าเปอร์เซ็นต์เตตราพลอยด์ต่ำสุดที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมล 30 นาทีหลังการผสม เหนี่ยวนำเป็นเวลา 10 นาที (11.89±1.90%) ผลผลิตโพลีพลอยด์ที่ได้รับจากการศึกษาการเหนี่ยวนำทริพลอยด์มีความแตกต่างกัน ทั้งนี้จากการศึกษาของ Diter and Dufy (1990) เหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วยสารไซโตคาลาซิน บี ได้ผลผลิตโพลีพลอยด์ที่เป็นเตตราพลอยด์เท่ากับ 64.42±7.8% และ 28.3±2.3% ที่เวลาหลังการผสมเซลล์สืบพันธุ์ 10 และ 45 นาที ในหอย Manila clam, *Ruditapes philippinarum* และ จากการศึกษาของ Eudeline et al. (2000) ได้รับผลผลิตเตตราพลอยด์ 13-92 % ที่เหนี่ยวนำทริพลอยด์ด้วยไซโตคาลาซิน บี 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ 10 นาทีหลังการผสมเซลล์สืบพันธุ์ ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์เพนตะพลอยด์พบค่าสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น (26.73±7.86%) และ

ค่าต่ำสุดที่ระดับความเข้มข้น 100 ไมโครโมล 30 นาทีหลังการผสม เหนียวนำเป็นเวลา 5 นาที ($1.06 \pm 1.25\%$) (ตารางที่ 4) ผลผลิตเพนตะพลอยด์ที่ได้จากการเหนียวนำทริพลอยด์ในครั้งนี้ พบว่า มีค่าสูงกว่าการศึกษาที่ผ่านมา การศึกษาด้วยสาร 6-ไดเมทิวอะมิโนพิวรีนที่มีความเข้มข้น 60-75 มิลลิกรัมต่อลิตร มีค่าเท่ากับ 3.33 % , เหนียวนำด้วยไซโตคาลาซิน ปี ที่ความเข้มข้น 0.75% ได้ผลผลิตเท่ากับ 4.35 % และ เหนียวนำด้วยอุณหภูมิตั้งที่ 5-7 องศาเซลเซียส ได้ผลผลิตเท่ากับ 2 % (Hui-ping et al. 1999) จากการศึกษาการเหนียวนำทริพลอยด์พบว่าความเข้มข้นของ 6-ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ที่เพิ่มขึ้นจะเป็นผลให้ผลผลิตของเพนตะพลอยด์เพิ่มสูงขึ้นด้วยเช่นกัน (Yang and Guo, 2006).



ตารางที่ 5 เปอร์เซ็นต์โพสพลอยด์จากการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์ในหอยตะไกรมกราคมขาวด้วยสาร

6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีนในระยะโทรโคฟอร์

ความเข้มข้น (ไมโครโมล)	เวลาหลังการ ผสม (นาที)	ระยะเวลาเหนี่ยวนำ (นาที)	4n (%)	5n (%)
100	30	5	15.92±0.56 ^{cd}	1.06±1.25 ^d
		10	11.89±1.90 ^d	1.11±1.48 ^d
	40	5	23.32±9.83 ^{abcd}	2.62±3.40 ^{cd}
		10	17.51±4.72 ^{bcd}	2.96±4.19 ^{cd}
	50	5	15.99±4.12 ^{cd}	3.00±2.97 ^{cd}
		10	21.55±1.37 ^{abcd}	11.35±4.12 ^{bcd}
200	30	5	23.82±3.93 ^{abc}	13.02±4.65 ^{bc}
		10	24.22±5.63 ^{abc}	10.67±2.75 ^{bcd}
	40	5	30.18±10.36 ^a	11.43±9.31 ^{bcd}
		10	31.94±13.86 ^a	11.25±5.37 ^{bcd}
	50	5	28.00±4.65 ^{ab}	10.42±2.90 ^{bcd}
		10	27.50±3.76 ^{abc}	8.74±7.21 ^{bcd}
300	30	5	26.91±3.36 ^{abc}	8.11±5.98 ^{cd}
		10	29.42±5.57 ^a	26.73±7.86 ^a
	40	5	30.47±11.58 ^a	12.61±3.71 ^{bc}
		10	30.10±5.39 ^a	13.04±7.91 ^{bc}
	50	5	16.98±12.93 ^{bcd}	19.15±15.85 ^{ab}
		10	28.03±2.57 ^{ab}	3.39±3.99 ^{cd}

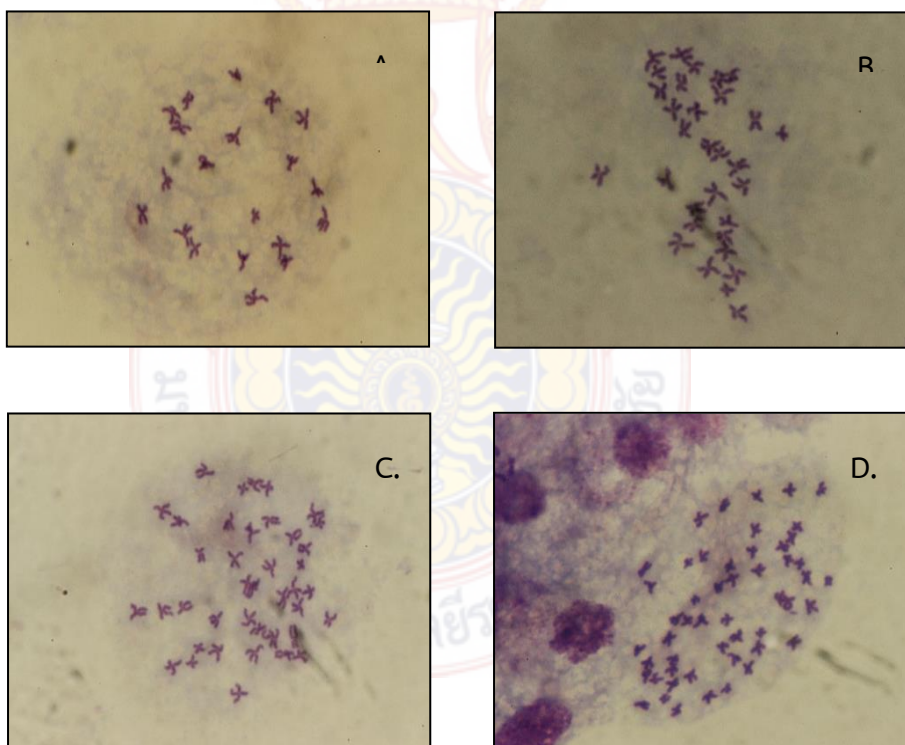
หมายเหตุ: - ค่าเฉลี่ย ± SD

- ตัวอักษรที่แสดงที่แตกต่างกันบนค่าเฉลี่ยที่แสดงในแนวตั้งเป็นค่าที่แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$)
- 4n (เตตราพลอยด์) = โครโมโซม 35-44 แท่ง, 5n (เพนตะพลอยด์) = โครโมโซม 45-64 แท่ง

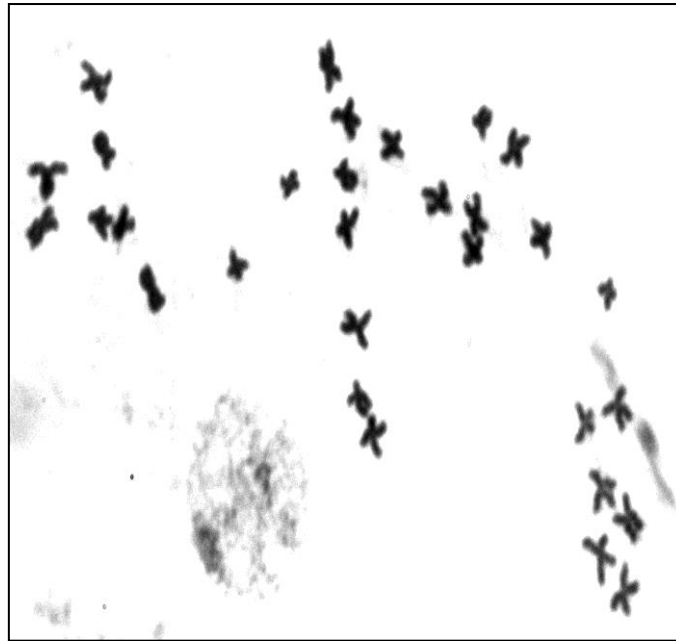
4.3 ผลการศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์จากการเหนี่ยวนำทริพลอยดีในระยะโทรโคเฟอร์

จากการตรวจสอบเซลล์จากระยะโทรโคเฟอร์จากการเหนี่ยวนำทริพลอยดีด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน เมื่อนำเซลล์ระยะเมทาเฟสมาทำการย้อมสี จัดเรียงคาริโอไทป์และสร้างอิดิโอแกรม และวัดขนาดความยาวแขนโครโมโซมในแต่ละแท่งเพื่อหาขนาดและชนิดของโครโมโซม พบว่าโครโมโซมทริพลอยดีเท่ากับ 30 จำนวนแขนทั้งหมดเท่ากับ 60 เป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริก ขนาดใหญ่ 15 แท่ง และโครโมโซมชนิดเมทาเซนตริกขนาดกลาง 15 แท่ง (ดังภาพที่ 10-12) และ (ตารางที่ 6) นอกจากนี้จากการศึกษาในครั้งพบชุดโครโมโซมที่เป็น 4 ชุด และ 5 ชุด มีจำนวนโครโมโซมเท่ากับ 40 และ 50 แท่ง คาริโอไทป์ของเตตราพลอยด์ (ภาพที่ 13-14) และคาริโอไทป์เพนตะพลอยด์ (ภาพที่ 15-16) ตามลำดับ และสามารถเขียนสูตรคาริโอไทป์ของโครโมโซมแบบทริพลอยดี ดังนี้

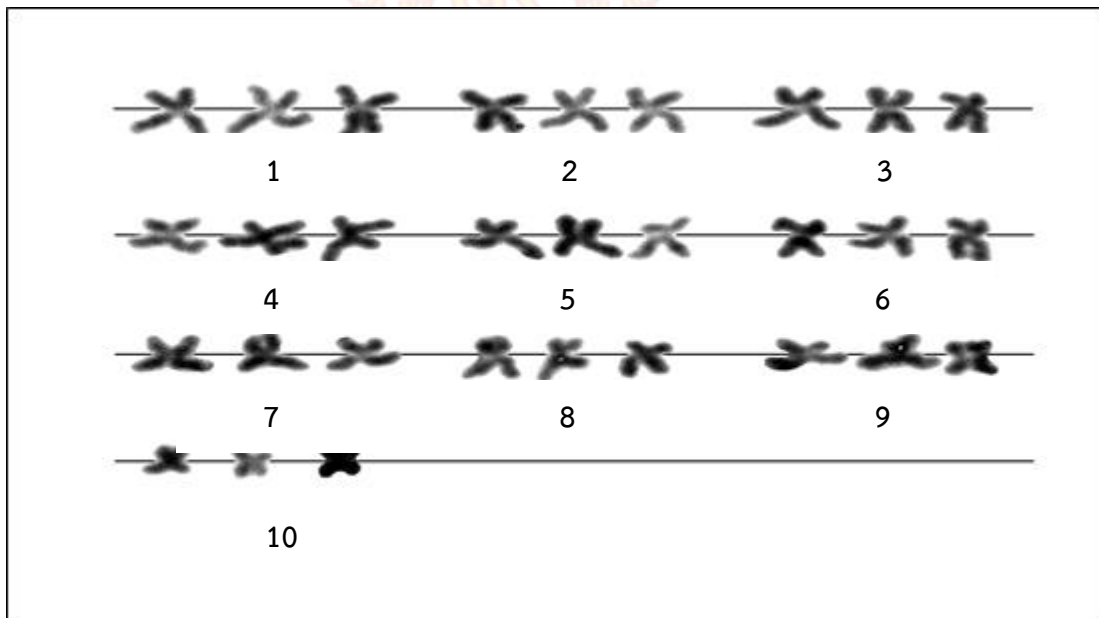
$$3n \text{ (Triploid)} \quad 30 = L_{15}^m + M_{15}^m$$



ภาพที่ 10. แสดงโพลีพลอยดีโครโมโซม : (A) ดิพลอยด์ ($2n = 20$); (B) ทริพลอยด์ ($3n = 30$); (C) เตตราพลอยด์ ($4n = 40$); (D) เพนตะพลอยด์ ($5n = 50$).



ภาพที่ 11. เมทาเฟสของหอยตะโกรมครามขาว (*C. belcheri*), $3n=30$ จากการเหนี่ยวนำ
 ทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบธรรมดา

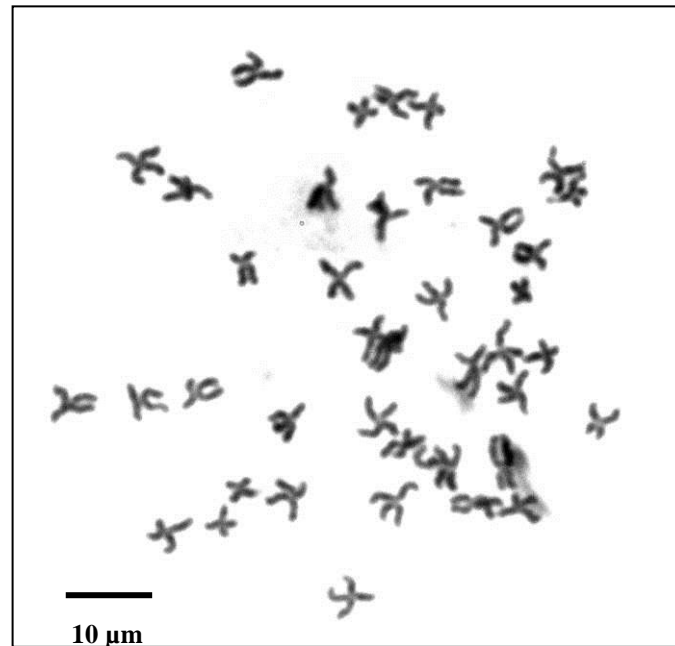


ภาพที่ 12. คาร์ิโอไทป์ของหอยตะโกรมครามขาว (*C. belcheri*), $3n=30$ จากการเหนี่ยวนำ
 ทริพลอยด์ด้วย 6- ไดเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบธรรมดา

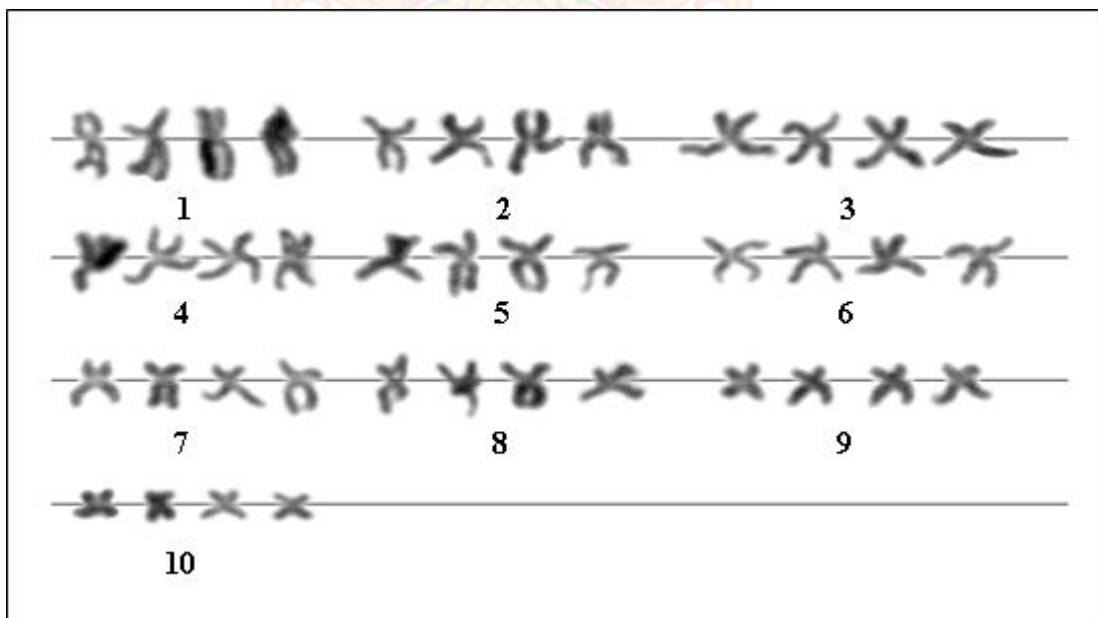
ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยความยาวของแขนโครโมโซมข้างสั้น, ความยาวของแขนโครโมโซมข้างยาว, ความยาวทั้งหมดของโครโมโซมแต่ละคู่ (LT), ค่า relative length (RL), ค่า centromeric index (CI), ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation, SD) ของ RL และ CI จากเซลล์ระยะเมทาเฟส 20 เซลล์ของหอยตะไกรมกราคมขาว (*Crassostrea belcheri*, 3n=30)

คู่ที่	Ls	Ll	LT	RL \pm SD	CI \pm SD	ขนาดโครโมโซม	ชนิดโครโมโซม
1	3.570	4.312	7.882	0.125 \pm 0.005	0.547 \pm 0.018	L	m
2	3.347	4.086	7.433	0.118 \pm 0.004	0.549 \pm 0.024	L	m
3	3.205	3.879	7.084	0.112 \pm 0.003	0.546 \pm 0.020	L	m
4	3.055	3.729	6.784	0.107 \pm 0.003	0.548 \pm 0.018	L	m
5	2.925	3.539	6.464	0.102 \pm 0.002	0.546 \pm 0.021	L	m
6	2.681	3.472	6.153	0.099 \pm 0.003	0.553 \pm 0.020	M	m
7	2.631	3.319	5.950	0.094 \pm 0.003	0.556 \pm 0.024	M	m
8	2.476	3.137	5.613	0.089 \pm 0.004	0.557 \pm 0.023	M	m
9	2.266	2.968	5.234	0.083 \pm 0.004	0.564 \pm 0.020	M	m
10	2.029	2.442	4.470	0.071 \pm 0.005	0.546 \pm 0.021	M	m

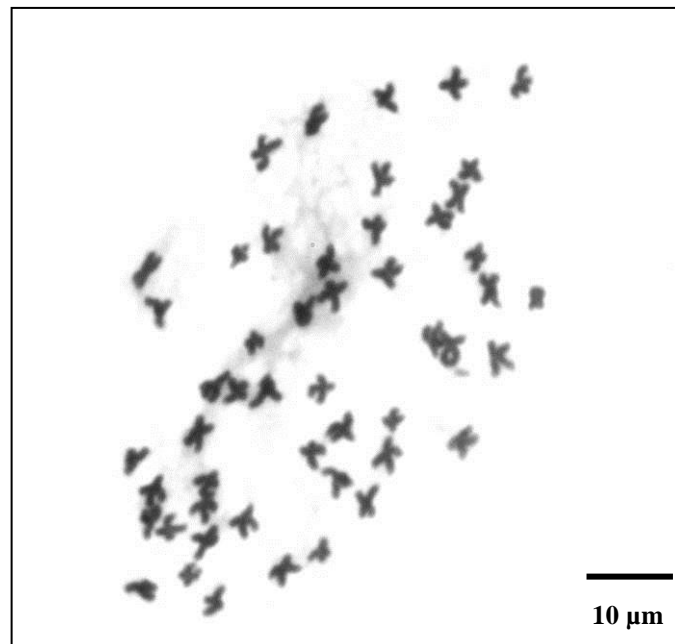
หมายเหตุ: โครโมโซมขนาด L= โครโมโซมขนาดใหญ่ (LT>6.176), M=โครโมโซมขนาดกลาง (LT=3.941-6.176) และ m = โครโมโซมชนิดเมทาเซนทริก



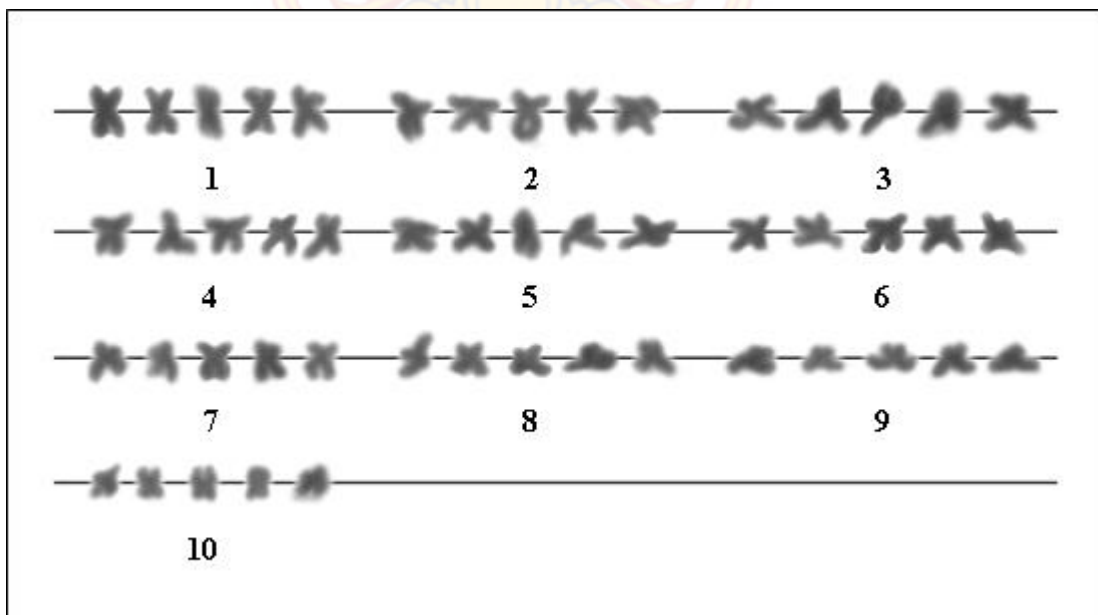
ภาพที่ 13. เมทาเฟสของหอยตะโกรมครามขาว (*C. belcheri*), $4n=40$ จากการเหนี่ยวนำ
ทริพลอยด์ด้วย 6- ไตเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 14. คาร์ิโอไทป์ของหอยตะโกรมครามขาว (*C. belcheri*), $4n=40$ จากการเหนี่ยวนำ
ทริพลอยด์ด้วย 6- ไตเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบธรรมดา



ภาพที่ 15. เมทาเฟสของหอยตะโกรมครามขาว (*C. belcheri*), $5n=50$ จากการเหนี่ยวนำ
ทริพลอยด์ด้วย 6- ไตเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบธรรมดา



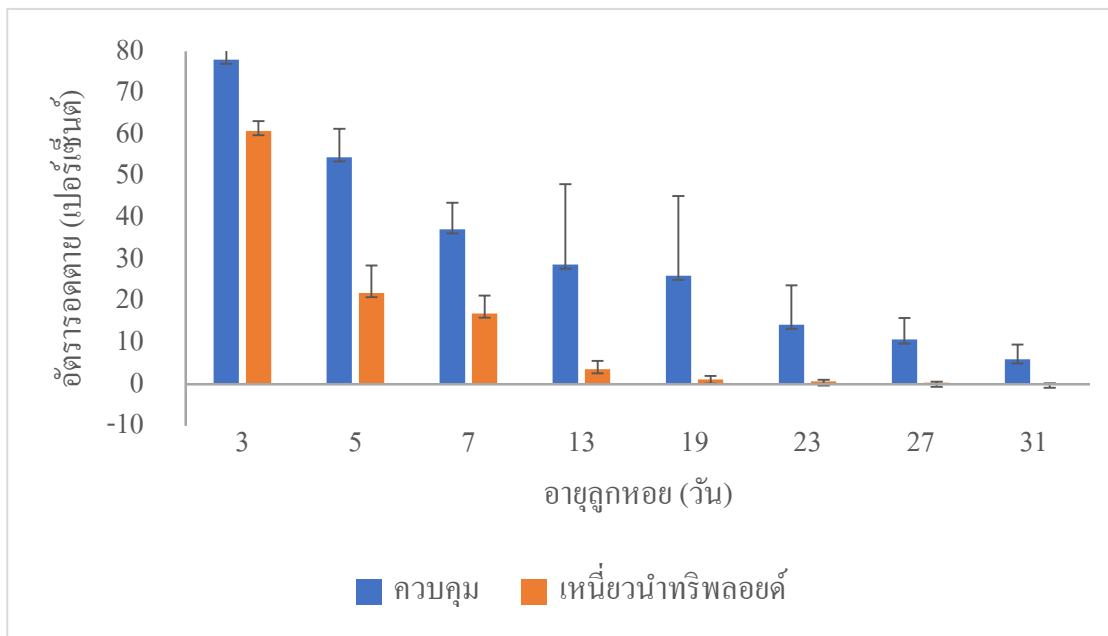
ภาพที่ 16. คาร์ิโอไทป์ของหอยตะโกรมครามขาว (*C. belcheri*), $5n=50$ จากการเหนี่ยวนำ
ทริพลอยด์ด้วย 6- ไตเมทิวอะมิโนพิวรีน ด้วยการย้อมแถบสีแบบธรรมดา

4.4 ศึกษาพัฒนาการของหอยตะไกรมกรามขาวแบบทรูปลอยต์ในระยะอ่อนและระยะก่อนลงเกาะ

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำทรูปลอยต์ในหอยตะไกรมกรามขาวด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน ซึ่งมีปัจจัยที่สำคัญต่อการเหนี่ยวนำ 3 ประการ คือ ความเข้มข้นของสารเคมีที่ใช้ในการเหนี่ยวนำ ระยะเวลาหลังการผสม และระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ เมื่อสิ้นสุดการทดลองดังกล่าว พบว่า ชุดการทดลองที่มีผลผลิตของทรูปลอยต์ดีที่สุด คือ ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล ระยะเวลาหลังการผสมเป็นเวลา 40 นาที เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งให้ผลผลิตเท่ากับ 43.68 ± 2.44 เปอร์เซ็นต์ ได้ทำการเลือกชุดการทดลองดังกล่าวเพื่อทำการเพาะและอนุบาลเพื่อศึกษาพัฒนาการ ความผิดปกติ อัตราการรอด และการเจริญเติบโตทั้งด้านความยาวและความกว้างของลูกหอยตะไกรมกรามขาวทุกระยะในโรงเพาะฟัก

4.4.1 อัตราการรอดของลูกหอย

จากการศึกษาอัตราการรอดของลูกหอยจากการอนุบาลลูกหอยในโรงเพาะฟักจากการเหนี่ยวนำทรูปลอยต์ด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน จากการทดสอบทางสถิติพบว่า มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญกับการทดลองชุดควบคุม ($P < 0.05$) ในทุกระยะพัฒนาการตลอดระยะเวลาในการอนุบาล ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Mallia and Thomas (2003) พบว่าอัตราการรอดของลูกหอยนางรม *Crassostrea madrasensis* ในระยะวัยอ่อน พบว่าในชุดควบคุมมีการเจริญเติบโตดีกว่าชุดเหนี่ยวนำทรูปลอยต์ตั้งแต่วันที่ 1 จนกระทั่งระยะวัยเก็ล็ด อัตราการรอดชุดเหนี่ยวนำทรูปลอยต์จะมีค่าที่ต่ำ นอกจากนี้การศึกษาของ Guo et al (1992) พบว่า ในหอยนางรม *C.gigas* ระยะวัยอ่อน มีอัตราการรอดของทรูปลอยต์เท่ากับ 15.6% จากผลการทดลองของ Jiang et al (1993) ศึกษาในหอย *Pinctada martensii* มีอัตราการรอดของลูกหอยทรูปลอยต์เท่ากับ 37.1% ขณะที่บางการศึกษาพบอัตราการรอดของลูกหอยวัยอ่อนที่เหนี่ยวนำทรูปลอยต์มีอัตราการรอดสูงถึง 50-80% (Arai et al. 1986) ทั้งนี้เนื่องจากคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์เป็นปัจจัยที่สำคัญอีกประการที่มีผลต่ออัตราการรอดของลูกหอยที่มีการเหนี่ยวนำ เนื่องจากหากใช้เซลล์สืบพันธุ์จากการผสมเทียมจะมีคุณภาพที่ต่ำ อัตราการผสมต่ำและเป็นผลให้อัตราการรอดในระยะวัยอ่อนต่ำ อีกทั้งคุณภาพของไข่ที่ใช้ในการทดลองแต่ละครั้งมีความสมบูรณ์เพศไม่เท่ากันและมาจากพ่อแม่พันธุ์ต่างชุดและต่างเวลา กัน เมื่อความสมบูรณ์ของไข่ไม่เท่ากันนั้นจะทำให้การพัฒนาของไข่หลังจากการปฏิสนธิในแต่ละเซลล์ไม่เท่ากัน ดังแสดงภาพที่ 17

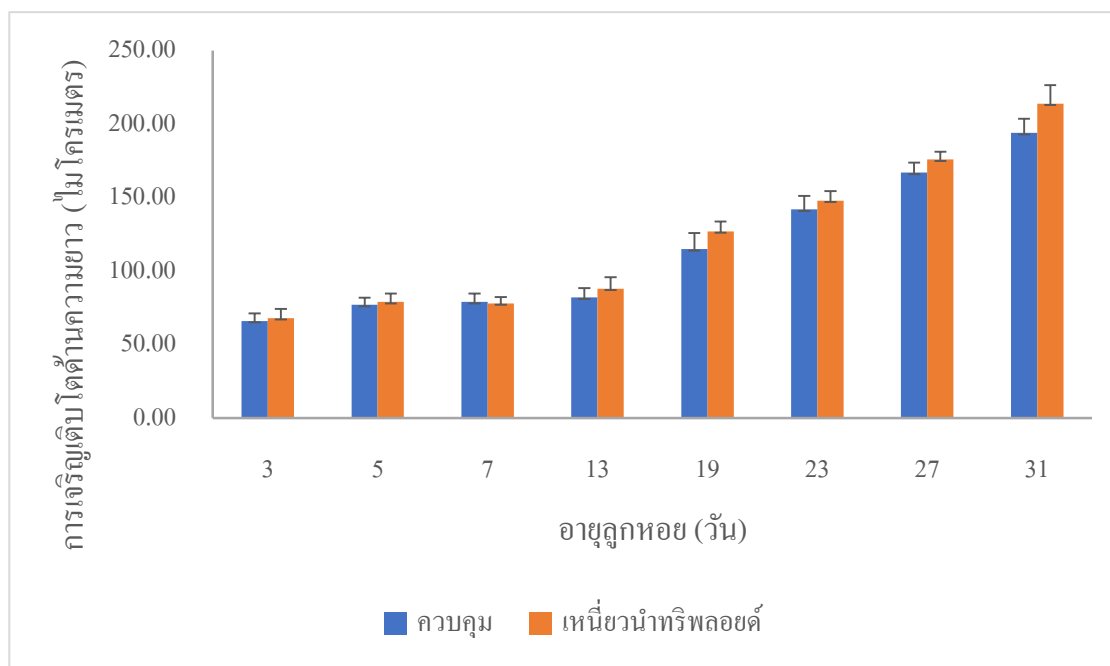


ภาพที่ 17 อัตรารอดตายของลูกหอยตะกรมกรรมชายที่อนุบาลในโรงเพาะฟักจากการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีนและชุดควบคุม

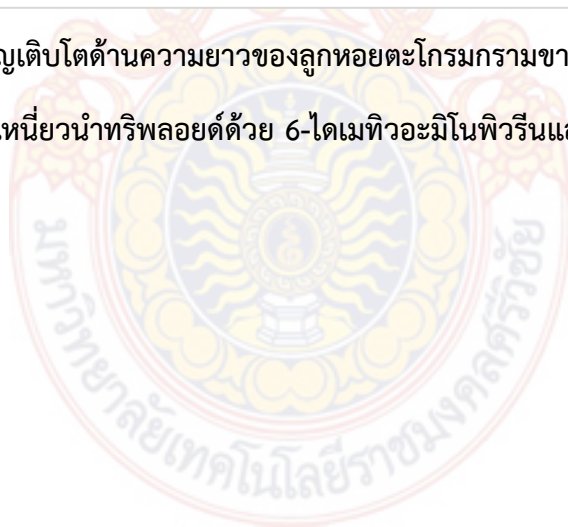
4.4.2 การศึกษาการเจริญเติบโตของลูกหอย

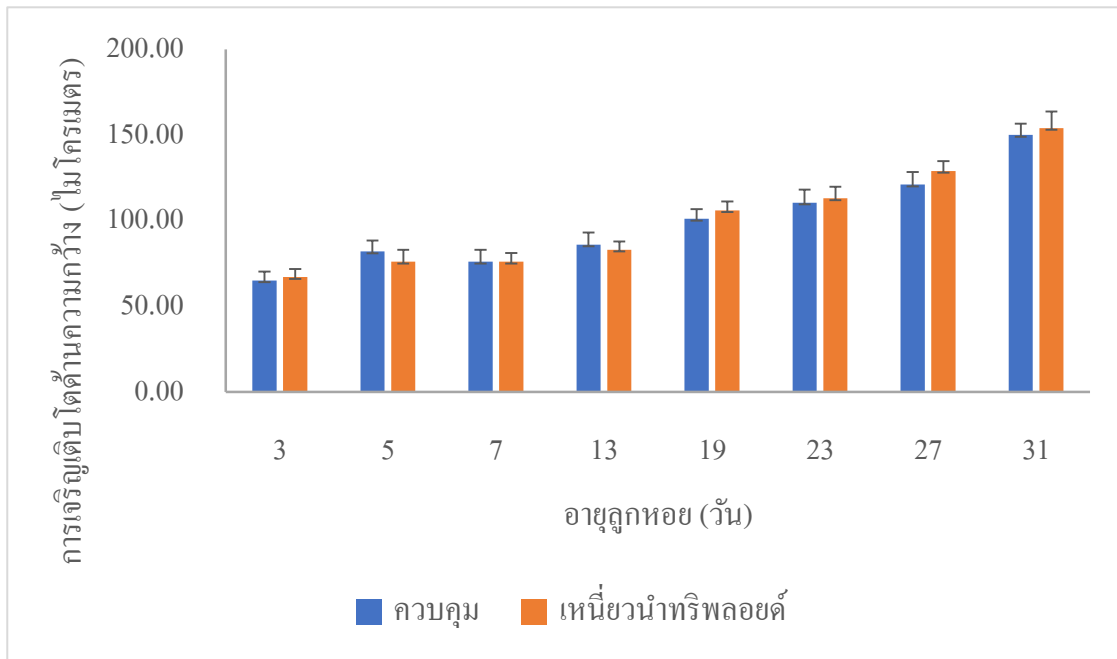
จากการศึกษาการเจริญเติบโตของลูกหอยจากการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน จากการทดสอบทางสถิติพบว่า การเจริญเติบโตด้านความกว้างและความยาวเปลือก ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงในภาพที่ 18 และ 19 ซึ่งขนาดของลูกหอยที่ได้จากการทดลองทั้งชุดควบคุมและเหนี่ยวนำทรูปลอยด์มีขนาดที่ใกล้เคียงกัน ทั้งความยาวและความกว้างตลอดระยะเวลาการทดลอง แต่อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าลูกหอยที่ได้รับการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์จะมีการเจริญเติบโตทั้งด้านความยาวและความกว้างที่ดีกว่าชุดควบคุม (ดิฟลอยด์) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของนักวิจัยหลายท่าน Mallia and Thomas (2003) ศึกษาในหอยนางรม (*C. madrasensis*); Beaumont and Kelly (1989) ในหอย (*Mytilus edulis*); Hawkins, et al. (1994); ในหอยนางรม *Ostrea edulis*; Utting et al. (1996) ในหอย *Tapes philippinarum* และ Nell et al. (1994). ทำการทดลองในหอยนางรม *S. commercialis* พบว่าลูกหอยที่มีการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าชุดควบคุมตั้งแต่วันที่ 1 จนถึงระยะวัยแก่

ทั้งนี้เนื่องมาจากได้มีการใช้พลังงานที่ได้รับเพื่อการเจริญเติบโตและลดการใช้พลังงานเพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ส่งผลให้ลูกหอยที่มีการเหนี่ยวนำทรูฟลอยด์มีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าลูกหอยแบบดิฟลอยด์



ภาพที่ 18 การเจริญเติบโตด้านความยาวของลูกหอยตะกรรกรรมขาวที่อนุบาลในโรงเพาะฟักจากการเหนี่ยวนำทรูฟลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีนและชุดควบคุม





ภาพที่ 19 การเจริญเติบโตด้านความกว้างของลูกหอยตะไกรธรรมชาติอนุบาลในโรงเพาะฟัก
จากการเหนียวนำทริพลอยด์ด้วย 6-ไดเมทิวอะมิโนพิวรีนและชุดควบคุม



สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการผลิตหอยตะไกรมกรามขาแบบทรูปลอยด์จากโรงเพาะฟัก ได้มีศึกษาข้อมูลพื้นฐานเกี่ยวกับชุดโครโมโซมแบบดิพลอยด์ของหอยตะไกรมกรามขา ซึ่งพบว่า ดิพลอยด์โครโมโซมเท่ากับ 20 แห่ง เป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกทั้งหมด จำนวนแขนโครโมโซมเท่ากับ 40 สามารถเขียนสูตรคาริโอไทป์ของหอยตะไกรมกรามขาได้ดังนี้

$$2n (20) = L^{m}_{10} + M^{m}_{10}$$

หอยตะไกรมกรามขามีโครโมโซมเครื่องหรือตำแหน่งนอร์ 1 ตำแหน่ง ซึ่งพบอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 10 แขนข้างสั้น

จากการศึกษาการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์ด้วยสาร 6- DMAP ประกอบด้วย 3 ปัจจัย คือ ความเข้มข้นสาร 3 ระดับ (100, 200, 300 ไมโครโมล) ระยะเวลาหลังการผสม 3 ระดับ (30,40,50 นาที) และระยะเวลาในการเหนี่ยวนำ 2 ระดับ (5 และ 10 นาที) พบว่าหน่วยการทดลองที่ระดับความเข้มข้นของสาร 6-ไดเมทิลอะมิโนพิวรีน 100 ไมโครโมล เวลาหลังจากการผสมเป็นเวลา 30 นาที เหนี่ยวนำเป็นเวลา 10 นาที มีเปอร์เซ็นต์ของทรูปลอยด์สูงสุดเท่ากับ 86.99 ± 2.45 เปอร์เซ็นต์ อัตราการรอดที่สูงสุดของตัวอ่อนระยะโทรโคฟอร์พบในชุดทดลองชุดควบคุมมีค่าเท่ากับ 54.00 ± 2.74 เปอร์เซ็นต์ และค่าผลผลิตทรูปลอยด์สูงสุดที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมล 50 นาทีหลังการผสม เหนี่ยวนำเป็นเวลา 5 นาที เท่ากับ 43.68 ± 2.44 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้พบว่าจากการตรวจสอบผลการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์ในระยะโทรโคฟอร์ พบโครโมโซมที่เป็น 4 ชุด และ 5 ชุด ในทุกหน่วยการทดลอง ยกเว้นชุดควบคุม เมื่อทำการศึกษาด้านพันธุศาสตร์เซลล์ของลูกหอยจากการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์ พบว่ามีโครโมโซมเท่ากับ 30 แห่งจำนวนแขนทั้งหมดเท่ากับ 60 และเป็นโครโมโซมชนิดเมทาเซนทริกทั้งหมด

จากการศึกษาพัฒนาการของลูกหอยตะไกรมกรามขาจากการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์ในระยะวัยอ่อนและก่อนลงเกาะ พบว่า ตลอดระยะเวลาในการอนุบาลในชุดควบคุมจะมีอัตราการรอดของลูกหอยที่ดีกว่าลูกหอยจากการเหนี่ยวนำทรูปลอยด์และการเจริญเติบโตพบว่าทั้งด้านความยาวและความกว้าง ทั้งสองชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่า การเจริญเติบโตทั้งด้าน

ความยาวและความกว้างของชุดการเหนี่ยวนำมีค่าที่สูงกว่าชุดควบคุม ตั้งแต่ลูกหอยอายุ 1 วัน ถึง ระยะลงเกาะ

ข้อเสนอแนะ

1. การเหนี่ยวนำที่พลอยดีควรจะใช้เซลล์สืบพันธุ์ที่ได้จากการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตามธรรมชาติ เพื่อเพิ่มอัตราการรอด การเจริญเติบโต และพัฒนาการที่ดีของลูกหอยในแต่ละระยะ



อ้างอิง

- จินตนา จินดาลิขิต. 2538. การเหนี่ยวนำทริพลอยดีในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* วิทยานิพนธ์ปริญญาโท จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- Allen Jr, K, S. and Downing, S.L. 1990. Performance of Triploid Pacific Oysters, *Crassostrea gigas*: Gametogenesis. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 47(6): 1213-1222.
- Allen, Jr. S.K. and D. Bushek. 1992. Large scale production of triploid *Crassostrea virginica* (Gmelin) using 'stripped' gametes. **Aquaculture**. 103: 241-251.
- Allen Jr, S.K. and Downing, S.L. 1986. Performance of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg). I. Survival, growth, glycogen content, and sexual maturation in yearlings. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 102(2-3): 197-208.
- Allen, S.K., Downing, S.L., Chew, K.K. and Program, W.S.G. 1989. **Hatchery Manual for Producing Triploid Oysters**: Washington Sea Grant Program.
- Barber, B.J. Mann, R. and Allen Jr, S.K. 1992. Optimization of triploid induction for the oyster, *Crassostrea virginica* (Gmelin). **Aquaculture** 106(1): 21-26.
- Cross, I., Vega, L. and Rebordinos, L. 2003. Nucleolar organizing regions in *Crassostrea angulata*: chromosomal location and polymorphism. **Genetica** 119(1): 65-74.
- De Beer, M. 2004. **Induction of triploidy in the South African abalone, *Haliotis midae*, by the use of hydrostatic pressure**. Stellenbosch: University of Stellenbosch.
- Desrosiers, R.R., Gerard, A., Peignon, J.-M., Naciri, Y., Dufresne, L., Morasse, J., Ledu, C., Phelipot, P., Guerrier, P. and Dube, F. 1993. A novel method to produce

- triploids in bivalve molluscs by the use of 6-dimethylaminopurine. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 170(1): 29-43.
- Downing, S.L. and Allen Jr, S.K. 1987. Induced triploidy in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: Optimal treatments with cytochalasin B depend on temperature. **Aquaculture** 61(1): 1-15.
- Dufy, C. and Diter, A. 1990. Polyploidy in the Manila clam, *Ruditapes philippinarum*. I-Chemical induction and larval performances of triploids. **Aquatic Living Resources** 3(01): 55-60.
- Durand, P., Wada, K.T. and Komaru, A. 1990. Triploidy induction by caffeine-heat shock treatments in the Japanese pearl oyster *Pinctada fucata martensii*. **Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries** 56.
- Eudeline, B., Allen Jr, S.K. and Guo, X. 2000. Delayed meiosis and polar body release in eggs of triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas*, in relation to tetraploid production. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology** 248(2): 151-161.
- Gendreau, S. and H. Grizel. 1990. Induced triploidy and tetraploidy in the European flat oyster, *Ostrea edulis* L. **Aquaculture**. 90: 229-238.
- Gerard, A., Ledu, C., Phelipot, P. and Naciri-Graven, Y. 1999. The induction of MI and MII triploids in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* with 6-DMAP or CB. **Aquaculture** 174(3-4): 229-242.
- Gerard, A., Naciri, Y., Peignon, J.M., Ledu, C. and Phelipot, P. 1994. Optimization of triploid induction by the use of 6-DMAP for the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). **Aquaculture Research** 25(7): 709-719.

- Guo, X., Cooper, K., Hershberger, W.K. and Chew, K.K. 1992. Genetic consequences of blocking polar body I with cytochalasin B in fertilized eggs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*: I. Ploidy of resultant embryos. **The Biological Bulletin** 183(3): 381-386.
- Guo, X., DeBrosse, G.A. and Allen Jr, S.K. 1996. All-triploid Pacific oysters (*Crassostrea gigas* Thunberg) produced by mating tetraploids and diploids. **Aquaculture** 142(3-4): 149-161.
- Hand, R.E., Nell, J.A. and Maguire, G.B. 1998. Studies on triploid oysters in Australia. X. Growth and mortality of diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). **Journal of Shellfish Research** 17(4): 1115-1118.
- Hand, R.E. and J.A. Nell. 1999. Studies on triploid oysters in Australia: XII. Gonad discolouration and meat condition of diploid and triploid Sydney rock oysters (*Saccostrea commercialis*) in five estuaries in New South Wales, Australia. **Aquaculture**. 171: 181-194.
- Hand, R.E., J.A. Nell, D.D. Reid, I.R. Smith and G.B. Maguire. 1999. Studies on triploid oysters in Australia: effect of initial size on growth of diploid and triploid Sydney rock oysters *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). **Aquaculture Research**. 30: 35-42.
- Hawkins, A.J.S., A.J. Day, A. Gérard, C. Naciri, C. Ledu, B.L. Bayne, and M. Héral. 1994. A genetic and metabolic basis for faster growth among triploids induced by blocking meiosis I but not meiosis II in the larviparous European flat oyster, *Ostrea edulis* L. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**. 184: 21-40.

- Howell, W.M. and Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. **Experientia** 36(8): 1014-1015.
- Jackson, D.L., B.W. MacDonald, B. Vercaemer, X. Guo, A. Mallet and E.L. Kenchington. 2003. **Investigations with triploid Atlantic sea scallops, *Placopecten magellanicus*, at the Bedford Institute of Oceanography, 2000-2003.** (Ottawa, Ont.): Fisheries and Oceans Canada. 48 p.
- Jarayabhand, P. and S. Jindalikit. 1992. Chromosome manipulation in small oyster, *Saccostrea cucullata* by thermal shock: evidences from trochophore larvae, p.85-91. *In* Proceedings of the First International Workshop on Genetics in Aquaculture and Fisheries Management.
- Jarayabhand, P., S. Jindalikit and P. Menasveta. 1994. Chromosome manipulation in small oyster *Saccostrea cucullata* by thermal shock. **Thai Journal of Aquatic Science**. 1: 26-33.
- Khrueanet, W., Supiwong, W., Tumpeesuwan, C., Tumpeesuwan, S., Pinthong, K. and Tanomtong, A. 2013. First chromosome analysis and localization of the nucleolar organizer region of land snail, *Sarika resplendens* (Stylommatophora, Ariophantidae) in Thailand. **Cytologia** 78(3): 213-222.
- Koedprang, W. and Wattanakul, W. 1996. Study on karyotypes of three species of Ostreidae oysters, *Crassostrea belcheri*, *C. gigas* and *Saccostrea commercialis*. *In*: Annual Conference: Field of Animal Science and Fisheries, Lampang (Thailand).

- Komaru, A., Uchimura, Y., Ieyama, H. and Wada, K.T. 1988. Detection of induced triploid scallop, *Chlamys nobilis*, by DNA microfluorometry with DAPI staining. **Aquaculture** 69(3-4): 201-209.
- Leitao, A. Boudry, P., Labat, J. and Thiriou-Quievreux, C. 1999. Comparative karyological study of cupped oyster species. **Malacologia** 41(1): 175-186.
- Li, X. and Havenhand, J. 1997. Karyotype, nucleolus organiser regions and constitutive heterochromatin in *Ostrea angasi* (Mollusca: Bivalvia): evidence of taxonomic relationships within the Ostreidae. **Marine Biology** 127(3): 443-448.
- Li, Y., Li, X. and Qin, J.G. 2007. Triploidy induction in Australian greenlip abalone, *Haliotis laevigata* (Donovan) with cytochalasin B. **Aquaculture Research** 38(5): 487-492.
- Liu, W., Heasman, M. and Simpson, R. 2004. Induction and evaluation of triploidy in the Australian blacklip abalone, *Haliotis rubra*: a preliminary study. **Aquaculture** 233(1-4): 79-92.
- Mallia, J.V. and Thomas, P. 2003. Effect of temperature on polar body formation in the edible oyster, *Crassostrea madrasensis*. **Journal of the Marine Biological Association of India** 45(2): 242-244.
- Melo, E.M.C., Gomes, C., Silva, F., Suhnel, S. and Melo, C. 2015. Chemical and physical methods of triploidy induction in *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793). **Boletim do Instituto de Pesca** 414: 889-898.
- Nell, J.A. and B. Perkins. 2005. Studies on triploid oysters in Australia: farming potential of all-triploid Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg), in Port-Stephens, New South Wales, Australia. **Aquaculture Research**. 36: 530-536.

- Nell, J.A., Cox, E., Smith, I.R. and Maguire, G.B. 1994. Studies on triploid oysters in Australia. I. The farming potential of triploid Sydney rock oysters, *Saccostrea commercialis* (Iredale and Roughley). **Aquaculture** 126(3-4): 243-255.
- Pereira, J.C., Chaves, R., Batista, F.M., Guedes-Pinto, H. and Leltao, A. 2011. Cytogenetic Characterization of the Dwarf Oyster, *Ostrea stentina* (Mollusca: Bivalvia) and Comparative Karyological Analysis within Ostreinae. **Journal of Shellfish Research** 30(2): 211-216.
- Silapajarn, K. 1994. **The Study on Polyploidy Induction in Takrom Oyster *Crassostrea belcheri* (sowerby) by Thermal Shock**. M.D. Thesis, Mahidol University.
- Stanley, J.G., Allen Jr, S.K. and Hidu, H. 1981. Polyploidy induced in the American oyster, *Crassostrea virginica*, with cytochalasin B. **Aquaculture** 23(1-4): 1-10.
- Stanley, J.G., Hidu, H. and Allen Jr, S.K. 1984. Growth of American oysters increased by polyploidy induced by blocking meiosis I but not meiosis II. **Aquaculture** 37(2): 147-155.
- Stepito, N. and Cook, P. 1998. Induction of triploidy in the South African abalone using cytochalasin B. **Aquaculture International** 6(2): 161-169.
- Thiriot-Quievreux, C. 2002. Review of the literature on bivalve cytogenetics in the last ten years. **Cahiers de Biologie Marine** 43(1): 17-26.
- Thomas, P., Mallia, J.V. and Muthiah, P. 2004. Triploidy induction and confirmation in the edible oyster *Crassostrea madrasensis*. **Journal of the Marine Biological Association of India** 46(2): 224-228.

- Thomas, P., Mallia, J.V. and Muthiah, P. 2006. Induction of triploidy in Indian edible oyster, *Crassostrea madrasensis* (Preston) using 6-Dimethylaminopurine. **Asian Fisheries Science** 19(1): 15-20.
- Turpin, R. and Lejeune, J. 1965. **Les Chromosomes Humains**. Gauthier-Villars, Paris.
- Utting, S. and Spencer, B. 1996. **The hatchery culture of bivalve mollusc larvae and juveniles** (Vol. 68): Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, Directorate of Fisheries Research.
- Vadopalas, B. and Davis, J.P. 2004. Optimal chemical triploid induction in geoduck clams, *Panopea abrupta*, by 6-dimethylaminopurine. **Aquaculture** 230(1-4): 29-40.
- Wang, Y., Xu, Z. and Guo, X. 2004. Differences in the rDNA-bearing chromosome divide the Asian-Pacific and Atlantic species of *Crassostrea* (Bivalvia, Mollusca). **The Biological Bulletin** 206(1): 46-54.
- Wang, Z., Zhang, G., Wang, Y., Wu, L., Yang, H., Zhu, L., Chang, Y., Xia, F. and Wang, Q. 1990. Triploidization of the Pacific abalone with cytochalasin B and temperature shock. **Journal of Dalian Fisheries University** 5: 1-8.
- Yang, H. and Guo, X. 2006. Polyploid induction by heat shock-induced meiosis and mitosis inhibition in the dwarf surfclam, *Mulinia lateralis* Say. **Aquaculture** 252(2-4): 171-182.
- Yuan, T.C., Liang, Y., Cai, W.R., Hai, Y.R. and Ping, W.Z. 1999. Triploid of *Crassostrea gigas* induced with 6 dimethylaminopurine: blocking polar body I. **Journal of Fisheries of China** 23(2): 128-132.
- Zhang, G., Wang, Z., Chang, Y., Song, J., Ding, J., Wang, Y. and Wang, R. 1998. Triploid induction in Pacific abalone *Haliotis discus hannai* (Ino) by

6-dimethylaminopurine and the performance of triploid juveniles. *Journal of Shellfish Research* 17: 783-788.

