# ภาคผนวก

Prince of Songkla University
Pattani Campus

**1 การนับเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่**

1.1 การนับเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ด้วย Haemacytometer มีความลึก 0.1 มิลลิเมตร (mm) ประกอบด้วยตารางขนาด 1 ตารางมิลลิเมตร จำนวน 9 ตาราง มี 2 ด้าน แต่ละด้านตารางแบ่งเป็นช่องย่อย ๆ

การคำนวณหาปริมาตรเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่จากการนับด้วย Haemacytometer การนับจำนวนเซลล์แพลงก์ตอนจากช่องใหญ่ 9 ช่อง **(**กำลังขยายประมาณ 4 x 10 เท่า)

1 ช่องใหญ่ มีปริมาตร เท่ากับ 1×0.1 มิลลิเมตร

เท่ากับ 0.1×0.1×0.01 เซนติเมตร (cm)

เท่ากับ 0.0001 ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ 0.0001 มิลลิลิตร (mL)

เท่ากับ $10^{-4}$ มิลลิลิตร

สมมติเลือกนับ 10 ช่อง จาก 9 ช่อง (ด้านละ 5 ช่อง)

ดังนั้น 10 ช่องใหญ่ มีปริมาตรเท่ากับ $10 \times 10^{-4}$ ตารางเซนติเมตร

หากนับเซลล์จาก 5 ช่องใหญ่ได้ n เซลล์ คือปริมาตร $5 \times 10^{-4}$ ตารางเซนติเมตร มีจำนวน n เซลล์ ดังนั้น ปริมาตร 1 ตารางเซนติเมตร มีจำนวน $(1 \times n \times 10^{-4})/5$ เซลล์

**2 สูตรอาหารที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่**

**ตารางผนวกที่ 1** สูตรอาหาร MGM (Modified Guillard's Medium) ที่ใช้เลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* โดยใช้อัตรา 1 mL ต่อน้ำ 1 ลิตร

| Chemical | MW | Mol/L | Chemical/L |
|---|---|---|---|
| $NaNO_3$ | 84.99 | 0.1 µmol | 42.5 g |
| $Na_2H_2PO_4$ | 141.96 | 30 µmol | 4.26 |
| $FeSO_4$ | 151.91 | 1 µmol | 0.15 |
| $Na_2EDTA$ ($C_{10}H_{14}O_8Na_2.2H_2O$) | 372.24 | 500 µmol | 37.2 |
| $MnC_{12}$ | 125.84 | 1 µmol | 0.01258 mg |

Prince of Songkla University Pattani Campus

**3.วิธีเตรียมทดสอบธาตุอาหารในสาหร่ายและน้ำ**

**ก. วิธีการเตรียมสาหร่าย**

ตัวอย่างสาหร่าย 1 กรัมน้ำหนักแห้ง ชั่งน้ำหนักใส่ในบีกเกอร์ Pyrex ขนาด 500 mL เติม $HNO_3$ 10 mL คนให้ทั่วอย่างช้า ๆ หลังจากนั้นเติม 3 mL ของ $HClO_4$ 60 เปอร์เซ็นต์ วางบน hot plate ให้ความร้อนอย่างช้า ๆ จนกระทั่งฟองหายไป ให้ความร้อนต่อจนกระทั่ง $HNO_3$ เกือบระเหยจะมีควันสีขาวเกิดขึ้น จึงตั้งทิ้งไว้ให้เย็น เติม $HNO_3$ 10 mL และให้ความร้อนต่อจนควันสีขาวเกิดขึ้น ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ให้ความร้อนต่อจนกว่าไอเป็นสีขาวของ $HClO_4$ จึงทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรให้ได้ 50 mL โดยการเติม HCl (1+1)

**ข. วิธีการเตรียมน้ำ**

กรองน้ำ 100 mL เติม $HNO_3$ 3 mL วางบน hot plate ให้ความร้อนอย่างช้า ๆ จนกระทั่งเหลือปริมาตรน้ำ 50 mL เติม $HNO_3$ 3 mL วางบน hot plate ให้ความร้อนอย่างช้า ๆ จนกระทั่งเหลือปริมาตรน้ำประมาณ 20 mL จึงทิ้งไว้ให้เย็น ปรับปริมาตรน้ำด้วยน้ำกลั่น 25 mL นำตัวอย่างน้ำไปตรวจสอบปริมาณธาตุโลหะ

**4. วิธีวิเคราะห์ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส โดยวิธี ascorbic acid method**

**การเตรียมสารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส**

1. Sulfuric acid solution 5.0 N

เจือจางกรดซัลฟิวริกเข้มข้น จำนวน 70 mL ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 mL เก็บในขวดแก้วสีชา

2. Potassium antimonyl tartrate solution

ละลาย potassium antimonyl tartrate ($K(SbO)C_4H_4O_6.1/2H_2O$) จำนวน 1.3715 กรัม (g) ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 mL เก็บในขวดแก้วสีชา ถ้าสารนี้ยังใสอยู่ก็ใช้ไปเรื่อย ๆ

3. Ammonium molybdate solution

ละลาย ammonium molybdate ($(NH_4)_6Mo7O_{24}.4H_2O$) จำนวน 20 กรัม ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 500 mL เก็บในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ้าสารนี้ยังใสอยู่สามารถใช้ไปเรื่อย ๆ

4. Ascorbic acid 0.01 M

ละลาย ascorbic acid จำนวน 1.76 กรัม ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL เก็บในขวดพลาสติกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารนี้อยู่ได้ประมาณ 1 สัปดาห์

5. Standard phosphate solution

ละลาย $KH_2PO_4$ จำนวน 0.2195 กรัม ด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 100 mL สารละลายนี้จะมีความเข้มข้นของ $PO_4^{3-}$-P 500 มิลลิกรัม/ลิตร (mg/L)

Prince of Songkla University Pattani Campus

**การเตรียม standard curve**

นำ standard phosphate solution (500 mg/L) มาจำนวน 2.00 mL ใส่ไว้ใน volumetric flask ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1,000 mL จะได้สารละลายที่มีความเข้มข้นของ $PO_4^{3-}$-P 1.00 mg/L แล้ว เตรียมสารละลายเพื่อทำ standard curve ตามความเข้มข้น (ใช้ volumetric pipet ในการดูดสาร)

**ตารางผนวกที่ 2** สารละลายเพื่อทำ standard curve ตามความเข้มข้น

| Phosphate-Phosphorous (mg/L) | จำนวน mL ของ 1.00 mg/L $PO_4^{3-}$-P ที่ pipet มาแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 100 mL |
|---|---|
| 0.00 | 0.00 |
| 0.02 | 2.00 |
| 0.04 | 4.00 |
| 0.06 | 6.00 |
| 0.08 | 8.00 |
| 0.10 | 10.00 |
| 0.15 | 15.00 |
| 0.20 | 20.00 |

**วิธีการวิเคราะห์ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส**

เตรียม combined reagent ผสม sulfuric acid solution 5.0 N จำนวน 50 mL+potassium antimonyl tartrate solution จำนวน 5 mL+ammonium molybdate solution จำนวน 15 mL+ascorbic acid solution จำนวน 30 mL โดยปรับอุณหภูมิของสารเคมีแต่ละอย่างให้เท่าอุณหภูมิห้องเสียก่อน และผสมเรียงตามลำดับ เมื่อเติมสารตัวหนึ่งลงไปให้ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสารตัวใหม่ลงไป ถ้าเกิดความขุ่นให้ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที ให้ความขุ่นหายไปแล้วผสมต่อตวงน้ำตัวอย่างจำนวน 50.0 mL ใส่ใน Erlenmeyer flask ขนาด 125 mL หยด phenolphthalein 1 หยด ถ้ามีสีแดงให้หยด 5.0 N sulfuric acid จนไม่มีสีแล้วเติม combined reagent 8.0 mL ผสมให้เข้ากันทิ้งไว้ 10 นาที วัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น SHIMADZU UV–160A ที่ความยาวคลื่น 880 นาโนเมตร แต่อย่าทิ้งไว้นานเกิน 30 นาที

Prince of Songkla University Pattani Campus

**5. วิธีการวิเคราะห์ไนเตรท-ไนโตรเจน**

ตวงตัวอย่างน้ำ 90 mL (ถ้า pH ของน้ำตัวอย่างมากกว่า 9 ให้ปรับลงมาโดยใช้ 5 เปอร์เซ็นต์ HCl ให้ pH อยู่ระหว่าง 8-9) ใส่ลงใน erlenmeyer flask ขนาด 125 mL แล้วเติมแอมโมเนียมคลอไรด์เข้มข้น ($NH_4Cl$) 2.0 mL ผสมให้เข้ากัน เทลงในคอลัมน์ ปล่อยให้ไหลในอัตรา 5-8 มิลลิลิตร/นาที ใช้กระบอกตวงขนาด 50 mL รองน้ำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ออกมา ทิ้งน้ำตัวอย่าง 25-30 mL ครั้งแรกที่ผ่านคอลัมน์ เก็บน้ำตัวอย่างที่ผ่านคอลัมน์ 50 mL ไปวิเคราะห์หลังจากผ่าน reduction column แล้วไม่เกิน 15 นาที นำตัวอย่างน้ำปริมาตร 50 mL เติม sulfanilamide จำนวน 1.0 mL ผสมทิ้งไว้ 2 นาที แต่ไม่เกิน 8 นาที แล้วเติม N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride solution จำนวน 1.0 mL ผสมทิ้งไว้อย่างน้อย 10 นาที แต่ไม่เกิน 2 ชั่วโมง วัดค่า absorbance ด้วยเครื่อง spectrophotometer รุ่น SHIMADZU UV – 160 A ที่ความยาวคลื่น 543 นาโนเมตร

**6. วัดความเป็นกรด–ด่าง** ด้วย pH meter model HI 98107 โดยนำน้ำที่เก็บแต่ละบ่อมาวัดความเป็นกรด-ด่างโดยนำ pH meter มาจุ่มในน้ำตัวอย่างที่อุณหภูมิห้อง ทุกสัปดาห์

**7. วิธีวัดความเค็ม**ด้วย refracto-salinometer วัดทุก ๆ สัปดาห์น้ำ

**8. วิธีวัดอุณหภูมิน้ำและอากาศ**ด้วย alcohol thermometerวัดทุก ๆ สัปดาห์เวลา 12.30 นาที

**ตารางผนวกที่ 3** สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *U.intestinalis*

| | **การศึกษาสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการสืบพันธุ์** | | |
|---|---|---|---|
| | **สิ่งแวดล้อม** | **แบบอาศัยเพศ** | **แบบไม่อาศัยเพศ** |
| สภาพแวดล้อม | อัลคาไลด์ | / | - |
| | ฟอสเฟต-ฟอสฟอรัส | / | - |
| | ไนเตรท-ไนโตรเจน | / | - |
| | ความกระด้าง | - | / |
| | pH | - | - |
| | ความเค็ม | - | / |
| | อุณหภูมิอากาศ | - | - |
| | อุณหภูมิน้ำ | - | - |
| | ความเข้มแสง | / | - |
| | ความยาวท่อนพันธุ์ | / | - |
| ธาตุในแหล่งน้ำ | Mn | / | - |
| | Cr | / | - |
| | Cu | - | - |
| | Fe | - | - |
| | Zn | - | - |
| | Ca | - | - |

Prince of Songkla University Pattani Campus

| การศึกษาสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ | | | |
|---|---|---|---|
| | **สิ่งแวดล้อม** | **แบบอาศัยเพศ** | **แบบไม่อาศัยเพศ** |
| ธาตุในสาหร่าย | Mn | - | - |
| | Cr | - | - |
| | Cu | - | - |
| | Fe | - | - |
| | Zn | - | - |
| | Ca | - | / |

**ตารางผนวกที่ 4** การศึกษาสภาวะแวดล้อมต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis*

| Factor | Level | Day of maturation | % maturation |
|---|---|---|---|
| ความเค็ม (ppt) | 10 | 6 | 100 |
| | 15 | 4 | 100 |
| | 20 | 4 | 100 |
| | 25 | 4 | 100 |
| | 30 | 4 | 100 |
| การผึ่งแห้ง (ชั่วโมง) | 0 | 4 | 100 |
| | 1 | 4 | 100 |
| | 2 | 4 | 100 |
| | 3 | 0 | 0 |
| ขนาดท่อนพันธุ์ (cm) | 0.5 | 4 | 100 |
| | 1.0 | 4 | 100 |
| | 1.5 | 6 | 100 |
| | 2.0 | 4 | 100 |
| | 3.0 | 6 | 100 |
| อุณหภูมิ (°C) | 25 | 4 | 100 |
| | 30 | 14 | 87 |
| | 35 | 0 | 0 |
| การเพิ่มปริมาณแคลเซียม (mg/L) | 12 | 4 | 100 |
| | 18 | 4 | 100 |
| | 0 | 4 | 100 |
| | 6 | 2 | 100 |

Prince of Songkla University Pattani Campus

**ตารางผนวกที่ 5** การศึกษาวิธีการกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis*

| Factor | Level | Day of spore release | Number of spore release ($x10^6 \pm SE\ x10^6$ สปอร์/กรัมน้ำหนักสด ) |
|---|---|---|---|
| ระดับความเค็ม (ppt) | 5 | 4 | 4.02±0.27[a] |
| | 10 | 4 | 7.10±3.39[a] |
| | 15 | 4 | 4.42±0.31[a] |
| | 20 | 4 | 3.55±0.43[a] |
| | 25 | 4 | 12.16±0.37[a] |
| ความเข้มแสง (µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$) | 20 | 4 | 10.10±0.24[a] |
| | 80 | 8 | 6.79±0.94[a] |
| | 100 | 4 | 3.79±1.40[a] |
| | 150 | 6 | 7.42±1.20[a] |
| การผึ่งแห้ง (ชั่วโมง) | 0 | 8 | 9.05±1.50[a] |
| | 1 | 8 | 9.76±1.01[a] |
| | 2 | 8 | 4.33±0.75[a] |
| | 3 | 8 | 5.34±1.26[a] |

**ตารางผนวกที่ 6** การศึกษาพฤติกรรมการลงเกาะของสปอร์สาหร่ายไส้ไก่ *U .intestinalis*

| **ตำแหน่ง** | **วัสดุ** | | |
|---|---|---|---|
| | **เชือก** | **พลาสติก** | **อวน** |
| จำนวนสปอร์เกาะ | ดีมาก | ปานกลาง | ดี |
| บน | ดีมาก | ปานกลาง | น้อย |
| กลาง | น้อย | น้อย | น้อย |
| ล่าง | ปานกลาง | น้อย | น้อย |

หมายเหตุ 1-25 น้อย 26-50 ปานกลาง
51-75 ดี 76-100 ดีมาก

Prince of Songkla University Pattani Campus

## การเผยแพร่ผลการวิจัย

บทความวารสาร (Journal) จากการเผยแพร่ผลงานวิทยานิพนธ์แบบบรรยายในการประชุมวิชาการเกษตร ครั้งที่ 16 คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น ระหว่างวันที่ 26 เดือน มกราคม พ.ศ. 2558 ถึงวันที่ 27 เดือน มกราคม พ.ศ. 2558

Prince of Songkla University
Pattani Campus

แก่นเกษตร 43 ฉบับพิเศษ 1 : (2558). KHON KAEN AGR. J. 43 SUPPL. 1 : (2015).

# การเหนี่ยวนำการสร้างอับซูโอสปอร์ของสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* Linnaeus (Chlorophyta) ในห้องปฏิบัติการ

# Induction of Zoosporangial Formation of Gut Weed, *Ulva intestinalis* Linnaeus (Chlorophyta) in Laboratory

อาริณี มูน๊ะ[1], ระพีพร เรืองช่วย[1*] และ โชคชัย เหลืองธุวปราณีต[1]

Arinee Muna[1], Rapeeporn Ruangchuay[1*] and Chokchai Lueangthuvapranit[1]

**บทคัดย่อ**: การเหนี่ยวนำการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในสาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* ในห้องปฏิบัติการ เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับใช้ในขยายพันธุ์ได้อย่างต่อเนื่อง ใช้ปัจจัยกระตุ้น 3 ปัจจัย ประกอบด้วย 1) ขนาดความยาวท่อนพันธุ์ 5 ระดับ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 ซม. 2) อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 25, 30 และ 35°C และ 3) การเติมสารแคลเซียม จากคลอไรด์ 4 ระดับ คือ 0, 6, 12 และ 18 มก./ล. เซลล์สืบพันธุ์ที่สร้าง คือ อับซูโอสปอร์ พบว่ามีจำนวนโพรโทพลาสต์ 13±3 อัน/เซลล์ โดยความยาวท่อนพันธุ์ 0.5-3.0 ซม. ไม่มีผลต่อการสร้างอับซูโอสปอร์ โดยสร้างได้ร้อยละ 98±4-100±0 ในเวลา 4 วัน ส่วนอุณหภูมิ 25°C ทำให้เกิดการเหนี่ยวนำสร้างอับซูโอสปอร์ ได้มากที่สุด คือ ร้อยละ 100±0 ในวันที่ 4 สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับอุณหภูมิอื่น ส่วนการเพิ่มสาร $CaCl_2$ 6 และ 18 มก./ล. ส่งผลให้มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มากที่สุดร้อยละ 100±0 ในวันที่ 2 ใกล้เคียงกับการเติม $CaCl_2$ 12 มก./ล ดังนั้น การตัดสาหร่ายเป็นชิ้นส่วนขนาด 0.5-3.0 ซม. การเลี้ยงชิ้นส่วนสาหร่ายที่ 25°C และการเพิ่มสาร $CaCl_2$ 6-18 มก./ล. ลงในน้ำเลี้ยงจะช่วยเหนี่ยวนำให้สาหร่ายไส้ไก่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ภายใน 2 วัน

**คำสำคัญ** สาหร่ายไส้ไก่, *Ulva intestinalis*, อับซูโอสปอร์

**ABSTRACT**: Induction of zoosporangial formation in *Ulva intestinalis* [by using the environmental factor] in laboratory condition was aimed to obtain the beneficial information for the continuous culture. Three factors including: 1) fragment length, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 and 3.0 cm; 2) temperature 25, 30 and 35°C; and 3) calcium chloride ($CaCl_2$) 0, 6, 12 and 18 mg/L. The results found only zoosporangia. Each cell contained of sporangial protoplasts 13±3 individuals. The fragment length, 0.5-3.0 cm long, were not significantly different on sporangia formation ($p>0.05$). Every fragment lengths were induced zoosporangia 98±4-100±0% in 4 days. At 25°C the fragments were produced sporangia 100±0 % within 4 days and showed significantly affect with those of the remained temperatures. The enriched of $CaCl_2$ at 6 and 18 mg/L inducted 100±0% zoosporangia in 2 days and which similar to 12 mg/L. $CaCl_2$ Inconclusion cutting of the thallus length into 0.5-3.0 cm and cultured at 25°C were induced zoosporangia in 4 days while adding 6-18 mg/L $CaCl_2$ induced zoosporangia within 2 days.

**Keywords**: Gut weed, *Ulva intestinalis*, zoosporangia

[1] แผนกวิชาเทคโนโลยีการประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ.ปัตตานี 94000
Division of Fishery Technology, Faculty of Science and Technology, Prince of Songkla University, Pattani Province 94000

* Corresponding author: rrapee@bunga.pn.psu.ac.th

## บทนำ

สาหร่ายไส้ไก่ *Ulva intestinalis* ซึ่งอาจรู้จักในชื่อเดิมว่า *Enteromorpha intestinalis* เป็นสาหร่ายทะเลสีเขียว ในดิวิชัน Chlorophyta มีแทลลัสเป็นหลอดกลวง หงิกงอ หรือเป็นลอน และย่นเหมือนไส้ไก่ แตกแขนงได้ อยู่เป็นกลุ่มหรือเป็นสาย (ยุวดี, 2549) มีลักษณะอ่อนนุ่มและมีวงจรชีวิตสั้น (Reine and Trono, 2001) พบได้ทั่วไปตามบริเวณแหล่งน้ำกร่อย ปากแม่น้ำ ขึ้นบนพื้นโคลนหรือบนก้อนหิน ในบริเวณที่มีธาตุอาหารสูง (Algaebase, 2014) มีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมในช่วงกว้าง (Kamer and Fong, 2000) ) เนื่องจากสาหร่าย ในสกุล *Ulva* มีวิตามิน เกลือแร่ โปรตีนสูง ช่วยกระตุ้นกระตุ้นภูมิคุ้มกันโรค ประเทศในแถบเอเชียจึงมีการนำสาหร่ายมาใช้ประโยชน์ต่างๆ เช่น ประเทศญี่ปุ่นและจีน ใช้เป็นพืชผักสมุนไพร โดยนำมาบดเป็นผง ใช้โรยหน้าอาหารต่าง ๆ (Critchley and Ohno, 1998) ในประเทศฟิลิปปินส์นำมาเป็นอาหารปลานวลจันทร์ทะเล *Chanos chanos* (Reine and Trono, 2001) นอกจากนี้ ยังนำสารสกัดจากสาหร่ายกลุ่มนี้มาเป็นส่วนผสมของเครื่องสำอาง แชมพู และ โลชั่น เนื่องจากมีสารต้านจุลชีพอยู่ด้วย (Adey and Purgason, 1998; Briand 1995; Briand et al. 2005; Hasebe and Yamad, 2004)

สำหรับในประเทศไทยได้นำสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* มาใช้ประโยชน์ในการเลี้ยงกุ้งกุลาดำ พบว่าสาหร่ายไส้ไก่สามารถดูดซับแอมโมเนีย ไนไตรท์ และฟอสฟอรัสในบ่อกุ้ง เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต และบ่อเลี้ยงที่มีสาหร่ายไส้ไก่จะมีปริมาณสัตว์หน้าดินมาก จึงเป็นแหล่งสร้างอาหารจากธรรมชาติให้กับกุ้งกุลาดำในบ่อดินตั้งแต่ระยะเริ่มต้นเลี้ยง ซึ่งช่วยลดต้นทุนค่าอาหารกุ้งได้ในช่วงเวลาการเลี้ยง 2 เดือนแรก (จริยาวดี และคณะ, 2550) นอกจากนี้ยังทำให้ระบบการเลี้ยงปลอดจากสารเคมี ซึ่งมีผลดีต่อผู้บริโภค จากการใช้ประโยชน์ดังกล่าวทำให้มีความพยายามในการขยายพันธุ์และเพาะเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่กันมากขึ้น แต่ยังไม่พบรูปแบบการเพาะเลี้ยงสาหร่ายไส้ไก่ได้อย่างต่อเนื่องที่จะได้ต้นอ่อนมากพอซึ่งนำไปใช้เลี้ยงในบ่อดินได้ ดังนั้นการเหนี่ยวนำการสืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่โดยใช้ปัจจัยเด่นต่างๆ ได้แก่ ปัจจัยทางชีวภาพ คือ ขนาดของท่อนพันธุ์ ปัจจัยทาง ฟิสิกส์ ได้แก่ อุณหภูมิ และ ปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ปริมาณสารแคลเซียม ที่จะทำให้การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* ได้ในเวลาที่รวดเร็วขึ้น เพื่อจะนำไปใช้ในการเลี้ยงได้ต่อไป

## วิธีการศึกษา

### 1. การเตรียมท่อนพันธุ์

แทลลัสสาหร่าย *U. intestinalis* เก็บจากฟาร์มสาหร่ายที่เลี้ยงในบ่อซีเมนต์ บริเวณมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ นำมาคัดเลือกต้นพันธุ์ที่สมบูรณ์ จัดสิ่งปนเปื้อนต่างๆ แล้วนำตัวอย่างมาล้างหลายครั้งด้วยน้ำทะเลที่ระดับความเค็มเดียวกันจากสภาพแวดล้อมที่เก็บ และตรวจสอบการลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยเลือกแทลลัสที่ยังไม่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ นำมาเหนี่ยวนำด้วยวิธีต่าง ๆ

### 2. การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

#### 2.1 ขนาดของท่อนพันธุ์ที่แตกต่างกัน

ตัดแทลลัสสาหร่าย *U. intestinalis* ที่ความยาวแตกต่างกัน 5 ขนาด ได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 3.0 ซม. ชั่งน้ำหนักรวม 0.5 ก. ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ โดยใช้น้ำความเค็ม 25 ppt เติมอาหาร สูตร Modified Gillard'S Medium (MGM) (Guillard, 1975) ภายใต้อุณหภูมิ 25±2°C ที่ความเข้มแสง 60 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ การให้แสง:มืด เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ทำตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 2 วัน และนำผลที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

#### 2.2 ระดับอุณหภูมิที่แตกต่างกัน

นำแทลลัสที่ยังไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาตัด

ให้ได้ขนาด 3 ซม. (โดยใช้เงื่อนไขที่เหมาะสมที่ได้ศึกษาจากข้อ 2.1) ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ ที่มีน้ำความเค็ม 25 ppt และ สูตรอาหาร MGM ทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ เลี้ยงในอ่างควบอุณหภูมิที่ระดับ ต่างกัน 25, 30 และ 35 °C การให้แสง: มืด 12:12 ชั่วโมง ทำการนับตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก 2 วันและนำผลที่ได้ไปใช้ในการทดลองต่อไป

**2.3 การเพิ่มสารแคลเซียมจาก $CaCl_2$ ในปริมาณที่แตกต่างกัน**

เพิ่มสารแคลเซียมจาก $CaCl_2$ ในปริมาณ 0, 6, 12 และ 18 มก./ล. โดยนำแทลลัสที่ยังไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มา ตัดแทลลัสให้ยาว 3 ซม ใส่ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ซึ่งมีขาต่อพิเศษเพื่อให้อากาศ ความเค็ม 25 ppt ใช้สูตรอาหาร MGM เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เลี้ยงที่ระดับความเข้มแสง 60 µmol $m^{-2}s^{-1}$ การให้แสง: มืด 12:12 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใต้กล้องจุลทรรศน์ทุก ๆ 2 วัน

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

คำนวณหาร้อยละของท่อนพันธุ์ที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ และหาความแตกต่างของทางสถิติ แบบ One-way ANOVA และ เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยเป็นคู่แบบ Tukey HSD[a] (Steel and Torrie, 1980)

## ผลการศึกษา

**1. พฤติกรรมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่** *U. intestinalis*

แทลลัสสาหร่ายที่นำมากระตุ้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีความยาวเฉลี่ย 9.2±3.8 ซม. และความกว้างเฉลี่ย 1.8±0.8 มม.คุณภาพน้ำในบ่อที่เก็บสาหร่าย มีอุณหภูมิ 27±5°C ความเค็ม 16±5 ppt ปริมาณฟอสเฟตอยู่ในช่วง 0.76±0.22 มก./ล. ปริมาณไนเตรท 0.48±0.37 มก./ล. ค่าความเข้มแสง 1,126±113 µmol $m^{-2}$ $s^{-1}$ pH 7.8±0.2 ความกระด้าง 2,586±50 มก./ล. และ ความเป็นด่าง 132±7 มก./ล. เซลล์สาหร่ายก่อนสร้างเซลล์สืบพันธุ์ มีรูปร่างหลายเหลี่ยม ขนาด 15±3x19±3 µm มีคลอโรพลาสต์อยู่บริเวณขอบเซลล์ ในเซลล์มีไพรีนอยด์ 2±1 อัน เมื่อมีการเหนี่ยวนำด้วยปัจจัยสภาพแวดล้อมต่างๆ พบว่า การสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบทั่วไปบนผิวชิ้นส่วนของสาหร่ายไส้ไก่ที่นำมากระตุ้น โดยเฉพาะบริเวณปลายเซลล์ที่มีรอยตัด โดยเซลล์สืบพันธุ์ที่สร้างเป็นแบบไม่อาศัยเพศ คือ อับซูโอสปอร์ (zoosporangium) ภายในมีการแบ่งตัวของโพรโทพลาสต์ (protoplast) มีจำนวน 13±3 อัน/เซลล์ ขนาดของ โพรโทพลาสต์ภายในเซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 7±1 µm (Figure 1)

**2. ปัจจัยต่าง ๆที่มีผลต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่** *Ulva intestinalis*

2.1 ผลของขนาดท่อนพันธุ์ต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

จากการศึกษา พบว่าท่อนพันธุ์สาหร่ายที่ความยาว 0.5–3.0 ซม. มีการสร้างเซลล์แบบสืบพันธุ์ แบบ อับซูโอสปอร์ได้จำนวนร้อยละ 98±4-100±0 ในวันที่ 4 ของการเหนี่ยวนำโดยที่ทุกขนาดของท่อนพันธุ์ พบร้อยละของท่อนพันธุ์ที่สร้างอับซูโอสปอร์ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) อย่างไรก็ตามในวันที่ 2 ของการเลี้ยง พบว่าที่ความยาวของท่อนพันธุ์ 3 ซม. พบจำนวนท่อนพันธุ์ที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์มากที่สุด คือร้อยละ 90±3 จึงใช้ขนาดของท่อนพันธุ์ที่ 3 ซม. (Table 1)

2.2 ผลการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมิระดับแตกต่างกันต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

จากการศึกษาพบว่า ในวันที่ 4 ที่อุณหภูมิ 25 ท่อนพันธุ์ของสาหร่ายไส้ไก่สามารถสร้างอับซูโอสปอร์ได้ร้อยละ 100±0 โดยมีความแตกต่างทางสถิติ ($p<0.05$) กับที่อุณหภูมิ 30°C ซึ่งสร้างอับซูโอสปอร์ได้เพียงร้อยละ 12±8 ขณะที่อุณหภูมิ 35°C ไม่พบการสร้างระหว่างอับซูโอสปอร์และท่อนพันธุ์ตายในวันที่ 6 (Table 1)

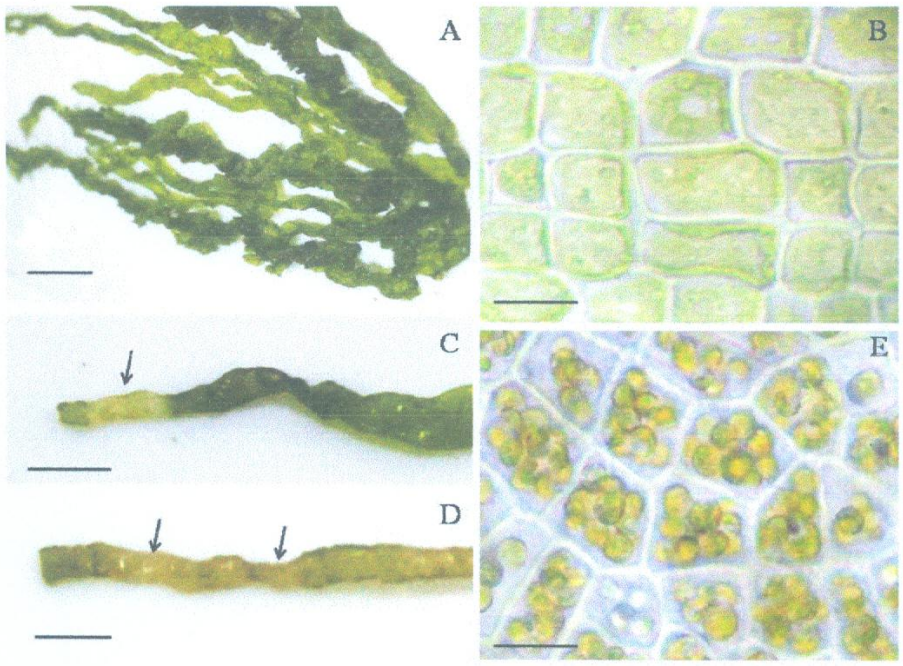


**Figure 1** Characteristics of *Ulva intestinalis*: A. Immature thalli, scale bar= 2 mm; B. Surface cells, scale bar= 20 μm; C. Formation of reproductive cell at the end of fragment (arrow point), scale bar= 2 mm; D. Formation of reproductive cell at the inner part of fragment (arrow point), scale bar= 2 mm and D. Zoosporangia, scale bar= 20 μm

**Table 1** Stimulating factors on percentage reproductive formation (n=90) in *Ulva intestinalis*

| Factors | Level | Percentage of the formation (mean±sd) at 2nd and 4th day | | Type of Reproductive cell | Incubated conditions |
|---|---|---|---|---|---|
| | | 2nd | 4th | | |
| 1. Fragment length (cm) | 0.5 | 86±10[a] | 100±0[a] | zoosporangia | Temperature 25°C, light intensity 60 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$, light:dark 12:12 hrs and salinity 25 ppt |
| | 1.0 | 80±14[a] | 100±0[a] | zoosporangia | |
| | 1.5 | 69±10[a] | 99±1[a] | zoosporangia | |
| | 2.0 | 61±15[a] | 100±0[a] | zoosporangia | |
| | 3.0* | 90±3[a] | 98±4[a] | zoosporangia | |
| 2. Temperature (°C) | 25* | 61±16[b] | 100±0[c] | zoosporangia | Fragment 3 cm, light intensity 60 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$, light:dark 12:12hrs and salinity 25 ppt |
| | 30 | 10±7[a] | 12±8[b] | zoosporangia | |
| | 35 | 0±0[a] | 0±0[a] | - | |
| 3. Enrichment concentration of $CaCl_2$ (mg/L) | 0 | 88±3[a] | 100±0[a] | zoosporangia | Fragment 3 cm, temperature 25°C, light intensity 60 μmol $m^{-2}$ $s^{-1}$, light:dark 12:12 hrs and salinity 25 ppt |
| | 6 | 100±0[b] | 100±0[a] | zoosporangia | |
| | 12 | 96±5[b] | 100±0[a] | zoosporangia | |
| | 18 | 97±6[b] | 100±0[a] | zoosporangia | |

Different alphabets in colomn of each factor show significant ($p<0.05$)

*The selected condition for the next experiment

**2.3 ผลของการเพิ่มสารแคลเซียมจาก $CaCl_2$ ต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์**

การเพิ่มสาร $CaCl_2$ สามารถกระตุ้นให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบอับซูโอสปอร์ โดยที่การเพิ่มสารแคลเซียม 6 มก./ล. สามารถสร้างอับซูโอสปอร์ ได้มากและเร็วที่สุดคือร้อยละ100±0 ในวันที่ 2 รองลงมาคือการเพิ่มสารแคลเซียม 18 และ12 มก./ล. สามารถสร้างอับซูโอสปอร์ ได้ร้อยละ 97±6 และ 96±5 ในวันที่ 2 เช่นกัน โดยที่ระดับการเติม $CaCl_2$ 6, 12 และ 18 มก./ล. พบว่ามีร้อยละสร้างอับซูโอสปอร์ในวันที่ 2 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p>0.05$) แต่มีความแตกต่างจากที่ไม่ได้เติมสาร $CaCl_2$ (Table 1)

## วิจารณ์

เมื่อนำแทลลัสของสาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* มีความยาวเฉลี่ย 9.2±3.8 ซม. มาเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยตัดแทลลัสให้มีขนาดเล็กลง ให้ท่อนพันธุ์ยาว 0.5-3.0 ซม. สามารถสร้างอับซูโอสปอร์ได้เกือบร้อยละ 100 ภายในวันที่ 4 ของการเหนี่ยวนำ โดยคล้ายคลึงกับสาหร่ายในกลุ่มเดียวกัน ดังการรายงานของ Lin et al. (2008) ซึ่งกล่าวว่า การตัดสาหร่าย *Enteromorpha prolifera* เป็นชิ้นเล็กสามารถเหนี่ยวนำให้สร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ อย่างไรก็ตามเมื่อตัดสาหร่ายไส้ไก่เป็นชิ้นส่วนขนาดเล็กลง มีแนวโน้มทำให้สาหร่ายสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้มากขึ้น ส่วนการเหนี่ยวนำด้วยอุณหภูมินั้น พบว่าที่ 25°C มีความเหมาะสมกับการเหนี่ยวนำให้มีการสร้างอับซูโอสปอร์ ซึ่งเป็นไปในทำนองเดียวกับ Mantri et al. (2011)รายงานว่าปัจจัยร่วมระหว่าง อุณหภูมิ 25 °C และความเค็ม 15 psu (=15ppt) เป็นสภาวะเหนี่ยวนำที่เหมาะสมสำหรับสาหร่าย *Ulva fasciata* ให้สร้างซูโอสปอร์ (zoospore) แม้ว่าในบริเวณที่เก็บสาหร่าย *U. intestinalis* ครั้งนี้มีอุณหภูมิ 27±5°C แต่การเพิ่มอุณหภูมิทำให้สาหร่ายสร้างอับซูโอสปอร์ได้น้อยกว่าการลดอุณหภูมิ ส่วนการเพิ่มสาร $CaCl_2$ ปริมาณ 6-18 มก./ล. สามารถเหนี่ยวนำให้มีการสร้างอับซูโอสปอร์ ได้เร็วยิ่งขึ้น เนื่องจาก $Ca^{2+}$ เป็นองค์ประกอบในโครงสร้างและการทำงานที่สำคัญของเซลล์พืช มีบทบาทในการสร้างผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ (Volotovski, 2011) ซึ่งมีความจำเป็นต่อพืชที่มีคลอโรฟิลล์ทุกชนิด โดยมีความสำคัญในการแบ่งเซลล์ และการแพร่พันธุ์ (พรพิมล, 2552) ดังนั้นเมื่อมีการเพิ่มสาร $CaCl_2$ ลงในน้ำเลี้ยง ทำให้สาหร่ายแบ่งโพรโทพลาสต์ได้เร็วขึ้น ทำให้สาหร่าย *U. intestinalis* สร้าง อับซูโอสปอร์ ภายในเวลา 2 วัน ทั้งนี้ จากการใช้ปัจจัยต่างๆ ในการกระตุ้น *U. intestinalis* สร้างอับซูโอสปอร์ได้ครั้งนี้ภายในเวลา 2-4 วัน ซึ่งระยะเวลาสอดคล้องกับรายงานของ Dan et al. (2002) ที่เลี้ยงชิ้นส่วนของสาหร่าย *E. prolifera* ซึ่งตัดเป็นชิ้นส่วนรูปกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 4.2 มม. ที่ระดับความเค็ม 5-52 psu (=5-52 ppt) ทำให้มีการสืบพันธุ์ได้มากกว่าร้อยละ 70 ของชิ้นส่วนทั้งหมดในเวลา 4-5 วัน และจากการกระตุ้นให้ในสาหร่ายมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ห้องปฏิบัติการครั้งนี้ พบเพียงอับซูโอสปอร์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Lin et al. (2008) พบว่า *E. prolifera* ในห้องปฏิบัติการพบสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพียงเฉพาะแบบอับซูโอสปอร์ ซึ่งเป็นการสืบพันธุ์ที่ไม่มีเพศ สามารถปล่อยซูโอสปอร์ (zoospore) ที่จะเจริญเป็นต้นใหม่ได้โดยตรง แม้ว่า ในทัลลัสที่สมบูรณ์สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ สองแบบได้ในท่อนเดียวกัน คือ อับเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศ (gametangium) และ อับซูโอสปอร์ (Reine and Trono, 2001) แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบเฉพาะ อับซูโอสปอร์เท่านั้น อาจเนื่องมาจากสภาพแวดล้อมที่ใช้เหนี่ยวนำดังกล่าวไม่เหมาะสมต่อการสร้างอับเซลล์สืบพันธุ์แบบมีเพศ หรืออาจเป็นเพราะท่อนพันธุ์ไม่สมบูรณ์พร้อม

## สรุป

การกระตุ้นให้สาหร่ายไส้ไก่ *U. intestinalis* สร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในห้องปฏิบัติการ ควรตัดท่อนพันธุ์ให้มีขนาดเล็ก 0.5-3 ซม. เลี้ยงที่ระดับอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 60 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ ระยะเวลาที่ได้รับแสง:มืด เท่ากับ 12:12 ชั่วโมง ที่ระดับความเค็ม

25 ppt สูตรอาหาร MGM ทำให้ท่อนพันธุ์สาหร่ายไส้ไก่สร้างอับซูโอสปอร์ได้เกือบทั้งหมดภายในเวลา 4 วัน และการเพิ่มสาร $CaCl_2$ อย่างน้อย 6 mg/L ลงในน้ำเลี้ยงจะช่วยกระตุ้นให้เกิดอับซูโอสปอร์ได้เร็วขึ้นภายใน 2 วัน

## เอกสารอ้างอิง


จริยาวดี สุริยพันธุ์, ขัชรี แก้วสุรลิขิต, ชนัดดา เกตุมา, ชลอ ลิ้มสุวรรณ, นิติ ชูเชิด, สาธิต ประเสริฐ, เดชานาท ทองพิทักษ์, และ ประยูร หงส์รัตน์. 2550. ผลของสาหร่ายไส้ไก่ (*Ulva intestinalis* Linnaeus) ต่อสัตว์หน้าดินในบ่อเลี้ยงกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon* Fabricius). http://tdc.thailis.or.th/tdc/basic.php. ค้นเมื่อ 28 มิถุนายน 2557.

พรพิมล สุริยภัทร. 2552. หน้าที่และอาการขาดธาตุอาหารสำคัญ. http//www.agri.ubu.ac..th/~ponpimon/1202320. ค้นเมื่อ 2 พฤศจิกายน 2557.

ยุวดี พีรพรพิศาล. 2549. สาหร่ายวิทยา (Phycology). ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์.มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Adey, W. H. and R. Purgason. 1998. Animal Feedstock Comprising Harvested Algal Turf and a Method of Preparing. United States Patent No. US 1998/5715774, Feb 10, 1998.

Algaebase. 2014. Ulva Linnaeus, 1753: 1163. http://www.algaebase.org/search/genus/detail, Accessed Aug. 25, 2014.

Briand, X. 1995. Utilization of algae extract for the preparation of pharmaceutical, cosmetic. United States Patent No. US 5508033/1996, Feb 14, 1996.

Briand, X., C. Stephanie, B. Dumas, T .M. Esquerre-Tugayeand, S. Salamagne. 2005. Use of Ulvans as Elicitors of Mechanisms for Nitrogen Absorption and Protein. United States Patent No. US 2005/0127695 A1, Mar 30, 2005.

Critchley, A.T. and M. Ohno, 1998. SEAWEED RESOURCES OF THE WORLD. Japan International Cooperation Agency, Yokosuka, Japan.

Dan, A., M. Hiraoka., M. Ohno. and T. Critchley. 2002. Observations on the effect of salinity and photon effluent rate on the induction of sporulation and rhizoid formation in the green alga *Enteromorpha prolifera* (Muller) J.Agardh (Chlorophyta, Ulvales). Journal of Fisheries science. 68:1182-1188

Hasebe, K. and K. Yamada. 2004. Hair treatment composition and hair cosmetic for damaged hair. United States Patent No. US2004/0165636 A1, Mar 3, 2004.

Kamer, K. and P. Fong. 2000. A fluctuating salinity regime mitigates the negative effects of reduced salinity on the estuarine microalga, *Enteromorpha intestinalis*. J. Exp. Mar. Biol. Ecol. 254:53-69.

Lin, A., C. Shen, J. Wang, and B. Yan. 2008. Reproduction Diversity of *Enteromorpha prolifera*. J. Integr. Plant Biol. 50:622–629.

Mantri, V.A., R.P. Singh, A.J. Bijo, P. Kumari, C. R. K. Reddy, and B. Jha. 2011. Differential response of varying salinity and temperature on zoospore induction, regeneration and daily growth rate in *Ulva fasciata* (Chlorophyta, Ulvales). J. Appl. Phycol. 23:243-250.

Reine, P.V. and Trono, G.C. 2001. PLANT RESOURCES OF ROUTH-EAST ASIA. Backhuys Publishers, Leiden.

Steel, R. G. D. and J.H. Torrid, 1980. PRINCIPLE AND PROCEDURES OF STATISTICS, 2nd ed. Mc Grawhill, New York

Volotovski, I. D. 2011. Role of calcium ions in photo signaling processes in a plant cell. Biophys. J. 56:778-788.