พัฒนาการทางวิทยาเนื้อเยื่อและฮีสโตเคมีของระบบย่อยอาหารใน ปลาดุกลำพันระยะวัยอ่อน

Histology and Histochemistry of the Development of the Digestive System in Nieuhofii's Walking Catfish Larvae, *Clarias nieuhofii* (Valencieness, 1840)

ทวีสิน แซ่ลี้

Taweesin Saelee

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Zoology
Prince of Songkla University
2554

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ พัฒนาการทางวิทยาเนื้อเยื่อและฮีสโตเคมีของระบบย่อยอาหารในปลาดุกลำพันระยะวัยอ่อน

ผู้เขียน นายทวีสิน แซ่ลี้

สาขาวิชา สัตววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(รองศาสตราจารย์ จินตมาศ สุวรรณจรัส)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(ดร.สุภฎา คีรีรัฐนิคม)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธำรงค์ อมรสกุล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ จินตมาศ สุวรรณจรัส)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ กรรณิกา ชัชวาลวานิช)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาสัตววิทยา

.....

(ศาสตราจารย์ ดร.อมรรัตน์ พงศ์ดารา)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ พัฒนาการทางวิทยาเนื้อเยื่อและฮีสโตเคมีของระบบย่อยอาหารในปลาดุกลำพันระยะวัยอ่อน

ผู้เขียน นายทวีสิน แซ่ลี้

สาขาวิชา สัตววิทยา

ปีการศึกษา 2554

บทคัดย่อ

ศึกษาพัฒนาการทางวิทยาเนื้อเยื่อและฮีสโตเคมีในระบบทางเดินอาหารของปลาดุกลำพัน, *Clarias nieuhofii* ระยะวัยอ่อนอายุ 0 - 46 วันหลังฟักออกเป็นตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าเมื่อแรกฟักท่อทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันเป็นท่อตรงบุด้วย Simple cuboidal epithelium และวางอยู่บนถุงไข่แดง (ปริมาตร 1.735 ± 0.691 ลบ.มม.) ซึ่งจะยุบหมดภายในวันที่ 7 หลังฟัก เมื่อลูกปลาอายุ 1.5 - 2.0 วันหลังฟัก ตับและตับอ่อนเริ่มปรากฏโดยตับจะเริ่มสะสมไกลโคเจนในวันที่ 2 หลังฟัก เมื่อลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟักท่อทางเดินอาหารมีการเปลี่ยนแปลงเป็น 5 ส่วน ได้แก่ ช่องปากและคอหอย หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น และลำไส้เล็กส่วนปลาย โดยในส่วนช่องปากมีการพัฒนาฟันคอหอยและตุ่มรับรส เมื่อลูกปลาอายุ 4 วันหลังฟัก หลอดอาหารเริ่มพัฒนาชั้นของกล้ามเนื้อลายและสามารถแยกหลอดอาหารเป็นสองส่วนซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่กระเพาะอาหารสามารถแบ่งเป็นส่วน Cardiac และ Pyloric ต่อมแกสทริคเริ่มพบในกระเพาะอาหารส่วน Cardiac ในลูกปลาอายุ 3.5 วันหลังฟัก และในเวลาเดียวกัน มีการพัฒนาวิลไลที่ลำไส้เล็กส่วนต้นในขณะที่มีการสร้าง Supranuclear vesicles ในลำไส้เล็กส่วนปลาย สารเมือกชนิดเป็นกรดพบทั้งใน Goblet cells ของลำไส้เล็กและในเซลล์เมือกของหลอดอาหารในลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟักแต่จะพบปริมาณมากขึ้นบริเวณเซลล์เมือกของหลอดอาหารส่วนหน้าเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น สำหรับสารเมือกชนิดเป็นกลางพบครั้งแรกที่เซลล์เมือกของหลอดอาหารส่วนหลังและกระเพาะอาหารในลูกปลาอายุ 4 วันหลังฟักและมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นตามอายุ จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ด้วยวิธีทางฮีสโตเคมีพบว่าเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสปรากฏการทำงานในถุงไข่แดงของลูกปลาระหว่างอายุ 0 - 7 วันหลังฟัก เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสเริ่มการทำงานตั้งแต่แรกฟักและพบการทำงานระดับสูงบริเวณ Striated border ของลำไส้เล็กในลูกปลาที่เริ่มกินอาหารจากภายนอกและมีการทำงานมากขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น เอนไซม์อะไมเลสมีการทำงานในลำไส้เล็กและตับอ่อนในลูกปลาอายุ 2 - 30 วันหลังฟักและไม่พบการทำงานในลำไส้เมื่อลูกปลาอายุ 30 วันเป็นต้นไป สำหรับเอนไซม์ไลเปสพบการทำงาน

ทั่วไปในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารแต่มีระดับการทำงานสูงขึ้นในตับอ่อนและลำไส้เล็กเมื่อลูกปลาเข้าสู่ระยะวัยรุ่น (ตั้งแต่ 20 วันหลังฟัก) นอกจากนี้ยังศึกษาพบว่าอายุของลูกปลาวัยอ่อน (0 - 46 วันหลังฟัก) มีความสัมพันธ์แบบเส้นตรง (Linear regression) ในเชิงบวกกับความยาวลำตัวทั้งหมด (Total length) ($R^2 = 0.993$) และมีความสัมพันธ์แบบเส้นตรงในเชิงลบ ($R^2 = 0.927$) กับปริมาตรถุงไข่แดง ผลการศึกษาดังกล่าวอาจใช้ในการคาดคะเนอายุของลูกปลาจากความยาวลำตัวทั้งหมดและปริมาตรถุงไข่แดงได้

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าลูกปลาดุกลำพันมีรูปแบบพัฒนาการของระบบทางเดินอาหารเช่นเดียวกับปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ๆ และมีระยะเวลาพัฒนาการคล้ายคลึงกับปลาในกลุ่มปลาดุก ลูกปลาดุกลำพันสามารถเริ่มกินอาหารจากภายนอกเมื่ออายุ 4 วันหลังฟักโดยเป็นช่วงเวลาที่ลูกปลามีท่อทางเดินอาหารที่สามารถทำงานได้ซึ่งจะมีการพัฒนาจนมีลักษณะสมบูรณ์อย่างรวดเร็วภายในวันที่ 7 หลังฟัก ลูกปลาดุกลำพันมีรูปแบบการทำงานของเอนไซม์คล้ายคลึงกับปลากระดูกแข็งชนิดอื่น ๆ ซึ่งมีระดับการทำงานที่ต่ำในระยะแรกและเพิ่มสูงขึ้นในช่วงเวลาการกินอาหารครั้งแรก ผลการวิจัยในครั้งนี้ถือเป็นความรู้พื้นฐานสำคัญสำหรับการพัฒนาสูตรอาหารและการอนุบาลปลาดุกชนิดนี้ให้ประสบผลสำเร็จต่อไป

Thesis Title	Histology and Histochemistry of the Development of the Digestive System in Nieuhofii's Walking Catfish Larvae, *Clarias nieuhofii* (Valencieness, 1840)
Author	Mr. Taweesin Saelee
Major Program	Zoology
Academic Year	2011

Abstract

The histological and histochemical development of the digestive system of Nieuhofii's walking catfish larvae, *Clarias nieuhofii* from hatching until 46 days after hatching (DAH) was described using light microscopy. At hatching, the digestive tract of *C. nieuhofii* was composed of a straight tube lining with the simple cuboildal epithelium and placed on the yolk sac (1.735 ± 0.691 mm^3, volume) that completely absorption by 7 DAH. During 1.5 - 2.0 DAH, the liver and the pancreas appeared, and glycogen accumulation was observed in the liver at 2 DAH. By 3 DAH, the digestive tract was differentiated into 5 parts: Buccopharyngeal cavity, Esophagus, Stomach, Anterior and Posterior intestine, and the buccopharygeal tooth buds as well as the taste bud were developed. At 4 DAH, the muscularis of the esophagus was developed and divided into 2 parts, coinciding with the differentiation of the stomach into cardiac and pyloric region. The gastric gland was appeared first in the cardiac stomach by DAH 3.5. At the same time, the villi were developed in the anterior intestine while the supranuclear vesicles were found in the posterior intestine. The acid mucosubstance appeared both in the goblet cells of the intestine and the mucous cells of the esophagus at 3 DAH; however, it increased in the anterior esophagus with age. The first neutral mucosubstance appeared in the mucus cells of the posterior esophagus and the stomach at 4 DAH and increased with age. In the enzyme histochemical study, acid phosphatase activity was detected in the larval yolk sac during 0 - 7 DAH. Alkaline phosphatase activity was first detected at hatching and its activity was strong in the striated border of the intestine at the time of first feeding and increasing with age. Amylase activity was found in the intestine and the pancreas during 2 - 30 DAH and after that it disappeared in the intestine. Lipase activity had a wide distribution in digestive organs at 2 DAH, and strong reaction in the

intestine and the pancreas of the juvenile fish. Furthermore, this study demonstrated that the fish larval age (0 - 46 DAH) had positive linear regression with the total length (Tl) (R^2 = 0.993) and negative linear regression with the yolk sac volume (R^2 = 0.927). This result may be applied to estimate the age from Tl and yolk sac volume of fish larvae.

This study concludes that the development of the digestive system of *C. nieuhofii* larvae had the general pattern in the teleosts with similar to other catfishes in the duration. The optimal time of the first feeding of these fish larvae were 4 DAH that larvae had the functional digestive tract which developed rapidly to the complete morphological digestive tract by 7 DAH. The developmental pattern of enzyme activity of this catfish had similar to other bony fishes that the low degree in the early period but increased in the time of first feeding. These results lead to provide basis knowledge for the development of diets and increase weaning success for this catfish.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(11)
รายการตารางภาคผนวก	(12)
สัญลักษณ์คำย่อและอักษรย่อ	(13)
บทที่	
1. บทนำ	1
1. บทนำต้นเรื่อง	1
2. บทตรวจเอกสาร	3
2.1 ข้อมูลทางอนุกรมวิธาน	3
2.2 แหล่งที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย	4
2.3 ชีววิทยาการเจริญ	□
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
3. วัตถุประสงค์การวิจัย	10
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีดำเนินการวิจัย	11
1. วัสดุ	11
1.1 สัตว์ทดลอง	11
1.2 สารเคมี	11
1.3 วัสดุวิทยาศาสตร์	12
2. อุปกรณ์	12
3. วิธีดำเนินการวิจัย	13
3.1 การเตรียมตัวอย่าง	13
3.2 การศึกษาโครงสร้างภายนอก	16
3.3 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา	17
3.4 การศึกษาทางฮีสโตเคมี	17

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3. ผลการวิจัย	22
1. ความสัมพันธ์ระหว่างอายุกับความยาวลำตัวทั้งหมดและปริมาตรถุงไข่แดง	22
2. การยุบตัวของถุงไข่แดง	2□
3. การพัฒนาของท่อทางเดินอาหาร	27
4. การพัฒนาของตับและตับอ่อน	37
□.การสะสมไกลโคเจนในตับ	42
6. สารเมือกในทางเดินอาหาร	4□
7. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในทางเดินอาหาร	46
4. วิจารณ์ผลการวิจัย	60
□. สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	71
เอกสารอ้างอิง	73
ภาคผนวก ก	81
ภาคผนวก ข	86
ประวัติผู้เขียน	90

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การแบ่งระยะการเจริญเติบโตจากลักษณะภายนอกของปลาดุกลำพัน	6
2	กลุ่มตัวอย่างลูกปลาดุกลำพันเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาและฮีสโตเคมี	14
3	การให้อาหารลูกปลาดุกลำพันอายุ 0-46 วันหลังฟัก	16
4	กลุ่มตัวอย่างลูกปลาดุกลำพันเพื่อศึกษาเอนไซม์ฮีสโตเคมี	16
□	ค่าเฉลี่ยความยาวทั้งหมดของลูกปลาดุกลำพันอายุ 0-46 วันหลังฟัก	23
6	ค่าเฉลี่ยปริมาตรถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันอายุ 0-□วันหลังฟัก	24
7	ตารางสรุปพัฒนาการเนื้อเยื่อระบบทางเดินอาหารลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ	41
8	ปริมาณไกลโคเจนในตับของลูกปลาดุกลำพันในระยะต่าง ๆ	43
9	ปริมาณสารเมือกที่มีฤทธิ์เป็นกรดและกลางในทางเดินอาหาร ของลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ	4□
10	การทำงานของเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสในทางเดินอาหาร ของลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ	48
11	การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในทางเดินอาหาร ของลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ	□1
12	การทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในทางเดินอาหาร ของลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ	□4
13	การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพัน ระยะต่าง ๆ	□7
14	ปริมาณการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิดในระบบทางเดินอาหาร ของลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ	60

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะภายนอกของปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*)	4
2	อุปกรณ์เพาะเลี้ยงและอนุบาลลูกปลาดุกลำพัน	1□
3	การวัดค่าความยาวลำตัวทั้งหมดและการวัดค่า R_1 และ R_2 เพื่อหาปริมาตรของถุงไข่แดง	17
4	ค่าเฉลี่ยความยาวลำตัวทั้งหมดของปลาดุกลำพันตั้งแต่อายุ 0-46 วัน	2□
□	การลดลงของปริมาตรถุงไข่แดงของปลาดุกลำพันอายุ 0-□วัน	2□
6	การยุบตัวของถุงไข่แดงในลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (H&E)	27
7	ท่อทางเดินอาหารเริ่มแรกของลูกปลาดุกลำพันอายุ 1.□วัน (H&E)	28
8	ช่องปากและคอหอยของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (H&E)	30
9	หลอดอาหารของลูกปลาดุกลำพันอายุ 7 และ 37 วันหลังฟัก (H&E)	32
10	กระเพาะอาหารของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (H&E)	34
11	ลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลายของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (H&E)	37
12	ตับและตับอ่อนของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (H&E)	39
13	ลักษณะภายนอกของลูกปลาระยะต่าง ๆ	42
14	ตับลูกปลาดุกลำพันที่อายุต่าง ๆ (Best's Carmine)	44
1□	ทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (PAS & AB)	46
16	ปริมาณการติดสีของเอนไซม์แอสิดฟอสฟาเตสในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ	49
17	ปริมาณการติดสีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ	□2
18	ปฏิกิริยาการติดสีของเอนไซม์อะไมเลสในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ	□□
19	ปริมาณการติดสีของเอนไซม์ไลเปสในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ	□8

รายการตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ **หน้า**

1 ค่าความยาวลำตัวทั้งหมดของลูกปลาดุกลำพันอายุ 0-46 วันหลังฟัก 86
2 ค่าปริมาตรถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันอายุ 0-46 วันหลังฟัก 87
3 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงลูกปลาดุก 88

สัญลักษณ์คำย่อและอักษรย่อ

A-Anus
Ab-Alcian blue
Am-Acid mucosubstance
Af-Anal fin
Ae-Anterior esophagus
Ai-Anterior intestine
B-Brain
Bb-Barbel
Bp-Buccopharynx
Cf-Caudal fin
Cm-Circular muscle layer
Cs-Cardiac stomach
Ct-Cartilage
DAH-Day after hatching
Df-Dorsal fin
Dff-Dorsal finfold
Dr-Dorsal ray
E-Esophagus
Ee-Eleutherembryonic phase
Ep-Epithelium
F-Food
Gc-Goblet cells
Gg-Gastric glands
Gi-Gastrointestinal tract
Gl-Gill slits
Gp-Gastric pit
H-Head
H&E-Hematoxyline&Eosin
Ht-Heart
In-Intestine
Is-Islet of pancreas
Jp-Juvenile period
L-Liver
Lm-Longitudinal muscle layer
Lmf-Longitudinal mucosal fold
Lp-Laminar propria
Lu-Lumen
M-Muscle
Mc-Mucous cell
Mf-Mucosal fold
Ml-Muscularis
Mm-Muscularis mucosae
Nc-Notochord
Nm-Neutral mucosubstance
O-Oral cavity
P-Pancreas
Pa-Pancreatic acinar
PAS-Periodic and Schiff's reagent
Pd-Pancreatic duct
Pe-Posterior esophagus
Pi-Posterior intestine
Pl-Pterygiolarval phase
Ppl-Protopterygiolarval phase
Pr-Pectoral fin
Ps-Pyloric stomach
Pt-Pharyngeal teeth
Pv-Pelvic fin
R-Rectum
Rmf-Radial mucosal fold
Sb-Striated border
Si-Sinusoid
Snv-Supranuclear vesicles
Ss-Serosa
St-Stomach
V-Villi
Vff-Ventral finfold.
Tb-Taste bud
Tl-Total length
Y-Yolk sac
Z-Zymogen granule

บทที่ 1

บทนำ

1. บทนำต้นเรื่อง

ปลาดุกจัดเป็นกลุ่มปลาที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ และมีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายในประเทศต่าง ๆ เช่น ในประเทศโครเอเชีย มีการเพาะเลี้ยงปลาดุกยุโรป, *Silurus glanis* L. (Kozaric et al., 2008) ในสหราชอาณาจักรที่นิยมเลี้ยงปลา Channel catfish, *Ictalurus punctatus* เพื่อการบริโภค และเพื่อการกีฬา (Lovell, 1998) ในประเทศแถบทวีปแอฟริกานิยมเลี้ยงปลาดุกแอฟริกัน, *Clarias gariepinus* เพื่อเป็นอาหาร (De Graaf and Janssen, 1996) รวมถึงประเทศจีนที่มีปลา Yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* เป็นปลาเศรษฐกิจที่สำคัญ (Yang et al., 2010) สำหรับประเทศไทยมีการเลี้ยงปลาดุกหลายชนิดเพื่อการบริโภคซึ่งประชาชนโดยทั่วไปรู้จักกันดี ได้แก่ ปลาดุกด้าน , *C. batrachus* ปลาดุกอุย, *C. macrocephalus* และปลาดุกบิ๊กอุย, *C. macrocephalus* x *C. gariepinus* (จำเนียร, 2542; วริยา, 2546) เนื่องจากปลาดุกบิ๊กอุยมีอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วและมีความต้านทานโรคได้ดีกว่าปลาดุกชนิดอื่น ทำให้ปัจจุบันได้รับความนิยมและเข้ามาแทนที่ตลาดของปลาดุกด้านและปลาดุกอุย (วริยา, 2546)

ปลาดุกลำพัน, *C. nieuhofii* เป็นปลาดุกที่อยู่ในวงศ์ Clariidae ที่พบได้ในประเทศไทยเช่นเดียวกับปลาดุกด้าน และปลาดุกอุย ในปัจจุบันปลาดุกลำพันเป็นปลาที่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาน้ำจืดเริ่มให้ความสนใจในการเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์ เนื่องจากปลาดุกลำพันจัดเป็นปลาที่มีรสชาติดีเป็นที่นิยมบริโภค และสามารถนำมาเลี้ยงเป็นปลาสวยงามได้ (ศราวุธ และคณะ, 2538; สัมพันธ์ และคณะ, 2544) แต่ขณะนี้กำลังประสบปัญหาในเรื่องของประชากรในธรรมชาติที่ลดลงอย่างมาก (ศราวุธ และคณะ, 2538) ทำให้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มปลาที่มีสถานภาพมีแนวโน้มใกล้สูญพันธุ์ (Vidthayanon, 2005) ดังนั้นจึงมีความพยายามที่จะเพาะขยายพันธุ์ปลาชนิดนี้ให้มีจำนวนพันธุ์ปลาในธรรมชาติมากขึ้นเพื่อการอนุรักษ์และการบริโภค ในปัจจุบันสามารถเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกลำพันได้เป็นผลสำเร็จด้วยวิธีการผสมเทียมพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติโดยใช้สาร Bufereline (Suprefact®) ร่วมกับสาร Domperidone (Motilium®) ฉีดกระตุ้นให้เกิดความพร้อมของเซลล์สืบพันธุ์และเพาะพันธุ์ได้ประสบผลสำเร็จ (กฤษณะ และคณะ, 2551) เป็นเหตุให้ในปัจจุบันมีกลุ่มเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเริ่มให้ความสนใจที่จะนำไปทดลองเลี้ยงเป็นจำนวนมาก และมีการ

วิจัยพัฒนาสูตรอาหารที่เหมาะสมในการอนุบาลลูกปลาดุกลำพันให้มีประสิทธิภาพอย่างจริงจัง (สุภฎา และคณะ, 2551) แต่เนื่องจากปลาดุกลำพันเป็นสัตว์น้ำที่เพิ่งประสบความสำเร็จในการเพาะขยายพันธุ์ ทำให้องค์ความรู้ที่เกี่ยวข้องกับการอนุบาลยังมีไม่เพียงพอ โดยเฉพาะข้อมูลทางด้านพัฒนาการของอวัยวะและการทำงานของเอนไซม์ในทางเดินอาหารในวัยอ่อนของลูกปลา

โดยส่วนใหญ่แล้วในการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนในเชิงพาณิชย์มักจะประสบปัญหาการตายของลูกปลาเป็นจำนวนมากในช่วงเวลาการกินอาหารจากภายนอกครั้งแรก (Yufera and Darias, 2007; Yang et al., 2010) และมักมีอัตราการเจริญเติบโตที่ช้า (Kozaric et al., 2008) ทำให้จำนวนปลาไม่เพียงพอต่อความต้องการของท้องตลาดและเกิดความสิ้นเปลืองต้นทุนด้านวัตถุดิบของอาหารในการอนุบาลลูกปลา จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าในแต่ละช่วงวัยของลูกปลาจะมีความต้องการสารอาหารที่แตกต่างกันตามพัฒนาการของทางเดินอาหาร (Ribeiro et al., 1999; Wegner et al., 2009) รายงานการศึกษาพัฒนาการทางวิทยาเนื้อเยื่อของทางเดินอาหารในปลาหลายชนิดพบว่าพัฒนาการของทางเดินอาหารและความต้องการสารอาหารมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของปลา เช่น ในปลาดุกยุโรปสามารถกินอาหารได้สมบูรณ์ในลูกปลาอายุ 7 วันหลังฟักซึ่งเป็นช่วงเวลาที่พบต่อมแกสทริค (Gastric gland) ในกระเพาะอาหาร และมีการสะสมไกลโคเจนและไขมันในตับ (Kozaric et al., 2008) เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าความต้องการอาหารของลูกปลามีความเกี่ยวข้องกับชนิดและปริมาณเอนไซม์จากตับอ่อนที่หลั่งออกมาในช่วงพัฒนาการอีกด้วย เช่น การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในทางเดินอาหารของปลา Pacific threadfin, *Polydactylus sexfilis* และ Bluefin trevally, *Caranx melampygus* ที่พบว่ามีการทำงานที่เพิ่มขึ้นของเอนไซม์อะไมเลส (Amylase) ไลเปส (Lipase) อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (Alkaline phosphatase) และเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ในช่วงแรกของการกินอาหาร (Kim et al., 2001) ดังนั้น การศึกษาพัฒนาการทางเดินอาหารและการทำงานของเอนไซม์ในลูกปลาวัยอ่อนจึงเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำความเข้าใจถึงสรีรวิทยาการกินอาหารของลูกปลาวัยอ่อน (Kisbert et al., 2004) และสามารถนำองค์ความรู้นี้ไปช่วยในการวางแผนการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนให้มีประสิทธิภาพได้ (Bengson, 1993; Segner et al., 1993)

การวิจัยครั้งนี้มุ่งศึกษาพัฒนาการของทางเดินอาหารในระยะวัยอ่อนของปลาดุกลำพันโดยใช้การวิเคราะห์ทางวิทยาเนื้อเยื่อ (Histological analysis) และฮีสโตเคมี (Histochemistry) เพื่อให้เข้าใจถึงขั้นตอนการพัฒนาอวัยวะต่าง ๆ ในทางเดินอาหาร และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีภายในเนื้อเยื่อที่บ่งบอกถึงความพร้อมในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร ได้แก่ การศึกษาชนิดและปริมาณของสารเมือกที่มีฤทธิ์เป็นกรดและเป็นกลาง (Acid and neutral mucosubstance) ในท่อทางเดินอาหารส่วนต่าง ๆ ซึ่งเป็นลักษณะที่แสดงถึงความพร้อมในการหลั่งน้ำย่อยในท่อทางเดินอาหาร (Petrinec et al., 2005; Kozaric et al., 2008) การศึกษาการสะสมไกลโคเจนในตับซึ่งเริ่มเมื่อมี

การดูดซึมและกักเก็บสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นแหล่งพลังงานในการเจริญเติบโต นอกจากนี้เพื่อให้ทราบถึงช่วงเวลาแน่นอนที่ลูกปลาสามารถย่อย ดูดซึม และเผาผลาญสารอาหารได้ จึงศึกษาการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และเอสิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase) ซึ่งเป็นเอนไซม์สำคัญที่มีความเกี่ยวข้องกับการย่อย และดูดซึมสารอาหาร (Roubaty and Portmann, 1988; Kim et al., 2001) ศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสและอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์จากตับอ่อนที่ทำหน้าที่ในการย่อยไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ตามลำดับ ซึ่งสารอาหารทั้งสองชนิดเป็นแหล่งพลังงานสำคัญในการเจริญเติบโตในลูกปลาวัยอ่อน (Lovell, 1998) คาดว่าข้อมูลที่ได้รับจากการวิจัยในครั้งนี้จะช่วยให้มีความเข้าใจถึงพัฒนาการทางวิทยาเนื้อเยื่อและการทำงานขององค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญในทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันวัยอ่อน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาเทคนิคในการอนุบาลลูกปลาดุกลำพันให้มีประสิทธิภาพ อันจะนำไปสู่การอนุรักษ์พันธุ์ปลาให้คงอยู่ในธรรมชาติ และสามารถเพาะเลี้ยงปลาชนิดนี้ในเชิงพาณิชย์ต่อไป

2. บทตรวจเอกสาร

2.1 ข้อมูลทางอนุกรมวิธาน

ปลาดุกลำพัน, *C. nieuhofii* สามารถจำแนกตามอนุกรมวิธาน (Taxonomy) ดังนี้

Kingdom: Animalia

Phylum: Chordata

Class: Actinopterygii

Order: Siluriformes

Family: Clariidae

Genus: *Clarias*

Species: *nieuhofii*

Scientific name: *Clarias nieuhofii* (Valencieness, 1840)

Synonym/misidentification: *Prophagorus nieuhofii*

Common name: Slender Walking Catfish, Nieuhofii's Walking Catfish

Thai name: ปลาดุกลำพัน

ปลาดุกเป็นปลากระดูกแข็งที่ไม่มีเกล็ดจัดอยู่ในวงศ์เดียวกับปลาดุกทั่วไป (Clariid catfish) ปลาดุกในวงศ์นี้มีลักษณะครีบหลังและครีบก้นที่ยาวมาก มีตาเล็ก และมีอวัยวะช่วยหายใจ

เรียกว่า Labyrinth organ อยู่เหนือกระดูกเหงือก (สุภาพร, 2550) ทำให้สามารถอยู่บนบกได้เป็นเวลานาน จนได้ชื่อว่า Air-breathing catfishes (Nelson, 1994)

ปลาดุกที่อยู่ในสกุล *Clarias* มีลักษณะสำคัญคือ มีครีบหลังและครีบก้นที่ยาว ไม่มี Dorsal–fin spine ไม่มี Adipose fin และมีหัวแบบ Depressed ปลาสกุลนี้ที่พบในไทย (อภิชาติ และสิริวรรณ, 2551) ได้แก่ ปลาดุกด้าน ปลาดุกอุย ปลาดุกเนื้อเลน, *C. meladerma* Bleeker, 1846 ปลาดุกแอฟริกัน และปลาดุกลำพัน

ปลาดุกลำพันมีลักษณะแตกต่างจาก *Clarias* ชนิดอื่นตรงที่มีลำตัวค่อนข้างยาว โดยมีขนาดลำตัวมาตรฐาน (Standard length) ยาวเป็น 8.0 - 9.3 เท่าของความลึกของลำตัว (Depth of body) มีก้านครีบก้นอยู่ระหว่าง 69 - 95 ก้าน (Rainboth, 1996) มีส่วนหัวขนาดเล็ก มีลำตัวสีน้ำตาลแดง มีลายจุดขาวแนวตั้งตลอดลำตัว ส่วนท้องมีสีจาง (ศราวุธ และคณะ, 2538) (ภาพที่ 1)

ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*)
ที่มา: สุภฎา และคณะ (2551)

2.2 แหล่งที่อยู่อาศัยและการแพร่กระจาย

ศราวุธ และคณะ (2538) รายงานว่าปลาดุกลำพันชอบอาศัยในแหล่งน้ำนิ่ง หรือมีกระน้ำไหลเอื่อย ๆ มีต้นไม้ปกคลุม และพื้นดินเป็นโคลน เช่น ในพื้นที่ป่าพรุในจังหวัดนราธิวาส พัทลุง และชุมพร นอกจากนี้ยังพบว่า แหล่งน้ำธรรมชาติที่ปลาอาศัยอยู่ มักมีสีชาหรือน้ำตาลแดงเข้ม มีค่า pH 4.5 และพื้นดินเป็นดินโคลนสีเทาปนน้ำเงินมีซากพืชที่ยังย่อยสลายไม่หมด (Peat) ปะปนกับชั้นของดินอินทรีย์ (Organic layer) ที่หนาประมาณ 20 - 300 ซม. และมีค่า pH ของดิน 2.0 - 4.5

ปลาดุกลำพันแพร่กระจายในหมู่เกาะ Indo-Australian แถบหมู่เกาะมะละกาและฟิลิปปินส์ ในประเทศไทย พบในจังหวัดทางภาคใต้ฝั่งตะวันออกและจังหวัดตราดในภาคตะวันออก (Smith, 1945) มีรายงานว่าพบปลาดุกลำพันที่จังหวัดพัทลุง และอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร และมีค่อนข้างชุกชุมที่พรุโต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส (ศราวุธ และคณะ, 2538) แต่ในปัจจุบันพบปลาดุกลำพันในป่าพรุทางภาคใต้ตั้งแต่จังหวัดชุมพรลงไป และป่าพรุในจังหวัดจันทบุรีและตราดเท่านั้น (อภิชาติ และสิริวรรณ, 2551)

2.3 ชีววิทยาการเจริญ

พัฒนาการของตัวอ่อน

กฤษณะ และคณะ (2551) ได้ศึกษาคัพภะวิทยาของปลาดุกลำพันและรายงานว่า ไข่ปลาดุกลำพันเป็นชนิดไข่จมแบบติด (Adhesive dermersal egg) หลังจากการปฏิสนธิแล้วมีการแบ่งเซลล์แบบ Meroblastic cleavage ใช้เวลาในการฟักเป็นตัวประมาณ 33 ชั่วโมง 15 นาที ที่อุณหภูมิน้ำ 26.5 - 27.5 ^{o}C ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Kiriratnikom และคณะ (2007) ที่ได้รายงานว่า ลูกปลาดุกลำพันฟักออกจากไข่ในระยะเวลาประมาณ 30 - 36 ชั่วโมง และมีความใกล้เคียงกับระยะเวลาการฟักของปลาดุกอื่น ๆ ในสกุล *Clarias* เช่น ปลาดุกแอฟริกันที่ใช้เวลาประมาณ 28 - 30 ชั่วโมง (De Graaf and Janssen, 1996) และปลาดุกด้าน 30 ชั่วโมง (Hossain et al., 2006)

พัฒนาการของลูกปลาวัยอ่อน

อภิชาติ และสิริวรรณ (2551) ทำการศึกษาพัฒนาการของลูกปลาดุกลำพันวัยอ่อน ตั้งแต่อายุ 6 ชั่วโมง - 40 วัน โดยบรรยายลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก (External morphology) ในลูกปลาช่วงอายุต่าง ๆ รายงานว่าเมื่อลูกปลาดุกลำพันอายุ 6 ชั่วโมง (ความยาวลำตัวประมาณ 5.22 มม.) มีลำตัวเรียวยาวมีถุงไข่แดงรูปร่างกลมอยู่ด้านล่างลำตัวติดกับส่วนหัว เริ่มเห็นจุดกำเนิดตา และหนวด 2 คู่บริเวณหัว ส่วนของครีบอกยังไม่มีการพัฒนา พบช่องเปิดทวารบริเวณกล้ามเนื้อ (Somite) หางมัดที่ 19 ปากของลูกปลาเริ่มเปิดในวันที่ 2 หลังฟักออกเป็นตัวซึ่งเป็นเวลาเดียวกับการเริ่มพัฒนาของทางเดินอาหาร ถุงไข่แดงมีขนาดเล็กลงและยุบหมดในวันที่ 4 (อุดมชัย และสุวรรณี, 2529 อ้างจาก ศราวุธ และคณะ, 2538) ตลอดช่วงอายุ 2 - 19 วัน ลูก

ปลามีการพัฒนาโครงสร้างภายนอกต่างๆตามลำดับ เช่น เริ่มมีการพัฒนากระดูกเสริมความแข็งแรงของหางในวันที่ 2 จุดสีส่วนหัว ลำตัว และหางมีความหนาแน่นมากขึ้นในวันที่ 4 - 9 เป็นต้น และในวันที่ 40 (ความยาวลำตัวประมาณ 35.88 มม.) ลูกปลาจะมีลักษณะภายนอกเหมือนปลาเต็มวัยทุกประการยกเว้นระบบสืบพันธุ์ที่ยังไม่มีการพัฒนา

การแบ่งระยะการเจริญเติบโตจากลักษณะภายนอก

สำหรับการศึกษาพัฒนาการของปลาดุกลำพันระยะวัยอ่อนครั้งนี้ใช้การแบ่งระยะการเจริญเติบโตจากลักษณะภายนอกตามการจัดแบ่งของ Balon (Huysentruyt et al., 2009) เทียบเคียงกับอายุปลาวัยอ่อนได้เป็น 4 ระยะ (ตารางที่ 1) ดังนี้

1. Eleutherembryonic phase (Ee) อายุปลา 0 - 3 วันหลังฟัก เป็นระยะที่ลูกปลาฟักออกจากไข่จน กระทั่งเริ่มกินอาหารจากภายนอก (External feeding)

2. Protopterygiolarval phase (Ppl) อายุปลา 4 - 6 วันหลังฟัก เป็นระยะที่ลูกปลาเริ่มกินอาหารจากภายนอกจนกระทั่งลูกปลาเริ่มมีการพัฒนาครีบต่าง ๆ (Finfold differentiation)

3. Pterygiolarval phase (Pl) อายุปลา 7 - 16 วันหลังฟัก เป็นระยะที่ลูกปลามีการพัฒนาครีบต่าง ๆ จนสมบูรณ์

4. Juvenile period (Jp) อายุปลา 17 วันหลังฟักเป็นต้นไป เป็นระยะหลังจากที่ลูกปลามีลักษณะครีบทั้งหมดสมบูรณ์เหมือนปลาตัวเต็มวัยจนกระทั่งมีการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์จนสมบูรณ์ (Sexual maturation)

ตารางที่ 1 การแบ่งระยะการเจริญเติบโตจากลักษณะภายนอกของปลาดุกลำพัน

Developmental phase	DAH
Eleutherembryonic phase (Ee)	0 - 3
Protopterygiolarval phase (Ppl)	4 - 6
Pterygiolarval phase (Pl)	7 - 16
Juvenile period (Jp)	≥17

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีการศึกษาพัฒนาการตามวัยของระบบทางเดินอาหารในลูกปลากระดูกแข็งวัยอ่อนด้วยวิธีทางวิทยาเนื้อเยื่อในปลาหลายชนิด เช่น Dover sole, *Solea solea* (Bouhlic and Gabaudan, 1992), Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. (Kjørsvik and Reiersen, 1992), Senegal sole, *Solea senegalensis* (Ribeiro et al., 1999), Common Pandora, *Pagellus erythrinus* (Micale et al., 2008), Starlet, *Acipenser ruthenus* L. (Wegner et al., 2009) และ Yellow catfish, *Pelteobagrus fulvidraco* (Yang et al., 2010) เป็นต้น

การเริ่มกินอาหารครั้งแรกเป็นช่วงเวลาวิกฤตในการพัฒนาการของลูกปลาวัยอ่อน โดยพบว่าลูกปลามีอัตราการตายที่สูงในช่วงเวลานี้ (Yufera and Darias, 2007) เมื่อลูกปลาเริ่มกินอาหาร ทางเดินอาหารของลูกปลาจะต้องพร้อมที่จะทำงาน แม้จะยังพัฒนาไม่สมบูรณ์เหมือนในปลาตัวเต็มวัยก็ตาม (Govoni et al., 1986) ในช่วงเวลานี้กระบวนการพัฒนาของทางเดินอาหารจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของลูกปลา โดยมีการเพิ่มอัตราการนำเข้าและการย่อยอาหารประกอบกับการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยและดูดซึมของลูกปลาวัยอ่อน ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นของลูกปลา (Bengson, 1993) ดังนั้นจึงพบว่าช่วงเวลานี้เป็นช่วงเวลาวิกฤตของลูกปลาที่ต้องได้รับสารอาหารอย่างต่อเนื่องหลังจากสารอาหารภายในถุงไข่แดงหมดลง (Gisbert et al., 2004; Pena and Dumas, 2005; Yufera and Darias, 2007)

มีการศึกษาพบว่าในลูกปลาหลายชนิดมีการรับสารอาหารแบบผสม กล่าวคือ แม้ถุงไข่แดงจะยังยุบไม่หมดก็สามารถที่จะกินอาหารจากภายนอกได้แล้ว ดังเช่นในปลา *Melanogrammus aeglefinus* ที่มีถุงไข่แดงยุบในวันที่ 3 หลังการฟัก แต่เริ่มกินอาหารได้ตั้งแต่อายุ 1.5 วัน (Hamlin et al., 2000) ปลา *Amphiprion percula* ซึ่งมีพัฒนาการของอวัยวะต่าง ๆ ที่รวดเร็วตั้งแต่แรกฟัก พบว่าถุงไข่แดงถูกใช้จนหมดในวันที่ 3 หลังการฟัก แต่สามารถกินอาหารได้ตั้งแต่วันแรกที่ฟัก (Onal et al., 2008) และปลาดุกยุโรปที่กินอาหารได้ในวันที่ 4 หลังฟัก ก่อนที่ถุงไข่แดงจะยุบหมด 2 วัน (Kozaric et al., 2008) โดยพบว่าระบบทางเดินอาหารของลูกปลาดังกล่าวมีการพัฒนาส่วนของตับและตับอ่อนแล้ว ถึงแม้ว่าท่อทางเดินอาหารจะยังไม่สามารถแยกความแตกต่าง และพัฒนาเต็มที่ก็ตาม ในช่วงเวลาที่มีการกินอาหารจากภายนอกในขณะที่ทางเดินอาหารของลูกปลายังพัฒนาไม่สมบูรณ์ อาหารที่ลูกปลากินควรเป็นอาหารที่มีชีวิต เนื่องจากสามารถอาศัยเอนไซม์ภายในย่อยตัวมันเอง และมีสารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของลูกปลา (Abol-Munafi et al., 2006)

ลักษณะทางวิทยาเนื้อเยื่อสามารถบอกรายละเอียดของการทำงานในระบบย่อยอาหารได้เป็นอย่างดี ดังเช่นการปรากฏของต่อมแกสทริคซึ่งเป็นต่อมในกระเพาะอาหาร เป็นการบ่งบอกการเข้าสู่ระยะวัยรุ่น (Juvenile period) โดยปลาแต่ละชนิดจะมีระยะเวลาแตกต่างกัน และในเวลาดังกล่าวในท่อทางเดินอาหารจะพบปฏิกิริยาของ PAS ซึ่งบ่งบอกการตรวจพบสาร Mucopolysaccharide ซึ่งเป็นสารที่หลั่งออกมาจากเซลล์เมือก (Mucous cell) เพื่อป้องกันผนังของกระเพาะอาหารจากการย่อยของกรดไฮโดรคลอริก และเอนไซม์ที่สร้างจากต่อมแกสทริค ดังเช่นในปลาบู่ทราย, *Oxyeleotris marmoratus* จะพบต่อมแกสทริคในกระเพาะส่วน Cardiac ในวันที่ 30 หลังฟักพร้อม ๆ กับพบการทำงานของเซลล์เมือก (Abol-Munafi et al., 2006) ลักษณะดังกล่าวคล้ายกับในปลา Rainbow trout (Sarieyyupoglu et al., 2000) และปลาดุกยุโรป (Kozaric et al., 2008)

รายงานการศึกษาการเจริญของตับและตับอ่อนในลูกปลาวัยอ่อนหลายชนิดพบว่าอวัยวะทั้งสองมักเจริญในช่วงแรกก่อนที่ท่อทางเดินอาหารมีการพัฒนา และถุงไข่แดงจะยุบหมด (Hamlin et al., 2000; Kozaric et al., 2008; Onal et al., 2008) ตับมีหน้าที่ทั้งด้านการย่อย และสะสมสารอาหาร โดยตับจะทำหน้าที่สร้างน้ำดีที่ช่วยในการแตกตัวของไขมันและสะสมสารอาหารหลายชนิด เช่น ไขมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์ และคาร์โบไฮเดรตในรูปของไกลโคเจน เป็นต้น (Lovell, 1998) โดยการเริ่มสะสมไกลโคเจนและไขมันในลูกปลาวัยอ่อนแต่ละชนิดมีเวลาแตกต่างกันซึ่งเป็นการแสดงถึงความพร้อมของกระบวนการย่อย และดูดซึมสารอาหาร ดังเช่น ในปลาดุกยุโรปที่เริ่มพบการสะสมในระหว่างวันที่ 7 - 9 หลังฟักพร้อมกับการพบหยดไขมันบริเวณลำไส้ส่วนต้น (Kozaric et al., 2008) เป็นต้น ส่วนตับอ่อนทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ย่อยอาหารเป็นแห่งแรกของระบบทางเดินอาหาร (Lovell, 1998) เอนไซม์ที่ผลิตมีหลายชนิด เช่น อะไมเลส ไลเปส ทริปซิน (Trypsin) และไคโมทริปซิน (Chymotrypsin) เป็นต้น มีการศึกษาเปรียบเทียบเวลาการเริ่มปรากฏการทำงานของเอนไซม์เหล่านี้ในปลาทะเลหลายชนิด เช่น Sea bass, *Dicentrachus labrax* L., Dover sole, *Solea solea* และRed drum, *Sciaenops ocellatus* เป็นต้น พบว่าในปลาแต่ละชนิดตรวจพบเอนไซม์ อะไมเลส ไลเปส ทริปซิน และไคโมทริปซินในเวลาที่ใกล้เคียงกัน เช่น ใน Sea bass พบเอนไซม์ทั้งหมดในวันที่ 4 - 5 หลังฟัก และ Red drum พบในวันแรกหลังฟัก (Zambonino Infante and Cahu, 2001) แสดงว่าเวลาดังกล่าวลูกปลาเหล่านี้มีความพร้อมในการย่อยสารอาหารชนิดต่าง ๆ ได้แล้ว การศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ควบคู่ไปกับการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหารมีส่วนสำคัญในการวางแผนการเลี้ยงดูลูกปลาวัยอ่อน เช่น การศึกษาเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสซึ่งสามารถใช้บอกความพร้อมในการดูดซึมสารอาหารชนิดต่าง ๆ เช่น ไขมัน กลูโคส แคลเซียม และฟอสเฟต (Roubaty and Portmann, 1988; Mahmood et al., 1994) การศึกษาเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสซึ่งมี

ความเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายของถุงไข่แดง และความพร้อมในการย่อยและดูดซึมสารอาหารของลำไส้เล็ก (Kim et al., 2001) โดยมักพบว่าช่วงเวลาการกินอาหารครั้งแรกจะตรวจพบกิจกรรมของเอนไซม์สองชนิดนี้เพิ่มขึ้นในบริเวณลำไส้เล็ก (Gisbert et al., 1999) สำหรับเอนไซม์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสารอาหารจากภายนอก ได้แก่ ไลเปสและอะไมเลส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสารอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตของลูกปลา ได้แก่ ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตตามลำดับ (Lovell, 1998) โดยเอนไซม์ไลเปสเป็นเอนไซม์ที่มีหน้าที่ในการย่อยไขมันชนิดที่ไม่ละลายน้ำให้เป็นกรดไขมัน (Fatty acid) ซึ่งส่วนใหญ่จะตรวจพบเอนไซม์บริเวณตับอ่อน และบริเวณอื่น ๆ ด้วยวิธีทางฮีสโตเคมี (Bancroft and Gamble, 2002) สำหรับการศึกษาเอนไซม์ชนิดนี้ในลูกปลาวัยอ่อนมีอยู่หลายชนิด เช่น ในปลานิลแดง, *Oreochromis niloticus* พบเอนไซม์ไลเปสในลำไส้เล็กของลูกปลาก่อนการเริ่มกินอาหารครั้งแรกเช่นเดียวกับเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ (Maltase, Leucine aminopeptidase, Dipeptidyl aminopeptidase IV, Non-specific esterases และอัลคาไลน์ฟอสฟาเตส) โดยเอนไซม์ไลเปสจะตรวจพบช้ากว่าเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ประมาณ 3 วัน (Tengjaroenkul et al., 2002) สำหรับเอนไซม์อะไมเลสเป็นเอนไซม์โดยทั่วไปในกระบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตให้เป็นน้ำตาล พบว่าในช่วงแรกของพัฒนาการของลูกปลาหลายชนิด เช่น Sea bass Bluefin trevally และ Pacific threaddfihs มีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสที่สูงโดยเฉพาะในช่วงเวลาการกินอาหารครั้งแรกและจะลดลงเมื่อลูกปลามีการพัฒนาเข้าสู่ระยะลูกปลาขนาดเล็ก (Cahu and Zambonino Infante, 2001; Kim et al., 2001)

สำหรับการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ในระบบย่อยอาหารของกลุ่มปลาดุกยังมีอยู่น้อยมาก ส่วนใหญ่ศึกษาแผนการพัฒนาการของระบบทางเดินอาหารภายนอก และการสะสมองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดในทางเดินอาหาร ดังเช่นการศึกษาพัฒนาการของทางเดินอาหารในลูกปลาดุกยุโรปอายุ 1 - 19 วันหลังฟัก พบว่าถุงไข่แดงปรากฏใน 5 วันแรก ท่อทางเดินอาหารเริ่มพบความแตกต่างในระหว่างวันที่ 3 - 5 และพบว่าหลังจากลูกปลาอายุ 7 วันหลังฟักจะมีท่อทางเดินอาหารที่สมบูรณ์ เนื่องจากมีลักษณะโครงสร้างในระบบย่อยอาหารพร้อมสำหรับกระบวนการกิน การย่อย และการดูดซึมสารอาหาร (Kozaric et al., 2008) ซึ่งผลการศึกษานี้มีความคล้ายคลึงกับปลาดุกชนิดอื่น ๆ เช่น ปลาดุกแอฟริกาใต้, *Rhamdia quelen* (Hernandez et al., 2009), Yellow catfish (Yang et al., 2010) เป็นต้น สำหรับตัวอย่างการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในปลาดุก ได้แก่ การศึกษาเอนไซม์ในทางเดินอาหารของปลาดุก 3 ชนิด ประกอบด้วย *Physailia pellucida, Eutropius niloticus* และ *Schilbe mystus* พบว่าเอนไซม์ทริปซิน และเปปซิน (Pepsin) ปรากฏในทางเดินอาหารในปลาดุกทั้ง 3 ชนิด แต่เปปซินจะพบการทำงานที่สูงกว่าทริปซินและพบว่าในปลาดุกทั้ง 3 ชนิดตรวจสอบไม่พบเอนไซม์ไลเปส (Olatunde and Ogunbiyi, 1977)

สำหรับปลาดุกลำพันยังไม่มีรายงานการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับพัฒนาการทางเดินอาหารในช่วงวัยอ่อนมีเพียงข้อมูลของอาหาร และนิสัยการกินอาหารในปลาตัวเต็มวัยเท่านั้น ดังนั้นงานวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งศึกษาถึงพัฒนาการของทางเดินอาหารทางด้านวิทยาเนื้อเยื่อ และฮีสโตเคมีในช่วงวัยอ่อนของปลาชนิดนี้ คาดว่าข้อมูลที่ได้รับจากงานวิจัยในครั้งนี้จะสามารถเป็นประโยชน์ต่อการวางแผนอนุบาลลูกปลาดุกลำพันให้มีประสิทธิภาพสามารถเพิ่มผลผลิตอย่างเพียงพอเพื่อการอนุรักษ์สายพันธุ์ปลาชนิดนี้ให้คงอยู่ต่อไป และพัฒนาไปสู่การเพาะเลี้ยงในเชิงพาณิชย์เพื่อสร้างรายได้ที่มั่นคงให้แก่เกษตรกรต่อไป

3. วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารในปลาดุกลำพันระยะวัยอ่อน
2. เพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อย และดูดซึมในทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันระยะวัยอ่อนด้วยวิธีทางฮีสโตเคมี

บทที่ 2

วิธีดำเนินการวิจัย

1. วัสดุ

1.1 สัตว์ทดลอง

ตัวอย่างทั้งหมดจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง โดยแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ

1. ลูกปลาดุกลำพันอายุ 0-46 วันหลังฟัก สำหรับการศึกษาวิทยาเนื้อเยื่อและฮีสโตเคมี
2. ไข่ที่ปฏิสนธิแล้วของปลาดุกลำพัน สำหรับการศึกษาเอนไซม์ฮีสโตเคมี

1.2 สารเคมี

Absolute ethyl alcohol
Acetone
Acetate buffer pH 5.0
Acetic acid
Acid alcohol
Alcian blue solution pH 2.5
Bouin's fluid
Carmine
Calcium chloride
Cobalt nitrate
Embedding media for frozen section
Eosin-Y
Formal calcium
Glycerin jelly
Harris's hematoxylin
Light petroleum
Lead nitrate
Magnesium sulphate
Mayer's hematoxylin
Methyl alcohol
Paraplast
1 % Periodic acid
Permount
Saturated lithium carbonate
Schiff's reagent
Sodium B-glycerophosphate
Sodium diethyl barbiturate
Starch
Xylene
Yellow ammonium sulphide

1.3 วัสดุวิทยาศาสตร์

กระดาษกรอง เบอร์ 1 (Filter paper No. 1)	ท่อ PVC (PVC pipe)
กระดาษเลเบล (Label paper)	ถุงมือยาง (Gloves)
กระจกปิดสไลด์ขนาด 22 x 40 มม. (Cover slip)	ใบมีด (Microtome knife)
กล่องพลาสติกโพลีสไตรีน (Polystryrene box)	ปิเปตขนาดเล็ก(Micropipette)
กล่องพลาสติก (Plastic box)	ลวด เบอร์ 18 (Wire No. 18)
ขวดใส่ตัวอย่าง (Bottom)	สไลด์แก้วขนาด 25x75x2 มม. (Slide)
ตัวบล็อกฝังชิ้นเนื้อ (Embedding ring)	สายยาง (Rubber tube)
ตาข่ายอวน (Net)	เอ็นขาว เบอร์ 0.6 (Fiber No. 0.6)

2. อุปกรณ์

กระจกหน้าปัดนาฬิกา (Watch glass)	เครื่องอุ่นสไลด์(Slide warmer)
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope)	จาร์ย้อมสี (Staining jar)
กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereo microscope)	ชุดเครื่องมือผ่าตัด (Surgical set)
กล้องถ่ายสไลด์ (Microphotography)	ตู้ดูดไอสารเคมี (Flume hood)
กล่องใส่สไลด์ (Slides box)	ตู้อบ (Oven)
เครื่องชั่ง (Precision measure)	ที่วางหลอดทดลอง (Test tube rack)
เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Rotary microtome)	บีกเกอร์ (Beaker)
เครื่องตัดชิ้นเนื้อแช่แข็ง (Cryostat)	ปั๊มออกซิเจน (Oxygen pump)
เครื่องฝังชิ้นเนื้อ (Embedding centre)	อ่างลอยเนื้อเยื่อ (Water bath)

3. วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การเตรียมตัวอย่างลูกปลา

สำหรับการศึกษาทางวิทยาเนื้อเยื่อและฮีสโตเคมี (ไกลโคเจน และสารเมือก) ทำการเก็บตัวอย่างลูกปลาดุกลำพันช่วงอายุต่าง ๆ ที่เพาะฟักภายในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง ครั้งละ 12 ตัว โดยจะมีความถี่ในการเก็บลูกปลาแตกต่างกันตามช่วงอายุ และแบ่งแช่ในสารคงสภาพ (Fixative) ได้แก่ Bouin's fluid 24 ชม. เพื่อศึกษาทางวิทยาเนื้อเยื่อและสารเมือกในทางเดินอาหาร และ Absolute ethanol 24 ชม. เพื่อศึกษาการสะสมไกลโคเจน (ตารางที่ 2)

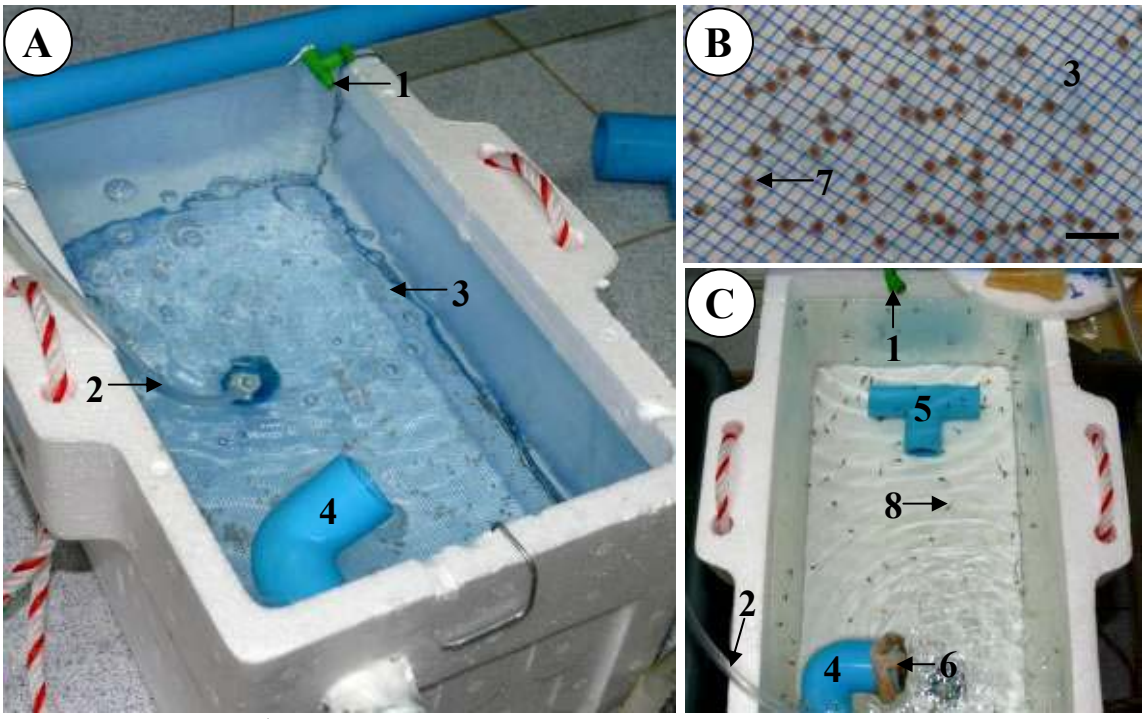
ตารางที่ 2 กลุ่มตัวอย่างลูกปลาดุกลำพันเพื่อศึกษาทางวิทยาเนื้อเยื่อและฮีสโตเคมี

กลุ่มที่	อายุปลาหลังฟัก (วัน)	ความถี่ในการเก็บ	จำนวน (ตัว/ครั้ง)	จำนวนปลาใน Fixative	
				Bouin's fluid	Absolute ethanol
1	0 - 4	ทุก 12 ชม.	12	6	6
2	5 - 10	ทุกวัน	12	6	6
3	12 - 22	ทุก 2 วัน	12	6	6
4	25 - 46	ทุก 3 วัน	12	6	6

สำหรับตัวอย่างในการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิดด้วยวิธีการทางฮีสโตเคมีนำมาจากการเพาะฟักลูกปลาภายในอาคารปฏิบัติการทางน้ำ ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัย-สงขลานครินทร์ โดยมีวิธีการเพาะเลี้ยงและอนุบาลดังนี้

นำไข่ลูกปลาดุกลำพันที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วจากห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง มาเพาะฟักในกล่องพลาสติกโพลีสไตรีนขนาด 20.0 x 33.0 x 20.0 ซ.ม. (ความจุน้ำ 5 ลิตร) จำนวน 2 กล่องซึ่งทำความสะอาดและติดตั้งระบบให้อากาศ และระบบหมุนเวียนน้ำ (ระบบน้ำล้น) แล้วเติมน้ำประปาที่พักไว้ 1 สัปดาห์ปริมาตรประมาณ 4.5 ลิตรต่อกล่อง วางตาข่ายอวนที่เตรียมไว้ให้อยู่เหนือพื้นภาชนะประมาณ 5 ซม. โปรยไข่ปลาที่ปฏิสนธิแล้วให้กระจายบนช่องของตาข่ายอวน โดยให้มีความหนาแน่นประมาณ 2 - 3 ฟอง/ตร.ซม. ทั้ง 2

กล่อง จากนั้นให้ออกซิเจนและมีการหมุนเวียนน้ำตลอดเวลา (ภาพที่ 2A&B) เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 36 ชม.ลูกปลาจะเริ่มเจาะเปลือกไข่แล้วลอดช่องตาข่ายลงไปนอนอยู่บนพื้นภาชนะขณะที่เปลือกไข่ยังค้างอยู่บนตาข่าย หลังจากลูกปลาฟักเป็นตัวหมดแล้วทำการยกตาข่ายอวนออก (ภาพที่ 2C) จากนั้นเมื่อลูกปลามีอายุ 72 ชม. หลังฟักจะเริ่มให้อาหารตามวิธีการของสุภฎา และคณะ (2551) โดยใช้ตัวอ่อนอาร์ทีเมียแรกฟักที่ยังมีชีวิตเป็นอาหารอนุบาลลูกปลาโดยให้อาหารวันละ 2 มื้อคือช่วงเวลา 8.00 - 9.00 น. และ20.00 - 21.00 น. จนกระทั้งลูกปลามีอายุ 14 - 16 วันหลังฟักจึงเปลี่ยนเป็นให้อาหารผงผสมตัวอ่อนอาร์ทีเมีย จากนั้นเริ่มให้อาหารผงอย่างเดียวเมื่อลูกปลาอายุ 17 - 21 วันหลังฟัก และเปลี่ยนเป็นอาหารเม็ดบดหยาบตั้งแต่ลูกปลามีอายุ 22 วันเป็นต้นไป (ตารางที่ 3) โดยก่อนให้อาหารแต่ละมื้อจะใช้ปิเปตขนาดเล็กดูดตะกอนของเสียและลูกปลาที่ตายออกจากพื้นภาชนะ



ภาพที่ 2 อุปกรณ์เพาะเลี้ยงและอนุบาลลูกปลาดุกลำพัน

A: ชุดอุปกรณ์อนุบาลลูกปลาดุกลำพัน **B:** การกระจายตัวของไข่ปลาดุกลำพันบนตาข่ายอวน

C: ชุดอุปกรณ์หลังจากลูกปลาฟักออกจากไข่แล้ว

ความหมายสัญลักษณ์: 1: วาล์วน้ำเข้า; **2:** สายให้อากาศ; **3:** ตาข่ายอวน; **4:** ท่อน้ำล้น; **5:** ที่ซ่อนของลูกปลา; **6:** ผ้าขาวบางป้องกันลูกปลาหนี; **7:** ไข่ที่ปฏิสนธิแล้ว; **8:** ลูกปลาวัยอ่อน; Scale bar - 1 cm.

ตารางที่ 3 การให้อาหารลูกปลาดุกลำพันอายุ 0 - 46 วันหลังฟัก

อายุ (DAH) / สารอาหาร	0-2	3-7	8-14	15-16	17-21	22-46
ถุงไข่แดง	———					
อาร์ทีเมีย		———	———	———		
อาหารผง*				———	———	
อาหารบดหยาบ*						———

*รายละเอียดองค์ประกอบของสูตรอาหารอยู่ในภาคผนวก ก

ในระหว่างการอนุบาลลูกปลาดุกลำพันจะทำการสุ่มเก็บตัวอย่างลูกปลากลุ่มอายุละ 12 ตัว โดยแบ่ง 6 ตัวมาคงสภาพใน 4 ^{o}C Absolute acetone เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อศึกษาเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสและอัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยวิธีพาราฟิน และจำนวน 6 ตัวนำมาสลบด้วยความเย็นเพื่อศึกษาเอนไซม์อะไมเลสและไลเปสด้วยวิธีการตัดเนื้อเยื่อสดแช่แข็ง (Fresh frozen section) (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 กลุ่มตัวอย่างลูกปลาดุกลำพันเพื่อศึกษาเอนไซม์ฮีสโตเคมี

กลุ่มที่	อายุปลาหลังฟัก (วัน)	ความถี่ในการเก็บ	จำนวน (ตัว/ครั้ง)	จำนวนปลาใน 4 ^{o}C Absolute acetone	จำนวนปลาในการตัดเนื้อเยื่อสดแช่แข็ง
1	0 - 7	ทุกวัน	12	6	6
2	8 - 20	ทุก 3 วัน	12	6	6
3	21 - 46	ทุก 5 วัน	12	6	6

3.2 การศึกษาโครงสร้างภายนอก

ความสัมพันธ์ของความยาวทั้งหมดและอายุ

วัดความยาวลำตัวทั้งหมด (Total length) (ภาพที่ 3) ของลูกปลาที่ผ่านการคงสภาพด้วย Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชม. และแช่อยู่ใน 70% แอลกอฮอล์ทุกกลุ่มอายุ ๆ ละ 10 ตัวด้วยเวอร์เนียมีหน่วยเป็นมิลลิเมตรค่าทศนิยม 2 ตำแหน่ง หาค่าเฉลี่ย และทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวกับอายุ โดยใช้วิธีทดสอบทางสถิติแบบ Linear regression ด้วยโปรแกรม Microsoft office excel

ความสัมพันธ์ของปริมาตรถุงไข่แดงและอายุ

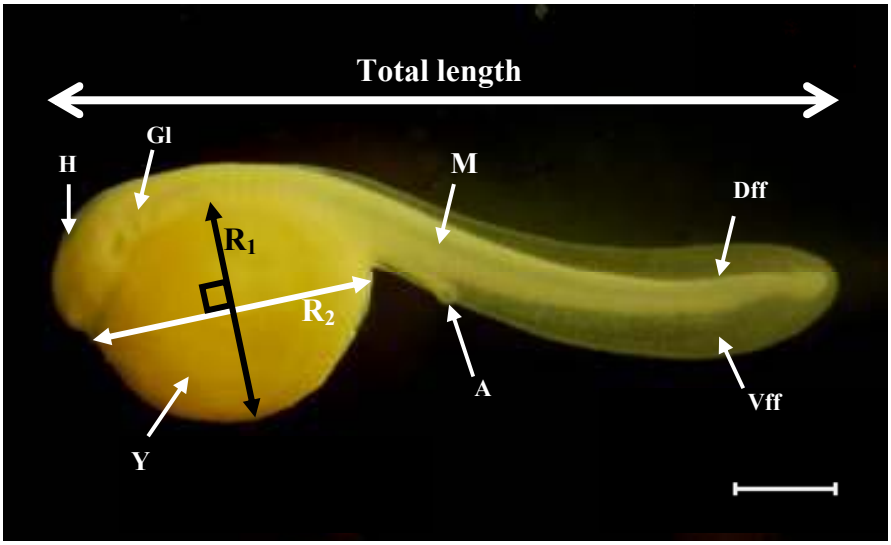
ศึกษาการยุบตัวของถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันที่ผ่านการคงสภาพด้วย Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชม. และแช่อยู่ใน 70% แอลกอฮอล์ของทุกกลุ่มอายุ ๆ ละ 10 ตัว โดยวัดค่าความยาวต่าง ๆ โดยใช้ Ocular micrometer แล้วคำนวณค่าปริมาตรตามสูตร (Fukuhara, 1986 อ้างตาม Amornsakun et al., 2004) (ภาพที่ 3)

$$\text{ปริมาตรของถุงไข่แดง} = 4/3\pi(R_1/2)^2(R_2/2)$$

โดยที่ R_1 = ความยาวของแกนย่อย

R_2 = ความยาวของแกนหลัก

จากนั้นหาค่าเฉลี่ย และทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาตรถุงไข่แดงกับอายุ โดยใช้วิธีทดสอบทางสถิติแบบ Linear regression ด้วยโปรแกรม Microsoft office excel



ภาพที่ 3 การวัดค่าความยาวลำตัวทั้งหมด (Total length) และการวัดค่า R_1 และ R_2 เพื่อหาปริมาตรของถุงไข่แดงในลูกปลาอายุ 0 วันหลังฟัก; Scale bar - 5 mm.

3.3 การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

นำตัวอย่างลูกปลาดุกลำพันที่ผ่านการคงสภาพด้วย Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชม. มาผ่านแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้น 70%, 95% และ100% ตามลำดับเพื่อการดึงน้ำออกจากเซลล์ (Dehydration) จากนั้นผ่านตัวอย่างไปยัง Xylene และพาราฟินเหลว (Melted paraffin) ตามลำดับ เพื่อเป็นการนำพาราฟินเข้าสู่เซลล์ (Infiltration) และฝังชิ้นตัวอย่างในตัวบล็อกฝังชิ้นเนื้อ (Embedding ring) นำบล็อกเนื้อเยื่อที่ได้ไปตัดตามยาวด้วยความหนา 6 μm. ติดบนสไลด์ จากนั้นย้อมด้วย Harris's hematoxylin & Eosin (Humarson, 1979) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ผ่านสไลด์เนื้อเยื่อใน Xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที จากนั้นล้าง Xylene ออกใน Absolute alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

2. ผ่านสไลด์เนื้อเยื่อไปยัง 95% Alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำประปาไหลประมาณ 5 นาที

3. ย้อมสี Harris's hematoxylin เป็นเวลา 6 - 8 นาที จากนั้น Differentiate ใน 1% Acid alcohol ประมาณ 3 วินาที แล้วแช่ในน้ำประปาเพื่อเพิ่มความเป็นเบส 2 นาที จากนั้น Neutralize ด้วย Saturated lithium carbonate ประมาณ 1 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่น 2 นาที

4. ย้อมสี Eosin Y เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างสีส่วนเกินและดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย 95% Alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 5 - 10 จุ่ม และ Absolute alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

5. ผ่านสไลด์ที่ย้อมสีแล้วไปยัง Xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาทีและปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วยกระจกปิดสไลด์ (Cover slit) โดยยึดด้วย Permount

นำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light microscope) โดยศึกษาเปรียบเทียบในลูกปลาตั้งแต่อายุ 0 - 46 วันหลังฟัก ถ่ายภาพสไลด์ บันทึกผล และวิเคราะห์ผล

3.4 การศึกษาทางฮีสโตเคมี

1. การศึกษาการสะสมไกลโคเจนในตับ

นำตัวอย่างลูกปลาที่ผ่านการคงสภาพด้วย Absolute alcohol เป็นเวลา 24 ชม. มาผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่นเดียวกับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาจนได้สไลด์เนื้อเยื่อ จากนั้นย้อมสไลด์ด้วยเทคนิค Best's Carmine (Mallory, 1942) โดยมีขั้นตอนการย้อมดังนี้

1. ผ่านสไลด์เนื้อเยื่อใน Xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที จากนั้นล้าง Xylene ออกใน Absolute alcohol และ 95% Alcohol อย่างละ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่น 2 นาที

2. ย้อมสี Harris's hematoxylin เป็นเวลา 10 นาที จากนั้น Differentiate ใน 1 % Acid alcohol ประมาณ 3 วินาที

3. แช่สไลด์ใน Working carmine เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นจุ่มสไลด์ใน Differentiate solution 5 - 10 จุ่ม

4. ล้างสีสไลด์ออกบางส่วนใน 80 % Alcohol 1 - 2 จุ่ม แล้วผ่านสไลด์ใน 95% Alcohol และ Absolute alcohol อย่างละ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

5. ผ่านสไลด์ที่ย้อมสีแล้วไปยัง Xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาทีและปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วยกระจกปิดสไลด์โดยยึดด้วย Permount

สไลด์ที่ย้อมแล้วบริเวณที่มีการสะสมของไกลโคเจนในเนื้อเยื่อจะย้อมติดสีชมพูถึงแดงซึ่งสามารถศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ทำการศึกษาปริมาณ และอายุที่ลูกปลาเริ่มสะสมไกลโคเจนในตับ โดยหาค่าเฉลี่ย 4 ตัวในแต่ละอายุของลูกปลา ตั้งแต่ 0 - 40 วันหลังฟัก จากนั้นถ่ายภาพสไลด์ บันทึกผล และวิเคราะห์ผล

2. การศึกษาสารเมือกในทางเดินอาหาร

นำตัวอย่างลูกปลาที่ผ่านการคงสภาพด้วย Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชม. มาผ่านกระบวนการต่าง ๆ เช่นเดียวกับการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาจนได้สไลด์เนื้อเยื่อ จากนั้นย้อมสไลด์ด้วยเทคนิค PAS & Alcian blue (Mowry, 1956) โดยมีขั้นตอนการย้อมดังนี้

1. ผ่านสไลด์เนื้อเยื่อใน Xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที จากนั้นล้าง Xylene ออกใน Absolute alcohol และ 95% Alcohol อย่างละ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่น 2 นาที

2. ย้อมสไลด์ด้วย Alcian blue solution (pH 2.5) เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น 2 นาที

3. แช่สไลด์ในสารละลาย 1 % Periodic acid 5 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น 2 นาที

4. แช่สไลด์ใน Schiff's reagent เป็นเวลา 8 นาที แล้วล้างในน้ำประปาไหล 10 นาที

5. ย้อมสไลด์ด้วย Mayer's hematoxylin ประมาณ 6 - 8 นาทีจากนั้นแช่ในน้ำประปา 2 นาที จากนั้น Neutralize ด้วย Saturated lithium carbonate ประมาณ 1 นาที แล้วแช่ในน้ำกลั่น 2 นาที

6. ดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย 95% Alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 1 นาทีและ Absolute alcohol 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

7. ผ่านสไลด์ที่ย้อมสีแล้วไปยัง Xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาทีและปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วยกระจกปิดสไลด์โดยยึดด้วย Permount

เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยเทคนิค PAS & Alcian blue สามารถจำแนกชนิดของสารเมือกได้เป็นสารเมือกมีฤทธิ์เป็นกรด (Acid mucosubstance) ซึ่งจะย้อมติดสีฟ้า และสารเมือกมีฤทธิ์เป็นกลาง (Neutral mucosubstance) ย้อมติดสีชมพู โดยนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้มาศึกษาภายภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยวิเคราะห์ถึงชนิด ปริมาณของสารเมือก ลักษณะโครงสร้างที่ผลิตสารเมือก และบริเวณที่ปรากฏในท่อทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันแต่ละระยะ จากนั้นถ่ายภาพสไลด์ บันทึกผล และวิเคราะห์ผล

3. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตส

หลังจากที่คงสภาพลูกปลาดุกลำพันใน 4 ^{o}C Absolute acetone เป็นเวลา 24 ชม. แล้ว เปลี่ยนมาแช่ใน Absolute ethanol 30 นาทีต่อด้วย Light petroleum และพาราฟินเหลว จากนั้นฝังชิ้นตัวอย่างในตัวบล็อกฝังชิ้นเนื้อ แล้วนำไปตัดตามยาวด้วยความหนา 6 μm. ติดบนสไลด์ จากนั้นย้อมสไลด์ด้วยเทคนิค Lead nitrate (Chayan et al., 1969) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ผ่านสไลด์เนื้อเยื่อลงใน Light petroleum 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที จากนั้นล้างใน Absolute acetone 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที และแช่ในน้ำกลั่น 2 นาที

2. นำสไลด์ไปแช่ใน Incubating medium ที่ 37 ^{0}C เป็นเวลา 2 ชม. แล้วล้างในน้ำกลั่น 1 นาที

3. จุ่มสไลด์ใน 1% Yellow ammonium sulphide 2 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น 2 นาที

4. ย้อมสไลด์ด้วย 1 % Eosin Y 5 นาที จากนั้นล้างในน้ำกลั่น 2 นาที แล้วปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วยกระจกปิดสไลด์โดยยึดด้วย Glycerin jelly

จากนั้นนำมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยบริเวณที่มีปฏิกิริยาของเอนไซม์จะปรากฏเป็นตะกอนสีน้ำตาลดำ ถ่ายภาพสไลด์ บันทึกผล และวิเคราะห์ผล

4. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

หลังจากที่คงสภาพลูกปลาดุกลำพันใน 4 ^{o}C Absolute acetone เป็นเวลา 24 ชม. แล้ว ผ่านตัวอย่างตามกระบวนการเหมือนกับการศึกษาเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสจนได้สไลด์เนื้อเยื่อ จากนั้นย้อมสไลด์ด้วยเทคนิค Calcium cobalt (Chayan et al., 1969) ตามขั้นตอนต่อไปนี้

1. ผ่านสไลด์เนื้อเยื่อลงใน Light petroleum 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที จากนั้นล้างใน Absolute acetone 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที และแช่ในน้ำกลั่น 2 นาที

2. นำสไลด์ไปแช่ใน Incubating medium ที่ 37 ^{0}C เป็นเวลา 2 ชม. แล้วล้างในน้ำประปาไหล 2 นาที

3. แช่สไลด์ใน 2 % Cobalt nitrate 5 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น 2 นาที

4. จุ่มสไลด์ใน 1% Yellow ammonium sulphide 2 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น 2 นาที

5. ย้อมสไลด์ด้วย 1 % Eosin Y 5 นาที จากนั้นล้างในน้ำกลั่น 2 นาที แล้วปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วยกระจกปิดสไลด์โดยยึดด้วย Glycerin jelly

จากนั้นนำมาศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยบริเวณที่มีปฏิกิริยาของเอนไซม์จะปรากฏเป็นตะกอนสีน้ำตาลดำ ถ่ายภาพสไลด์ บันทึกผล และวิเคราะห์ผล

5. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์อะไมเลส

เมื่อลูกปลาสลบด้วยความเย็นแล้วนำมาตัดชิ้นเนื้อสดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อด้วยความเย็น (Cryostat) โดยยึดตัวลูกปลาด้วย Embedding media ตัดเนื้อเยื่อที่ความหนา 8 - 10 μm. ติดเนื้อเยื่อบนสไลด์ นำสไลด์เนื้อเยื่อสดไปศึกษาการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสด้วยวิธี Substrate film (Tremblay, 1967) ตามขั้นตอนดังนี้

1. Incubate สไลด์เนื้อเยื่อใน Moist chamber (ภาชนะมีฝาปิดปูด้วยกระดาษกรองเปียก) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 45 นาที

2. แช่สไลด์ในสารละลาย Mix เป็นเวลา 1 ชม. จากนั้นล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

3. แช่สไลด์ในสารละลาย 1 % Periodic acid 15 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

4. แช่สไลด์ใน Schiff's reagent เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างในน้ำประปาไหล 5 นาที

5. ย้อมสไลด์ด้วย Harris's hematoxylin ประมาณ 10 นาทีจากนั้นแช่ในน้ำประปา 2 นาที Differentiate ใน 1% Acid alcohol ประมาณ 3 วินาที แล้วแช่ในน้ำประปา 2 นาที จากนั้นปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วยกระจกปิดสไลด์โดยยึดด้วย Glycerin jelly

สไลด์ที่ย้อมเสร็จแล้วพื้นที่ทั้งหมดจะมีสีม่วงยกเว้นบริเวณที่มีปฏิกิริยาของเอนไซม์อะไมเลสจะเกิดเป็นช่องว่างไม่ติดสี นำสไลด์มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงตรวจสอบบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดช่องว่าง ถ่ายภาพสไลด์ บันทึกผล และวิเคราะห์ผล

6. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปส

เมื่อลูกปลาสลบด้วยความเย็นแล้วนำมาตัดชิ้นเนื้อสดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อด้วยความเย็น (Cryostat) โดยยึดตัวลูกปลาด้วย Embedding media ตัดเนื้อเยื่อที่ความหนา 8 - 10 μm. ติดเนื้อเยื่อบนสไลด์ นำสไลด์เนื้อเยื่อสดไปศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสด้วยเทคนิค Tween method (Gomori, 1952 อ้างจาก Bancroft et al., 2002) ตามขั้นตอนดังนี้

1. แช่สไลด์เนื้อเยื่อใน Incubating medium เป็นเวลา 2 ชม. แล้วล้างในน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที

2. แช่ใน 2 % Lead nitrate (55 ^{0}C) เวลา 10 นาที จากนั้นล้างในน้ำกลั่น 2 นาที และน้ำประปา 10 นาที

3. จุ่มสไลด์ใน 1% Yellow ammonium sulphide 3 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น 2 นาที น้ำประปา 2 นาที แล้วปิดสไลด์เนื้อเยื่อด้วยกระจกปิดสไลด์โดยยึดด้วย Glycerin jelly

นำสไลด์มาศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง โดยบริเวณเนื้อเยื่อที่มีเอนไซม์จะเกิดปฏิกิริยาเป็นตะกอนสีน้ำตาล ถ่ายภาพสไลด์ บันทึกผล และวิเคราะห์ผล

บทที่ 3

ผลการวิจัย

1. ความสัมพันธ์ระหว่างอายุกับความยาวลำตัวทั้งหมด (Total length) และปริมาตรถุงไข่แดง (Yolk volume)

จากการวัดขนาดความยาวลำตัวทั้งหมดและปริมาตรของถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันอายุ 0 - 46 วันหลังฟัก โดยสุ่มวัดค่าอายุละ 10 ตัว ซึ่งเพาะฟักภายในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุงที่อุณหภูมิน้ำเฉลี่ย 26 - 27 ^{o}C พบว่าได้ค่าดังตารางที่ 5 และ 6 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยความยาวลำตัวทั้งหมดของลูกปลาดุกลำพันอายุ 0 - 46 วันหลังฟัก

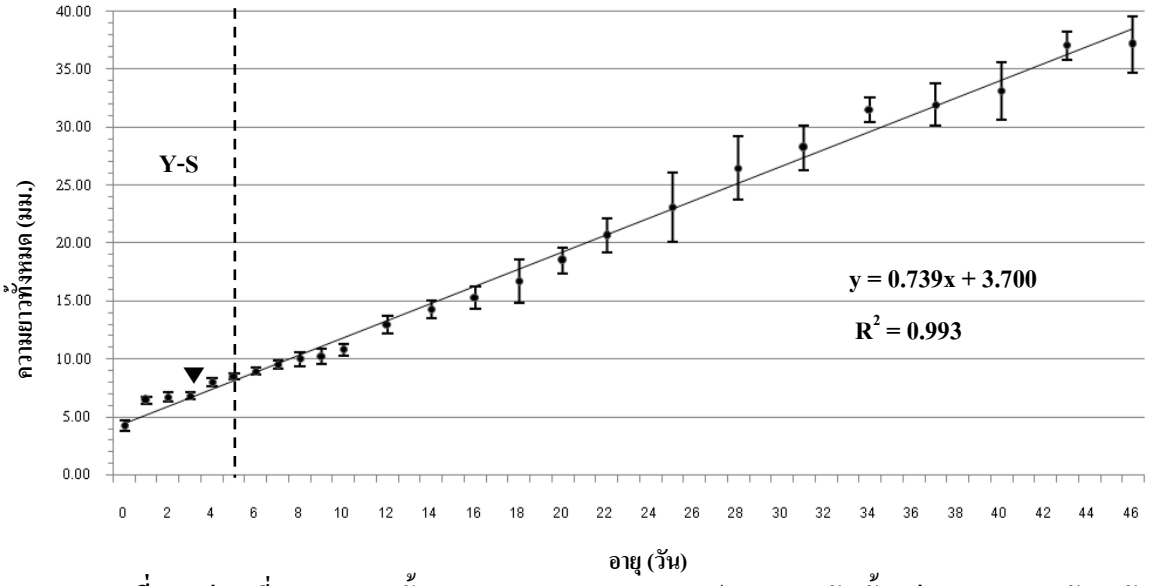
อายุหลังฟัก (วัน)	ค่าเฉลี่ย (มม.) ± SD, n = 10	อายุหลังฟัก (วัน)	ค่าเฉลี่ย (มม.) ± SD, n = 10
0	4.27 ± 0.46	16	15.29 ± 0.98
1	6.44 ± 0.32	18	16.72 ± 1.85
2	6.70 ± 0.40	20	18.49 ± 1.16
3	6.81 ± 0.31	22	20.64 ± 1.45
4	8.01 ± 0.33	25	23.13 ± 3.00
5	8.53 ± 0.25	28	26.47 ± 2.72
6	8.94 ± 0.29	31	28.22 ± 1.88
7	9.50 ± 0.34	34	31.53 ± 1.04
8	10.02 ± 0.61	37	31.96 ± 1.84
9	10.22 ± 0.62	40	33.13 ± 2.48
10	10.83 ± 0.51	43	37.07 ± 1.22
12	12.95 ± 0.77	46	37.14 ± 2.44
14	14.28 ± 0.80		

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยปริมาตรถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันอายุ 0 - 5 วันหลังฟัก

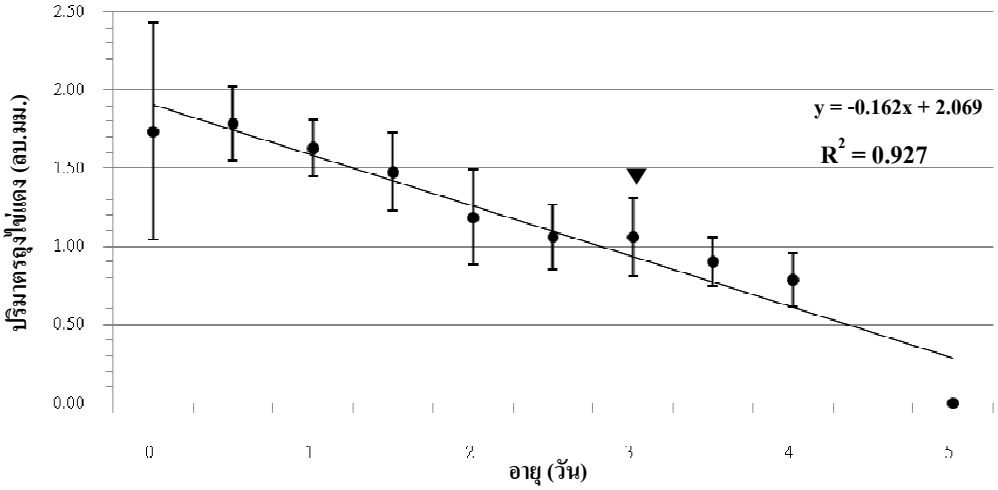
อายุหลังฟัก (วัน)	ค่าเฉลี่ย (ลบ.มม.) ± SD, n = 10	อายุหลังฟัก (วัน)	ค่าเฉลี่ย (ลบ.มม.) ± SD, n = 10
0.0	1.735 ± 0.691	2.5	1.061 ± 0.205
0.5	1.786 ± 0.234	3.0	1.059 ± 0.251
1.0	1.628 ± 0.180	3.5	0.903 ± 0.159
1.5	1.475 ± 0.251	4.0	0.787 ± 0.173
2.0	1.186 ± 0.302	5.0	-

ลูกปลาดุกลำพันแรกฟักมีความยาวทั้งหมดเฉลี่ย 4.27 ± 0.46 มม. โดยมีความยาวเพิ่มขึ้นในทุกครั้งที่สุ่มเก็บตัวอย่าง ในวันที่เริ่มให้อาหารครั้งแรก คือ อายุ 3 วันหลังฟัก ลูกปลามีความยาวทั้งหมดเฉลี่ย 6.81 ± 0.31 มม. และมีความยาวเฉลี่ยเพิ่มขึ้นเป็น 8.01 ± 0.33 มม. ในอายุ 4 วันหลังฟัก ลูกปลาดุกมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุดในวันสุดท้ายในการเก็บตัวอย่างที่อายุ 46 วันหลังฟัก คือ 37.14 ± 2.44 มม. เมื่อนำค่าความยาวเฉลี่ยทั้งหมดตั้งแต่ลูกปลาอายุ 0 - 46 วันหลังฟักมาทดสอบหาความสัมพันธ์ทางสถิติกับอายุของลูกปลาพบว่าความยาวทั้งหมดและอายุของลูกปลาดุกลำพันมีความสัมพันธ์เพิ่มขึ้นในเชิงเส้นตรง (Linear regression) โดยมีแนวโน้มความสัมพันธ์ตามสมการ $y = 0.739x + 3.700$ ซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 0.993 โดยที่ค่า y แทน ความยาวทั้งหมดและค่า x แทน อายุเป็นวันของลูกปลาดุกลำพัน (ภาพที่ 4)

ถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันมีลักษณะเป็นทรงวงรีขนาดใหญ่ติดอยู่ด้านล่างของลำตัวซึ่งสามารถคำนวณหาปริมาตรได้ด้วยสูตรการหาปริมาตรของวงรี จากการคำนวณปริมาตรถุงไข่แดงที่ปรากฏระหว่าง 0 - 4 วันหลังฟักพบว่าในลูกปลาแรกเกิดมีปริมาตรถุงไข่แดงเฉลี่ย 1.735 ± 0.691 ลบ.มม. หลังจากนั้นจะมีปริมาตรเล็กลงเรื่อย ๆ โดยสังเกตจากจุดสีน้ำตาลดำบนลำตัวที่ค่อย ๆ เจริญลงมาคลุมผิวหนังบริเวณท้องและถุงไข่แดง ในลูกปลาอายุ 4 วันหลังฟักปรากฏถุงไข่แดงมีขนาดเล็กลงมากคำนวณปริมาตรได้ค่า 0.787 ± 0.173 ลบ.มม. ลูกปลาบางตัวไม่สามารถคำนวณค่าปริมาตรได้เนื่องจากมีจุดสีน้ำตาลดำครอบคลุมบริเวณลำตัวเกือบทั้งหมด ถุงไข่แดงจะยุบตัวลงและมีจุดสีน้ำตาลดำครอบคลุมจนไม่สามารถวัดปริมาตรถุงไข่แดงได้ในลูกปลาอายุประมาณ 5 วันหลังฟัก เมื่อนำปริมาตรถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันอายุ 0 - 5 วันมาทดสอบหาความสัมพันธ์ทางสถิติกับอายุพบว่า ปริมาตรของถุงไข่แดงและอายุของลูกปลามีความสัมพันธ์ลดลงในเชิงเส้นตรง โดยมีแนวโน้มสัมพันธ์ตามสมการ $y = - 0.162x + 2.069$ ซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 0.927 โดยค่า y แทนปริมาตรถุงไข่แดงและค่า x แทนอายุเป็นวันที่เพิ่มขึ้นของลูกปลาดุกลำพัน (ภาพที่ 5)



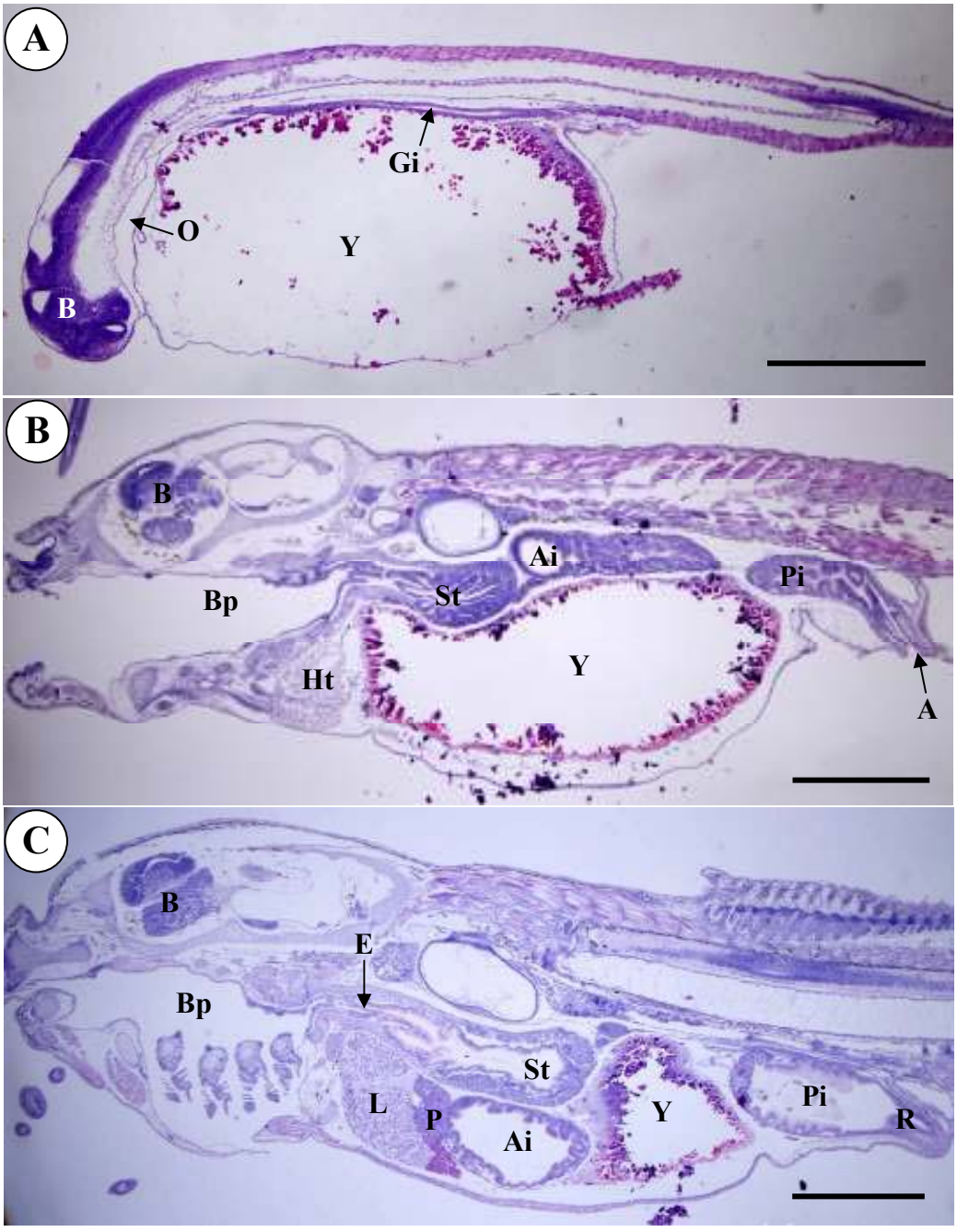
ภาพที่ 4 ค่าเฉลี่ยความยาวทั้งหมด (Total length) ของปลาดุกลำพันตั้งแต่อายุ 0 - 46 วันหลังฟัก ; Y-S = Yolk sac larvae; ▼, เวลาเริ่มต้นให้อาหาร



ภาพที่ 5 การลดลงของปริมาตรถุงไข่แดงของปลาดุกลำพันอายุ 0 - 5วันหลังฟัก; ▼, เวลาเริ่มต้นให้อาหาร

2. การยุบตัวของถุงไข่แดง (Yolk sac)

พื้นที่ส่วนใหญ่ของลำตัวลูกปลาดุกลำพันแรกเกิดเป็นถุงไข่แดง (Yolk sac) ที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบาง ๆ ติดสีม่วงโดยมีท่อทางเดินอาหารแรกเริ่มแนบอยู่ด้านบน ภายในถุงไข่แดงเป็นโยล์ค (Yolk) ซึ่งย้อมติดสีแดงของ Eosin และมักจะหลุดร่อนไประหว่างการตัดชิ้นเนื้อ (ภาพที่ 6A-C) ถุงไข่แดงจะยุบตัวลงตามปริมาตรโยล์คที่ใช้ไปตลอดการเจริญเติบโตของลูกปลา โดยมีท่อทางเดินอาหาร และอวัยวะต่าง ๆ ภายในช่องท้องเจริญเข้ามาแทนที่ เมื่อลูกปลาอายุ 4 - 6 วันหลังฟักกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น ตับและตับอ่อนที่มีขนาดใหญ่ขึ้นจะเบียดถุงไข่แดงให้เคลื่อนไปอยู่ตอนท้ายของช่องท้อง (ภาพที่ 6) และในวันที่ 7 หลังฟักพบว่าถุงไข่แดงและโยล์คสลายจากช่องท้องจนหมด แต่เมื่อสังเกตจากลักษณะภายนอกจะไม่ปรากฏถุงไข่แดงในลูกปลาอายุประมาณ 5 วันหลังฟัก เนื่องจากมีการพัฒนาจุดสีน้ำตาลดำบริเวณลำตัวด้านล่างทำให้ไม่สามารถเห็นขอบเขตของถุงไข่แดงได้ชัดเจน



ภาพที่ 6 การยุบตัวของถุงไข่แดงในลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (H&E)

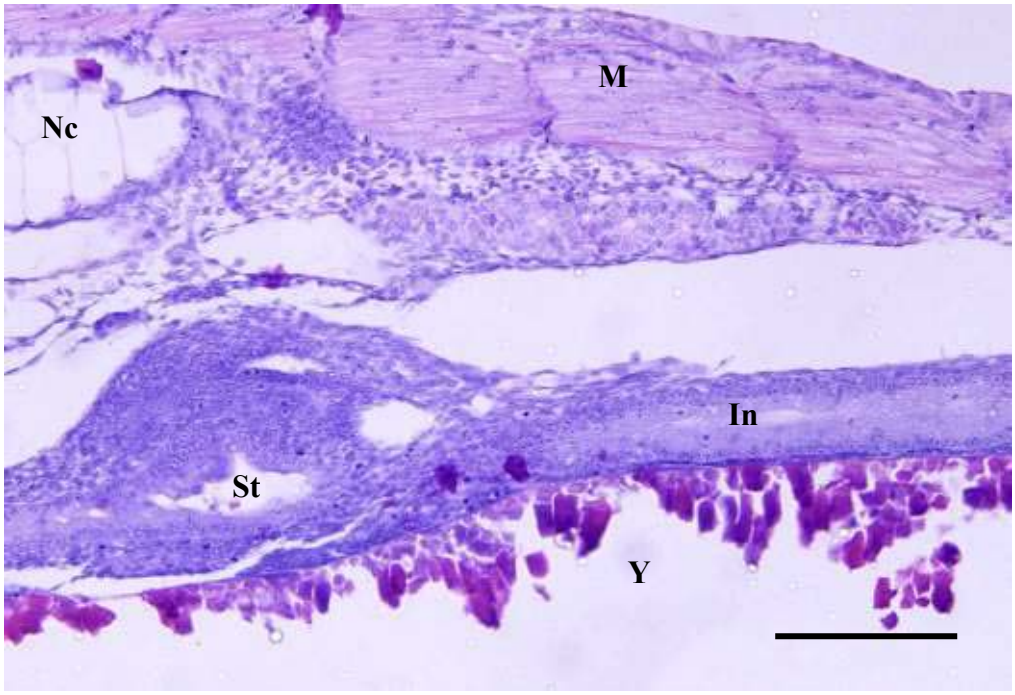
A: 6 ชั่วโมงหลังฟัก **B:** 4 วันหลังฟัก

C: 6 วันหลังฟัก

Scale bar - 0.5 mm.

3. การพัฒนาของท่อทางเดินอาหาร (Digestive tract)

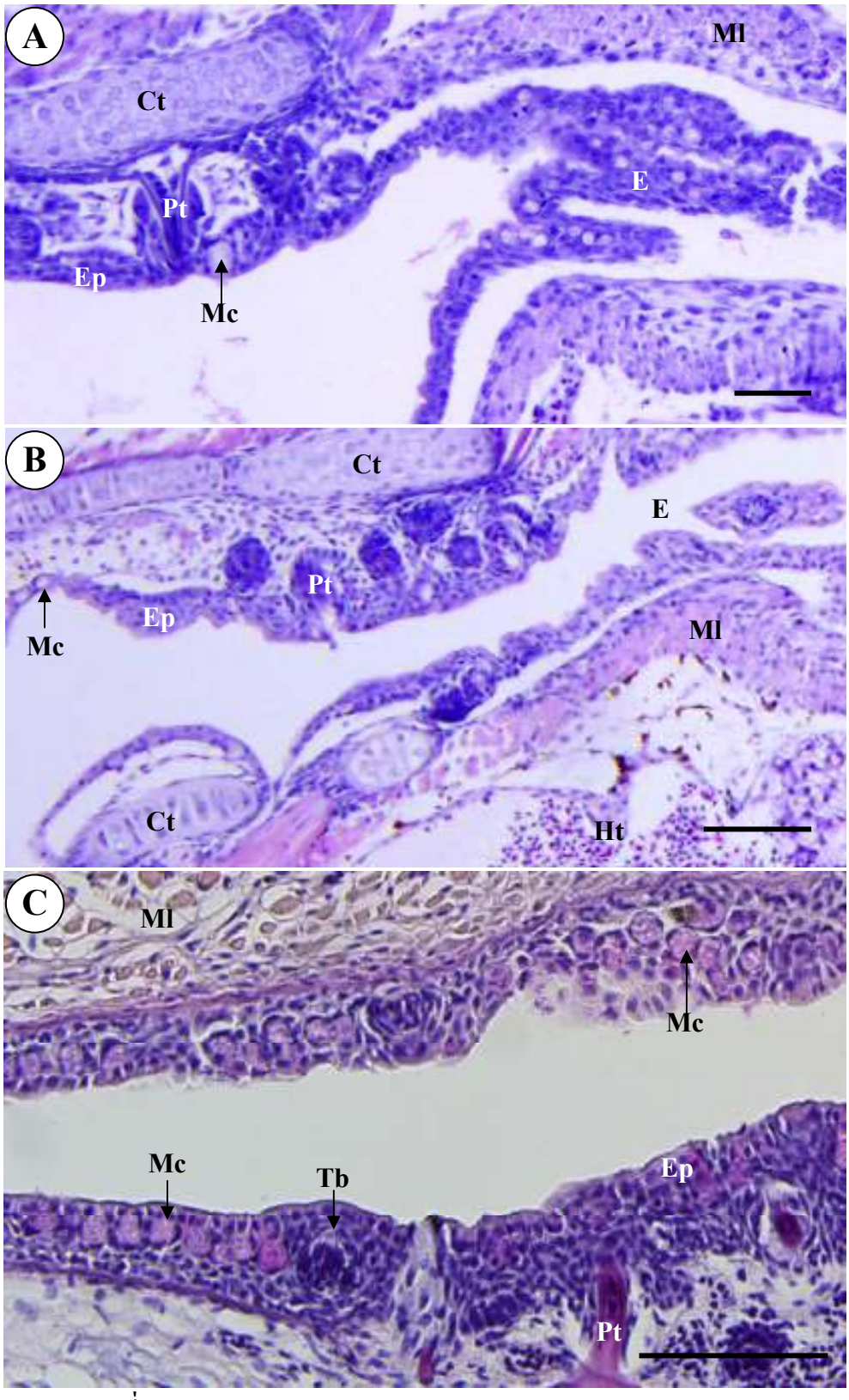
ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกหลังจากการฟัก ท่อทางเดินอาหารจะเป็นท่อตรงขนาดเล็ก วางอยู่บนถุงไข่แดง บุด้วย Simple cuboidal epithelium ส่วนต้นของท่อทางเดินอาหารเป็นช่องแคบ ๆ ของปากและคอหอย (Buccopharyngeal cavity) ที่บุด้วย Simple squamous epithelium และส่วนท้ายติดต่อกับช่องทวาร (Anus) ที่ยังไม่เปิด ท่อทางเดินอาหารมีการเพิ่มจำนวนชั้นของเซลล์อย่างรวดเร็ว และเมื่อลูกปลาอายุประมาณ 1 วันหลังฟัก ท่อทางเดินอาหารส่วนต้นก็เริ่มโป่งออก เกิดเป็นส่วนแรกเริ่มของกระเพาะที่มี Cuboidal cells ซ้อนอยู่หลายชั้น ในขณะที่ลำไส้เล็กยังเป็นท่อตรง โดยมีผนังด้านในบุด้วย Simple columnar epithelium (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 ท่อทางเดินอาหารเริ่มแรกของลูกปลาดุกลำพันอายุ 1.5 วันหลังฟัก (H&E); Scale bar - 100 µm.

ในระหว่างอายุ 1 - 3 วันหลังฟัก ขณะที่ลูกปลายังคงปรากฏถุงไข่แดง ท่อทางเดินอาหารมีการพัฒนาจนสามารถแยกได้เป็น 5 ส่วน ได้แก่ ช่องปากและคอหอย (Buccopharyngeal cavity), หลอดอาหาร (Esophagus), กระเพาะอาหาร (Stomach), ลำไส้เล็กส่วนต้น (Anterior intestine) และลำไส้เล็กส่วนปลาย (Posterior intestine) ซึ่งแต่ละส่วนมีการเจริญที่แตกต่างกันดังนี้

ช่องปากและคอหอย (Buccopharyngeal cavity) เป็นส่วนแรกสุดของท่อทางเดินอาหาร เริ่มปรากฏช่องปากตั้งแต่แรกเกิดโดยผนังภายในบุด้วย Simple squamous epithelium เมื่อลูกปลาอายุ 12 ชม.หลังฟักมีการรวมกลุ่มของเซลล์บริเวณผนังช่องปากด้านหน้าและพัฒนากลายเป็นริมฝีปากและเปิดเมื่ออายุประมาณ 1 วันหลังฟัก ในลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟักเริ่มปรากฏปุ่มของฟันคอหอย (Pharyngeal teeth bud) บริเวณผนังคอหอยด้านบนและล่าง (ภาพที่ 8A) และเริ่มพบตุ่มรับรส (Taste bud) บริเวณผนังของช่องปากบนและล่างโดยแต่ละตุ่มอยู่ห่างกันเป็นระยะ ๆ (ภาพที่ 8C) และเริ่มปรากฏเซลล์เมือก (Mucous cells) บริเวณเยื่อบุผนังช่องปากบนและล่างเมื่อลูกปลามีอายุ 4 วันหลังฟัก (ภาพที่ 8A) เยื่อบุผิวของช่องปากและคอหอยมีการพัฒนาเป็น Stratified squamous epithelium เมื่อลูกปลาอายุ 4 วันหลังฟักแต่บริเวณที่พบฟันคอหอยจะมีจำนวนชั้นมากกว่าส่วนที่เป็นช่องปาก เมื่อลูกปลาอายุประมาณ 18 วันหลังฟักเป็นต้นไปมีการพัฒนาเยื่อบุผิวของช่องปากและคอหอยหนามากขึ้น พร้อมกับเซลล์เมือกที่เพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 8C)



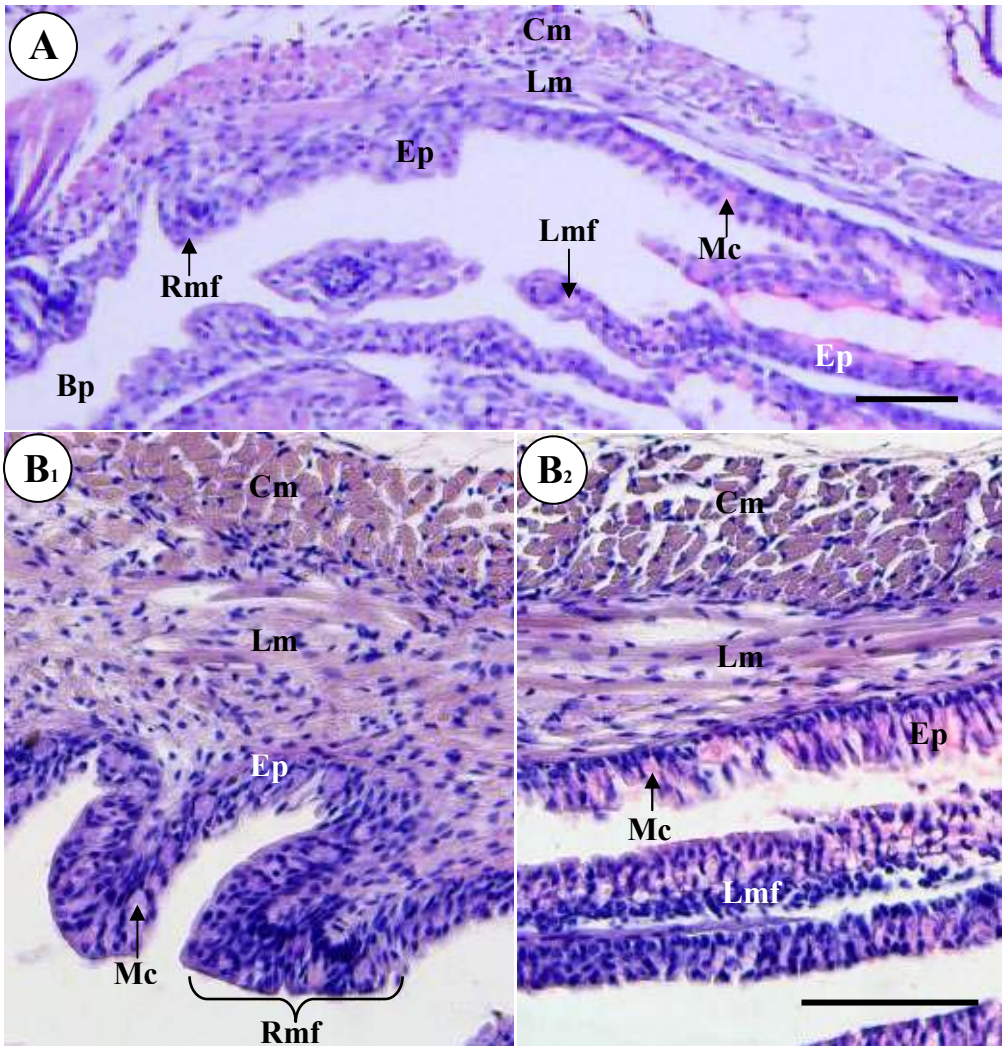
ภาพที่ 8 ช่องปากและคอหอยของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (H&E)

A: 4 วันหลังฟัก **B:** 7 วันหลังฟัก

C: 40 วันหลังฟัก

Scale bar - 50 µm.

หลอดอาหาร (Esophagus) เป็นส่วนของท่อทางเดินอาหารที่ถัดจากคอหอยเข้ามาและเชื่อมต่อกับกระเพาะอาหาร หลอดอาหารเริ่มปรากฏความแตกต่างจากท่อทางเดินอาหารส่วนอื่น ๆ เมื่ออายุประมาณ 2 วันหลังฟักโดยมีผนังบุด้วย Stratified squamous epithelium และมีชั้นกล้ามเนื้อ (Muscularis) ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อลาย (Striated muscle) บาง ๆ อยู่ชั้นล่าง เมื่อลูกปลาอายุประมาณ 3 วันหลังฟักชั้นของกล้ามเนื้อลายสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชั้น โดยชั้นในเป็นกล้ามเนื้อลายตามยาว (Longitudinal muscular layer) และชั้นนอกเป็นกล้ามเนื้อลายเรียงแบบวงกลม (Circular muscular layer) นอกจากนี้ชั้นบุผิวของหลอดอาหารมีการพัฒนามากขึ้นจนสามารถแบ่งเป็น 2 ส่วน ได้แก่ หลอดอาหารส่วนหน้า (Anterior esophagus) ซึ่งบุด้วย Stratified squamous epithelium ในขณะที่หลอดอาหารส่วนหลัง (Posterior esophagus) บุด้วย Simple columnar epithelium (ภาพที่ 9A&B) ผนังหลอดอาหารสร้างสันนูนของชั้นบุผิว (Mucosal fold) ประมาณวันที่ 4 หลังฟักโดยมีความแตกต่างกันในหลอดอาหาร 2 ส่วน กล่าวคือ หลอดอาหารส่วนหน้ามีสันนูนแนวรัศมี (Radial mucosal fold) (ภาพที่ 9A&B1) ในขณะที่หลอดอาหารส่วนหลังมีสันนูนตามยาว (Longitudinal mucosal fold) และบริเวณไซโทพลาสซึมของเซลล์บุผิวมีการติดสีแดงของ Eosin (ภาพที่ 9A&B2) หลอดอาหารเริ่มปรากฏเซลล์เมือก (ภาพที่ 9A&B) เมื่อลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟัก เมื่อลูกปลามีอายุ 7 วันหลังฟักชั้นกล้ามเนื้อทั้ง 2 ชั้นหนามากยิ่งขึ้น และมีการยกเป็นสันของชั้นบุผิวในหลอดอาหารทั้ง 2 ส่วนชัดเจนมากขึ้น เมื่อลูกปลาอายุมีอายุประมาณ 20 วันหลังฟักเซลล์เมือกมีการเพิ่มจำนวนหนาแน่นมากขึ้นบริเวณชั้นบุผิวของหลอดอาหารทั้ง 2 ส่วน (ภาพที่ 9B1&2)



ภาพที่ 9 หลอดอาหารของลูกปลาดุกลำพันอายุ 7 และ 37 วันหลังฟัก (H&E)

A: 7 วันหลังฟัก

B: 37 วันหลังฟัก (B1 - Anterior esophagus; B2 - Posterior esophagus)

Scale bar - 50 µm.

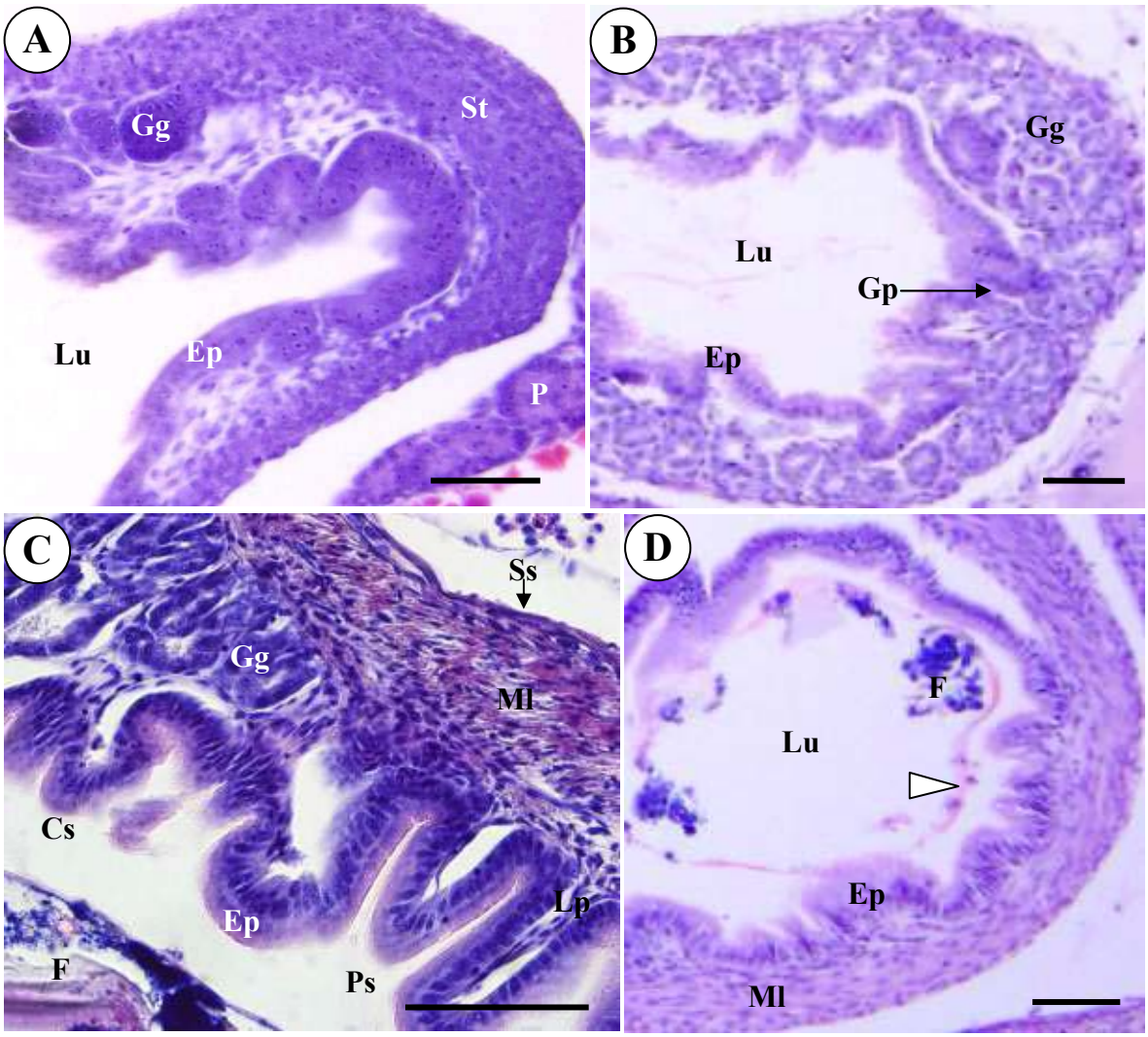
กระเพาะอาหาร (Stomach) เป็นส่วนท่อทางเดินอาหารที่ถัดจากหลอดอาหาร มีลักษณะเป็นถุงขนาดใหญ่ ในปลาดุกลำพันเริ่มปรากฏความแตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อลูกปลาอายุประมาณ 1.5 วันหลังฟักโดยส่วนกระเพาะอาหารจะมีการโป่งออกด้วย Stratified cuboidal cells ที่อยู่รวมกันอย่างหนาแน่น เมื่อลูกปลามีอายุ 2 วันหลังฟักชั้นเยื่อบุผิวจะพัฒนาเป็น Simple columnar epithelium และพบการยกตัวเป็นสันนูนของชั้นบุผิว (ภาพที่ 10A) กระเพาะอาหารสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วนเมื่อลูกปลามีอายุ 4 วันหลังฟัก ซึ่งลักษณะโดยทั่วไปเป็นถุงคล้ายตัวยู (U) กล่าวคือ กระเพาะอาหารส่วน Cardiac เป็นส่วนแรกของกระเพาะที่ต่อมาจากหลอดอาหารและมีการโค้งพับกลับมาเป็นกระเพาะส่วน Pyloric ซึ่งเชื่อมต่อไปยังลำไส้เล็กส่วนต้น กระเพาะอาหารทั้ง 2 ส่วนมีพัฒนาการทางเนื้อเยื่อดังนี้

1. Cardiac stomach เป็นส่วนต้นของกระเพาะอาหารเชื่อมต่อกับหลอดอาหาร กระเพาะส่วนนี้บุด้วย Simple columnar epithelium ที่มีการยกตัวนูนขึ้นเป็นระยะ ๆ เมื่อลูกปลาอายุประมาณ 3.5 วันหลังฟักมีการเจริญของต่อมแกสทริคในชั้นมิวโคซา (Mucosa) และมีช่องแกสทริค (Gastric pit) เปิดสู่ช่องลูเมน (Lumen) (ภาพที่ 10A&B) ส่วนต้นของกระเพาะมีชั้นกล้ามเนื้อลายเรียงแบบวงกลมต่อเนื่องมาจากหลอดอาหารมีระยะสั้น ๆ แล้วเปลี่ยนเป็นชั้นบาง ๆ ของกล้ามเนื้อเรียบเรียงแบบวงกลม (Circular smooth muscle layer) และหุ้มด้วยชั้นซีโรซา (Serosa) ซึ่งเป็นชั้นบาง ๆ ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดโปร่งบาง (Loose connective tissue) (ภาพที่ 10C) ในลูกปลาอายุ 12 วันหลังฟักมีการยกตัวขึ้นเป็นสันของชั้นมิวโคซามากขึ้นในขณะที่ผนังยังคงเป็น Simple columnar epithelium (ภาพที่ 10C)

2. Pyloric stomach เป็นส่วนของกระเพาะอาหารที่เชื่อมต่อกับกระเพาะส่วน Cardiac โดยโค้งพับกลับมาส่วนหน้าและเชื่อมต่อกับลำไส้เล็กส่วนต้น กระเพาะส่วนนี้บุด้วย Simple columnar epithelium เช่นเดียวกับกระเพาะส่วน Cardiac แต่มีการยกนูนขึ้นของชั้นมิวโคซามากกว่าและมีแกนเป็นลามินาโพรเพรีย (Laminar propria) ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดแน่นทึบ (Dense connective tissue) (ภาพที่ 10C&D) โดยเริ่มปรากฏลักษณะดังกล่าวในลูกปลาอายุประมาณ 5 วันหลังฟัก กระเพาะส่วน Pyloric ไม่มีการเจริญของต่อมแกสทริคแต่มีการเจริญของชั้นกล้ามเนื้อที่หนากว่าในกระเพาะส่วน Cardiac และยังสามารถแบ่งเป็น 2 ชั้นโดยชั้นในเป็นกล้ามเนื้อเรียบเรียงแบบวงกลมซึ่งบางกว่าชั้นนอกที่เป็นกล้ามเนื้อเรียบตามยาว (Longitudinal smooth muscle layer) ซึ่งลักษณะการพัฒนาชั้นกล้ามเนื้อนี้จะปรากฏชัดเมื่อลูกปลาอายุประมาณ 7 วันหลังฟัก (ภาพที่ 10D)

กระเพาะอาหารทั้ง 2 ส่วนในระยะหลังจากอายุ 4 วันหลังฟักเป็นต้นไปมีการเจริญอย่างต่อเนื่องทั้งด้านความยาวและความหนาของผนัง โดยกระเพาะส่วน Cardiac มีการเพิ่มความ

หนาของชั้นมิวโคซาและมีจำนวนต่อมแกสทริคมากขึ้น (ภาพที่ 10B&C) สำหรับกระเพาะส่วน Pyloric มีความถี่การยกนูนของชั้นมิวโคซามากขึ้นและมีการเพิ่มความหนาของชั้นกล้ามเนื้อเรียบโดยเฉพาะกล้ามเนื้อเรียบชั้นนอก (ภาพที่ 10C) นอกจากนี้บนพื้นผิวของเยื่อบุกระเพาะทั้ง 2 ส่วน มีการเคลือบของสารเมือกซึ่งติดสีแดงของ Eosin โดยเริ่มพบในลูกปลาอายุประมาณ 4 วันหลังฟัก (ภาพที่ 10D)



ภาพที่ 10 กระเพาะอาหารของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (H&E)

A: กระเพาะอาหาร (3.5 วันหลังฟัก) **B:** Cardiac stomach (6 วันหลังฟัก)

C: รอยต่อของกระเพาะอาหาร 2 ส่วน (25 วันหลังฟัก) **D:** Pyloric stomach (8 วันหลังฟัก)

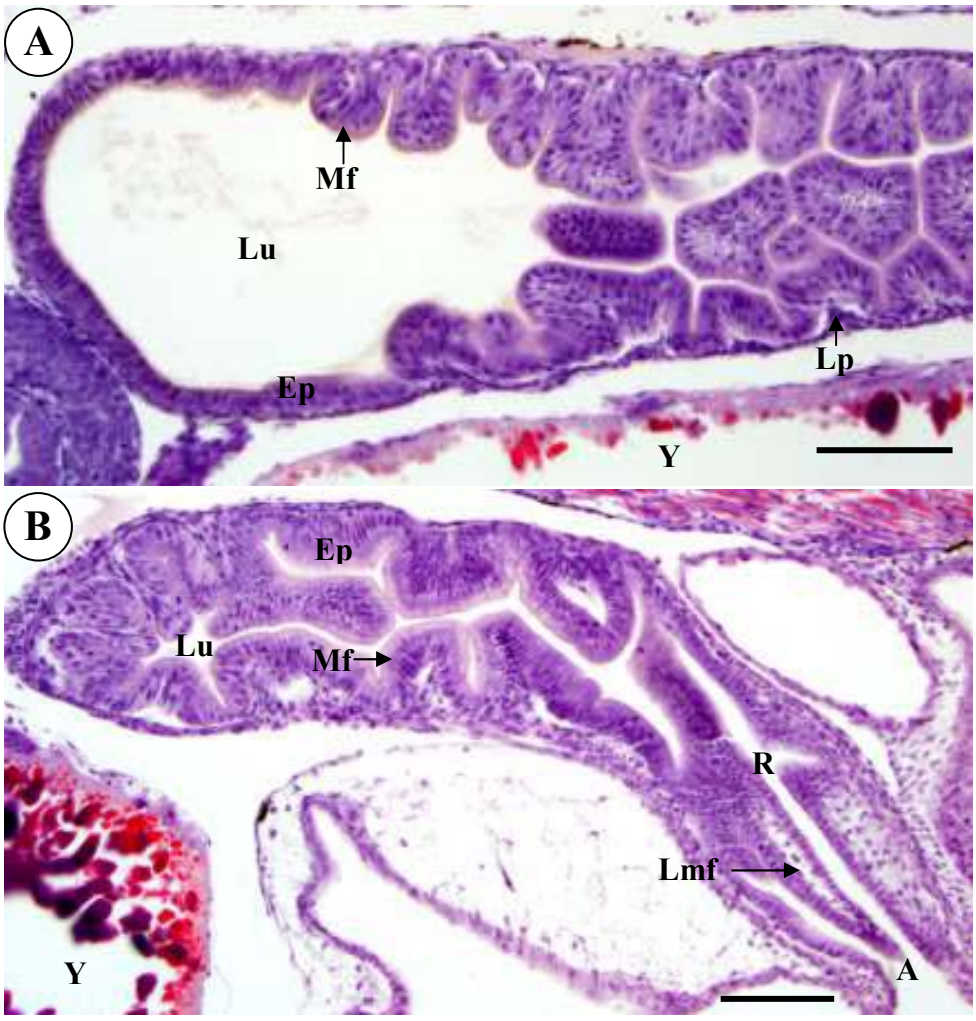
หัวลูกศรขาว - สารเมือก; Scale bar - 50 µm.

ลำไส้เล็ก (Intestine) เป็นส่วนที่ยาวที่สุดของท่อทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพัน ในช่วงอายุ 1 - 2 วันหลังฟักลำไส้เล็กมีผนังภายในบุด้วย Simple columnar epithelium โดยมีการเพิ่มขึ้นทั้งความสูงและจำนวนของเซลล์อย่างรวดเร็ว และมีการเพิ่มความยาวมากขึ้นตลอดความยาวของลำตัวจนกระทั่งมีการขดไปมาภายในช่องท้อง เมื่อลูกปลาดุกลำพันอายุ 3 วันหลังฟัก ลำไส้เล็กสามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ ลำไส้เล็กส่วนต้น (Anterior intestine) (ภาพที่ 11A) และลำไส้เล็กส่วนปลาย (Posterior intestine) (ภาพที่ 11B) โดยลำไส้เล็กส่วนต้นจะมีการขดตัวและมีความยาวมากกว่าส่วนปลายซึ่งมีลักษณะเป็นท่อตรงขนาดสั้นและเชื่อมต่อกับไส้ตรง (Rectum) (ภาพที่ 11) ซึ่งรายละเอียดทางเนื้อเยื่อของลำไส้ทั้ง 2 ส่วนมีดังนี้

1. ลำไส้เล็กส่วนต้น (Anterior intestine) เป็นส่วนทางเดินอาหารที่ต่อจากกระเพาะอาหารส่วน Pyloric (ภาพที่ 12C) ลำไส้เล็กส่วนนี้ผนังภายในบุด้วย Simple columnar epithelium ซึ่งพื้นผิวผนังมี Striated border ติดสีแดงของ Eosin ตลอดความยาวของลำไส้ และเมื่อลูกปลามีอายุประมาณ 3 วันหลังฟักผนังลำไส้เริ่มยกขึ้นเป็นสันนูนพร้อม ๆ กับการเกิดชั้นลามินาโพรเพรียซึ่งเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดโปร่งใส (ภาพที่ 11A) สันนูนดังกล่าวเพิ่มความสูงมากขึ้นอย่างรวดเร็วจนเป็นวิลไล (Villi) ในลูกปลาอายุประมาณ 5 วันหลังฟักซึ่งมีลักษณะคล้ายนิ้วมือยื่นเข้าไปในช่องลูเมน (ภาพที่ 12A) ถัดจากชั้นลามินาโพรเพรียจะเป็นชั้นบาง ๆ ของกล้ามเนื้อเรียบ (Muscularis mucosae) โดยเริ่มปรากฏชัดเจนในลูกปลาอายุประมาณ 3 - 4 วันหลังฟัก และชั้นนอกสุดถูกหุ้มด้วยซีโรซาเช่นเดียวกับกระเพาะอาหาร Goblet cells เริ่มปรากฏในลำไส้ส่วนต้นเมื่อลูกปลาอายุ 4 วันหลังฟักโดยพบกระจายเป็นระยะ ๆ ในชั้นของมิวโคซา (ภาพที่ 12B)

2. ลำไส้เล็กส่วนปลาย (Posterior intestine) เป็นส่วนของลำไส้ที่เชื่อมต่อกับลำไส้เล็กส่วนต้นมีลักษณะเป็นท่อตรงขนาดสั้นที่ผนังภายในบุด้วย Simple columnar epithelium เช่นเดียวกับในลำไส้เล็กส่วนต้นแต่มีลักษณะที่แตกต่างออกไป กล่าวคือส่วนบนของไซโทพลาสซึมของเซลล์บุผิวจะพบ Supranuclear vesicles เป็นส่วนที่ย้อมไม่ติดสี H&E โดยเริ่มปรากฏลักษณะนี้ในลูกปลาอายุ 4 วันหลังฟัก (ภาพที่ 11B&13A) นอกจากนี้ลำไส้เล็กส่วนปลายยังมีความถี่และความสูงของสันนูนบนผนังน้อยกว่าลำไส้เล็กส่วนต้นโดยเริ่มมีการยกตัวเป็นสันของผนังในลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟัก สำหรับ Goblet cells เริ่มปรากฏในลำไส้เล็กส่วนปลายเพียงเล็กน้อยในลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟัก ส่วนของชั้นกล้ามเนื้อเรียบและชั้นซีโรซามีลักษณะเช่นเดียวกับลำไส้เล็กส่วนต้น (ภาพที่ 13B) ส่วนปลายของลำไส้เล็กส่วนปลายเปิดออกสู่ภายนอกทางไส้ตรงซึ่งบุด้วย Simple columnar epithelium เช่นเดียวกันแต่ไม่ปรากฏ Supranuclear vesicles และมีสันนูนของผนังในแนวยาว นอกจากนี้ยังมีชั้นกล้ามเนื้อเรียบที่หนาอีกด้วย (ภาพที่ 11B) ไส้ตรงเริ่มพัฒนาแยกจากลำไส้เล็กส่วนปลายในลูกปลาอายุประมาณ 4 วันหลังฟัก

หลังจากลูกปลามีอายุได้ 5 วันหลังฟักซึ่งพัฒนาองค์ประกอบทางเนื้อเยื่อส่วนลำไส้ครบถ้วนแล้ว ลูกปลามีการพัฒนาของลำไส้เล็กทั้ง 2 ส่วนโดยมีการเพิ่มขึ้นในด้านของความยาวและความกว้างของลำไส้ โดยที่ลำไส้ทั้ง 2 ส่วนมีการเพิ่มความสูงของเซลล์บุผิวและนิวเคลียสเคลื่อนไปอยู่ส่วนฐานของเซลล์ ในลูกปลาอายุ 20 - 46 วันหลังฟักพบวิลไลในลำไส้เล็กส่วนต้นมีการเพิ่มความยาวไปยังลูเมนมากขึ้น (ภาพที่ 12B&C) ส่วนลำไส้เล็กส่วนปลายมีจำนวนของ Supranuclear vesicles มากขึ้นจนเกือบเต็มพื้นที่ของเซลล์บุผิวทั้งหมดในลูกปลาอายุที่มีมากขึ้น (ภาพที่ 13B)

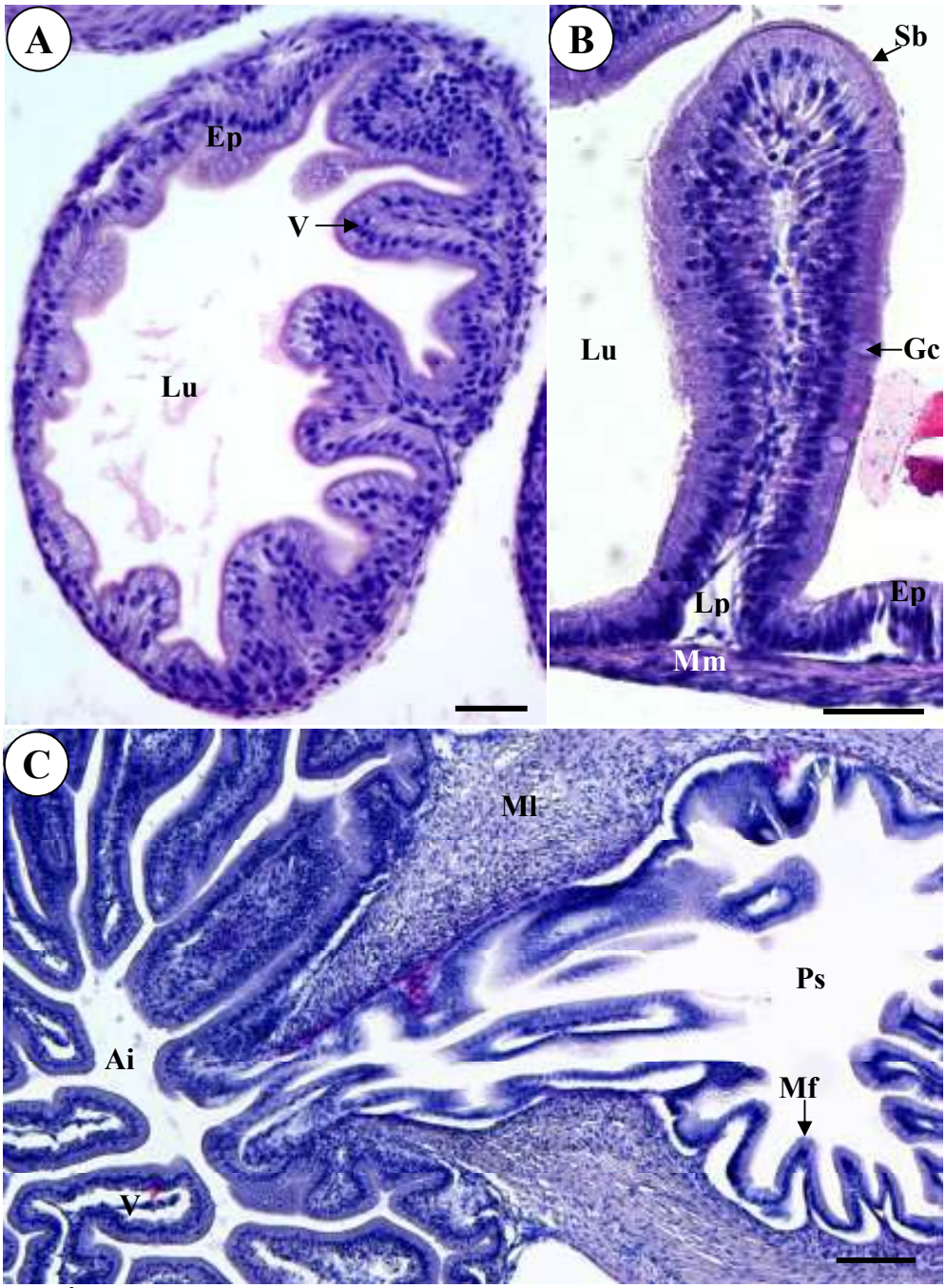


ภาพที่ 11 ลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลายของลูกปลาดุกลำพันอายุ 4 วันหลังฟัก (H&E)

A: ลำไส้เล็กส่วนต้น

B: ลำไส้เล็กส่วนปลาย

Scale bar - 50 μm.



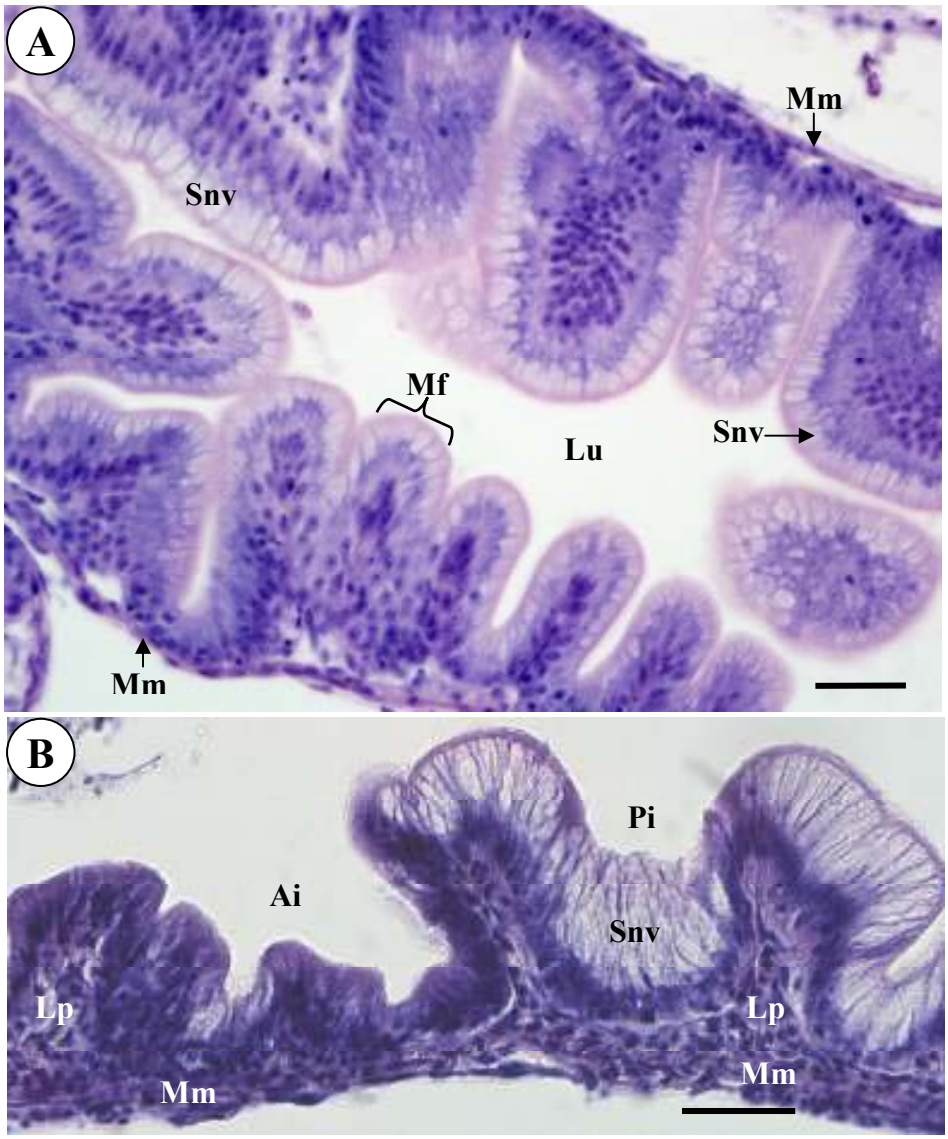
ภาพที่ 12 ลำไส้เล็กส่วนต้นของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (H&E)

A: ลำไส้เล็กส่วนต้น (8 วันหลังฟัก)

B: วิลไลของลำไส้เล็กส่วนต้น (46 วันหลังฟัก)

C: ทางผ่านของกระเพาะ Pyloric สู่ลำไส้เล็กส่วนต้น (40 วันหลังฟัก)

Scale bar **A&B** - 20 µm; **C** - 50 µm.



ภาพที่ 13 ลำไส้เล็กส่วนปลายของลูกปลาดุกลำพันอายุ 10 และ 46 วันหลังฟัก (H&E)

A: ลำไส้เล็กส่วนปลาย (10 วันหลังฟัก)

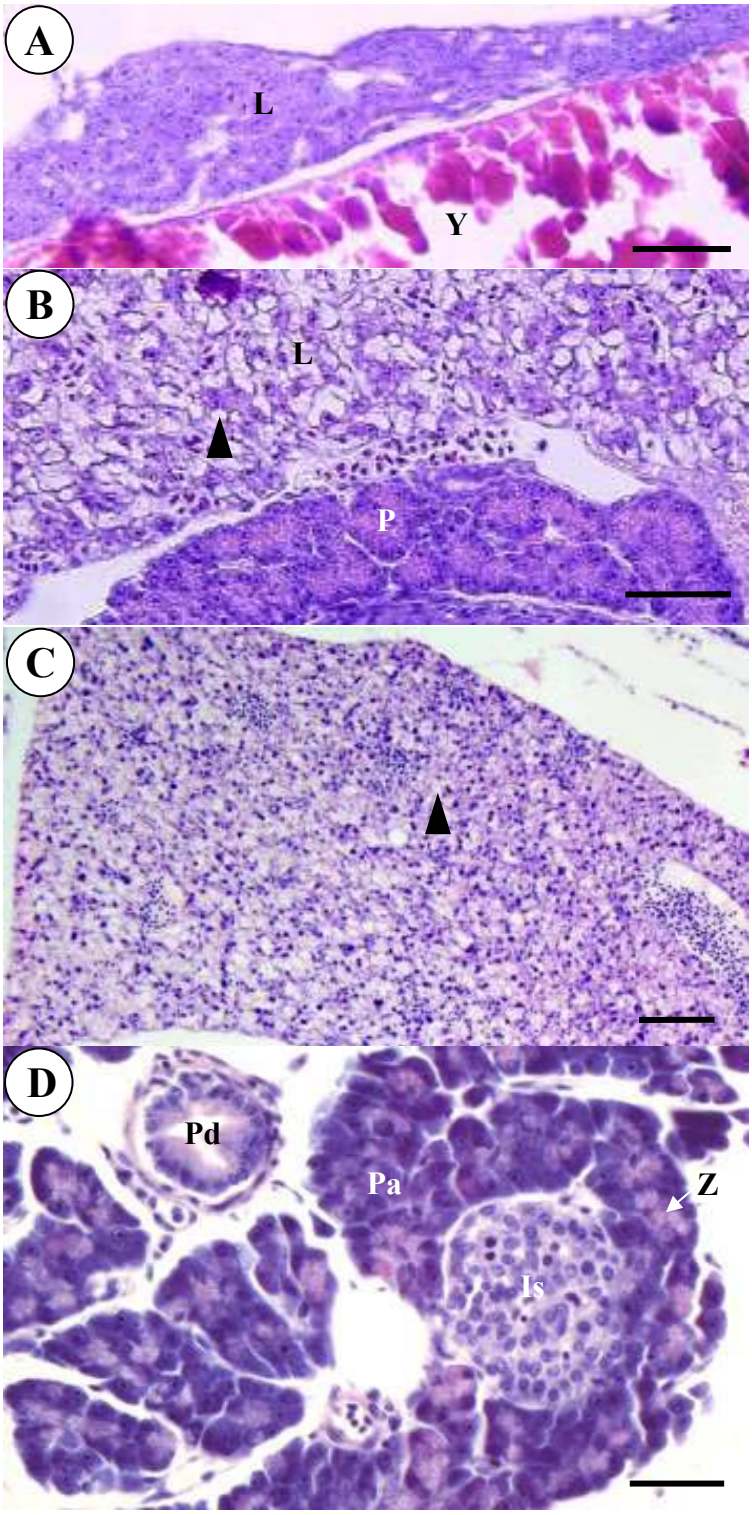
B: รอยต่อของลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลาย (46 วันหลังฟัก)

Scale bar - 20 µm

4. การพัฒนาของตับ (Liver) และตับอ่อน (Pancreas)

ตับและตับอ่อนยังไม่มีการพัฒนาในลูกปลาแรกเกิดจนกระทั่งลูกปลาอายุประมาณ 1.5 วันหลังฟัก (36 ชม.) จะเริ่มเห็นกลุ่มของเซลล์ตับ (Hepatocyte) มีลักษณะกลมเจริญอยู่บนท่อทางเดินอาหารส่วนต้น (ภาพที่ 14A) และมีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้นอย่างรวดเร็ว (2 - 6 วันหลังฟัก) บริเวณด้านหน้าของท่อทางเดินอาหารจนมีขนาดใหญ่และเริ่มย้ายตำแหน่งลงมาอยู่ใต้หลอดอาหารและกระเพาะอาหารแทนที่ถุงไข่แดงที่กำลังสลายไปในลูกปลาอายุ 4 วันหลังฟัก (ภาพที่ 14B) และเมื่อลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟักเริ่มปรากฏหยดไขมัน (Oil Droplet) ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดกลมย้อมไม่ติดสี H&E ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ตับ (ภาพที่ 14B) ตับในลูกปลาระยะหลัง (10 - 46 วันหลังฟัก) มีการพัฒนาจนมีขนาดใหญ่และเซลล์ตับส่วนใหญ่สะสมไขมันจำนวนมาก (ภาพที่ 14C)

สำหรับตับอ่อนจะเริ่มสังเกตเห็นได้ในลูกปลาอายุประมาณ 2 วันหลังฟัก โดยพบเป็นกลุ่มของ Pancreatic acinar cells อยู่ตอนท้ายของตับ (ภาพที่ 14B) ส่วนยอดของ Acinar ปรากฏ Zymogen granules ซึ่งเป็นเม็ดเล็ก ๆ ติดสีแดงของ Eosin (ภาพที่ 14B&D) ตับอ่อนเมื่อพัฒนามากขึ้นจะมีการย้ายตำแหน่งเช่นเดียวกับตับลงมาอยู่แนบกับลำไส้เล็กส่วนต้นในลูกปลาอายุประมาณ 4 วันหลังฟัก และพัฒนาท่อน้ำย่อยของตับอ่อน (Pancreatic duct) ซึ่งบุด้วย Simple columnar epithelium ไปเชื่อมต่อกับลำไส้เล็กส่วนต้น (ภาพที่ 14D)



ภาพที่ 14 ตับและตับอ่อนของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (H&E)

A: ตับ (1.5 วันหลังฟัก) **B:** ตับและตับอ่อน (3.5 วันหลังฟัก)

C: ตับ (20 วันหลังฟัก) **D:** ตับอ่อน (16 วันหลังฟัก)

หัวลูกศรดำ - Oil droplet; Scale bar **A - C** - 50 µm; **D** - 20 µm.

จากการแบ่งระยะของการเจริญเติบโตด้วยลักษณะโครงสร้างภายนอกตามวิธีการของ Balon (Huysentruyt et al., 2009) ได้เป็น 4 ระยะนั้น พบว่าแต่ละระยะสามารถสรุปการพัฒนาเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารเป็นลำดับดังนี้ (ตารางที่ 7)

ระยะ Eleutherembryonic phase (ภาพที่ 15A) เป็นช่วงเวลาสั้น ๆ ตั้งแต่ลูกปลาออกจากไข่จนกระทั้งเริ่มกินอาหารจากภายนอกครั้งแรก ในลูกปลาดุกลำพันมีระยะนี้เพียง 4 วันแต่พบว่ามีการพัฒนาโครงสร้างสำคัญในอวัยวะส่วนต่าง ๆ อย่างรวดเร็ว เช่น การสร้าง Zymogen granules ในตับอ่อน และการสร้างเซลล์เมือกในหลอดอาหาร เป็นต้น ในขณะที่ลูกปลายังคงมีถุงไข่แดงปรากฏอยู่

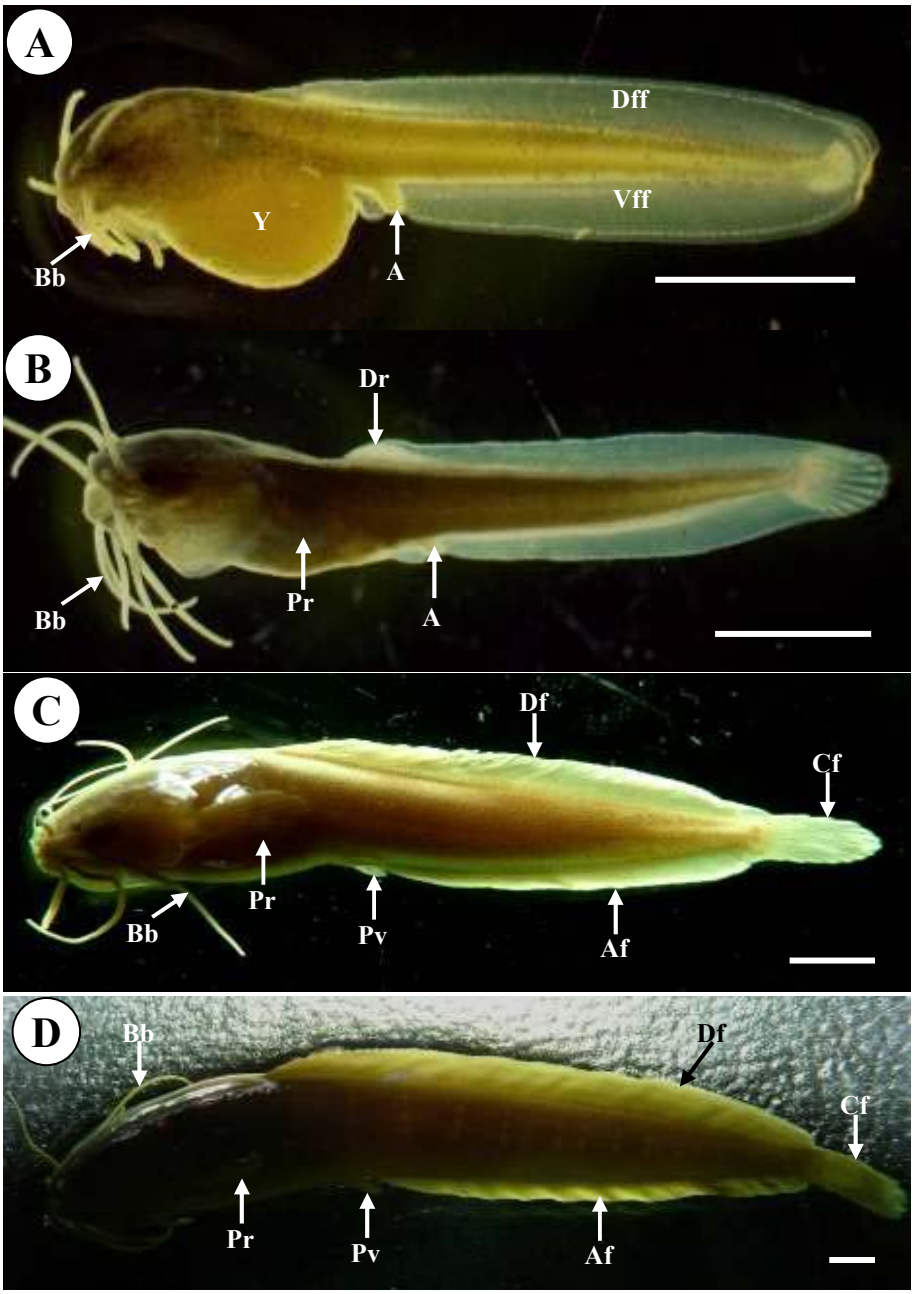
ระยะ Protopterygiolarval phase (ภาพที่ 15B) เป็นช่วงที่ลูกปลาเริ่มกินอาหารจากภายนอกจนถึงการเริ่มพัฒนาครีบต่าง ๆ (Finfold formation) โดยกำหนดจากการสร้างแกนกระดูกของครีบในแนวตั้งและแนวนอนของลูกปลาซึ่งจะเริ่มมีลักษณะดังกล่าวในลูกปลาดุกลำพันอายุประมาณ 6 วันหลังฟัก ในช่วงเวลานี้มีการเจริญของเม็ดสีบนผิวหนังอย่างรวดเร็วจนทำให้ลูกปลามีสีน้ำตาลทั้งตัว ระยะนี้ลูกปลามีการยุบตัวของถุงไข่แดงจนหมดและมีการพัฒนาโครงสร้างต่าง ๆ ของระบบย่อยอาหารจนครบแต่อาจมีจำนวนไม่มาก เช่น ตุ่มรับรสและเซลล์เมือกในช่องปาก Goblet cells ในลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลาย Supranuclear vesicles ในลำไส้เล็กส่วนปลายและหยดไขมันในตับอ่อน

ระยะ Pterygiolarval phase (ภาพที่ 15C) เป็นช่วงเวลาที่ลูกปลากำลังมีการพัฒนาครีบต่าง ๆ จนสมบูรณ์เหมือนกับตัวเต็มวัยซึ่งลูกปลาดุกลำพันใช้เวลาพัฒนาประมาณ 10 วัน (7 - 16 วันหลังฟัก) ในระยะนี้ลูกปลามีโครงสร้างต่าง ๆ ภายในระบบย่อยอาหารสมบูรณ์ มีการเพิ่มขนาดของท่อทางเดินอาหารให้หนาและยาวมากขึ้น และพบว่าตับมีขยายใหญ่ขึ้นมากและมีหยดไขมันมากขึ้น

ระยะ Juvenile period (ภาพที่ 15D) เป็นช่วงเวลาที่ยาวนานของลูกปลาที่มีโครงสร้างภายนอกเหมือนตัวเต็มวัยแต่ยังไม่มีการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ ในระยะนี้อวัยวะในระบบย่อยอาหารของลูกปลาไม่มีการเปลี่ยนแปลงมากนัก มีการเพิ่มความหนาของผนังท่อทางเดินอาหารเพียงเล็กน้อยในแต่ละอายุของปลาจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลองที่ลูกปลาอายุ 46 วันหลังฟัก

ตารางที่ 7 ตารางสรุปพัฒนาการเนื้อเยื่อระบบทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันที่ระยะต่าง ๆ

Phase Organ	Ee (0 - 3 DAH)	Ppl (4 - 6 DAH)	Pl (7 - 16 DAH)	Jp (17 - 46 DAH)
ช่องปากและคอหอย	-บุด้วย Simple squamous epithelium -ปรากฏปุ่มฟันคอหอย -ปากเปิด	-บุด้วย Simple squamous epithelium -ปรากฏเซลล์เมือก -ปรากฏตุ่มรับรส	-บุด้วย Stratified squamous epithelium -เซลล์เมือกเพิ่มจำนวนมากขึ้น	
หลอดอาหาร	-บุด้วย Simple squamous epithelium -พัฒนาชั้นกล้ามเนื้อลายเป็น 2 ชั้น -สามารถแบ่งเป็น 2 ส่วน -ปรากฏเซลล์เมือก	-ผนังหลอดอาหารทั้ง 2 ส่วนมีการยกเป็นสันนูน -ชั้นกล้ามเนื้อลายหนาขึ้น	-เพิ่มความยาวและความกว้างของหลอดอาหาร -เซลล์เมือกเพิ่มจำนวนมากขึ้น	
กระเพาะอาหาร	-บุด้วย Simple columnar epithelium -ผนังเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น	-กระเพาะแบ่งเป็น 2 ส่วน : Cardiac และ Pyloric, เคลือบด้วยสารเมือก -Cardiac: ปรากฏต่อมแกสทริค, ชั้นกล้ามเนื้อเรียบ, ผนังโค้งเป็นระยะ ๆ -Pyloric: ผนังโค้งเป็นระยะ ๆ , ชั้นกล้ามเนื้อเรียบหนา	-Cardiac: ต่อมแกสทริคจำนวนมากขึ้น, ผนังยกตัวมากขึ้น -Pyloric: ชั้นกล้ามเนื้อเรียบหนามากขึ้น, ผนังยกตัวสูงขึ้น	-เพิ่มความหนาและความยาวทั้ง 2 ส่วน
ลำไส้เล็กส่วนต้น	-บุด้วย Simple columnar epithelium	-บุด้วย Simple columnar epithelium -ปรากฏวิลไล และ Striated border -ปรากฏ Goblet cells	-เพิ่มความยาวและการขดตัว -วิลไลสูงขึ้น	-หน้าตัดกว้างขึ้น -วิลไลสูงขึ้น
ลำไส้เล็กส่วนปลาย	-บุด้วย Simple columnar epithelium	-บุด้วย Simple columnar epithelium -ปรากฏ Supranuclear vesicles -ผนังโค้งขึ้น -ปรากฏ Goblet cells	-ผนังโค้งมากขึ้น -Supranuclear vesicles จำนวนมากขึ้น	-หน้าตัดกว้างขึ้น -Supranuclear vesicles จำนวนมากขึ้น
ตับและตับอ่อน	-ปรากฏกลุ่มเซลล์ตับและตับอ่อน -ปรากฏ Zymogen granules ในตับอ่อน	-เซลล์ตับและตับอ่อนเพิ่มจำนวนมากขึ้น -ปรากฏหยดไขมันในตับ	-ตับและตับอ่อนเพิ่มขนาดและเคลื่อนลงมาใต้กระเพาะติดกับลำไส้เล็กส่วนต้น -หยดไขมันในตับมากขึ้น	-ตับขยายขนาดและมีหยดไขมันมากขึ้น



ภาพที่ 15 ลักษณะภายนอกของลูกปลาระยะต่าง ๆ

A: Eleutherembryonic phase (3 วันหลังฟัก) **B:** Protopterygiolarval phase (6 วันหลังฟัก)

C: Pterygiolarval phase (16 วันหลังฟัก) **D:** Juvenile period (46 วันหลังฟัก)

Scale bar - 5 mm.

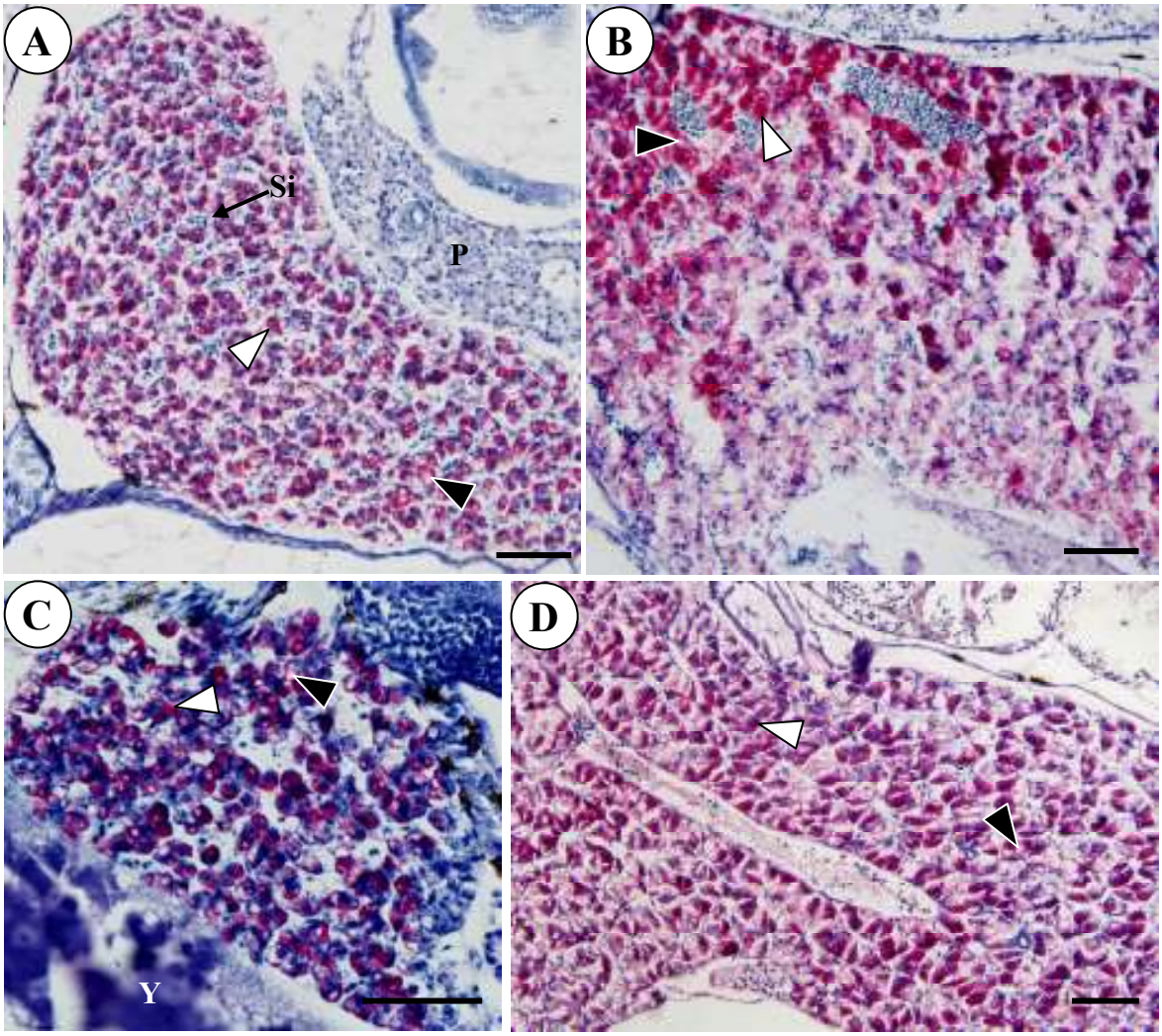
5. การสะสมไกลโคเจนในตับ

จากการย้อมสี Best's carmine เนื้อเยื่อตับของลูกปลาดุกลำพันอายุ 2 - 40 วันหลังฟัก พบไกลโคเจนเป็นส่วนที่ติดสีชมพูแดงอยู่ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ตับ (Hepatocyte) โดยเริ่มพบมีการสะสมตั้งแต่อายุ 2 วันหลังฟัก (ระยะ leutherembryonic) แต่มีเพียงบางเซลล์และมีปริมาณไม่มากนัก (ภาพที่ 16C) และพบมีการสะสมไกลโคเจนครบทุกเซลล์ในลูกปลาอายุประมาณ 4 วันหลังฟัก และมีปริมาณภายในเซลล์มากขึ้น (ระยะ Protopterygiolarval) (ตารางที่ 8, ภาพที่ 16A) การสะสมไกลโคเจนในตับของลูกปลาช่วงอายุ 6 - 40 วันหลังฟักมีปริมาณไม่แน่นอน บางส่วนสลายไปเนื่องจากพบว่าภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ตับมีสีชมพูจางลง (ภาพที่ 16B) นอกจากนี้เซลล์ตับบางเซลล์ยังพบการสะสมหยดไขมัน (Oil droplet) ซึ่งมีลักษณะเป็นเม็ดกลมย้อมไม่ติดสีอยู่ภายในไซโทพลาสซึมโดยเริ่มพบในลูกปลาอายุประมาณ 3 วันหลังฟัก โดยในลูกปลาแต่ละตัวมีปริมาณไม่แน่นอนแต่มีแนวโน้มมากขึ้นเมื่อลูกปลาอายุมากขึ้น

ตารางที่ 8 ปริมาณไกลโคเจนในตับของลูกปลาดุก-ลำพันในระยะต่าง ๆ

Phase	Glycogen storage
e (0 - 3 DAH)	++
Ppl (4 - 6 DAH)	+++
Pl (7 - 16 DAH)	+++
Jp (17 - 40 DAH)	++++

ปริมาณไกลโคเจนน้อย (+) – มากที่สุด (++++)



ภาพที่ 16 ตับลูกปลาดุกลำพันที่อายุต่าง ๆ (Best's Carmine)

A: 5 วันหลังฟัก **B:** 10 วันหลังฟัก

C: 3 วันหลังฟัก **D:** 40 วันหลังฟัก

หัวลูกศรขาว - Glycogen deposit; หัวลูกศรดำ - Oil droplet; Scale bar - 40 µm.

6. สารเมือกในทางเดินอาหาร

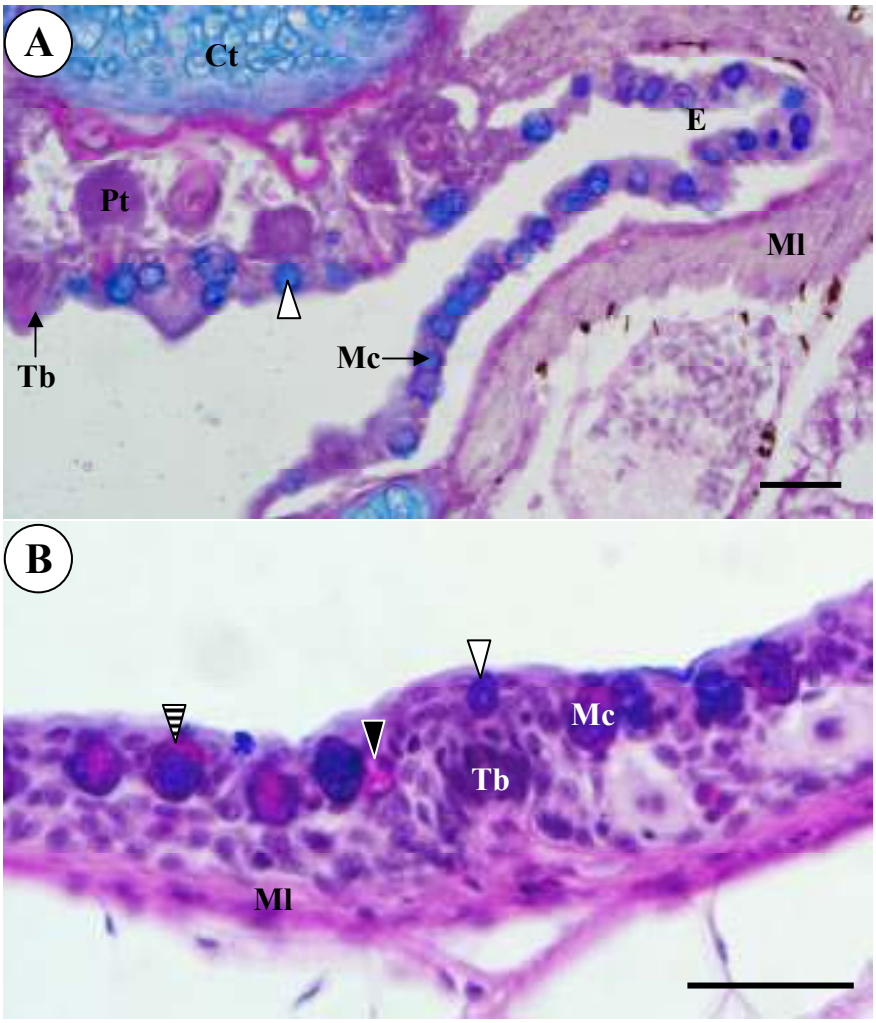
จากการศึกษาปริมาณสารเมือก (Mucosubstance) ในทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ โดยเทคนิคการย้อม PAS & Alcian blue (pH 2.5) ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาสารเมือกทั้งชนิดที่มีฤทธิ์เป็นกรด (สีฟ้า) และเป็นกลาง (สีชมพู) พบว่าสารเมือกทั้งสองชนิดปรากฏอยู่บริเวณส่วนต่าง ๆ ของทางเดินอาหาร ได้แก่ ช่องลูเมนของท่อทางเดินอาหาร เซลล์เมือกในช่องปากและหลอดอาหาร ปลายด้านบนของเซลล์บุผิวของกระเพาะ และ Goblet cells ในลำไส้เล็ก

เริ่มพบสารเมือกมีฤทธิ์เป็นกรดในเซลล์เมือกของหลอดอาหารและใน Goblet cells ของลำไส้เล็กในลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟักโดยพบปริมาณเพียงเล็กน้อย (ภาพที่ 19A) สารเมือกมีฤทธิ์เป็นกลางเริ่มพบครั้งแรกในลูกปลาอายุ 4 วันหลังฟักในเซลล์เมือกของหลอดอาหารส่วนหลัง (ภาพที่ 18A) และพบเฉพาะสารเมือกชนิดนี้ตลอดช่วงการเจริญเติบโตเช่นเดียวกับในกระเพาะอาหารที่เริ่มปรากฏสารเมือกชนิดนี้เมื่ออายุ 4 วันหลังฟัก (ภาพที่ 18C) ส่วนลำไส้เล็กส่วนปลายพบ Goblet cells จำนวนน้อยซึ่งภายในเป็นสารเมือกมีฤทธิ์เป็นกรดเพียงชนิดเดียว (ภาพที่ 19C) นอกจากนี้ยังปรากฏบริเวณที่มีสารเมือกทั้งสองชนิดและชนิดผสม ได้แก่ เซลล์เมือกของช่องปากและคอหอยในลูกปลาอายุ 25 วันหลังฟัก (ภาพที่ 17B) เซลล์เมือกของหลอดอาหารส่วนหน้า (ภาพที่ 18B) และ Goblet cells ของลำไส้เล็กส่วนต้นในลูกปลาอายุ 7 วันหลังฟัก (ภาพที่ 19B) โดยอวัยวะเหล่านี้ในช่วงแรกพบเพียงเซลล์เมือกมีฤทธิ์เป็นกรดเพียงชนิดเดียว สารเมือกที่พบในบริเวณต่าง ๆ ของทางเดินอาหารมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น โดยพบเซลล์เมือกจำนวนมากที่สุดในหลอดอาหารทั้งส่วนหน้าและหลัง (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ปริมาณสารเมือกที่มีฤทธิ์เป็นกรดและกลางในทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ

Organ	Bp		Ae		Pe		St		Ai		Pi	
Phase	Am	Nm	Am	Nm	Am	Nm	Am	Nm	Am	Nm	Am	Nm
Ee (0 - 3 DAH)	0	0	+1	-	+1	-	0	0	+1	-	+1	-
Ppl (4 - 6 DAH)	+1	0	+3	0	0	+3	0	+2	+1	0	+1	0
Pl (7 - 16 DAH)	+1	0	+3	+1	0	+3	0	+2	+2	+1	+2	0
Jp (17 - 46 DAH)	+1	+1	+3	+2	0	+4	0	+3	+2	+1	+1	0

ปริมาณสารเมือกที่มีฤทธิ์เป็นกรด (Am) และกลาง (Nm) - ไม่พบ (0) ถึง พบมากที่สุด (+4)

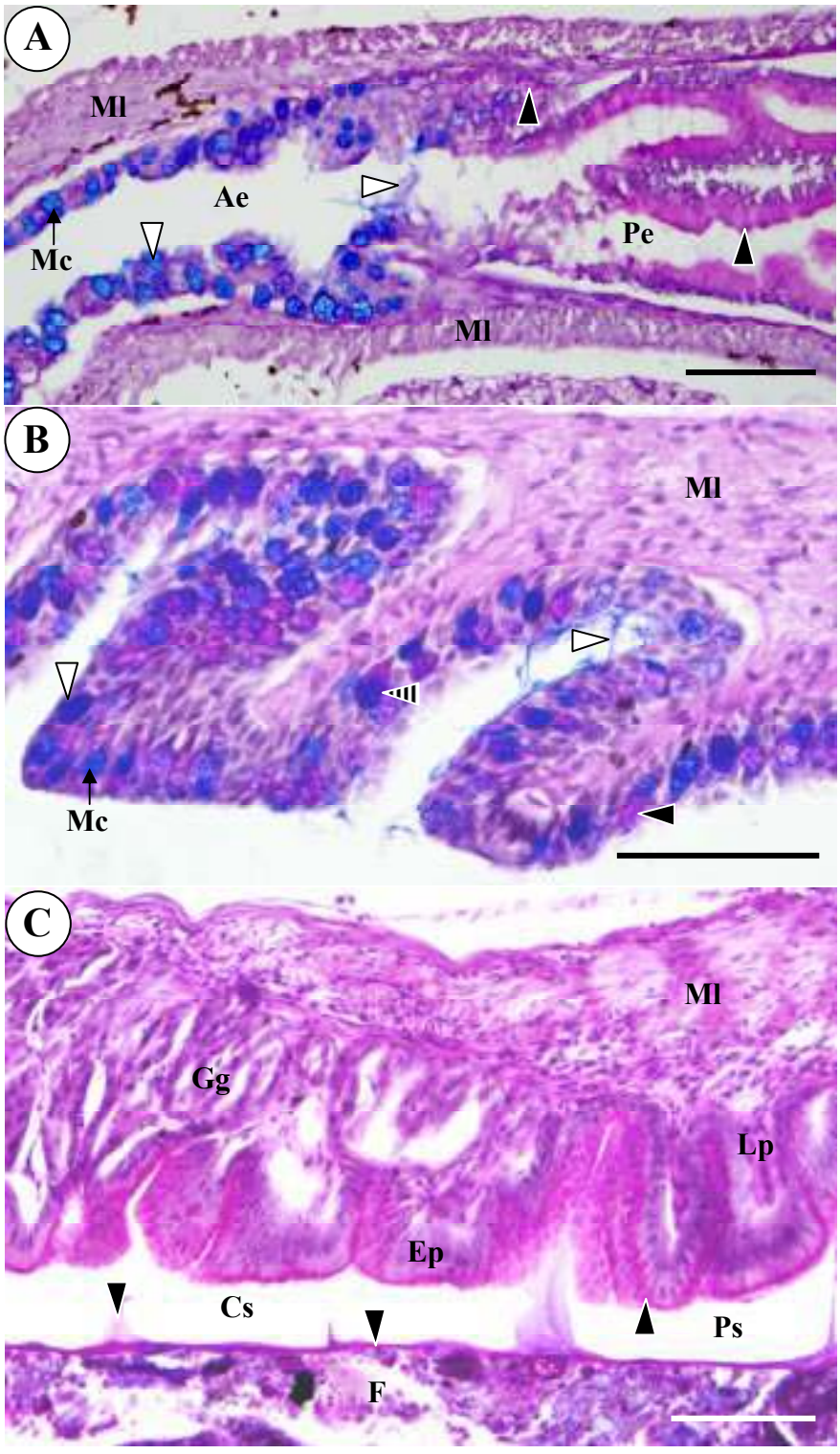


ภาพที่ 17 ช่องปากและคอหอยของลูกปลาดุกลำพันอายุ 7 และ 46 วันหลังฟัก (PAS & Ab)

A: ช่องปากและคอหอย (7 วันหลังฟัก)

B: ช่องปาก (46 วันหลังฟัก)

หัวลูกศรขาว - สารเมือกมีฤทธิ์เป็นกรด; หัวลูกศรดำ - สารเมือกมีฤทธิ์เป็นกลาง; หัวลูกศรลาย - สารเมือกชนิดผสม; Scale bar - 20 µm.



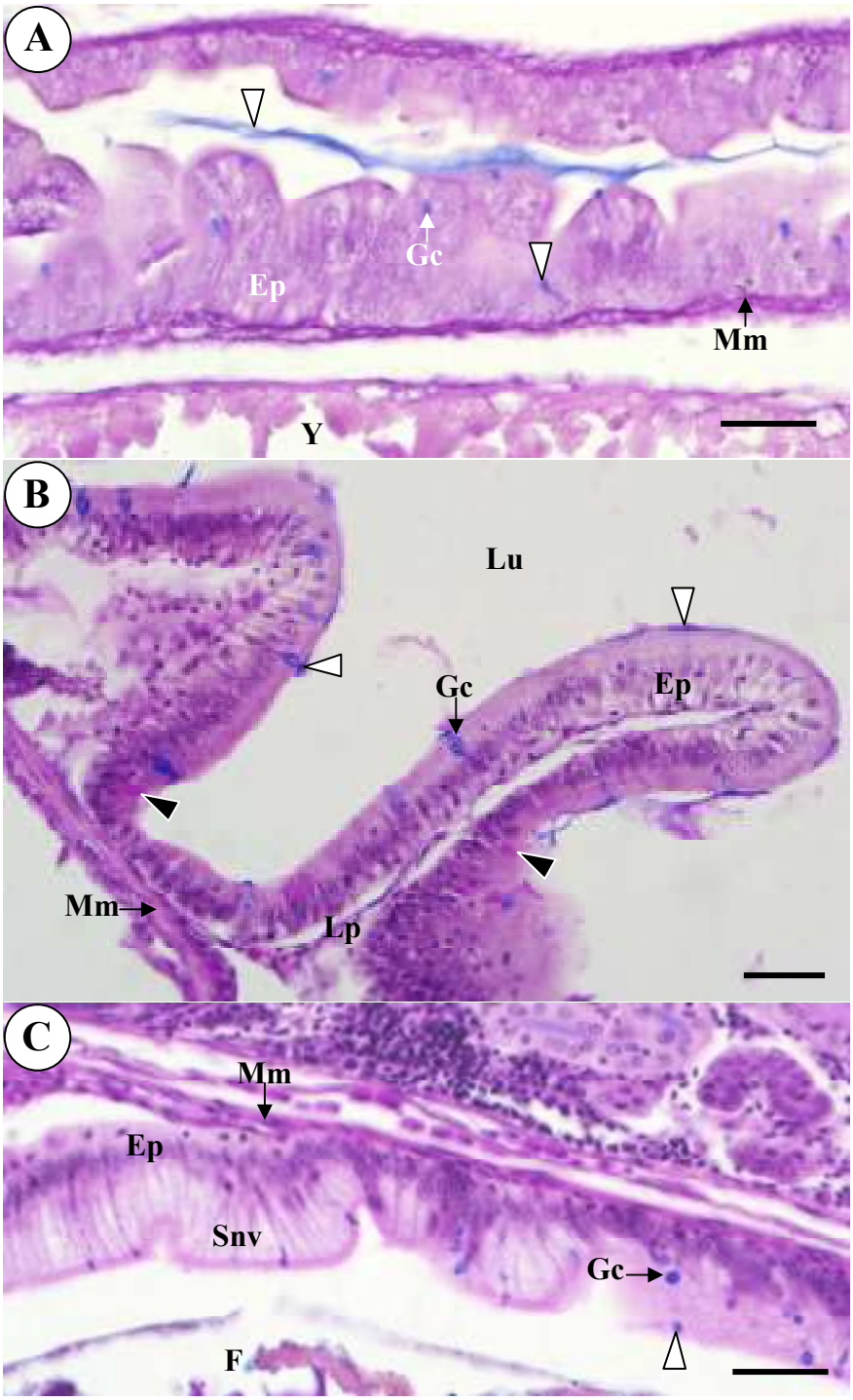
ภาพที่ 18 หลอดอาหารและกระเพาะอาหารของลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ (PAS & Ab)

A: หลอดอาหารส่วนหน้าและหลัง (7 วันหลังฟัก)

B: หลอดอาหารส่วนหน้า (46 วันหลังฟัก)

C: กระเพาะอาหารส่วน Cardiac และ Pyloric (25 วันหลังฟัก)

หัวลูกศรขาว - สารเมือกมีฤทธิ์เป็นกรด; หัวลูกศรดำ - สารเมือกมีฤทธิ์เป็นกลาง; หัวลูกศรลาย - สารเมือกชนิดผสม; Scale bar - 50 µm.



ภาพที่ 19 ลำไส้เล็กส่วนต้นและปลายของลูกปลาดุกลำพันอายุ 3 และ 46 วันหลังฟัก (PAS & Ab)

A: ลำไส้เล็ก (3 วันหลังฟัก) **B:** ลำไส้เล็กส่วนต้น (46 วันหลังฟัก)

C: ลำไส้เล็กส่วนปลาย (46 วันหลังฟัก)

หัวลูกศรขาว - สารเมือกมีฤทธิ์เป็นกรด; หัวลูกศรดำ - สารเมือกมีฤทธิ์เป็นกลาง;

Scale bar - 20 µm.

7. การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในทางเดินอาหาร

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตส อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส อะไมเลส และไลเปส ด้วยวิธีการทางฮีสโตเคมีในระบบย่อยอาหารของลูกปลาดุกลำพันวัยอ่อนตั้งแต่อายุ 0 - 46 วันหลังฟักโดยแบ่งระยะการเจริญของลูกปลาเป็น 4 ระยะ คือ ระยะ Eleutherembryonic อายุ 0 - 3 วันหลังฟัก ระยะ Protopterygiolarval อายุ 4 - 6 วันหลังฟัก ระยะ Pterygiolarval อายุ 7 - 16 วันหลังฟัก และระยะ Juvenile อายุ 17 - 46 วันหลังฟัก ซึ่งผลการศึกษาเอนไซม์แต่ละชนิดมีดังนี้

1. การศึกษาเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตส

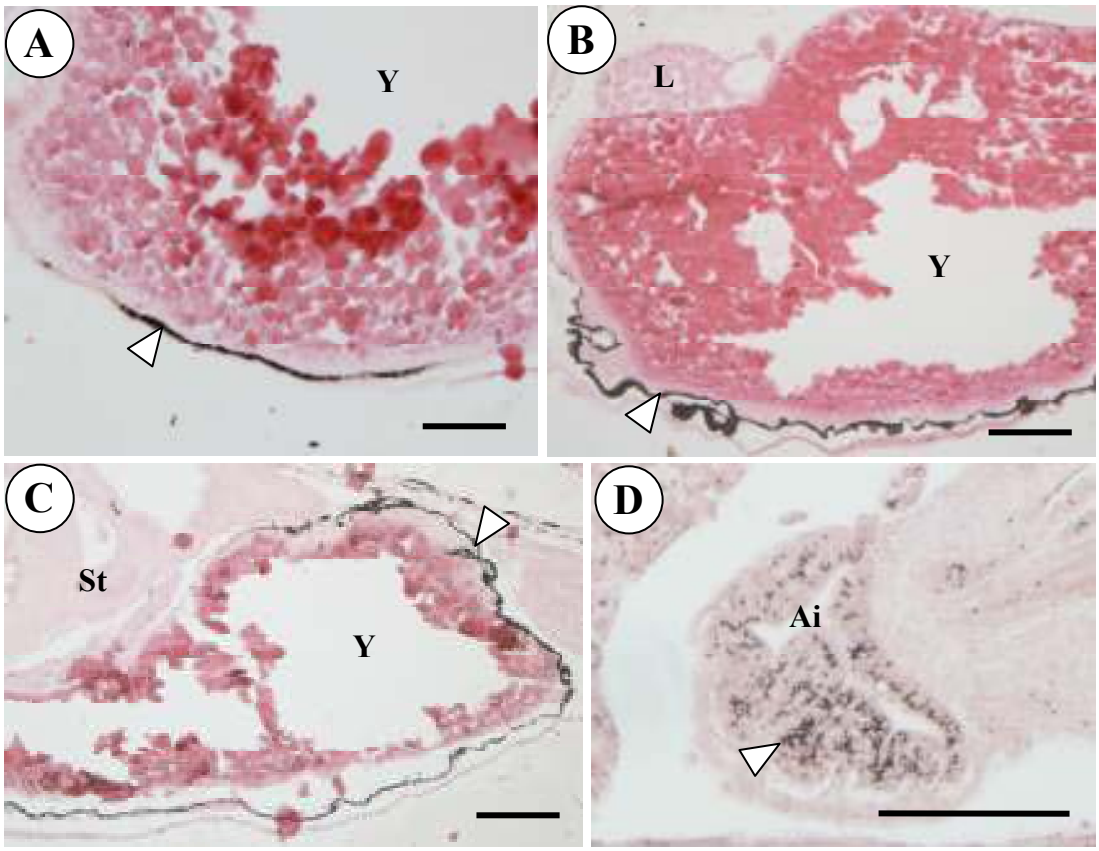
การศึกษาการทำงานของเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสสามารถทำได้ทางอ้อม โดยการตรวจหาปริมาณสารที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนไปของสารตั้งต้น โดยการศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค Lead nitrate ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยปฏิกิริยา Simultaneous coupling reaction โดยปฏิกิริยาเริ่มจากเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสจะย่อยสาร Sodium β glyceroposphate ได้ Phosphate ion ซึ่งจะรวมตัวกับ Lead ion เป็น Lead phosphate จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อกับ Sulphide ion จะได้ตะกอนสีน้ำตาลถึงดำซึ่งสามารถตรวจวัดปริมาณได้ (Bancroft and Gamble, 2002)

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสในลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ พบว่าเริ่มมีการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ตั้งแต่แรกฟักโดยพบปฏิกิริยาตะกอนสีดำภายในเซลล์ของถุงไข่แดง (ภาพที่ 20A&B) และพบว่าในบริเวณดังกล่าวมีการทำงานของเอนไซม์มากขึ้นเมื่อลูกปลาเข้าสู่ระยะ Protopterygiolarval (อายุ 4 - 6 วันหลังฟัก) โดยพบการเกิดตะกอนดำเข้มโดยรอบของถุงไข่แดง (ตารางที่ 10, ภาพที่ 20C) หลังจากที่ถุงไข่แดงยุบจนหมดในระยะ Pterygiolarval (อายุประมาณ 7 วันหลังฟัก) เริ่มพบการทำงานของเอนไซม์เล็กน้อยที่ชั้นมิวโคซาของลำไส้เล็กส่วนต้น (ตารางที่ 10, ภาพที่ 20D) และเมื่อถึงตอนปลายของระยะ Pterygiolarval (อายุ 15 - 16 วันหลังฟัก) และเริ่มเข้าสู่ระยะวัยรุ่นจะไม่พบการทำงานของเอนไซม์ตลอดทางเดินอาหาร (ตารางที่ 10) จนกระทั่งเสร็จสิ้นการทดลอง

ตารางที่ 10 การทำงานของเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสในทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ

Organ / Phase	Y	E	St	Ai	Pi	L	P
Ee (0 - 3 DAH)	++	0	0	0		0	0
Ppl (4 - 6 DAH)	+++	0	0	0	0	0	0
Pl (7 - 16 DAH)	0	0	0	+	0	0	0
Jp (17 - 46 DAH)	0	0	0	0	0	0	0

ไม่พบการทำงาน (0) – พบมากที่สุด (++++)



ภาพที่ 20 ปริมาณการติดสีของเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ

A: ถุงไข่แดง (1 วันหลังฟัก) **B:** ถุงไข่แดง (3 วันหลังฟัก)

C: ถุงไข่แดง (5 วันหลังฟัก) **D:** ลำไส้เล็กส่วนต้น (8 วันหลังฟัก)

หัวลูกศร - ตะกอนปฏิกิริยา; Scale bars - 100 µm.

2. การศึกษาเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส

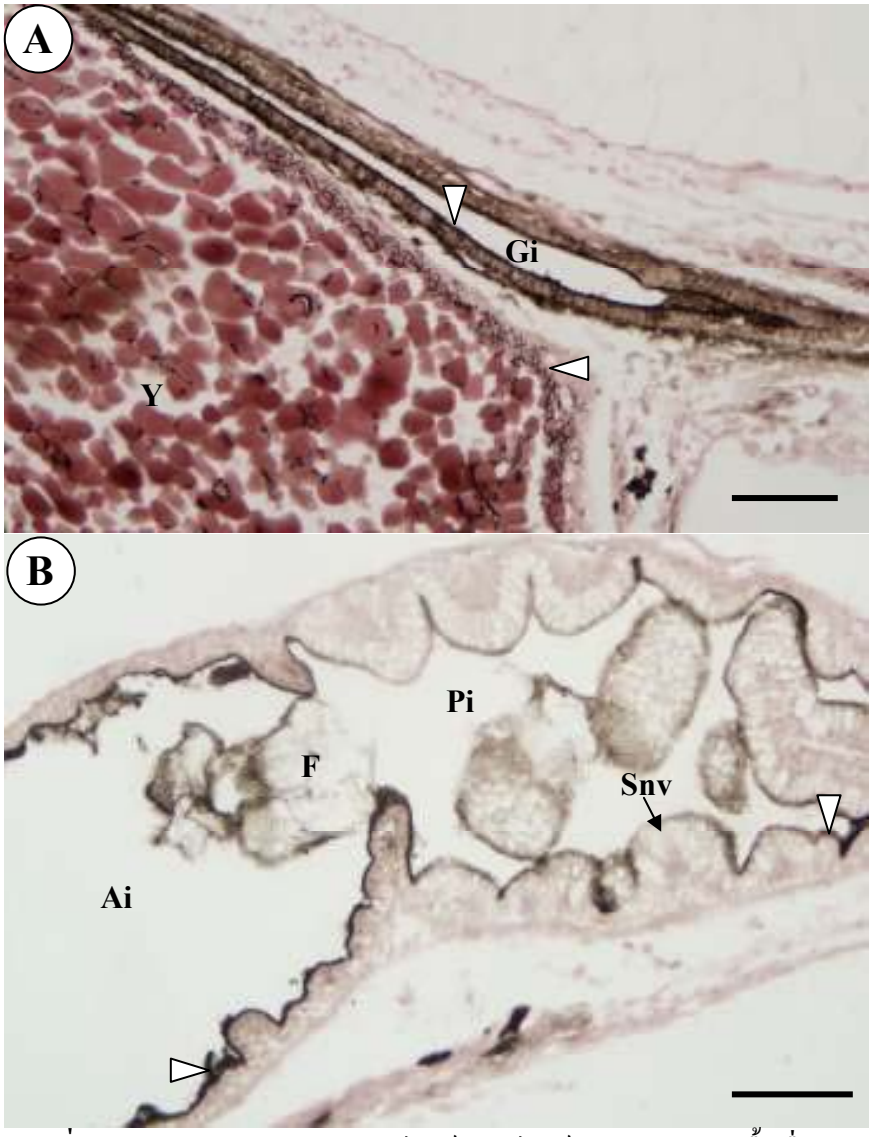
การศึกษาการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสด้วยวิธี Calcium-Cobalt ซึ่งเป็นเทคนิคที่อาศัยปฏิกิริยา Simultaneous coupling reaction เช่นเดียวกับวิธีการศึกษาเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสโดยปฏิกิริยาเริ่มจากเอนไซม์จะย่อยสาร Sodium β glyceroposphate ได้ Phosphate ion ซึ่งจะรวมตัวกับ Calcium ion เป็น Calcium phosphate จากนั้นทำปฏิกิริยาต่อกับ Cobalt ion ได้เป็น Cobalt phosphate เข้ารวมตัวกับ Sulfide ion จะได้ตะกอนสีน้ำตาลถึงดำของ Cobalt sulfide ซึ่งสามารถแสดงปริมาณของเอนไซม์ได้ (Bancroft and amble, 2002)

ผลการศึกษาเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ พบว่าเอนไซม์มีการทำงานตั้งแต่แรกฟัก (ระยะ Eleutherembryonic) โดยตรวจพบปฏิกิริยาของเอนไซม์บริเวณเซลล์ถุงไข่แดง และตลอดเซลล์ของเยื่อบุท่อทางเดินอาหารเริ่มแรก (ตารางที่ 11, ภาพที่ 21A) เมื่อลูกปลาเจริญเข้าระยะ Protopterygiolarval (อายุ 5 วันหลังฟัก) จะไม่พบการทำงานของเอนไซม์บริเวณถุงไข่แดง แต่จะพบบริเวณ Striated border ของลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนปลาย (ตารางที่ 11, ภาพที่ 21B) และพบว่าเอนไซม์มีการทำงานมากขึ้นในลำไส้เล็กทั้งสองส่วนเมื่อลูกปลาเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ Pterygiolarval และระยะวัยรุ่น (ตารางที่ 11)

ตารางที่ 11 การทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ

Organ / Phase	Y	E	St	Ai	Pi	L	P
Ee (0 - 3 DAH)	+	0	+	+		0	0
Ppl (4 - 6 DAH)	0	0	0	++	++	0	0
Pl (7 - 16 DAH)	0	0	0	+++	++	0	0
Jp (17 - 46 DAH)	0	0	0	++++	++++	0	0

ไม่พบการทำงาน (0) – พบมากที่สุด (++++)



ภาพที่ 21 ปริมาณการติดสีของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ

A: ท่อทางเดินอาหารเริ่มต้นและถุงไข่แดง (1 วันหลังฟัก)

B: ลำไส้เล็กส่วนต้นและปลาย (12 วันหลังฟัก)

หัวลูกศร - ตะกอนปฏิกิริยา; Scale bar - 50 μm.

3. การศึกษาเอนไซม์อะไมเลส

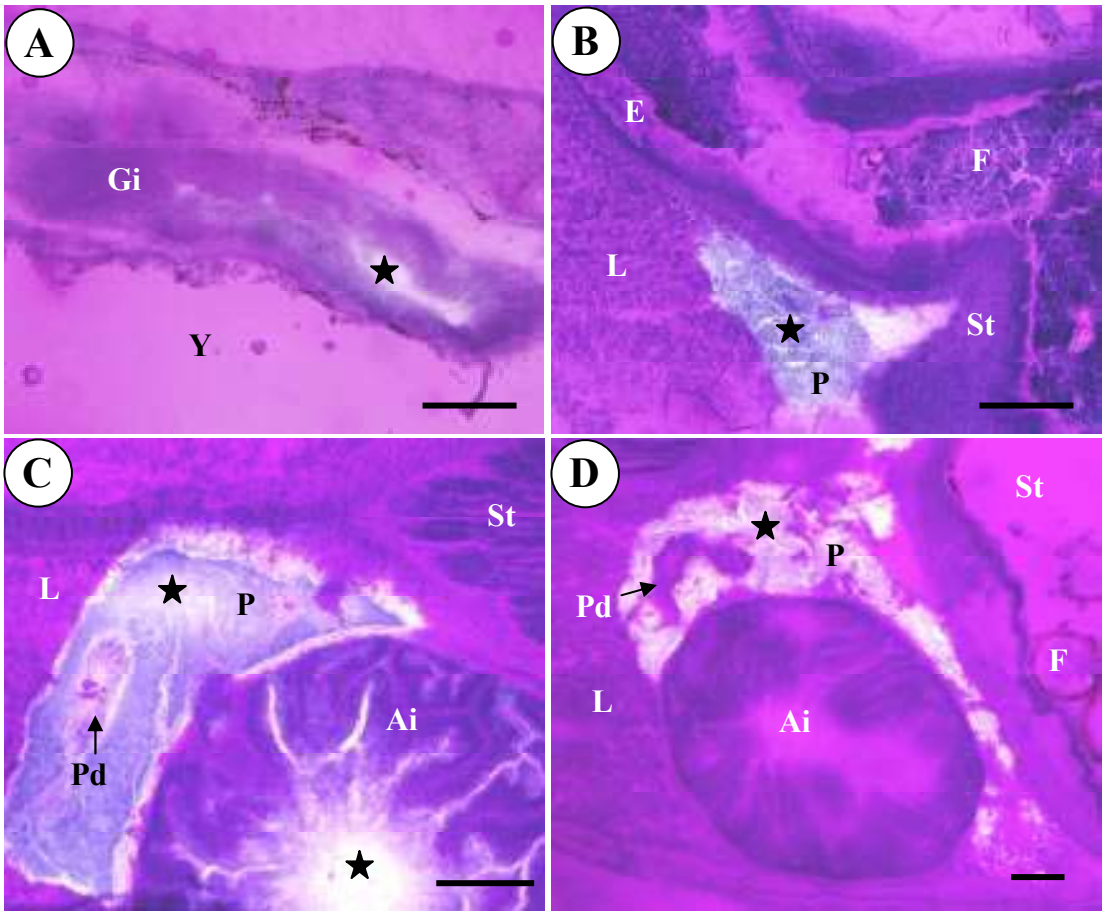
จากการศึกษาเอนไซม์อะไมเลสด้วยเทคนิค Substrate film (Tremblay, 1967) ซึ่งเป็นวิธีการศึกษาการทำงานโดยตรงของเอนไซม์ โดยการติดแผ่นเนื้อเยื่อสดแช่แข็งลงบนสไลด์แก้วที่เคลือบด้วยสารละลายแป้ง (Hydrolyzed starch) หากบริเวณใดของเนื้อเยื่อมีเอนไซม์อะไมเลสจะเกิดการย่อยฟิล์มแป้งบนสไลด์ตรงบริเวณนั้นให้กลายเป็นน้ำตาล และเมื่อทำการย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วยเทคนิค PAS ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ศึกษาสารจำพวกคาร์โบไฮเดรตซึ่งหากมีสารจำพวกนี้จะเกิดปฏิกิริยาเป็นสีชมพูโดยที่บริเวณที่มีเอนไซม์ อะไมเลสจะไม่เกิดปฏิกิริยา PAS เนื่องจากฟิล์มแป้งได้รับการย่อยไปแล้วบริเวณนั้นจึงเกิดเป็นช่องว่างหรือมีสีจางกว่าบริเวณโดยรอบ (Tremblay, 1967)

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ พบว่ามีการทำงานของเอนไซม์ในลูกปลาระยะ Eleutherembryonic (อายุ 3 วันหลังฟัก) โดยพบปริมาณเล็กน้อยภายในลูเมนของกระเพาะอาหารเริ่มแรก ภายในลูเมน และชั้น Mucosa ของลำไส้เล็ก และบริเวณเซลล์โดยทั่วไปของตับอ่อน (ตารางที่ 12, ภาพที่ 22A) เมื่อลูกปลาเจริญเติบโตมากขึ้นที่ระยะ Protopterygiolarval จะไม่พบการทำงานของเอนไซม์บริเวณกระเพาะอาหาร (ตารางที่ 12, ภาพที่ 22B) แต่จะมีมากขึ้นในตับอ่อนและลำไส้เล็ก (ตารางที่ 12)โดยพบการย่อยฟิล์มแป้งในบริเวณกว้างทำให้ไม่เกิดการติดสีโดยเฉพาะใน Acinus และในช่องลูเมนของท่อน้ำย่อยของตับอ่อน (ภาพที่ 22B) ส่วนบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนท้ายพบการทำงานของเอนไซม์แตกต่างกันในแต่ละบริเวณโดยบริเวณเนื้อเยื่อชั้นมิวโคซาพบการทำงานเพียงเล็กน้อย (ติดสีชมพูจาง) ในขณะที่บริเวณพื้นผิวของเซลล์ชั้นบุผิวและช่องลูเมนพบการทำงานของเอนไซม์มาก (เกิดช่องว่างของสี) (ตารางที่ 12, ภาพที่ 22C) เมื่อลูกปลาเจริญเติบโตถึงอายุประมาณ 15 วันหลังฟัก (อยู่ในระยะ Pterygiolarval) พบว่าการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในลำไส้เล็กลดน้อยลงโดยพบบริเวณที่เกิดช่องว่างของสีน้อยลงจนกระทั่งไม่พบการทำงานของเอนไซม์ในลูกปลาอายุประมาณ 30 วันหลังฟัก (เข้าสู่ระยะวัยรุ่น) ในขณะที่ตับอ่อนพบการทำงานของเอนไซม์มากขึ้นบริเวณ Acinus และบริเวณโดยรอบแต่ไม่พบการทำงานในลูเมนของท่อน้ำย่อยตับอ่อน (ตารางที่ 12, ภาพที่ 22D)

ตารางที่ 12 การทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ

Organ / Phase	Y	E	St	Ai	Pi	L	P
Ee (0 - 3 DAH)	0	0	+	+		0	+
Ppl (4 - 6 DAH)	0	0	0	++	++	0	++
Pl (7 - 16 DAH)	0	0	0	++	+	0	+++
Jp (17 - 46 DAH)	0	0	0	+	0	0	+++

ไม่พบการทำงาน (0) – พบมากที่สุด (++++)



ภาพที่ 22 ปฏิกิริยาการติดสีของเอนไซม์อะไมเลสในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ

A: ท่อทางเดินอาหาร (4 วันหลังฟัก) **B:** ตับอ่อน (7 วันหลังฟัก)

C: ลำไส้เล็กและตับอ่อน (28 วันหลังฟัก) **D:** ลำไส้เล็กและตับอ่อน (41 วันหลังฟัก)

รูปดาว - ปฏิกิริยาเอนไซม์อะไมเลส; Scale bars - 100 µm.

4. การศึกษาเอนไซม์ไลเปส

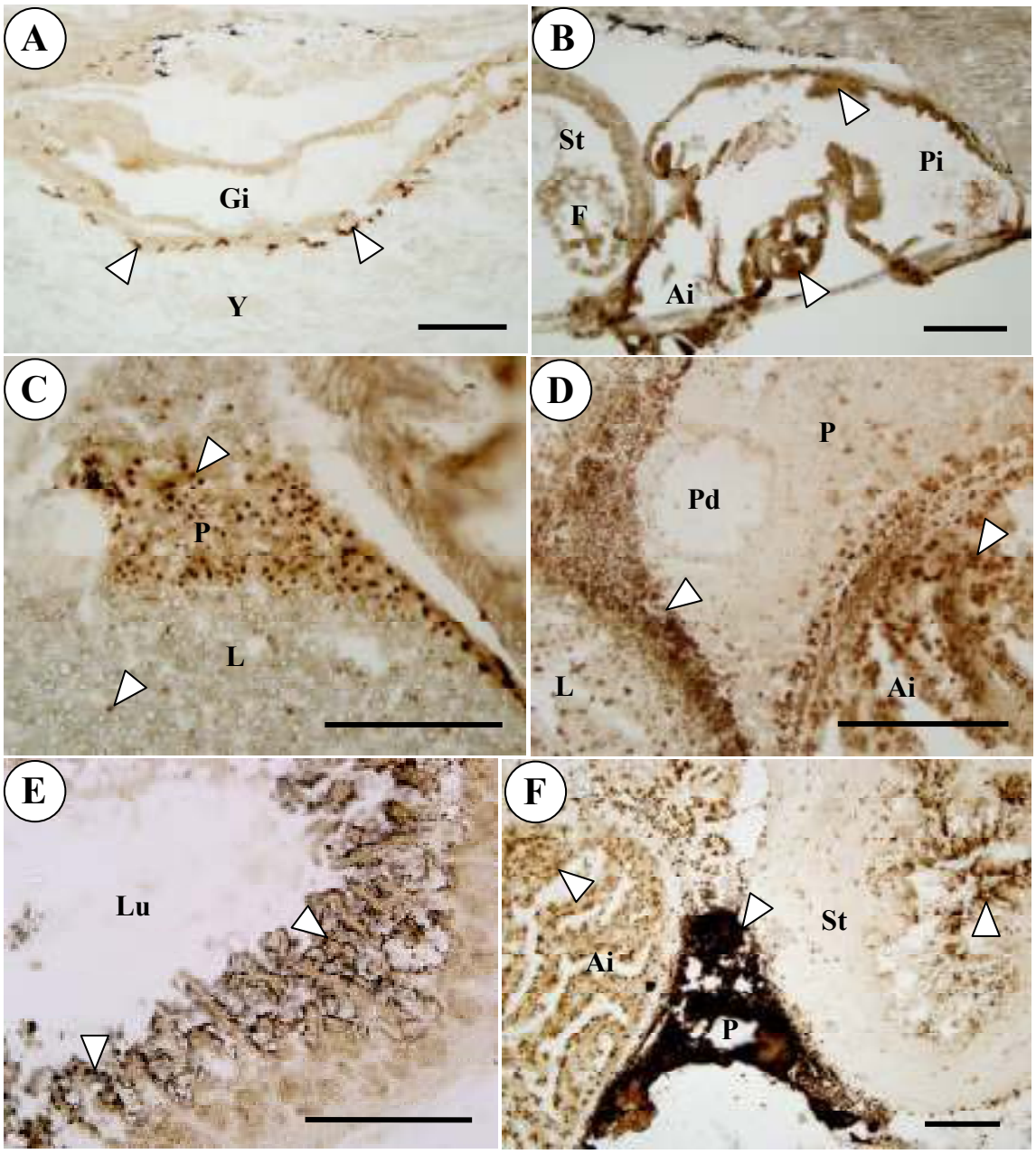
การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสโดยใช้เทคนิค Tween method (Gomori, 1952) เป็นการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในเชิงปริมาณ และคุณภาพโดยอาศัยการเกิดปฏิกิริยาทางเคมีของเอนไซม์ไลเปสเริ่มต้นจากการให้เอนไซม์ย่อย Tween 80 ซึ่งเป็นสารตั้งต้นจำพวกไขมันให้เป็นกรดไขมัน (Fatty acids) จากนั้นกรดไขมันจะรวมตัวกับ Calcium ions เป็น Insoluble calcium soaps ที่อยู่ใน Lead ions และในขั้นสุดท้ายสารที่ได้จะไปทำปฏิกิริยากับ Ammonium sulfide จนได้ตะกอนสีน้ำตาลถึงน้ำตาลดำทำให้สามารถศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในเนื้อเยื่อได้ (Bancroft and Gamble, 2002)

การศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในลูกปลาระยะต่าง ๆ พบว่าเริ่มมีการทำงานของเอนไซม์ในลูกปลาอายุ 2 วันหลังฟักโดยพบเป็นกลุ่มตะกอนน้ำตาลเข้มกระจายในหลายบริเวณ ได้แก่ เนื้อเยื่อรอบถุงไข่แดงบริเวณเซลล์บุผิวของหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก (ภาพที่ 23A) และบริเวณเซลล์ตับและตับอ่อนเริ่มแรกโดยตรวจพบปริมาณของตะกอนเล็กน้อย (ตารางที่ 13) เมื่อลูกปลาเจริญเติบโตเข้าสู่ระยะ Pterygiolarval (อายุประมาณ 7 วันหลังฟัก) ตรวจพบการทำงานของเอนไซม์มากขึ้นในลำไส้เล็กส่วนต้นโดยพบตะกอนสีน้ำตาลดำปริมาณมากตลอดแนวของเนื้อเยื่อชั้นมิวโคซา (ตารางที่ 13, ภาพที่ 23B) และเมื่อลูกปลามีอายุประมาณ 10 - 15 วันหลังฟัก ตรวจพบการทำงานของเอนไซม์มากขึ้นในบริเวณตับอ่อนโดยพบกลุ่มตะกอนสีน้ำตาลดำกระจายตัวในแต่ละ Acinus ของตับอ่อน (ตารางที่ 13, ภาพที่ 23C) เมื่อลูกปลาเจริญเข้าสู่ระยะ Juvenile (อายุ 20 - 28 วันหลังฟัก) พบการทำงานของเอนไซม์มากขึ้นในเซลล์ชั้นมิวโคซาและซับมิวโคซาของลำไส้เล็กส่วนต้น บริเวณเซลล์ตับ และเนื้อเยื่อตับอ่อนส่วนที่ติดกับตับ (ตารางที่ 13, ภาพที่ 23D) และเมื่อลูกปลาดุกมีอายุประมาณ 35 - 46 วันหลังฟักพบการทำงานของเอนไซม์มากขึ้นทั้งบริเวณพื้นผิวของเซลล์บุผิวและเนื้อเยื่อชั้นมิวโคซาของกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 23E) บริเวณไซโทพลาสซึมของชั้นบุผิวของลำไส้เล็กส่วนต้น และเนื้อเยื่อโดยทั่วไปของตับอ่อน (ภาพที่ 23F)

ตารางที่ 13 การทำงานของเอนไซม์ไลเปสในทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพัน ระยะต่างๆ

Organ / Phase	Y	E	St	Ai	Pi	L	P
Ee (0 - 3 DAH)	+	+	+	++		0	+
Ppl (4 - 6 DAH)	+	+	+	+	++	+	+
Pl (7 - 16 DAH)	0	+	+	++	+	+	+++
Jp (17 - 46 DAH)	0	+	++	++++	+++	++	+++

ไม่พบการทำงาน (0) – พบมากที่สุด (++++)



ภาพที่ 23 ปริมาณการติดสีของเอนไซม์ไลเปสในเนื้อเยื่อทางเดินอาหารลูกปลาดุกลำพันอายุต่าง ๆ

A: ท่อทางเดินอาหารและถุงไข่แดง (3 วันหลังฟัก) **B:** ลำไส้เล็กส่วนต้นและปลาย (7 วันหลังฟัก)

C: ตับและตับอ่อน (10 วันหลังฟัก) **D:** ลำไส้เล็กส่วนต้น ตับ และตับอ่อน (28 วันหลังฟัก)

E: กระเพาะส่วน Cardiac (35 วันหลังฟัก) **F:** กระเพาะ ลำไส้เล็กส่วนต้น และตับอ่อน (46 วันหลังฟัก)

หัวลูกศร - ตะกอนปฏิกิริยา; Scale bars - 100 µm.

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดในเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหารของลูกปลาดุกลำพันใน 4 ระยะของการเจริญเติบโต สามารถสรุปได้ตามตารางที่ 14 โดยพบว่าเอนไซม์ทั้ง 4 ชนิดสามารถทำงานได้ตั้งแต่ลูกปลาอยู่ในระยะ Eleutherembryonic phase (0 - 3 วันหลังฟัก) ซึ่งเป็นช่วงที่ลูกปลามีถุงไข่แดงปรากฏและยังไม่เริ่มกินอาหารจากภายนอก ในระยะนี้พบการทำงานในระดับต่ำของเอนไซม์บริเวณรอบถุงไข่แดงและท่อทางเดินอาหารแรกเริ่ม โดยบริเวณถุงไข่แดงพบการทำงานของเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสในระดับปานกลาง เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและไลเปสมีการทำงานเพียงเล็กน้อย ส่วนเอนไซม์อะไมเลสไม่พบการทำงานบริเวณนี้ ในส่วนท่อทางเดินอาหารแรกเริ่ม (กระเพาะและลำไส้เล็ก) พบการทำงานเล็กน้อยของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส อะไมเลส และไลเปส

เมื่อลูกปลาเข้าสู่ระยะ Protopterygiolarval phase (4 - 6 วันหลังฟัก) เป็นช่วงเวลาที่ลูกปลาเริ่มกินอาหารที่มีชีวิต (อาร์ทีเมีย) พบว่าเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสมีการทำงานที่สูงขึ้นบริเวณถุงไข่แดง เช่นเดียวกับการทำงานที่สูงขึ้นของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและอะไมเลสบริเวณลำไส้เล็ก นอกจากนี้ยังพบการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในระดับที่สูงขึ้นบริเวณตับอ่อน ส่วนเอนไซม์ไลเปสพบการทำงานเล็กน้อยในท่อทางเดินอาหาร ตับ และตับอ่อน

ในระยะ Pterygiolarval phase (7 - 16 วันหลังฟัก) เป็นระยะที่ถุงไข่แดงสลายจนหมด เริ่มพบการทำงานเล็กน้อยของเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น ในขณะที่เอนไซม์อีก 3 ชนิดพบการทำงานในระดับที่สูงขึ้นโดยเฉพาะเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในบริเวณลำไส้เล็กส่วนต้น ส่วนเอนไซม์ไลเปสมีการทำงานสูงขึ้นบริเวณตับอ่อนและลำไส้เล็กส่วนต้น และมีการทำงานเล็กน้อยบริเวณลำไส้เล็กส่วนปลายและตับ สำหรับเอนไซม์อะไมเลสมีการทำงานมากขึ้นบริเวณตับอ่อน และลำไส้เล็กส่วนต้น

เมื่อลูกปลาเจริญเข้าสู่ระยะวัยรุ่น (17 - 46 วันหลังฟัก) ไม่พบการทำงานของเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสในระบบทางเดินอาหาร ในขณะที่พบการทำงานในระดับสูงของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสและเอนไซม์ไลเปสบริเวณลำไส้เล็กทั้งสองส่วน โดยที่ตรวจพบการทำงานที่สูงขึ้นของเอนไซม์ไลเปสที่ตับและตับอ่อนเช่นกัน สำหรับเอนไซม์อะไมเลสไม่พบการทำงานตลอดท่อทางเดินอาหารหลังจากอายุ 30 วันเป็นต้นไปแต่พบการทำงานเฉพาะบริเวณตับอ่อน

ตารางที่ 14 ปริมาณการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิดในระบบทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันระยะต่าง ๆ

Phase / Enzyme	Ee (0 - 3 DAH)	Ppl (4 - 6 DAH)	Pl (7 - 16 DAH)	Jp (17 - 46 DAH)
Acid phosphatase	++	+++	+	0
Alkaline phosphatase	+	++	+++	++++
Amylase	+	++	+++	+++
Lipase	+	+	++	+++

ไม่พบการทำงาน (0) – พบมากที่สุด (++++)

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการวิจัย

ความสัมพันธ์ระหว่างอายุกับความยาวทั้งหมด

ลูกปลาดุกลำพันที่เพาะฟักภายในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุงที่อุณหภูมิน้ำเฉลี่ย 26 °C – 27 °C เมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกชนิดอื่นพบว่ามีความใกล้เคียงกับปลาดุกแอฟริกันซึ่งเป็นปลาดุกที่อยู่ในสกุล Clarias เช่นเดียวกัน โดยมีความยาวแรกฟักเฉลี่ย 4.5 ± 0.2 มม. (Mukai et al., 2008) แต่พบว่ามีขนาดใหญ่กว่า Silver catfish, *Rhamdia quelen* ที่มีความยาวแรกฟักเฉลี่ย 2.76 ± 0.38 มม. (Pimenta de Amorim et al., 2009) ในขณะที่มีขนาดเล็กกว่าเมื่อเทียบกับ –ellow catfish ที่มีความยาวแรกฟักเฉลี่ย 7.1 ± 0.3 มม. (–ang et al., 2010) ทั้งนี้จากการศึกษาพบว่าลูกปลาในชนิดเดียวกันอาจมีความยาวแรกฟักที่ไม่เท่ากันได้โดยขึ้นอยู่กับอิทธิพลจากแม่พันธุ์ (Maternal effect) ที่ถูกควบคุมโดยสารพันธุกรรมภายในตัวของแม่พันธุ์ปลา (Heath et al., 1999) นอกจากนี้ความยาวของลูกปลาแรกฟักมีความใกล้เคียงกันในปลาที่อยู่ในสกุลเดียวกันเช่นเดียวกับในปลาสกุล *Acepenser* (*A. baeri; A. medirostris; A. ruthenus*) ที่มีความยาวทั้งหมดแรกฟักเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 10.4 – 12.2 มม. (Gisbert et al., 1998; Gisbert and Doroshov, 2003; Wegner et al., 2009)

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของความยาวทั้งหมดกับอายุพบว่าเมื่อลูกปลามีอายุเพิ่มมากขึ้นความยาวทั้งหมดจะเพิ่มขึ้น โดยมีจะความสัมพันธ์ในเชิงเส้นตรง (Linear regression) ความสัมพันธ์เช่นนี้มีความสอดคล้องกับการศึกษาในปลาชนิดอื่น ๆ เช่น –ellow catfish (–ang et al., 2010) California halibut, *Paralichthys californicus* (Gisbert et al., 2004) เป็นต้น

การยุบตัวของถุงไข่แดง

สำหรับการศึกษาการลดขนาดของถุงไข่แดงพบว่าถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันปรากฏให้เห็นตั้งแต่แรกฟักจนกระทั่งอายุ 5 วันหลังฟัก เมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกชนิดอื่นพบว่าถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันมีระยะเวลาในการยุบนานกว่า เช่น ปลากดเหลือง, *Mystus nemurus* ที่ถุงไข่แดงจะยุบหมดใน 3 วันหลังฟัก (Amornsakun et al., 1997) เช่นเดียวกับในปลากดคัง,

Mystus wyckioides และปลาบู่ทราย, *Oxyeleotris marmoratus* ที่ระยะของถุงไข่แดงปรากฏเพียง 4.3 วันหลังฟัก (Amornsakun, 1999) และ 3.4 วันหลังฟัก (Amornsakun et al., 2002) ตามลำดับ แต่มีความใกล้เคียงกับปลาดุกยุโรปที่มีถุงไข่แดงจนอายุ 6 วันหลังฟัก (Kozaric et al., 2008) เมื่อพิจารณาปริมาตรของถุงไข่แดงแรกฟักพบว่าลูกปลาดุกลำพันมีปริมาตรเฉลี่ย 1.735 ± 0.691 ลบ.มม. ซึ่งมีปริมาตรมากกว่าในปลากดเหลือง (1.186 ± 0.250 ลบ.มม.) (Amornsakun et al., 1997) และปลากดคัง (1.443 ± 0.476 ลบ.มม.) (Amornsakun, 1999) การยุบตัวของถุงไข่แดงในลูกปลาดุกลำพันแรกเกิดถึง 5 วันหลังฟักเป็นไปในเชิงเส้นตรง ซึ่งมีการลดลงค่อนข้างสม่ำเสมอเช่นเดียวกับการลดลงของถุงไข่แดงในปลาสลิด (Amornsakun et al., 2004)

จากการทดลองพบว่าลูกปลาดุกลำพันสามารถกินอาหารจากภายนอกครั้งแรกตั้งแต่อายุ 3 วันหลังฟักก่อนที่ถุงไข่แดงจะยุบหมดในวันที่ 5 หลังฟัก ซึ่งลักษณะเช่นนี้สอดคล้องกับปลาดุกชนิดอื่น ๆ ได้แก่ ปลาดุกยุโรปที่กินอาหารได้ในวันที่ 4 หลังฟักก่อนที่ถุงไข่แดงจะยุบหมดในวันที่ 6 หลังฟัก (Kozaric et al., 2008) □ellow catfish ที่เริ่มกินอาหารในวันที่ 3 หลังฟักขณะที่ยังปรากฏถุงไข่แดง (□ang et al., 2010) ซึ่งเหมือนกับปลาชนิดอื่นบางชนิด เช่น *Melanogrammus aeglefinus* ที่มีถุงไข่แดงยุบในวันที่ 3 หลังการฟัก แต่เริ่มกินอาหารได้ตั้งแต่อายุ 1.5 วันหลังฟัก (Hamlin et al., 2000) และ *Amphiprion percula* ที่กินอาหารได้ตั้งแต่แรกฟักในขณะที่ถุงไข่แดงยุบหมดในวันที่ 3 หลังฟัก (Onal et al., 2008) ทั้งนี้เวลาที่ลูกปลาสามารถกินอาหารจากภายนอกครั้งแรกขึ้นอยู่กับโครงสร้างและอวัยวะต่าง ๆ ที่สอดคล้องกับการหาอาหาร ความพร้อมของการย่อยและการดูดซึมสารอาหาร และการปรากฏของอาหารที่เหมาะในช่วงเวลานั้น (□ufera and Darias, 2007) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับสารอาหารที่สะสมภายในถุงไข่แดงและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม เช่น อุณหภูมิของน้ำ เป็นต้นอีกด้วย (Hodson and Blunt, 1986 อ้างตาม Amornsakun et al., 2004) จากปัจจัยดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานลักษณะของลูกปลาดุกลำพันที่พบว่าปากของลูกปลาเริ่มเปิดในวันที่ 2 หลังฟัก และเป็นเวลาเดียวกับการเริ่มพัฒนาของทางเดินอาหาร (อภิชาติ และสิริวรรณ, 2551) นอกจากนี้ถุงไข่แดงมีขนาดเล็กลงและยุบหมดในวันที่ 4 (ศราวุธ และคณะ, 2538) สำหรับการศึกษาในครั้งนี้มีการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อของลูกปลาดุกลำพันพบว่าในลูกปลาอายุ 5 วันหลังฟักยังคงปรากฏถุงไข่แดงอยู่ภายในช่องท้องในขณะที่ไม่สามารถระบุขอบเขตของถุงไข่แดงจากภายนอกได้แล้ว ในช่วงเวลานี้ตับและท่อทางเดินอาหารมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วจนมีการเบียดถุงไข่แดงไปส่วนท้ายของลำตัวและสลายหมดไปในวันที่ 7 หลังฟัก ด้วยเหตุนี้การศึกษาทางวิทยาเนื้อเยื่อจึงสามารถระบุระยะเวลาที่แน่นอนของการสลายของถุงไข่แดงควบคู่ไปกับข้อมูลจากการศึกษาลักษณะภายนอก

พัฒนาการของเนื้อเยื่อในระบบย่อยอาหาร

พัฒนาการทางวิทยาเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารในลูกปลาวัยอ่อนมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางทั้งในปลาทะเลและปลาน้ำจืดโดยเฉพาะปลาที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจ ทั้งนี้เนื่องจากองค์ความรู้ดังกล่าวสามารถทำให้เข้าใจถึงสรีรวิทยาการกินอาหารและการเจริญเติบโตของลูกปลาเพื่อเป็นประโยชน์ในการวางแผนการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนให้มีประสิทธิภาพ (Senger et al., 1993; Ribeiro et al., 1999; Zaiss et al., 2006) จากการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของระบบย่อยอาหารในลูกปลาดุกลำพันในครั้งนี้พบว่ามีความคล้ายคลึงกับปลาดุกยุโรป (Kozaric et al., 2008) Silver catfish (Pimenta de Amorim et al., 2009) และ ellow catfish (ang et al., 2010) กล่าวคือ เมื่อแรกฟักท่อทางเดินอาหารมีลักษณะเป็นท่อตรงวางอยู่บนถุงไข่แดงซึ่งมีขนาดใหญ่ ต่อมามีการพัฒนาชั้นเนื้อเยื่อของกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กอย่างรวดเร็ว และมีการกินอาหารจากภายนอกในขณะที่ถุงไข่แดงยังยุบไม่หมด ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นการได้รับอาหารแบบผสม (Endogenous exogenous feeding) ทั้งสารอาหารจากถุงไข่แดงและจากเหยื่อที่มีชีวิตภายนอก (ufera and Darias, 2007) โดยพบว่าช่วงเวลาดังกล่าวมีการพัฒนาของตับและตับอ่อนอย่างรวดเร็ว (Kozaric et al., 2008; Pimenta de Amorim et al., 2009)

พัฒนาการของช่องปากและคอหอยในลูกปลาดุกลำพันระยะแรกพบว่ามีลักษณะคล้ายกับ ellow catfish โดยแรกฟักลูกปลามีช่องปากบุด้วย Simple squamous epithelium และเริ่มปรากฏตุ่มรับรส และเซลล์เมือกเมื่อลูกปลามีอายุประมาณ 3 4 วันหลังฟัก และมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นตลอดการเจริญเติบโต แต่ลักษณะการเจริญของฟันมีความแตกต่างกันโดยที่ปลาดุกลำพันจะมีการเจริญของฟันคอหอยประมาณวันที่ 3 หลังฟัก ในขณะที่ ellow catfish มีการเจริญของฟันเขี้ยว (Jaw teeth) บริเวณผนังช่องปาก Premaxillar ในวันที่ 5 หลังฟัก ในช่วงการกินอาหารเริ่มแรกช่องปากและคอหอยของปลาดุกทั้ง 2 ชนิดมีขนาดใหญ่ซึ่งมีความเหมาะกับพฤติกรรมการกินแบบกลืนกิน (Swallowing) ซึ่งเหยื่อสามารถเป็นได้ทั้ง Rotifer Cladocera และCopepoda (Wang et al., 2002)

หลอดอาหารของลูกปลาดุกลำพันสามารถแบ่งได้เป็น 2 ส่วนตามลักษณะทางวิทยาเนื้อเยื่อเมื่อลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟัก โดยหลอดอาหารส่วนหน้าของลูกปลาดุกลำพันบุด้วย Stratified squamous epithelium มีการโค้งขึ้นในแนวรัศมีและหลอดอาหารส่วนหลังจะบุด้วย Simple columna epithelium และมีการโค้งตามยาวของผนัง เริ่มปรากฏเซลล์เมือกเมื่อลูกปลาดุกลำพันมีอายุ 3 วันหลังฟักโดยส่วนหลังมีความหนาแน่นกว่าส่วนหน้า และยังมีการพัฒนาชั้นของกล้ามเนื้อลายทั้งชนิดเรียงเป็นวงกลมและชนิดตามยาวใต้ผนังหลอดอาหารด้วย ลักษณะทาง

เนื้อเยื่อของหลอดอาหารดังกล่าวเอื้อต่อการกลืนกินอาหารที่มีส่วนแข็ง และมีหนามแหลม เช่น พวก Cladocera ที่มีเปลือกแข็ง เป็นต้น โดยการมีเซลล์บุผิวหลายชั้น และมีการโค้งตามยาวของผนังจะช่วยป้องกันความเสียหายทางกายภาพขณะกลืนอาหาร เช่น การเสียดสี และการผลิตสารเมือกเคลือบผนังหลอดอาหารช่วยในการหล่อลื่นและป้องกันการติดเชื้อจากแบคทีเรีย (Kozaric et al., 2008; Raji and Norouzi, 2010) ลูกปลาดุกลำพันเริ่มกินอาหารจากภายนอกครั้งแรกเมื่ออายุ 3 วันหลังฟักซึ่งเป็นช่วงเวลาที่หลอดอาหารเริ่มมีพัฒนาลักษณะดังกล่าว เช่นเดียวกับใน California halibut (Gisbert et al., 2004) Common pendora (Micale et al., 2006) และ ellow catfish (ang et al., 2010)

กระเพาะอาหารของลูกปลาดุกลำพันเริ่มมีการพัฒนาแยกจากท่อทางเดินอาหารส่วนอื่น ๆ ที่อายุ 1.5 วันหลังฟัก และเริ่มสร้างต่อมแกสทริคในกระเพาะส่วน Cardiac ในลูกปลาอายุ 3.5 วันหลังฟักซึ่งพบว่ามีระยะใกล้เคียงกับปลาดุกหลายชนิดในอันดับ Siluriformes ได้แก่ ปลาดุกแอฟริกัน (4 วันหลังฟัก) (Verreth et al., 1992), *Mystus macropterus* (5 วันหลังฟัก) (Chen et al., 2002), *S. asotus* (5 วันหลังฟัก) (Pu et al., 2004), ปลาดุกยุโรป (5 วันหลังฟัก) (Kozaric et al., 2008) และ ellow catfish (3 วันหลังฟัก) (ang et al., 2010) ซึ่งพบว่าเร็วกว่าในปลาในอันดับอื่น ๆ เช่น ปลาในอันดับ Acipenseriformes ปรากฏต่อมแกสทริคครั้งแรกระหว่าง 6 12 วันหลังฟัก (Gisbert et al., 1998; Gisbert and Doroshov, 2003) การปรากฏของต่อมแกสทริคมักสัมพันธ์กับการกินอาหารครั้งแรกโดยใช้เป็นตัวกำหนดช่วงเวลาที่พร้อมรับอาหารจากภายนอก (Verreth et al., 1992; Senger et al., 1993) เนื่องจากต่อมแกสทริคเป็นโครงสร้างสำคัญที่ทำหน้าที่ช่วยย่อยโปรตีนเพราะผลิตเอนไซม์เปปซิโนเจนและหลั่งกรดไฮโดรคลอริก (H drochloric) ในระหว่างที่ลูกปลาเจริญที่กำลังเข้าสู่ระยะวัยรุ่น (Govoni et al., 1986; Dabrowski and Portella, 2005) แต่สำหรับในกลุ่มของปลาดุกพบว่าโครงสร้างและอวัยวะต่าง ๆ ยังไม่เข้าสู่ระยะวัยรุ่นจนกว่าจะมีการพัฒนาครีบโดยสมบูรณ์ (Balon, 1999; Hu sentru t et al., 2009) อย่างไรก็ตาม ang และคณะ (2010) รายงานว่าการปรากฏของต่อมแกสทริคและ Pepsinogen granules ของ ellow catfish ไม่สามารถยืนยันว่ากระเพาะอาหารสามารถเริ่มทำงานได้แล้วแต่ต้องตรวจสอบการปรากฏของเอนไซม์เปปซิโนเจนและโปรตอนปั๊ม (H^+/K^+ ATPase) ด้วยเทคนิค RT PCR และ *in situ* h bridization

กระเพาะอาหารของลูกปลาดุกลำพันสามารถแบ่งเป็น 2 ส่วนที่อายุ 4 วันหลังฟักตามลักษณะทางวิทยาเนื้อเยื่อเป็นส่วน Cardiac และ P loric และมีการโค้งพับเป็นตัวยูซึ่งมีลักษณะเหมือนกับกระเพาะอาหารของปลาดุกด้าน (Raji and Norouzi, 2010) และ ellow catfish (ang et al., 2010) และมีลักษณะทางเนื้อเยื่อเหมือนกัน กล่าวคือ กระเพาะส่วนหน้า (Cardiac และFundic) บุด้วย Simple columnar และมีต่อมแกสทริคในชั้นมิวโคซาจำนวนมาก และกระเพาะส่วน P loric บุ

ด้วย Simple columnar เช่นกันแต่ในชั้นมิวโคซาปรากฏต่อมแกสทริคน้อยหรือไม่ปรากฏ และมีชั้นกล้ามเนื้อที่หนาและแข็งแรง ลักษณะเช่นนี้เหมือนกับปลา *A. baeri* (Gisbert et al., 1998) *A. medirostris* (Gisbert and Doroshov, 2003) และ *A. ruthenus* (Wegner et al., 2009) ในช่วงการกินอาหารจากภายนอกกระเพาะอาหารของลูกปลาดุกสามารถขยายขนาดได้หลายเท่าตามปริมาณอาหารที่ลูกปลากินเข้าไป

ลำไส้เล็กของลูกปลาดุกลำพันประกอบด้วยลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนท้าย ซึ่งสามารถแยกได้ชัดเจนตามลักษณะทางวิทยาเนื้อเยื่อในลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟัก ลำไส้เล็กส่วนต้นมีการยื่นเข้าไปของผนังกลายเป็นวิลไลเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการย่อยและดูดซึมสารอาหารชนิดต่าง ๆ ซึ่งเริ่มพบลักษณะเช่นนี้ชัดเจนเมื่อลูกปลาอายุประมาณ 5 วันหลังฟัก เซลล์บุผิวของลำไส้เล็กเป็นเซลล์ Enteroc te ซึ่งมี Striated border ยื่นออกมาเพื่อช่วยในการย่อยและดูดซึมสารอาหารและช่วงระหว่างเซลล์ Enteroc te มีการเจริญของ Goblet cells โดยเริ่มปรากฏในลูกปลาอายุ 4 วันหลังฟัก ซึ่งมีความใกล้เคียงกับปลาดุกยุโรป (5 วันหลังฟัก) (Kozaric et al., 2008) และ ellow catfish (3 วันหลังฟัก) (ang et al., 2010) แต่ค่อนข้างเร็วกว่าใน California halibut (13 วันหลังฟัก) (Gisbert et al., 2004) และ Common pendora (33 วันหลังฟัก) (Micale et al., 2006) Goblet cell ในลำไส้เล็กส่วนต้นทำหน้าที่ในการขับสารเมือกมาเคลือบบริเวณผนังลำไส้เพื่อช่วยในการย่อยและดูดซึมสารอาหาร นอกจากนี้ผนังส่วนต้นของลำไส้เล็กมีช่องเปิดของท่อน้ำย่อยจากตับอ่อนซึ่งขับเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น ไลเปส อะไมเลส เป็นต้น มาย่อยสารอาหารต่าง ๆ และมีท่อน้ำดีจากถุงน้ำดีมาเปิดเพื่อขับน้ำดีมาช่วยให้ไขมันแตกตัวทำให้สะดวกในการย่อยและดูดซึม สำหรับในลำไส้เล็กส่วนปลายทำหน้าที่ดูดซึมโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่โดยใช้กระบวนการ Pinoc totic absorption และสะสมภายในไซโทพลาสซึมเป็น Supranuclear vesicles ปรากฏเป็นส่วนที่ไม่ติดสีอยู่ภายในเซลล์ (Govoni et al., 1986; Takashima and Hibi a, 1995) ซึ่งลักษณะเช่นนี้พบเช่นกันใน ellow catfish (ang et al., 2010) Watanabe (1984) รายงานว่าลักษณะเช่นนี้เกิดขึ้นเพื่อแสดงถึงความสามารถในการย่อยโปรตีนในเซลล์เมื่อขาดเอนไซม์ในการย่อยโปรตีน (Proteol tic enz mes) จากกระเพาะซึ่งมักเป็นช่วงแรกที่กระเพาะยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ (Hamlin et al., 2000) นอกจากนี้ลำไส้เล็กส่วนปลายของลูกปลาดุกลำพันยังพบ Goblet cells แทรกอยู่เล็กน้อยในลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟัก ซึ่งปรากฏเร็วกว่าใน California halibut (13 วันหลังฟัก) (Gisbert et al., 2004) และ Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) (20 วันหลังฟัก) (Sarasquete et al, 1995) โดย Goblet cells ที่ปรากฏในลำไส้เล็กส่วนปลายทำหน้าที่ขับสารเมือกซึ่งมีหน้าที่ต่างจากในลำไส้เล็กส่วนต้นโดยช่วยในการหล่อลื่นของเสียในระหว่างการขับถ่าย และป้องกันการติดเชื้อโรคจากภายนอก (Gisbert et al., 2004; ashpal et al., 2007)

พัฒนาการของตับและตับอ่อน และการสะสมไกลโคเจน

ตับและตับอ่อนของลูกปลาดุกลำพันเริ่มปรากฏครั้งแรกในลูกปลาอายุ 1.5 วันหลังฟัก เช่นเดียวกับปลาดุก ellow catfish (2 วันหลังฟัก) (ang et al., 2010) และปลาดุกยุโรป (3 วันหลังฟัก) (Kozaric et al., 2008) ที่มีการพัฒนาของตับและตับอ่อนอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเจริญเติบโตโดยพบอยู่รวมเป็นกลุ่มเซลล์บริเวณท่อทางเดินอาหารส่วนต้นที่ยังไม่พัฒนา เช่นเดียวกับปลา *A. medirostris* (Gisbert and Doroshov, 2003) และ *A. ruthenus* (Wegner et al., 2009) ที่ตับและตับอ่อนเริ่มพัฒนาเมื่ออายุ 2 วันหลังฟัก จากการศึกษาการสะสมไกลโคเจนในตับของลูกปลาดุกลำพันตั้งแต่อายุ 2 40 วันหลังฟักพบว่าเริ่มการสะสมไกลโคเจนในอายุ 2 วันหลังฟัก และเริ่มปรากฏหยดไขมันในอายุ 3 วันหลังฟักโดยพบว่ามีแนวโน้มการสะสมเพิ่มมากขึ้นในวันที่ 4 หลังฟักซึ่งอยู่ในช่วงของการกินอาหารครั้งแรก (3 วันหลังฟัก) โดยพบว่าการสะสมสารอาหารทั้งสองของลูกปลาดุกลำพันเร็วกว่าในปลาดุกยุโรปที่เริ่มพบการสะสมไกลโคเจนและไขมันในลูกปลาอายุ 7 วันหลังฟักซึ่งเริ่มหลังจากการกินอาหารครั้งแรก (4 วันหลังฟัก) (Kozaric et al., 2008) จากการศึกษาพบว่าการทำงานของตับจะเริ่มเมื่อมีการกินอาหารจากภายนอกครั้งแรก และมีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายใน ได้แก่ การเริ่มสะสมไกลโคเจน หยดไขมัน และการปรากฏของ Hepatic sinusoid ในตับ (Pena et al., 2003; Wegner et al., 2009) การสะสมไกลโคเจนในตับของลูกปลาดุกลำพันตั้งแต่อายุ 6 วันหลังฟักมีปริมาณไม่แน่นอนในแต่ละเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ang และคณะ (2010) ที่พบว่าในลูกปลาที่มีการให้อาหารอย่างสมบูรณ์มีระดับการสะสมไกลโคเจนที่ไม่คงที่ ลักษณะเช่นนี้แสดงถึงความสามารถในการสังเคราะห์ (Gl cogenesis) ควบคู่กับการสลาย (Gl cogenol sis) ไกลโคเจนในตับซึ่งมีความสัมพันธ์กับระดับของการเผาผลาญสารอาหาร (Metabolic demand) ในลูกปลา (Mir and Channa, 2011) เนื่องจากไกลโคเจนและไขมันในตับเป็นแหล่งอาหารสำคัญในลูกปลาที่ถุงไข่แดงยุบหมด (Gisbert and Doroshov, 2003) มีความเป็นไปได้ว่าในช่วงแรกของพัฒนาการของปลาดุกลำพันมีความต้องการสารอาหารในปริมาณที่มาก แต่อาหารที่ได้รับอย่างสมบูรณ์นั้นมีคุณค่าทางโภชนาการไม่เพียงพอจึงมีการสลายไกลโคเจนในตับมาใช้เป็นพลังงานในการดำรงชีวิตด้วย

ตับอ่อนของลูกปลาดุกลำพันเริ่มปรากฏพร้อมกับการสร้าง Z mogen granules ภายในส่วนยอดของเซลล์ Acinar ในลูกปลาอายุ 2 วันหลังฟักก่อนกินอาหารในวันที่ 3 หลังฟัก โดยพบว่าในปลาชนิดอื่น ๆ มีการสร้างในช่วงอายุที่แตกต่างกันแต่จะสร้างก่อนการกินอาหารจากภายนอกครั้งแรกเช่นเดียวกัน (Kozaric et al., 2008; Wegner et al., 2009; ang et al., 2010) Z mogen granules เป็นถุงบรรจุเอนไซม์ย่อยอาหารจำพวกโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และ

นิวคลีโอไทด์ที่ยังทำงานไม่ได้ (Takashima and Hibi□a, 1995; Genten et al., 2009) ในการหลั่งเอนไซม์จากตับอ่อนมีความสัมพันธ์กับระดับของการกินอาหาร ส่วนประกอบ หรือการอดอาหารของลูกปลา (Cahu and Zambonino Infunte, 2001) โดยพบว่าในช่วงแรกของการกินอาหารมีการหลั่งเอนไซม์จากตับอ่อนและลำไส้เล็กปริมาณเล็กน้อยแต่จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น (Kolkovski, 2001) ในช่วงแรกที่ลูกปลากินอาหารจากภายนอกจึงจำเป็นต้องได้รับอาหารที่มีเอนไซม์ภายในได้แก่อาหารที่มีชีวิต เช่น อาร์ทีเมีย เป็นต้น (Cahu and Zambonino Infunte, 2001) เพื่อให้ลูกปลาได้รับสารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโต

สารเมือกในทางเดินอาหาร

สารเมือกที่พบในทางเดินอาหารของลูกปลาดุกลำพันมีทั้งชนิดที่มีฤทธิ์เป็นกรดและเป็นกลาง จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าลูกปลาดุกลำพันเริ่มปรากฏเซลล์สร้างสารเมือกมีฤทธิ์เป็นกรดในลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟักที่ผนังของหลอดอาหารและ Goblet cells ของลำไส้เล็กที่กำลังพัฒนา ลักษณะเช่นนี้เหมือนกับรายงานในปลาหลายชนิด เช่น ปลาดุกยุโรป (Kozaric et al., 2008) Dover sole (Boulhic and Gabaudan, 1992) □ellowtail flounder (Baglole et al., 1997) และ Senegal sole (Ribeiro et al., 1999) เป็นต้น ซึ่งเริ่มพบการทำงานของเซลล์เมือกมีฤทธิ์เป็นกรดในช่วงการเริ่มกินอาหารจากภายนอก จากนั้นมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เมือกมากขึ้นและปรากฏเป็น 2 ชนิดในลูกปลาที่โตขึ้นเช่นเดียวกับในปลา *S. aurata* (Domeneghini et al., 1998) และ *A. baeri* (Gisbert et al., 1998) ทั้งนี้การปรากฏสารเมือกที่มีฤทธิ์เป็นกรดในหลอดอาหารของปลาเกี่ยวข้องกับการหล่อลื่นขณะกลืนอาหาร (Gisbert et al., 2004; Kozaric et al., 2008) และช่วยป้องกันการติดเชื้อจากไวรัส และแบคทีเรีย เนื่องจากสารเมือกมีฤทธิ์เป็นกรดมี Sialic acid ซึ่งช่วยป้องกันเอนไซม์ Sialidase ที่แบคทีเรียผลิตได้ (Zimmer et al., 1992) ซึ่งการศึกษาในปลาหลายชนิดพบว่าการติดเชื้อโรคในน้ำเป็นปัญหาในการอนุบาลลูกปลา (Padros et al., 1993) ดังนั้นการที่ลูกปลาขาดการผลิตสารเมือกในหลอดอาหารอาจนำไปสู่การตายเป็นจำนวนมากได้หากขาดการควบคุมคุณภาพของน้ำที่ดีในการอนุบาล (Gisbert et al., 2004)

สำหรับสารเมือกที่มีฤทธิ์เป็นกลางพบในเซลล์บุผิวของกระเพาะอาหารของลูกปลาดุกลำพัน โดยเริ่มพบลักษณะนี้ในลูกปลาอายุ 4 วันหลังฟัก เช่นเดียวกับ *A. baeri* (Gisbert et al., 1998) California halibut (Gisbert et al., 2004) และปลาดุกยุโรป (Kozaric et al., 2008) การปรากฏสารเมือกมีฤทธิ์เป็นกลางในกระเพาะอาหารมีความสัมพันธ์กับความพร้อมในการย่อยอาหารของกระเพาะ เนื่องจากกระเพาะจะผลิตกรดไฮโดรคลอริกจากต่อมแกสทริคออกสู่ช่องลูเมน

เพื่อปรับสภาพของกระเพาะให้เป็นกรดเพื่อให้เอนไซม์เปปซิโนเจนเปลี่ยนเป็นเปปซินที่สามารถทำงานย่อยโปรตีนได้ (Eroschenko, 2005) กระเพาะของลูกปลาดุกลำพันเริ่มปรากฏต่อมแกสทริคเมื่ออายุประมาณ 3.5 วันหลังฟัก เป็นเวลาใกล้เคียงกับที่ส่วนยอดของเซลล์บุผิวของกระเพาะเริ่มผลิตสารเมือกมีฤทธิ์เป็นกลางเพื่อป้องกันการอันตรายจากกรดและเอนไซม์จากต่อมแกสทริค (Gisbert et al., 1999; Kozaric et al., 2008) ดังนั้นจึงทราบได้ว่าช่วงเวลานี้มีความเหมาะสมที่ต่อมแกสทริคในกระเพาะอาหารของลูกปลาดุกลำพันสามารถทำงานได้ นอกจากนี้การทำงานของต่อมแกสทริคอาจมีความสัมพันธ์กับการปรากฏเซลล์เมือกที่มีฤทธิ์เป็นกลางภายในหลอดอาหารส่วนหลังซึ่งเริ่มปรากฏในลูกปลาอายุ 4 วันเช่นกัน ทั้งนี้เนื่องจากหลอดอาหารของลูกปลามีขนาดสั้นและเชื่อมต่อกับกระเพาะอาหารจึงอาจได้รับอันตรายจากกรดในกระเพาะเช่นเดียวกัน

ลำไส้เล็กของลูกปลาดุกลำพันทั้งสองส่วนเริ่มพบ Goblet cells ที่มีฤทธิ์เป็นกรดในอายุ 3 วันหลังฟักซึ่งมีจำนวนน้อย แทรกอยู่ในชั้นมิวโคซาเป็นระยะ ๆ และเริ่มพบ Goblet cells ที่มีฤทธิ์เป็นกลางในลำไส้ทั้งสองส่วนเมื่ออายุ 6 □7 วันหลังฟัก ซึ่งพบลักษณะเช่นนี้ใน *S. aurata* (Domeneghini et al., 1998) *M. aeglefinus* (Hamlin et al., 2000) และปลาดุกยุโรป (Kozaric et al., 2008) เช่นเดียวกัน จากการศึกษาพบว่าสารเมือกมีฤทธิ์เป็นกลางที่ผลิตจาก Goblet cells ในทางเดินอาหารมีความเกี่ยวข้องกับการดูดซึมสารอาหารจำพวกน้ำตาลโมเลกุลคู่ (Disaccharide) และกรดไขมันสายสั้น (Short□chain fatt□acid) (Osman and Caceci, 1991; Riberio et al., 1999) ส่วนการหลั่งสารเมือกที่มีฤทธิ์เป็นกรดเกี่ยวข้องกับการหล่อลื่นของอาหารในลำไส้เล็กทั้งสองส่วน (Sarasquete et al., 1995; Gisbert et al., 2004)

การหลั่งสารเมือกในทางเดินอาหารในแต่ละส่วนของลูกปลาดุกลำพันมีความเกี่ยวข้องกับการกินอาหาร การย่อยอาหาร และการดูดซึมสารอาหาร โดยสารเมือกทั้งสองชนิดมีหน้าที่ต่างกันกล่าวคือ สารเมือกที่มีฤทธิ์เป็นกรดช่วยป้องกันอันตรายจากการติดเชื้อโรคจากภายนอกที่อาจปะปนมากับอาหารและน้ำ และช่วยในการเคลื่อนตัวของอาหารในทางเดินอาหาร ส่วนสารเมือกที่มีฤทธิ์เป็นกลางทำหน้าที่ในการเคลื่อนตัวของอาหาร ป้องกันอันตรายจากกระบวนการย่อยของกระเพาะอาหาร และช่วยในการดูดซึมสารอาหารโมเลกุลเล็กในลำไส้เล็ก

การทำงานของเอนไซม์

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ 4 ชนิด ได้แก่ เอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตส อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส อะไมเลส และไลเปสด้วยเทคนิคทางฮีสโตเคมีในลูกปลาดุกลำพัน 4 ระยะ

พบว่าในระยะแรกจะพบการทำงานของเอนไซม์ในระดับที่ต่ำจากนั้นเมื่อลูกปลาเริ่มกินอาหารจากภายนอกระดับการทำงานของเอนไซม์จะมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นเป็นลำดับ

เอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสปรากฏการทำงานในปลาดุกลำพันระยะ Eleuther embr□onic phase ซึ่งเป็นระยะที่ปรากฏถุงไข่แดง และระยะ Protopter□giolarval phase ซึ่งเป็นระยะที่ลูกปลาเริ่มกินอาหารจากภายนอกในขณะที่ยังปรากฏถุงไข่แดงโดยพบการทำงานเฉพาะที่ถุงไข่แดง และพบการทำงานของเอนไซม์เพียงเล็กน้อยบริเวณชั้นมิวโคซาของลำไส้เล็กส่วนต้นในตอนต้นของระยะ Pter□giolarval phase จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสเป็นเอนไซม์ที่ผลิตในไลโซโซม (L□sosome) แต่สามารถตรวจสอบการทำงานได้ภายนอกไลโซโซม (Kozaric et al., 2006; Mir and Channa, 2010) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าเอนไซม์ชนิดนี้มีการทำงานในระดับที่สูงรอบของถุงไข่แดงในระยะที่ลูกปลายังคงมีถุงไข่แดง (Gisbert et al., 1999; Kim et al. 2001) เมื่อถุงไข่แดงยุบหมดการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ก็จะลดลงด้วย ซึ่งแสดงถึงการทำหน้าที่ในการย่อยสลาย และดูดซึมสารอาหารภายในถุงไข่แดง (Kim et al., 2001) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Buddington (1985) ที่รายงานว่าในระยะแรกของลูกปลาที่มีถุงไข่แดงจะมีการใช้ประโยชน์จากสารอาหารภายในถุงไข่แดงผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยวิธี Pinoc□tosis และ Endoc□tosis นอกจากนี้ Mir และ Channa (2010) ตรวจพบการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้บริเวณลามินาโปรเพรีย, Striated border, Enteroc□te และชั้นซับมิวโคซาของลำไส้เล็กในปลา Snow trout, *Schizothorax curvifrons* Heckel โดยรายงานว่าการปรากฏการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวอาจเกี่ยวข้องกับการดูดซึมและการขนส่งสารในการเผาผลาญสารอาหาร (กลูโคส และอะมิโนเอสิด) จากการกินอาหารของปลา จากผลการศึกษาข้างต้นทำให้ทราบว่าลูกปลาดุกลำพันมีการนำสารอาหารจากถุงไข่แดงมาใช้ในการเจริญเติบโต และทันทีที่ถุงไข่แดงยุบหมดลูกปลาสามารถดูดซึมสารอาหารจากภายนอกผ่านทางลำไส้เล็กได้ทันที

เอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีการทำงานบริเวณถุงไข่แดงในลูกปลาดุกลำพันระยะ Eleutherembr□onic phase เช่นเดียวกับเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสแต่มีระดับที่ต่ำกว่า จากนั้นมีการทำงานที่สูงขึ้นบริเวณลำไส้เล็กในระยะ Protopter□giolarval phase และมีระดับการทำงานที่เพิ่มสูงขึ้นในลำไส้เล็กทั้งสองส่วนในระยะ Pter□giolarval phase และระยะวัยรุ่น การศึกษาในปัจจุบันพบว่าเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสมีระดับการทำงานที่สูงในช่วงก่อนการกินอาหารครั้งแรก (Gawlicka et al., 2000; Kim et al. 2001) โดยเอนไซม์ชนิดนี้มักตรวจพบบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการขนส่งสารแบบใช้พลังงาน (Active transport) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการดูดซึมสารอาหารจากภายนอก เช่น ลิปิด อะมิโนเอสิด แคลเซียม และคาร์โบไฮเดรต (Kozaric et al., 2006) ซึ่งการเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้เป็นการบ่งบอกการเข้าสู่ช่วงเวลาที่ลูกปลา

สามารถกินอาหารจากภายนอกได้แล้ว ในทางตรงข้ามการทำงานที่ลดลงของเอนไซม์นี้เป็นการบ่งบอกถึงสภาพการอดอาหาร (Starvation) หรือการกินอาหารที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการในลูกปลาวัยอ่อน (Cahu and Zambanino Infante, 1994; Gawlicka et al., 2000) จากการศึกษาเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในลูกปลาดุกลำพันพบว่าท่อทางเดินอาหารเริ่มแรกมีความพร้อมในการดูดซึมสารอาหารตั้งแต่แรกฟัก (ระยะ Eleutherembr□onic phase) และมีการทำงานร่วมกับเอนไซม์เอสิดฟอสฟาเตสในการนำสารอาหารในถุงไข่แดงมาใช้ และเมื่อมีการกินอาหารครั้งแรก (3 วัน) จะสามารถดูดซึมสารอาหารโมเลกุลเล็กได้ และพบว่าหลังจากถุงไข่แดงยุบหมดเอนไซม์ชนิดนี้มีระดับการทำงานที่สูงขึ้นมากบริเวณลำไส้เล็กทั้งสองส่วนเป็นการแสดงถึงความพร้อมในการรับสารอาหารจากภายนอกอย่างเต็มที่

จากการศึกษาการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในลูกปลาดุกลำพันพบว่ามีรูปแบบการทำงานคล้ายกับปลาหลายชนิด เช่น Pacific threadfin, Bluefin trevall□ และ Senegal sole (Martinez et al., 1999; Kim et al., 2001) กล่าวคือ เอนไซม์มีการทำงานในระดับสูงในช่วงแรกของการกินอาหารจากภายนอก จากนั้นจะมีการลดลงในช่วงที่ลูกปลาเข้าสู่ระยะวัยรุ่น มีการรายงานว่ารูปแบบการทำงานของเอนไซม์เช่นนี้ถูกกำหนดโดยยีน (Zambanino Infante and Cahu, 2001) เมื่อระดับการทำงานของเอนไซม์น้อยลงทำให้ลูกปลาต้องเปลี่ยนชนิดของอาหารที่กินในระหว่างการเจริญเติบโต (Krogdahl and Sundb□, 1999) มีการอนุบาลลูกปลากินเนื้อ (Carnivorous) ที่กำลังพัฒนาเข้าสู่ระยะวัยรุ่นด้วยอาร์ทีเมียพบว่าสามารถเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสได้ เนื่องจากลูกปลาได้รับเอนไซม์จากอาร์ทีเมียที่ผลิตขึ้นมาย่อยอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตใน Microalgae ที่อาร์ทีเมียกินเข้าไป (Zambanino Infante and Cahu, 1994) ทำให้ในช่วงเวลาดังกล่าวลูกปลาสามารถย่อยสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตได้ดียิ่งขึ้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าลูกปลาดุกลำพันมีการทำงานของเอนไซม์อะไมเลสในเนื้อเยื่อ 2 บริเวณ คือ บริเวณตับอ่อนซึ่งทำหน้าที่ผลิตเอนไซม์ และบริเวณช่องลูเมนของลำไส้เล็กซึ่งเป็นตำแหน่งการทำงานของเอนไซม์ โดยเริ่มพบการทำงานในลำไส้ในลูกปลาอายุ 3 วันหลังฟักและพบการทำงานที่เพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกับบริเวณตับอ่อน จนกระทั่งลูกปลามีอายุ 30 วันหลังฟักภายในช่องลูเมนไม่ปรากฏการทำงานของเอนไซม์พบเฉพาะบริเวณตับอ่อนเท่านั้น จากผลการศึกษาข้างต้นจึงสามารถสรุปได้ว่าลูกปลาดุกลำพันสามารถย่อยและได้รับสารอาหารจากอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตในช่วงอายุ 3 □30 วันหลังฟัก และสามารถให้ลูกปลากินอาร์ทีเมียหรือแพลงก์ตอนสัตว์ชนิดอื่น ๆ หลังจากอายุ 30 วันหลังฟักเพื่อทดแทนเอนไซม์อะไมเลสในช่องลูเมนของลำไส้

จากการศึกษาเอนไซม์ไลเปสในลูกปลาดุกลำพันพบการทำงานตั้งแต่อายุ 2 วันหลังฟักในระดับต่ำและมีการเพิ่มการทำงานสูงขึ้นในระยะ Pter□giolarval phase และระยะวัยรุ่น

โดยพบว่าในระยะแรกมีการทำงานโดยรอบถุงไข่แดงซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการย่อยและดูดซึมสารอาหารจำพวกไขมันในถุงไข่แดง (Gawlicka et al., 2000) จากนั้นมีการทำงานที่สูงขึ้นในชั้นของมิวโคซาและซับมิวโคซาของลำไส้เล็กในช่วงเวลาที่ได้รับอาหารจากภายนอก (อาร์ทีเมีย และอาหารผง) คาดว่าการทำงานที่เพิ่มขึ้นดังกล่าวเกี่ยวข้องกับไขมันที่เป็นองค์ประกอบของอาหารที่ลูกปลาได้รับ (Gawlicka et al., 2000; Mir and Channa, 2010) โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Zambanino Infante และ Cahu (2001) ที่พบว่าเอนไซม์ไลเปสและฟอสโฟไลเปส (Phospholipase) มีการทำงานเพิ่มขึ้นเมื่อผสมสารตั้งต้นของเอนไซม์ดังกล่าวในอาหาร ได้แก่ Triglycerides และ Phospholipids ในการอนุบาลลูกปลา Red drum, *Sciaenops ocellatus* อายุ 24 วันหลังฟัก และ Sea bass อายุ 38 วันหลังฟัก นอกจากนี้พบว่าเอนไซม์ไลเปสสามารถผลิตได้จากต่อมแกสทริคในกระเพาะอาหาร (Gisbert et al., 1999) จึงสามารถพบการทำงานของเอนไซม์นี้ในชั้นมิวโคซาของกระเพาะอาหาร และสามารถผลิตได้จากตับอ่อนซึ่งมีปริมาณมากขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น (Gisbert et al., 1999) นอกจากนี้เอนไซม์ไลเปสสามารถแพร่ไปตามเส้นเลือดในระบบย่อยอาหาร โดยมีการย่อยไขมันให้เป็นไคโลไมครอน (Chilomicron) เพื่อง่ายต่อการดูดซึมและลำเลียงไปยังอวัยวะส่วนต่าง ๆ (Mir and Channa, 2010) ด้วยเหตุนี้จึงปรากฏการทำงานของเอนไซม์ไลเปสในตับของลูกปลาดุกลำพัน

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

1. สรุปผลการวิจัย

1.1. อายุกับความยาวทั้งหมดและปริมาตรถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันอายุ 0 - 46 วันหลังฟักมีความสัมพันธ์กันสามารถนำไปใช้คาดคะเนอายุของลูกปลาดุกลำพันจากความยาวทั้งหมดและปริมาตรถุงไข่แดงได้ในกรณีที่ไม่ทราบเวลาฟักที่แน่ชัด เช่น กรณีสำรวจพบลูกปลาในธรรมชาติ เป็นต้น

1.2. ลูกปลาดุกลำพันมีพัฒนาการในระบบทางเดินอาหารเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับปลาชนิดอื่น โดยท่อทางเดินอาหารเริ่มมีการพัฒนาประมาณวันที่ 1 - 2 หลังฟักและพัฒนาจนครบทุกส่วนในวันที่ 6 - 7 หลังฟัก ซึ่งพบว่าในช่วงเวลาดังกล่าวถุงไข่แดงมีปริมาตรลดลงอย่างรวดเร็วจนสลายหมดไปในวันที่ 7 หลังฟักซึ่งเป็นช่วงเวลาวิกฤตที่ลูกปลาขาดสารอาหารจากภายในและอาจทำให้ลูกปลาตายได้ ดังนั้นเพื่อให้ลูกปลาได้รับสารอาหารอย่างต่อเนื่องเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงจึงควรให้อาหารก่อนที่ถุงไข่แดงจะยุบหมดเนื่องจากสารอาหารจากถุงไข่แดงที่กำลังลดลงนั้นอาจไม่เพียงพอต่อความต้องการสารอาหารที่ใช้ในการเจริญเติบโต

1.3. เวลาที่เหมาะสมในการให้อาหารครั้งแรกแก่ลูกปลาดุกลำพันคือวันที่ 4 หลังฟักเนื่องจากลูกปลามีการพัฒนากระเพาะอาหารและลำไส้เล็กที่พร้อมทำงานแล้ว และมีการผลิตสารเมือกในทางเดินอาหารเพื่อช่วยการเคลื่อนตัวของอาหารและดูดซึมสารอาหาร รวมทั้งเริ่มมีการทำงานของเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยและดูดซึมสารอาหารแต่ยังมีการทำงานไม่เต็มที่ อย่างไรก็ตามอาหารที่ลูกปลาได้รับในเวลานี้ควรเป็นอาหารที่มีชีวิตจำพวกแพลงก์ตอนสัตว์ เช่น อาร์ทีเมียหรือไรแดง เพื่อที่ลูกปลาจะได้รับเอนไซม์จากอาหารมาช่วยในการย่อยภายในด้วย เมื่อลูกปลามีอายุประมาณ 7 วันหลังฟักสามารถกินอาหารที่มีคุณค่าทางอาหารสูงได้ เช่น โปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากมีการทำงานของเอนไซม์ย่อยอาหารที่สูงขึ้น แต่เมื่อลูกปลาเข้าสู่ระยะวัยรุ่น (30 วันหลังฟัก) ไม่ควรได้รับอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตโดยตรงเพราะจะไม่สามารถย่อยได้ ควรได้รับอาหารจำพวกน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวซึ่งสามารถดูดซึมได้ทันที

1.4. ตับของลูกปลาดุกลำพันเริ่มสะสมไกลโคเจนในวันที่ 2 หลังฟักและมีปริมาณมากขึ้นแต่ไม่สม่ำเสมอเนื่องจากไกลโคเจนบางส่วนมีการสลายไปใช้เป็นพลังงานในการเจริญเติบโตทำให้ทราบว่าตับของลูกปลาดุกลำพันมีประสิทธิภาพสูงในการเปลี่ยนสารอาหารที่

สะสมมาใช้เป็นพลังงานในการเจริญเติบโต และทราบว่าลูกปลาดุกลำพันต้องการสารอาหารปริมาณมากในการพัฒนาการในช่วงวัยอ่อน

2. ข้อเสนอแนะ

2.1. ควรศึกษาการทำงานของเอนไซม์ในการย่อยสารอาหารจำพวกโปรตีน และเอนไซม์ชนิดอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องในระบบย่อยอาหาร เพื่อให้เข้าใจถึงกระบวนการย่อยอาหารชนิดต่าง ๆ ของลูกปลาดุกลำพันซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการผลิตอาหารที่เหมาะสมและสามารถการวางแผนการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนที่มีประสิทธิภาพ

2.2. ควรมีการศึกษาเปรียบเทียบลักษณะทางเนื้อเยื่อระบบทางเดินอาหารและการทำงานของเอนไซม์ในทางเดินอาหารของปลาดุกตัวเต็มวัยเพื่อให้ได้องค์ความรู้ด้านชีววิทยาการกินอาหารที่สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

เอกสารอ้างอิง

กฤษณะ เรืองคล้าย, สุภฎา คีรีรัฐนิคม, พันธสิทธิ์ โชคสวัสดิกร และอานุช คีรีรัฐนิคม. 2551. คัพภะวิทยาของปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*). ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง: พัทลุง.

จำเนียร ทองพันชั่ง. 2542. คู่มือการเลี้ยงปลาดุก. สำนักพิมพ์เกษตรศาสตร์วิชาการ: กรุงเทพฯ.

วริยา สรรคชา. 2546. การเพาะเลี้ยงและการดูแลรักษาปลาดุก. หจก. เพชรกะรัต: กรุงเทพฯ.

ศราวุธ เจะโส๊ะ, สุวิมล สี่หิรัญ และพรพนม พรหมแก้ว. 2538. ชีววิทยาบางประการของปลาดุกลำพัน. รายงานการสัมมนาประจำปี 2538 กรมประมง: กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 18-20 กันยายน 2538. หน้า 329-348.

สัมพันธ์ จันทร์ดำ, อุทัยรัตน์ ณ นครและปรัชญา มุสิกสินธร. 2544. ความหลากหลายทางพันธุกรรมของปลาดุกลำพันในประเทศไทย. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัย เกษตรศาสตร์ สาขาประมง ครั้งที่ 39: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 104-112.

สุภาพร สุขสีเหลือง. 2550. มีนวิทยา. พิมพ์ดีจำกัด: กรุงเทพฯ.

สุภฎา คีรีรัฐนิคม, พันธสิทธิ์ โชคสวัสดิกร, กฤษณะ เรืองคล้าย และอานุช คีรีรัฐนิคม. 2551. ผลของระดับโปรตีนในอาหารต่อการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดของปลาดุกลำพันระยะปลานิ้ว. การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลวิชาการ ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, 27-29 สิงหาคม 2551. หน้า 45

อภิชาติ เติมวิชชาการ และสิริวรรณ สุขศรี. 2551. พัฒนาการและการจำแนกชนิดของลูกปลาดุกวัยอ่อน. วารสารประมง. 61(6): 514-519.

Abol-Munafi, A.B., Liem, P.T., Van, M.V. and Ambak, M.A. 2006. Histological ontogeny of the digestive system of marble goby (*Oxyeleotris marmoratus*) larvae. Journal of Sustainability Science and Management. 1(2): 79-86.

Amornsakun, T., Chiayvareesajja, S., Hassan, A., Ambak, A. and Jee, A.K. 1997. Yolk absorption and start of feeding of larval green catfish, *Mystus nemurus* (Cuv. & Val.). Songklanakarin Journal of Science and Technology. 19(1): 117-122.

Amornsakun, T. 1999. Some aspects in early life stages of larval red-tail catfish, *Mystus wyckioides*. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 21(4): 401-406.

Amornsakun, T., Sriwatana, W. and Chamnanwech, U. 2002. Some aspects in early life stage of sand goby, *Oxyeleotris marmoratus*. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 24(4): 611-619.

Amornsakun, T., Sriwatana, W. and Promkaew, P. 2004. Some aspects in early life stage of Siamese gourami, *Trichogaster pectoralis* (Regan) Larvae. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 26(3): 347-356.

Baglole, C.J., Murray, H.M., Goff, G.P. and Wright, G.M. 1997. Ontogeny of the digestive tract during larval development of yellowtail flounder: a light microscopic and mucous histochemical study. Journal of Fish Biology. 51: 120-134.

Balon, E.K. 1999. Alternative ways to become a juvenile or a definitive phenotype (and on some persisting linguisticoffences). Environmental Biology of Fishes. 56: 17-38.

Bancroft, J.D. and Gamble, M. 2002. Theory and Practice of Histological Techniques, 5th Ed. Churchill Livingstone: London.

Bengson, D.A. 1993. A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. Journal of World Aquaculture Society. 24: 199-210.

Bouhlic, M. and Gabaudan, J. 1992. Histological study of the organogenesis of digestive system and swim bladder of the dover sole, *Solea solea* (Linnaeus, 1758). Aquaculture. 102: 373-396.

Buddington, R. 1985. Digestive secretions of lake sturgeon, *Acipenser fulvencens*, during early development. Journal of Fish Biology. 26: 715-723.

Cahu, C. and Zambonino Infante, J. 1994. Early weaning of sea bass *Dicentrarchus labrax* larvae with a compound diet: effect on digestive enzymes. Comparative Biochemistry and Physiology. 109: 213-222.

Cahu, C. and Zambonino Infante, J. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. Aquaculture. 200: 161-180.

Chayen, J., Butcher, R.G. and Poulter, L.W. 1960. A Guide to Practical Histochemistry. Philadelphia. J.B. Lippincott Company: USA.

Chen, X., Jin, C., Xu, J. and Wang, D. 2002. Histological studies on the postembryonic development of the digestive system in *Mystus macropterus*. Journal of Southwest China Normal University. 27(2): 239-243.

Dabrowski, K. and Portella, M.C. 2005. Feeding plasticity and nutritional physiology in tropical fishes. In: The Physiology of Tropical Fishes. Val, A.L., Fide Almeida-Val, V.M. and Randall, D.J., Ed. Academic Press: USA, pp 155-224.

De Graaf, G. and Janssen, J. 1996. Handbook on the Artificial Reproduction and Pond Rearing of the African catfish *Clarias gariepinus* in Sub-Saharan Africa. In: A Handbook Fao. Fisheries Technical: Rome, pp 109.

Domeneghini, C., Pannelli Straini, R. and Veggetti, A. 1998. Gut glycoconjugates in *Sparus aurata* L. (Pisces, Teleostei). A comparative histochemical study in larval and adult ages. Histology and Histopathology. 13: 135-145.

Eroschenko, V.P. 2005. diFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations, 10th Ed. Lippincott Williams & Wilkins: USA.

Gawlicka, A., Parent, B., Horn, M.H., Ross, N., Opstad, I. and Torrissen, O.J. 2000. Activity of digestive enzymes in yolk-sac larvae of Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): indication of readiness for first feeding. Aquaculture. 184: 303-314.

Genten, F., Terwinghe, E. and Danguy, A. 2009. Atlas of Fish Histology. Science Publishers: USA.

Gisbert, E., Rodrígue , A., Williot, P. and Castelló-Orvay, F. 1998. A histological study of the development of the digestive tract of Siberian sturgeon (*Acipenser baeri*) during early ontogeny. Aquaculture. 167: 195-209.

Gisbert, E., Sarasquete, M.C., Williot, P. and Castello-Orvay, F. 1999. Histochemistry of the development of the digestive system of Siberian sturgeon during early ontogeny. Journal of Fish Biology. 55: 596-616.

Gisbert, E. and Doroshov, S.I. 2003. Histology of the developing digestive system and the effect of food deprivation in larval green sturgeon (*Acipenser medirostris*). Aquatic Living Resources. 16: 77-89.

Gisbert, E., Conklin, D.B. and Piedrahita, R.H., 2004. Effects of delayed first feeding on the nutritional condition and mortality of California halibut larvae. Journal of Fish Biology. 64: 116-132.

Gisbert, E., Piedrahita, R.H. and Conklinb, D.E. 2004. Ontogenetic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthys californicus*) with notes on feeding practices. Aquaculture. 232: 455-470.

Govoni, J.J., Boehlert, G.W. and Watanabe, Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. Environmental Biology of Fishes. 16: 59-77.

Hamlin, H.J., Hunt von herbing, I. and Kling, L.J. 2000. Histological and morphological evaluations of the digestive tract and associated organs of haddock throughout post-hatching ontogeny. Journal of fish biology. 57: 716-732.

Heath, D.D., Fox, C.W. and Heath, J.W. 1999. Maternal effects on offspring si□e: variation through early development of Chinook salmon. Evolution. 53(5): 1605-1611.

Hernande□, D.R., Pere□Gianeselli, M. and Domitrovic, H.A. 2009. Morphology, histology andhistochemistry of the digestive system of South American catfish (*Rhamdia quelen*). International Journal Morphology. 27(1): 105-111.

Hossain, Q., Altaf Hossain, M. and Parween, S. 2006. Artificial breeding and nursery practices of *Clarias batrachus* (Linnaeus, 1758). Scientific World. 4(4): 32-37.

Humason, G. 1979. Animal Tissue Techniques. W.H. Freeman and Company: San Francisco.

Huysentruyt, F., Moerkerke, B., Devaere, S. and Adriaens, D. 2009. Early development and allometric growth in the armoured catfish *Corydoras aeneus* (Gill, 1858). Hydrobiologia. 627: 45-54.

Kim, B.G., Divakaran, S., Brown, C.L. and Ostrowski, A.C. 2001. Comparative digestive en□yme ontogeny in two marine larval fishes: Pacific threadfin (*Polydactylus sexfilis*) and bluefin trevally (*Caranx melampygus*). Fish Physiology and Biochemistry. 24: 225-241.

Kiriratnikom, S., Ruangklay, K., Choksawatdikorn, P., Anuchart, P. and Kiriratnikom, A. 2007. Effect of Various Forms of Diet on Growth Performance and Survival of Nieuhofii Catfish Larvae (*Clarias nieuhofii*). Proceeding of the 33$^{th.}$ Congress on Science and Technology of Thailand. Walailak University, October 18-20, 2007. pp 564-569.

Kjørsvik, E. and Reiersen, A.L. 1992. Histomorphology of the early-sac larvae of the Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* L. an indication of the timing of functionality. Journal of Fish Biology. 41: 1-19.

Ko aric, Z., Ku ir, S., Petrinec, Z., Gjurcevic, E. and Opacak, A. 2006. Histochemical distribution of digestive en ymes in intestine of goldline, *Sarpa salpa* L. 1758. Journal Application of Ichthyology. 22: 43-48.

Ko aric, Z., Ku ir, S., Petrinec, Z., Gjurcevic, E. and Bo ic, M. 2008. The development of the digestivetract in larval European catfish (*Silurus glanis* L.). Anatomia Histologia Embryologia Journal of Veterinary Medicine. 37: 141-146

Kolkovski, S. 2001. Digestive en ymes in fish larvae and juveniles implications and applications to formulated diets. Aquaculture. 200: 181-201.

Krogdahl, A. and Sundby, A. 1999. Characteristics of pancreatic function in fish. In: Biology of the Pancreas in Growing Animals. Pier ynowski, S.G. and Zabielski, R., Ed. Elsevier Science: Amsterdam, pp 437-458.

Lovell, T. 1998. Nutrition and Feeding of Fish, 2nd Ed. Kluwer Academic Publishers: USA.

Mahmood, A., Yamagishi, F., Eliakim, R., DeSchryver-Kecskemeti, K., Gramlich, T.L. and Alpers, D.H. 1994. A possible role for rat intestinal surfactant like particles in transepithelia triacylglycerol transport. The Journal of Clinical Investigation. 93: 70-80.

Mallory, F.B. 1942. Pathological Technique. W.B. Saunders Co.: USA.

Martine , I., Moyaano, F.J., Fernande -Dia , C. and Yufera, M. 1999. Digestive en ymes activity during larval development of the Senegal sole (*Solea senegalensis*). Fish Physiology and Biochemistry. 21: 317-323.

Micale, V., Di Giancamillo, A., Domeneghini, C., Mylonas, C.C., Nomikos, N., Papadakis, I.E. and Muglia, U. 2008. Ontogeny of the digestive tract in sharpsnout sea bream *Diplodus puntazzo* (Cetti, 1777). Histology and Histopathology. 23: 1077-1091.

Mir, I.H. and Channa, A. 2010. Histochemical distribution of lipase and acid phosphatase in the intestinal tract of snow trout, *Schizothotax curvifrons* Heckel. Journal of biological Science. 10(7): 643-647.

Mir, I.H. and Channa, A. 2011. Liver of the snow trout, *Schizothotax curvifrons* Heckel: A Histochemical study. International Journal of Biological Chemistry. 5(1): 75-85.

Mukai, K., Tu an, A.D., Lim, L.S. Wahid, N., Muhamad Shaleh, S.R., and Senoo, S. 2008. Development of sensory organs in larvae of African catfish *Clarias gariepinus*. Journal of Fish Biology. 73(7): 1648-1661.

Nelson, J.S. 1994. Fish of the World, 3rd Ed. John Wiley & Sons Inc: USA.

Olatunde, A.A. and Ogunbiyi, O.A. 1977. Digestive enzyme in the alimentary tracts of three tropical catfish. Hydrobiologia. 56(1): 21-24.

Onal, U., Langdon, C. and Celik, I. 2008. Ontogeny of the digestive tract of larval percula clownfish, *Amphiprion percula* (Lace´pe`de, 1802): a histological perspective. Aquaculture Research. 39: 1077-1086.

Osman, A.H.K. and Caceci, T. 1991. Histology of the stomach of *Tilapia nilotica* Linnaeus, 1758 from the river Nile. Journal of Fish Biology. 38: 221-223.

Padros, F., Sala, R. and Crespo, S. 1993. Organogenesis in turbot, *Scophthalmus maximus*, larvae related to the main developmental stages. European Aquaculture Society Special. 15: 213-215.

Pena, R., Dumas, S., Villalejo-Fuerte, M. and Ortiz-Galindo, J.L. 2003. Ontogenetic development of the digestive tract in reared spotted sand bass *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. Aquaculture. 219: 633-644.

Pena, R. and Dumas, S. 2005. Effect of delayed first feeding on development and feeding ability of *Paralabrax maculatofasciatus* larvae. Journal of Fish Biology. 67: 640-651.

Petrinec, Z., Nejedli, S., Kužir, S. and Opačak, A. 2005. Mucosubstances of the digestive tract mucosa in Northern pike (*Esoxlucius* L.) and European catfish (*Silurus glanis* L.) Veterinarski. 75(4): 317-327.

Pimenta de Amorim, M., Campos Gomes, B.V., Martins, Y.S., Sato, Y., Rizzo, E. and Bazzoli, N. 2009. Early development of the silver catfish *Rhamdia quelen* (Quoy & Gaimard, 1824) (Pisces: Heptapteridae) from the Sao Francisco river basin, Brazil. Aquaculture Research. 40: 172-180.

Pu, H.Y., Zhai, B.X. and Liu, H.L. 2004. Histological studies on post-embryonic development of digestive system in larval catfish *Silurus asotus*. Journal of Fishery Sciences of China. 11(1): 1-8.

Rainboth, W.J. 1996. FAO Species Identification Field Guide for Fishery Purposes, Fishes of the Cambodian Mekong. Food and Agriculture Organization of the United Nation: Rome.

Raji, A.R. and Norou i, E. 2010. Histological and histochemical study on the alimentary canal in walking catfish (*Claris batrachus*) and piranha (*Serrasalmus nattereri*). Iranian Journal of Veterinary Research. 11(3): 255-261.

Ribeiro, L., Sarasquete, C. and Dinis, M.T. 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. Aquaculture. 171: 293-308.

Roubaty, C. and Portmann, P. 1988. Relation between intestinal alkaline phosphatase activity and brush border membrane transport of inorganic phosphate, D-glucose-6-phosephate. Pfluegers Arch. 412: 482-490.

Sarasquete, M.C., Polo, A. and Yufera, M. 1995. Histology and histochemistry of the development of the digestive system of larval gilthead seabream, *Sparus aurata*, L. Aquaculture. 130: 79-92.

Sarieyyupoglu, M., Girgin, A. and Koprucu, S. 2000. Histological study in the digestive tract on larval development of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum, 1792). Turkey Journal Zoology. 20: 199-205.

Segner, H., Rosch, R., Werreth, J. and Wit, U. 1993. Larval nutritional physiology: studies with *Clarias gariepinus*, *Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus*. Journal of the World Aquaculture Society. 24: 121-134.

Smith, H.M. 1945. The Freshwater Fishes of Siam or Thailand. United States Government office: Washington.

Takashima, F. and Hibiya, T. 1995. An Atlas of Fish Histology Normal and Pathological Features, 2nd Ed. Kodansha Ltd.: Japan.

Tengjaroenkul, B., Smith, B.J., Smith, S.A. and Chatreewongsin, U. 2002. Ontogenic development of the intestinal en ymes of cultured Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* L. Aquaculture. 211: 241-251.

Tremblay, G. 1967. The locali ation of amylase activity in tissue sections by a starch film method. Journal of Histochemistry and Cytochemistry. 11: 202-206.

Verreth, J., Torreele, E., Spar ier, E. and Slurs en, A. 1992. The development of a functional digestive system in *Clarias gariepinus* (Burchell). Journal of the World Aquaculture Society. 23(4): 286-998.

Vidthayanon, C. 2005. Thailand Red Data: Fishes. Office of Natural Research and Environmental Policy and Planning: Thailand.

Wang, C., Xie, C. and Feng, G. 2002. The effects of the feeding organs and digestive tract in *Pelteobagrus fulvidraco* on its food si e during development. Acta Hydaobiologia Sinica. 26: 58-66.

Watanabe, Y. 1984. An ultrastructural study of intracellular digestion of horseradish peroxidase by the rectal epithelium cells in larvae of a freshwater cottid fish *Cottus nozawae.* Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries. 50: 409-416.

Wegner, A., Ostas ewska, T. and Ro ek, W. 2009. The ontogenetic development of the digestive tract and accessory glands of starlet (*Acipenser ruthenus* L.) larvae during endogenous feeding. Reviews in Fish Biology and Fisheries. 19: 431-444.

Yang, R., Xie, C., Fan, Q., Gao, C. and Fang, L. 2010. Ontogeny of the digestive tract in yellow catfish *Pelteobagrus fulvidraco* larvae. Aquaculture. 302: 112-123.

Yashpal, M., Kumari, U., Mittal, S. and Mittal, A.K. 2007. Histochemical characteri ation of glycoproteins in the buccal epithelium of the catfish, *Rita rita*. Acta histochemica. 109: 285-303.

Yufera, M. and Darias, M.J. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. Aquaculture. 268: 53-63.

Zaiss, M.M., Papadakis, I.E., Maingot, E., Divanach, P. and Mylonas, C.C. 2006. Ontogeny of the digestive tract in shi drum (*Umbrina cirrosa* L.) reared using the mesocosm larval rearing system. Aquaculture. 260(29): 357-368.

Zambonino Infante, J. and Cahu, C. 1994. Development and response to a diet change of some digestive en ymes in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larvae. Fish Physiology and Biochemistry. 12: 399-408.

Zambonino Infante, J. and Cahu, C. 2001. Ontogeny of the gastrointestinal tract of marine fish larvae. Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 130: 477-487.

Zimmer, G., Reuter, G. and Schauer, R. 1992. Use of influen a c-virus for detection of 9-O-acetylated sialic acids on immobili ed conjugates by esterase activity. European Journal of Biochemistry. 204: 209-215.

ภาคผนวก ก

ตารางภาคผนวกที่ 1 ค่าความยาวลำตัวทั้งหมดของลูกปลาดุกลำพันอายุ 0 - 46 วันหลังฟัก

No.	อายุ	TL	อายุ	TL	อายุ	TL	อายุ	TL	อายุ	TL	อายุ	TL	อายุ	TL	อายุ	TL	อายุ	TL	อายุ	TL	อายุ	TL	อายุ	TL	อายุ	TL
1	0	4.40	1	6.00	2	6.90	3	6.60	4	7.90	5	8.60	6	9.20	7	9.10	8	9.15	9	9.60	10	11.40	12	13.65	14	13.20
2		5.00		6.60		6.85		6.90		7.90		8.20		8.75		9.05		10.30		10.25		10.30		14.05		15.65
3		4.85		5.90		6.85		7.25		8.20		8.60		9.20		9.20		10.90		10.40		11.05		13.40		14.25
4		4.10		6.75		6.40		6.25		7.85		8.70		8.70		9.80		10.30		10.50		10.30		11.20		13.15
5		4.35		6.50		5.65		7.10		7.50		8.75		9.55		9.80		10.30		10.30		10.70		13.00		15.05
6		4.25		6.85		6.70		6.95		8.40		8.75		8.75		9.80		10.75		10.80		11.75		12.80		14.30
7		4.05		6.40		6.85		6.60		8.10		8.55		8.65		9.60		9.30		11.30		10.50		13.25		14.50
8		3.85		6.40		6.95		6.95		7.60		8.80		9.00		9.10		9.40		9.60		10.90		12.50		13.55
9		3.55		6.60		6.90		6.10		8.10		8.25		8.80		9.80		9.65		9.20		11.10		12.75		14.40
10		4.40		6.44		6.95		6.65		8.55		8.10		8.80		9.70		10.10		10.20		10.25		12.90		14.75
AV±SD	4.27± 0.46		6.44± 0.32		6.70±0.40		6.81±0.31		8.01±0.33		8.53±0.25		8.94±0.29		9.50±0.34		10.02±0.61		10.22±0.62		10.83±0.51		12.95±0.77		14.28±0.80	
1	16	16.25	18	14.80	20	18.80	22	20.30	25	21.55	28	26.45	31	27.40	34	36.30	37	33.10	40	36.45	43	39.30	46	35.35		
2		16.20		19.50		17.90		21.20		28.30		20.70		27.25		31.45		32.10		33.35		37.05		38.45		
3		16.20		16.95		15.70		19.10		27.30		28.75		26.65		30.15		35.35		36.25		38.45		33.05		
4		15.90		17.65		19.80		21.30		21.40		28.35		29.25		31.90		30.35		30.30		37.00		39.70		
5		14.35		14.05		18.30		20.25		23.40		32.25		30.10		32.80		30.00		34.05		37.05		39.65		
6		14.30		18.55		17.90		23.60		22.50		29.05		26.30		32.85		32.00		35.15		36.40		33.30		
7		13.40		14.40		19.20		20.05		19.85		23.95		26.95		32.35		28.30		31.35		35.70		34.55		
8		15.60		16.75		18.85		21.30		19.30		25.70		28.90		30.55		32.80		30.80		35.45		42.35		
9		15.10		16.25		19.45		21.05		25.35		28.20		32.25		31.50		30.00		30.33		37.20		38.60		
10		15.55		18.30		19.00		18.25		22.30		27.10		27.15		30.25		27.85		30.48		41.15		37.55		
AV±SD	15.29±0.98		16.72±1.85		18.49±1.16		20.64±1.45		23.13±3.00		26.47±2.72		28.22±1.88		31.53±1.04		31.96±1.84		33.13±2.48		37.07±1.22		37.14±2.44			

ตารางภาคผนวกที่ 2 ค่าปริมาตรถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันอายุ 0 - 4 วันหลังฟัก

No.	อายุ	R1 (mm.)	R2 (mm.)	YV (mm^3)	อายุ	R1 (mm.)	R2 (mm.)	YV (mm^3)	อายุ	R1 (mm.)	R2 (mm.)	YV (mm^3)	อายุ	R1 (mm.)	R2 (mm.)	YV (mm^3)	อายุ	R1 (mm.)	R2 (mm.)	YV (mm^3)
1	0	0.825	0.900	2.566	0.5	0.75	0.81	1.914	1.0	0.69	0.88	1.732	1.5	0.625	0.825	1.350	2.0	0.63	0.85	1.391
2		0.813	0.875	2.420		0.70	0.90	1.847		0.65	0.83	1.460		0.725	0.825	1.816		0.45	0.69	0.583
3		0.775	0.925	2.327		0.73	0.90	1.982		0.65	0.85	1.504		0.650	0.825	1.460		0.70	0.81	1.668
4		0.750	0.800	1.885		0.75	0.88	2.062		0.69	0.75	1.485		0.688	0.850	1.683		0.60	0.80	1.206
5		0.700	0.800	1.642		0.63	0.75	1.227		0.71	0.81	1.728		0.663	0.813	1.494		0.63	0.68	1.104
6		0.775	0.875	2.201		0.75	0.83	1.944		0.73	0.88	1.927		0.675	0.825	1.575		0.66	0.81	1.494
7		0.425	0.525	0.397		0.75	0.81	1.914		0.69	0.88	1.732		0.650	0.875	1.549		0.56	0.69	0.911
8		0.625	0.750	1.227		0.73	0.85	1.871		0.65	0.78	1.372		0.525	0.750	0.866		0.63	0.75	1.227
9		0.600	0.688	1.037		0.73	0.85	1.871		0.71	0.85	1.807		0.663	0.775	1.425		0.60	0.75	1.131
10		0.725	0.750	1.651		0.68	0.73	1.384		0.69	0.78	1.534		0.688	0.775	1.534		0.63	0.70	1.145
AV±SD			1.735 ±0.691				1.786 ±0.234				1.628 ±0.180				1.475 ±0.251				1.186 ±0.302	
1	2.5	0.63	0.70	1.145	3.0	0.68	0.70	1.336	3.5	0.54	0.75	0.908	4.0	0.48	0.63	0.591				
2		0.65	0.75	1.327		0.63	0.69	1.125		0.56	0.70	0.928		0.60	0.69	1.037				
3		0.60	0.73	1.093		0.63	0.73	1.186		0.60	0.69	1.037		0.60	0.75	1.131				
4		0.63	0.71	1.166		0.68	0.75	1.431		0.63	0.66	1.084		0.48	0.75	0.709				
5		0.58	0.70	0.969		0.60	0.69	1.037		0.56	0.63	0.828		0.50	0.75	0.785				
6		0.60	0.75	1.131		0.56	0.69	0.911		0.58	0.63	0.866		0.50	0.75	0.785				
7		0.48	0.59	0.555		0.56	0.75	0.994		0.54	0.63	0.756		0.50	0.69	0.720				
8		0.60	0.75	1.131		0.60	0.75	1.131		0.50	0.56	0.589		0.49	0.73	0.722				
9		0.56	0.73	0.961		0.56	0.69	0.911		0.63	0.69	1.125		0.44	0.75	0.601				
10		0.60	0.75	1.131		0.48	0.56	0.532		0.56	0.69	0.911		0.50	0.75	0.785				
AV±SD			1.061 ±0.205				1.059 ±0.251				0.903±0.159				0.787±0.173					

ตารางภาคผนวกที่ 3 ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงลูกปลาดุก

ส่วนประกอบ	กรัม/อาหาร 100 ก.
ปลาป่น	56.8
กากถั่วเหลือง	13.2
แป้งสาลี	7
แป้งข้าวเจ้า	16.6
วิตามิน	1
แร่ธาตุ	1
น้ำมันถั่วเหลือง	2.6
น้ำมันปลา	1.8

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีเตรียม

1. การย้อม H&E

1.1. Bouin's fluid

Picric acid (Saturated aqueous solution)	75.0 ml.
Formalin (Formaldehyde 40%)	25.0 ml.
Glacial acetic acid	5.0 ml.

1.2. Harris's Hematoxylin

Harris's Hematoxylin	5.0 g.
Absolute alcohol	50.0 g.
Aluminium ammonium sulfate (Ammonium alum)	100.0 g.
Mercuric oxide	2.5 g.
Distilled water	1000.0 ml.

<u>วิธีการเตรียม</u>

ละลายผงสี Harris's Hematoxylin ใน Absolute alcohol โดยอุ่นบนแผ่นความร้อน (hot plate) และละลาย Ammonium alum ในน้ำกลั่น ภายใน Erlenmeyer flask ขนาด 2000 ml. โดยใชความร้อนช่วย จากนั้นผสมสารละลายทั้ง 2 ชนิด เข้าด้วยกัน และคนให้เข้ากันดี ต้มให้เดือดภายในเวลารวดเร็ว (ใช้ตะเกียงบุนเสน หรือเตาแก๊ส) แล้วค่อยๆใส่ผง Mercuric oxide ลงไปทีละน้อยจนหมด คนให้เข้ากันดีจะได้สารละลายสีม่วงดำ แช่สารละลายนี้ในน้ำเย็นจนสารละลายเย็นลง สามารถนำไปใช้ได้ทันที แต่เพื่อให้สีสุกตามกระบวนการทางเคมี จะต้องตั้งทิ้งไว้ในที่มืดประมาณ 2-3 วัน

<u>การทดสอบสี</u> หยดสี Harris's Hematoxylin 1 หยดบนกระดาษกรองสีขาว หากขอบนอกของสีน้ำเงินเข้ม แสดงว่าสีนี้ใช้ได้ หากไม่เกิดแสดงว่าสีนี้ไม่มีประสิทธิภาพ

<u>ข้อควรปฏิบัติ</u> กรองสีก่อนจะใช้ย้อมอย่างน้อยวันละครั้ง ตรวจสอบคุณภาพสีสัปดาห์ละครั้ง และเก็บสีที่ยังไม่ใช้ในขวดสีน้ำตาล

1.3. Eosin

-Stock solution

Eosin Y	10.0 g.
Distilled water	50.0 ml.

ละลายให้เข้ากันดีแล้วเติม

95% Ethyl alcohol 940.0 ml.

3.2 Working solution

-Stock solution 1 ส่วน

95% Ethyl alcohol 1 ส่วน

1.4. 1% acid alcohol

70% Ethyl alcohol 1000.0 ml.

Conc. HCL 10.0 ml.

1.5. Saturated litium carbonate

Litium carbonate 3.0 g.

Distilled water 1000.0 ml.

2. การย้อม Best's Carmine

2.1. Working Carmine

Stock solution 10 ml.

28% Ammonia water 15 ml.

Methyl alcohol 15 ml.

2.2. Differentiating solution

Absolute alcohol 20 ml.

Methyl alcohol 10 ml.

Distilled water 15 ml.

3. การย้อม PAS&Alcian blue

Alcian blue solution pH. 2.5

Alcian blue 1 g.

3% acetic acid 100 ml.

4. เทคนิค Lead nitrate (สำหรับ Acid phosphatase)

Incubation medium

0,05 M. Acetate buffer	100 ml.
0.01 M. Sodium B glycerophosphate	0.2160 g.
Lead nitrate	1.3248 g.

5. เทคนิค Calcium cobalt (สำหรับ Alkaline phosphatase)

Incubation medium

3% Sodium B glycerophosphate	10 ml.
2% Sodium diethyl barbiturate	10 ml.
Distilled water	5 ml.
2% Calcium chloride	20 ml.
5% Magnesium sulphate	1 ml.

6. เทคนิค Substrate film (สำหรับ Amylase)

6.1. การเตรียมสไลด์เคลือบ

ละลายแป้ง 4 g.ในน้ำเดือด 15 นาที กรองด้วยผ้าขาวบางขณะยังร้อน หยดสารละลาย 4-5 หยดบนสไลด์แก้วแล้วเกลี่ยด้วยปลายปิเปตอย่างรวดเร็ว จากนั้นสไลด์ในแนวตั้งบนกระดาษกรองทิ้งให้แห้งแล้วเช็ดสารละลายที่กองอยู่ส่วนล่างให้หมด นำสไลด์ไปแช่ในสารละลาย Mix 1 คืน แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง

6.2. สารละลาย Mix เตรียมจาก Methyl alcohol : Acetic acid : น้ำกลั่น = 5 : 1 : 5

7. เทคนิค Tween (สำหรับ Lipase)

Incubation medium (solution A+B+C)

Solution A: Tris buffer pH 7.2		9 ml.
Solution B:		0.6 ml.
Tween 80	5 ml.	
Tris buffer pH 7.2	100 ml.	
Thymol	1 crystal	
Solution C		0.3 ml.
Calcium chloride	200 mg.	
Distilled water	10 ml.	

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นายทวีสิน แซ่ลี้

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210220026

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

โครงการพัฒนากำลังคนด้านวิทยาศาสตร์ (ทุนเรียนดีวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย : Science Achievement Scholarship of Thailand : SAST) และทุนสนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2553

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Saelee, T., Kiriratnikon, S., Suwanjarat, J., Thongboon, L. and Pongsuwan, K. 2011. The Development of the Digestive System in *Clarias Nieuhofii* Larvae: Histology and Histochemical Studies. Journal of the Microscopy Society of Thailand. 4(1): 16-19.