รายงานวิจัย

โครงสร้างเนื้อเยื่อและฮีสโตเคมีของพัฒนาการระบบทางเดินอาหารในปลาดุกลำพันวัยอ่อน *Clarias nieuhofii*

Histology and histochemistry of the development of the digestive system in Nieuhofii's walking catfish *Clarias nieuhofii* larvae

คณะผู้วิจัย

รศ. จินตมาศ สุวรรณจรัส

รศ. ดร. ธำรงค์ อมรสกุล

นางกนกกาญจน์ พงษ์สุวรรณ

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	iii
กิตติกรรมประกาศ	v
รายการภาพ	vi
รายการตาราง	viii
ความหมายอักษรย่อ	ix
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วิธีดำเนินการวิจัย	
- การเตรียมตัวอย่างลูกปลาดุกลำพัน	3
- ศึกษาความสัมพันธ์ของอายุปลาและขนาดปลา	3
- ศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหาร	4
- การศึกษาทางฮีสโตเคมี	4
การศึกษาปริมาณไกลโคเจน	5
การศึกษาปริมาณสารเมือก (Mucosubstance)	5
การศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์	7
3. ผลการวิจัย	
- ศึกษาความสัมพันธ์ของอายุปลาและขนาดปลา	10
- ศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหาร	13
การยุบตัวของถุงไข่แดง (Yolk sac)	13
การพัฒนาของท่อทางเดินอาหาร (Digestive tract)	14
พัฒนาการของตับ (Liver) และตับอ่อน (Pancreas)	30
- การศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์	33
- พัฒนาการของอวัยวะในระบบย่อยอาหาร	33
4. สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย	38
เอกสารอ้างอิง	43

บทคัดย่อ

ศึกษาและวิเคราะห์พัฒนาการของเนื้อเยื่อทางเดินอาหารและอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบย่อยอาหารในปลาดุกลำพันวัยอ่อน ตั้งแต่แรกฟัก (อายุ 0 วัน) ถึงอายุ 46 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา รวมทั้งศึกษาอายุและขนาดความยาวทั้งสิ้นของลูกปลาดุกลำพัน พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ สามารถนำค่าความยาวทั้งสิ้นมาเป็นตัวบอกอายุปลาได้อย่างใกล้เคียง และตั้งแต่อายุ 10 วัน เป็นต้นไป ลูกปลามีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็ว เมื่อแรกเกิดท่อทางเดินอาหารของมีลักษณะเป็นท่อตรง ปกคลุมด้วยเซลล์บุผิวทรงเตี้ยชั้นเดียว ปากและทวารหนักเปิดออกเมื่อปลามีอายุ 2 วัน ปลาดุกลำพันมีพัฒนาการของกระเพาะอาหารและเซลล์ตับค่อนข้างเร็ว (ก่อนอายุ 2 วัน) และมีเซลล์ตับอ่อนเกิดขึ้นที่อายุ 2 วัน การศึกษาพบว่าเซลล์ตับปลาดุกลำพันมีประสิทธิภาพสูงในการสะสมไกลโคเจน โดยพบตั้งแต่ฟักเป็นตัว (อายุ 0 วัน) ลูกปลาอายุ 3 วัน พบตุ่มฟันบนผนังช่องปาก พร้อมกับมีการยกตัวของผนังกระเพาะอาหาร ถุงไข่แดงยุบหมดจากภายนอกเมื่อปลาอายุ 5 วัน และหลังจากอายุ 7 วัน ไข่แดงถูกใช้หมด ลูกปลารับสารอาหารจากภายนอกเท่านั้น จึงเป็นช่วงวิกฤตสำหรับการให้อาหารที่ลูกปลาสามารถย่อยและดูดซึมได้ จากการพบต่อมแก๊สตริกปรากฏในชั้นมิวโคซาของกระเพาะเมื่อปลาอายุ 4 วัน พร้อมกับการพบสารเมือกเป็นกลางเคลือบผนังกระเพาะอาหาร แสดงว่า กระเพาะอาหารของปลาดุกลำพันวัยอ่อนเริ่มทำหน้าที่บดย่อยอาหารได้ในช่วงอายุดังกล่าว ปลาดุกลำพันมีเซลล์ต่อมสร้างสารเมือก 3 ชนิด โดยที่เซลล์เยื่อบุผิวผนังท่อคอหอยและหลอดอาหารมีเซลล์ต่อมสร้างสารเมือกกรดมากที่สุด รวมทั้งมีการทำงานของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase หนาแน่นมากที่บริเวณนี้ ส่วนที่ลำไส้มีการทำงานของเอ็นไซม์ตั้งแต่ลูกปลาอายุ 3 วันแสดงว่าเริ่มมีการดูดซึมสารอาหารเกิดขึ้น และตั้งแต่ 20 วันเป็นต้นไป ที่ผิวบนเยื่อยุผิวผนังลำไส้ของปลาดุกลำพันวัยอ่อน มีปริมาณเอ็นไซม์ alkaline phosphatase ค่อนข้างมาก และมีมากตลอดจนสิ้นสุดการศึกษา (อายุ 46 วัน) ดังนั้น ตั้งแต่ลูกปลาอายุ 20 วันเป็นต้นไป การให้อาหารปลาที่อุดมด้วยไขมัน น่าจะเป็นผลดีต่อการเจริญเติบโตของลูกปลาดุกลำพัน

Abstract

The histological development of the digestive tract and accessory glands of Nieuhofii's walking catfish, *Clarias nieuhofii* from hatching until 46 dah (day after hatching) was described using light microscopy. The study show the significant correlation of fish age and total length, that is useful for estimating the age of *C. nieuhofii* larvae, and the growth rate rapidly increased at 10 dah onwards. At hatching, the digestive tract of *C. nieuhofii* was composed of a straight tube lining with the simple low columnar epithelium. Undifferentiated liver and pancreas cells were found just after hatching for 36 and 48 hrs, respectively. The opening of mouth and anus occurred at 2 dah, with distinct structure of esophagus, stomach, and intestine. By 3 dah, the buccopharygeal tooth bud was found coinciding with the increasing of mucosal fold of stomach and noticeably obvious between anterior and posterior intestine. At 5 dah, the yolk sac was not morphologically noticeable and yolk completely depleted by dah 7, indicating the end of endogenous feeding, and the onset of critical period that *C. nieuhofii* larvae depended only on exogenous feeding. By 4 dah, the first gastric gland appeared in mucosa of stomach with the neutral mucous along the striated border of epithelium suggesting the activity of digestion occurred at this period. Three types of mucous secreting cells were found in the pharyngeal and esophageal epithelium with remarkably abundance of acid mucous cells. Enzyme histochemical study showed that the activity of alkaline phosphatase was highest at brush border of the esophageal epithelium. At 3 dah, the alkaline phosphatase activity was found along the striated border of the intestinal epithelium indicating the ability of absorption began at this stage, and from 20 dah onwards, the enzyme activity was high through the end of investigation (46 dah).

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ ได้รับการสนับสนุน โดยทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินรายได้ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2552 ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างยิ่ง และขอขอบคุณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ที่สนับสนุนและให้ใช้สถานที่ในการวิจัย และขอขอบคุณ ดร. สุภฎา คีรีรัฐนิคม แผนกวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ ที่อนุเคราะห์ลูกปลาดุกลำพันสำหรับการวิจัยครั้งนี้

รายการภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของปลาดุกลำพันที่เพิ่งฟักออกจากไข่ (0 วัน) 10

ภาพที่ 2 ค่าเฉลี่ยความยาวทั้งสิ้น ของปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 0-46 วัน 12

ภาพที่ 3 ปริมาตรถุงไข่แดงของปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 0-5วัน 13

ภาพที่ 4 พัฒนาการของโครงสร้างภายในปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 6 ชม – 6 วัน 14

ภาพที่ 5 พัฒนาการของเนื้อเยื่อท่อทางเดินอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 6 - 48 ชม 15

ภาพที่ 6 พัฒนาการของเนื้อเยื่อช่องปาก และคอหอยปลาดุกลำพันวัยอ่อน 18

ภาพที่ 7 พัฒนาการของเนื้อเยื่อหลอดอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อน 19

ภาพที่ 8 พัฒนาการของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 5 - 20 วัน 21

ภาพที่ 9 ต่อมแก๊สตริกในกระเพาะอาหารของปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 19 วัน (MT) 21

ภาพที่ 10 เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 22 - 37 วัน 22

ภาพที่ 11 เนื้อเยื่อผนังกระเพาะอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อน (PAS-AB) 23

ภาพที่ 12 พัฒนาการของเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนต้นปลาดุกลำพันอายุ 4 - 40 วัน 25

ภาพที่ 13 ลำไส้เล็กส่วนต้นและตับอ่อนของปลาดุกลำพันอายุ 19 วัน (MT) 26

ภาพที่ 14 ลำไส้เล็กส่วนต้นปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 6 วัน (PAS-AB) 26

ภาพที่ 15 พัฒนาการของเนื้อเยื่อลำไส้ส่วนท้ายปลาดุกลำพันอายุ 4 - 46 วัน 28

ภาพที่ 16 เนื้อเยื่อบุผิวผนังลำไส้ส่วนท้ายปลาดุกลำพันวัยอ่อน (PAS-AB) 29

ภาพที่ 17 เนื้อเยื่อตับปลาดุกลำพันวัยอ่อนแสดงปริมาณไกลโคเจน (BC) 31

ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อตับอ่อนปลาดุกลำพันวัยอ่อน 32

ภาพที่ 19 เนื้อเยื่อผนังท่อทางเดินอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อน แสดงปฏิกิริยาการทำงานของเอ็นไซม์ Alkaline phosphatase 36

ภาพที่ 20 เนื้อเยื่อผนังท่อทางเดินอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อน แสดงปฏิกิริยาการทำงานของเอ็นไซม์ Acid phosphatase 37

รายการตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความยาวทั้งสิ้น (Total length) ของปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 0-46 วัน 11

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยปริมาตรถุงไข่แดงของปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 0-5 วัน 11

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยปริมาณเอ็นไซม์ Alkaline phosphatase และ Acid phosphatase ในทางเดินอาหารส่วนต่างๆของปลาดุกลำพันวัยอ่อนที่อายุ 0-40 วัน 34

ตารางที่ 4 พัฒนาการของอวัยวะในระบบย่อยอาหารของปลาดุกลำพันวัยอ่อน 35

ความหมายอักษรย่อ

AB	=	Acian blue	AInt	=	Anterior intestine
An	=	Anus	B	=	Brain
BC	=	Best's carmine	Bc	=	Buccopharyngeal cavity
BD	=	Bile duct	Ca	=	Cartilage
Cy	=	Cytoplasm	dah	=	Day after hatch
Df	=	Dorsal fanfold	En	=	Enterocyte
Ep	=	Epithelium	Es	=	Esophagus
fd	=	Food debris	ft	=	Fat tissue
Gc	=	Goblet cell	Gg	=	Gastric gland
G	=	Gill arch	GI	=	Gastrointestinal tract
H	=	Head	Hc	=	Hepatocyte
HE	=	Hematoxylin & Eosin	ICM	=	Inner circular muscle layer
IF	=	Intestinal fold	IL	=	Islet of Langahans
Int	=	Intestine	Kd	=	Kidney
L	=	Liver	Lp	=	Lamina propria
LS	=	Longitudinal section	Lu	=	Lumen
Lv	=	Lipid vacuole	M	=	Muscle
Mf	=	Mucosal fold	Mm	=	Muscularis mucosa
Mo	=	Mouth	Mr	=	Mucosal ridge
MT	=	Masson trichrome	Mu	=	Mucous
N	=	Number	OLM	=	Outer circular muscle layer
P	=	Pancreas	PAS	=	Periodic acid Schiff
Pd	=	Pancreatic duct	PInt	=	Posterior intestine
Pt	=	Pharyngeal teeth	R	=	Rectum
rbc	=	Red blood cell	Rg	=	Rugae
Sb	=	Swim bladder	SD	=	Standard deviation
St	=	Stomach	Stb	=	Striated border
Su	=	Submucosa	Tb	=	Taste bud
TL	=	Total length	Tob	=	Tooth bud
Vf	=	Ventral fanfold	Ys	=	Yolk sac

บทที่ 1
บทนำ

ปัจจุบันประเทศไทยได้มีการทดลองเพาะเลี้ยงปลาเศรษฐกิจหลายชนิด ส่วนใหญ่เพื่อเป็นการเพิ่มผลผลิตทางด้านอาหารโปรตีน รวมทั้งเพื่อเลี้ยงเป็นปลาสวยงามส่งขายทั้งในและต่างประเทศ สำหรับปลาดุกลำพัน *Clarias nieuhofii* เป็นปลาน้ำจืดในกลุ่ม Catfish จัดอยู่ในอันดับ (order) Siluriformes วงศ์ Clariidae มีชื่อสามัญหลายชื่อเช่น Slender walking catfish, Nieuhofii's walking catfish และ Air-breathing catfish (Nelson, 1994) ในประเทศไทย มีรายงานพบปลาดุกลำพันที่จังหวัดพัทลุง และอำเภอหลังสวน จังหวัดชุมพร และเคยพบชุกชุมที่พรุต๊ะแดง จังหวัดนราธิวาส (ศราวุธและคณะ 2538) แต่ในปัจจุบันพบน้อยลง (อภิชาติและศิริวรรณ 2551) จึงคาดว่าประชากรปลาดุกลำพันในแหล่งน้ำธรรมชาติมีแนวโน้มลดลงเรื่อยๆ และหากไม่มีระบบการจัดการที่ดี ในอนาคตอาจเป็นปลาหายากและเสี่ยงกับการสูญพันธุ์ สำหรับปลาดุกลำพัน นอกจากจะมีผู้นิยมนำมาเลี้ยงเป็นปลาหายากและปลาสวยงามแล้ว เนื้อปลาดุกลำพันจัดว่ามีรสชาติดี จึงเป็นที่นิยมนำมาทำเป็นอาหารทั้งในครัวเรือนและร้านอาหารทั่วไป แต่ที่ผ่านมายังไม่ได้รับการส่งเสริมอย่างจริงจังให้รู้จักเพาะเลี้ยงกันแพร่หลาย อย่างไรก็ตาม หลายหน่วยงานกำลังอยู่ระหว่างให้ความสนใจและส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพันมากขึ้น เพื่อเป็นทางเลือกใหม่สำหรับแหล่งอาหารโปรตีนของประชากรไทย และในอนาคตอาจสามารถ พัฒนาเป็นปลาเศรษฐกิจส่งขายต่างประเทศ ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพัน ยังอยู่ในขั้นเริ่มต้น การผสมพันธุ์และเพาะฟักลูกปลาดุกลำพันยังอยู่ในขั้นการศึกษาทดลอง เป็นที่ทราบกันดีว่า การอนุบาลปลาวัยอ่อนเป็นขั้นตอนที่เกษตรกรและนักวิชาการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำให้ความสำคัญเป็นอันดับต้นๆ เนื่องจากเป็นขั้นตอนสำคัญต่ออัตราการรอดของลูกปลา อันเป็นปัจจัยต่อการเพิ่มผลผลิต และความเสี่ยงในหลายด้าน อัตราการรอดของลูกปลามีความผันแปร อาจสืบเนื่องมาจากหลายสาเหตุ และหลายกระบวนการ การจัดการด้านอาหารปลาให้สอดคล้องกับการเจริญของปลาวัยอ่อนเป็นสาเหตุที่สำคัญประการหนึ่ง นอกจากจะสามารถลดอัตราการตายของลูกปลาแล้ว ยังมีผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและคุณภาพเนื้อปลาด้วย (Bogut *et al*., 2002; Has-Schon *et al*., 2004)

โดยทั่วไป ลูกปลามีความต้องการสารอาหารเพื่อการเจริญเติบโตในวัยอ่อนแตกต่างจากปลาวัยรุ่นและปลาเต็มวัย ลูกปลาอายุน้อยมักเป็นพวกกินเนื้อ เช่น zooplankton และเมื่อลูกปลาอายุมากขึ้น มีพฤติกรรมการกินได้ทั้งพืชและสัตว์ จนเมื่อเป็นตัวเต็มวัยอาจกลับเป็นปลากินพืช (Liao *et al*., 1979; Ferraris *et al*., 1986) พฤติกรรมการกินพืชหรือสัตว์ หรือทั้งพืชและสัตว์สอดคล้องอย่างยิ่งกับพัฒนาการของโครงสร้างและการทำงานของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร (Savasquet *et al*.,

1995; Gisbert *et al*., 2005; Terasa, 2005) และเนื่องจากปลาแต่ละชนิดมีพัฒนาการส่วนต่างๆของท่อทางเดินอาหาร เช่น ช่องปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้ แตกต่างกัน (Kangsen *et al*., 2005) ดังนั้นการวางแผนจัดหาสารอาหารให้เหมาะสมกับความต้องการของปลาวัยอ่อน จึงมีความสำคัญ เนื่องจากลูกปลาวัยอ่อนจะได้รับสารอาหารที่นำไปใช้ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด อันนำไปสู่อัตราการรอดที่สูงขึ้น (Sarasquete *et al*., 1993; Kozaric *et al*., 2008) การเพาะฟักปลาดุกลำพันยังขาดข้อมูลดังกล่าวนี้ และยังไม่มีรายงานการทำงานของระบบย่อยอาหารในปลาดุกลำพันวัยอ่อน ดังนั้นการศึกษาการเติบโตและการทำงานของท่อทางเดินอาหารในลูกปลาดุกลำพันเพื่อทราบระยะเวลาและประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ดูดซึมสารอาหาร จึงมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการอนุบาลลูกปลา

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาพัฒนาการของเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหารส่วนต่างๆ ตั้งแต่ผนังช่องปาก หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้ ตับ และ ตับอ่อน ที่เจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงตามอายุของปลาดุกลำพัน ตั้งแต่ฟักออกเป็นตัวอายุ 0 วัน จนอายุประมาณ 45 วัน ด้วยวิธี Histological analysis เพื่อวิเคราะห์โครงสร้างและการทำงานของเซลล์เยื่อบุผนังทางเดินอาหารรวมทั้งอวัยวะที่สร้างน้ำย่อยเช่นตับ และตับอ่อนในช่วงอายุต่างๆ นอกจากนี้ ได้ใช้วิธี Histochemical analysis และการย้อมสีพิเศษ (special stain) เพื่อศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวกับการย่อยหรือดูดซึมสารอาหารที่สำคัญบางชนิด ทั้งนี้เพื่อสามารถเชื่อมโยงพัฒนาการของท่อทางเดินอาหารในแต่ละอายุของลูกปลา กับช่วงเวลาการทำงานของเซลล์ในระบบย่อยอาหารที่เริ่มแสดงบทบาทเกี่ยวกับการดูดซึมสารอาหาร ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้นอกจากมีวัตถุประสงค์เพื่อทราบถึงพัฒนาการและการทำงานของเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหารในปลาวัยอ่อนแล้ว ยังสามารถเป็นข้อมูลช่วยในการวางแผนจัดการอาหารให้เหมาะสมสอดคล้องกับการเจริญของท่อทางเดินอาหาร และจะเป็นประโยชน์ต่อการกำหนดสูตรอาหารที่เหมาะสม เพื่อประโยชน์สูงสุดต่อประสิทธิภาพการอนุบาลและเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพันต่อไป

บทที่ 2
วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมตัวอย่างลูกปลาดุกลำพัน

เตรียมพ่อแม่พันธุ์ปลาดุกลำพัน *Clarias nieuhofii* ในบ่อเลี้ยง ที่บ่อเพาะฟักของแผนกวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง แยกเลี้ยงแม่ปลาที่พร้อมวางไข่ ทำการรีดไข่ผสมกับน้ำเชื้อจากพ่อพันธุ์ปลาดุกลำพัน นำไข่ที่ผสมแล้ว (fertilized egg) มาเพาะเลี้ยง และเก็บตัวอย่างลูกปลาดุกลำพันในช่วงอายุต่างๆ ดังนี้

อายุปลา (วัน)	ความถี่ในการเก็บ	จำนวน (ตัว/ครั้ง)
1-5	เก็บทุกวัน	18
6-11	เก็บทุก 2 วัน	18
12-20	เก็บทุก 4 วัน	18
21-46	เก็บทุก 5 วัน	18

นำตัวอย่างลูกปลาตามจำนวนในแต่ละกลุ่ม วัดขนาดความยาวปลาทุกครั้ง หลังจากนั้นสลบปลาด้วยความเย็นจัด และแช่ตัวอย่างปลาในน้ำยารักษาสภาพเนื้อเยื่อ (fixative) 3 ชนิดๆละ 6 ตัวเพื่อการศึกษาวิเคราะห์เนื้อเยื่อต่อไป

น้ำยารักษาสภาพเนื้อเยื่อทั้ง 3 ชนิด ได้แก่

Bouin's fluid สำหรับย้อม Haematoxylin and Eosin (HE), Masson trichrome stain (MT) และ ศึกษา Mucopolysacchride

Absolute ethanol สำหรับศึกษาปริมาณไกลโคเจน (glycogen) ในตับ

Absolute acetone สำหรับศึกษาเอ็นไซม์กลุ่ม phosphatase

2. ศึกษาความสัมพันธ์ของอายุปลาและขนาดปลา

วัดขนาดความยาวลำตัว (Total length) ของลูกปลาทุกกลุ่ม ด้วยเวอร์เนีย หาค่าเฉลี่ยความยาวลำตัว และทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างความยาวลำตัวกับอายุปลา ทดลอบความเชื่อมั่นทางสถิติด้วยการวิเคราะห์ความทดถอยทางเส้นตรง (linear regression) ด้วยโปรแกรม SPSS และทดสอบความแตกต่างของแต่ละกลุ่มช่วงอายุแบบ T-test ที่ความเชื่อมั่น 95%

3. ศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหาร

นำตัวอย่างลูกปลาดุกลำพันจากแต่ละกลุ่ม มาแช่ทั้งตัวใน Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อดังกล่าวผ่านกระบวนการตามวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา (Histological technique) เพื่อทำ paraffin section และย้อมสีเนื้อเยื่อ ตามขั้นตอนดังนี้

1) Dehydration โดยการนำชิ้นเนื้อเยื่อแช่ใน 95% แอลกอฮอล์ 2 ครั้งๆละ 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปแช่ใน Absolute alcohol เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และแช่ด้วย Absolute alcohol อีกครั้ง (ทิ้งไว้ค้างคืน)
2) Clearing โดยนำชิ้นเนื้อเยื่อจากข้อ 1 แช่ใน Xylene เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง
3) Infiltration นำเนื้อเยื่อจากข้อ 2 แช่ใน Xylene : Melten wax (1:1) เป็นเวลา 30 นาที ตามด้วย Wax_1 (1 ชม) และ Wax_2 (1 ชม) ตามลำดับ จากนั้น Embed ใน Wax_3
4) Sectioning ด้วย microtome ที่ความหนา 6-8 μm

วิธีการย้อมสี Haematoxylin and Eosin (H&E)

1) นำ sections ลงใน Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที โดยจุ่มขึ้นลง
2) ล้าง Xylene ออกใน Absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
3) นำสไลด์ไปยัง 95% Ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
4) ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลอยู่ตลอดเวลาประมาณ 5 นาที
5) ย้อมนิวเคลียสด้วย Harris's Hematoxylin เป็นเวลา 6 นาที
6) Differentiate ใน 1% acid alcohol 5 วินาทีโดยจุ่มขึ้นลง
7) ล้างน้ำประปา 2 นาที
8) ปรับด้วยด่าง saturated lithium carbonate ประมาณ 30 วินาที
9) ล้างน้ำกลั่น 1-2 นาที
10) ย้อมไซโตพลาสซึมด้วย Eosin 30 วินาที-1 นาที
11) ปรับสี Eosin ด้วย 95%alcohol 2 ครั้งๆละ 5-10 จุ่ม
12) Dehydrate ใน absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
13) Clear ด้วย Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
14) Mount ด้วย Permount

วิธีการย้อมสี Masson Trichrome Stain

1) นำ sections ลงใน Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที โดยจุ่มขึ้นลง
2) ล้าง Xylene ออกใน Absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
3) นำสไลด์ไปยัง 95% Ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
4) ล้างน้ำกลั่น 1-2 นาที
5) ย้อมนิวเคลียสด้วย Weigert's iron hematoxylin 10 นาที
6) ล้างน้ำกลั่น 1-2 นาที
7) ย้อมสี Beibrich scarlet-acid fushin 15 นาที
8) ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลอยู่ตลอดเวลาประมาณ 5 นาที
9) ล้างน้ำกลั่น 1-2 นาที
10) Mordant ใน Phosphomolybdic acid-phosphotungstic acid เป็นเวลา 10-15 นาที
11) ย้อมสี Aniline blue 5 -10 นาที
12) ล้างน้ำกลั่น 1-2 นาที
13) Differentiate ใน 1% Acetic water เป็นเวลา 3-5 นาที
14) Dehydrate ใน absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
15) Clear ด้วย Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
16) Mount ด้วย Permount

ตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลและถ่ายภาพ

4. การศึกษาทางฮีสโตเคมี

สำหรับการศึกษาสารประกอบพวกสารเมือก ไกลโคเจนและเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นในเนื้อเยื่อทางเดินอาหาร ตามพัฒนาการเจริญของลูกปลาในปลาวัยต่างๆกัน โดยใช้เทคนิควิธีทางฮีสโตเคมี ประกอบด้วยวิธีการต่างๆ ดังนี้

4.1 การศึกษาปริมาณไกลโคเจน

นำตัวอย่างลูกปลาดุกลำพันจากแต่ละกลุ่ม มาแช่ทั้งตัวใน Absolute alcohol เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อดังกล่าวผ่านกระบวนการตามวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อทำ paraffin section และย้อมสีเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาปริมาณของสารไกลโคเจนด้วย **วิธี Best's Carmine Stain** ตามขั้นตอนดังนี้

1) นำ sections ลงใน Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที โดยจุ่มขึ้นลง
2) ล้าง Xylene ออกใน Absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที

3) นำสไลด์ไปยัง 95% Ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
4) ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลอยู่ตลอดเวลาประมาณ 5 นาที
5) ย้อมนิวเคลียสด้วย Harris's Hematoxylin เป็นเวลา 6 นาที
6) Differentiate ใน 1% acid alcohol 5 วินาทีโดยจุ่มขึ้นลง
7) ล้างน้ำประปา 2 นาที
8) ปรับด้วยด่าง saturated lithium carbonate ประมาณ 30 วินาที
9) ล้างน้ำกลั่น 1-2 นาที
10) ย้อมด้วยสี Carmine เป็นเวลา 20-30 นาที
11) ปรับสี ด้วย differentiating solution ประมาณ 1-2 วินาที
12) ล้างใน 80 % alcohol ประมาณ 1-2 วินาที
13) Dehydrate ใน absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
14) Clear ด้วย Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
15) Mount ด้วย Permount

ตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลและถ่ายภาพ

4.2 การศึกษาปริมาณสารเมือก (Mucosubstance)

นำตัวอย่างลูกปลาดุกลำพันจากแต่ละกลุ่ม มาแช่ทั้งตัวใน Bouin's fluid เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อดังกล่าวผ่านกระบวนการตามวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อทำ paraffin section และย้อมสีเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาสารเมือกที่เป็นเป็นกลางและกรดในเยื่อบุทางเดินอาหารลูกปลา ตามขั้นตอนดังนี้

2.1 ศึกษาการทำงานของสารเมือกที่เป็นกลาง (Neutral mucosubstance) ด้วยวิธี **PAS reaction** ตามขั้นตอนดังนี้

1) นำ sections ลงใน Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที โดยจุ่มขึ้นลง
2) ล้าง Xylene ออกใน Absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
3) นำสไลด์ไปยัง 95% Ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
4) ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 นาที
5) ลงใน 1% Periodic acid เป็นเวลา 5-8 นาที
6) ล้างด้วยน้ำประปา 3 นาที
7) ล้างด้วยน้ำกลั่น 1 นาที
8) นำ sections ลงแช่ใน Schiff's reagent 15 นาที

9) ล้างด้วยน้ำประปา 10 นาที

10) ย้อมสีนิวเคลียสด้วย haematoxylin 10 นาที

11) ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที

12) นำ sections ลงใน 1% acid alcohol 1-2 วินาที

13) ล้างด้วยน้ำประปา 5 นาที

14) Dehydrate ใน absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที

15) Clear ด้วย Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที

15) Mount ด้วย Permount

ตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลและถ่ายภาพ

2.2 ศึกษาสารเมือกกรด (Acid mucosubstance) ด้วย วิธี **The Alcian Blue Method for Acid Mucopolysaccharides** ตามขั้นตอนดังนี้

1) นำ sections ลงใน Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที โดยจุ่มขึ้นลง

2) ล้าง Xylene ออกใน Absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที

3) นำสไลด์ไปยัง 95% Ethyl alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที

4) ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลอยู่ตลอดเวลาประมาณ 5 นาที

5) ย้อมนิวเคลียสด้วย Harris's Hematoxylin เป็นเวลา 6 นาที

6) Differentiate ใน 1% acid alcohol 5 วินาทีโดยจุ่มขึ้นลง

7) ล้างน้ำประปา 2 นาที

8) ปรับด้วยด่าง saturated lithium carbonate ประมาณ 30 วินาที

9) ล้างน้ำกลั่น 1-2 นาที

10) ย้อมด้วยสี Alcian blue เป็นเวลา 5-10 นาที

11) ล้างในน้ำกลั่นประมาณ 1-2 นาที

12) Dehydrate ใน absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที

13) Clear ด้วย Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที

14) Mount ด้วย Permount

ตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลและถ่ายภาพ

4.3 การศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์

นำตัวอย่างลูกปลาดุกลำพันจากแต่ละกลุ่ม มาแช่ทั้งตัวใน Absolute acetone เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำชิ้นเนื้อดังกล่าวผ่านกระบวนการตามวิธีทางเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อทำ paraffin section

และย้อมสีเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาปริมาณของเอ็นไซม์ Alkaline phosphatase และ Acid phosphatase ในเยื่อบุทางเดินอาหารลูกปลา ตามขั้นตอนดังนี้

4.3.1 การทำงานของ Alkaline phosphatase : วิธี The calcium cobalt method for Alkaline phosphatase

1) นำ sections ลงใน light petroleum 2 ครั้งๆละ 2 นาที โดยจุ่มขึ้นลง
2) ล้าง light petroleum ออกใน Absolute acetone 2 ครั้งๆละ 2 นาที
3) นำสไลด์แช่ในสารละลาย Incubating medium ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37°C

สูตร Incubating medium:

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

4) ล้างด้วยน้ำประปาที่ไหลอยู่ตลอดเวลาประมาณ 5 นาที
5) แช่ sections ลงใน 2% cobalt nitrate หรือ acetate, 3-5 นาที
6) ล้างน้ำกลั่น 1-2 นาที
7) แช่ sections ลงในสารละลายเจือจางของ yellow ammonium sulphide 1-2 นาที
8) ล้างในน้ำกลั่นประมาณ 1-2 นาที
9) ย้อมด้วยสี eosin เป็นเวลา 5 นาที
10) Dehydrate ใน absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
11) Clear ด้วย Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
12) Mount ด้วย Permount

ตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลและถ่ายภาพ

4.3.2 การทำงานของเอ็นไซม์ Acid phosphatase : วิธี The lead nitrate method for Acid phosphatase

1) นำ sections ลงใน light petroleum 2 ครั้งๆละ 2 นาที โดยจุ่มขึ้นลง
2) ล้าง light petroleum ออกใน Absolute acetone 2 ครั้งๆละ 2 นาที
3) นำสไลด์แช่ในสารละลาย Incubating medium ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37°C

สูตร Incubating medium:

0.01 M-Sodium ß-glycerophosphate in 0.05 M-acetate buffer (pH 5.0), containing 0.004 M-lead nitrate.

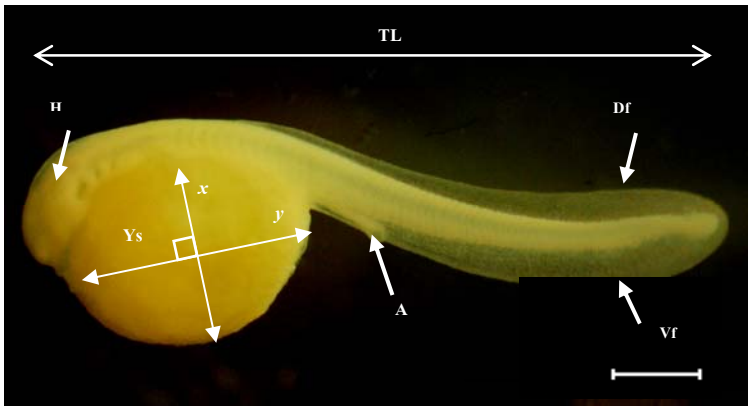
4) ล้างน้ำกลั่น 1-2 นาที
5) แช่ sections ลงใน สารละลายเจือจาง yellow ammonium sulphide 1-2 นาที
6) ล้างในน้ำกลั่นประมาณ 1-2 นาที
7) ย้อมด้วยสี eosin เป็นเวลา 5 นาที
8) Dehydrate ใน absolute alcohol 2 ครั้งๆละ 2 นาที
9) Clear ด้วย Xylene 2 ครั้งๆละ 2 นาที
10) Mount ด้วย Permount

ตรวจสอบเนื้อเยื่อที่ย้อมสีแล้วด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกผลและถ่ายภาพ

บทที่ 3
ผลการวิจัย

1. ศึกษาความสัมพันธ์ของอายุปลาและขนาดปลา

ศึกษาการเจริญเติบโตของปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 0-46 วัน โดยวัดความยาวทั้งสิ้น (Total length,TL) ตั้งแต่ปลายปากถึงปลายหาง และปริมาตรของถุงไข่แดง (yolk sac) (ภาพที่ 1) ในลูกปลาแต่ละกลุ่มอายุ พบว่าปลาดุกลำพันแรกเกิด (0 วัน) มีค่าความยาวทั้งสิ้น (Total length) เฉลี่ย 4.27 ± 0.46 มม. และลูกปลามีความยาวเพิ่มขึ้นในทุกๆครั้งที่ทำการเก็บตัวอย่าง และมีความยาวเฉลี่ยมากที่สุดในปลาวัยอ่อนอายุ 46 วัน คือ 37.14 ± 2.44 มม. (ตารางที่ 1) สำหรับลักษณะของถุงไข่แดง พบว่าในลูกปลาแรกเกิดมีถุงไข่แดงขนาดกลมใหญ่ติดอยู่ด้านล่าง ค่อนไปทางข้างหน้าของลำตัว ซึ่งมีปริมาตรเฉลี่ย 1.735 ±0.691 ลบ.มม. (x = 1.403 มม., y = 1.578 มม.) หลังจากนั้นจะมีขนาดเล็กลงเรื่อยๆตามอายุที่เพิ่มขึ้น และจุดสีน้ำตาลดำที่ค่อยๆเจริญลงมาคลุมผิวหนังบริเวณท้อง มีปริมาณเพิ่มขึ้น จากการศึกษา พบว่าเมื่อลูกปลาดุกลำพันอายุประมาณ 5 วัน ถุงไข่แดงจะยุบตัวจนหมด ไม่สามารถคำนวณขนาดเป็นปริมาตรจากภายนอกได้ (ตารางที่ 2)



ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของปลาดุกลำพันที่เพิ่งฟักออกจากไข่ (0 วัน)
x = เส้นผ่านศูนย์กลางวงรีด้านสั้น และ y = เส้นผ่านศูนย์กลางวงรีด้านยาว,
Scale bar= 400 µm

ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยความยาวทั้งสิ้น (Total length) ของปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 0-46 วัน

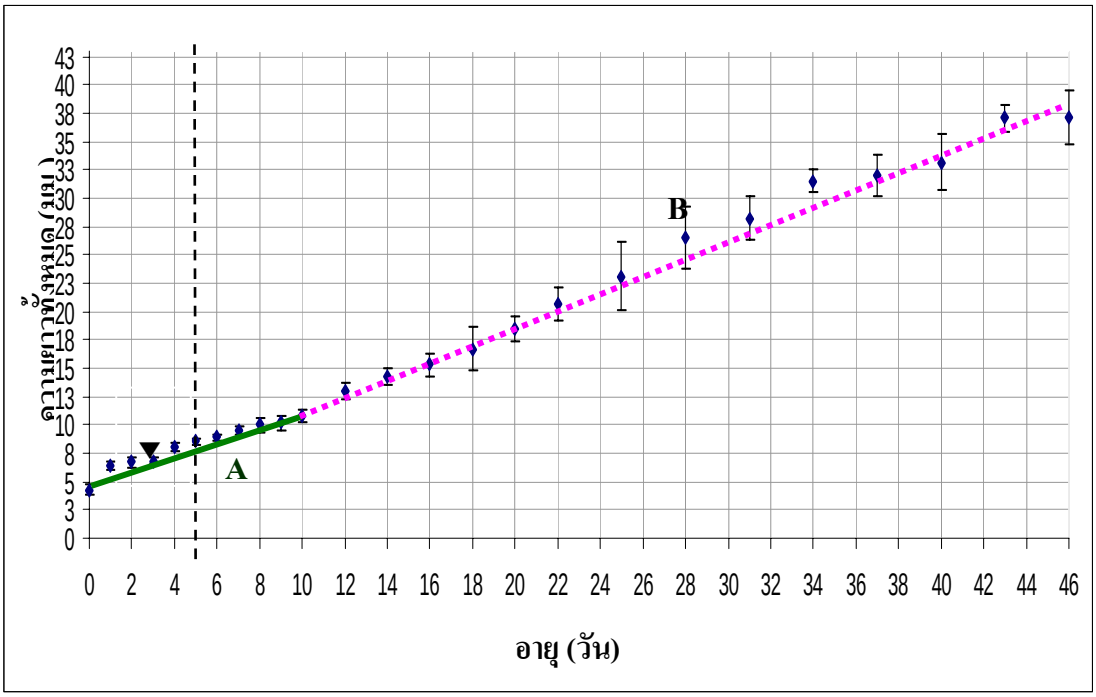
อายุ (วัน)	N	ค่าเฉลี่ย (มม.) ± SD	อายุ (วัน)	N	ค่าเฉลี่ย (มม.) ± SD
0	9	4.27± 0.46	16	10	15.29±0.98
1	9	6.44± 0.32	18	10	16.72±1.85
2	10	6.70±0.40	20	10	18.49±1.16
3	9	6.81±0.31	22	10	20.64±1.45
4	10	8.01±0.33	25	10	23.13±3.00
5	10	8.53±0.25	28	9	26.47±2.72
6	10	8.94±0.29	31	10	28.22±1.88
7	10	9.50±0.34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

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยปริมาตรถุงไข่แดงของปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 0-5 วัน

อายุ (วัน)	ค่าเฉลี่ย ($มม^3$) ± SD	อายุ (วัน)	ค่าเฉลี่ย ($มม^3$) ± SD
0	1.735 ±0.691	2.5	1.061 ±0.205
0.5	1.786 ±0.234	3	1.059 ±0.251
1	1.628 ±0.180	3.5	0.903±0.159
1.5	1.475 ±0.251	4	0.787±0.173
2	1.186 ±0.302	5	-

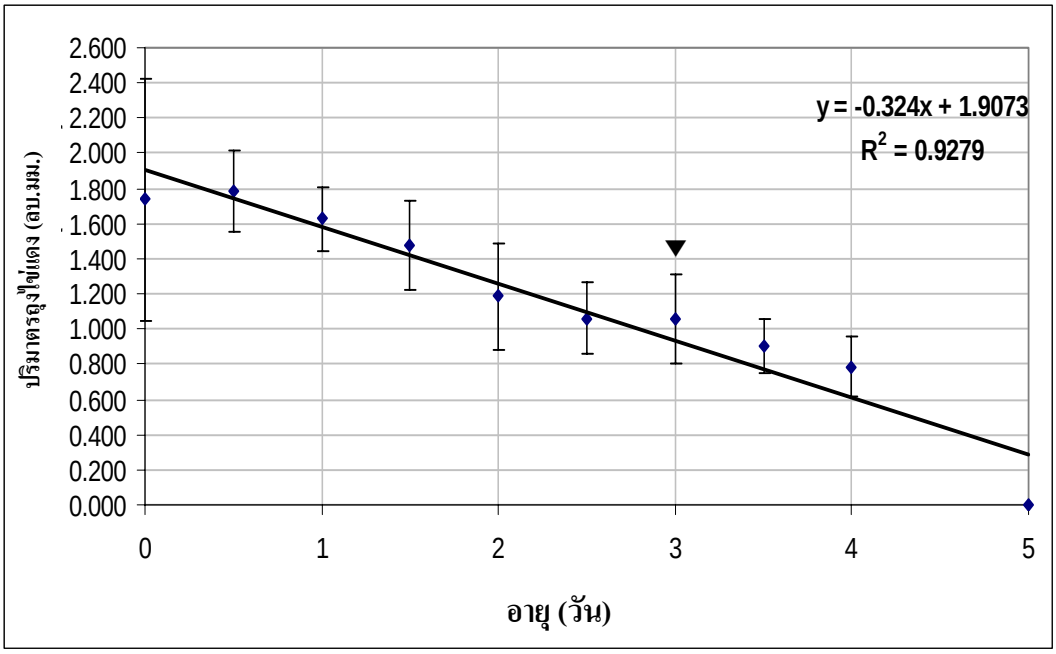
เมื่อศึกษาการกระจายตัวของค่าความยาวทั้งหมดพบว่ามีการกระจายตัวของข้อมูลเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงที่ 1 ลูกปลาอายุ 0-10 วัน และช่วงที่ 2 ลูกปลาอายุ 10-46 วัน โดยช่วงที่ 1 ค่าความยาว

ทั้งสิ้นของลูกปลาอายุ 0-10 วัน สามารถทดสอบด้วยวิธีทางสถิติ linear regression พบว่าอายุกับความยาวทั้งหมดมีความสัมพันธ์เชิงเส้น (R^2=0.9498) โดยค่าทั้งสองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความสัมพันธ์ของสมการ y = 0.583x + 4.7064 (เส้นตรง A ภาพที่ 2) ส่วนช่วงที่ 2 ค่าความยาวทั้งหมดตั้งแต่ลูกปลาอายุ 10-46 วัน เมื่อทดสอบทางสถิติแล้ว พบว่าอายุกับความยาวทั้งหมดมีความสัมพันธ์เชิงเส้น (R^2=0.9876) โดยค่าทั้งสองมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความสัมพันธ์ของสมการ y = 0.7608x + 12.18 (เส้นตรง B ภาพที่ 2) และเมื่อพิจารณาค่าความชันของเส้นตรงทั้ง 2 ช่วง พบว่าเส้นตรงช่วงที่ 1 มีค่าความชันเป็น 0.583 ซึ่งมีแนวโน้มน้อยกว่าเส้นตรงช่วงที่ 2 ที่มีความชัน 0.7608 แสดงว่า ช่วงแรกที่ลูกปลามีอายุ 0-10 วัน เป็นช่วงที่ลูกปลามีความยาวทั้งหมดมีแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงน้อยกว่าช่วงที่ 2 ที่ลูกปลาอายุ 10-46 วัน



ภาพที่ 2 ค่าเฉลี่ยความยาวทั้งสิ้น ของปลาดุกลำพันวัยอ่อนตั้งแต่อายุ 0-46 วัน
(▼) = เวลาเริ่มต้นให้อาหาร, เส้นตรง A = อายุ 0-10 วัน เส้นตรง B = อายุ 10-46 วัน

ส่วนการทดสอบทางสถิติในอายุกับปริมาตรถุงไข่แดง พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้น (R^2=0.9279) ในทิศทางเดียวกัน แต่ค่าปริมาตรถุงไข่แดงมีแนวโน้มลดลงเมื่ออายุของลูกปลาเพิ่มมากขึ้นตามความสัมพันธ์ของสมการ y = -0.324x + 1.9073 (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ปริมาตรถุงไข่แดงของปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 0-5วัน (▼) = เวลาเริ่มต้นให้อาหาร

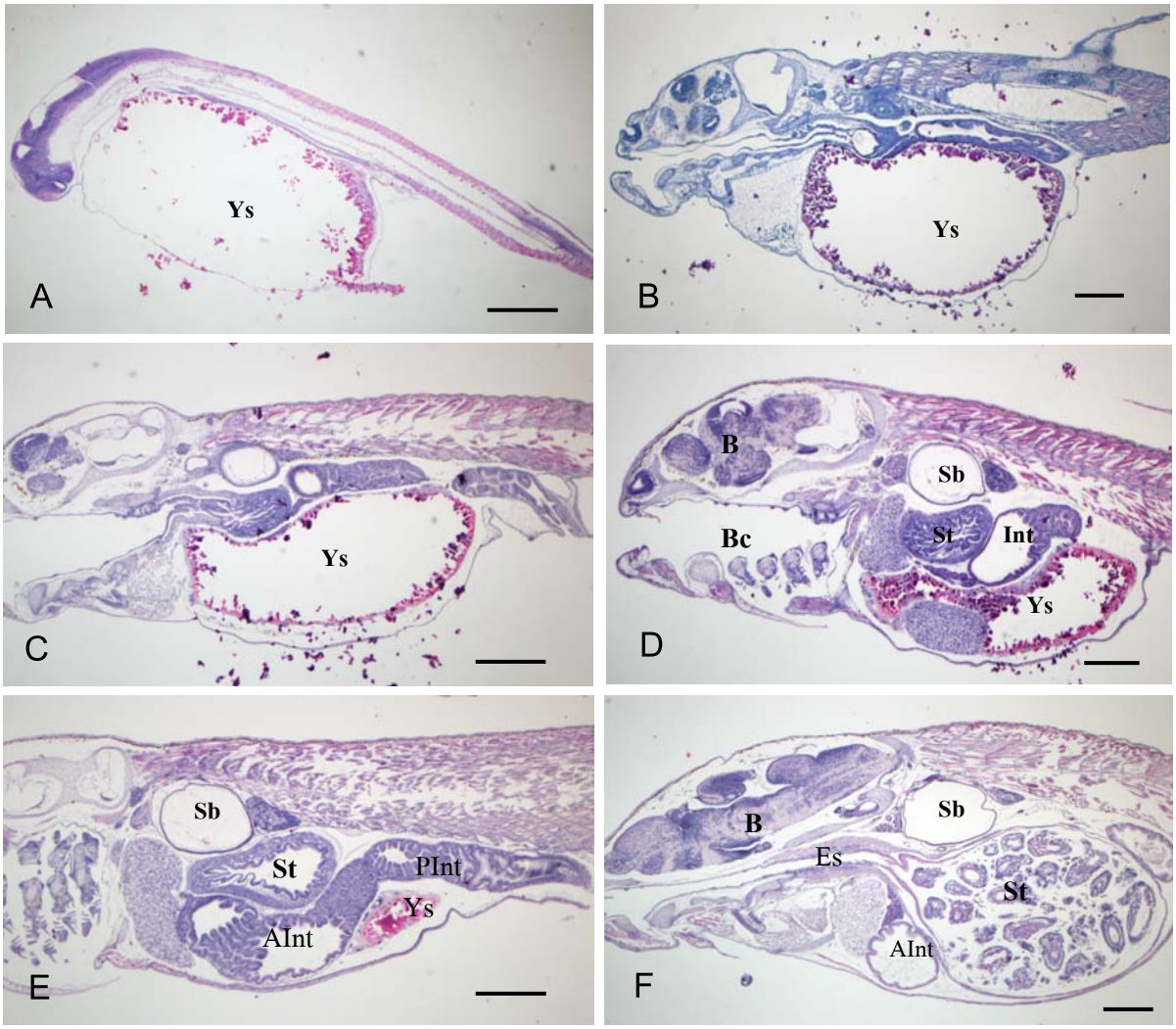
2. ศึกษาโครงสร้างเนื้อเยื่อระบบย่อยอาหาร

ระบบย่อยอาหารของปลาประกอบด้วยโครงสร้างหลักคือท่อทางเดินอาหารและต่อมที่เกี่ยวกับการย่อยอาหาร เช่น ต่อมเมือก (Mucous gland) และต่อมแก๊สตริก (Gastric gland) ในกระเพาะอาหาร รวมทั้งอวัยวะสร้างน้ำย่อยอาหาร เช่น ตับและตับอ่อน ซึ่งโครงสร้างเหล่านี้ มีพัฒนาการตามการเจริญเติบโตของลูกปลา ดังนี้

2.1 การยุบตัวของถุงไข่แดง (Yolk sac)

พื้นที่ส่วนใหญ่ภายในช่องท้องของปลาดุกลำพันแรกเกิดเป็นโยลค์ (Yolk) ที่ถูกหุ้มด้วยถุงไข่แดง (Yolk sac) ที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆติดสีม่วง และส่วนที่เป็นโยลค์ ที่ย้อมติดสี Eosin โดยมีท่อทางเดินอาหารขนาดเล็กแนบอยู่ด้านบน (ภาพที่ 4A) เมื่อลูกปลามีพัฒนาการตามอายุที่เพิ่มขึ้น ถุงไข่แดงจะยุบตัวลงตามปริมาณโยลค์ ที่ลดลงตลอดการเจริญเติบโตของลูกปลา ในขณะเดียวกัน มีการเจริญของท่อทางเดินอาหาร และอวัยวะต่างๆภายในช่องท้องเข้ามาแทนที่ (ภาพที่ 4B-D) เมื่อลูกปลาอายุได้ประมาณ 5 วัน จากลักษณะภายนอกพบว่าปริมาณโยลค์ จะหมดลงพร้อมการสลายไปของถุงไข่แดง แต่เมื่อตรวจสอบจากโครงสร้างเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่าถุงไข่แดงของลูกปลาอายุ 6 วัน ยังสลายไม่หมด ถุงไข่แดงมีขนาดเล็กลงมาก (ภาพที่ 4E) และจะสลาย

หมดไปในวันที่ 7 นอกจากนี้พบการเจริญของกระเพาะอาหารอย่างรวดเร็ว และกระเพาะอาหารสามารถขยายใหญ่ตามปริมาณอาหารที่บริโภคเข้าไป (ภาพที่ 4F)

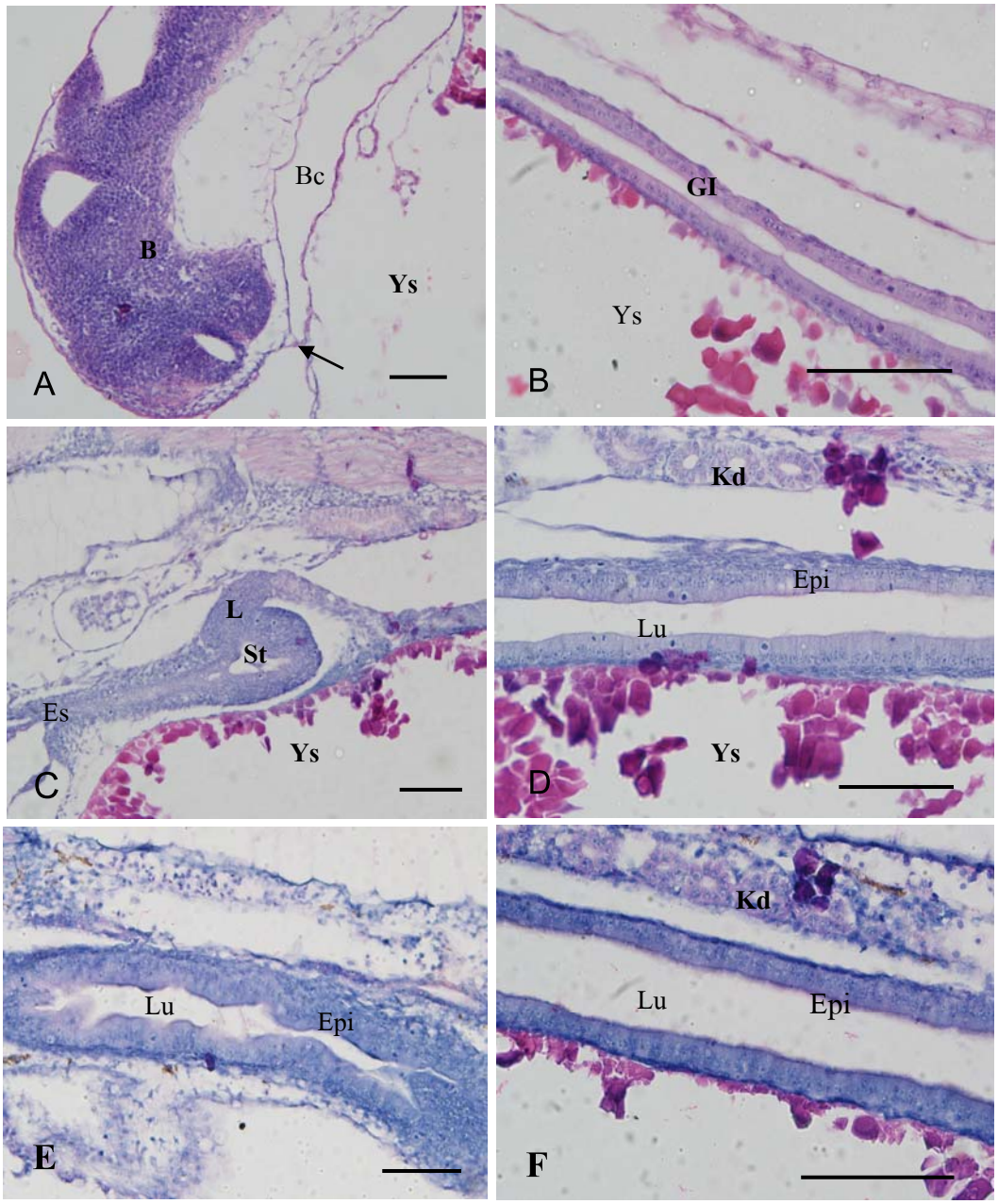


ภาพที่ 4 พัฒนาการของโครงสร้างภายในปลาดุกลำพันวัยอ่อน อายุ 6 ชม – 6 วัน (LS, HE)
A: อายุ 6 ชม B: อายุ 3 วัน ; C: อายุ 4 วัน ; D: อายุ 5วัน ; E: อายุ 6วัน ; F: อายุ 9วัน
Scale bar = 50 µm (ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)

2.2 การพัฒนาของท่อทางเดินอาหาร (Digestive tract)

ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกหลังจากการฟัก ท่อทางเดินอาหารจะเป็นท่อตรงขนาดเล็กวางอยู่ด้านบนถุงไข่แดง (ภาพที่ 4A และ 5A) ในระหว่างอายุ 1-3 วัน ขณะที่ปลาวัยอ่อนยังคงมีถุงไข่แดงอยู่ ส่วนต้นของท่อทางเดินอาหารเป็นช่องแคบๆของปากและคอหอย (Buccopharyngeal cavity) และส่วนท้ายสุดของท่อติดต่อกับช่องทวาร (Anus) ที่ยังไม่เปิด จากการศึกษาพบว่าลูกปลาอายุ 6 ชม ช่อง

ปากยังไม่เปิด และ ผนังท่อทางเดินอาหารส่วนต้น ส่วนกลางและท้ายยังเป็นท่อตรง โดยมีเยื่อบุผิวภายในช่องปากและทางเดินอาหารส่วนต้นเป็นเซลล์แบนชั้นเดียว (Simple squamous epithelium) (ภาพที่ 5A) ส่วนทางเดินอาหารส่วนกลางและท้ายเป็นเซลล์ทรงเตี้ยชั้นเดียว (Simple low columnar epithelium) (ภาพที่ 5B)



ภาพที่ 5 พัฒนาการของเนื้อเยื่อท่อทางเดินอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 6 - 48 ชม (LS, HE)

A: ช่องปากมีเยื่อปิด (ลูกศร) ลูกปลาอายุ 6 ชม B: ท่อทางเดินอาหาร (6 ชม)

C: กระเพาะอาหาร (36 ชม) D: ลำไส้ (36 ชม) E: กระเพาะอาหาร (48 ชม)

F: ลำไส้เล็ก (48 ชม) Scale bar = 50 µm (ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)

เมื่อลูกปลาอายุ 1 วัน ท่อทางเดินอาหารส่วนต้นก็เริ่มโป่งออก เกิดเป็นส่วนแรกเริ่มของกระเพาะอาหารที่มีเซลล์ทรงเตี้ย (Cuboidal cell) ซ้อนอยู่หลายชั้น และที่อายุ 36 ชม พบกลุ่มเซลล์ตับเกิดขึ้นที่ด้านบนของกระเพาะอาหาร (ภาพที่ 5C) รวมทั้งเกิดเนื้อเยื่อไต เห็นเป็นท่อไตทางด้านบนของลำไส้ ในขณะที่ท่อทางเดินอาหารส่วนกลางและท้ายยังเป็นท่อตรง และมีเยื่อบุผิวทางเดินอาหารเป็นเซลล์ทรงสูงชั้นเดียว (Simple columnar epithelium) (ภาพที่ 4 D) เมื่อลูกปลาอายุ 2 วัน ท่อทางเดินอาหารมีจำนวนเซลล์มากขึ้น และผนังลำไส้ยังเป็นท่อตรง (ภาพที่ 4 E-F)

ปลาอายุ 4 วัน ท่อทางเดินอาหารมีการพัฒนาจนสามารถแยกได้ชัดเจนออกเป็น 5 ส่วน ได้แก่ ช่องปากและคอหอย (Buccopharyngeal cavity), หลอดอาหาร (Esophagus), กระเพาะอาหาร (Stomach), ลำไส้เล็กส่วนต้น (Anterior intestine) และลำไส้เล็กส่วนท้าย (Posterior intestine) (ภาพที่ 4 C)

เนื้อเยื่อของท่อทางเดินอาหารส่วนต่างๆ ประกอบด้วยโครงสร้างเนื้อเยื่อ 4 ชั้น ดังนี้

1) ชั้นมิวโคซา (Mucosa) ประกอบด้วยส่วนสำคัญคือ ชั้นของเยื่อบุผิว (Mucosal epithelium) อยู่บนชั้น Basal lamina ซึ่งเป็นชั้นของเส้นใยคอลลาเจน (Collagen fiber) อยู่รวมกันหนาแน่น ถัดลงไปเป็นชั้นของ ลามินาโปรเปรีย (Lamina propia) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบโปร่ง และมีหลอดเลือดแทรก
2) ชั้นซับมิวโคซา (Submucosa) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) บางๆ
3) ชั้นกล้ามเนื้อ (Muscularis) ประกอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบ 2 ชั้น เรียงกันในแนวรอบวง (Circular muscle layer) และเรียงในแนวตามยาว (Longitudinal muscle layer)
4) ชั้นซีโรซา (Serosa) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อบาง หุ้มรอบนอก

จากการศึกษาท่อทางเดินอาหารตั้งแต่ช่องปาก ถึงส่วนปลายของทางเดินอาหาร พบว่าลูกปลาดุกลำพัน มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อ โดยเริ่มจากช่องปากจนสิ้นสุดลำไส้เล็กส่วนท้าย โดยการศึกษาครั้งนี้ ได้จำแนกรายละเอียดของเนื้อเยื่อชั้นต่างๆดังกล่าว แยกเป็นแต่ละส่วน ดังนี้

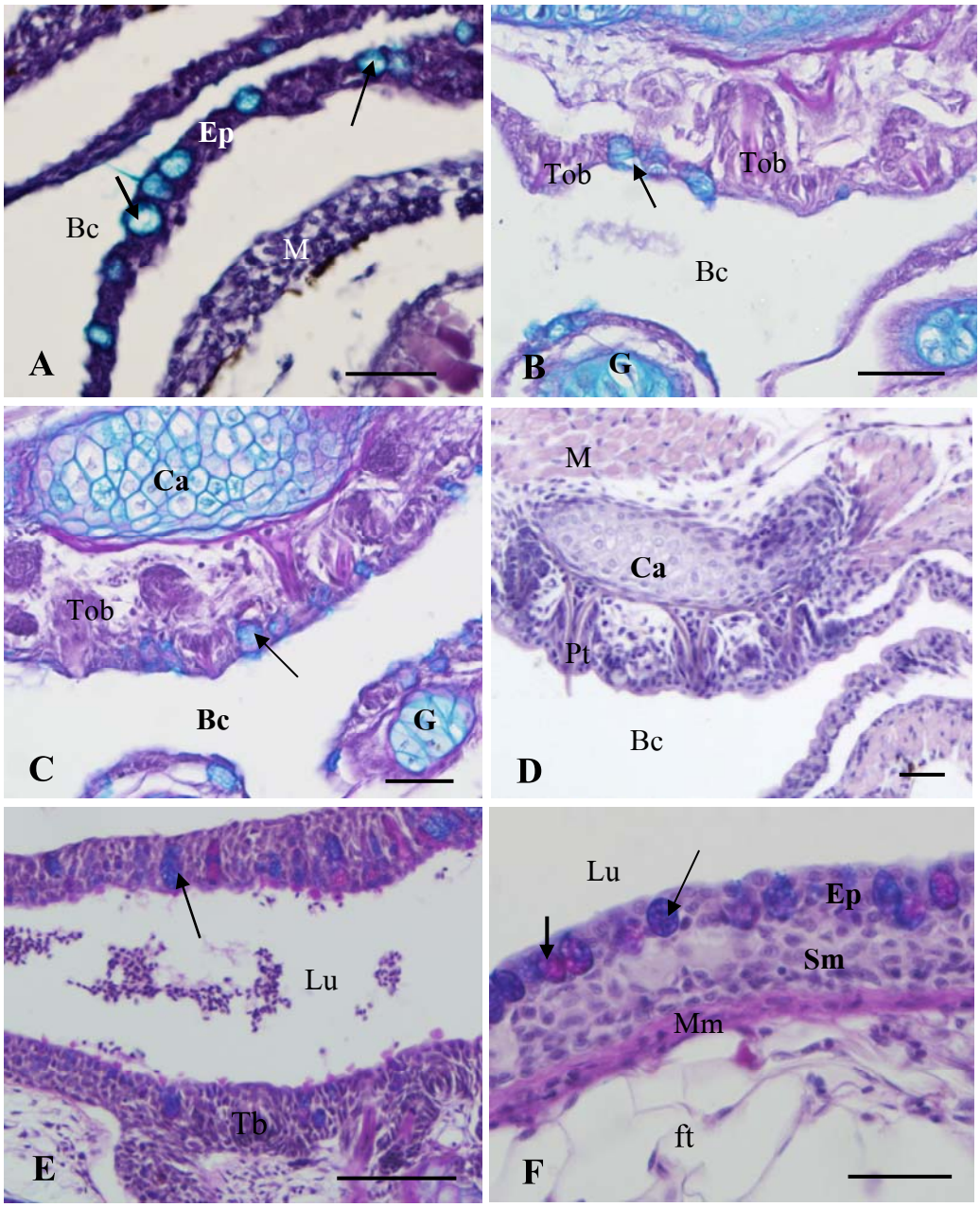
2.2.1 *ช่องปาก และคอหอย (Mouth cavity and Pharynx)*

ปลาดุกลำพันมีช่องปากตั้งแต่แรกเกิดโดยผนังภายในบุด้วย simple squamous epithelium (ภาพที่ 5A) และเริ่มมีการพัฒนาของขากรรไกรบนและล่างเมื่ออายุประมาณ 6 ชั่วโมง หลังฟักออกมา โดยเห็นเป็นเซลล์ติดสีม่วงร่วมกลุ่มกันบริเวณผิวทางด้านหน้าของหัวใกล้กับถุงไข่แดง และเริ่มเปิดปากเมื่ออายุประมาณ 12 ชั่วโมง ปุ่มของฟันขากรรไกรบน และล่าง (Maxillary and Mandible teeth) เริ่มปรากฏบริเวณช่องปาก เมื่อลูกปลาอายุ 3 วัน ในช่วงอายุ 2 วัน ผนังท่อคอหอย

เป็นเซลล์ทรงเตี้ยชั้นเดียว มีเซลล์ต่อมสร้างสารเมือกกรด ซึ่งเป็นสารพวก acid mucopolysaccharide (AB positive) เกิดขึ้น เห็นเป็นสีน้ำเงินในส่วนบนของไซโตพลาสซึม (ภาพที่ 6 A) และที่อายุ 4 วันมีปุ่มของฟันคอหอย (Pharyngeal teeth) ปรากฏอยู่บริเวณคอหอยตำแหน่งเดียวกับช่องเหงือก ซึ่งฟันคอหอยมีลักษณะแบบปลายแหลม (ภาพที่ 6 B) เมื่อลูกปลาอายุ 6 วัน ที่ผนังท่อคอหอยพบปุ่มรับรสเป็นกลุ่มเซลล์ติดสีน้ำเงินเข้ม เซลล์ต่อมระยะนี้ส่วนมากเป็นต่อมสร้างสารเมือกกรด (ภาพที่ 6 C) ฟันคอหอยยื่นบางซี่ออกมาสู่ผิวบนชัดเจนมากขึ้นตามอายุ (ภาพที่ 6 D) และเมื่อลูกปลาอายุมากขึ้นพบเซลล์ต่อมสร้างเมือกชนิดเป็นกลาง ซึ่งเป็นสารพวก neutral mucopolysaccharide (PAS positive) เจริญร่วมแทรกระหว่างเซลล์บุผิว โดยเซลล์ต่อมสร้างเมือกมีลักษณะกลม ส่วนเซลล์ต่อมสร้างเมือกชนิดเป็นกลางเป็นรูปค่อนข้างรี (ภาพที่ 6 E-F)

2.2.2 *หลอดอาหาร (Esophagus)*

สำหรับหลอดอาหาร เริ่มเห็นความเนื้อเยื่อส่วนนี้อย่างชัดเจนเมื่อลูกปลาอายุประมาณ 1.5 วัน (36 ชม) โดยชั้นมิวโคซาทของหลอดอาหารประกอบด้วยเซลล์หลายชั้น (stratified cuboidal cells) ส่วนชั้นซับมิวโคซายังเป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันอยู่กันอย่างหลวมๆและมีชั้นกล้ามเนื้อแทรก เมื่ออายุปลา 3 วัน ที่เยื่อบุผิวหลอดอาหารมีเซลล์สร้างเมือกเกิดขึ้น และเมื่อทดสอบทางฮีสโตเคมี พบว่าเป็นเซลล์ต่อมสร้างสารเมือกกรด (ภาพที่ 7 A) จำนวนเซลล์ต่อมมีหนาแน่นตลอดผนังท่อยาวจนสิ้นสุดบริเวณที่เป็นเยื่อบุผนังของกระเพาะอาหาร โดยเฉพาะบริเวณที่ติดกับกระเพาะอาหาร จะมีต่อมเซลล์สร้างเมือกหนาแน่นมาก (ภาพที่ 7 B) และเป็นสารเมือกชนิดกรดทั้งหมด (ภาพที่ 7 C, E) เมื่อปลาวันอ่อนอายุ 2-3 วัน มีปุ่มฟันเล็กๆและต่อมรับรสเกิดขึ้นที่เยื่อบุผนังหลอดอาหาร (ภาพที่ 7 C-D) นอกจากนี้ พบว่าที่ผนังหลอดอาหารมีเซลล์สร้างเมือก 3 ชนิด คือชนิดที่เซลล์ต่อมสร้างสารเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง เซลล์มีลักษณะยาวรี ไซโตพลาสซึมติดสีชมพูของ PAS ส่วนเซลล์ต่อมอีกชนิดหนึ่งสร้างสารเมือกกรด เซลล์มีลักษณะกลม ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินของ AB และเซลล์ต่อมสร้างเมือกปนทั้งสารกรดและเป็นกลาง ซึ่งเซลล์เหล่านี้จะมีไซโตพลาสซึมติดทั้งสีชมพูและสีน้ำเงินร่วมกัน (ภาพที่ 7 E-F) และจากการศึกษาพบว่าเซลล์ต่อมสร้างเมือกกรดเกิดขึ้นก่อนโดยเริ่มพบที่ปลาอายุ 3 วัน ส่วนเซลล์ต่อมสร้างเมือกชนิดเป็นกลางเกิดขึ้นเมื่ออายุ 7 วัน

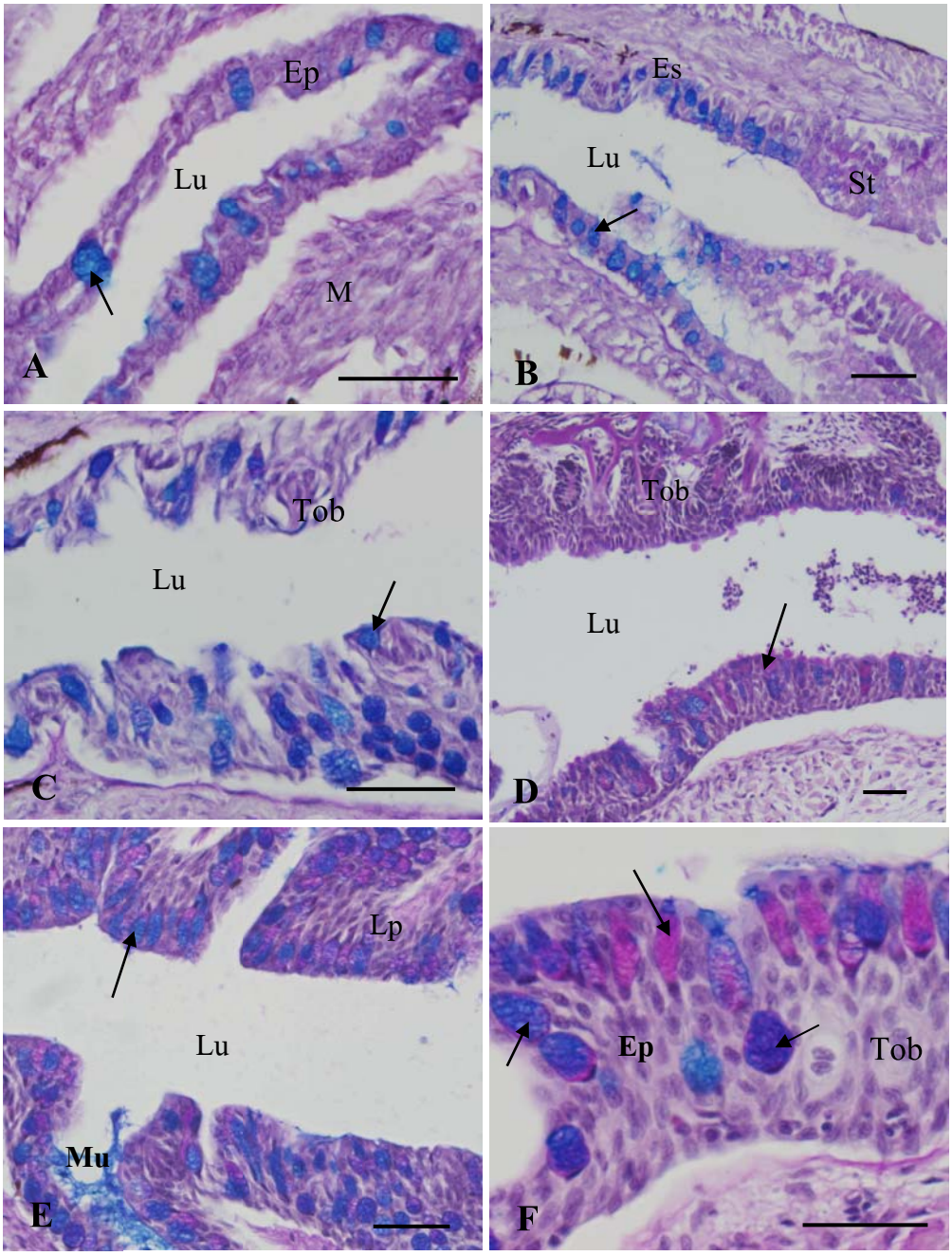


ภาพที่ 6 พัฒนาการของเนื้อเยื่อช่องปาก และคอหอยปลาดุกลำพันวัยอ่อน (LS, AB)

A: อายุ 2 วัน **B:** อายุ 4 วัน **C:** ช่องปาก (อายุ 6 วัน) **D:** คอหอย (อายุ 9 วัน) (HE)

E: บริเวณรอยต่อคอหอยและหลอดอาหาร (อายุ 25 วัน) **F:** อายุ 46 วัน

ลูกศร – เซลล์ต่อมสร้างเมือก Scale bar = 20 µm (ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)



ภาพที่ 7 พัฒนาการของเนื้อเยื่อหลอดอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อน (LS, AB)

A: อายุ 4 วัน **B:** อายุ 8 วัน **C:** อายุ 12 วัน **D:** อายุ 25 วัน **E:** อายุ 46 วัน

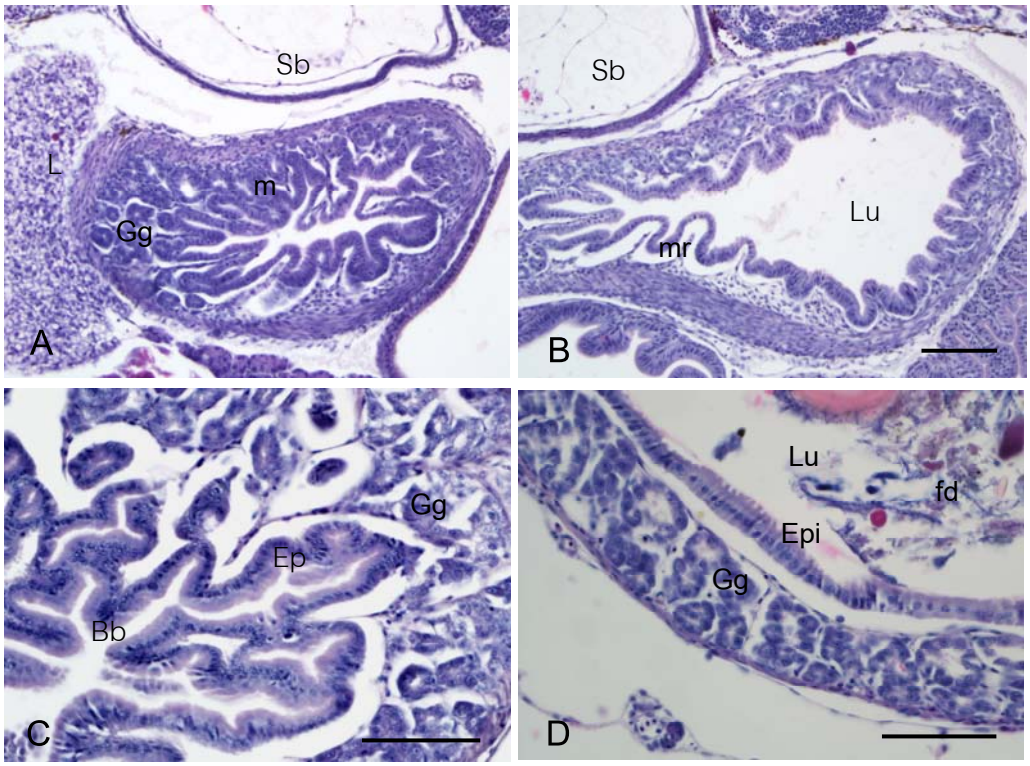
F: อายุ 46 วัน ลูกศร - เซลล์ต่อมสร้างเมือก Scale bar = 20 µm

(ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)

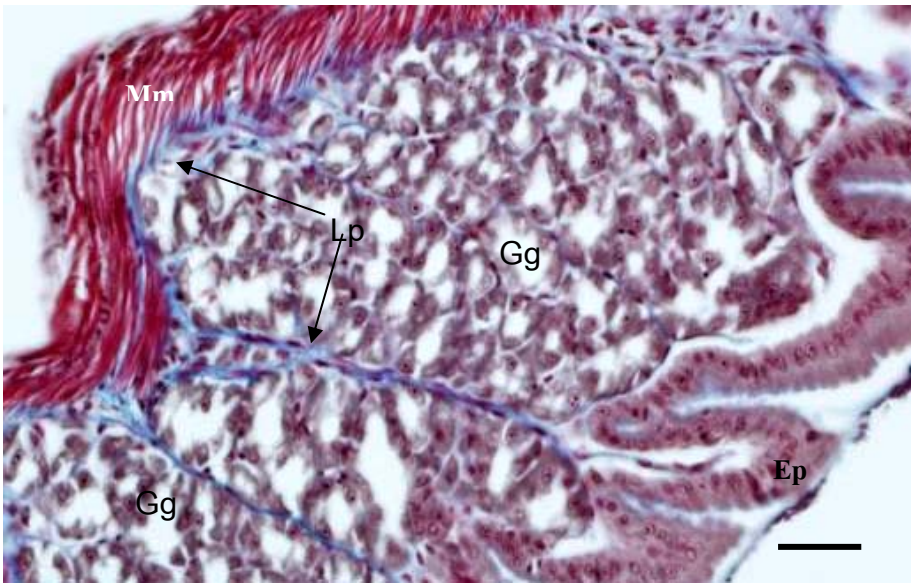
2.2.3 ***กระเพาะอาหาร (Stomach)***

เมื่อลูกปลามีอายุ 2 วัน บริเวณที่เป็นกระเพาะอาหารจะมีการขด และโป่งออก ผนังท่อบุด้วยเซลล์ทรงสูงชั้นเดียว (ภาพที่ 5E) และอายุ 3 วัน เริ่มยกตัวเป็นสัน (mucosal ridges) จากนั้นค่อยๆเพิ่มความสูงมากขึ้นรวมทั้งจำนวนเซลล์บุผิวมีจำนวนมาก และเมื่อลูกปลามีอายุ 3.5 วัน เริ่มพัฒนาต่อมแก๊สตริกในชั้นลามินาโปรเปรียของมิวโคซา (ภาพที่ 8A) และจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามอายุ (ภาพที่ 8B-D) เมื่อปลามีอายุ 5 วัน ชั้นกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารเพิ่มความหนาอย่างรวดเร็ว ผนังกระเพาะอาหารต่อจากนี้ จะมีการ mucosal fold มาก ขึ้น เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของการย่อย (ภาพที่ 8 C) และเมื่ออาหารเข้าสู่กระเพาะอาหารจำนวนมาก พบว่าผนังกระเพาะอาหารของลูกปลาดุกลำพันมีประสิทธิภาพขยายได้มาก โดยพบผนังกระเพาะยืดออกจนไม่มีสันนูน เห็นเซลล์ทรงสูงชั้นเดียวและมีต่อมแก๊สตริกหนาแน่นในชั้นลามินาโปรเปรีย (ภาพที่ 8 D) นอกจากนี้ จากการศึกษาเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ย้อม MT) ในกระเพาะอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุประมาณ 2 วัน พบเป็นเนื้อเยื่อบางๆ ติดสีน้ำเงินของ aniline blue อยู่ในชั้นซับมิวโคซา ซึ่งเนื้อเยื่อเกี่ยวพันส่วนนี้จะมีการพัฒนาจนเห็นชัดเจนมากขึ้นเป็นส่วนใหญ่ของชั้น ลามินาโปรเปรีย และเมื่อชั้นมิวโคซา มีความหนาเพิ่มมากขึ้นตามอายุของลูกปลา เนื้อเยื่อเกี่ยวพันในชั้นลามินาโปรเปรีย เจริญมากขึ้นแทรกระหว่างกลุ่มของต่อมแก๊สตริก (ภาพที่ 9) เมื่อลูกปลามีอายุเพิ่มขึ้น ต่อมแก๊สตริกในชั้นลามินาโปรเปรียเจริญมากขึ้นตามลำดับ (ภาพที่ 10A, C) เช่นเดียวกับชั้นกล้ามเนื้อกระเพาะอาหารเพิ่มความหนามาก และชั้นกล้ามเนื้อจะลดไปมากเมื่อเข้าสู่ลำไส้เล็ก (ภาพที่ 10 B)

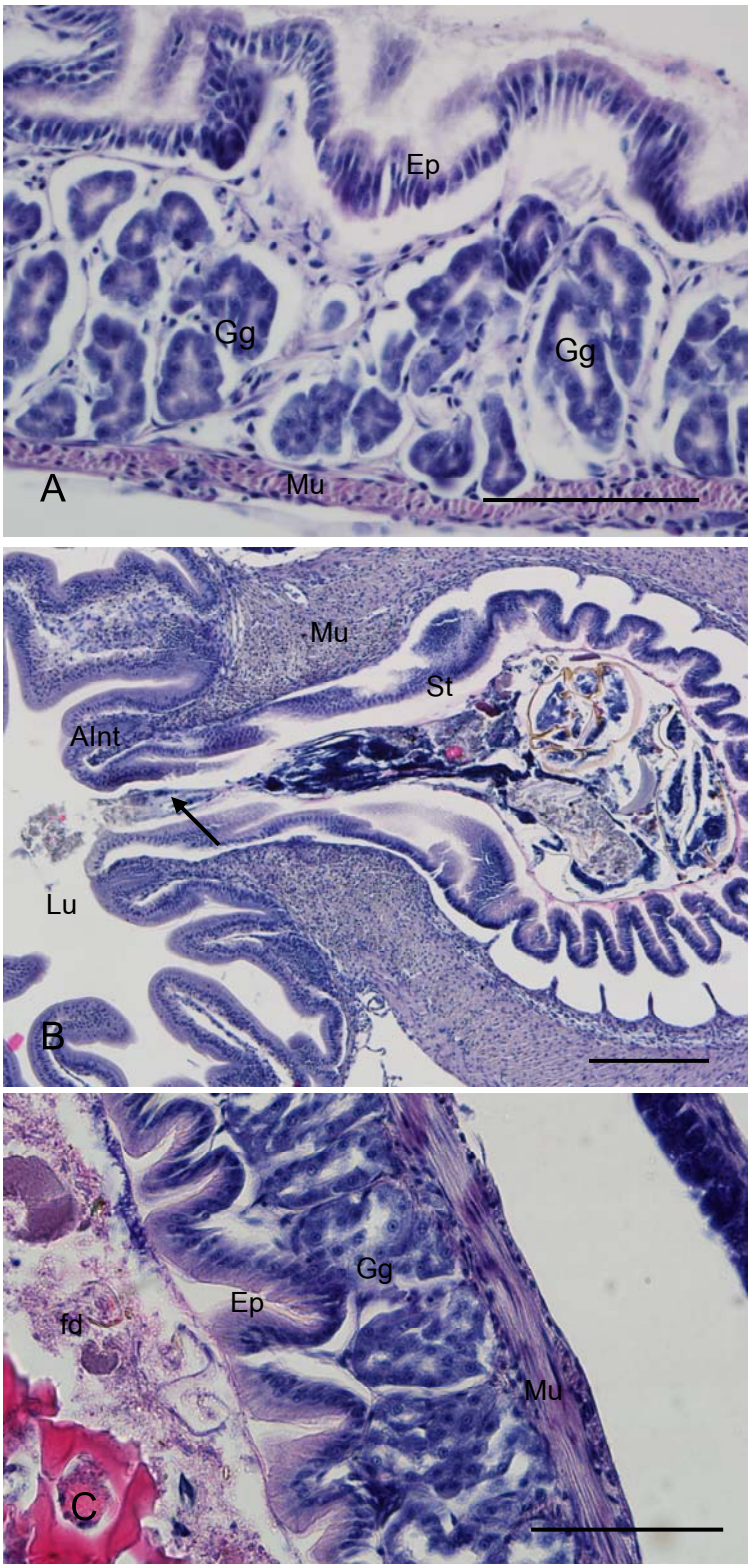
สำหรับการใช้วิธีทางฮีสโตเคมีเพื่อศึกษาสารเมือก พบว่า กระเพาะอาหารของปลาดุกลำพันวัยอ่อนมีสารสร้างเมือกที่เป็นกลางโดยเห็นเป็นสีชมพู (PAS positive, AB negative) เคลือบบริเวณผิวบน (ภาพที่ 11A) และมีพัฒนาการของจำนวนสารเมือกมากขึ้นทั้งในไซโตพลาสซึม (ภาพที่ 11B) และตลอดบนเยื่อบุผิว (ภาพที่ 11C) สำหรับสารเมือกเหล่านี้ คาดว่าหลั่งออกมาเพื่อป้องกันการกัดย่อยของกรดในกระเพาะอาหาร



ภาพที่ 8 พัฒนาการของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 5 - 20 วัน (LS, HE)
A: อายุ5 วัน; **B:** อายุ 6 วัน; **C:** อายุ12 วัน; **D:** อายุ 20 วัน Scale bar = 50 µm
(ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)



ภาพที่ 9 ต่อมแก๊สตริกในกระเพาะอาหารของปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 19 วัน (MT)
Scale bar = 20 µm (ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)

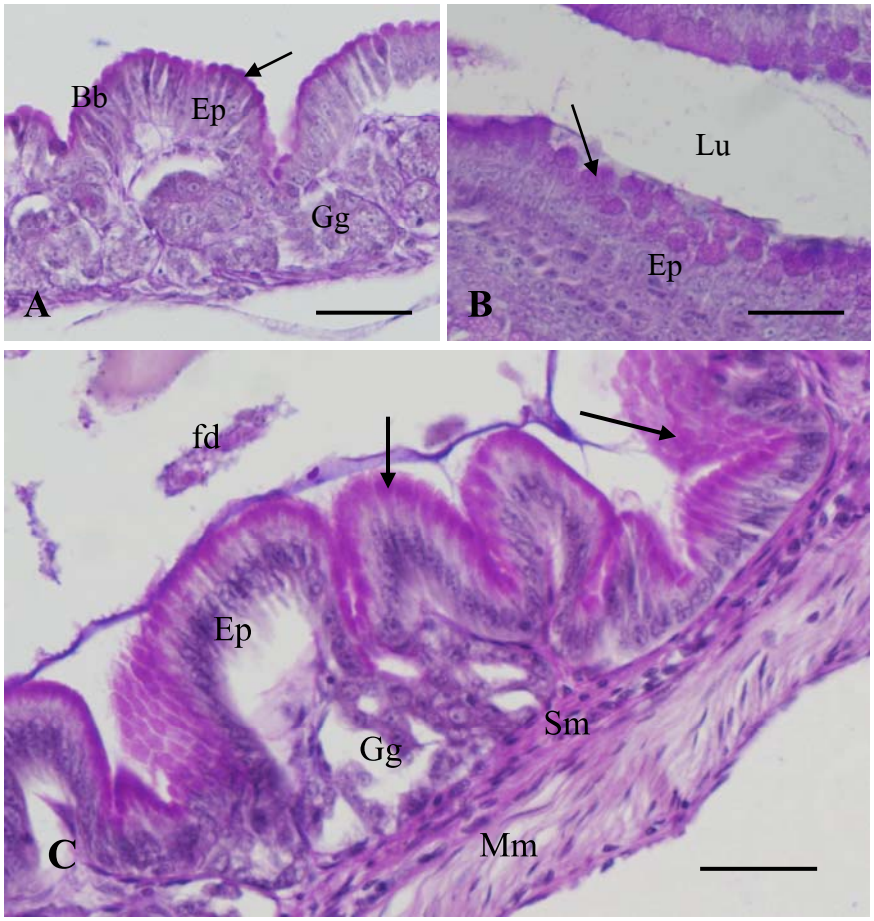


ภาพที่ 10 เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 22 - 37 วัน (LS, HE)

A: อายุ 22 วัน; **B:** อายุ 25 วัน แสดงบริเวณ อาหารเข้าสู่ลำไส้เล็ก (ลูกศร);

C: อายุ 37 วัน แสดงผนังกระเพาะ อาหาร Scale bar = 100 µm

(ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)



ภาพที่ 11 เนื้อเยื่อผนังกระเพาะอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อน (PAS-AB)
A: อายุ 10 วัน; **B:** อายุ 12 วัน **C:** อายุ 46 วัน Scale bar = 20 µm
(ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)

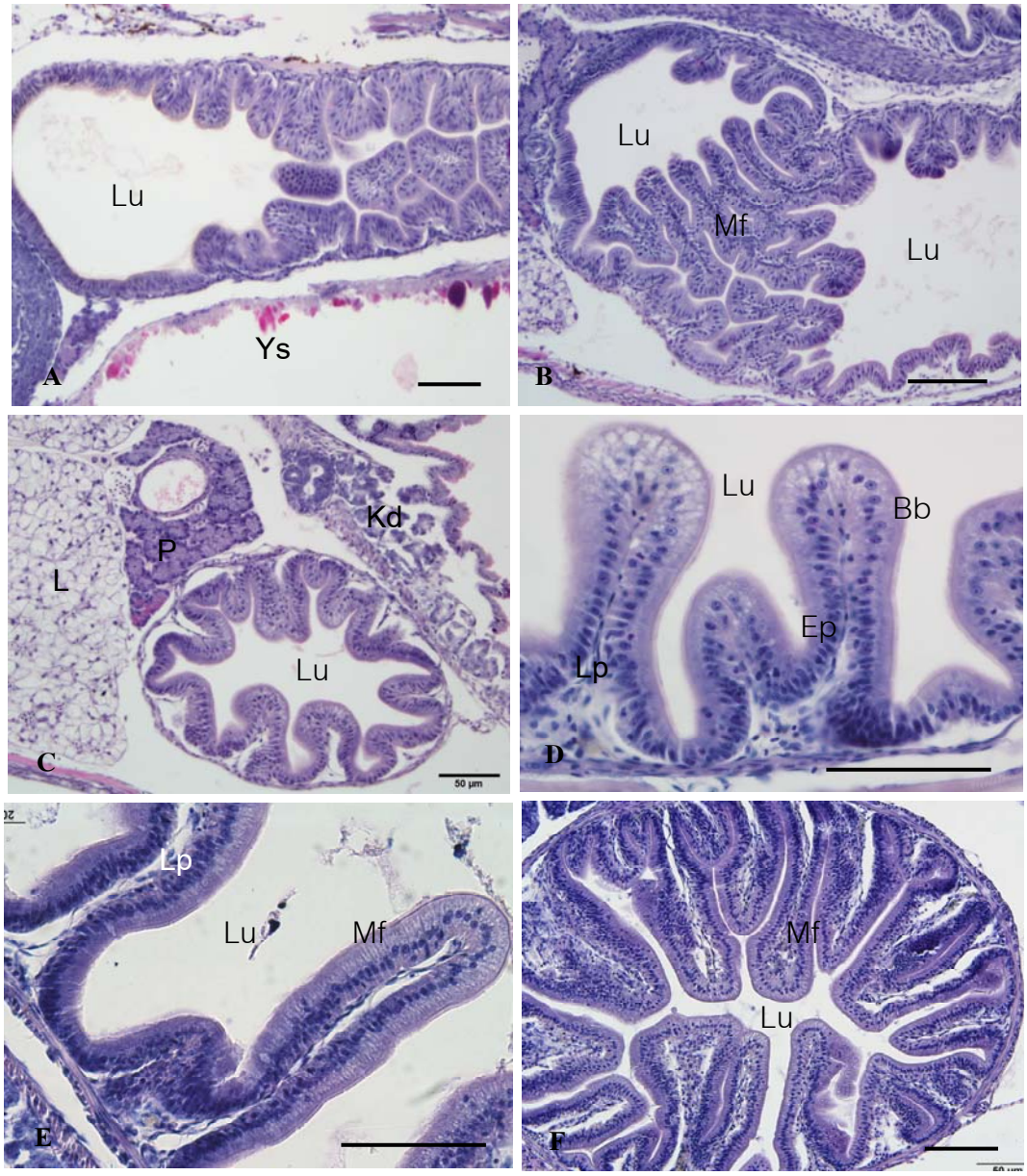
2.2.4 *ลำไส้เล็ก (Intestine)*

ลำไส้เล็กส่วนต้น (Anterior intestine)

ปลาดุกลำพันวัยอ่อนในช่วงอายุ 1-2 วันมีการเจริญของชั้นมิวโคซา อย่างรวดเร็ว ทำให้มีผนังหนามากขึ้น และเพิ่มความยาวมากขึ้นจนมีการขดไปมาภายในช่องท้อง เมื่อลูกปลาอายุ 3 วัน จะสามารถแยกลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนท้ายได้โดยสังเกตจากลักษณะของเซลล์บุผิว ชั้นมิวโคซาของผนังลำไส้เล็กส่วนต้นบุด้วยเซลล์ Enterocyte ทรงสูงชั้นเดียว (simple columnar epithelium) โดยมีนิวเคลียสติดสีม่วงเรียงเป็นแถวตรงฐานของเซลล์ และบริเวณผิวบนเซลล์จะเป็น striated boarder ซึ่งติดสีชมพูของ Eosin ไซโตพลาสซึมด้านบนของเซลล์ (apical cytoplasm) ติดสีเข้มมากขึ้น แสดงถึงการเริ่มมีกิจกรรมของเซลล์มากขึ้น สำหรับชั้นซับมิวโคซาระยะนี้มีขนาดบางมาก เมื่อลูกปลามีการเจริญเติบโตมากขึ้น ที่อายุ 4-5 วัน ผนังลำไส้มีพัฒนาการเพิ่มพื้นที่ผิวชัดเจน โดยส่วนของชั้นมิวโคซา จะมีการยกตัวสูงขึ้นเป็นสัน mucosal fold ยื่นเข้าไปใน lumen มากขึ้น (ภาพที่ 12 A) รวมทั้งมีการขดมากขึ้น (ภาพที่ 12 B) สำหรับชั้นซับมิวโคซาและชั้นกล้ามเนื้อพบว่ามีพัฒนาการช้ากว่ามาก สังเกตจากปลาอายุ 10 วัน ชั้นเนื้อเยื่อดังกล่าวมีขนาดบางมาก (ภาพที่ 12 C) อย่างไรก็ตาม เมื่อปลามีอายุมากขึ้น Enterocyte มีจำนวนหนาแน่นขึ้น ไซโตพลาสซึมที่ด้านบนเซลล์มีช่องว่าง (Apical vacuole) มากขึ้น และส่วนต่างๆของลำไส้เล็กส่วนต้นมีพัฒนาการเพิ่มขึ้นทั้งขนาดและจำนวนของ mucosal fold (ภาพที่ 12 D-F)

จากการย้อมสีพิเศษ (MT) เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อเกี่ยวพันในลำไส้เล็ก พบว่า ปลาอายุ 2 วัน เริ่มเกิดเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นชั้นบางๆเพียงเล็กน้อย โดยเริ่มตรวจพบใต้ชั้น simple columnar epithelium และเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น มีการเจริญเกิดขึ้นตลอดชั้นลามินาโปรเปรีย ที่ขยายขึ้นไปในแกนของ intestinal fold ทั้งในส่วนลำไส้เล็กส่วนต้น และส่วนปลาย รวมทั้งพบในชั้นเนื้อเยื่อของผนังท่อน้ำดี ซึ่งมาเปิดสู่ลำไส้เล็กส่วนต้น (ภาพที่ 13)

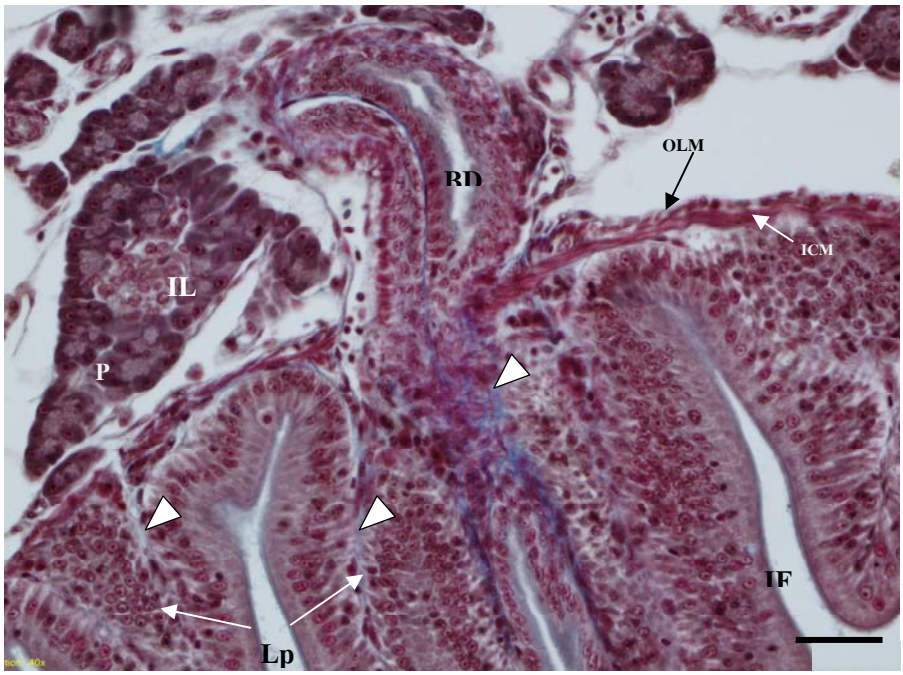
สำหรับการศึกษาเซลล์ต่อมสร้างสารเมือกพบว่าเซลล์เยื่อบุผนังลำไส้มีเซลล์ต่อมสร้างเมือกแทรกไม่มาก และเป็นชนิดสารเมือกกรด (PAS negative, AB positive) ซึ่งสารเมือกกรดเหล่านี้จะเคลือบผิวบนตลอดความยาวของท่อผนังลำไส้เล็ก (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 12 พัฒนาการของเนื้อเยื่อลำไส้เล็กส่วนต้นปลาดุกลำพันอายุ 4 - 40 วัน (LS, HE)

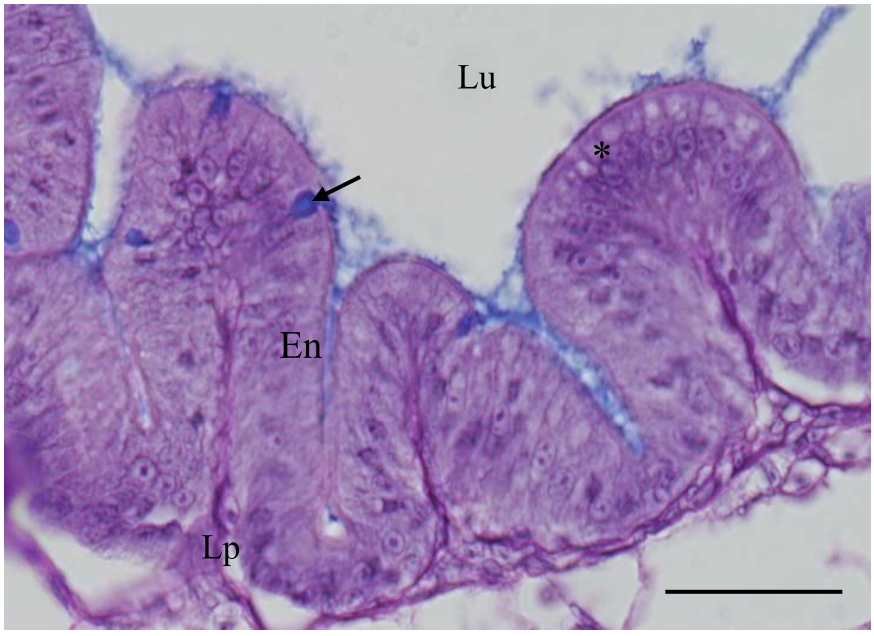
A: อายุ 4 วัน; **B:** อายุ 6 วัน; **C:** อายุ 10 วัน; **D:** อายุ 22 วัน; **E:** อายุ 37วัน; **F:** อายุ 40วัน

Scale bar = 50 µm (ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)



ภาพที่ 13 ลำไส้เล็กส่วนต้นและตับอ่อนของปลาดุกลำพันอายุ 19 วัน (MT) แสดงเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ลูกศร) Scale bar = 20 µm.

(ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)



ภาพที่ 14 ลำไส้เล็กส่วนต้นปลาดุกลำพันวัยอ่อนอายุ 6 วัน (PAS-AB)

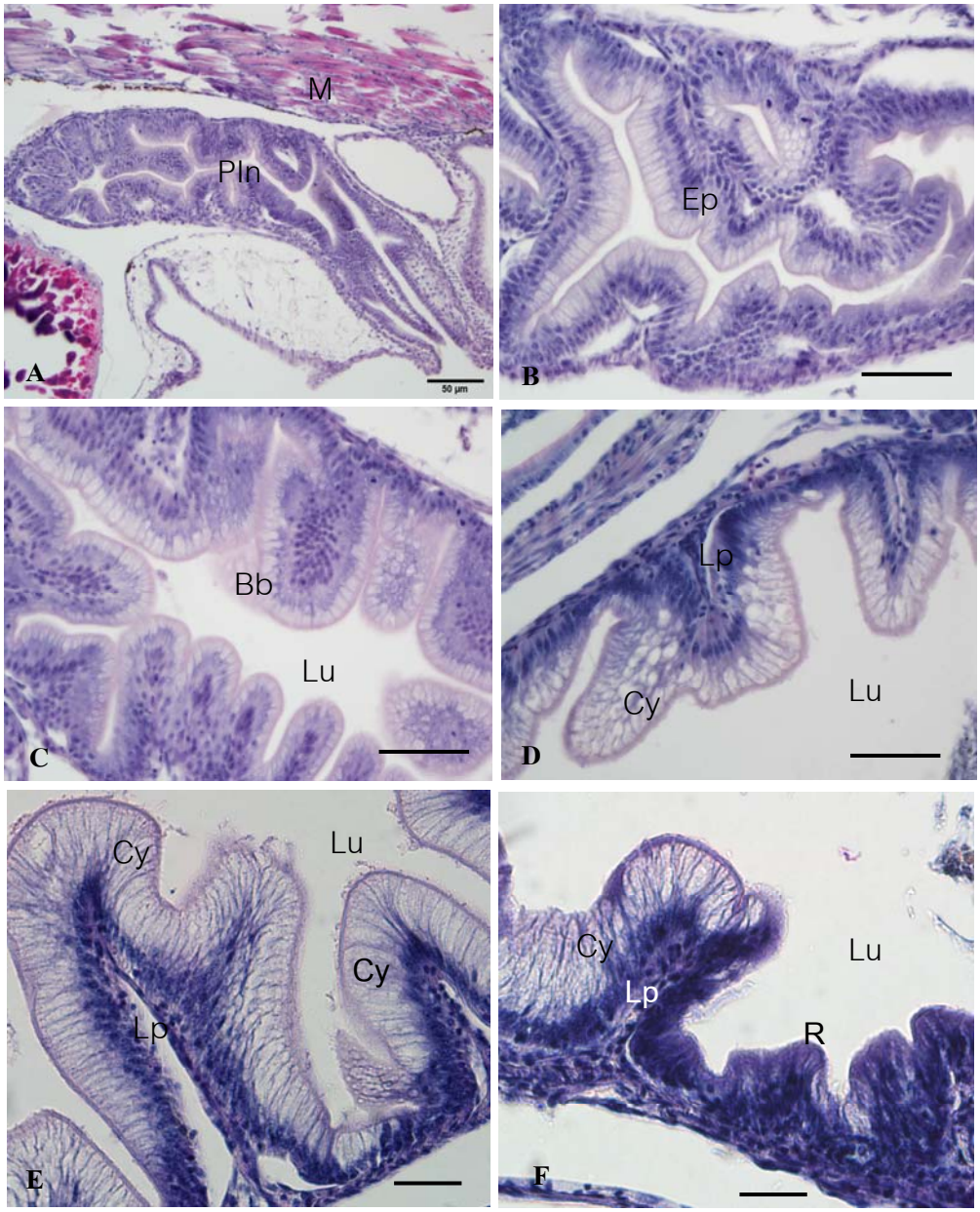
ลูกศร - เซลล์ต่อมสร้างเมือกกรด * - vacuole. Scale bar = 20 µm

(ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)

ลำไส้เล็กส่วนท้าย (Posterior intestine)

ในช่วงอายุ 1-2 วัน ลำไส้เล็กส่วนท้ายมีการเจริญเช่นเดียวกับส่วนต้น โดยเป็นเซลล์บุผิวรูปทรงเตี้ยชั้นเดียว (ภาพที่ 15 D, F) เมื่อลูกปลาอายุ 3 วัน พบว่าชั้นมิวโคซาบุเปลี่ยนเป็นเซลล์ทรงสูง (columnar epithelium) มีนิวเคลียสและไซโตพลาสซึมติดสีม่วงเข้ม ผิวเซลล์จะเป็น striated boarder ซึ่งติดสีชมพู (ภาพที่ 15 A) เมื่อลูกปลาอายุ 4 วัน ผนังลำไส้ส่วนนี้บุด้วยเซลล์ทรงสูงชั้นเดียวชัดเจน นิวเคลียสติดสีม่วงเรียงเป็นระเบียบอยู่ติดฐานเซลล์ ที่ส่วนบนของไซโตพลาสซึมมีสีจางใสและพบ vacuole เกิดขึ้นที่ส่วนบน แสดงว่าเริ่มมีการดูดซึมอาหารเกิดขึ้น ส่วนชั้นซับมิวโคซายังมีขนาดบางมาก (ภาพที่ 15 B-D) เมื่อปลาอายุมากขึ้น ผนังลำไส้มีการยกตัวเป็น mucosal folds ตามด้วยชั้น ลามินา โปรเปรีย ยื่นเข้าไปในท่อ lumen มากขึ้น (ภาพที่ 15 E) และที่ผนังลำไส้มีชั้นของกล้ามเนื้อซึ่งเป็นกล้ามเนื้อเรียบเรียงรอบวง 2-3 ชั้น จากลำไส้ส่วนท้ายต่อกับไส้ตรง (rectum) พบว่าเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ปลาดุกลำพันวัยอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน จากเซลล์รูปทรงสูงชั้นเดียว เป็นเซลล์ทรงสูงที่เบียดชิดกันแน่นเหมือนมีซ้อนกันหลายชั้น (Pseudostratified epithelium) รวมทั้งมีไซโตพลาสซึมติดและนิวเคลียสสีน้ำเงินเข้ม (ภาพที่ 15 F)

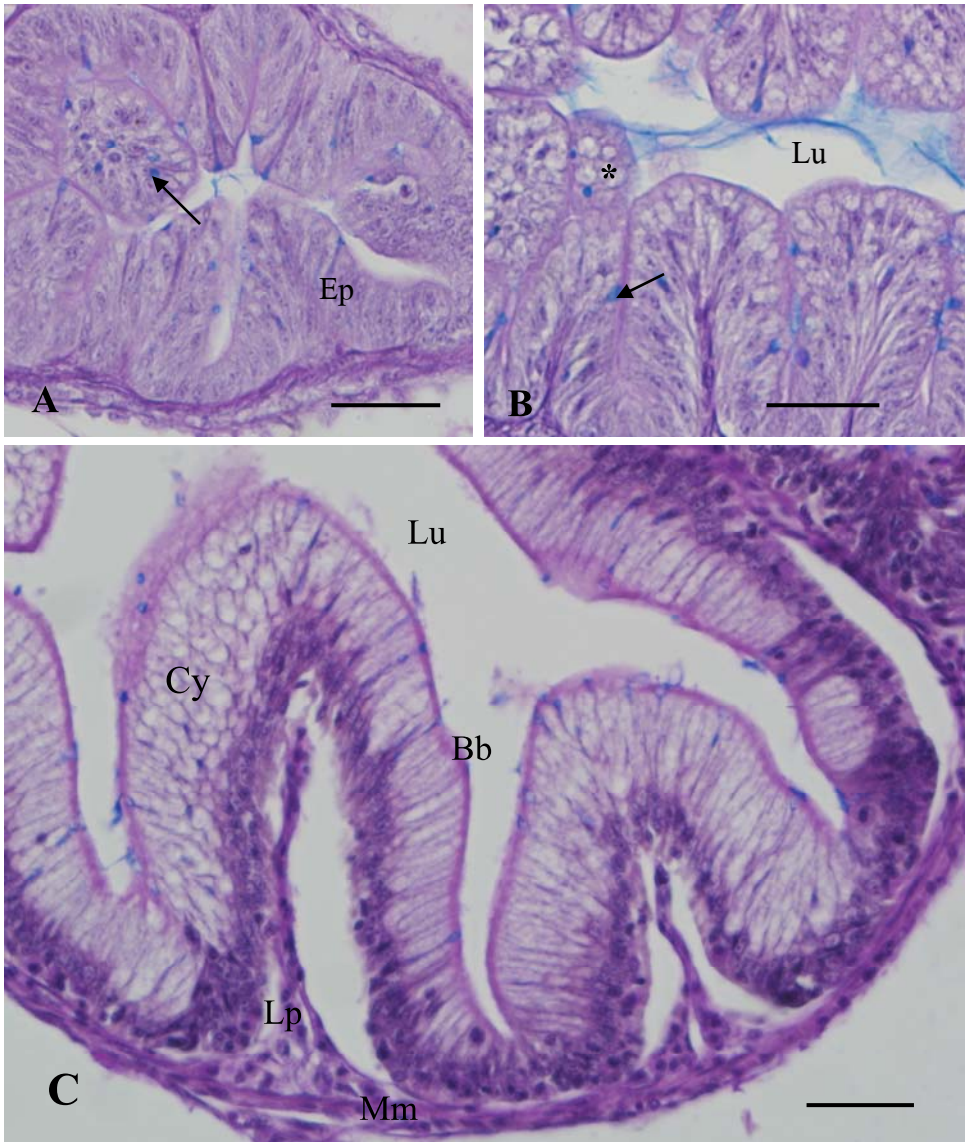
สำหรับสารเมือกในลำไส้เล็กส่วนท้าย พบว่ามีลักษณะคล้ายกับส่วนต้น คือเป็นสารเมือกกรด และสามารถพบได้ตั้งแต่อายุ 4 วัน (ภาพที่ 16 A) และมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามอายุปลา (ภาพที่ 16 B, C)



ภาพที่ 15 พัฒนาการของเนื้อเยื่อลำไส้ส่วนท้ายปลาดุกลำพันอายุ 4 - 46 วัน (LS, HE)

A: อายุ 4 วัน; **B:** อายุ 6 วัน; **C**: อายุ 10 วัน; **D:** อายุ 16 วัน; **E-F:** อายุ 46 วัน

Scale bar = 50 µm (A), และ 25 µm (B-F) (ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)



ภาพที่ 16 เนื้อเยื่อบุผิวผนังลำไส้ส่วนท้ายปลาดุกลำพันวัยอ่อน (PAS-AB)

A: อายุ 4 วัน; **B:** อายุ 5 วัน; **C:** อายุ 46 วัน Scale bar = 20 µm

(ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)

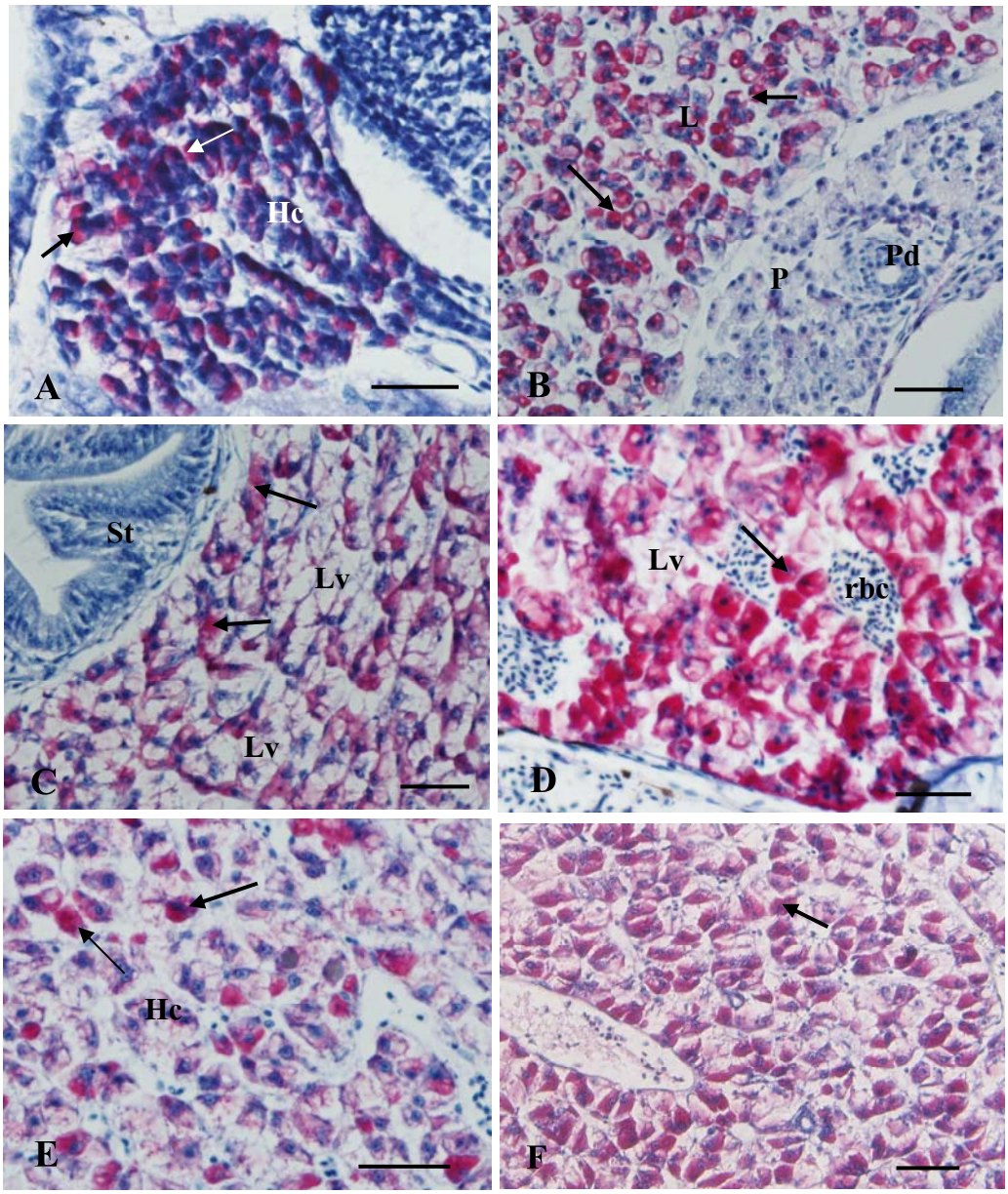
2.3 พัฒนาการของตับและตับอ่อน (Development of liver and pancreas)

2.3.1 *ไกลโคเจนในตับ (Liver)*

เซลล์ตับ (hepatocyte) เริ่มปรากฏเป็นกลุ่มบนท่อทางเดินอาหารส่วนต้นในลูกปลาอายุประมาณ 1.5 วัน (36 ชม.) ไซโตพลาสซึมของเซลล์ส่วนมากติดสีน้ำเงิน บ่งบอกถึงเซลล์อยู่ในระยะ active และจากการศึกษาปริมาณไกลโคเจนด้วยวิธี Best's carmine (BC) พบว่าเซลล์ตับสามารถสะสมสารไกลโคเจนทันทีภายใน 2 วันเมื่อปลาพักเป็นตัว โดยเห็นเป็นเม็ดละเอียดสีชมพูเข้มแทรกอยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ (ภาพที่ 17 A) ปริมาณสารไกลโคเจนมีแนวโน้มลดลงเมื่อปลาอายุมากขึ้น และถูกแทนที่ด้วยหยดไขมัน (ภาพที่ 17 B-C) จนอายุ 10 วัน พบมีไกลโคเจนเพิ่มมากขึ้นอีกครั้ง (ภาพที่ 14 D) สอดคล้องกับช่วงเวลาที่ปลาเริ่มมีอัตราเร่งของการเติบโต จากการศึกษาพบว่าปริมาณไกลโคเจนในตับถูกใช้ไปเมื่อปลาโตขึ้นและมีหยดไขมันเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 14 E-F) อย่างไรก็ตาม สามารถพบสารไกลโคเจนในตับปลาดุกลำพันวัยอ่อนตลอดทุกอายุจนสิ้นสุดการศึกษา (อายุ 46 วัน)

2.3.2 *พัฒนาการของตับอ่อน (Pancreas)*

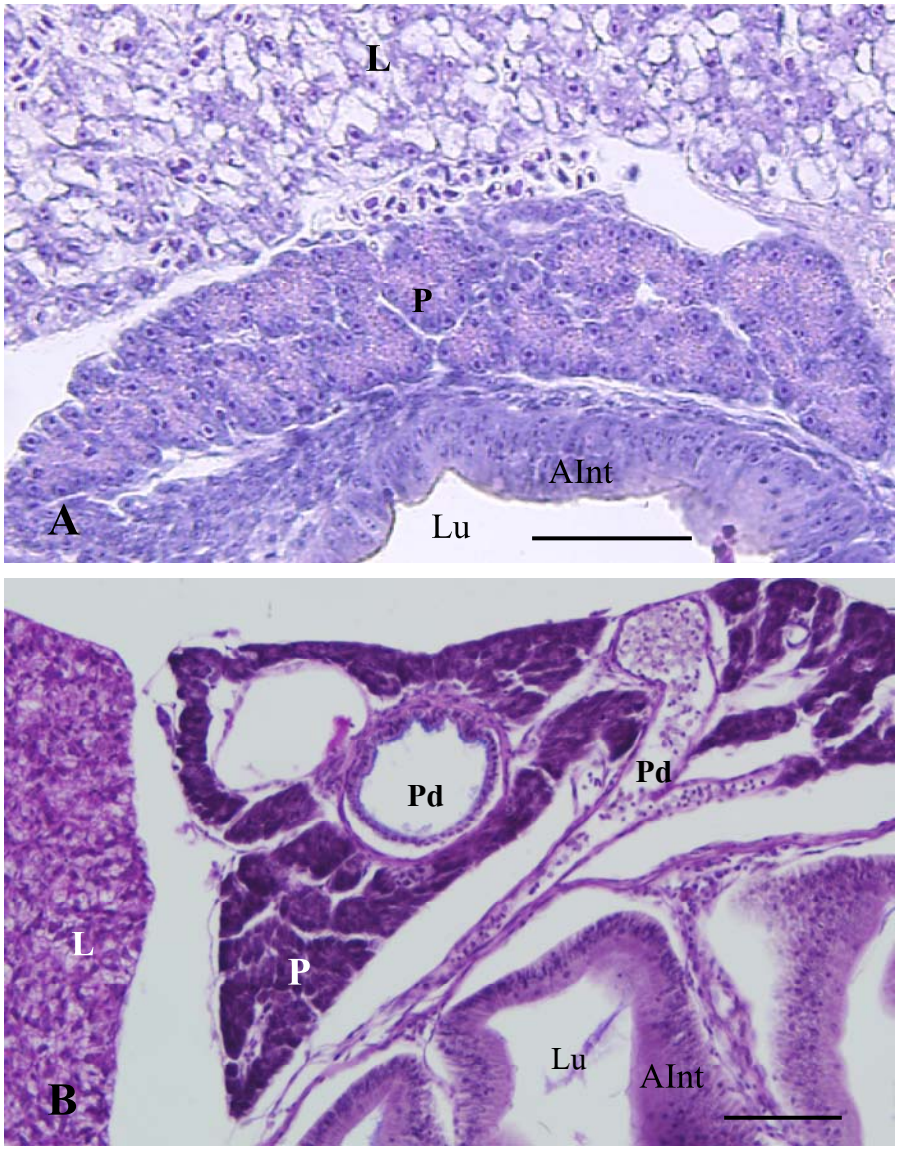
เริ่มสังเกตเห็นเซลล์ตับอ่อนได้ในลูกปลาอายุ 3 วัน โดยพบเป็นกลุ่มของ pancreatic acinar cell ซึ่งเป็นเซลล์ติดสีชมพูของ Eosin นิวแคลียสติดสีเข้มรวมกลุ่มอยู่ตอนท้ายของตับ (ภาพที่ 18 A) เมื่อปลามีอายุมากขึ้น พบพัฒนาการของ zymogen granule เป็นสีชมพูภายในไซโตพลาสซึมและฐานเซลล์ติดสีน้ำเงินเข้ม พบมี Islet of Langerhan เจริญแทรกในเนื้อตับอ่อน (ภาพที่ 13) ท่อน้ำย่อยตับอ่อน (Pancreatic duct) ประกอบด้วยเซลล์ลูกบาศก์ชั้นเดียวแทรกในเนื้อตับอ่อนเปิดเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้น(ภาพที่ 18 B) เนื้อเยื่อตับอ่อนมีโครงสร้างไม่แตกต่างตลอดการศึกษา แต่มีขนาดและจำนวนเซลล์ตับอ่อนเพิ่มมากขึ้นตามอายุปลา



ภาพที่ 17 เนื้อเยื่อตับปลาดุกลำพันวัยอ่อนแสดงปริมาณไกลโคเจน (ลูกศร) (BC)

A: อายุ 2 วัน **B:** อายุ 4 วัน **C:** อายุ 8 วัน **D:** อายุ 10 วัน **E:** อายุ 18 วัน **F:** อายุ 40 วัน

Scale bar = 20 µm (ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)



ภาพที่ 18 เนื้อเยื่อตับอ่อนปลาดุกลำพันวัยอ่อน

A: อายุ 4 วัน (HE) **B:** อายุ 25 วัน (PAS-AB) Scale bar = 50 µm

(ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)

2.4 การศึกษาการทำงานของเอ็นไซม์ด้วยวิธีทางฮีสโตเคมี

จากการศึกษาปริมาณของเอ็นไซม์ Alkaline phosphatase (Akp) และ Acid phosphatase (Acp) ในทางเดินอาหารของปลาดุกลำพันวัยอ่อน ด้วยวิธีทางฮีสโตเคมี พบว่าปริมาณของเอ็นไซม์ที่อายุปลาต่างๆมีปริมาณไม่เท่ากัน (ตารางที่ 3) พบว่าเอ็นไซม์ Akp ที่ท่อทางเดินอาหารที่ยังไม่พัฒนาปรากฏตั้งแต่ปลาฟักออกเป็นตัว (อายุ 0 วัน) โดยพบปฏิกิริยาเป็นสีน้ำตาลเข้มที่ผิวบนของผนังท่อในปริมาณน้อย (ภาพที่ 19 A) และที่อายุ 3 วัน เมื่อลูกปลามีพัฒนาการท่อทางเดินอาหารเป็นส่วนต่างๆ พบเอ็นไซม์ดังกล่าว ในปริมาณเล็กน้อยตลอดตั้งแต่ หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้ (ภาพที่ 19 B, C) เมื่อปลาวัยอ่อนมีอายุ 20 วันเป็นต้นไป จนสิ้นสุดการทดลอง (อายุ 46 วัน) พบว่าเอ็นไซม์ Akp ที่เยื่อบุผิวผนังหลอดอาหารมีปริมาณมากที่เมื่อเทียบกับส่วนอื่น (ตารางที่ 3) ส่วนกระเพาะอาหารมีการทำงานของเอ็นไซม์น้อยมากหรือแทบไม่มี (ภาพที่ 19 D) และตั้งแต่อายุ 20 วันเป็นต้นไป ลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนท้ายมีการทำงานของเอ็นไซม์เพิ่มขึ้นค่อนข้างมากตามอายุ (ภาพที่ 19 E, F) โดยเห็นปฏิกิริยาเป็นสีเข้มดำเคลือบตลอดที่ striated border ของเซลล์เยื่อบุผิวของผนังลำไส้

สำหรับการทำงานของเอ็นไซม์ Acid phosphatase (Acp) พบว่ามีปริมาณค่อนข้างน้อยกว่ามากเมื่อเทียบกับเอ็นไซม์ Akp (ตารางที่ 3) โดยสามารถพบเอ็นไซม์ Acp เมื่อปลาอายุ 1 วัน ที่ผนังท่อทางเดินอาหารในปริมาณไม่มาก (ภาพที่ 20 A) และที่อายุ 3 วัน เมื่อท่อทางเดินอาหารของลูกปลาวัยอ่อนมีพัฒนาการแล้ว ปรากฏว่าตั้งแต่หลอดอาหาร การะเพาะอาหาร และลำไส้ แทบไม่มีการทำงานของเอ็นไซม์ Acp (ภาพที่ 20 B, C)

3. พัฒนาการของอวัยวะในระบบย่อยอาหาร

จากผลการศึกษาข้างต้น พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอวัยวะต่างๆระหว่างพัฒนาการระบบย่อยอาหารของปลาดุกลำพันวัยอ่อน โดยตั้งแต่อายุ 0-7 วัน มีการพัฒนาเนื้อเยื่อเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และมีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อเป็นลำดับตามอายุปลา ซึ่งได้สรุปเฉพาะการเกิดเนื้อเยื่อที่สำคัญเป็นระยะดังรายละเอียดในตารางที่ 4

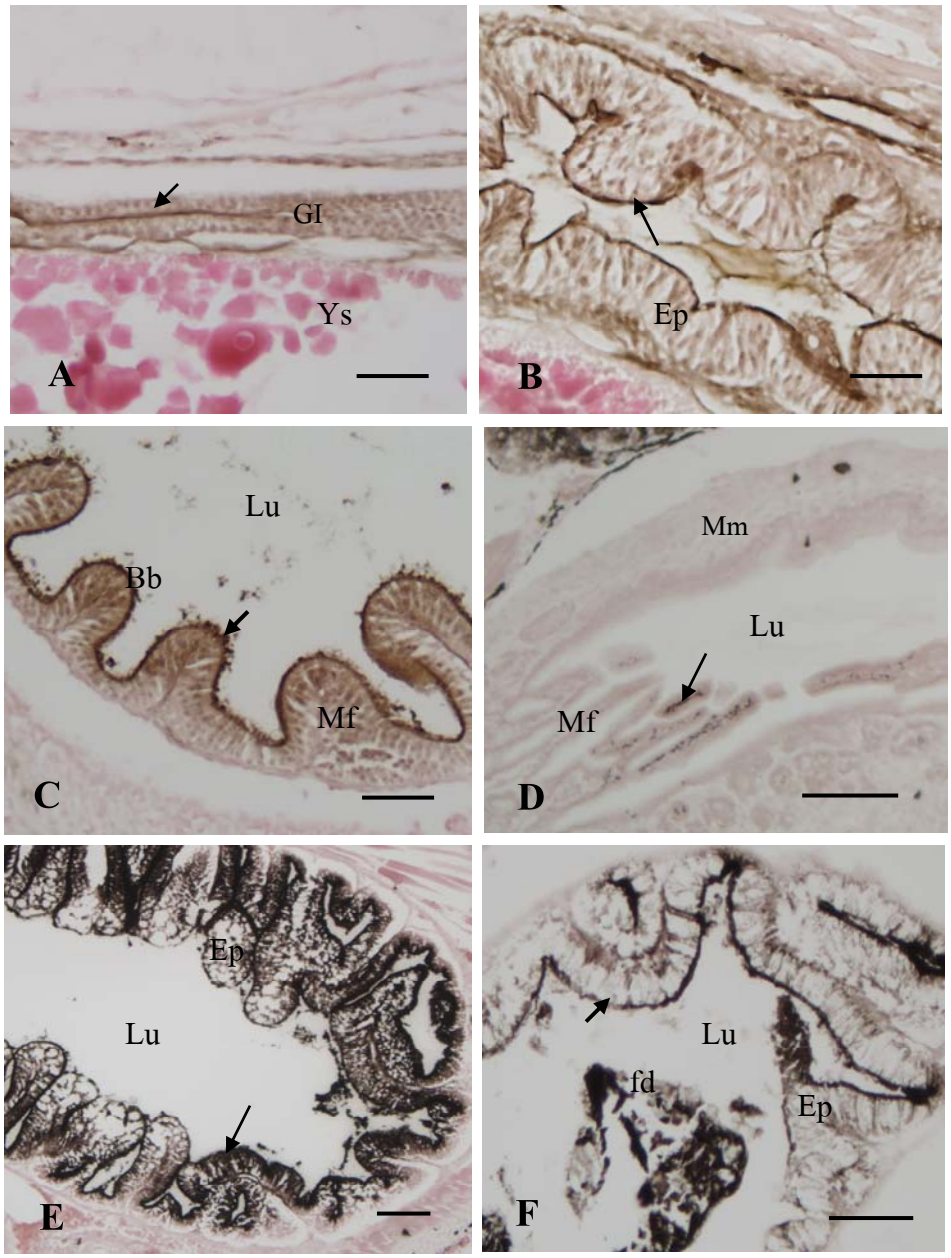
ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยปริมาณเอ็นไซม์ Alkaline phosphatase (Akp) และ Acid phosphatase (Acp) ในทางเดินอาหารส่วนต่างๆของปลาดุกลำพันวัยอ่อนที่อายุ 0-40 วัน

Age (dah)	Undifferentiated GI tract		Esophagus		Stomach		Anterior intestine		Posterior intestine	
	Akp	Acp	Akp	Acp	Akp	Acp	Akp	Acp	Akp	Acp
0	1	0	-	-	-	-	-	-	-	-
1	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-
2	2	0	-	-	-	-	-	-	-	-
3	-	-	1	1	1	1	1	1	1	0
5	-	-	1	0	1	0	1	0	1	0
12			1	0	0	1	1	0	1	0
15			1	1	0	0	2	0	1	0
20			4	0	1	1	3	0	4	0
25			4	0	0	0	4	0	4	0
30			4	0	0	0	4	0	4	0
35			-	0	0	0	4	0	3	0
40			4	0	0	0	4	0	4	0

0 = ไม่มี 1 = น้อย 2 = ปานกลาง 3 = มาก 4 = มากที่สุด

ตารางที่ 4 พัฒนาการของอวัยวะในระบบย่อยอาหารของปลาดุกลำพันวัยอ่อน

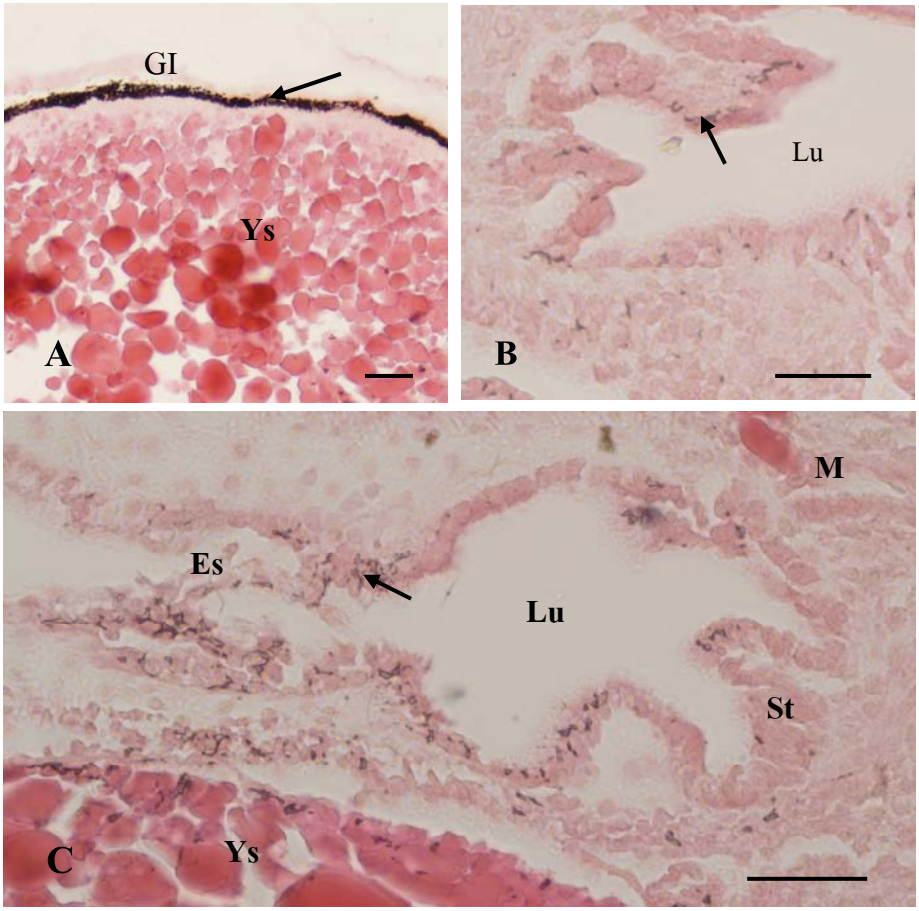
อายุลูกปลา	ลักษณะสำคัญ
0 ชม.	มีช่องปาก และท่อทางเดินอาหารเป็นท่อตรง
6 ชม.	มีพัฒนาการของขากรรไกรบนและล่าง
12 ชม	ปากเริ่มเปิด และมีปุ่มฟันขากรรไกรบนและล่าง
24 ชม	มีส่วนต้นของกระเพาะอาหารเกิดขึ้น
36 ชม	เห็นความแตกต่างของหลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้ เริ่มมีเซลล์ตับ และมีสารไกลโคเจน
2 วัน	มีต่อมเมือกที่ผนังท่อหลอดอาหาร กระเพาะอาหารยกตัวมากขึ้น ลำไส้ยาวมากขึ้น
3 วัน	เกิดปุ่มฟันในช่องปากและคอหอย มีสารเมือกที่ผนังท่อหลอดอาหาร กระเพาะอาหารมี mucosal ridges สำไส้แยกเป็นส่วนต้นและส่วนท้าย เกิดเซลล์ตับอ่อน
4 วัน	มีต่อมแก๊สตริกเกิดขึ้น
5 วัน	ถุงไข่แดงยุบหมด กระเพาะอาหารเป็น 2 ส่วน คือ fundus และ pylorus
6 วัน	เกิดปุ่มรับรสและฟันที่คอหอย สำไส้มี mucosal folds
7 วัน	ไข่แดงสลายหมด หลอดอาหารมีต่อมสร้างเมือกกลาง
8 วัน	ต่อมแก๊สตริกเพิ่มจำนวนมากขึ้น ลำไส้มี supranuclear vesicles
10-46 วัน	มีพัฒนาการเนื้อเยื่อทางเดินอาหารทุกส่วน และมีการเติบโตเป็นลำดับตามอายุปลาวัยอ่อน



ภาพที่ 19 เนื้อเยื่อผนังท่อทางเดินอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อน แสดงปฏิกิริยาการทำงานของเอ็นไซม์ Alkaline phosphatase (Akp) (ลูกศร)

A: ท่อทางเดินอาหาร (อายุ 1 วัน) **B:** ลำไส้เล็ก (อายุ 3 วัน) **C:** ลำไส้เล็ก (อายุ 15 วัน) **D:** กระเพาะอาหาร (อายุ 20 วัน) **E:** ลำไส้เล็กส่วนต้น (อายุ 30 วัน) **F:** ลำไส้เล็กส่วนท้าย (อายุ 35 วัน) ลูกศร = ปฏิกิริยาของเอ็นไซม์

Scale bar = 20 µm (A-C), 50 µm (D-F) (ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)



ภาพที่ 20 เนื้อเยื่อผนังท่อทางเดินอาหารปลาดุกลำพันวัยอ่อน แสดงปฏิกิริยาการทำงานของเอ็นไซม์ Acid phosphatase (Acp) (ลูกศร)
A: อายุ 1 วัน **B:** กระเพาะอาหาร (อายุ 3 วัน) **C:** หลอดอาหาร-กระเพาะอาหาร (อายุ 3 วัน) Scale bar = 20 µm (ความหมายอักษรย่ออยู่หน้า vii)

บทที่ 4
สรุปและวิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษา ปลาดุกลำพันวัยอ่อนที่มีอายุตั้งแต่ 0- 46 วัน รวมจำนวนลูกปลาทั้งสิ้น 830 ตัว พบว่า ลูกปลาแรกเกิด (อายุ 0 วัน) มีค่า เฉลี่ยความยาวทั้งสิ้น 4.27 ± 0.46 มม. และมีความยาวเพิ่มขึ้นตามอายุ เช่นที่อายุ 3 วัน และ 9 วัน มีค่า เฉลี่ยความยาวทั้งสิ้น 6.81 ± 0.31 มม.และ 10.22 ± 0.62 มม. ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับปลาดุกสายพันธุ์ยุโรป *Silurus glanis* (Kozaric *et al*., 2008) พบว่าลูกปลาดุกลำพันมีขนาดเล็กกว่าในทุกอายุ เมื่อลูกปลาอายุ 46 วัน (สิ้นสุดการเก็บตัวอย่าง) มีความยาวเฉลี่ย 37.14 ± 2.44 มม ซึ่งเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ของอายุและขนาดความยาวทั้งสิ้นของลูกปลา พบว่ามีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญโดยมีความสัมพันธ์เชิงเส้น (R^2=0.9498) ซึ่งข้อมูลดังกล่าวนี้ทำให้สามารถนำค่าความยาวทั้งสิ้นมาเป็นตัวบอกอายุปลาได้อย่างใกล้เคียง นอกจากนี้จากการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความยาวทั้งสิ้น พบว่าลูกปลามีการเจริญเป็น 2 ช่วง คือที่อายุ 0-10 วันลูกปลามีการเจริญเติบโตช้า และตั้งแต่วันที่ 10 เป็นต้นไปจนสิ้นสุดการศึกษาที่อายุ 46 วัน ลูกปลามีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นธรรมชาติของลูกปลาทุกชนิดที่ช่วงเวลาหนึ่งจะมีอัตราการเติบโต (growth rate) ขึ้นสูง และปลาแต่ละชนิดมีช่วงจังหวะเวลาดังกล่าวนี้แตกต่างกัน (Ribeiro *et al*., 1999) ทั้งนี้คาดว่าอัตราเร่งของการเจริญเติบโตสอดคล้องกับการพัฒนาของระบบทางเดินอาหารและเป็นช่วงเวลาสำคัญสำหรับการให้อาหารที่มีคุณภาพ และเหมาะสมเพื่อให้สอดคล้องกับอัตราการเจริญเติบโตที่รวดเร็วของลูกปลา นอกจากนี้การศึกษาพบว่าปากของลูกปลาดุกลำพันเปิดก่อนที่ไข่แดงจะหมดไป เช่นเดียวกับปลาส่วนใหญ่ (Amornsakun *et al*., 1997; Ribeiro *et al*., 1999; Kozaric *et al*., 2008) ดังนั้นในช่วงแรก ลูกปลาดุกลำพันรับอาหารจากภายใน (endogenous feeding) โดยได้สารอาหารจากถุงไข่แดง ซึ่งมีขนาดกลมใหญ่ปริมาตรเฉลี่ย 1.735 ±0.691 ลบ.มม. แนบอยู่ด้านล่าง ค่อนไปทางข้างหน้าของลำตัว จากลักษณะภายนอกพบว่าถุงไข่แดงของลูกปลากุดลำพันจะยุบตัวจนหมดเมื่อลูกปลาอายุประมาณ 5 วัน แต่เมื่อศึกษาชิ้นเนื้อเยื่อจากกล้องจุลทรรศน์ พบว่าถุงไข่แดงยังคงมีอยู่จนลูกปลาอายุ 7 วัน (ความยาวทั้งสิ้น 9.50 ± 0.34 มม) จึงสลายหมด เช่นเดียวกับปลาดุกสายพันธุ์ยุโรป *S. glanis* (Kozaric *et al*., 2008) และจากการตรวจชิ้นเนื้อสามารถพบเศษอาหารในกระเพาะอาหารลูกปลาอายุ 7 วัน และหลังจากวันที่ 7 เป็นต้นไป ลูกปลารับสารอาหารจากภายนอก (exogenous feeding) เท่านั้น ดังนั้นช่วงเวลานี้เป็นช่วงสำคัญที่สุดสำหรับการให้อาหารที่ลูกปลาสามารถย่อยและดูดซึมได้ เนื่องจากอัตราการรอดระหว่างการอนุบาลลูกปลา ขึ้นอยู่กับเวลาวิกฤตินี้ ซึ่งหากเกษตรกรให้อาหารลูกปลาล่าช้า จะเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ลูกปลาอ่อนแอและมีอัตราการรอดต่ำ ถึงแม้ว่าลูกปลาดุกลำพันอายุ 4 วัน มีการพัฒนาของท่อทางเดินอาหารจนสามารถแยกได้ชัดเจนออกเป็น 5 ส่วน ได้แก่ ช่องปากและคอหอย หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก

ส่วนต้น และลำไส้เล็กส่วนท้าย แต่จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า ช่วงอายุดังกล่าว ท่ออาหารทุกส่วนยังไม่พร้อมสำหรับการทำหน้าที่ย่อยหรือดูดซึม การวิเคราะห์ทางฮีสโตเคมีจะทำให้ทราบถึงช่วงเวลาที่ท่อทางเดินอาหารเริ่มทำหน้าที่และมีประสิทธิภาพในบทบาทดังกล่าว

สำหรับการศึกษาพัฒนาการของเนื้อเยื่อทางเดินอาหาร พบว่าปลาดุกลำพันวัยอ่อนมีรูปแบบและโครงสร้างพื้นฐานของการเจริญของเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ แบบเดียวกับพัฒนาการของปลาทั่วไป ยกเว้นช่วงเวลาของการเกิดอวัยวะแต่ละส่วน อาจมีความใกล้เคียงหรือแตกต่างกับปลาชนิดอื่นบ้าง ซึ่งความรู้ดังกล่าวเป็นข้อมูลที่สำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยงและอนุบาลลูกปลา โดยปลาดุกลำพันระยะแรกเกิดจนอายุ 12 ชั่วโมง ทางเดินอาหารยังไม่พัฒนา ท่อทางเดินอาหารเป็นเพียงท่อตรงไม่มีทางเปิดของปากและทวารหนัก จนอายุ 36 ชั่วโมงเป็นต้นไป เริ่มมีพบการพัฒนาของเซลล์ในท่อทางเดินอาหาร ทางเดินอาหารส่วนแรกที่สำคัญคือหลอดอาหาร ปลาดุกลำพันมีหลอดอาหารเริ่มแข็งแรงเมื่ออายุ 2 วัน โดยสังเกตได้จากการพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันคอลลาเจนในชั้นซับมิวโคซา ซึ่งหลอดอาหารของปลามีหน้าที่เช่นเดียวกับหลอดอาหารของสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไป คือเป็นทางผ่านของชิ้นอาหารจากปากไปยังกระเพาะอาหาร ดังนั้นเนื้อเยื่อบุผิวของท่อหลอดอาหารจึงมีลักษณะโครงสร้างเอื้อต่อการเสียดสีกับชิ้นอาหาร โดยมีเยื่อบุผิวของท่อเป็นเซลล์แบนหลายชั้นและเซลล์สร้างสารเมือก อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาทางด้านโครงสร้างและฮีสโตเคมี พบว่าเนื้อเยื่อส่วนนี้มีความแตกต่างกันในปลาต่างสายพันธุ์ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับหน้าที่พิเศษของหลอดอาหารในปลาแต่ละชนิดรวมทั้งช่วงอายุของปลาวัยอ่อน (Domeneghini *et al.*, 1998) เซลล์สร้างเมือกอาจเกิดขึ้นพร้อมกับการเปิดปาก เช่น ในปลานวลจันทร์ทะเล (Ferraris *et al.*, 1987) ปลา Dover sole (Boulhic and Gabaudan, 1992) และปลา *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al*., 1999) แต่ปลาส่วนใหญ่เซลล์สร้างเมือกเกิดก่อนมีการกินอาหารจากภายนอก ยกเว้นปลาบางชนิดที่มีเซลล์สร้างเมือกเกิดขึ้นภายหลังการกินอาหารจากภายนอก เช่นปลา Gilthead seabream (Sarasquete *et al*., 1995) สำหรับปลาดุกลำพันมีเซลล์สร้างเมือก (goblet cell) เกิดขึ้นเมื่อปลาอายุ 3 วัน โดยพบเจริญแทรกเป็นระยะอยู่ระหว่างเซลล์เยื่อบุผิวตลอดผนังช่องปาก คอหอยไปจนถึงหลอดอาหาร จากการศึกษาด้วยการย้อมสีพิเศษทำให้ยืนยันได้ว่าเซลล์ต่อมสร้างเมือกของปลาดุกลำพันมี 3 ชนิด ได้แก่ ชนิดสร้างสารเมือกกรด สารเมือกเป็นกลาง และชนิดสารเมือกปนทั้งกรดและเป็นกลางในต่อมเดียวกัน โดยในช่วงแรกเป็นเซลล์สร้างสารเมือกกรด (acid mucopolysaccharide) ทั้งสิ้น และหลังจากนั้นประมาณ 1-2 วันจึงพัฒนาเซลล์ต่อมสร้างเมือกที่เป็นกลาง (neutral mucopolysaccharide) รวมทั้งชนิดปนเจริญแทรก และตั้งแต่ลูกปลาอายุ 5 วันเป็นต้นไป พบหนาแน่นมากโดยเฉพาะที่บริเวณหลอดอาหารก่อนเข้าสู่กระเพาะอาหาร เปรียบเทียบกับปลาดุกสายพันธุ์ยุโรป *S. glanis* มีเซลล์สร้างสารเมือกช้ากว่า โดยมีสารเมือกกรดในหลอดอาหารเมื่อปลาอายุ 5 วัน และสารเมือกเป็นกลางเมื่ออายุ 7 วัน (Kozaric *et al*., 2008)

โดยทั่วไปกระเพาะอาหารของปลาน้ำจืดปรากฏชัดเจนตั้งแต่ลูกปลาอายุตั้งแต่ 5 – 35 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา (Curier-Peres and Kestemart, 2002; Gisbert *et al*., 2004; Yang *et al*., 2010) สำหรับปลาดุกลำพันมีพัฒนาการของกระเพาะอาหารค่อนข้างเร็ว (ก่อนอายุ 2 วัน) และมีต่อมแก๊สตริก เมื่ออายุปลา 3.5 วัน สอดคล้องกับธรรมชาติของปลากลุ่ม Siluriformes ซึ่งมีพัฒนาการของต่อมแก๊สตริกเร็วกว่าในปลาอันดับ (order) อื่น (Bisbal and Bengtson, 1995; Gisbert *et al*., 1998) รวมทั้งปลาดุกสายพันธุ์ยุโรป *S. glanis* มีต่อมแก๊สตริกในวันที่ 5-7 (Kozaric *et al*., 2008) โดยทั่วไปต่อมแก๊สตริกมีหน้าที่ในการหลั่งน้ำย่อยที่เป็นกรดและเอนไซม์ย่อยโปรตีนให้มีโมเลกุลเล็กลงเพื่อลำไส้สามารถดูดซึมได้ อย่างไรก็ตาม พบว่าปลาหลายชนิดมีการทำงานของน้ำย่อยในกระเพาะอาหารภายหลังพบต่อมแก๊สตริกเกิดขึ้นแล้วหลายวัน เช่น ในปลา *Corgonus lavaretus* (Mahr *et al*., 1983) เมื่อลูกปลาอายุ 4วัน ผิวบนชั้นมิวโคซาของกระเพาะอาหารลูกปลาดุกลำพันเคลือบด้วยสารเมือกที่เป็นกลาง (PAS positive) แสดงว่าเริ่มมีการทำงานของน้ำย่อย โดยเยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารได้ถูกเคลือบด้วยสารเมือกเพื่อป้องกันการกัดย่อยจากกรดที่หลั่งจากต่อมแก๊สตริกของมันเอง ซึ่งสารเมือกที่เป็นกลางในท่อทางเดินอาหารสัมพันธ์กับการดูดซึมสารอาหารที่มีโมเลกุลย่อยง่าย เช่น พวกน้ำตาล แป้ง และกรดไขมันโมเลกุลเล็ก (Osman and Caceci, 1991) เช่นที่พบในกระเพาะอาหารของปลา *Sparus aurata* (Domengehini *et al*., 1998), *Acipensor baeri* and *Paralichthus californicus* (Gisbert *et al*., 1999, 2004)

ลำไส้ของปลาประกอบด้วยลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนท้าย การศึกษาครั้งนี้พบว่าเซลล์ของเยื่อบุผนังลำไส้ของลูกปลาดุกลำพันประกอบด้วยเซลล์รูปทรงกระบอกเรียงตัวกันเป็นแนวชั้นเดียว ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ที่มีคุณสมบัติในการดูดซึมสารอาหารได้ดี ลำไส้เล็กของลูกปลาดุกลำพันมีเซลล์ต่อมสร้างสารเมือกค่อนข้างน้อยเมื่อเทียบกับปลาทั่วๆ ที่ส่วนต้นของสำไส้พบทั้งชนิดสารเมือกเป็นกลางและเป็นกรดอยู่ปะปนกัน ซึ่งสารเหล่านี้ล้วนมีส่วนร่วมในการย่อยและดูดซึมสารอาหารที่ลำไส้เล็ก (Grau *et al*., 1992) อย่างไรก็ตาม พบว่าลำไส้ของปลาดุกลำพันมีต่อมสร้างสารเมือกกรดเกือบทั้งสิ้น สันนิษฐานว่า นอกจากลำไส้ปลาดุกลำพันวัยอ่อนมีการดูดซึมสารอาหารได้ดีแล้ว ยังมีประสิทธิภาพในการย่อยกรดไขมันด้วย

ปลาดุกลำพันมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนค่อนข้างเร็วและเจริญในเวลาใกล้เคียงกัน โดยเจริญแยกส่วนกัน เช่นเดียวกับปลาดุกสายพันธุ์อื่น (Kozaric *et al*., 2008; Yang *et al*., 2010) ไม่รวมอยู่ในเนื้อเยื่อก้อนเดียวกัน ซึ่งปลาทะเลหลายชนิด เช่นปลากะพงขาว มีตับและตับอ่อนเจริญร่วมกันเป็น hepatopancreas นอกจากกลุ่มปลาดุกแล้ว มีปลาหลายชนิดที่เซลล์ตับเจริญแยกจากตับอ่อน และมีปลาหลายชนิดที่เซลล์ตับปรากฏในวันแรกหลังจากออกจากไข่ เช่น ปลา dover sole (Boulhic and Gabaudan, 1992) ปลาทราย gilthead seabream (Sarasquete *et al*., 1995) และปลา wolfish (Falk-Peterson และ Hansen, 2001) เนื้อเยื่อตับของปลาดุกลำพันเจริญอยู่ทางด้านบนของกระเพาะอาหาร พบว่าเกิดขึ้นเร็วกว่าปลาดุกสายพันธุ์ *Pelteobagrus fulvideaco* ที่พบกลุ่ม

เซลล์ตับ เมื่ออายุปลา 2 วัน (Yang *et al*., 2010) ส่วนปลาดุกสายพันธุ์ยุโรป *S. glanis* มีเซลล์ตับเกิดขึ้นล่าช้าออกไปโดยพบที่อายุ 3 วัน และมีท่อทางเดินอาหารเริ่มพัฒนาเมื่อลูกปลาอายุ 3-5 วัน (Kozaric *et al*., 2008) อย่างไรก็ตาม กลุ่มเซลล์ตับที่เกิดขึ้นใหม่ จะยังไม่มีบทบาทจนกว่าจะมีพัฒนาการจนสามารถสร้างน้ำย่อย ซึ่งแตกต่างกันในปลาแต่ละสายพันธุ์ นอกจากตับมีหน้าที่สร้างน้ำดีเพื่อช่วยย่อยอาหารแล้ว ยังเป็นแหล่งสะสมไกลโคเจนเพื่อเป็นแหล่งพลังงานในร่างกาย ลูกปลาระยะวัยอ่อนมีระยะเวลาของการสะสมไกลโคเจนในตับแตกต่างกันขึ้นอยู่กับกระบวนการเผาผลาญในร่างกายของปลาแต่ละชนิด ในปลาดุกลำพัน มีการปรากฏของสารไกลโคเจนพร้อมกับการเกิดเซลล์ตับ (อายุ 36 ชม) ซึ่งเร็วกว่าปลาหลายชนิด เช่น ปลาดุกสายพันธุ์ยุโรป *S. glanis* (Kozaric *et al*., 2008) ปลา cod *Gadus morhua* (Kjorsvik et al., 1991) ปลา Dover sole (Boulhic and Gabaudan, 1992) และปลา *Solea senegalensis* (Ribeiro *et al*., 1999) คาดว่าไกลโคเจนเป็นแหล่งสารอาหารสำรองของลูกปลาในกรณีสารไข่แดงถูกใช้หมดไป โดยทั่วไปปริมาณของไกลโคเจนในเซลล์ตับมักลดลงเมื่อปลามีอายุเพิ่มขึ้นและถูกแทนที่ด้วยหยดไขมันภายในเซลล์ตับ ทำให้ตับปลาเป็นแหล่งไขมันปลาที่มีคุณประโยชน์ ระยะเวลาของการสลายไปของไกลโคเจนขึ้นอยู่กับชนิดของปลา เช่น ปลา *S. solea* ไม่มีไกลโคเจนในตับเมื่ออายุปลาวัยอ่อน 30 วัน (Boulhic and Gabaudan, 1992) ในขณะที่ปลาบางสายพันธุ์มีปริมาณของไกลโคเจนในตับตลอดช่วงพัฒนาการของปลาวัยอ่อน (Santos and Vinagre, 1991) การศึกษาครั้งนี้ พบว่าเซลล์ตับปลาดุกลำพันวัยอ่อนสามารถสะสมสารไกลโคเจนทันทีภายใน 2 วันเมื่อปลาพักเป็นตัว ปริมาณสารไกลโคเจนมีแนวโน้มลดลงเมื่อปลาอายุมากขึ้น และถูกแทนที่ด้วยหยดไขมัน จนอายุ 10 วัน (ความยาวทั้งสิ้น 10.83 ± 0.51 มม) พบมีไกลโคเจนเพิ่มมากขึ้นอีกครั้ง สอดคล้องกับช่วงเวลาที่ปลามีอัตราเร่งของการเติบโต ในปลาบางชนิดไม่มีปริมาณของไกลโคเจนในตับ โดยตับเป็นแหล่งสะสมไขมันเท่านั้น สำหรับตับอ่อนปลาดุกลำพันพบว่าพัฒนาการช้ากว่าตับเล็กน้อย โดยพบเซลล์ตับอ่อนที่อายุ 2 วัน เช่นเดียวกับปลาดุกเหลืองสายพันธุ์ *P. fulvideaco* (Yang *et al*., 2010) แต่เร็วกว่าปลาดุกสายพันธุ์ยุโรป *S. glanis* (Kozaric *et al*., 2008) และจากการพบ zymogen granule ในเซลล์ตับอ่อนเมื่อปลาดุกลำพันอายุ 4 วัน ทำให้สันนิษฐานว่าเริ่มผลิตน้ำย่อยในช่วงเวลาดังกล่าว

สำหรับการศึกษาเอ็นไซม์ alkaline phosphatase ซึ่งมีความสำคัญในการดูดซึมสารอาหาร เช่น น้ำตาล ไขมัน แคลเซียม และฟอสเฟส (Roubaty and Portmann, 1988) โดยเฉพาะในปลาวัยอ่อน เอนไซม์ตัวนี้ จะมีหน้าที่ช่วยให้การดูดซึม และกระบวนการขนย้ายสารผ่านเยื่อบุผิว โดยพบมากในถุงไข่แดง และลำไส้ และจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเติบโตของลูกปลา (Govoni *et al*., 1986) การทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase จะพบมากที่ striated border ของเยื่อบุผิว เช่นเดียวกับที่พบในปลาเก๋า (จินตมาศ สุวรรณจรัส 2533) ปลานวลจันทร์ทะเล (Ferraris *et al*., 1987) ปลา *S. senegalensis* (Ribeiro *et al*., 1999) เป็นต้น และการเพิ่มของเอ็นไซม์มีส่วนสัมพันธ์กับการเพิ่มพื้นที่ผิวดูดซึมของผนังลำไส้ (Segner *et al*., 1989) ท่อทางเดินอาหารปลาดุกลำพันมีการ

ทำงานของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase ตั้งแต่แรกเกิด โดยที่ยังเป็นเพียงท่อตรง แสดงว่าท่ออาหารมีความสามารถดูดซึมได้ทันทีที่ฟักเป็นตัว โดยเฉพาะเยื่อบุผนังหลอดอาหารมีการทำงานของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase มากกว่าส่วนอื่นๆ สำหรับเอ็นไซม์ acid phosphatase พบว่าไม่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการระบบย่อยอาหารของปลาดุกลำพันวัยอ่อน เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ แทบไม่พบปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ตัวนี้เลย

การศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า อายุและขนาดความยาวทั้งสิ้นของลูกปลาดุกลำพันมีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ สามารถนำค่าความยาวทั้งสิ้นมาเป็นตัวบอกอายุปลาได้อย่างใกล้เคียง และตั้งแต่อายุ 10 วัน เป็นต้นไป ลูกปลามีอัตราการเจริญอย่างรวดเร็ว จึงเป็นช่วงเวลาสำคัญสำหรับอาหารที่มีคุณภาพ สำหรับพัฒนาการของเนื้อเยื่อทางเดินอาหาร พบว่ามีรูปแบบโครงสร้างพื้นฐานของการเจริญของเนื้อเยื่อส่วนต่างๆแบบเดียวกับปลาทั่วไป ลูกปลาดุกลำพันมีปากเปิดที่อายุประมาณ 12 ชม และมีพัฒนาการของกระเพาะอาหารค่อนข้างเร็ว (อายุ 36 ชม) ซึ่งกระเพาะอาหารทำงานที่อายุ 4 วัน รวมทั้งลูกปลาดุกลำพันอายุ 4 วัน มีการพัฒนาของท่อทางเดินอาหารจนสามารถแยกได้ชัดเจนออกเป็น 5 ส่วน ได้แก่ ช่องปากและคอหอย หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้นและส่วนท้าย เมื่ออายุ 5 วัน ถุงไข่แดงยุบหมดจากภายนอก และหลังจาก 7 วัน ไข่แดงถูกใช้หมด ลูกปลารับสารอาหารจากภายนอกเท่านั้น จึงเป็นช่วงวิกฤตสำหรับการให้อาหารที่ปลาวัยอ่อนสามารถย่อยและดูดซึมได้ เนื้อเยื่อตับของปลาดุกลำพันวัยอ่อนเกิดขึ้นเร็ว (อายุ 2 วัน) และมีประสิทธิภาพสูงในการสะสมไกลโคเจน นอกจากนี้ปลาดุกลำพันมีเซลล์ต่อมสร้างเมือกถึง 3 ชนิด และส่วนมากเป็นสารเมือกกรด โดยพบหนาแน่นที่หลอดอาหาร ผนังลำไส้ของปลาดุกลำพันมีการสะสมของเอ็นไซม์ alkaline phosphatase ตั้งแต่ฟักออกจากตัวและมีปริมาณมากที่สุดที่หลอดอาหาร สำหรับการให้อาหารลูกปลา จากการศึกษา มีข้อเสนอแนะว่า ในช่วงแรก เกษตรกรควรให้อาหารที่มีโมเลกุลย่อยง่าย เช่น อาหารที่มีส่วนผสมของสารอาหารพวกน้ำตาล แป้ง และกรดไขมันโมเลกุลเล็ก และตั้งแต่อายุ 20 วัน เป็นต้นไป สามารถให้อาหารที่อุดมด้วยไขมัน เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่ลำไส้ส่วนต้นมีประสิทธิภาพในการดูดซึมได้ดี อย่างไรก็ตาม เพื่อสามารถอธิบายถึงกลไกและประสิทธิภาพในการดูดซึมของท่อทางเดินอาหาร การศึกษาครั้งต่อไป ควรวิจัยเพิ่มเติมเกี่ยวกับการทำงานของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทำงานของเซลล์ในระบบย่อยอาหาร

เอกสารอ้างอิง

จินตมาศ สุวรรณจรัส 2533. การศึกษาเยื่อบุผนังลำไส้เล็กของปลาเก๋า ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบสแกนและวิธีทางฮีสโตเคมี วารสารสงขลานครินทร์ 12: 338-349

ศราวุธ เจะโส๊ะ สุวิมล สี่หิรัญ และ พรพนม พรหมแก้ว 2538 ชีววิทยาบางประการของปลาดุกลำพันรายงานสัมมนาประจำปี 2538 กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ หน้า 329-348

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

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 J. Sci. Technol.,19(1): 117-122.

Bisbal,G.A., Bengtson, D.A. 1996. Development of digestive tract in larvae summer flounder. J. Fish. Biol., 47: 227-291.

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

Bogut, I., Has-Schon, E. Cacic, M., Milakovic, Z., Novoselic, D. and Brkic, S. 2002. Linolenic acid supplementation in the diet of European catfish (*Silurus glanis*): effect on growth and fatty acid composition. J. Appl. Ichthyol., 18: 1-6.

Cuvier-Peres, A., Kestemont, P. 2002. Development of some digestive enzymes in Eurasian perch larvae *Perca fluviatilis*. Fish Physiol. and Biochem., 24: 279-285.

Domeneghini, C., Ponnelli, S.R. and Veggetti, A. 1998. Gut glycoconjugates in *Sparus aurata* L. (Pisces, Teleostei), a comparative histochemical study in larval and adult ages. Histol. Histopathol. 13: 359-372.

Ferraris R. P., Tan, J. D. and Der la Cruz, M. C. 1987. Development of digestive tract of milkfish, *Chanos chanos* (Forskal): Histology and histochemistry. Aquaculture, 61: 241-257.

Falk-Peterson, I.B. and Hansen, T. K. 2001 Organ differentiation in newly hatched common wolfish. J. Fish. Biol., 59: 1465-1482.

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

Gisbert, E., Sarasquete, M.C., Williot, P. and Castello-Orvay, F. 1999. Histochemistry of development of the digestive tract of Siberian sturgeon (*Acipensor baeri*) during early ontogeny. J. Fish. Biol., 55: 596-616.

Gisbert, E., Piedrahita, R. H. And Conklin, D.E. 2004. Ontogenic development of the digestive system in California halibut (*Paralichthus californicus*) with note on feeding particles. Aquaculture 232: 455-470.

Govoni, J. J., Boehlert, G. W. and Watanabe, Y. 1986. The physiology of digestion in fish larvae. Env. Biol. Fish., 16: 59-77.

Grau, A.,Cespo, S., Sarasquete, M.C. and Gonzalez de Canales, M. L. 1992. The digestive tract of the amberjack *Seriolata dumerii* , Risso: a light and scanning electron microscopy study. J. Fish. Biol. 41: 287-303.

Has-Schon, E., Bogut, I., Kralik, D. and Vukovic, B. 2004. Mutual influence of protein and lipid feed content on European catfish (*Silurus glanis*) growth. J. Appl. Ichthyol., 20: 92-98.

Kjorsvik, E., van der Meeren, T., Kryvi, H., Ainfinnos, J., Kuenseth, P. G., 1991. Early development of digestive tract of cod larvae, *Gadus morhua* L., during start-feeding and starvation. J. Fish. Biol., 38: 1- 15.

Kozaric, Z., Kuzir, S., Petrine, Z., Gjurcevic, E. and Bozic, M. 2008. The development of the digestive tract in larval European catfish *Silurus glanis* L. Anat. Histol. Embryol., 37: 141-146.

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

Osman, A.H.K. and Caceci, T. 1991. Histology of the stomach of *Tilapia nilotica* (Lineatus 1758) from the river Nile. J. Fish. Biol. 38: 221-223.

Ribeiro, L., Zambonino-Infante, J. L., Cahu, C. and Dinis, M. T. 1999. Development of digestive enzyme in larvae of *Solea senegalensis,* Kaup 1858. Aquaculture, 179: 465-473.

Sagiv, K., 2001. Digestive enzymes in fish larvae and juveniles-implications and application to formulated diets. Aquaculture, 200: 181-201.

Santos, E. A., Vinagre, A. S., 1991. Carbohydrate metabolism during embryonic and larval developmemt of *Odonthostes humensis* (DeBuer, 1953) (Pisces-Atherinidae), J. Fish. Biol., 39: 239-344.

Sarasquete, M., Polo, A. and Gonzalez De Canales, M. L., 1993. A histochemical and immunohistochemical study of digestive enzymes and hormones during the larval development of the seabream, *Sparus aurata* L. Histochem. J., 25(6): 430-437.

Sarasquete, M., 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(1): 79-92.

Senger, H., Rosch, R., Schmidt, H., and Von Poeppinghausen, K. J. 1989. Digestive enzymes in larval *Coregonus lavaretus* L., J. Fish. Biol., 35: 249-263.

Senger, H., Rosch, R. and Werrethand, U.W. 1993. Larval nutritional physiology: studies with *Claris gariepinus, Coregonus lavaretus* and *Scophthalmus maximus.* J. World Aquac. Soc., 24: 121-134.

Teresa, O. 2005. Developmental changes of digestive system structures in pike-perch (*Sander lucioperca* L.). E-J. Ichthyol., 2: 65-78.

William, J. A. and Nickol, B. B. 1989. Histological structure of intestine and pyloric caeca of the green sun fish, *Lepomis cyanellus* Rafinesque. J. Fish. Biol., 35: 359-372.

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.