



เนื้อเยื่อวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์ และฤดูวางไข่ของปลิงทะเลขาว

Holothuria scabra แถบภาคใต้ของประเทศไทยฝั่งอันดามัน

Histology and Chemical Compositions of Gonad, and Breeding Season of Sea

Cucumber *Holothuria scabra*, in the South of Thailand (Andaman Zone)

วิจิตรา ตุงษ์

Wijittra Tungse

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

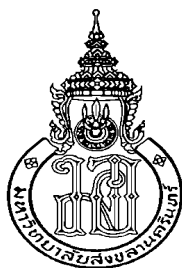
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Aquatic Science

Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์



เนื้อเยื่อวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์ และฤดูวางไข่ของปลิงทะเลขาว

Holothuria scabra แถบภาคใต้ของประเทศไทยฝั่งอันดามัน

Histology and Chemical Compositions of Gonad, and Breeding Season of Sea

Cucumber *Holothuria scabra*, in the South of Thailand (Andaman Zone)

วิจิตรา ตุงษ์

Wijittra Tungse

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of

Master of Science in Aquatic Science

Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ เนื้อเยื่อวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์ และฤดูวางไข่ของ
ปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra* แถบภาคใต้ของประเทศไทยฝั่งอันดามัน
ผู้เขียน นางสาววิจิตรา ตุ้งชี้
สาขาวิชา วาริชศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	คณะกรรมการสอบ
..... (ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที)ประธานกรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.ประภาพร อุทาร์พันธุ์)
.....กรรมการ (ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที)
.....กรรมการ (ศาสตราจารย์ ดร.นพ.บุญเสริม วิทย์ชำนานุกุล)
.....กรรมการ (รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิพร พรหมขุนทอง)
.....กรรมการ (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สถาพร ดิเรกบุษราคม)
..... (ดร.ดวงแขพิศา กาญจนโสภา)	
..... (ดร.นพแก้ว เจริญทิพากร)	

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอแสดงความขอบคุณ
บุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

ลงชื่อ.....

(ดร.ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาววิจิตรา ตุงษ์)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ

(นางสาววิจิตรา ตุงษ์)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	เนื้อเยื่อวิทยาและองค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์ และฤดูวางไข่ของปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i> แถบภาคใต้ของประเทศไทยฝั่งอันดามัน
ผู้เขียน	นางสาววิจิตรา ตุงซี
สาขาวิชา	วาริชศาสตร์
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อวิทยา การพัฒนา และองค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์ และฤดูวางไข่ ของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833) แถบภาคใต้ของประเทศไทยฝั่งอันดามัน เพื่อใช้เป็นความรู้พื้นฐานสำคัญในการเพาะเลี้ยงปลิงทะเลขาวและพัฒนาสูตรอาหารพ่อแม่พันธุ์ปลิงทะเลขาวในอนาคต การทดลองใช้พ่อแม่พันธุ์ปลิงทะเลขาวจากฝั่งอันดามัน บริเวณเกาะปู จ.กระบี่ น้ำหนัก 200-1,200 กรัม ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 โดยนำอวัยวะสืบพันธุ์มาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาและโครงสร้างระดับจุลภาค ระยะเวลาพัฒนาการ รอบของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ฤดูวางไข่ และองค์ประกอบทางเคมี พบว่า ปลิงทะเลขาวมีฤดูวางไข่ปีละครั้ง ในเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม ซึ่งมีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (G.S.I.) เฉลี่ยมากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน ในเพศผู้ $9.3 \pm 2.2\%$ และเพศเมีย $16.2 \pm 2.8\%$ ลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งของเพศผู้และเพศเมีย มีลักษณะท่อยาวเป็นแกนกลางและมีแขนงยื่นออกไปโดยรอบ ระยะเวลาพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์มี 5 ระยะ คือ 1) indeterminate stage 2) growing stage 3) mature stage 4) partly spawned stage และ 5) spent stage พัฒนาการของเซลล์ไข่แบ่งเป็น 5 ระยะ คือ 1) oogonia 2) previtellogenic oocyte 3) early vitellogenic oocyte 4) mid vitellogenic oocyte และ 5) late vitellogenic oocyte พัฒนาการของอสุจิแบ่งเป็น 5 ระยะ คือ 1) spermatogonia 2) primary spermatocyte 3) secondary spermatocyte 4) spermatid และ 5) spermatozoa พบว่าการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในแต่ละครั้งใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ สำหรับองค์ประกอบทางเคมี โดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย พบว่าในระยะแรกของการพัฒนาการ ได้แก่ indeterminate stage และ growing stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมาก ในระยะ mature stage มีปริมาณไขมันรวมและโปรตีนรวมมากที่สุด และระยะ spent stage มีคาร์โบไฮเดรต ไขมันรวมและโปรตีนรวมน้อยที่สุด ทั้งในเพศผู้และเพศเมียมีกรดอะมิโน Glutamic acid มากที่สุด และกรดไขมันที่พบมากคือ Cis-5, 8, 11, 14-Eicasatetraenic acid C20:4 n-6 (ARA), Cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic acid C20:5 n-3 (EPA), Stearic acid C18:0 และ Palmitic acid C16:0

Thesis Title	Histology and Chemical Compositions of Gonad, and Breeding Season of Sea Cucumber <i>Holothuria scabra</i> , in the South of Thailand (Andaman Zone)
Author	Ms. Wijitra Tungse
Major	Aquatic Science
Academic Year	2013

Abstract

The aims of this research were studying of gonad development, seasonal breeding, and gonad chemical compositions of sea cucumber *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833) in the south of Thailand (Andaman zone), for providing the basic knowledge in sea cucumber culture and sea cucumber broodstock feed mill in the future. In January to December 2012, sea cucumber *H. scabra* weight of 200-1,200 gram from Andaman sea (Poo island, Krabi province) were collected. Their gonads were removed for histological, ultrastructural, gonado-somatic index (G.S.I.) and chemical composition study. The results showed that *H. scabra* has annual spawning pattern, from October to December. An average Gonado-somatic index was highest in November ($9.3 \pm 2.2\%$ in male and $16.2 \pm 2.8\%$ in female). Gonad of both male and female *H. scabra* showed a central long tubule that extended many branches around. Gonad development was divided into 5 stages; 1) indeterminate stage 2) growing stage 3) mature stage 4) partly spawned stage and 5) spent stage. Oogenesis was divided into 5 stages; 1) oogonia 2) previtellogenic oocyte 3) early vitellogenic oocyte 4) mid vitellogenic oocyte and 5) late vitellogenic oocyte. Spermatogenesis was divided into 5 stages; 1) spermatogonia 2) primary spermatocyte 3) secondary spermatocyte 4) spermatid and 5) spermatozoa. Spawning cycle was taken place in every 2 weeks. Chemical composition of male and female gonad showed high amount of carbohydrate in Indeterminate stage and Growing stage, highest amount of fat crude and protein crude in Mature stage, and lowest amount of carbohydrate, fat crude and protein crude in Spent stage. Glutamic acid was highest amount amino acid in both male and female. Cis-5, 8, 11, 14-Eicasatetraenic acid C20:4 n-6 (ARA), Cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic acid C20:5 n-3 (EPA), Stearic acid C18:0 and Palmitic acid C16:0 were high amount fatty acid of both male and female.

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ ดร. กัททิตรา พงษ์ทิพย์พาที ประธานกรรมการที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ และ ศ.ดร.นพ. บุญเสริม วิทยชานาญกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษา ช่วยเหลือ และ สนับสนุนในการค้นคว้าวิจัย รวมทั้งได้ให้ความเมตตา ให้โอกาสแก่ข้าพเจ้าได้ทำงานวิจัยเรื่องนี้ จนกระทั่งสำเร็จการศึกษาในระดับปริญญาโท ตลอดจนอบรม สั่งสอน การใช้ชีวิตในสังคม และ ตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ จนกระทั่งวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และ ขอขอบพระคุณ รศ.ดร. วุฒิพร พรหมขุนทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้ คำปรึกษา ช่วยเหลือ และสนับสนุนในการค้นคว้าวิจัยจนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และ ขอขอบพระคุณนายสำราญ ระเด่น กำนันตำบลเกาะศรีบอยา ที่กรุณาให้ปลิงทะเล เพื่อทำการวิจัยใน ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่อุดหนุนทุนวิจัย และงานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจากสถานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ทุก ท่านที่ให้ความกรุณาสั่งสอนให้ความรู้แก่ข้าพเจ้า และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาสาย พันธุ์กุ้ง (ศวพก.) อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี ศูนย์วิทยาศาสตร์และเครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี และศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ กิจการ สุขุมาศัย ที่ ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ นักศึกษา ปริญญาโท ที่ไม่ได้กล่าวชื่อนาม ซึ่งทุกคนคอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้การวิจัยครั้งนี้จน สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ รวมทั้งขอขอบคุณ ญาติพี่น้องของ ข้าพเจ้า ที่คอยเป็นกำลังใจและคอยให้ความช่วยเหลืออย่างดียิ่งในยามทุกข์ และอยู่เคียงข้างข้าพเจ้า มาโดยตลอด จนทำให้ข้าพเจ้าประสบความสำเร็จในการศึกษาระดับวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตใน ครั้งนี้

วิจิตรา ตุงชี้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(6)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบัญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(12)
บทที่ 1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
วัตถุประสงค์	2
ตรวจเอกสาร	3
1. อนุกรมวิธานของปลิงทะเลขาว (<i>H. scabra</i>)	3
2. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับปลิงทะเล	4
2.1 ประวัติศาสตร์เกี่ยวกับการประมงของปลิงทะเล	4
2.2 แหล่งที่อยู่อาศัยของปลิงทะเล	5
3. วงจรชีวิตของปลิงทะเล	6
4. ลักษณะชีววิทยาโดยทั่วไปของปลิงทะเล	8
5. อวัยวะสืบพันธุ์ ของปลิงทะเล	14
5.1 <i>Holothuria scabra</i>	14
5.2 <i>Holothuria atra</i>	17
6. ดัชนีความสมบูรณ์เพศและขนาดของ tubule (Gonad index and tubule size) ใน <i>H. scabra</i> แถบหมู่เกาะโซโลมอน (Solomon Islands)	21
7. วงจรการสืบพันธุ์ (Reproductive cycle) ของ <i>H. scabra</i>	23
8. องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลิงทะเล	23
9. องค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์สัมพันธ์กับการสร้างสูตรอาหาร	29
บทที่ 2. วิธีการวิจัย	
วิธีการดำเนินการ	
1. การเก็บตัวอย่าง	32

สารบัญ (ต่อ)

เรื่อง	หน้า
2. ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์และผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	35
3. ศึกษาฤดูวางไข่	36
4. ศึกษาขอบของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในฤดูวางไข่	37
5. การแยกเพศปลิงทะเลขาวด้วยลายเส้นบนลำตัว	41
6. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition) ของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว	41
6.1 การเตรียมการสกัด	41
6.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition)	42
7. การวิเคราะห์กรดอะมิโนและกรดไขมัน	45
บทที่ 3. ผลการทดลอง	
1. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว <i>H. scabra</i> แถบภาคใต้ของประเทศไทย ฝั่งอันดามัน	46
1.1 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ในแต่ละระยะพัฒนาการ	46
1.2 เนื้อเยื่อวิทยาของอวัยวะและเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้	53
1.3 เนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย	66
2. ฤดูวางไข่ของปลิงทะเลขาว <i>H. scabra</i> แถบภาคใต้ของประเทศไทยฝั่งอันดามัน	77
3. ขอบของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในฤดูวางไข่	81
4. การแยกเพศปลิงทะเลขาวด้วยลายเส้นบนลำตัว	86
5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition) ของอวัยวะสืบพันธุ์ ปลิงทะเลขาว	91
6. กรดอะมิโนและกรดไขมันในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาว	98
บทที่ 4. บทวิจารณ์	102
บทที่ 5. สรุป	110
เอกสารอ้างอิง	111
ภาคผนวก	117

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผู้ค้นพบปลิงทะเลชนิดต่าง ๆ	3
2. วงจรชีวิตของปลิงทะเล <i>Holothuria scabra</i>	7
3. วงจรการสืบพันธุ์ของ <i>Holothuria scabra</i> กับ โครงสร้างของ gonad tubules	15
4. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition) ของปลิงทะเล	25
5. กรดอะมิโนในปลิง <i>Acaudina molpadioides</i> และ <i>Thelenota ananas</i>	25
6. ปริมาณกรดอะมิโนไม่จำเป็น และกรดอะมิโนจำเป็นของปลิงทะเล 7 ชนิด (เปอร์เซ็นต์)	26
7. แร่ธาตุต่าง ๆ ที่มีอยู่ในปลิงทะเล 7 ชนิด (ppm)	27
8. วิตามิน (ppht) ซาโปนิน (ppt) และ polysaccharides (ppht) ในปลิงทะเล <i>Acaudina molpadioides</i> และ <i>Thelenota ananas</i>	28
9. องค์ประกอบกรดไขมัน (%น้ำหนัก; Mean \pm SD, n=5) จากปลิงทะเลสดและแห้ง ชนิด <i>Cucumaria frondosa</i>	28
10. ส่วนประกอบของสูตรอาหารที่จัดทำขึ้นให้กับหอยเม่น <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	30
11. Gonadosomatic index ของหอยเม่น <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i> ที่ได้รับอาหารสูตรพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์	30
12. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition) ของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเม่น <i>Strongylocentrotus droebachiensis</i>	31
13. ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาวแบ่งตามระยะพัฒนาการ	48
14. แสดงจำนวนปลิงทะเลขาว (ตัว) เพศผู้และเพศเมียที่เก็บได้ในแต่ละเดือน	77
15. แสดงวันที่ปลิงทะเลขาวปล่อยเซลล์สืบพันธุ์จากการกระตุ้น ในระยะเวลา 1 ปี	85
16. แสดงช่วงเวลาในการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาวในฤดูวางไข่	85
17. แสดงเพศ ระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ น้ำหนักตัว ความยาว จำนวนเส้นแนวขวางที่ปรากฏบนลำตัว และระยะห่างระหว่างเส้นเฉลี่ย ของปลิงทะเลขาว	87
18. จำนวนเส้นแนวขวางบนผิวลำตัวปลิงทะเลขาว	90
19. ระยะห่างระหว่างเส้นแนวขวางบนผิวลำตัวปลิงทะเลขาว	91
20. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i> เพศผู้(%น้ำหนักเปียก)	93

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
21. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i> เพศผู้ (%น้ำหนักแห้ง)	93
22. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i> เพศเมีย (%น้ำหนักเปียก)	94
23. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i> เพศเมีย (%น้ำหนักแห้ง)	94
24. กรดอะมิโนในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i>	99
25. กรดไขมันในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i>	100
26. การสืบพันธุ์และฤดูกาลวางไข่ของ <i>Holothuria scabra</i>	105
1. ภาคผนวก ก ปลิงทะเลที่สามารถรับประทานได้ 52 ชนิด	118
1. ภาคผนวก ค การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคสความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ความยาวคลื่น 490 nm	122
1. ภาคผนวก ง การเตรียมอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเล stock solution ในแต่ละระยะพัฒนาการ ที่ความเข้มข้นต่างๆ	125
2. ภาคผนวก ง OD ₄₉₀ ของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเล stock solution ในแต่ละระยะพัฒนาการ	125
3. ภาคผนวก ง OD ₄₉₀ ของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเล stock solution ในแต่ละระยะพัฒนาการ และปริมาณน้ำตาล (µg/ml)	126
4. ภาคผนวก ง OD ₄₉₀ ของกล้ามเนื้อผนังลำตัวปลิงทะเล stock solution ในแต่ละระยะพัฒนาการและปริมาณน้ำตาล (µg/ml)	128

รายการภาพประกอบ

รูปที่	หน้า
1. วงจรชีวิตของปลิงทะเล	7
2. ภาพ light microscope แสดงตัวอ่อนปลิงทะเล <i>Holothuria scabra</i> ที่ระยะต่างๆ	8
3. ลักษณะทั่วไปของปลิงทะเล	9
4. ลักษณะหนวดของปลิงทะเล: A, หนวดแบบจาน (peltate); B, หนวดแบบขนนก (pinnate); C, หนวดแบบกิ่งไม้ (dendritic); D, หนวดแบบนี้มีมือ (digitate)	10
5. ลักษณะสปีคูลของปลิงทะเล	10
6. ลักษณะแผ่นวงแหวนหินปูนของปลิงทะเล: A, Holothuriidae; B, Cucumariidae; C, D Phyllophoridae; E, Stichopodidae และ F, Synaptidae	11
7. ลักษณะเรสไพราทอรีทรี (respiratory tree) ของปลิงทะเล	13
8. แสดง Oogenesis ของ <i>Holothuria scabra</i>	19
9. แสดง Spermatogenesis ของ <i>Holothuria scabra</i>	20
10. แสดงลักษณะของ gonad ที่มองเห็นด้วยตาเปล่าของ <i>Holothuria atra</i>	21
11. <i>H. scabra</i> ที่รวบรวมจาก Kong Halangi Bay, Solomon Islands เป็นเวลา 3 ปี (1996-1998) (เพศเมีย, วงกลมสีดำ; เพศผู้, วงกลมสีขาว)	22
12. ระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเล <i>H. scabra</i> ในแถบ Solomon Islands ในระยะเวลา 3 ปี (1996-1998) A: เพศเมีย และ B: เพศผู้	23
13. Electron micrograph ของ body wall ของปลิงทะเลแสดง collagen fibrils และ microfibrils (ครีซี) (A) โครงสร้างของ major sulfated polysaccharides ที่สกัดจากเนื้อเยื่อซึ่งเป็น fucosylated chondroitin sulfate (B) และ โครงสร้างของ sulfated fucan (C)	29
14. ชั่งน้ำหนักปลิงทะเลขาวเป็นรายตัว	33
15. การขนส่งปลิงทะเลขาว	33
16. บ่อพักน้ำที่เป็นบ่อดินที่ สวพท. ขนาด 12x20x3 เมตรปูด้วยพลาสติก	34
17. กระชังเลี้ยงปลิงทะเลขาวขนาด 1x1x0.5 เมตร ตาอวนกว้างประมาณ 2 เซนติเมตร	34
18. ภายในกระชังเลี้ยงปลิงทะเลขาวมีทรายหรือโคลนปนทรายรวมทั้งสาหร่าย <i>gracillaria</i> sp.	35
19. การชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นตอนที่ 1 โดยการใช้วิธีทำให้แห้ง (dry treatment)	38
20. การชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นตอนที่ 2 โดยการใช้ความดันน้ำ (water pressure)	38
21. การชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นตอนที่ 3 โดยการใช้ความเย็น (cold shock)	39
22. การชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นตอนที่ 4 โดยการใช้ความร้อน (thermal stimulation)	39

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
23. การชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ขึ้นตอนที่ 5 โดยการใช้อาหาร (food stimulants) ด้วยการเติมสาหร่ายแห้ง Spirulina ที่ อัตรา 30 กรัม ต่อน้ำทะเล 300-500 ลิตร	40
24. ถังวางไข่ของปลิงทะเลขาวที่คลุมให้มีดสนิท	40
25. รูปร่างของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว <i>H. scabra</i> ในระยะ Indeterminate stage (1), Growing stage (2), Mature stage (3), Partly spawned stage (4) และ Spent stage (5)	46
26. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว ระยะ Indeterminate stage เมื่อดูด้วยตาเปล่า มีสีเหลืองผสมน้ำตาล (ก) และสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (ข)	49
27. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว ระยะ Growing stage เมื่อมองด้วยตาเปล่า ผนังท่ออวัยวะสืบพันธุ์ tubules มีเม็ดโป่งพองเป็นระยะ (สรชี้) (ก) และเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะทึบแสง เห็นเม็ดโป่งพองได้ชัดเจน (ลูกสร) (ข) สำหรับรังไข่มีสีส้มอ่อน tubules มีลักษณะโปร่งแสงกว่าอวัยวะ (ค) และเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เห็นเซลล์ไข่ออกภายใน (สรชี้) (ง)	49
28. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว ระยะ Mature stage	50
29. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว ระยะ Partly spawned stage	51
30. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว ระยะ Spent stage	52
31. ผนังของอวัยวะประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น คือ peritoneal epithelium (PE) เป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกสุดมีฐานเป็น basal laminar (BL) เชื่อมติดกับชั้นที่สอง คือ connective tissue (CT) ภายในมี collagen fiber (สรชี้) และ germinal epithelium (GE) เป็นเนื้อเยื่อชั้นในสุด ติดกับ testicular lumen (TL) แสดงด้วย LM (ก) และ TEM (ข) spermatogonia (SG); spermatocyte (SC)	56
32. Light microscope ของ spermatogenesis ซึ่งพบเซลล์อสุจิในระยะ spermatogonia (SG), spermatocyte (SC), spermatid (ST) และ spermatozoa (SZ) (รูปเล็ก)	56
33. Spermatogonia (SG) วางอยู่บน basal laminar (BL) (ก) ภายในนิวเคลียส (N) มีกลุ่มของเส้นใยโครมาติน (heterochromatin; H) กระจายทั่วทั้งนิวเคลียส มองเห็นเป็นกลุ่มๆ ภายในไซโทพลาซึมพบไมโทคอนเดรีย (M) และ dense granules (สรชี้) (ข)	57

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
34. Primary spermatocyte พบ heterochromatin (H) กลุ่มใหญ่ๆ บริเวณกลางนิวเคลียสและด้านข้างติดกับเยื่อหุ้มนิวเคลียส ภายในซัยโทพลาสซึมพบ mitochondria (สรชี้) จำนวนมาก dense granules (หัวลูกศร) หนาแน่นขึ้น พบ membrane-bounded proacrosomal granules (MG) และพบ electron lucent vesicles (EV)	57
35. TEM ของ spermatid เป็นเซลล์กลม บนนิวเคลียส (N) ด้านหนึ่งของเซลล์มี acrosome (หัวลูกศร) ซึ่งวางตัวอยู่บน subacrosome (สรชี้) และพบว่าซัยโทพลาสซึม (CT) มีปริมาณมากที่ด้านหนึ่งของเซลล์ มี centriole (C) อยู่ภายใน (ก และ ข)	58
36. TEM ของ immature spermatozoa ภายในนิวเคลียส (N) ของเซลล์มีการกระจายตัวของ heterochromatin (หัวลูกศร) คล้ายๆ spermatid และพบว่า acrosomal region มีขนาดใหญ่ขึ้น ประกอบด้วย acrosome (A) และ subacrosome (SA) อีกด้านหนึ่งของเซลล์ที่เป็นซัยโทพลาสซึม (CT) มีการจัดตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม พบ centriole (สรชี้) อยู่ภายใน	58
37. TEM ของ mature spermatozoa แสดงส่วนหัวและคอ	59
38. TEM ของ mature spermatozoa ประกอบด้วยส่วนหัว คอ และหาง บริเวณส่วนหัวประกอบด้วยนิวเคลียส (N) ที่มี heterochromatin fiber เบียดตัวหนาแน่น และบริเวณหน้าสุดของส่วนหัวมี acrosome (A) และ subacrosome (สรชี้) ส่วนคอมี mitochondria (M) ขนาดใหญ่ (ก และ ข) ส่วนหางประกอบด้วยแกนที่เป็น axonemal microtubules (หัวลูกศร) ต่อมาจาก centriole (C) (ค และ ง)	60
39. อัณฑะของปลิงทะเลขาวในระยะ Indeterminate stage	61
40. อัณฑะของปลิงทะเลขาวในระยะ Growing stage	62
41. อัณฑะของปลิงทะเลขาวในระยะ Mature stage ไม่พบ germinal epithelium ที่ยื่นเข้ามาใน lumen (ก) ภายใน lumen เต็มไปด้วยเซลล์ spermatozoa (SZ) (ข และ ค) บริเวณ germinal epithelium ที่ผนังของ tubule ไม่พบเซลล์ spermatogonia (ง)	63
42. อัณฑะของปลิงทะเลขาวในระยะ Partly spawned stage	64
43. อัณฑะของปลิงทะเลขาวในระยะ Spent stage	65

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
44. ผนังรังไข่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ได้แก่ peritoneal epithelium (PE) เป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกสุดวางตัวอยู่บน basal laminar (ครีซ) ถัดมาคือ connective tissue (CT) เป็นเนื้อเยื่อชั้นกลาง และ germinal epithelium (GE) เป็นเนื้อเยื่อชั้นในสุด พบเซลล์ไข่ (oocyte; OO) และมีเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ไข่ (oogonia; หัวลูกศร) วางตัวอยู่บน basal laminar	67
45. ผนังของรังไข่เมื่อคู่ด้วยกลีองจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีเนื้อเยื่อ 3 ชั้น คือ peritoneum (PE) วางตัวอยู่บน basal laminar (BL), connective tissue (CT) และ germinal epithelium (GE) โดยชั้นล่างลงมาจะพบเซลล์ไข่ (OO) ล้อมรอบด้วย follicle (หัวลูกศร) อยู่ใน ovarian lumen (OL) (ก) และ connective tissue ประกอบด้วย collagen fiber (FB), hemal fluid (HF) อยู่ใน hemal space (HS) ของ hemal sinus (ข. และ ค.) และพบเซลล์ fibroblast (F) ในชั้น connective tissue (ง.)	68
46. รังไข่ระยะ indeterminate stage หรือ recovery stage (ก) พบเซลล์ไข่ในระยะ previtellogenic oocyte (ครีซ) ขนาดน้อยกว่า 20 μm วางตัวเรียงอยู่บน germinal epithelium (หัวลูกศร) (ข)	69
47. รังไข่ระยะ Growing stage (ก) พบเซลล์ไข่ในระยะ early vitellogenic oocyte (EO) และ mid vitellogenic oocyte (MO) ขนาด 20-40 μm และ 40-90 μm ตามลำดับ โดยเซลล์ไข่ระยะ mid vitellogenic oocyte เริ่มสร้าง follicle (ครีซ) (ข)	69
48. รังไข่ระยะ Mature stage พบเซลล์ไข่ปริมาณมากเต็ม tubule (ก) เป็นเซลล์ไข่ในระยะ late vitellogenic oocyte (LO) ขนาด 100-170 μm เห็น follicle รอบเซลล์ไข่ชัดเจน (ครีซ) มี germinal vesicle (GV) กลางเซลล์ และ นิวคลีโอลัส (หัวลูกศร) ใน germinal vesicle (ข และ ค) ovarian lumen (OL) ระหว่าง follicle ในระยะนี้ จะมีช่องแคบลง บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ไข่โดยรอบพบ microvilli (MV) ยื่นขึ้นมา (ง) บางครั้งพบว่ามี petaloid amoebocyte (PA) แทรกอยู่ (จ) และ เซลล์ไข่จะยึดติดกับ follicle โดยเนื้อเยื่อบางๆ เรียกว่า protuberance (PR) (ฉ)	70
49. รังไข่ระยะ Partly spawned stage ภายใน tubule มีช่องว่างมากขึ้น ปริมาณไข่ลดลง (ก) follicle เริ่มสลาย (ครีซ) (ข และ ค) มีการสร้างเซลล์ไข่ระยะ previtellogenic oocyte ขึ้นใหม่ที่บริเวณ germinal epithelium (หัวลูกศร) (ก และ ข) บางบริเวณพบเซลล์ไข่ที่กำลังสลายตัว (DO, degenerated oocyte) (ค)	71

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
50. ไข่ระยะ Spent stage ภายใน tubule มีช่องว่างมากขึ้นผนัง tubule ของรังไข่ เกี่ยวย่นมี รอยพับ (ครีซี) (ก) มีการสร้างเซลล์ไข่ระยะ previtellogenic oocyte และ vitellogenic oocyte ขึ้นใหม่ที่บริเวณ germinal epithelium (หัวลูกศร) (ข) ไม่พบ follicle รอบเซลล์ไข่ (ข และ ค) บางบริเวณพบเซลล์ไข่ที่กำลังสลายตัว (DO, degenerated oocyte) (ค)	72
51. TEM แสดง oogonia (O) วางอยู่บน basal laminar (BL) ของ germinal epithelium ภายใน ซัยโตพลาซึมพบ mitochondria (ครีซี) ปริมาณมากอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และมีโครงสร้าง ที่เรียกว่า electron-dense body (หัวลูกศร)	74
52. TEM แสดง early vitellogenic oocyte มีเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ (หัวลูกศร) หนา microvilli (ครีซี) ขึ้นขึ้นมาลักษณะคล้ายนิ้วมือ เนื่องจาก microvilli มีเยื่อหุ้มบางๆ ล้อมรอบไข่เรียกว่า vitelline envelope (VE) ในซัยโตพลาซึมพบ loose granule (L), dense granule (D) และ เริ่มพบ yolk granule (Y) (ก และ ข)	74
53. TEM ของ late vitellogenic oocyte แสดงเยื่อหุ้มเซลล์ (PM) มีความหนาเพิ่มขึ้น microvilli (MV) มีลักษณะห่อและยาวขึ้น ในซัยโตพลาซึมพบ yolk granule (Y) ปริมาณมาก ยังคง พบ loose granule (L) และ dense granule (ครีซี) และมี jelly space (JS) บรรจุโครงสร้างที่มี รูปทรงไม่แน่นอนกระจายอยู่ (ก และ ข) รอบเซลล์ไข่ (OO) ถัดจาก jelly space มีชั้น follicle ซึ่งประกอบด้วย follicular cell (หัวลูกศร) มีลักษณะเรียวยาวแผ่ซัยโตพลาซึมหุ้มรอบเซลล์ไข่ และมีด้านหนึ่งของเซลล์ไข่ถูกยึดไว้กับ follicle ด้วย protuberance (PR) (ก และ ง)	75
54. ในนิวเคลียสของ Late vitellogenic oocyte พบ nucleolus (N หรือ หัวลูกศร) ชัดเจน มีเยื่อหุมนิวเคลียสที่เรียกว่า germinal vesicle (GV) สมบูรณ์ (ก และ ข)	76
55. ภายใน jelly space (JS) ของ Late vitellogenic oocyte พบ โครงสร้างเป็นแท่งหลายแท่งยื่น ตั้งฉากมาจาก follicle (F) (follicular stick; FS)	76
56. สัดส่วนในแต่ละระยะพัฒนาการของอณฑะในรอบปีของปลิงทะเลขาวเพศผู้	79
57. สัดส่วนในแต่ละระยะพัฒนาการของรังไข่ในรอบปีของปลิงทะเลขาวเพศเมีย	79
58. ร้อยละของปลิงทะเลขาวในระยะเจริญพันธุ์ (mature stage) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ในรอบปี	80
59. ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index; G.S.I.) เฉลี่ย ของปลิงทะเลขาว เปรียบ เทียบระหว่างเดือนต่างๆ ในรอบปี	80
60. พฤติกรรมของปลิงทะเลขาวก่อนที่จะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์	82

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่	หน้า
61. ปลิงทะเลขาวเพศผู้ปล่อยเซลล์อสุจิเป็นสายสีขาวครีม	83
62. รูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonophores) มีลักษณะ โป่งพอง (ศรชี้)	83
63. ปลิงทะเลขาวเพศเมียปล่อยไข่สีส้มอ่อน	84
64. ปลิงทะเลขาวที่มีความเครียด มีรอยเปื้อยสีขาวที่ผิวหนัง	84
65. แสดงลายเส้นของปลิงทะเลขาว (ศรชี้)	86
66. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวลำตัวของปลิงทะเลขาวและจำนวนเส้นบนลายตัว	89
67. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวลำตัวของปลิงทะเลขาวและจำนวนเส้นบนลายตัว แยกเปรียบเทียบภายในเพศผู้และเพศเมีย	89
68. เพอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตในอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะของปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i>	95
69. เพอร์เซ็นต์ไขมันรวมในอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะของปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i>	95
70. เพอร์เซ็นต์โปรตีนรวมในอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะของปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i>	96
71. เพอร์เซ็นต์ความชื้นในอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะของปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i>	96
72. เพอร์เซ็นต์เถ้าในอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะของปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i>	97
73. เพอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตในกล้ามเนื้อปลิงทะเลขาว <i>Holothuria scabra</i> แต่ละระยะของ พัฒนาการอวัยวะสืบพันธุ์	97
1. ภาคผนวก ค กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส	123

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปลิงทะเล (sea cucumber) เป็นทรัพยากรสัตว์น้ำเค็มชนิดหนึ่ง ซึ่งมีคุณค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างยิ่ง เป็นที่นิยมบริโภค โดยเฉพาะในหมู่ชาวจีน เกาหลี และญี่ปุ่น (Chen, 2004) ปลิงทะเลเป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในไฟลัม Echinodermata และคลาส Holothuroidea (Agudo, 2006) พบว่าปลิงทะเลที่สามารถนำมาทำเป็นอาหารได้มีทั้งหมด 52 ชนิด แทบทั้งหมดเป็นชนิดที่อยู่ในเขตร้อนและใกล้เขตร้อนซึ่งประกอบด้วยปลิงทะเลที่มาจากแฟมิลี Holothuriidae และ Stichopodidae ซึ่งได้แก่ Holothuria, Actinopyga, Bohadschia และ Stichopus (Choo, 2008) มีการพบว่าปลิงทะเลมีสารอาหารบางอย่างที่ทำให้สุขภาพแข็งแรงและรักษาโรคด้วย เช่น สาร philinopside A ที่ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดหลอดเลือดของเซลล์มะเร็ง คือเป็น anti-angiogenic substance และเป็น tyrosine kinase inhibitor ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ (Tong *et al.*, 2005) ในการแปรรูปได้มีการนำปลิงทะเลสดมาผ่านกระบวนการทำแห้ง ที่เรียกว่า “trepang” หรือ “beche-de-mer” ส่งเป็นสินค้าส่งออกและสินค้านำเข้าที่สำคัญของหลายๆ ประเทศ (Choo, 2008)

เนื่องจากในปัจจุบันพบว่าประชากรโลกมีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้มีความต้องการทางด้านอาหารและยาเพื่อบริโภคและรักษาโรคเพิ่มสูงตามไปด้วย สำหรับปลิงทะเลได้มีการทำการประมงแบบ overfishing (การทำประมงแบบเกินกำลังผลิต) ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาสำคัญคือทรัพยากรปลิงทะเลได้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*, sandfish) ซึ่งเป็นชนิดที่มีราคาแพงและเป็นที่ต้องการของตลาดได้ถูกสกัดกั้นจับเพื่อนำไปขาย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการส่งเสริมการทำประมงปลิงทะเลอย่างยั่งยืนโดยการเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นหนทางหนึ่งที่สามารถขยายพันธุ์ อนุรักษ์ และป้องกันการสูญพันธุ์ของปลิงทะเล และยังเป็นการส่งเสริมระบบนิเวศในทะเลให้มีสภาพที่สมดุลอีกด้วยเนื่องจากปลิงทะเลกินอาหารที่เป็นซากแพลงก์ตอนที่ตายสามารถกำจัดของเสียบริเวณพื้นทรายได้ นอกจากนี้จะเป็นการจัดการทรัพยากรอย่างยั่งยืนแล้ว การเพาะเลี้ยงปลิงทะเลยังสามารถช่วยพัฒนาเศรษฐกิจจากการเพิ่มรายได้ให้กับประชากรได้อีกทางหนึ่ง พบว่าการทำประมงและซื้อขายเชิงพาณิชย์ของปลิงทะเลในแถบเอเชียมีมากที่สุดในโลก โดยเฉพาะบริเวณเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และเอเชียใต้ ซึ่งประกอบด้วย ประเทศ อินโดนีเซีย มาเลเซีย ไทย พม่า เวียดนาม ฟิลิปปินส์ สิงคโปร์ ญี่ปุ่น เกาหลีเหนือ เกาหลีใต้

ฮ่องกง จีน และไต้หวัน โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงปลิงทะเลมากในประเทศจีน ส่วนใหญ่เป็นชนิด *Apostichopus japonicas* (Lovatelli *et al.*, 2004) และพบว่าปลิงทะเลชนิด *H. scabra* และ *Holothuria atra* (ปลิงทะเลดำ) เป็นปลิงทะเลที่มีมูลค่าสูงและพบได้ตามชายฝั่งของประเทศไทย แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันกลับพบว่าปลิงทะเล *H. scabra* เกือบหมดสิ้นไปจากอ่าวไทยแล้ว (Khruthram, 2006) ดังนั้นการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์ปลิงทะเล *H. scabra* เป็นสิ่งสำคัญอย่างเร่งด่วนเพื่อนำปลิงทะเลชนิดนี้กลับคืนสู่อ่าวไทยเพื่อช่วยฟื้นฟูระบบนิเวศ และเพิ่มรายได้ให้กับประชากรด้วย

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำโดยทั่วไปต้องมีการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติ นำมาผสมพันธุ์ เพาะเลี้ยง และปรับปรุงพันธุ์ เพื่อให้ได้ลูกพันธุ์ที่ดี และอีกส่วนหนึ่งการให้อาหารเพื่อส่งเสริมการเจริญเติบโตให้มีระบบสืบพันธุ์ที่ดี สามารถให้ลูกพันธุ์ที่แข็งแรง ปริมาณมาก และอัตราการรอดสูง ก็เป็นสิ่งที่สำคัญ การเพาะเลี้ยงปลิงทะเลก็เช่นกัน เนื่องจากปลิงทะเล *H. scabra* เป็นปลิงชนิดที่ยังไม่มีการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยมาก่อน (นอกจากที่ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง ประจวบคีรีขันธ์ ต.คลองวาฬ อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ ซึ่งก็ประสบปัญหาอัตราการรอดต่ำ ไม่ได้เผยแพร่เพื่อการประกอบเป็นอาชีพและเพาะเลี้ยงเชิงพาณิชย์ ในปัจจุบันได้หยุดทำการเพาะเลี้ยงไปแล้ว) สาเหตุหนึ่งเนื่องมาจากยังขาดความรู้พื้นฐานเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ของปลิงทะเลชาว *H. scabra* ในแถบฝั่งทะเลของประเทศไทย ทำให้การเพาะเลี้ยงปลิงทะเลชาว *H. scabra* ในประเทศไทยยังไม่สามารถเกิดขึ้นได้ แต่อย่างไรก็ดีในปัจจุบันด้วยความร่วมมือระหว่างศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง (ศวพก.) อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้มีการเพาะเลี้ยงปลิงทะเลชาว *H. scabra* ขึ้นที่ ศวพก. มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาให้เป็นอาชีพใหม่สำหรับเกษตรกร และขยายพันธุ์เพื่อปล่อยกลับคืนสู่ท้องทะเล

งานวิจัยเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ของปลิงทะเลชาว *H. scabra* ในแถบฝั่งทะเลของประเทศไทยนับว่าเป็นสิ่งสำคัญ เพราะจะเป็นข้อมูลสำหรับการเพาะพันธุ์และขยายพันธุ์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้ความรู้พื้นฐานขององค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์ในระยะเจริญพันธุ์ยังทำให้สามารถพัฒนาสูตรอาหารสำหรับการเลี้ยงปลิงทะเลชาวโดยเฉพาะสูตรอาหารสำหรับพ่อแม่พันธุ์เพื่อการเพาะเลี้ยงได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลชาว *H. scabra* จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา และ โครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure)

2. เพื่อศึกษาความงาไขและดัชนีความสมบูรณ์เพศในแต่ละระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว *H. scabra*
3. เพื่อศึกษารอบของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว *H. scabra*
4. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ กรดอะมิโน และกรดไขมันของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว *H. scabra* โดยเปรียบเทียบในแต่ละเพศ

การตรวจเอกสาร

1. อนุกรมวิธานของปลิงทะเลขาว (*H. scabra*)

ลำดับอนุกรมวิธานของปลิงทะเลขาว (Agudo, 2006) และผู้ค้นพบปลิงทะเลชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1 (Lovatelli *et al.*, 2004)

Phylum Echinodermata

Class Holothuroidea (with tube feet)

Order Aspidochirotida (with tentacles peltate)

Family Holothuriidae (with body usually circular and gonads single)

Genus *Holothuria* (*Metriatyla*) Rowe, 1969

Holothuria (*Metriatyla*) *scabra* Jaeger, 1833

ตารางที่ 1. ผู้ค้นพบปลิงทะเลชนิดต่าง ๆ

Sea cucumber	References
<i>Actinopyga echinites</i>	Jaeger, 1833
<i>Actinopyga lecanora</i>	Jaeger, 1833
<i>Actinopyga mauritiana</i>	Quoy and Gaimard, 1833
<i>Actinopyga miliaris</i>	Quoy and Gaimard, 1833
<i>Bohadschia marmorata</i>	Jaeger, 1833
<i>Bohadschia subrubra</i>	Quoy and Gaimard, 1833
<i>Bohadschia tenuissima</i>	Semper, 1868
<i>Bohadschia vitiensis</i>	Semper, 1867
<i>Holothuria scabra</i>	Jaeger, 1833
<i>Holothuria scabra versicolor</i>	Conand, 1986
<i>Holothuria atra</i>	Jaeger, 1833

ตารางที่ 1. ผู้ค้นพบปลิงทะเลชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

Sea cucumber	References
<i>Holothuria maculosa</i>	Pearson, 1913
<i>Holothuria excellens</i>	Ludwig, 1875
<i>Holothuria fuscogilva</i>	Cherbonnier, 1980
<i>Holothuria nobilis</i>	Selenka, 1867
<i>Holothuria edulis</i>	Lesson, 1830
<i>Holothuria leucospilota</i>	Brandt, 1835
<i>Holothuria cinerascens</i>	Brandt, 1835
<i>Holothuria rigida</i>	Selenka, 1867
<i>Holothuria arenicola</i>	Semper, 1868
<i>Holothuria impatiens</i>	Forsk. 1775
<i>Pearsonothuria graeffei</i>	Semper, 1868
<i>Thelenota ananas</i>	Jaeger, 1833
<i>Stichopus chloronotus</i>	Brandt, 1835
<i>Stichopus horrens</i>	Selenka, 1867
<i>Stichopus hermanni</i>	Semper, 1868

ที่มา: Lovatelli และคณะ (2004)

2. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับปลิงทะเล

2.1 ประวัติศาสตร์เกี่ยวกับการประมงของปลิงทะเล

การทำประมง และการซื้อขายปลิงทะเลในแถบอินโดแปซิฟิกมีมาตั้งแต่คริสต์ศตวรรษที่ 16 (Akamine, 2004) Akamine (2004) กล่าวว่ามีการซื้อขายปลิงทะเลแห่งระหว่างประเทศญี่ปุ่นและประเทศจีน เพื่อนำไปทำไหมและยาในเมือง Edo (ชื่อเดิมของกรุงโตเกียว) ในปี ค.ศ. 1601-1867 และในเวลาเดียวกันพบว่ายุโรปซื้อปลิงทะเลแห่งจากเขตร้อนของประเทศจีนด้วยเช่นกัน และ Choo (2008) รายงานว่าปลิงทะเลแห่งเป็นสินค้านำเข้าจำนวนมากของไต้หวันและประเทศจีน ซึ่งส่วนหนึ่งนำเข้าจากเมือง Okinawa ของประเทศญี่ปุ่น จนกระทั่งประมาณปี ค.ศ. 1940 ผลผลิตปลิงทะเลจากเมือง Okinawa มีชื่อเสียงเป็นอย่างมาก

ในช่วงหลังของคริสต์ศตวรรษที่ 17 พบว่าชาวประมงของเมือง Sulawesi ประเทศอินโดนีเซีย มีบทบาทสำคัญในการรวบรวมปลิงทะเล ซึ่งมีการค้นหาปลิงทะเลที่มีคุณภาพสูงใน

บริเวณตะวันออกเฉียงของอินโดนีเซียและไกลออกไป จนกลายมาเป็นศูนย์กลางการค้าขายปลิงทะเลที่เมือง Makassar ซึ่งอยู่ทางใต้ของเมือง Sulawesi และมีรายงานว่ามีการซื้อขายปลิงทะเลแห่งในประเทศต่างๆ แถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้กับประเทศจีนหลังปี ค.ศ. 1700 เป็นต้นมา ในประเทศเวียดนามมีการทำประมงปลิงทะเลบริเวณใกล้กับเมือง Phu Quoc Archipelago ซึ่งเป็นแหล่งทรัพยากรปลิงทะเลของเวียดนาม โดยพบว่ามีประวัติการทำประมงปลิงทะเลมาตั้งแต่ก่อนปี ค.ศ. 1980 (Choo, 2008; Otero-Villanueva and Ut, 2007) สำหรับประเทศไทยมีรายงานว่ามีการทำประมงปลิงทะเลหลังปี ค.ศ. 1960 (Bussarawit and Thongtham, 1999 อ้างจาก Choo, 2008)

2.2 แหล่งที่อยู่อาศัยของปลิงทะเล

ในแถบเอเชีย พบว่าปลิงทะเลชนิดที่ถูกจับบ่อยๆ จัดอยู่ในออคเกอร์ Aspidochirotida ภายใต้ 2 แฟมิลี ได้แก่ Holothuriidae และ Stichopodidae สำหรับจีนัสที่นำมาใช้ทำอาหารบ่อยๆ ได้แก่ *Holothuria*, *Actinopyga* และ *Bohadschia* และสรุปว่ามีปลิงทะเลทั้งหมด 125 ชนิด และมี 52 ชนิด ที่นำมาทำเป็นอาหารได้ (ภาคผนวก ก) (Choo, 2008)

โดยทั่วไป *H. scabra* เป็นที่รู้จักกันคือ sandfish กระจายตัวไปทั่วในบริเวณอินโดแปซิฟิก ซึ่งพบระหว่างละติจูด 30° เหนือ และ 30° ใต้ วางไข่ทั่วไปในเมืองที่ตั้งอยู่ในเส้นศูนย์สูตร (Agudo, 2006) ในเวียดนาม *H. scabra* พบได้ที่ปากแม่น้ำบริเวณที่เป็นทราย หรือทะเลสาบ ที่ความลึก 2-25 เมตรหรือมากกว่านั้น บ่อยครั้งที่พบปลิงทะเลอยู่รวมกันหนาแน่นเป็นหย่อมๆ (Choo, 2008)

ข้อมูลจาก Bussarawit and Thongtham (1999) และ Mucharin and Putchakarn (2005) พบว่าในประเทศไทยมีปลิงทะเล 71 ชนิด แต่มีเพียง 8 ชนิดที่มีความสำคัญทางการค้า (ภาคผนวก 1) สำหรับการศึกษาชนิดปลิงทะเลที่พบบริเวณฝั่งทะเลอันดามันได้รวบรวมจากเอกสารของ สุเมตต์ และคณะ (2541) ซึ่งศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเอคโคไคโนเดิร์ม ในบริเวณสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดระนอง และพื้นที่ใกล้เคียง โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งอาศัยต่างๆ กัน คือ แหล่งหญ้าทะเล หาดทราย หาดหินเหนือ และแนวปะการัง ผลการสำรวจพบเอคโคไคโนเดิร์มทั้งสิ้น 33 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นปลิงทะเล 8 ชนิด

อรอุมา (2544) รายงานผลการศึกษาชนิดและการแพร่กระจายของปลิงทะเลรอบเกาะภูเก็ต พบปลิงทะเล 9 ชนิด ได้แก่ *Bohadschia marmorata*, *Bohadschia* sp., *Holothuria (Acanthotrapeza) coluber* (*H. coluber*), *H. (Halodeima) atra* (*H. atra*), *H. (Mertensiothuria) leucospilota* (*H. leucospilota*), *H. (Thymiosycia) hilla* (*H. hilla*), *H. (Thymiosycia) impatiens* (*H. impatiens*), *Opheodesoma clarki* และ *Synapta maculata*

จริยาและคณะ (2548) ศึกษาชนิดและการแพร่กระจายของปลิงทะเลบริเวณเกาะลันตาใหญ่ จังหวัดกระบี่ พบปลิงทะเลบริเวณหาดหิน 7 ชนิด ใน 1 แฟมิลี 2 จินัส บริเวณหาดทราย 8 ชนิด ใน 1 แฟมิลี 1 จินัส และบริเวณแหล่งหญ้าทะเลพบ 2 ชนิด ใน 2 แฟมิลี 2 จินัส โดยพบ *Holothuria (Mertensiothuria) leucospilota* มีความชุกชุมสูงสุด

ดังนั้นสรุปได้ว่าบริเวณที่พบปลิงทะเลได้มากคือบริเวณน้ำตื้นๆ ของเขตร้อน ซึ่งพบมากที่สุด ความลึกน้อยกว่า 20 เมตร ได้แก่ พื้นที่ที่มีก้าง และมีอาหารในระดับสูง ซึ่งประกอบด้วยพื้นที่ที่เป็นโคลน หญ้าทะเล หรือแนวปะการัง (Agudo, 2006)

3. วงจรชีวิตของปลิงทะเล

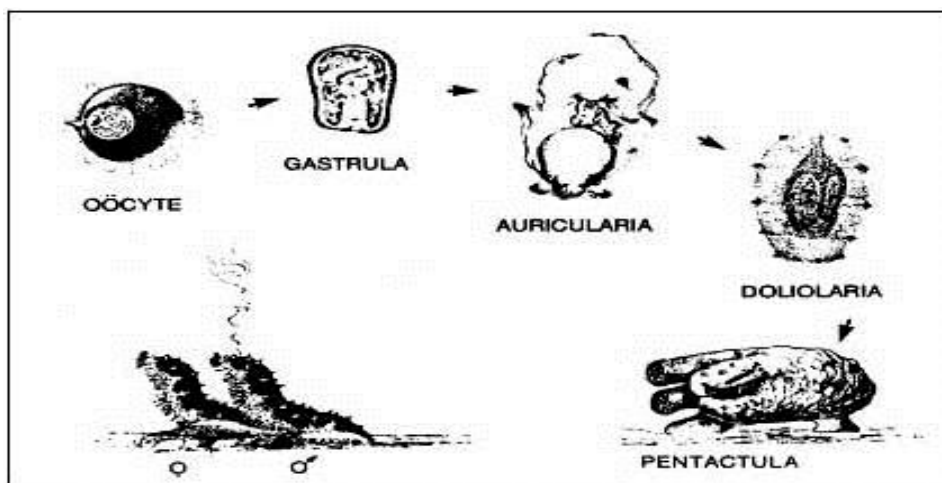
การเจริญเติบโตและพัฒนาการของปลิงทะเล *H. scabra* มีวงจรดังนี้ หลังจากการปฏิสนธิ 40 นาที ถึง 3 ชั่วโมง ตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ blastula ซึ่งเป็นช่วงชีวิตสั้นๆ ยังไม่มีการกินอาหาร ต่อมาที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิเข้าสู่ระยะ gastrula ซึ่งใช้เวลาประมาณ 2 วัน ระยะนี้จะไม่มีการกินอาหารเช่นกัน หลังจากนั้นเป็นระยะ larva ซึ่งแบ่งเป็น 3 ระยะย่อยๆ ได้แก่ 1) auricularia larvae (pelagic) ลำตัวใส รูปทรงคล้ายรองเท้าแตะ มีซิเลียไว้สำหรับเคลื่อนที่ มีการเคลื่อนที่ช้าๆ บนผิวน้ำอย่างต่อเนื่อง พบว่ามี pre-oral anterior และ anal posterior มีระบบย่อยอาหารที่สมบูรณ์ ได้แก่ ปาก (mouth) หลอดอาหาร (esophagus) และกระเพาะอาหาร (stomach) เริ่มกินอาหารจำพวก microalgae ระยะนี้ใช้เวลาประมาณ 12 วัน โดยแบ่งเป็น 3 ระยะย่อยๆ คือ early stage ใช้เวลา 2 วัน middle stage ใช้เวลา 4 วัน และ late stage ใช้เวลา 5-6 วัน 2) doliolaria larvae (pelagic) เป็นระยะสั้นๆ ใช้เวลาประมาณ 10 วัน ไม่มีการกินอาหารอยู่ในช่วงเปลี่ยนระยะเพื่อลงเกาะ มีสีน้ำตาลดำ รูปร่างเป็นทรงกระบอก รอบๆ ตัวมี 5 ซิเลีย เคลื่อนที่เร็ว ด้านข้างของลำตัวประกอบด้วยโครงสร้างทรงกลมเล็กๆ เรียกว่า hyaline spheres ข้างละ 5 อัน ซึ่งแต่ละอันมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 60-80 ไมโครเมตร 3) pentactula larvae (benthic) เป็นระยะที่ลงเกาะกับวัสดุต่างๆ มีสีดำ ลักษณะคล้ายท่อยาวๆ ด้านหน้าสุด (anterior) มีหนวด 5 เส้น และด้านหลัง (posterior) มีเท้า 1 เท้า สำหรับเคลื่อนที่ จะคืบคลานตามพื้นของบ่อหรือผิวน้ำของพื้นที่ยึดเกาะ มีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ใช้เวลาประมาณ 12-13 วัน หลังจากระยะ larva แล้ว ตัวอ่อนปลิงทะเลจะเข้าสู่ระยะวัยรุ่น (juvenile) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 15 วัน การดำรงชีวิตยังคงจัดเป็นประเภท benthic ลักษณะรูปร่างเหมือนตัวเต็มวัย มี 2 tube feet ที่ด้านหลังสุด ในช่วง early juveniles มีการเคลื่อนที่ช้า ติดแน่นกับที่ยึดเกาะ โตประมาณ 4-5 มิลลิเมตร ใน 1 สัปดาห์ (ตารางที่ 2 และรูปที่ 1 และ 2) และการเจริญเติบโตไปเป็นตัวเต็มวัย ขึ้นอยู่กับปัจจัยสิ่งแวดล้อม พบว่า *H. scabra* ขนาดกลางมีอัตราการเจริญเติบโตเฉลี่ย 0.5 เซนติเมตร/เดือน หรือ 14 กรัม/เดือน หากมีสิ่งแวดล้อมที่ดีสามารถเจริญเติบโตได้ 300 กรัม ใน 1 ปี แต่ยังคงไม่ทราบแน่ชัดว่า *H. scabra* มีชีวิตได้ยาวนานเท่าไร ซึ่งมันอาจจะอายุประมาณ 10 ปี และ

พบว่า *H. scabra* ที่เจริญเติบโตเต็มที่ สามารถสืบพันธุ์ได้ มีขนาดเล็กที่สุด คือ 200 กรัม สำหรับพ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์ จะมีน้ำหนักเฉลี่ยประมาณ 500 กรัม แต่อย่างไรก็ตามขึ้นกับแต่ละพื้นที่ด้วย ซึ่งในเวียดนามจะมีพ่อแม่พันธุ์น้ำหนัก 250-415 กรัม (Agudo, 2006)

ตารางที่ 2. วงจรชีวิตของปลิงทะเล *Holothuria scabra*

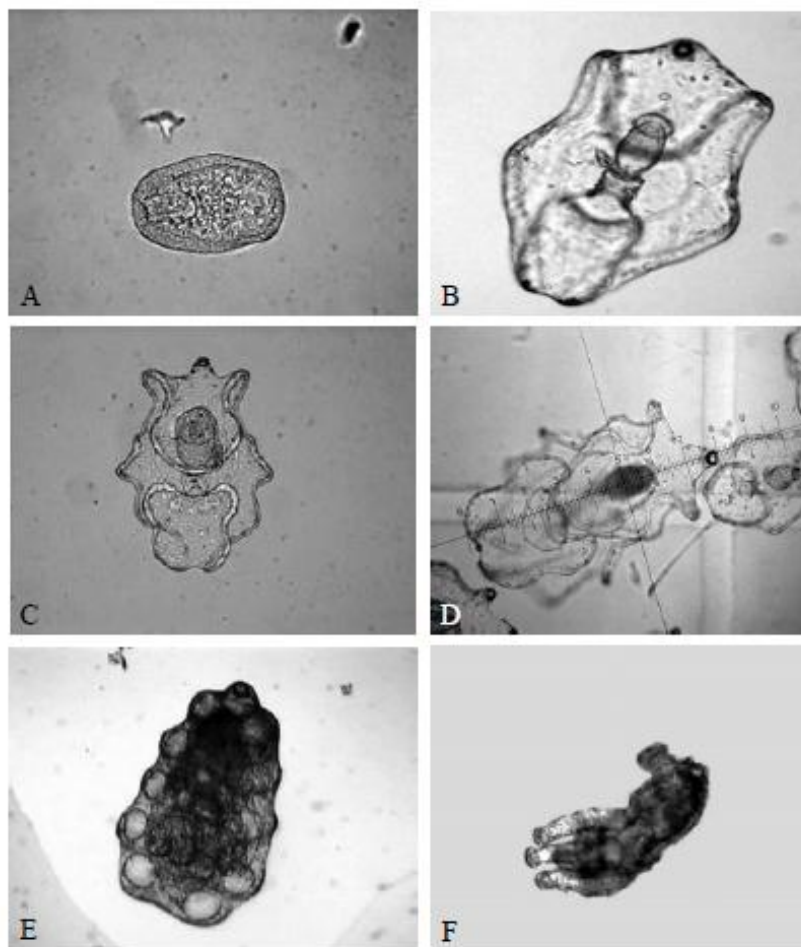
Stage	ระยะเวลาหลังจากผสมพันธุ์
Fertilised egg	0 นาที
Blastula	40 นาที ถึง 3 ชั่วโมง
Gastrula	24 ชั่วโมง
Auricularia larvae	
Early	2 วัน
Mid	4 วัน
Late	5-6 วัน
Doliolaria larvae	10 วัน
Pentactula larvae	12-13 วัน
Juvenile	15 วัน

ที่มา: Agudo (2006)



รูปที่ 1. วงจรชีวิตของปลิงทะเล

ที่มา: FAO (2010)



รูปที่ 2. ภาพ light microscope แสดงตัวอ่อนปลิงทะเล *Holothuria scabra* ที่ระยะต่างๆ

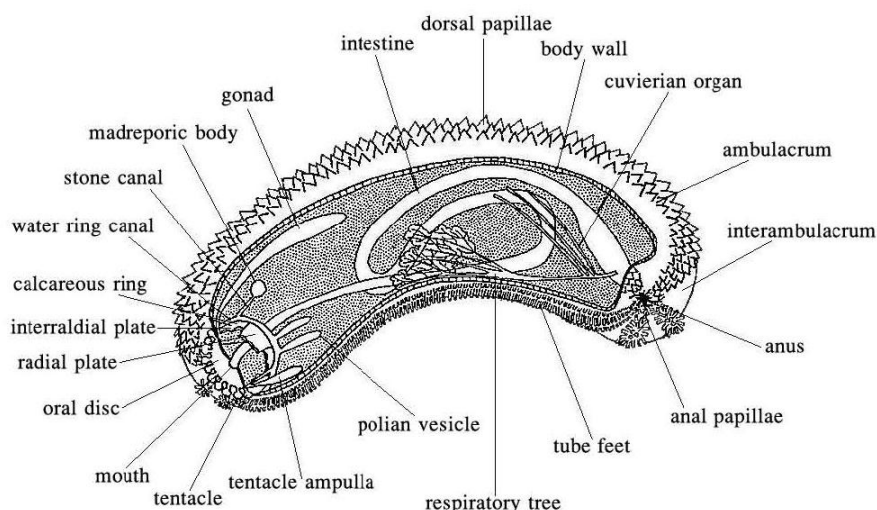
- | | |
|---|---|
| A. Gastrula stage | B. Early auricularia larva (430-563 μm) |
| C. Mid auricularia larva (700-750 μm) | D. Late auricularia larva (853 μm -1.1 mm) |
| E. Doliolaria larva (420-620 μm) | F. Pentactula larva (330-750 μm) |

ที่มา: Agudo (2006)

4. ลักษณะชีววิทยาโดยทั่วไปของปลิงทะเล

ปลิงทะเลมีลักษณะผิวของลำตัวที่มีทั้งหนา บาง โปร่งแสง และทึบแสง แล้วแต่ชนิด ร่างกายมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอกยาว มีแกนสมมาตรในแนวรัศมี ลำตัวอ่อนนุ่มและมีเส้นแนวพาดตามลำตัวตั้งแต่ปากไปเกือบถึงทวารหนัก ด้านท้อง (ventral side) แนบติดพื้น มีสี่ขีด มีแถบแอมบูลาครัม (ambulacrum) 3 แถบ สลับกับอินเตอร์แอมบูลาครัม (interambulacrum) 2 แถบ เรียกว่า ไตรเวียม (trivium) (รูปที่ 3) บริเวณด้านหลัง (dorsal side) หนุนขึ้นมีสี่ขีดและมีแถบแอมบูลาครัม 2 แถบ สลับกับแถบอินเตอร์แอมบูลาครัม 3 แถบ เรียกว่า ไบเวียม (bivium) โปเดีย (podia)

ทางด้านท้องเจริญดีกว่าด้านหลังและมีแว่นคูด เรียกว่า เท้าท่อ (tube feet) ในปลิงทะเลบางกลุ่มอาจไม่มีเท้าท่อ โพลีเดียอาจพบทางด้านหลัง แต่มีจำนวนน้อยมากและมีขนาดเล็ก โพลีเดียทำหน้าที่ในการรับสัมผัส มีตำแหน่งอยู่ในแถบแอมบูลาครา แต่ปลิงทะเลหลายชนิดมีโพลีเดียกระจายออกอย่างไม่มีระเบียบ ลักษณะลำตัวแบบนี้จะเป็นสมมาตรของซีกซ้ายขวา (จรัสศรี และคณะ, 2551)



รูปที่ 3. ลักษณะทั่วไปของปลิงทะเล

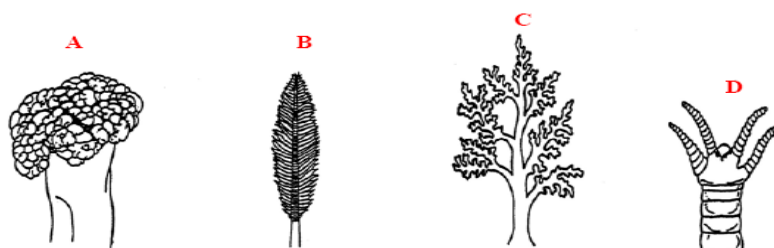
ที่มา: จรัสศรี และคณะ (2551)

ด้านหน้าของลำตัวมีช่องปากซึ่งมีหนวดอยู่รอบๆ ปาก และปลิงทะเลเกือบทุกชนิดมีหนวดที่เห็นได้ชัดเจนเป็นวงรอบปาก (buccal tentacle) หนวดเปลี่ยนแปลงมาจากโพลีเดียรอบปาก ซึ่งมักจะมี 10–30 เส้น หน้าที่หลักของหนวด คือ รวบรวมอาหาร หนวดจะมีลักษณะไม่ซับซ้อนแต่มีหลายแบบ คือ งอกออกมาคล้ายนิ้วมือ (digitate) หรือแตกแขนงแบบกิ่งก้านหรือกิ่งไม้ (dendritic) หรือแบบขนนก (pinnate) หรือแขนงที่แตกออกมีก้านสั้นปลายแขนงเป็นแวนทรงกลมหรือแบบจาน (peltate) (รูปที่ 4) ผนังของหนวดมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันน้อยและกล้ามเนื้อเจริญดี เมื่อหนวดหดตัวผนังตัวจะยื่นออกมาคลุมเพื่อป้องกันหนวด บริเวณปากของปลิงทะเลจะมีสี่ที่เด่นชัด

ผนังตัวของปลิงทะเลจะมีเดอร์มิส (dermis) เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่หนาและยืดหยุ่นได้ดี ในเดอร์มิส ประกอบด้วย ออสซิเคิลหรือสปิคูล (รูปที่ 5) ฝังตัวอยู่ในผนังกล้ามเนื้อ ขนาดเล็กมาก รูปร่างต่างๆ กัน ซึ่งมีความสำคัญในการจำแนกชนิดและการศึกษาด้านอนุกรมวิธาน บริเวณปากมีแผ่นวงแหวนหินปูน (calcareous ring) (รูปที่ 6) ทวารหนัก (anus) อยู่ส่วนท้ายของลำตัว

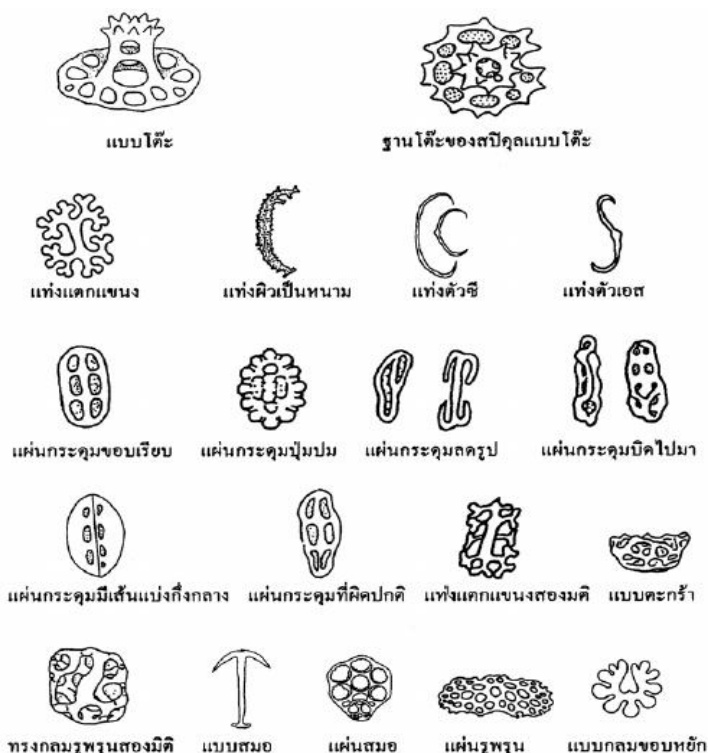
ทางเดินอาหารผันแปรตามลักษณะของตัวปลิงทะเลและอุปนิสัยการกินอาหาร แต่โดยทั่วไปจะประกอบด้วย 4–5 บริเวณ มีคอหอย (pharynx) สันต่อกับแคลซูลของอุ้งปาก (buccal

capsule) ซึ่งค้ำจุนด้วยวงของออสซิลิเทสขนาดใหญ่ แคปซูลของอู้งปากเป็นส่วนที่สำคัญมาก เนื่องจากเป็นที่อยู่ของท่อวงแหวนของระบบท่อน้ำและวงแหวนของระบบประสาท แลกกล้ำมเนื้อตามยาวของผนังตัวที่มาถึงบริเวณใกล้กับปากจะแตกแขนงเป็นกล้ำมเนื้อในการหดตัวไปเกาะที่แคปซูลของอู้งปาก ใช้ในการดึงปากและหนวดให้หดตัวลงมาชั่วคราว ถัดมาจะเป็นหลอดอาหาร



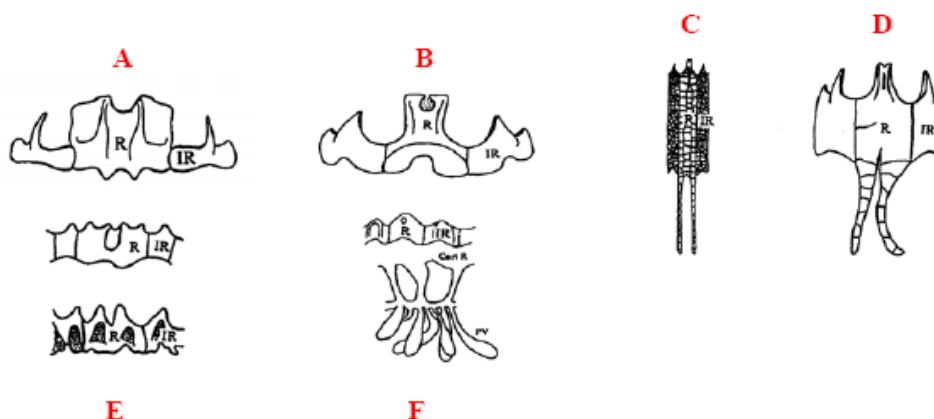
รูปที่ 4. ลักษณะหนวดของปลิงทะเล: A, หนวดแบบจาน (peltate); B, หนวดแบบขนนก (pinnate); C, หนวดแบบกิ่งไม้ (dendritic); D, หนวดแบบนี้ว่ามีือ (digitate)

ที่มา: จรัสศรี และคณะ (2551)



รูปที่ 5. ลักษณะสปีคูลของปลิงทะเล

ที่มา: จรัสศรี และคณะ (2551)



รูปที่ 6. ลักษณะแผ่นวงแหวนหินปูนของปลิงทะเล: A, Holothuriidae; B, Cucumariidae; C, D Phyllophoridae; E, Stichopodidae และ F, Synaptidae

ที่มา: จรัสศรี และคณะ (2551)

การหมุนเวียนของของเหลวเกิดภายในช่องลำตัว (coelom) ขนาดใหญ่ เยื่อผนังช่องลำตัวชนิดมีขน (ciliated epithelium) มีประโยชน์ช่วยในการพัดโบกให้เกิดกระแสของเหลวไหลวนเวียนอยู่ภายใน ช่วยลำเลียงอาหารให้แก่อวัยวะต่างๆ ภายในช่องลำตัวมีเซลล์ซีโลโมไซท์ (coelomocyte) จำนวนมากหลายรูปแบบตามหน้าที่ เช่น ซีโลโมไซท์ที่ทำหน้าที่จับอาหาร เรียกว่า ฟาโกไซติกอะมีโบไซท์ (phagocytic amoebocyte) ลักษณะไม่มีสีและมีขนาดเล็กมาก ส่วนซีโลโมไซท์ที่ทำหน้าที่ลำเลียงก๊าซ เรียกว่า ฮีโมไซท์ (hemocyte) ลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง ถ้าอยู่รวมกันเป็นจำนวนมากจะทำให้ของเหลวมีสีแดง (จรัสศรี และคณะ, 2551)

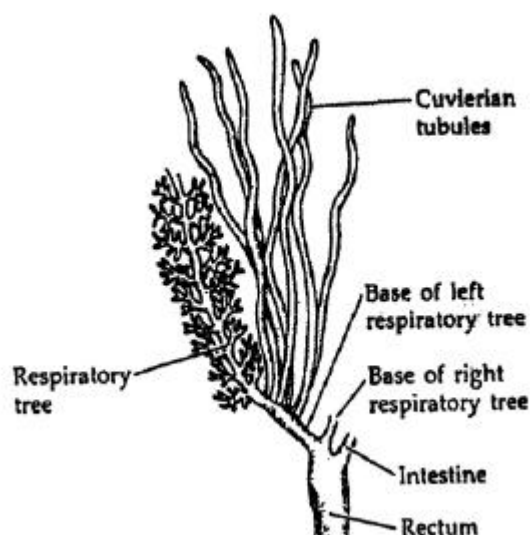
ปลิงทะเลมีการแลกเปลี่ยนก๊าซบริเวณผนังตัวที่บาง เช่น หนวดรอบปากและเท้าต่อ อวัยวะที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนก๊าซของปลิงทะเล มีลักษณะเป็นท่อแตกแขนงออกจากโคลอคา (cloaca) คล้ายต้นไม้ เรียกว่า เรสไพราทอรีทรี (respiratory tree) (รูปที่ 7) อยู่สองข้างทางของทางเดินอาหาร ปลิงทะเลอันดับ Apodida จะไม่มีเรสไพราทอรีทรี แต่แลกเปลี่ยนก๊าซทางผิวหนังโดยตรง (จรัสศรี และคณะ, 2551)

ระบบท่อน้ำประกอบด้วยท่อที่ให้ของเหลวจากช่องตัวไหลเวียนอยู่ภายใน เพื่อเป็นแรงผลักดันให้เท้าต่อเหยียดออกขณะเคลื่อนที่ สามารถแบ่งออกเป็นส่วนๆ คือ แผ่นตะแกรง (madreporite) สำหรับกรองน้ำ ที่จะเข้าสู่ท่อระบบหมุนเวียนน้ำ ท่อหลังแผ่นตะแกรง (stone canal) ท่อแหวน (ring canal) ตั้งอยู่รอบคอหอย โพลีอันเวสิเคิล (polian vesicle) ค่อนข้างยาวต่อจากท่อวงแหวน ทำหน้าที่ช่วยปรับความดันภายในระบบท่อน้ำนี้ให้คงที่ โดยการพองตัวและหดตัว ท่อรัศมี (radial canal) แยกจากท่อวงแหวนในแนวรัศมีฝังอยู่ใกล้ผิวหนัง ท่อย่อยที่แยกจากท่อรัศมีออกมาสองข้าง (lateral

canal) ท่อเล็กเหล่านี้จะไปสิ้นสุดที่เท้าท่อ ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้ในการเคลื่อนที่โผล่ยื่นออกมาพันผิวหนัง มีลักษณะเป็นปุ่มสั้นๆ ที่ปลายด้านในของหลอดเท้าและพองออกเป็นกระเปาะ (ampulla) เมื่อกด้ามเนื้อที่ผนังของกระเปาะนี้หดตัว ของเหลวภายในจะดันให้หลอดเท้าหรือหนวดเหยียดตัวยาวออก ในกลุ่มของปลิงทะเลที่ไม่มีเท้าท่อระบบท่อน้ำจะเหลืออยู่เพียงท่อน้ำแวนและโพเลียน เวลิกัลพันอยู่รอบคอหอยกับบัคเคิลโพเดีย (buccal podia) หรือหนวด (จรัสศรี และคณะ, 2551)

ปลิงทะเลส่วนใหญ่จะอาศัยบนพื้นท้องทะเล เวลาที่ต้องการเคลื่อนที่ (locomotion) จะใช้เท้าท่อสำหรับในกลุ่มที่ไม่มีเท้าท่อ ซึ่งได้แก่ ปลิงทะเลออร์เดอร์ Apodida จะอาศัยการยึดติดของผนังลำตัวร่วมกับการใช้สปีคูลูรูปสมอเกาะไปตามพื้น ปลิงทะเลบางชนิดมีท่อปิดยาวเรียวยาวออกมาจากท่อหลักของเรสไปราทอรีทรี เรียกว่า ท่อคูเวียร์ (tubes of cuvier) ใช้ในการป้องกันตัว โดยการหดกล้ามเนื้อของผนังลำตัวอย่างรุนแรงทำให้ผนังด้านหลังของท่ออาหารตอนท้ายจิกออกและเกิดแรงดัน ทำให้ของเหลวในซีลอมไหลเข้าสู่ท่อทางเดินอาหารตอนท้ายและออกไปทางทวารหนัก โดยมีท่อคูเวียร์ติดออกไปด้วยและแปรสภาพเป็นสารเหนียวคล้ายสายไหมที่ยาวและขาดง่าย เมื่อศัตรูถูกคลุมด้วยท่อคูเวียร์จะเคลื่อนที่ช้าลง ปลิงทะเลอาจมีการปกป้องตัวเองในลักษณะอื่นๆ เช่น สร้างสารพิษหุ้มตัวหรือปล่อยสารขับไล่ (repellent substance) ทำให้ปลาผละหนีไป ปลิงทะเลจะขับอวัยวะภายใน (autoevisceration) เมื่อต้องประสบกับภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ช่วงของอุณหภูมิสูงหรือต่ำเกินไป น้ำเสีย หรือมีการเปลี่ยนแปลงทางฟิสิกส์และเคมีอย่างรวดเร็ว ปลิงทะเลหลายชนิดจะขับอวัยวะภายในออกทางช่องทวารหนัก จากนั้นผนังลำตัวของปลิงทะเลจะแข็งขึ้น โดยอวัยวะภายในจะสามารถงอกใหม่ (regeneration) ได้อย่างรวดเร็ว ปลิงทะเลมีอวัยวะสืบพันธุ์เพียงอันเดียว (single gonad) บางชนิดมีเพศแยก (dioecious) บางชนิดมีเพศรวม (hermaphrodite) แต่ส่วนใหญ่จะมีเพศแยก อวัยวะสืบพันธุ์รวมมีเพียง 1 ชุด ต่อมาสร้างเซลล์สืบพันธุ์ มีแขนงเป็นพู่เรียวยาวหลายพู่ มีท่อไปยังรูสืบพันธุ์ที่อยู่ระหว่างหนวด 1 คู่ ทางด้านหลังของลำตัว ส่วนพวกที่มีเพศรวมมีอวัยวะสืบพันธุ์อันเดียวสร้างทั้งรังไข่และสเปิร์มผสมภายในตัวโดยสร้างไข่ขึ้นก่อน ปลิงทะเลอาศัยอยู่ในเขตน้ำตื้นจนถึงทะเลลึก ดำรงชีวิตเป็นสัตว์หน้าดินทั้งหมด สามารถที่จะปรับตัวให้ดำรงชีวิตในแหล่งที่อยู่ได้หลายแบบ จากการศึกษาลักษณะถิ่นที่อยู่อาศัยและการกินอาหารของปลิงทะเล พบว่าปลิงทะเลมีรูปแบบการกินอาหาร 2 แบบ คือ กินอาหารที่แขวนลอยในมวลน้ำ และกินอาหารที่ตกอยู่บนพื้นหรือปนอยู่กับตะกอน ปลิงทะเลออร์เดอร์ Aspidochirotida อาศัยในแนวปะการังหรือนอกแนวปะการัง หาดอาหารโดยใช้หนวดจับตะกอนหรืออินทรีย์สารต่างๆ ตามพื้นดิน ปลิงทะเลออร์เดอร์ Dendrochirotida อาศัยอยู่ในแนวปะการัง โดยเกาะอยู่กับวัตถุหรือฝังตัวตามพื้นทราย ใช้หนวดจับตะกอนหรือแพลงก์ตอนที่ล่องลอยมากับมวลน้ำ และปลิงทะเลออร์เดอร์ Apodida อาศัยอยู่ร่วมกับฟองน้ำหรือปะการัง โดยจะดักจับตะกอนที่ติดอยู่ตามผนังตัว

ของฟองน้ำหรือปะการังเป็นอาหาร ระบบประสาทของปลิงทะเลยังไม่เจริญมากนัก ประกอบด้วยประสาทรูปร่างแหวนล้อมรอบอุ้งปากได้ฐานของหนวด จากวงแหวนนี้จะมีเส้นประสาทแยกออกไปยังอวัยวะใกล้เคียงเป็นเส้นสั้นๆ ส่วนเส้นประสาทยาววิ่งไปตามแนวรัศมีฝังอยู่ในชั้นผิวหนังหรือเดอร์มิส เส้นประสาทนี้ยาวตลอดลำตัวและยังมีแขนงประสาทแยกออกมาจับตัวเป็นกลุ่มอยู่ใต้ผิวหนังชั้นนอก ปลิงทะเลรับรู้ความรู้สึกและแสดงอาการตอบโต้ซ้ำมากเนื่องจากอวัยวะรับรู้ความรู้สึกยังไม่เจริญ เซลล์รับรู้ความรู้สึกจะกระจายอยู่ตามผิวหนังทั่วไปโดยจะจับกลุ่มหนาแน่นเฉพาะแห่ง และมีมากที่บริเวณส่วนปลายหัวท้ายลำตัว ที่ตุ่มตามผิวหนังและที่หนวด ปลิงทะเลบางชนิดมีอวัยวะรับแสงอยู่ที่โคนหนวด ปลิงทะเลเดอริเดอริ Apodida มีอวัยวะเกี่ยวกับการทรงตัว (statocyst) เจริญดี ปลิงทะเลจะอาศัยอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่ม แหล่งที่อยู่ของปลิงทะเลมีหลายรูปแบบ ปลิงทะเลบางชนิดสามารถอาศัยอยู่ในแหล่งที่อยู่ได้หลายรูปแบบ เช่น *Cucumaria curata* พบใน 3 แหล่งที่อยู่บริเวณชายฝั่งของแคลิฟอร์เนีย คือ แหล่งที่อยู่แรกจะพบนอนนิ่งๆ บริเวณชายหาดอย่างหนาแน่น แหล่งที่อยู่ที่สองจะพบรวมกันเป็นกลุ่มๆ ละ 5-20 ตัว ในบริเวณที่มีการเลี้ยงหอย (*Mytilus* bed) และแหล่งที่อยู่ที่สามจะอาศัยรวมตัวกันอยู่ใต้ก้อนหินซึ่งอยู่ต่ำกว่าระดับน้ำขึ้นน้ำลง (midlittoral zone) (จรัสศรี และคณะ, 2551)



รูปที่ 7. ลักษณะเรสไพราทอรีทรี (respiratory tree) ของปลิงทะเล

ที่มา: จรัสศรี และคณะ (2551)

5. อวัยวะสืบพันธุ์ ของปลิงทะเล

5.1 *Holothuria scabra*

H. scabra พบได้ตลอดชายฝั่งของอินโดแปซิฟิก พบบ่อยครั้งในบริเวณใกล้ๆ แนวปะการัง และใกล้ๆ ปากแม่น้ำ จะฝังตัวในโคลนปนทรายช่วงกลางวัน และโผล่ออกมาในช่วงกลางคืนเพื่อกินอาหาร พบว่ามี 2 สปีชีส์ คือ ดำและเทา ข้อมูลทางพันธุศาสตร์บ่งชี้ว่า ทั้ง 2 สปีชีส์ เป็นชนิดเดียวกัน มีปลิงทะเลประมาณ 20 ชนิด รวมทั้ง *H. scabra* ที่บัญญัติไว้ในการประมง beche-de-mer ของอินโดแปซิฟิก ซึ่งเป็นชนิดที่มีมูลค่าสูงทางการค้า (Ramofafia *et al.*, 2003)

ช่วงการผสมพันธุ์ของ *H. scabra* มี 2 ครั้ง ใน 1 ปี ซึ่งมีรายงานในอินเดีย ฟิลิปปินส์ New Caledonia (เกาะทางตอนใต้ของมหาสมุทรแปซิฟิก) และอินโดนีเซีย ว่าสามารถพบ *H. scabra* ที่เจริญเติบโตเต็มที่ที่ได้อุดปลา โดยเฉพาะประชากร *H. scabra* ในเขตร้อน จากการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์และ gonad index พบว่ามีการเจริญของเซลล์เพศอย่างต่อเนื่อง (Hamel *et al.*, 2002)

โครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์

อวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ของ *H. scabra* มีลักษณะเป็นพุ่มที่มีแขนงของ tubules (gonad tubules) มากมายวางอยู่ทางด้านขวาของ dorsal mesentery พบว่า ขนาด สปีชีส์ รูปร่าง และจำนวนแขนงของแต่ละ tubules ขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งระยะของการเจริญเติบโตของอวัยวะสืบพันธุ์ได้เปรียบเทียบไว้ในตารางที่ 3

อวัยวะสืบพันธุ์หมายถึงรังไข่ (ovary) ในเพศเมียและอัณฑะ (testis) ในเพศผู้ มีการแบ่งระยะพัฒนาการ โดยรวมดังนี้

ระยะที่ 1 Indeterminate stage อวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่มีแขนง ความยาวน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร มีสีขาวยังไม่สามารถแบ่งเพศได้ เซลล์สืบพันธุ์ยังมองเห็นไม่ชัดเจน

ระยะที่ 2 Growing stage อวัยวะสืบพันธุ์เพิ่มขนาดและความยาว ยาวประมาณ 20-70 มิลลิเมตร เริ่มแบ่งออกเป็น 2 แขนง ความยาวของแขนงจะแตกต่างกันพบว่ารังไข่มีสีส้ม และอัณฑะจะมีสีขาวยเป็นเงามัน ภายในเห็นการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์

ระยะที่ 3 Mature stage อวัยวะสืบพันธุ์เจริญเติบโตเต็มที่ มี tubules ที่สมบูรณ์ ผนังบางใส ยาวประมาณ 30-200 มิลลิเมตร ปรากฏช่องว่างเรียกว่า coelomic cavity อยู่ด้านใน ในรังไข่พบเซลล์ไข่ (oocytes) อยู่ที่ผนังด้านในของ tubules ซึ่งมีระยะพัฒนาการที่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตาม ไข่ส่วนใหญ่เป็น oocyte ที่เจริญเติบโตเต็มที่ รังไข่มีสีส้มแดง อัณฑะมีสีขาวครีมพบลักษณะเป็นเม็ดเล็กๆ อยู่ภายใน มีเซลล์อสุจิ (sperm) ที่มีการ active สูง

ระยะที่ 4 Partly spawned stage อวัยวะสืบพันธุ์มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์บางส่วน มีทั้ง tubules ที่พัฒนาเต็มที่และ tubules ที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้วซึ่งมีขนาดเล็กและอ่อนนุ่ม พบเซลล์ phagocytes ในช่อง lumen ของ tubules ทั้ง 2 แบบ โดยเฉพาะใน tubules ที่ยังไม่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งบ่งชี้ถึงการสลายตัวกลับ (resorbtion) ของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่ได้ถูกปล่อย

ระยะที่ 5 Spent stage อวัยวะสืบพันธุ์มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์จนหมดซึ่งจะมีขนาดเล็กลง tubules เป็นรอยขนและหดตัว น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ช่วงนี้มีตั้งแต่ไม่น้อยกว่า 1 กรัม ถึง 40 กรัม อวัยวะสืบพันธุ์ที่มีน้ำหนักน้อยกว่า 1 กรัม มักมีสีน้ำตาล (Ramofafia *et al.*, 2003)

ตารางที่ 3. วงจรการสืบพันธุ์ของ *Holothuria scabra* กับโครงสร้างของ gonad tubules

ระยะของ อวัยวะสืบพันธุ์	น้ำหนัก ของ อวัยวะ สืบพันธุ์ (g)	tubules				
		ความ ยาว (mm)	เส้นผ่า ศูนย์กลาง (mm)	จำ นวน แขนง	ลักษณะ	สี
Indeterminate st.	<5	<10	<0.3	0	ยังไม่ปรากฏเซลล์สืบพันธุ์	ขาว
Growing st.						
เพศเมีย	5-30	30-70	0.7-1.4	1-2	oocytes มีการพัฒนา (20-80 μ m)	ส้ม
เพศผู้	5-30	20-60	0.5-1.3	1-2	sperm มีการพัฒนา	ขาว
Mature st.						
เพศเมีย	40-200	40-160	1.0-3.0	2-3	oocytes มีการพัฒนามากขึ้น (120-170 μ m)	ส้มแดง
เพศผู้	30-200	30-170	0.5-2.5	2-3	tubules มีเม็ดกลมเล็กๆ	ขาวครีม
Partly spawned st.						
เพศเมีย	30-120	30-140	0.5-2.10	1-3	tubules เล็กกลง ใน lumen ของบาง tubules ว่างเปล่า และพบ phagocytes ใน tubules tubules ที่ปล่อย sperm แล้วจะเล็กลง ส่วน	ส้มแดง
เพศผู้	20-90	20-150	3-19	1-3	tubules ที่ยังไม่ ปล่อย sperm จะมี sperm หนาแน่น	ขาวครีม
Spent st.						
เพศเมีย	0.1-4.0	6-130	0.1-1.8	1-3	tubules เล็กและหดตัว พบซาก oocytes tubules ที่ยังไม่ปล่อย sperm จะมีลักษณะ	ส้มอ่อน
เพศผู้	0.1-4.0	10-140	0.1-1.3	1-3	เหี่ยวขุ่น	ขาว

ที่มา: Ramofafia และคณะ (2003)

5.1.1 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Oogenesis)

รังไข่ในระยะต่างๆ มีการสร้าง oocytes ซึ่งมีพัฒนาการดังนี้

ระยะที่ 1 Indeterminate stage หรือ recovery stage พบ oocytes ในบริเวณเยื่อผิวที่บุอยู่ใน tubules (germinal epithelium) ของรังไข่ เซลล์ oocytes เริ่มผลิตไข่แดงหรือ vitellogenin ซึ่งอยู่ในระยะ previtellogenic เส้นผ่านศูนย์กลางของ oocytes น้อยกว่า 20 μm เซลล์ oocytes คีดสีเบส (basophilic) (รูปที่ 8A)

ระยะที่ 2 Growing stage ในรังไข่พบ oocytes ที่มีการเจริญของไข่แดงอย่างมาก (vitellogenesis) (รูปที่ 8B) oocytes ที่มีการผลิตไข่แดงในช่วงแรก (early-vitellogenesis) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 20-40 μm และช่วงกลาง (mid-vitellogenesis) มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30-80 μm ซึ่ง คีดสีกรด (eosinophilic) เพิ่มขึ้น และ oocytes มีการพัฒนาเป็นลักษณะของ follicle คือมี somatic cell ที่เรียกว่า follicular cell ล้อมรอบ oocyte

ระยะที่ 3 Mature stage พบ oocytes คีดสีกรดเข้มขึ้น เข้าสู่ระยะ late-vitellogenesis ขนาด oocyte เพิ่มขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลาง 120-170 μm ยังคงมีลักษณะเป็น follicle (รูปที่ 8C และ D) germinal vesicle ของ oocyte ปรากฏชัดอยู่ภายในเซลล์ (รูปที่ 8D) มี protuberance ยื่นออกมาจาก oocyte ยื่นเข้าหา germinal epithelium (รูปที่ 8D)

ระยะที่ 4 Partly spawned stage oocyte ที่ถูกปล่อยออกมาทำให้เกิดช่องว่างใน lumen มาก (รูปที่ 6E ทางด้านซ้าย) และพบว่ามีการเจริญของเซลล์เพศเพื่อทดแทนภายในรังไข่ที่มีการปล่อยไข่ไปบางส่วน ทำให้เกิดการคละกันหลายระยะของ oocytes ในแต่ละรุ่น (รูปที่ 8F และ G)

ระยะที่ 5 Spent stage พบ lumen ขนาดใหญ่ภายในว่างเปล่า มีซาก oocyte และ เซลล์ phagocyte ในบางบริเวณ

5.1.2 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Spermatogenesis)

พัฒนาการของอวัยวะแบ่งเป็น 5 ระยะ สัมพันธ์กับพัฒนาการของเซลล์ sperm ดังนี้

ระยะที่ 1 Recovery stage หรือ indeterminate stage อวัยวะมองเห็นชัดจากแถบของเซลล์ sperm ที่อยู่ในช่วงแรกของพัฒนาการที่เรียกว่า spermatocyte ซึ่งอยู่ในบริเวณ germinal epithelium เซลล์คีดสีกรด

ระยะที่ 2 Growing stage แถบของ spermatocyte ในบริเวณ germinal epithelium มีสีเข้มขึ้น (รูปที่ 9A และ B) มีการยื่นตัวของ germinal epithelium เข้าสู่แนวกลางของ tubules

เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิว เมื่ออวัยวะพัฒนามากขึ้น พบว่ามีการสะสมของเซลล์ sperm ที่เข้าสู่ระยะพัฒนาการขั้นสุดท้ายที่เรียกว่า spermatozoa ใน lumen (รูปที่ 9C และ D)

ระยะที่ 3 Mature stage ในอวัยวะที่เจริญเต็มที่ พบว่า lumen จะเต็มไปด้วยการรวมกลุ่มของ spermatozoa โดย germinal epithelium ที่ยื่นตัวเข้ามาได้ลดลงและหายไป (รูปที่ 9E) ผนังของอวัยวะบางลงมาก

ระยะที่ 4 Partly spawned stage สำหรับอวัยวะที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ไปบ้างแล้ว พบว่า spermatozoa ลดปริมาณลง (รูปที่ 9F และ G) ในบางบริเวณพบช่องว่างที่แสดงถึงการปล่อย spermatozoa ออกไป และพบ phagocytes บางบริเวณใน lumen การเกิด spermatogenesis ได้เกิดขึ้นใหม่ในอวัยวะระยะนี้ โดยเห็นได้จากการพัฒนาของ spermatocyte และการยื่นตัวของ germinal epithelium อีกครั้ง (รูปที่ 9G)

ระยะที่ 5 Spent stage ภายใน lumen ว่างลง มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ทั้งหมด แต่อย่างไรก็ดียังคงมี spermatozoa ที่ไม่ถูกปล่อยอยู่บ้าง (รูปที่ 9H และ I) (Ramofafia *et al.*, 2003)

5.2 *Holothuria atra*

H. atra เป็นสัตว์ที่แยกเพศ แต่ไม่สามารถแยกเพศได้จากลักษณะภายนอก อวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) มีอันเดียวประกอบด้วย tubules ที่เป็นเส้นใยเล็กๆ มากมาย อยู่รวมกันเป็น 1 พู วางตัวอยู่ทางด้านซ้ายของ dorsal mesentery และห้อยแขวนอยู่ในช่องว่างในร่างกายระหว่างผนังร่างกายกับลำไส้ (coelom) tubules จะมีลักษณะยาวและเป็นแขนง พบว่าในระยะที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ เส้นใยของรังไข่จะมีสีแดง ซึ่งมี oocytes เป็นจุดเล็กๆ สีขาวมากมาย อวัยวะจะประกอบด้วยเส้นใยขาวสีขาวยาว (Abdel-Razek *et al.*, 2005)

5.2.1 ระยะพัฒนาการของเพศผู้

ระยะที่ 1 Immature stage อวัยวะสืบพันธุ์มี tubules สั้น บาง มีแขนง และมีสีเหลืองขาว ยาวประมาณ 6.5-17 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4-0.6 มิลลิเมตร และค่า gonado-somatic index (G.S.I) อยู่ในช่วง 1.2-2.7 (รูปที่ 10A)

ระยะที่ 2 Maturing stage มี tubules ยาว บาง มีแขนง และมีสีขาวยาว ประมาณ 14-47 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4-1.2 มิลลิเมตร และ ค่า G.S.I อยู่ในช่วง 1.0-29.4 (รูปที่ 10B)

ระยะที่ 3 Ripe stage พบว่า tubules มีปริมาณมากที่สุด เป็นเส้นใยขาวสีขาวยาว มีลักษณะบวม และ sperm อาจอยู่ใน gonoduct พบว่า tubule มีความยาวประมาณ 33-60 มิลลิเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.1-2.5 มิลลิเมตร ค่า G.S.I อยู่ในช่วง 7.8-27.2 และพบว่ามี spermatozoa มากมายภายใน tubules (รูปที่ 10C)

ระยะที่ 4 Spent stage อวัยวะสืบพันธุ์ว่างเปล่าแต่ยังคงมี tubules ลักษณะใสอยู่ ยาวประมาณ 5.0-36 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2-0.9 มิลลิเมตร และ ค่า G.S.I อยู่ในช่วง 0.3-6.2 สำหรับบาง tubules ยังมี spermatozoa หลงเหลืออยู่ (รูปที่ 10D)

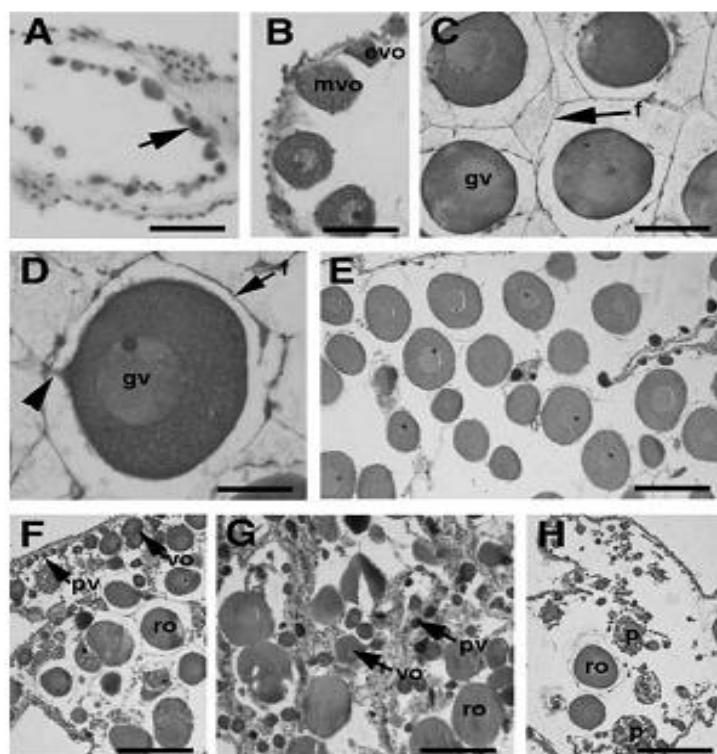
5.2.2 ระยะพัฒนาการของเพศเมีย

ระยะที่ 1 Immature stage อวัยวะสืบพันธุ์มี tubules ลักษณะบาง สั้น มีแขนง สีขาวเหลือง ยาวประมาณ 4-12 มิลลิเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2-1.0 มิลลิเมตร และ ค่า G.S.I อยู่ในช่วง 2.2-7.7 (รูปที่ 10E)

ระยะที่ 2 Maturing stage พบว่า tubules มีลักษณะยาว หนา มีแขนง สีเหลือง ยาวประมาณ 21.0-51.0 มิลลิเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7-2.0 มิลลิเมตร และ ค่า G.S.I อยู่ในช่วง 4.1-14.3 พบ oocytes ทรงกลมสีขุ่น (รูปที่ 10F)

ระยะที่ 3 Ripe stage พบว่า tubules ยาว หนา มีแขนง และมีสีแดงเข้ม ยาวประมาณ 24-130 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.0-2.5 มิลลิเมตร และค่า G.S.I อยู่ในช่วง 9.8-13.7 พบ oocytes เป็นรูปทรงกลม มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 75-175 ไมครอน ใส มองเห็นนิวเคลียส (รูปที่ 10G)

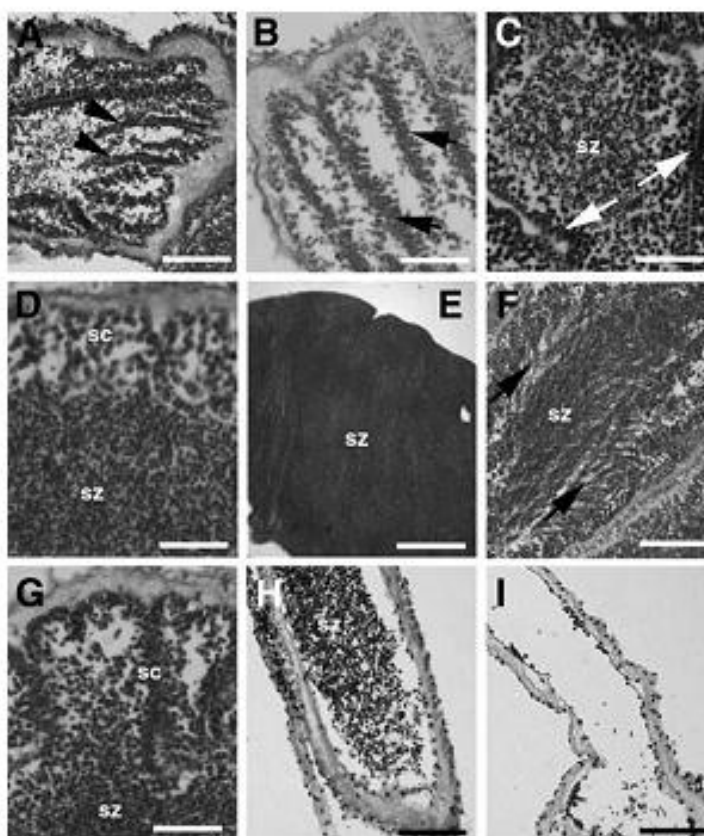
ระยะที่ 4 Spent stage พบ tubules ว่างเปล่า มีแขนง บาง tubules มีลักษณะอ่อนบาง มีสีเหลือง ยังคงมี oocytes อยู่บ้าง tubules ยาวประมาณ 20-24 มิลลิเมตร มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4-1.0 มิลลิเมตร และค่า G.S.I อยู่ในช่วง 1.7-8.4 (Abdel-Razek *et al.*, 2005)



รูปที่ 8. แสดง Oogenesis ของ *Holothuria scabra*

- A. Recovering ovary และ pre-vitellogenic oocytes (ศรีชี้)
 - B. Growing ovary ซึ่ง oocytes มีการผลิตไข่แดง (vitellogenesis) ในช่วงแรก (evo) และช่วงกลาง (mvo)
 - C., D. Mature ovary พบ oocytes เจริญอย่างเต็มที่ภายใน follicle (f) ที่มี germinal vesicle (gv) ขนาดใหญ่ protuberance (หัวลูกศร) ยึด follicle ให้ติดกับ germinal epithelium
 - E.- G. Partly spawned ovary พบว่ามี oocytes ที่ยังไม่ถูกปล่อยออกจํานวนน้อย เริ่มมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใหม่ในระยะ pre-vitellogenic (pv) และ vitellogenic oocytes (vo) พบซาก oocyte (ro) จากการปล่อยไข่ครั้งก่อน
 - H. Spent ovary พบการเหี่ยวแห้งและหดลงของ tubules มีซาก oocytes (ro) และ oocytes ที่สลายตัวจากการทำลายของ phagocytes
- (scale bar ใน A, B: 25 μ m; C: 133 μ m; D: 65 μ m; E-H: 240 μ m)

ที่มา: Ramofafia และคณะ (2003)



รูปที่ 9. แสดง Spermatogenesis ของ *Holothuria scabra*

- A., B. Late recovering/growing testis มีการขึ้นของ germinal epithelium เข้าสู่แนวกลางของ lumen และ spermatocytes ที่กำลังพัฒนาเกาะอยู่ (หัวลูกสรและลูกสร)
- C. Late-growing testis มีการสะสมของ spermatozoa (sz) ใน lumen มีการขึ้นของ germinal epithelium ที่มี spermatocyte ที่กำลังพัฒนาเกาะอยู่ (ลูกสร)
- D. Early mature testis พบ spermatozoa (sz) จำนวนมากใน lumen ยังคงพบ spermatocytes (sc) อยู่บ้าง
- E. Mature testis มีเฉพาะ spermatozoa (sz) อัดแน่น
- F., G. Partly spawned testis พบว่า spermatozoa (sz) หนาแน่นน้อยลงในรูป F และเกิดการ spermatogenesis ของ spermatocytes (sc) ใหม่ในภาพ G
- H., I. Spent testis พบว่าใน lumen ยังมี spermatozoa (sz) ที่ยังไม่ถูกปล่อย (H) หรือปล่อยเกือบหมดแล้ว (I)
- (scale bar ใน A, B: 90 μ m; C, D, G: 110 μ m; E: 750 μ m; F, H, I: 150 μ m)

ที่มา: Ramofafia และคณะ (2003)



รูปที่ 10. แสดงลักษณะของ gonad ที่มองเห็นด้วยตาเปล่าของ *Holothuria atra*

เพศผู้ (A: ระยะที่ 1; B: ระยะที่ 2; C: ระยะที่ 3; D: ระยะที่ 4)

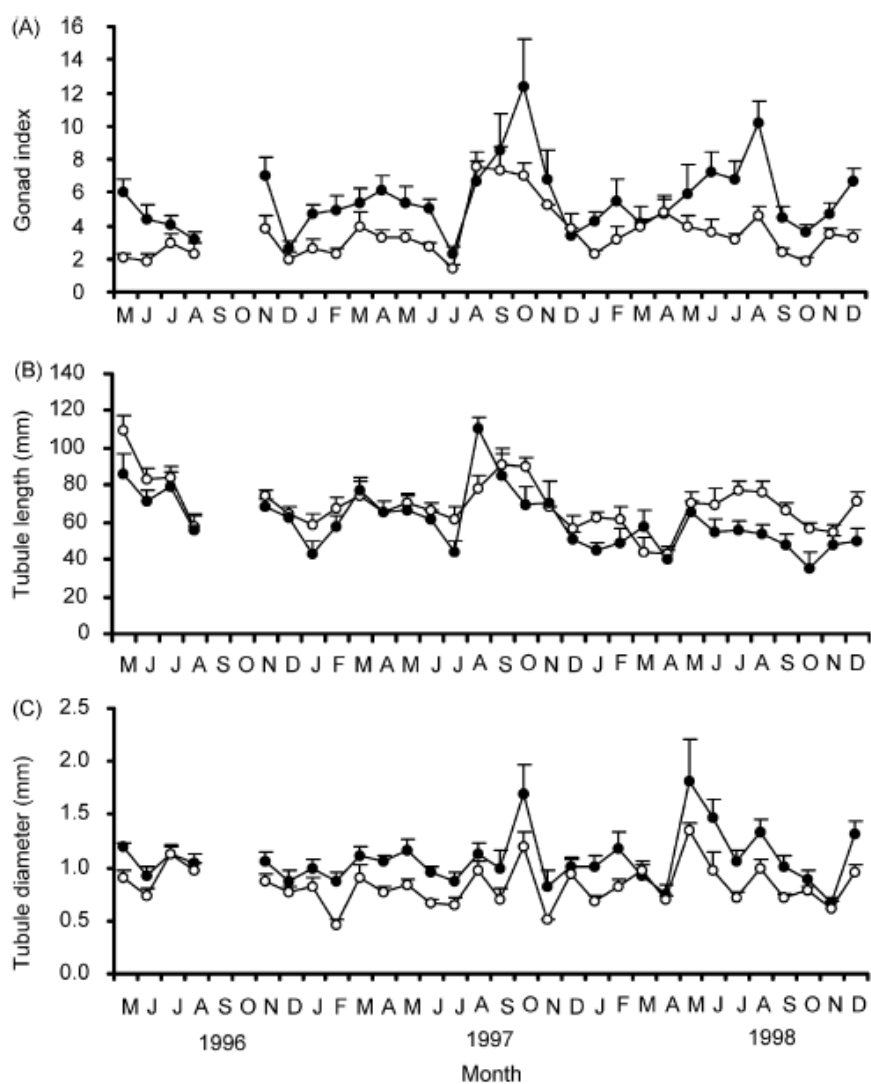
เพศเมีย (E: ระยะที่ 1; F: ระยะที่ 2; G: ระยะที่ 3; H: ระยะที่ 4)

ที่มา: Abdel-Razek และคณะ (2005)

6. ดัชนีความสมบูรณ์เพศและขนาดของ tubule (Gonad index and tubule size) ใน *H. scabra* แถบหมู่เกาะโซโลมอน (Solomon Islands)

Ramofafia และคณะ (2003) ได้ศึกษาเกี่ยวกับความสมบูรณ์เพศของปลิงทะเล *H. scabra* ใน Kong Halangi Bay, Solomon Islands ปี 1996-1998 พบว่าค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (Gonad index; GI) ของเพศเมียมีค่ามากที่สุดในเดือนตุลาคม (ปี 1997) และรองลงมาคือเดือนสิงหาคม ปี 1998 (รูปที่ 11A) สำหรับเพศผู้มีค่า GI มากที่สุดในเดือนสิงหาคมถึงเดือนตุลาคม ในปี 1997 และค่า GI ต่ำที่สุดของทั้งสองเพศ อยู่ในช่วงเดือนกรกฎาคม ปี 1997

ขนาดเฉลี่ยของ tubule ทั้งสองเพศ มีความแตกต่างกัน และไม่สอดคล้องค่า GI (รูปที่ 11) ในปี 1997 พบว่ารังไข่มี tubule ยาวที่สุดในเดือนสิงหาคม ซึ่งเป็นเวลา 2 เดือน ก่อนที่ค่า GI มากที่สุด และเส้นผ่านศูนย์กลางของ tubule ในรังไข่ ที่มากที่สุดในเดือนกันยายน ปี 1997 และเดือนเมษายน ปี 1998 สำหรับอัมชะมีการเปลี่ยนแปลงขนาดความยาวและเส้นผ่านศูนย์กลางของ tubule คล้ายกันกับ tubule ของรังไข่ (รูปที่ 11B, C)



รูปที่ 11. *H. scabra* ที่รวบรวมจาก Kong Halingi Bay, Solomon Islands เป็นเวลา 3 ปี (1996-1998)

(เพศเมีย, วงกลมสีดำ; เพศผู้, วงกลมสีขาว)

A แสดง gonad index ในระยะเวลา 3 ปี

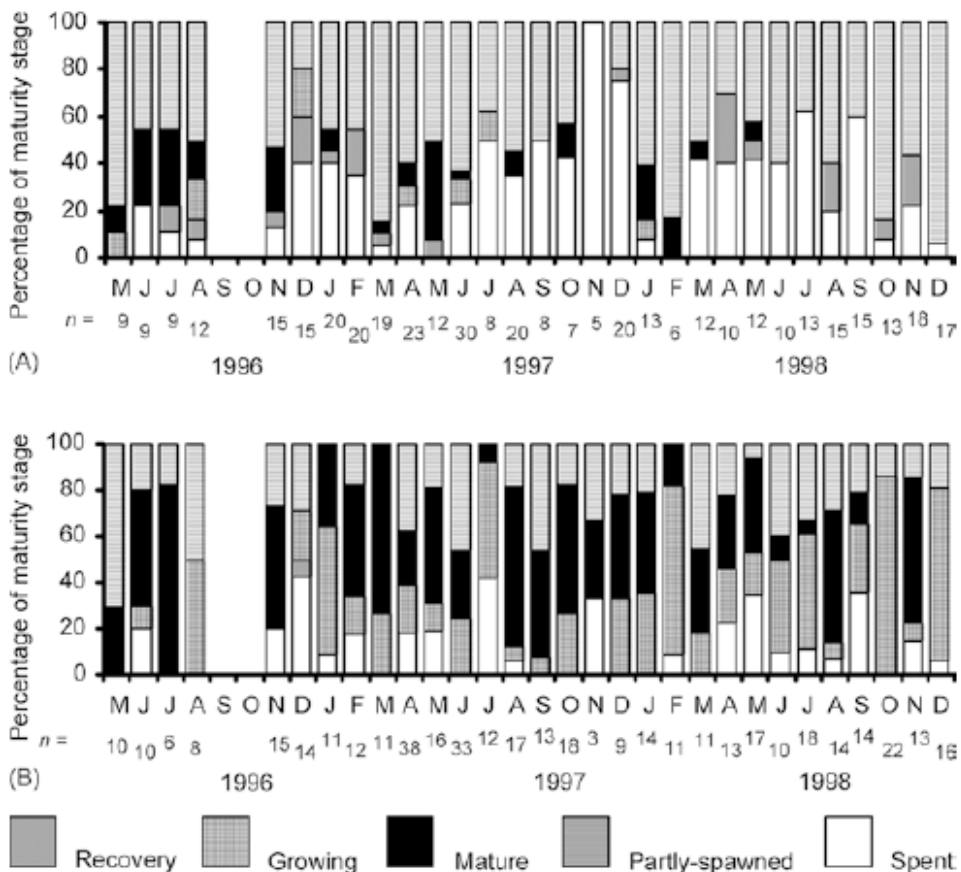
B แสดงความยาวของ gonad tubule ในระยะเวลา 3 ปี

C แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ gonad tubule ในระยะเวลา 3 ปี

ที่มา: Ramofafia และคณะ (2003)

7. วงจรการสืบพันธุ์ (Reproductive cycle) ของ *H. scabra*

Ramofafia และคณะ (2003) รายงานว่า พัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ของ *H. scabra* ในแถบ Solomon Islands ไม่มีรูปแบบของช่วงฤดูกาลที่แน่นอน และพบระยะ mature stage และการวางไข่ได้ตลอดทั้งปี (รูปที่ 12)



รูปที่ 12. ระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเล *H. scabra* ในแถบ Solomon Islands ในระยะเวลา 3 ปี (1996-1998) A: เพศเมีย และ B: เพศผู้ (n คือ จำนวนปลิงทะเลในแต่ละเดือน)

ที่มา: Ramofafia และคณะ (2003)

8. องค์ประกอบทางเคมีของเนื้อปลิงทะเล

Chen (2003) รายงานค่าองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition) ของปลิงทะเลดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าปลิง *Acaudina molpadioides*, *Apostichopus japonicus* และ *Thelenota ananas* มีไขมันน้อย มีโปรตีนสูงโดยเฉพาะในปลิงทะเลแห้ง และวิเคราะห์กรดอะมิโน

ทั้งในปลิงทะเลแห้งและสดดังแสดงในตารางที่ 5 Lovatelli และคณะ (2004) รายงานเกี่ยวกับกรดอะมิโนในปลิงทะเล 6 ชนิด ได้แก่ *H. scabra*, *Holothuria nobilis*, *Holothuria impatiens*, *Holothuria insignis*, *Holothuria multipilula*, *Actinopyga echinites* และ *T. ananas* ซึ่งพบทั้งกรดอะมิโนจำเป็นและกรดอะมิโนไม่จำเป็นดังแสดงในตารางที่ 6 และแร่ธาตุต่างๆ หลายชนิดดังแสดงในตารางที่ 7 Chen (2003) รายงานว่าปลิงทะเลชนิด *A. molpadioides* และ *T. ananas* มีวิตามินต่างๆ รวมทั้ง ซาโปนินและ polysaccharides (ตารางที่ 8) Zhong และคณะ (2007) ทำการศึกษากรดไขมันในปลิงทะเลแห้งและสด ชนิด *Cucumaria frondosa* พบว่ามี 20:5n-3 หรือ EPA ร้อยละ 43-56 จากไขมันทั้งหมด ดังแสดงในตารางที่ 9 นอกจากนี้ สุทรวัดน์ (2548) รายงานว่า คอลลาเจนในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตปริมาณสูง ซึ่งสอดคล้องกับ Mourao (2007) ที่พบว่าคอลลาเจนจากปลิงทะเลมี major sulfated polysaccharides และ sulfated fucan (รูปที่ 13) และ อารมณ (2553) รายงานว่า ปลิงทะเลมีคุณค่าและประโยชน์มากมายโดยนักวิทยาศาสตร์ค้นพบว่า เนื้อของปลิงทะเลมีสารอาหารที่เป็นประโยชน์แก่ร่างกายมนุษย์มาก โดยเฉพาะมิวโคโปรตีน (mucoprotein) ซึ่งในมิวโคโปรตีนนี้ มีคอนดรอยตินซัลฟูริกแอซิด (chondroitin sulfuric acid) เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ คอนดรอยตินซัลฟูริกแอซิดเป็นองค์ประกอบของส่วนต่างๆ ของร่างกายมนุษย์ เช่น กระดูกอ่อน เอ็น และสารหล่อลื่นบริเวณข้อต่อ ดังนั้นการรับประทานปลิงทะเลจึงช่วยบรรเทาอาการเสื่อมสมรรถภาพของข้อกระดูกในผู้สูงอายุ ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ชาวจีนนิยมบริโภคปลิงทะเลเพื่อเป็นยาอายุวัฒนะมาตั้งแต่สมัยโบราณ อีกทั้งเนื้อปลิงทะเลยังมีไขมันต่ำมาก จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผู้ต้องการควบคุมปริมาณไขมันในอาหารได้ด้วย

จรัสศรี และคณะ (2551) และ Van Dyck และคณะ (2010) รายงานว่า ทางการศึกษาพบปลิงทะเลบางชนิดมี "ฮอโลทูริน" (holothurin) จาก cuvierian tubule ที่ปลิงทะเลปล่อยออกมาเพื่อป้องกันตนเอง พบว่ามีคุณสมบัติในการขัดขวางการส่งความรู้สึกของกระแสประสาทได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการบำบัดความเจ็บปวดของผู้ป่วยหลังการผ่าตัดได้ นอกจากนี้ฮอโลทูรินยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรโตซัว นอกจากนี้ทางการแพทย์ยังพบว่า สารสกัดจากปลิงที่มีชื่อว่าสารซาโปนิน (saponin) ที่เรียกว่า "ฮอโลท็อกซิน" (holotoxin) สามารถนำมาพัฒนาเป็นยาต้านการกระจายตัวของเซลล์มะเร็ง และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดได้ นอกจากนี้ยังมีการนำปลิงทะเลมาเป็นส่วนผสมของโลชั่นบำรุงผิว สบู่ ยาสีฟัน หรือบรรจุแคปซูล เป็นอาหารเสริมสุขภาพ แม้กระทั่งน้ำจากการต้มปลิงทะเลยังสามารถนำมาทำยาแก้แผลพุพองหรือแก้คันจากยุงกัดอีกด้วย

ตารางที่ 4. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition) ของปลิงทะเล

Item	Protein %	Fat %	Moisture %	Carbohydrate %	Ash %
Fresh <i>Acaudina molpadioides</i>	12.94	0.03	77.00	0.43	1.03
Fresh body wall of <i>Acaudina molpadioides</i>	11.52	0.03	87.83	0.38	0.99
Dried <i>Acaudina molpadioides</i>	68.53	0.55	8.25	--	7.56
Fresh body wall of <i>Thelenota ananas</i>	16.64	0.27	76.97	2.47	1.60
Dried <i>Thelenota ananas</i>	69.72	3.70	8.55	--	9.51
Dried <i>Apostichopus japonicus</i>	55.51	1.85	21.55	--	21.09

ที่มา: Chen (2003)

ตารางที่ 5. กรดอะมิโนในปลิง *Acaudina molpadioides* และ *Thelenota ananas*

Amino acids	Fresh <i>Acaudina molpadioides</i> $\times 10^{-2}$	Fresh body wall of <i>Thelenota ananas</i> $\times 10^{-2}$	Dried <i>Acaudina molpadioides</i> $\times 10^{-2}$	Dried <i>Thelenota ananas</i> $\times 10^{-2}$
Asp	1.387	1.890	6.260	5.78
Thr**	0.519	0.712	2.438	2.58
Ser	0.459	0.721	2.008	2.07
Glv	1.658	2.865	8.994	7.86
Pro	1.302	1.408	--	1.03
Gly	2.502	2.724	14.424	10.03
Ala	1.662	1.703	5.771	5.20
Cys	0.387	--	--	--
Val**	0.374	0.688	1.944	2.43
Met**	0.158	0.339	0.614	0.86
Ile**	0.189	0.473	0.965	1.64
Lev**	0.359	0.780	1.684	2.59
Tyr	0.195	0.435	0.655	1.41
Phe**	0.223	0.567	0.847	1.67

ตารางที่ 5. กรดอะมิโนใน *Acaudina molpadioides* และ *Thelenota ananas* (ต่อ)

Amino acids	Fresh <i>Acaudina molpadioides</i> x 10 ⁻²	Fresh body wall of <i>Thelenota ananas</i> x 10 ⁻²	Dried <i>Acaudina molpadioides</i> x 10 ⁻²	Dried <i>Thelenota ananas</i> x 10 ⁻²
His	0.091	0.213	0.728	0.40
Lys**	0.182	0.524	1.288	0.92
Arg	0.647	0.773	3.778	4.46
Total	12.330	16.815	52.398	50.93

** Essential amino acids

ที่มา: Chen (2003)

ตารางที่ 6. ปริมาณกรดอะมิโนไม่จำเป็น และกรดอะมิโนจำเป็นของปลิงทะเล 7 ชนิด (เปอร์เซ็นต์)

Amino acid	A	B	C	D	E	F	G
Non-essential amino acids							
Asp	3.69	6.59	5.20	3.26	3.50	4.84	5.78
Ser	1.31	2.91	2.53	1.33	1.48	2.16	2.07
Glu	6.43	11.13	9.82	5.72	6.75	8.30	7.86
Pro	3.08	3.32	4.57	2.40	3.35	4.11	1.03
Gly	8.09	17.08	10.02	4.50	7.32	8.43	10.03
Ala	4.10	8.41	5.54	2.69	4.10	4.80	5.02
Cys	0.46	-	0.49	0.52	-	1.17	-
Tyr	0.99	1.65	1.55	1.12	1.06	1.70	1.41
Phe	1.15	1.45	1.78	1.40	1.12	1.99	1.67
<i>Sub-total</i>	<i>29.30</i>	<i>52.54</i>	<i>41.50</i>	<i>22.94</i>	<i>28.68</i>	<i>37.50</i>	<i>34.87</i>
Essential amino acids							
Lys	0.64	1.02	1.59	0.38	1.09	1.45	0.92
His	0.17	0.37	0.45	2.82	0.24	0.42	0.40
Arg	3.40	6.60	4.95	1.63	3.45	4.23	4.46
Val	1.59	2.64	2.23	1.09	1.78	2.50	2.43

ตารางที่ 6. ปริมาณกรดอะมิโนไม่จำเป็น และกรดอะมิโนจำเป็นของปลิงทะเล 7 ชนิด (%) (ต่อ)

Amino acid	A	B	C	D	E	F	G
Essential amino acids							
Met	0.89	1.03	1.40	1.21	0.90	1.49	0.86
Ile	0.76	1.39	1.45	1.93	0.98	1.51	1.64
Leu	1.49	2.64	2.64	1.74	1.75	2.63	2.59
Thr	1.68	3.44	2.68	-	1.89	2.48	2.58
<i>Sub-total</i>	<i>10.62</i>	<i>19.13</i>	<i>17.39</i>	<i>10.80</i>	<i>12.08</i>	<i>16.75</i>	<i>15.88</i>
Total	39.92	71.67	58.89	33.74	40.76	54.25	50.75

A: *H. scabra*; B: *H. nobilis*; C: *H. impatiens*; D: *H. insignis*; E: *H. multipilula*; F: *A. echinites*;

G: *T. ananas*

ที่มา : Lovatelli และคณะ (2004)

ตารางที่ 7. แร่ธาตุต่าง ๆ ที่มีอยู่ในปลิงทะเล 7 ชนิด (ppm)

Element	A	B	C	D	E	F	G
Ba	2.0	6.4	1.7	1.0	2.9	3.6	2
Co	0.4		0.2	0.4	1.7	0.7	0.4
Cr	10.1	12.9	15.3	9.3	4.4	11.5	10.1
Cu	6.1	1.3	5.9	2.0	2.5	1.8	6.1
Li	2.0	1.2	1.7	1.0	1.9	1.4	2
Mn	19.1	2.6	4.1	5.8	11.6	36.1	4.1
Ni	2.9	2.5	5	2.3	1.9	2.1	5
Si	110	12.9	170	11.5	77.6	65	46.6
Sr	616	181	119	57.8	874	64	162
V		0.51	0.51	0.34	0.97	0.72	1.01
Zn	28.6	7.77	40.9	10.4	9.71	26	70.9

A: *H. scabra*; B: *H. nobilis*; C: *H. impatiens*; D: *H. insignis*; E: *H. multipilula*; F: *A. echinites*;

G: *T. ananas*

ที่มา : Lovatelli และคณะ (2004)

ตารางที่ 8. วิตามิน (ppht) ซาโปนิน (ppt) และ polysaccharides (ppht) ในปลิงทะเล *Acaudina molpadioides* และ *Thelenota ananas*

	Vitamins						Saponins x10 ⁻³	Polysac- charides x10 ⁻⁵
	B1 x10 ⁻⁵	B2 x10 ⁻⁵	B6 x10 ⁻⁵	A x10 ⁻⁵	D x10 ⁻⁵	E x10 ⁻⁵		
Fresh <i>A. molpadioides</i>	0.114	0.15	0.039	0.15	0.0066	3.95	26.76	4.21
Frsh body wall of <i>A. molpadioides</i>	0.102	0.13	0.035	0.13	0.0059	3.52	26.50	3.75
Frsh body wall of <i>T. ananas</i>	0.782	0.23	19.000	0.35	0.0180	0.90	379.40	4.12

ที่มา: Chen (2003)

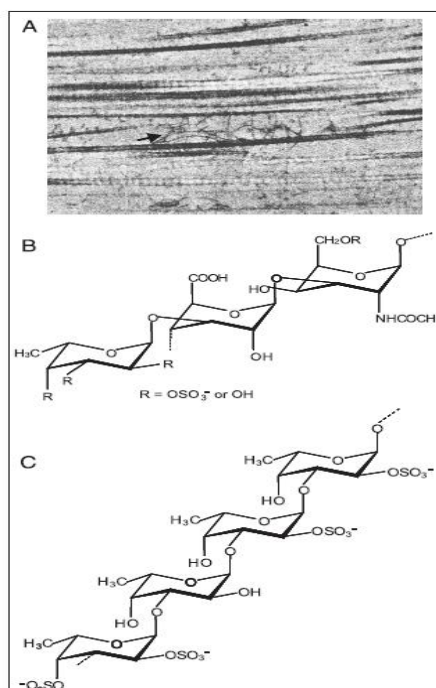
ตารางที่ 9. องค์ประกอบกรดไขมัน (%น้ำหนัก; Mean ± SD, n=5) จากปลิงทะเลสดและแห้ง ชนิด *Cucumaria frondosa*

Fatty acid	F	F+O	R	R+O
14:0	1.88±0.01 a	1.88±0.03 a	1.42±0.03 b	1.39±0.08 b
ai-15:0 ^b	2.18±0.20 c	4.03±0.48 b	3.92±0.31 b	8.98±0.32 a
16:0	2.33±0.03 b	2.83±0.34 a	2.14±0.08 b	2.30±0.09 b
16:1n7	5.75±0.03 c	7.36±0.88 b	6.05±0.28 c	11.3±0.25 a
17:0	0.64±0.00	0.35±0.13	0.52±0.11	0.67±0.22
17:1n7	3.87±0.04 a	2.44±0.98 b	3.44±0.14 a	2.45±0.04 b
16:4n3	2.39±0.07 bc	5.74±2.25 a	3.67±0.69 ab	1.31±0.30 c
18:0	5.41±0.02 a	4.20±0.03 b	2.54±0.09 c	1.51±0.06 d
18:1n9	2.43±0.02 c	3.72±0.01 a	2.60±0.07 b	2.32±0.05 d
18:1n7	3.52±0.02 a	3.37±0.10 a	3.01±0.10 b	3.36±0.11 a
20:1n9	4.00±1.04 a	1.66±0.14 b	1.85±0.21 b	1.35±0.24 c
20:3n3	5.00±0.15 b	2.54±0.05 c	5.65±0.19 a	4.05±0.14 b
20:5n3	46.1±0.31 c	43.2±0.96 d	56.7±1.96 a	52.0±1.89 b
22:0	1.95±0.07 b	2.09±0.04 ab	1.95±0.04 b	2.28±0.25 a
22:1n9	2.25±0.04	3.34±1.30	nd ^c	nd
22:6n3	4.96±0.01 b	5.81±0.62 a	2.28±0.19 c	2.03±0.07 c
others	5.37±0.19 a	5.57±0.57 a	2.29±0.16 c	2.76±0.09 b

F คือ ปลิงทะเลสด ไม่มีอวัยวะภายใน, F+O คือ ปลิงทะเลสด มีอวัยวะภายใน

R คือ ปลิงทะเลแห้ง ไม่มีอวัยวะภายใน, R+O คือ ปลิงทะเลแห้ง มีอวัยวะภายใน

ที่มา: Zhong และคณะ (2007)



รูปที่ 13. Electron micrograph ของ body wall ของปลิงทะเลแสดง collagen fibrils และ microfibrils (ครีซี) (A) โครงสร้างของ major sulfated polysaccharides ที่สกัดจากเนื้อเยื่อ ซึ่งเป็น fucosylated chondroitin sulfate (B) และ โครงสร้างของ sulfated fucan (C)

ที่มา: Mourao (2007)

9. องค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์ตัวนำกับการสร้างสูตรอาหาร

มีรายงานการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ ในปลิงทะเลชนิด *Cucumaria frondosa* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย พบว่ามีไขมันมากที่สุด รองลงมาเป็น โปรตีนและไกลโคเจน และพบว่าปริมาณ โปรตีนและไกลโคเจนแตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับอาหารสูตรพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์กับกลุ่มที่ไม่ได้รับ โดยเปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังการวางไข่ (David and MacDonald, 2002)

ในหอยเม่น *Strongylocentrotus droebachiensis* ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีมูลค่าสูง ได้มีการศึกษา gonadosomatic index และ proximate composition ของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยศึกษาในหอยเม่นที่ทำการเพาะเลี้ยงโดยได้รับสูตรอาหารที่จัดทำขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 10 พบว่า gonadosomatic index ค่าเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 11) และองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition) (ตารางที่ 12) พบว่ามีความชื้นเพิ่มขึ้น ซึ่งตรงกันข้ามกับไขมัน สำหรับเจ้าและโปรตีนจะมีผลเล็กน้อยหลังจากได้รับอาหาร แต่คาร์โบไฮเดรตไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P > 0.05$) (Liyana-Pathirana *et al.*, 2002) และการทดลองของ Olave และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษา

อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเม่นชนิด *Loxechinus albus* โดยทำการเปรียบเทียบหอยเม่นที่ให้อาหารธรรมชาติเป็นกลุ่มควบคุม และให้อาหารที่ผลิตขึ้นเป็นกลุ่มทดลอง ซึ่งใช้หอยเม่น 4 ขนาดด้วยกัน คือ หอยเม่นที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 40-45, 50-55, 60-65 และ 70-75 มิลลิเมตร พบว่าหอยเม่นทั้ง 4 ขนาดจะมีอวัยวะสืบพันธุ์ใหญ่ขึ้นเมื่อได้รับอาหารในสูตรที่สร้างขึ้น

ตารางที่ 10. ส่วนประกอบของสูตรอาหารที่จัดทำขึ้นให้กับหอยเม่น *Strongylocentrotus droebachiensis*

Constituent	Content (%)
Soy meal	19.6
Wheat middling	19.6
Barley	19.6
Corn meal	19.6
<i>Laminaria longicuris</i>	10.0
Gelatin	5.0
Lecithin	5.0
Sodium alginate	1.5

ที่มา: Liyana-Pathirana และคณะ (2002)

ตารางที่ 11. Gonadosomatic index ของหอยเม่น *Strongylocentrotus droebachiensis* ที่ได้รับอาหารสูตรพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์

Harvest level	Average diameter (cm)	Average weight (g)	Gonadosomatic index (%)
week 0	3.3±0.3 ^a	43.7±3.9 ^a	9.1±2.1 ^a
week 3	3.4±0.1 ^a	45.0±2.7 ^a	11.7±2.7 ^a
week 6	3.3±0.2 ^a	44.3±2.1 ^a	15.7±1.9 ^{ab}
week 9	3.2±0.1 ^a	43.3±2.0 ^a	21.3±1.8 ^b

ที่มา: คัดแปลงจาก Liyana-Pathirana และคณะ (2002)

ตารางที่ 12. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition) ของอวัยวะสืบพันธุ์ของ
หอยเม่น *Strongylocentrotus droebachiensis*

Constituent	Week 0	Week 3	Week 6	Week 9
Moisture (%)	74.7 (0.04) ^a	77.4 (0.02) ^b	77.9 (0.04) ^c	75.5 (0.02) ^d
Ash (%)	2.2 (0.2) ^a	1.2 (0.04) ^{bc}	1.0 (0.02) ^{bc}	1.4 (0.1) ^c
Protein (%)	7.4 (0.2) ^a	6.0 (0.3) ^b	5.8 (0.1) ^b	7.9 (0.1) ^a
Lipid (%)	4.7 (0.1) ^a	4.0 (0.2) ^{bc}	4.5 (0.1) ^{ab}	3.8 (0.2) ^c
Carbohydrate (%)	10.6 (0.2) ^a	11.6 (0.3) ^a	11.0 (0.2) ^a	11.2 (0.2) ^a

ที่มา: ดัดแปลงจาก Liyana-Pathirana และคณะ (2002)

Cerda และคณะ (1994) ทำการศึกษาพ่อแม่พันธุ์ของปลากระพง *Dicentrarchus labrax* โดยสร้างสูตรอาหาร D1 ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน 51% ไขมัน 13% และ คาร์โบไฮเดรต 10% และ สูตรอาหาร D2 ซึ่งประกอบด้วย โปรตีน 34% ไขมัน 14% และ คาร์โบไฮเดรต 32% สูตรทั้ง 2 มีความแตกต่างกันระหว่างปริมาณ โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต พบว่าปลาที่ได้รับอาหาร D2 โดยเฉพาะเพศเมียมีการเจริญเติบโตน้อยลงในช่วงเดือนแรก การวางไข่ต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหาร D1 อีกทั้งการลอยตัวและความสามารถในการฟักไข่น้อยกว่าปลาที่ได้รับอาหาร D1 นอกจากนี้ ปลากลุ่ม D2 จะมีการฟักเป็น larvae ที่ฟักมากกว่า 50% ดังนั้นจึงบ่งชี้ว่า ระดับโปรตีนและ คาร์โบไฮเดรตจากสารอาหาร ที่พ่อแม่พันธุ์ได้รับ มีผลอย่างมากต่อการสืบพันธุ์และอัตราการรอดของ รุ่นลูก

Martinez และคณะ (2000) รายงานว่าการลดระดับคาร์โบไฮเดรตในกล้ามเนื้อของ หอยแครงชนิด *Argopecten purpuratus* ลง จะทำให้เกิดการสะสมของโปรตีนและไขมันในอวัยวะ สืบพันธุ์โดยคาร์โบไฮเดรตที่ลดลงเรื่อยๆ จะทำให้มีโปรตีนและไขมันสะสมอยู่ที่อวัยวะสืบพันธุ์ มากซึ่งส่งผลให้อวัยวะสืบพันธุ์มีสีแดงชัดเจน นอกจากนี้ได้มีรายงานว่ามีการสำรองคาร์โบไฮเดรต ในกล้ามเนื้อไว้เพื่อเตรียมเป็นพลังงาน หรือเป็น precursors สำหรับสังเคราะห์ไขมันและโปรตีนใน อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยแครงชนิด *Argopecten purpuratus* และได้มีการทดลองวัดระดับไกลโค เจนในกล้ามเนื้อและอัตราการใช้ออกซิเจนต่อการปล่อยไนโตรเจน หรือ O/N ratios ในระหว่างการ เจริญของเซลล์เพศของหอยแครงชนิด *Argopecten irradians concentricus* พบว่าคาร์โบไฮเดรตใน กล้ามเนื้อจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นไขมันเก็บไว้เพื่อการพัฒนาของเซลล์ไข่ (Barber and Blake, 1985)

บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วิธีดำเนินการ

1. การเก็บตัวอย่าง

รวบรวมปลิงทะเลขาวจากธรรมชาติในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2554 และ เดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 ในทะเลฝั่งอันดามันบริเวณเกาะปู อ. เหนือคลอง จ. กระบี่ ห่างจากฝั่งประมาณ 10-15 กิโลเมตร น้ำลึกประมาณ 1-2 เมตร น้ำหนักตัวปลิงประมาณ 200-1,200 กรัม เลือกเฉพาะปลิงที่มีสุขภาพดี ไม่มีแผลที่ผิวหนัง ผิวหนังเรียบมีความแวววาว มี mucous layer ที่ใส เมื่อถูกสัมผัสจะเคลื่อนไหวได้ช้าๆ โดยทำความสะอาดปลิงทะเลขาวอย่างนุ่มนวลก่อนบรรจุลงในถุงพลาสติกถุงละหนึ่งตัว ใส่น้ำทะเล 1 ลิตร บรรจุออกซิเจนในถุง และนำไปใส่ในกล่องโฟมก่อนทำการขนส่งมายังศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง (ศวพก.) อ. ไชยา จ. สุราษฎร์ธานี (รูปที่ 15)

แบ่งปลิงออกเป็น 2 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 นำมาบันทึกน้ำหนักตัว (รูปที่ 14) ถ่ายรูป และตรวจสอบลายเส้นขวางบนลำตัว (รายละเอียดในวิธีการทดลองข้อ 5) ฝาลำตัวเพื่อนำอวัยวะสืบพันธุ์ออกมา และบันทึกน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ ถ่ายรูปอวัยวะสืบพันธุ์ ศึกษารูปร่าง สี และขนาด และตัดชิ้นส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ ความยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร แช่ในน้ำยารักษาสภาพ Davidson's fixative และ 4% glutaraldehyde เพื่อนำไปผ่านกระบวนการเนื้อเยื่อวิทยา และการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน และนำอวัยวะสืบพันธุ์ส่วนที่เหลือ พร้อมทั้งกล้ามเนื้อผนังลำตัว เก็บไว้ในตู้เย็นที่ -80 °C เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีภายหลัง

กลุ่มที่ 2 เลี้ยงไว้ในบ่อพักน้ำที่ ศวพก. (รูปที่ 16) เพื่อนำมาชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อหาระยะเวลาในแต่ละรอบของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ บ่อพักน้ำมีขนาด กว้าง 12 เมตร ยาว 20 เมตร และลึก 3 เมตร ด้านในของบ่อปูด้วยพลาสติก (polyethelene, PE) บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30-33 ppt ในบ่อมีปลาและหอยชนิดต่างๆ ในสภาพกึ่งธรรมชาติ โดยเลี้ยงปลิงทะเลไว้ในกระชังกว้าง 1 เมตร ยาว 1 เมตร และสูง 0.5 เมตร ตาอวนขนาด 2 เซนติเมตร (รูปที่ 17) ภายในมีทรายและสาหร่ายพมนาง (*gracillaria* sp.) (รูปที่ 18) เลี้ยงปลิงที่ความหนาแน่น 1 ตัวต่อตารางเมตร



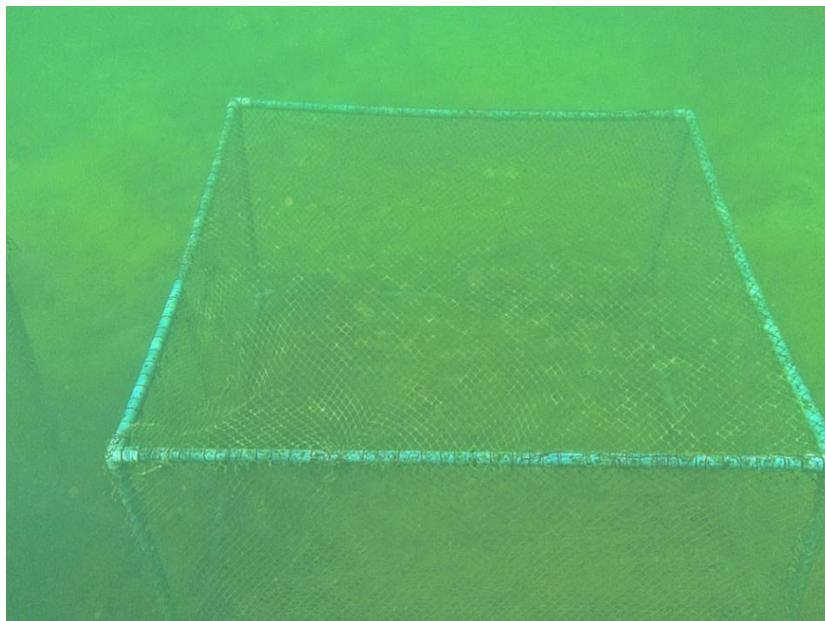
รูปที่ 14. ชั่งน้ำหนักปลิงทะเลขาวเป็นรายตัว



รูปที่ 15. การขนส่งปลิงทะเลขาว



รูปที่ 16. บ่อพักน้ำที่เป็นบ่อดินที่ สวพท. ขนาด 12x20x3 เมตรปูด้วยพลาสติก



รูปที่ 17. กระจังเลี้ยงปลิงทะเลขนาด 1x1x0.5 เมตร ตาอวนกว้างประมาณ 2 เซนติเมตร



รูปที่ 18. ภายในกระชังเลี้ยงปลิงทะเลขาวมีทรายหรือโคลนปนทรายรวมทั้งสาหร่าย *gracillaria* sp.

2. การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์และผ่านกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นำอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาวที่ได้จากกลุ่มที่ 1 มาทำการทดลอง โดยการสังเกต ลักษณะ จำนวนแขนง สี และวัดความยาวและเส้นผ่านศูนย์กลางของแขนง แล้วตัดอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงแต่ละตัวความยาว 0.5-1 เซนติเมตร เพื่อ

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยการเก็บตัวอย่างไว้ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้น นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Humason (1979) นำตัวอย่างที่ผ่านการย้อมสี haematoxylin และ eosin มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) (วิธีการโดยละเอียดกล่าวไว้ในภาคผนวก)

การศึกษาทางกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เก็บตัวอย่างรักษาสภาพใน 4% paraformaldehyde ที่เตรียมด้วยน้ำทะเลเทียม นาน 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4°C ล้างใน phosphate buffer saline (PBS) นำมาใส่น้ำยารักษาสภาพอีกครั้ง (post-fixed) ด้วย 1% osmium tetroxide (OsO_4) ทำการ dehydrate ในน้ำยาเอธานอล ทำการ embed ใน resin (London Resin Company, Ltd., England, UK) ตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome ที่ความหนา 90 nm ย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate และศึกษาภายในกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope, TEM) (100-CX II, JEOL)

3. การศึกษาฤดูวางไข่

การหาฤดูวางไข่ของปลิงทะเลขาว ได้จากการหาช่วงเดือนที่ปลิงทะเลมีความพร้อมที่จะวางไข่ โดยการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของปลิงทะเลขาวเพศผู้และเพศเมียที่อยู่ในระยะเจริญพันธุ์ (เสาวนีย์, 2539) และค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index ; G.S.I.) (ธนัญญา, 2543; Romafafia *et al.*, 2003) ของปลิงทะเลขาวเปรียบเทียบในแต่ละเดือน ในรอบปี โดยวิธีดังนี้

การหาเปอร์เซ็นต์ของปลิงทะเลขาวเพศเมียและเพศผู้ที่อยู่ในระยะเจริญพันธุ์

โดยการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของปลิงทะเลเพศเมียและเพศผู้ที่อยู่ในระยะเจริญพันธุ์ในแต่ละเดือน โดยใช้สูตร

$$P = \left(\frac{N_M}{N} \right) \times 100$$

โดยที่ P = เปอร์เซนต์ปลิงทะเลเพศเมียหรือเพศผู้ที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์อยู่ในระยะเจริญพันธุ์

N_M = จำนวนปลิงทะเลเพศเมียหรือเพศผู้ที่อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์อยู่ในระยะเจริญพันธุ์

N = จำนวนปลิงทะเลเพศเมียหรือเพศผู้ทั้งหมด

ถ้าค่าเปอร์เซ็นต์ของปลิงทะเลขาวเพศผู้หรือเพศเมียที่อยู่ในระยะเจริญพันธุ์มีค่าสูงในช่วงเดือนใด แสดงว่าช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงฤดูวางไข่ของปลิงทะเลขาว

การหาค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index; G.S.I.)

วิเคราะห์ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index ; G.S.I.) (ธนัญญา, 2543 และ Ramofafia *et al.*, 2003) ของปลิงทะเลเพศเมียและเพศผู้โดยนำข้อมูลน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์และน้ำหนักของตัวปลิงที่มีอวัยวะสืบพันธุ์รวมอยู่ด้วย มาคำนวณดังนี้

$$G.S.I. = \left(\frac{GW}{BW} \right) \times 100$$

โดยที่ $G.S.I.$ = ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ

GW = น้ำหนักของรังไข่ (กรัม)

BW = น้ำหนักตัวของปลิงที่มีรังไข่รวมอยู่ด้วย (กรัม)

เมื่อได้ค่า G.S.I. ของปลิงทะเลขาวแต่ละตัวแล้ว คำนวณหาค่าเฉลี่ยดัชนีความสมบูรณ์เพศ (mean gonadosomatic index) ของปลิงทะเลขาวแต่ละเดือน ซึ่งค่าที่ได้มีค่าสูงในเดือนใด แสดงว่าช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงฤดูวางไข่ของปลิงทะเลขาว

4. การศึกษารอบของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในฤดูวางไข่

ใช้ปลิงทะเลขาวกลุ่มที่ 2 ที่เลี้ยงไว้ในกระชังในบ่อพักน้ำที่ สวพท. นำมาชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ การชักนำแต่ละครั้งใช้ปลิงประมาณ 10 ตัว การชักนำจะทำในวันที่สัมพันธ์กับข้างขึ้นข้างแรม คือ วันที่พระจันทร์เต็มดวง (ขึ้น 15 ค่ำ) วันพระจันทร์มีดครึ่งดวง (แรม 8 ค่ำ) วันพระจันทร์มีดเต็มดวง (แรม 15 ค่ำ) หรือ วันพระจันทร์มีดครึ่งดวง (ขึ้น 8 ค่ำ) ทั้งนี้อาจชักนำก่อนหรือหลังได้ประมาณ 1-2 วัน โดยในช่วงแรกทำการชักนำห่างกัน 2 สัปดาห์ ถ้าหากสามารถชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ทุก 2 สัปดาห์ ก็ลดเวลาลงเหลือชักนำทุก 1 สัปดาห์ การชักนำแต่ละครั้งเริ่มทำตั้งแต่วันที่ 13.00 นาฬิกา

วิธีการชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (Agudo, 2006) มี 5 ขั้นตอน คือ

1. ทำให้แห้ง (dry treatment) โดยให้ปลิงทะเลขาวอยู่ในถังพลาสติกขนาด 500 ลิตร ที่แห้งสนิทหรือมีน้ำทะเลประมาณ 2 เซนติเมตร ในที่ร่ม นาน 30-45 นาที (รูปที่ 19)
2. ใช้ความดันน้ำ (water pressure) โดยการฉีดด้วยน้ำทะเลอย่างแรงนาน 2-3 นาที (รูปที่ 20) และเติมน้ำในแทงค์จนได้ปริมาณ 250-300 ลิตร
3. ใช้ความเย็น (cold shock) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยการแช่ถุงน้ำแข็งลงไปในถังที่มีปลิงทะเล (รูปที่ 21) อุณหภูมิสุดท้ายอยู่ที่ 24-26 °C
4. ใช้ความร้อน (thermal stimulation) โดยการย้ายปลิงลงในถังใหม่ที่มีน้ำทะเลอุณหภูมิ 32-33 °C ด้วยการใช้เครื่องทำความร้อน (heaters) ให้อยู่เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง (รูปที่ 22)
5. ใช้อาหาร (food stimulants) ด้วยการเติมสาหร่ายแห้ง *Spirulina* ในอัตราส่วน 30 กรัม ต่อน้ำทะเล 300-500 ลิตร (รูปที่ 23) และกวนน้ำนาน 1 ชั่วโมง
6. ย้ายปลิงทะเลไปยังถังวางไข่ขนาด 1 ตัน บรรจุน้ำทะเล 400-500 ลิตร หรือสูงประมาณ 45-55 เซนติเมตร ความเค็ม 30 ppt อุณหภูมิน้ำปกติที่ 28-30 °C และคลุมถังให้มีดสนิท (รูปที่ 24)



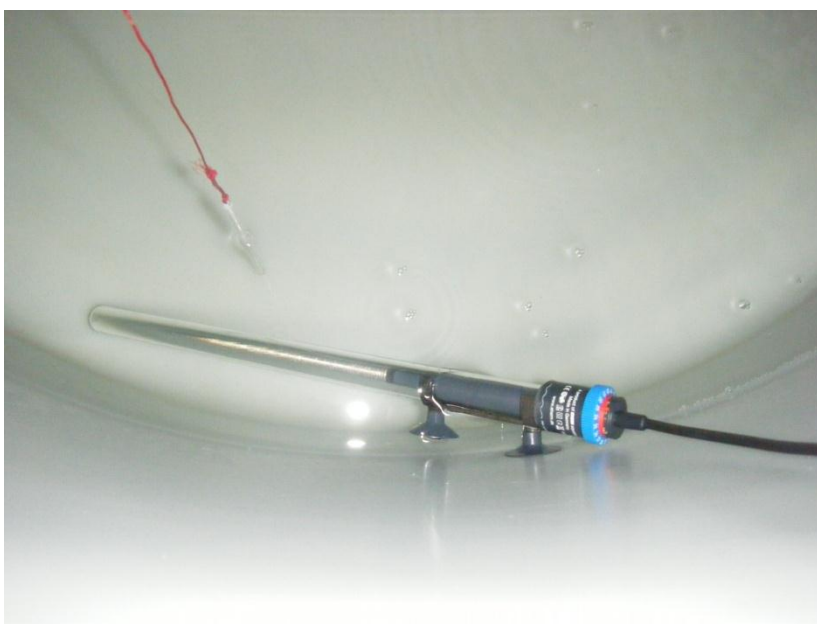
รูปที่ 19. การชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นตอนที่ 1 โดยการใช้วิธีทำให้แห้ง (dry treatment)



รูปที่ 20. การชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นตอนที่ 2 โดยการใช้ความดันน้ำ (water pressure)



รูปที่ 21. การชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นตอนที่ 3 โดยการใช้ความเย็น (cold shock)



รูปที่ 22. การชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นตอนที่ 4 โดยการใช้ความร้อน (thermal stimulation)



รูปที่ 23. การชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นตอนที่ 5 โดยการใช้อาหาร (food stimulants) ด้วยการเติมสาหร่ายแห้ง *Spirulina* ที่ อัตรา 30 กรัม ต่อน้ำทะเล 300-500 ลิตร



รูปที่ 24. ถังวางไข่ของปลิงทะเลขาวที่คลุมให้มีมืดสนิท

5. การแยกเพศปลิงทะเลขาวด้วยลายเส้นบนลำตัว

จากประสบการณ์ของผู้วิจัยได้สังเกตเห็นว่าลักษณะลายเส้นบนลำตัวของปลิงทะเลขาวมักสัมพันธ์กับเพศของปลิง จึงมีความสนใจเก็บข้อมูลในเบื้องต้นที่เป็นผลพลอยได้จากการทดลองนี้ไว้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะใช้ในการแยกเพศของปลิงทะเลขาวโดยใช้ลักษณะภายนอกต่อไป

โดยนำปลิงทะเลขาวแต่ละตัวซึ่งน้ำหนักและวัดความยาวตัว นับจำนวนเส้นที่มีลักษณะเป็นแนวขวางลำตัว ซึ่งแต่ละเส้นที่นับจะต้องมีความยาวเกินครึ่งลำตัวตามแนวขวาง และวัดระยะห่างระหว่างเส้นบนผิวลำตัวปลิงทะเลขาว นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย และนำอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาวไปผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อตรวจสอบเพศ

6. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition) ของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว

6.1 การเตรียมการสกัด

- นำอวัยวะสืบพันธุ์และกล้ามเนื้อผนังลำตัวแต่ละระยะพัฒนาการ อบแห้งที่ 60 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบดให้เป็นผงละเอียดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ *เถ้า โปรตีนรวม ไขมันรวม และ คาร์โบไฮเดรต*

- นำอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะพัฒนาการ ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Polytron ใน NaCl 35 ppt ที่อุณหภูมิ 4 °C จากนั้นปั่นตก (centrifuge) ที่ 5000 xg 5 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (supernatant) เก็บที่ -80 °C สำหรับวิเคราะห์ *คาร์โบไฮเดรต* (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001)

- นำกล้ามเนื้อผนังลำตัวแต่ละระยะพัฒนาการ บดให้เป็นเนื้อเดียวกันใน 10% trichloroacetic acid ที่อุณหภูมิ 4 °C และ centrifuge ที่ 5000 xg 5 °C เป็นเวลา 15 นาที นำส่วน supernatant เก็บที่ -80 °C เพื่อวิเคราะห์ *คาร์โบไฮเดรต* (Ruiz-Verdugo *et al.*, 2001)

- นำอวัยวะสืบพันธุ์ระยะ mature ของเพศผู้และเพศเมียทำการ Freeze dry เพื่อวิเคราะห์ *กรดอะมิโนและกรดไขมัน*

6.2 การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition)

6.2.1 ความชื้น (moisture)

หลักการ

การวิเคราะห์ความชื้นตัวอย่างเปียก ทำในตู้อบแห้งโดยใช้อุณหภูมิ 100 °C เวลาที่ใช้อบขึ้นอยู่กับชนิดของตัวอย่าง อยู่ในช่วง 24-48 ชั่วโมง

วิธีการ

ชั่งถ้วยอลูมิเนียม (W_1) ที่ผ่านการอบ (อุณหภูมิ 100 °C) อย่างละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) แล้วใส่ตัวอย่างลงในถ้วยอลูมิเนียมประมาณ 1 กรัม ทำการบันทึกน้ำหนักรวมของถ้วยอลูมิเนียมและตัวอย่าง (W_2) นำไปใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำออกมาวางทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมและตัวอย่างแห้ง (W_3) จนกว่าน้ำหนักจะคงที่ (กรมปศุสัตว์, 2553; AOAC, 1990)

การคำนวณ

$$\% \text{ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังอบ } (W_3) - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า } (W_1)}{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างก่อนอบ } (W_2) - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า } (W_1)} \times 100$$

$$\% \text{วัตถุแห้ง (total Dry matter)} = 100 - \% \text{ความชื้น}$$

6.2.2 เถ้า (ash)

หลักการ

เถ้าในอาหาร คือส่วนของสารอนินทรีย์ที่เหลือจากการเผาอาหารที่อุณหภูมิสูง จนกระทั่งสารอินทรีย์ถูกเผาไหม้ไปหมด เถ้าที่ได้มีส่วนประกอบของแร่ธาตุไม่เหมือนเดิมทุกอย่าง เนื่องจากแร่ธาตุบางอย่างอาจจะหายไประหว่างเวลาการเผา

วิธีการ

อบถ้วยกระเบื้อง (porcelain dish) ที่แห้งและสะอาดในตู้อบอุณหภูมิ 100 °C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกจากตู้อบ ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก (W_1) จากนั้นชั่งตัวอย่างประมาณ 0.1 กรัมใส่ในถ้วยกระเบื้อง บันทึกน้ำหนักตัวอย่างพร้อมถ้วย (W_2) นำไปเผาในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 550 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกจากเตาเผาและปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมาชั่งน้ำหนัก (W_3) (กรมปศุสัตว์, 2553; AOAC, 1990)

การคำนวณ

$$\% \text{ ใย } = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังเผา (W}_3\text{) - น้ำหนักถ้วยเปล่า (W}_1\text{)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (W}_2\text{)}} \times 100$$

$$\% \text{ อินทรีย์วัตถุ (Organic matter) } = \% \text{ วัตถุแห้ง } - \% \text{ ใย}$$

6.2.3 โปรตีนรวม (crude protein)

หลักการ

การวิเคราะห์หาโปรตีนด้วยวิธี Kjeldahl ประกอบด้วย 4 ขั้นตอนหลักคือ

1. การย่อยตัวอย่าง (digestion) เป็นการย่อยตัวอย่างด้วยกรดซัลฟูริกเข้มข้น โดยมีสารเร่งปฏิกิริยา ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูงในโตรเจนในตัวอย่างจะเปลี่ยนเป็นแอมโมเนียมซัลเฟต
2. การกลั่นแอมโมเนีย (distillation) เมื่อนำโซเดียมไฮดรอกไซด์ มาทำปฏิกิริยากับเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ได้จากการย่อยตัวอย่างแล้ว จะได้ก๊าซแอมโมเนีย ซึ่งจับก๊าซนี้ได้ด้วยสารละลายบอริก
3. การไตเตรตเพื่อหาปริมาณไนโตรเจน (titration) เป็นการนำสารละลายกรดบอริก ซึ่งจับก๊าซแอมโมเนียไว้ มาไตเตรต กับสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก
4. การคำนวณ นำปริมาณสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก ที่ใช้ในการไตเตรตไปคำนวณหาปริมาณไนโตรเจน แล้วคูณกับ Kjeldahl factor ได้เป็นค่าโปรตีน

วิธีการ

ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.1 กรัม ใส่หลอดย่อยโปรตีน บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) จากนั้นใส่สารเร่งรวม 3 กรัม และกรดซัลฟูริกเข้มข้น 10 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปย่อยที่อุณหภูมิ 375 °C จนกระทั่งสารละลายในหลอดย่อยมีสีใส (สีเขียวมรกต) ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และนำหลอดย่อยต่อกับเครื่องกลั่น ซึ่งมี flask ใส่กรดบอริก 40 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ลงใน flask จากนั้นเติม 45% NaOH ลงในหลอดย่อยอย่างช้าๆ จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะเห็นสารละลายมีสีดำ ต่อมนำไปกลั่นจนกรดบอริกเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ผ่านการกลั่น มาไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริกความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จากนั้นคำนวณหาปริมาณโปรตีนหยาบ (กรมปศุสัตว์, 2553; AOAC, 1990)

การคำนวณ

$$\% \text{ ไนโตรเจน (total Nitrogen, N)} = \frac{(A - B) \times C \times 0.014 \times 100}{D}$$

$$\% \text{ โปรตีน (crude protein)} = \% \text{ N} \times 6.25$$

A = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ไตเตรตกับ blank

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริก

D = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

6.2.4 ไขมัน (ether extract)

หลักการ

การวิเคราะห์หาไขมันในอาหารสัตว์ทำได้โดยใช้ตัวทำละลายที่เป็นสารอินทรีย์เป็นตัวสกัด ซึ่งคุณสมบัติที่สำคัญของตัวทำละลาย คือ ต้องระเหยง่ายและไวไฟ ตัวทำละลายที่นิยมใช้กันมากมี 4 ชนิด คือ diethyl ether, petroleum ether, dichloromethane และ chloroform ซึ่งสารที่สกัดได้ แบ่งเป็น 2 พวกคือ

1. สารพวกไขมัน คือกลีเซอไรด์ของกรดไขมัน กรดไขมันอิสระ สเตอรอล เลคซิทิน และไขมันที่ระเหยได้

2. สารพวกที่ไม่ใช่ไขมัน แต่ตัวทำละลายสามารถสกัดออกมาได้ด้วยคือ เม็ดสีต่างๆ เรซิน สารประกอบพวกอัลคาไลน์ และพวกวิตามินที่ละลายในไขมัน ได้แก่ A, D, E และ K เนื่องจากสารที่ไม่ใช่ไขมันนี้มีปริมาณน้อยมาก เมื่อเทียบกับสารพวกไขมัน ดังนั้นสารพวกที่ไม่ใช่ไขมัน จึงไม่มีผลต่อการวิเคราะห์หาปริมาณไขมัน

จากการที่สารที่ถูกสกัดมีทั้งพวกที่เป็นไขมันและไม่ใช่ไขมัน จึงเรียกสารทั้งสองพวกนี้ว่า

Crude fat

วิธีการ

อบด้วยไขมันที่มีลูกแก้ว 2-3 เม็ด ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 100 °C อบจนแห้งแล้วตั้งทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ทำการชั่งน้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วให้ได้น้ำหนักคงที่ (W_2) จากนั้นชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาดกรอง ประมาณ 0.1 กรัม (W_1) ห่อให้มีดชิดลงในใส่กรองสารที่เตรียมไว้ นำใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน นำถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วที่ชั่งไว้แล้วเติมสารละลายไดคลอโรมีเทน 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน และเปิดเครื่องสกัดไขมัน โดยอุณหภูมิที่ใช้

ในการสกัดคือ 130 °C เปิดน้ำเข้าเครื่อง เปิดวาล์ว เลื่อนปุ่มไปที่ boiling คัมให้เดือดนาน 30 นาที จากนั้นเลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที และปิดวาล์ว เปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 10 นาที หลังจากนั้นปิดเครื่อง ปิดอากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่มไปที่ evaporation กลับที่เดิม นำด้วยสกัดไขมันออกจากเครื่องแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 °C จนแห้ง นำด้วยสกัดไขมันออกมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (W_3) (กรมปศุสัตว์, 2553; AOAC, 1990)

การคำนวณ

$$\% \text{ไขมัน (crude fat)} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมไขมันที่สกัด (} W_3 \text{)} - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า (} W_2 \text{)}}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง (} W_1 \text{)}} \times 100$$

6.2.5 คาร์โบไฮเดรต

วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric method โดยนำส่วน supernatant 1 มิลลิลิตร เติมในหลอดทดลองแก้ว ขณะเดียวกัน blank จะใช้น้ำ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 5% สารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งต่อไปอีกประมาณ 20 นาที แล้วจึงวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และหาปริมาณ glucose units โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส (Dubois *et al.*, 1956)

7. การวิเคราะห์กรดอะมิโนและกรดไขมัน

ส่งอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลชาวเพศผู้และเพศเมียที่ผ่านการ Freeze dry ไปวิเคราะห์ที่ศูนย์ทดสอบและมาตรวิทยา โดยใช้เทคนิค High-performance liquid chromatography (HPLC) สำหรับวิเคราะห์กรดอะมิโน ซึ่งการจำแนกกรดอะมิโนแต่ละชนิดจะหาได้จากการเปรียบเทียบ retention time กับ authentic standards และใช้เทคนิค Gas chromatography (GC) สำหรับวิเคราะห์กรดไขมัน ซึ่งการจำแนกกรดไขมันแต่ละชนิดโดยเปรียบเทียบกับ authentic standards

บทที่ 3

ผลการทดลอง

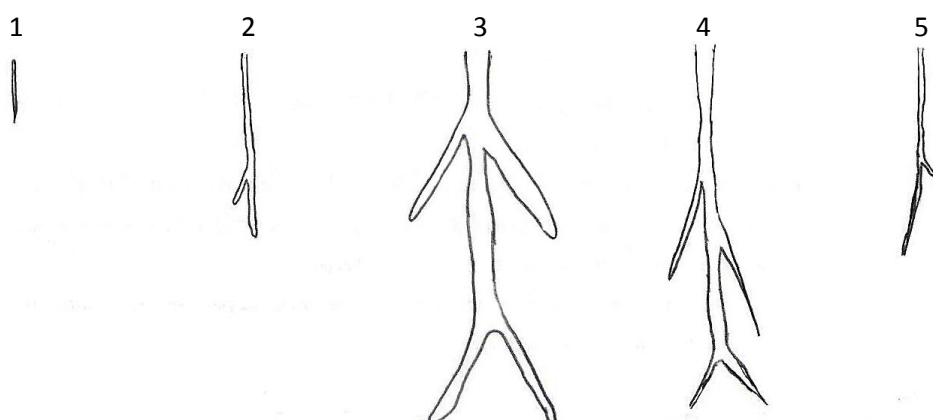
1. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว *H. scabra* แถบภาคใต้ของประเทศไทยฝั่งอันดามัน

ได้ทำการเก็บตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์ (รังไข่และอัณฑะ) ของปลิงทะเลขาว *H. scabra* จากภาคใต้ของประเทศไทยฝั่งอันดามันเพื่อศึกษาโครงสร้างทางเนื้อเยื่อวิทยาและ ultrastructure ในระยะเวลาช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 โดยได้แบ่งระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์อ้างอิงตาม Ramofafia *et al.*, 2003 ที่ได้ทำการศึกษาไว้แล้วในปลิงทะเลขาวแถบหมู่เกาะโซโลมอน

1.1 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ในแต่ละระยะพัฒนาการ

อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว *H. scabra* ในเพศผู้เรียกว่า อัณฑะ (testis) และเพศเมียเรียกว่า รังไข่ (ovary) มีรูปร่างคล้ายกัน เมื่อเข้าสู่ระยะพัฒนาที่สูงขึ้นจะมีลักษณะแตกแขนง ออกเป็นพุ่ม (gonad tubules) มากมาย รูปร่างของอวัยวะสืบพันธุ์มีความแตกต่างกันในแต่ละระยะของพัฒนาการ ดังนี้ (รูปที่ 25)

Indeterminate stage	อวัยวะสืบพันธุ์เป็นท่อเดี่ยวสั้น ๆ ยังไม่มีแขนง
Growing stage	ส่วนปลายของอวัยวะสืบพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 แขนง
Mature stage	อวัยวะสืบพันธุ์เพิ่มแขนงมากขึ้น มีลักษณะเป็นพุ่ม
Partly spawned stage	อวัยวะสืบพันธุ์มีขนาดเล็กกลง
Spent stage	อวัยวะสืบพันธุ์หดตัวมีขนาดเล็กกลงมาก เห็นขุ่น



รูปที่ 25. รูปร่างของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว *H. scabra* ในระยะ Indeterminate stage (1), Growing stage (2), Mature stage (3), Partly spawned stage (4) และ Spent stage (5)

เมื่อพิจารณาโดยละเอียดพบว่าลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์มีความแตกต่างกันทางด้านขนาด สี รูปร่าง และจำนวนแขนง ขึ้นอยู่กับเพศและระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ ดังนี้

ระยะที่ 1 Indeterminate stage (Recovery stage) อวัยวะสืบพันธุ์เป็นท่อ (tubule) สั้นๆ ยังไม่มีแขนง มีความเหนียว น้ำหนักอยู่ในช่วง 0.5-8 กรัม ความยาวน้อยกว่า 9 เซนติเมตร มีสีเหลืองเข้มปนน้ำตาล ไม่สามารถแยกเพศได้จากการดูด้วยตาเปล่า (รูปที่ 26)

ระยะที่ 2 Growing stage อวัยวะสืบพันธุ์เพิ่มขนาดทั้งความกว้างและความยาว มีความยาวประมาณ 1-10 เซนติเมตร เริ่มแบ่งออกเป็น 2 แขนง พบว่ารังไข่มีสีส้มอ่อน และอณฑะมีสีขาวเป็นเงามันและพบลักษณะเป็นเม็ด โป่งพองอยู่เป็นระยะ (รูปที่ 27)

ระยะที่ 3 Mature stage อวัยวะสืบพันธุ์เจริญเติบโตเต็มที่ มีน้ำหนักมาก มี tubules ที่สมบูรณ์ ยาวประมาณ 3-27 เซนติเมตร พบแขนง 2-3 แขนงต่อ tubule รังไข่มีสีส้มแดง ผนังบางใส เห็นเซลล์ไข่ชัดเจนอยู่ภายใน อณฑะมีสีขาวครีม มีลักษณะทึบแสง พบลักษณะโป่งพองเป็นเม็ดเล็กๆ จำนวนมาก จากการศึกษาในระยะต่อมาพบว่าเม็ดเล็กๆ นี้ภายในมีเซลล์อสุจิที่อัดแน่น (รูปที่ 28)

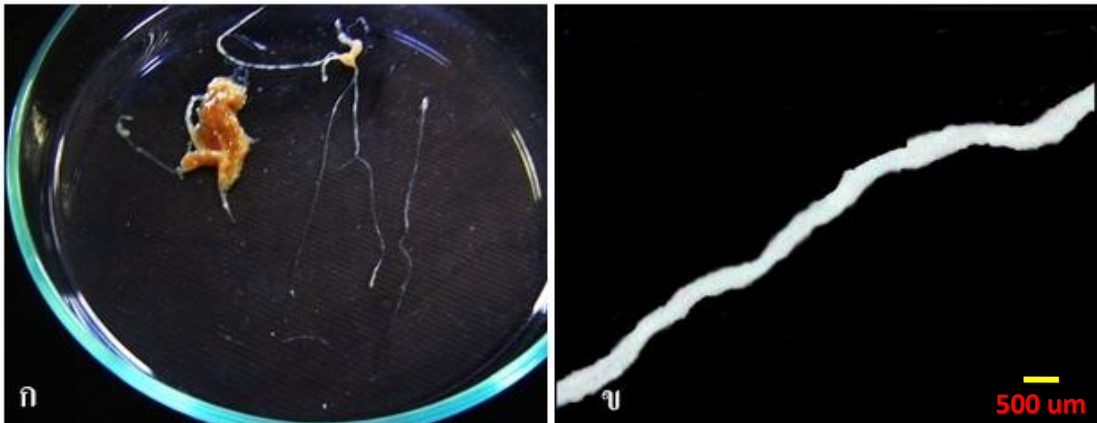
ระยะที่ 4 Partly spawned stage อวัยวะสืบพันธุ์มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์บางส่วน มีทั้ง tubules ที่พัฒนาเต็มที่และ tubules ที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้ว ซึ่งมีขนาดเล็กลงและอ่อนนุ่ม รังไข่มีสีส้มอ่อน อณฑะมีสีขาวครีม มีลักษณะโปร่งแสงบริเวณริม tubules เนื่องจากลักษณะทึบแสงจากการอัดแน่นของอสุจิได้ลดลง (รูปที่ 29)

ระยะที่ 5 Spent stage อวัยวะสืบพันธุ์มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ทั้งหมดซึ่งจะมีขนาดเล็กลง tubules เป็นรอยย่นและหดตัว น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ในระยะนี้มีตั้งแต่ 2-26 กรัม รังไข่มีสีส้มอ่อน ซีด อณฑะมีสีขาวครีม และ tubules ทั้งสองเพศมีลักษณะโปร่งแสงตลอด tubules (รูปที่ 30)

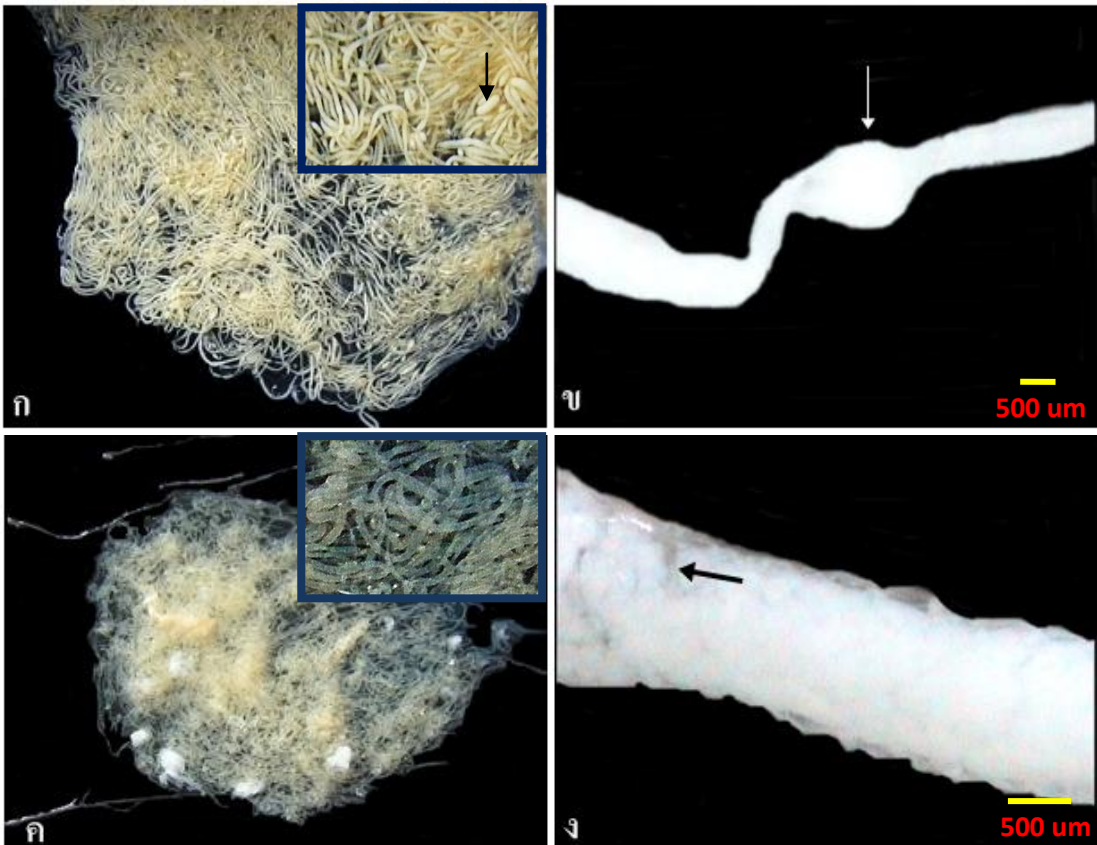
ได้สรุปลักษณะและขนาดของอวัยวะสืบพันธุ์ในแต่ละระยะพัฒนาการของทั้งเพศผู้และเพศเมียไว้ในตารางที่ 13

ตารางที่ 13. ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาวแบ่งตามระยะพัฒนาการ

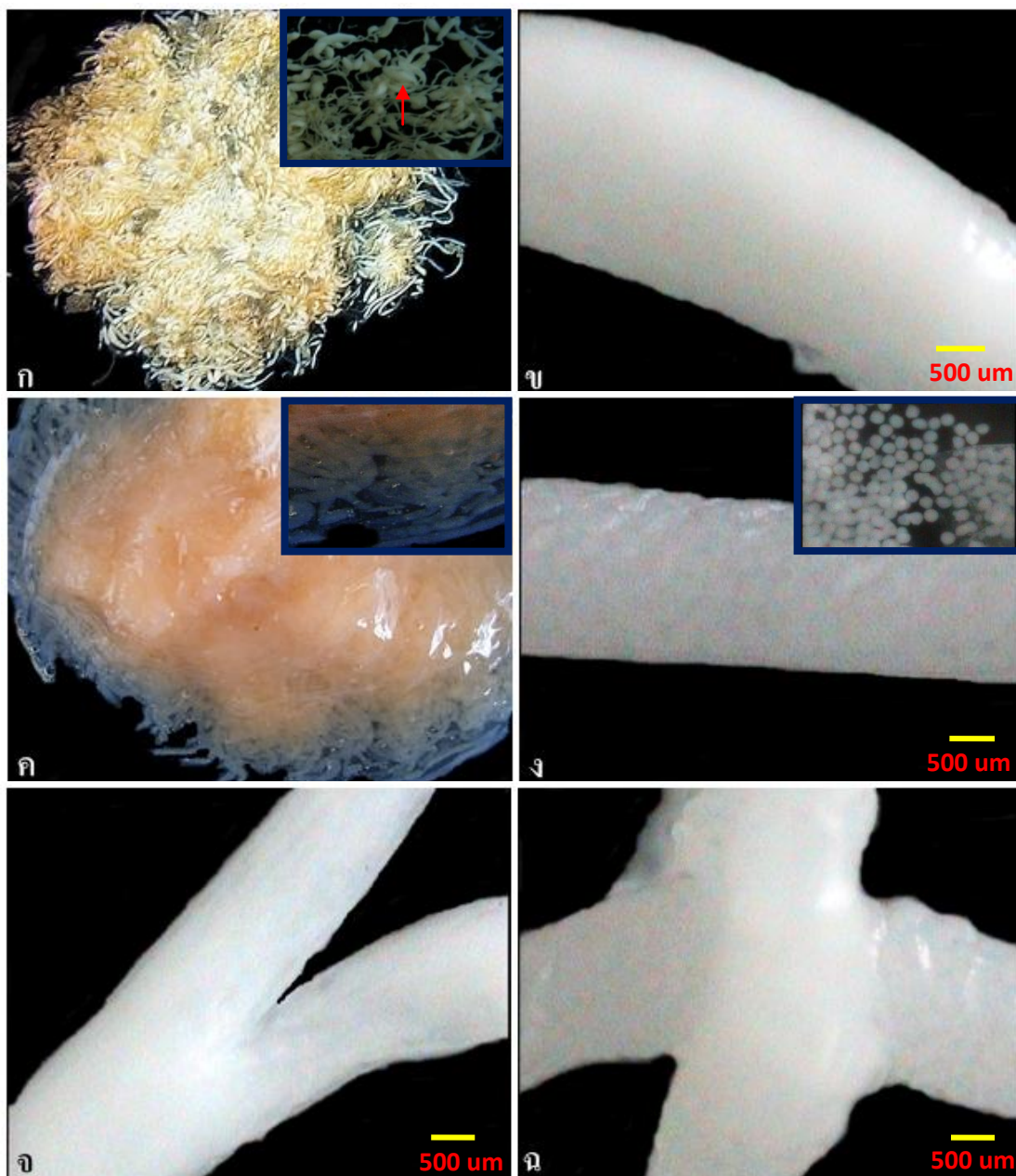
ระยะของอวัยวะ สืบพันธุ์	Tubules				
	ความ ยาว (cm)	เส้นผ่าน ศูนย์กลาง (mm)	จำ นวน แขนง	ลักษณะ	สี
Indeterminate st.					
อันทะ	1-9	0.05-0.50	0	ไม่สามารถแยกเพศได้เมื่อดูด้วย	เหลืองเข้ม
รังไข่	1-4	0.05-0.10	0	ตาเปล่า	ผสมน้ำตาล
Growing st.					
อันทะ	1-10	0.05-1.50	1-2	tubules มีเม็ดโป่งพองเป็นระยะ	ขาว
รังไข่	2-8	0.05-0.60	1-2	tubules มีขนาดและความยาว เพิ่มขึ้น	ส้มอ่อน
Mature st.					
อันทะ	4-27	0.25-2.00	2-3	tubules มีเม็ดโป่งพองจำนวน มาก	ขาวครีม
รังไข่	3-18	0.30-1.90	2-3	tubules มีขนาดใหญ่เห็นเซลล์ ไข่ชัดเจนเต็ม tubules	ส้มแดง
Partly spawned st.					
อันทะ	4-20	0.15-1.90	1-3	มีลักษณะ โปร่งแสงบริเวณริม tubules	ขาวครีม
รังไข่	6-20	0.05-1.80	1-3	tubules มีลักษณะ โปร่งแสง เล็กน้อย เห็นเซลล์ไข่อยู่ภายใน	ส้มอ่อน
Spent st.					
อันทะ	6-13	0.05-0.60	1-3	tubules หดเล็กลง มีรอยเหี่ยวย่น	ขาว
รังไข่	5-14	0.05-0.80	1-3	tubules หดเล็กลง มีรอยเหี่ยวย่น	ส้มอ่อนซีด



รูปที่ 26. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว ระยะ Indeterminate stage เมื่อดูด้วยตาเปล่า มีสีเหลืองผสมน้ำตาล (ก) และสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (ข)

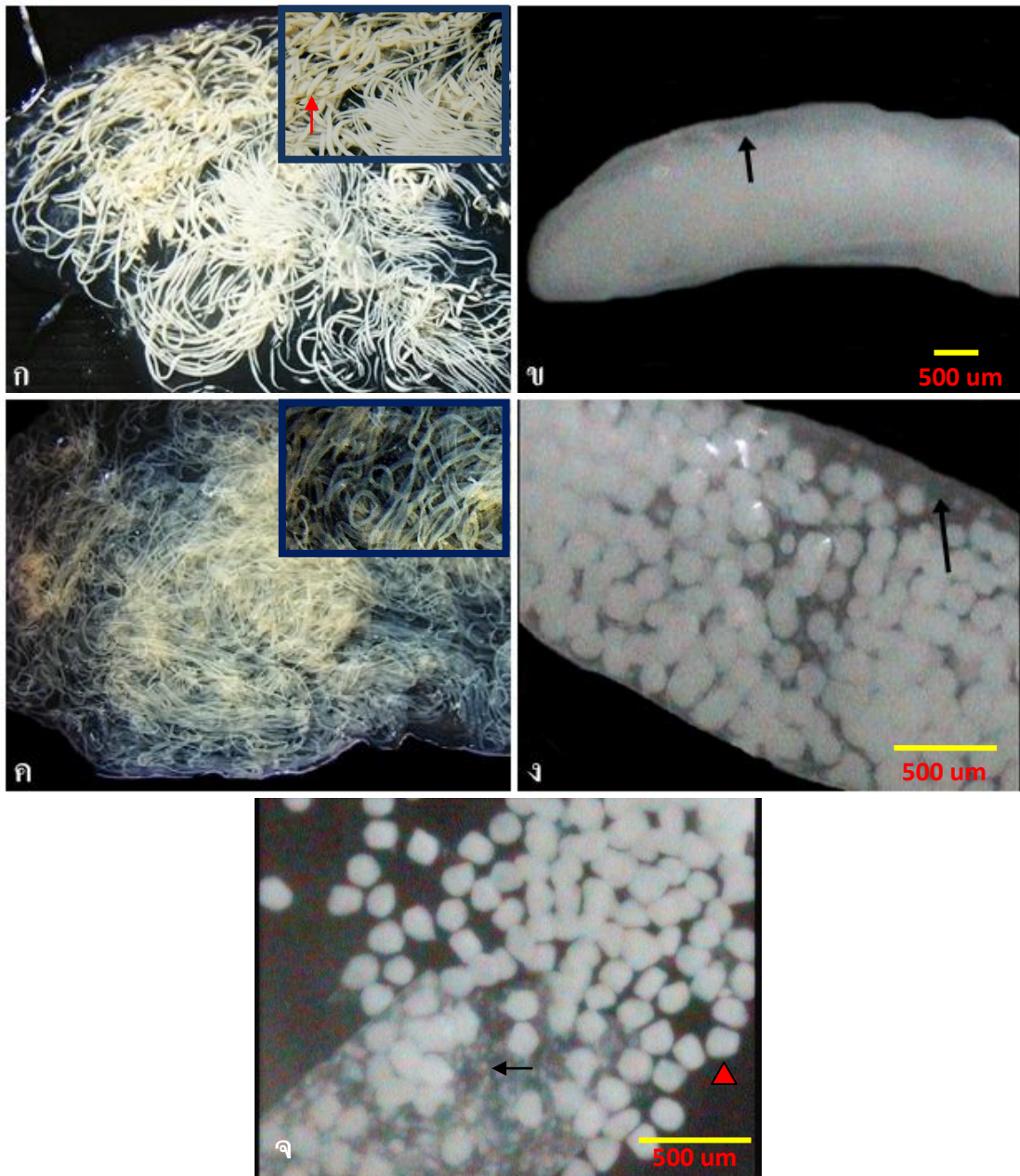


รูปที่ 27. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว ระยะ Growing stage เมื่อมองด้วยตาเปล่า อันทหะมีสีขาว tubules มีเม็ดโป่งพองเป็นระยะ (สรชี้) (ก) และเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์มีลักษณะทึบแสง เห็นเม็ดโป่งพองได้ชัดเจน (ลูกศร) (ข) สำหรับรังไข่มีสีส้มอ่อน tubules มีลักษณะโปร่งแสงกว่าอันทหะ (ค) และเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์เห็นเซลล์ไข่อยู่ภายใน (สรชี้) (ง)



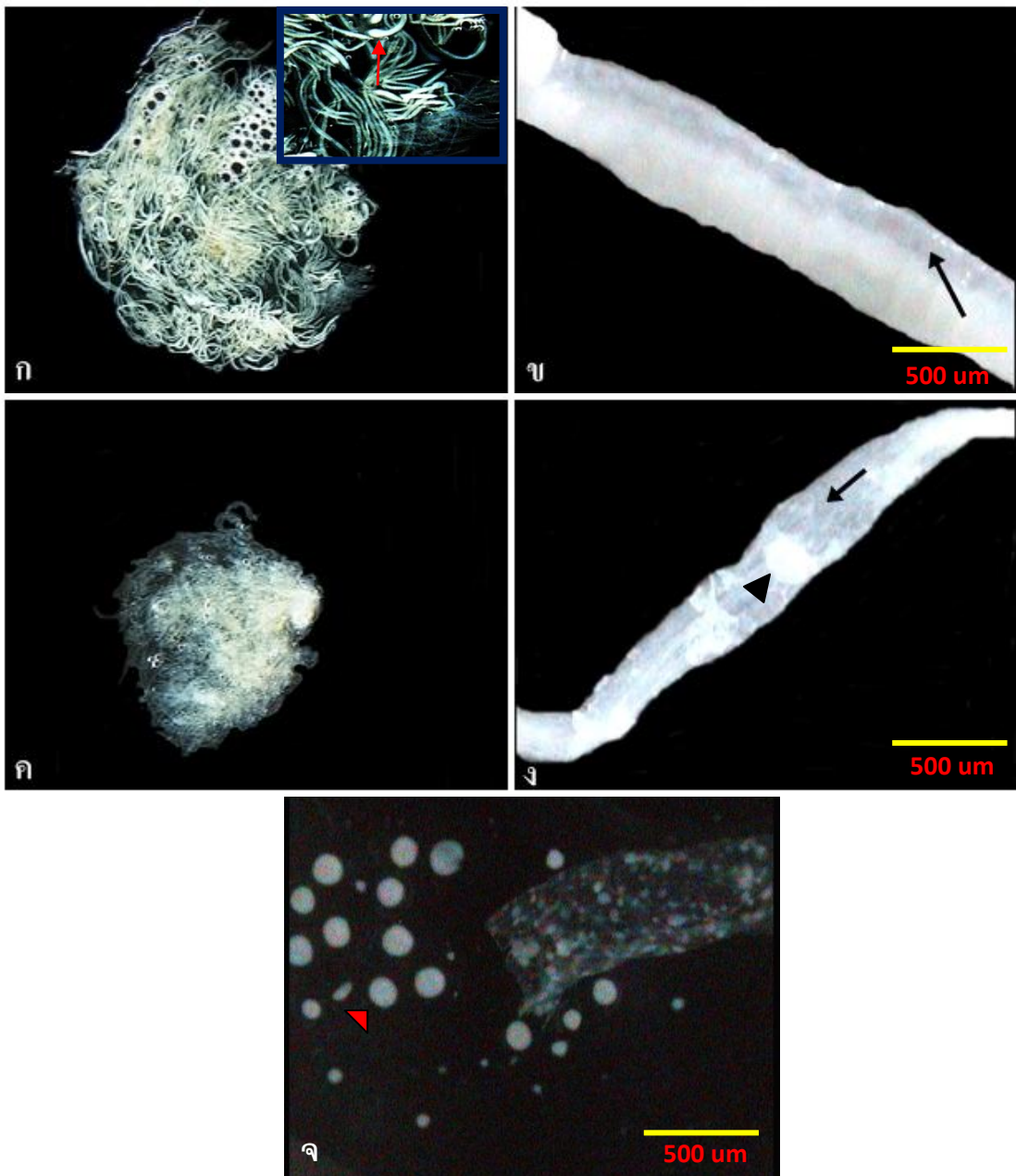
รูปที่ 28. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว ระยะ Mature stage

- ก. อวัยวะมีสีขาวครีม tubules มีลักษณะเมื่อดึงออกไปจำนวนมาก (ลูกศร)
- ข. อวัยวะเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะทึบแสง
- ค. รังไข่มีสีส้มแดง
- ง. รังไข่เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะทึบแสง ภายในเต็มไปด้วยเซลล์ไข่
- จ. ลักษณะการแตกแขนงของ tubule ในอวัยวะ
- ฉ. ลักษณะการแตกแขนงของ tubule ในรังไข่



รูปที่ 29. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว ระยะ Partly spawned stage

- ก. อวัยวะมีสีขาวครีม ลักษณะของเม็ดโป่งพองลดลง (สรชี้)
- ข. อวัยวะสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะโปร่งแสงบริเวณริม tubule (สรชี้)
- ค. รังไข่มีสีส้มอ่อน
- ง. รังไข่สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ tubule มี ลักษณะโปร่งแสง (สรชี้)
- จ. ลักษณะเซลล์ไข่ สังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งมีทั้งเซลล์ไข่ ขนาดเล็ก (สรชี้) และขนาดใหญ่ (หัวลูกสร)



รูปที่ 30. อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว ระยะ Spent stage

- ก. อวัยวะมีสีขาว tubules มีขนาดเล็กกลวง มีลักษณะเม็ดโป่งพองจำนวนน้อย (สรชี้)
- ข. อวัยวะตั้งเกิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะโปร่งแสงตลอด tubule (สรชี้)
- ค. รังไข่มีสีส้มอ่อนซีด ขนาดเล็กกลวง
- ง., จ. รังไข่ตั้งเกิดภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีลักษณะโปร่งแสงตลอด tubule (สรชี้) และเห็นเซลล์ไข่ขนาดใหญ่จำนวนน้อย (หัวลูกสร)

1.2 เนื้อเยื่อวิทยาของอัณฑะและเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

อัณฑะมีลักษณะเป็นท่อที่มีแขนง บรรจุเซลล์สุจิอยู่ในผนังของอัณฑะประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น (รูปที่ 32 และ 39) ได้แก่

- **Peritoneal epithelium** เป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกสุด มีลักษณะเป็นเยื่อบุผิวที่เป็นส่วนของเยื่อบุช่องท้อง เป็นเซลล์ทรงกลมและรูปลูกบาศก์เรียงตัวแถวเดียว
- **Connective tissue** เป็นเนื้อเยื่อชั้นกลาง ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหลวมๆ ที่มี collagen fiber เป็นองค์ประกอบหลัก
- **Germinal epithelium** เป็นเนื้อเยื่อชั้นในสุด พับตัวยื่นเข้ามาในท่อ มีฐานเป็นเยื่อ basal lamina บาง ๆ บน basal lamina มีเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สุจิเรียงตัวอยู่ เรียกว่า spermatogonia ซึ่งมีการแบ่งตัว แบบ meiosis (spermatogenesis) ให้เป็น spermatocyte, spermatid และ spermatozoa เข้าสู่ช่องว่างภายในท่อ ซึ่งจะถูกขับออกภายนอกร่างกายเพื่อปฏิสนธิกับไข่ในขณะผสมพันธุ์

Spermatogenesis พบเซลล์สุจิในระยะพัฒนาการต่าง ๆ 4 ระยะ (รูปที่ 31) ดังนี้

- **Spermatogonia** เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ มีรูปร่างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6-7 μm ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเห็นนิวเคลียสใหญ่ติดสีจาง เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าเซลล์ว่างอยู่บน basal lamina ภายในนิวเคลียสมีกลุ่มของเส้นใยโครมาติน (heterochromatin) กระจายตัวทั่วนิวเคลียส มองเห็นเป็นกลุ่มๆ อยู่ในนิวเคลียส ภายในไซโทพลาซึมพบไมโทคอนเดรีย และ dense granules กระจายตัวอยู่ทั่วไป (รูปที่ 33)
- **Spermatocyte** มีขนาดเล็กกว่า spermatogonia ที่พบส่วนใหญ่เป็น primary spermatocyte มีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 4-5 μm ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเห็นนิวเคลียสติดสีเข้ม เส้นใยโครมาตินหนาแน่นทึบ มีระยะการแบ่งตัวของเซลล์หลายระยะ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (diplotene ในระยะ prophase) พบว่าภายในนิวเคลียสมีกลุ่มของ heterochromatin กลุ่มใหญ่ๆ บริเวณกลางนิวเคลียสและด้านข้างติดกับเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear envelope) ไซโทพลาซึมมีปริมาณมากเพียงด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ภายในพบ mitochondria จำนวนมาก dense granules หนาแน่นขึ้น และพบ membrane-bounded proacrosomal granules ซึ่งเป็นแกรนูลที่มีเยื่อหุ้มชัดเจนและมีลักษณะทึบภายใน และพบ electron lucent vesicles ที่มีลักษณะจาง (รูปที่ 34)

- **Spermatid** มีขนาดเล็กกลางครึ่งหนึ่งของ primary spermatocyte นิวเคลียสมีลักษณะกลม เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าในนิวเคลียสมีการกระจายตัวของ heterochromatin เป็นกลุ่มเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 100-300 nm ที่นิวเคลียส ด้านหนึ่งของเซลล์เป็นบริเวณของ acrosome (acrosomal region) วางอยู่ทำให้นิวเคลียสเว้าเข้าเพื่อรองรับ มีลักษณะเป็นแอ่งรูปถ้วย (cup-shape fossa) [ในปลิง *Holothuria leucospilota* สันนิษฐานว่า acrosomal region เกิดจากการรวมตัวกันของ membrane-bounded proacrosomal granules และ dense granules (Thongkukiatkul *et al.*, 2008)] acrosomal region ประกอบด้วย acrosome กลมๆ ที่บ่งแสงอิเล็กตรอน วางตัวอยู่บน subacrosome ที่มีลักษณะคล้ายจานรองถ้วยที่บ่งแสงอิเล็กตรอนเช่นกัน สำหรับซัยโตพลาสซึมพบชัดเจนในอีกด้านหนึ่งของเซลล์ มี centriole อยู่ภายใน (รูปที่ 35)
- **Spermatozoa** เมื่อดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบ่งได้เป็น 2 ระยะ คือ immature spermatozoa และ mature spermatozoa โดย 1) immature spermatozoa มีส่วนหัวขนาดเล็กมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 μm ประกอบด้วยนิวเคลียสและ acrosomal region ภายในนิวเคลียสมีการกระจายตัวของ heterochromatin เป็นกลุ่มเล็ก ๆ ที่นิวเคลียสคล้ายใน spermatid สำหรับ acrosomal region มีขนาดใหญ่ขึ้น ประกอบด้วย acrosome และ subacrosome อีกด้านหนึ่งของเซลล์ที่เป็นซัยโตพลาสซึมมีการจัดตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม พบ centriole อยู่ภายใน (รูปที่ 36) 2) mature spermatozoa ประกอบด้วยส่วนหัว คอ และหาง ส่วนหัวมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 2 μm ส่วนหางมีความยาวประมาณ 5-10 μm บริเวณส่วนหัวประกอบด้วยนิวเคลียสที่มี heterochromatin fiber ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20 nm บีบตัวหนาแน่น เมื่อมองภาคตัดขวางมีลักษณะคล้าย dense granules อัดแน่นอยู่ในนิวเคลียส ทำให้มองเห็นนิวเคลียสมีลักษณะที่บ่งแสงอิเล็กตรอนมากขึ้น และบริเวณหน้าสุดของส่วนหัวมี acrosome และ subacrosome ส่วนคอประกอบด้วยซัยโตพลาสซึมที่มีพื้นที่ส่วนใหญ่เป็น mitochondria ขนาดใหญ่รูปร่างแหวน โดยมี centriole ที่เป็นส่วนต้นของหาง ทะลุออกมาจากบริเวณกลาง ส่วนหางประกอบด้วยแกนที่เป็น axonemal microtubules ต่อมาจาก centriole (รูปที่ 37 และ 38)

ระยะพัฒนาการของอวัยวะและเซลล์อสุจิภายใน

ในแต่ละระยะพัฒนาการของอวัยวะพบความหนาแน่น ปริมาณ และชนิดของเซลล์อสุจิ ที่แตกต่างกัน ดังนี้

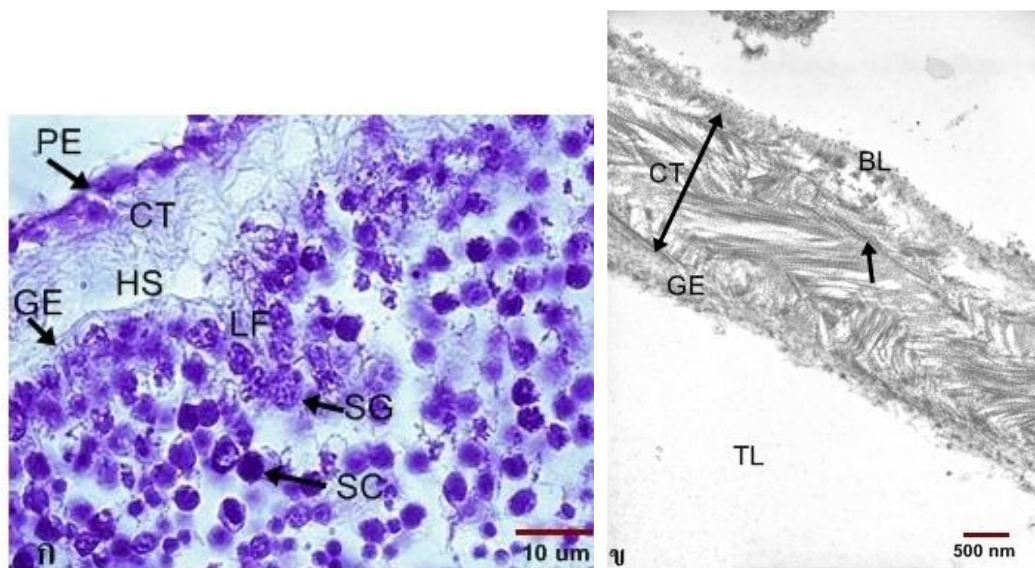
ระยะที่ 1 Indeterminate stage หรือ Recovery stage ระยะนี้ผนังอวัยวะชั้น connective tissue ค่อนข้างหนา พบชั้น germinal epithelium ยื่นตัวเข้าสู่แนวกลางของ tubules อย่างชัดเจนเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวในการพัฒนาเซลล์อสุจิ โดยมองเห็นเป็นแถบของเซลล์อสุจิ ซึ่งมีเซลล์อสุจิที่อยู่ในช่วงแรกของพัฒนาการจำนวนมาก ได้แก่ spermatogonia และ spermatocyte (รูปที่ 39)

ระยะที่ 2 Growing stage ยังมี germinal epithelium ที่ยื่นเข้าสู่ tubule มี spermatogonia จำนวนน้อยลง และในท่อ (lumen) มีการสะสมของเซลล์อสุจิที่เข้าสู่พัฒนาการในระยะหลังมากขึ้น ได้แก่ spermatid และ spermatozoa (รูปที่ 40)

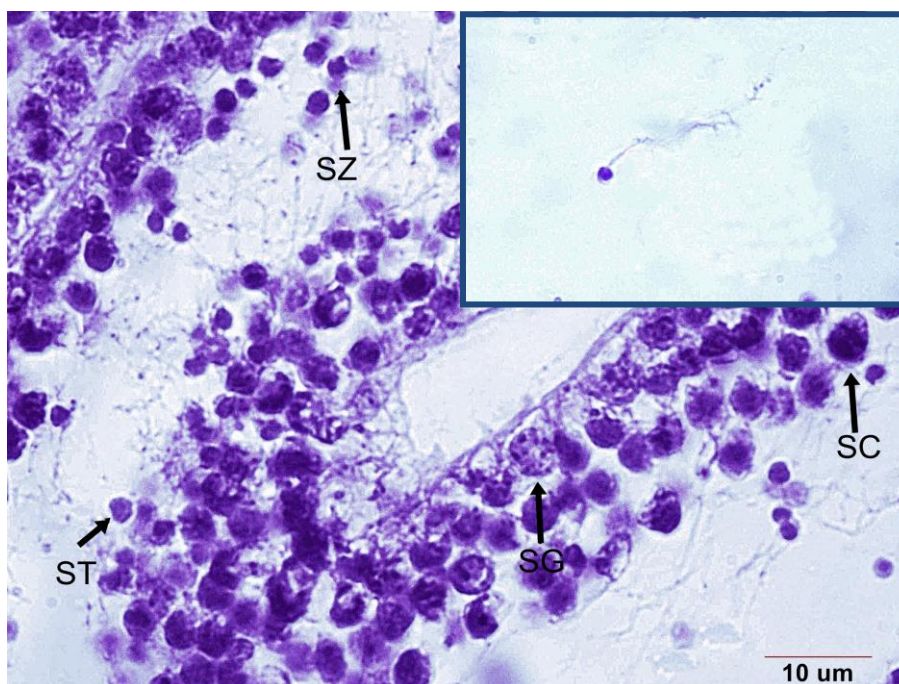
ระยะที่ 3 Mature stage เป็นระยะที่อวัยวะเจริญเต็มที่ พบว่าใน lumen เต็มไปด้วยการรวมกลุ่มของ spermatozoa โดยไม่พบ germinal epithelium ที่ยื่นตัวเข้ามา ผนังของอวัยวะในส่วน connective tissue บางลงมาก (รูปที่ 41)

ระยะที่ 4 Partly spawned stage เป็นระยะที่อวัยวะมีการปล่อยเซลล์อสุจิไปบ้างแล้ว พบว่า spermatozoa มีปริมาณลดลง ในบางบริเวณพบช่องว่างที่แสดงถึงการปล่อย spermatozoa ออกไป นอกจากนั้นยังพบการสร้างเซลล์อสุจิในระยะแรก (spermatogonia) ขึ้นใหม่อีกครั้ง (รูปที่ 42)

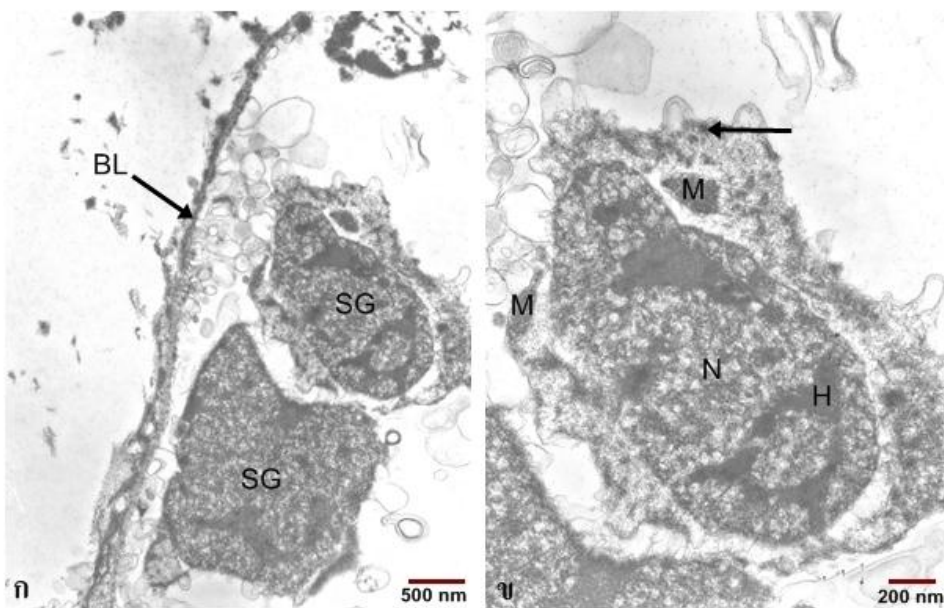
ระยะที่ 5 Spent stage ภายใน lumen ของอวัยวะว่างลง มีการปล่อยเซลล์อสุจิจนเกือบหมด ซึ่งยังพบ spermatozoa ที่ไม่ถูกปล่อยอยู่บ้าง และเกิด spermatogenesis ขึ้นใหม่ โดยเห็นได้จากการพัฒนาของ spermatogonia ขึ้นที่บริเวณผนัง tubule และในบางบริเวณผนังของ tubule ชั้น connective tissue หนาขึ้น (รูปที่ 43)



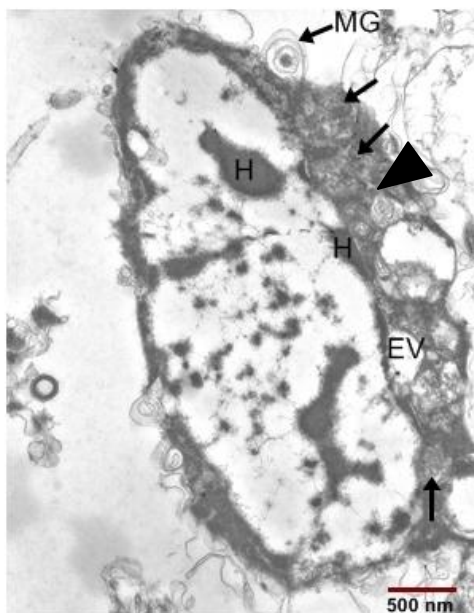
รูปที่ 31. ผนังของอวัยวะประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น คือ peritoneal epithelium (PE) เป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกสุดมีฐานเป็น basal lamina (BL) เชื่อมติดกับชั้นที่สอง คือ connective tissue (CT) ภายในมี collagen fiber (สรชี้) และ germinal epithelium (GE) เป็นเนื้อเยื่อชั้นในสุด ติดกับ testicular lumen (TL) แสดงด้วย LM (ก) และ TEM (ข) spermatogonia (SG); spermatocyte (SC)



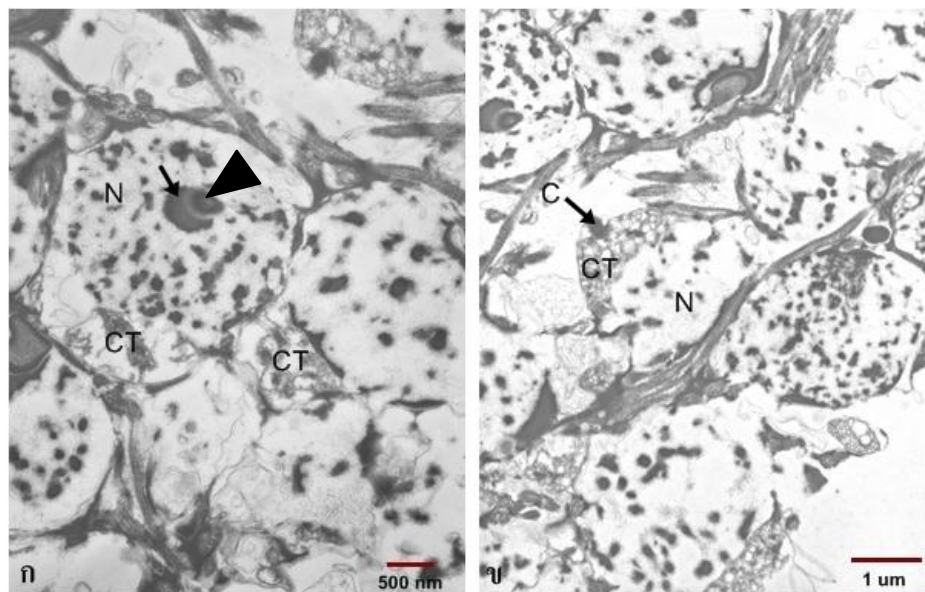
รูปที่ 32. Light microscope ของ spermatogenesis ซึ่งพบเซลล์อสุจิในระยะ spermatogonia (SG), spermatocyte (SC), spermatid (ST) และ spermatozoa (SZ) (รูปเล็ก)



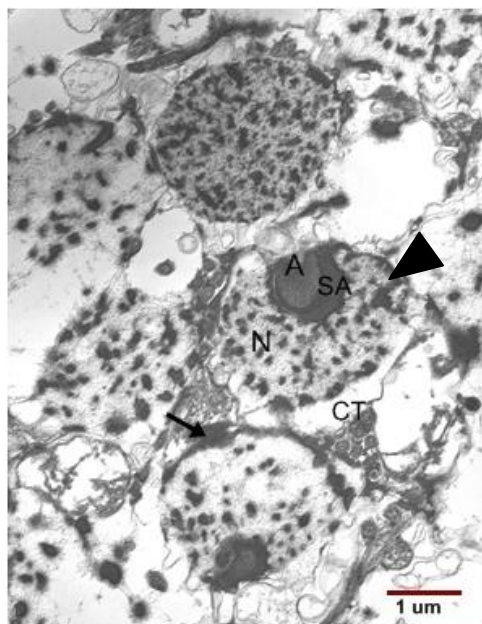
รูปที่ 33. Spermatogonia (SG) วางอยู่บน basal lamina (BL) (ก) ภายในนิวเคลียส (N) มีกลุ่มของเส้นใยโครมาติน (heterochromatin; H) กระจายตัวทั่วนิวเคลียส มองเห็นเป็นกลุ่มๆ ภายในไซโตพลาสซึมพบไมโทคอนเดรีย (M) และ dense granules (สรชี้) (ข)



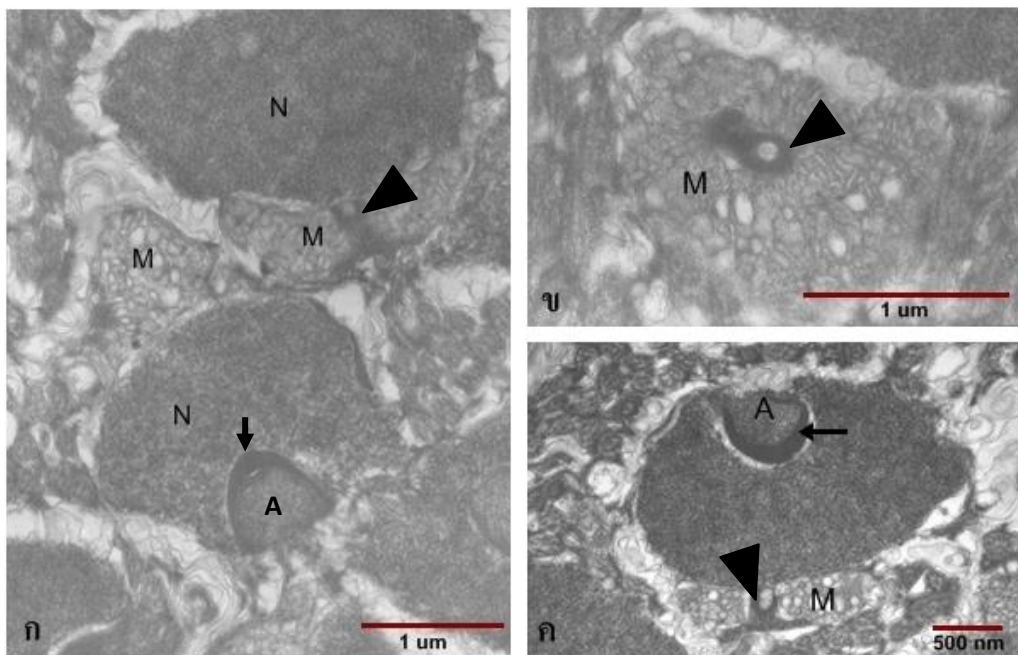
รูปที่ 34. Primary spermatocyte พบ heterochromatin (H) กลุ่มใหญ่ๆ บริเวณกลางนิวเคลียสและด้านข้างติดกับเยื่อหุ้มนิวเคลียส ภายในไซโตพลาสซึมพบ mitochondria (สรชี้) จำนวนมาก dense granules (หัวลูกศร) หนาแน่นขึ้น พบ membrane-bound proacrosomal granules (MG) และพบ electron lucent vesicles (EV)



รูปที่ 35. TEM ของ spermatid เป็นเซลล์กลม บนนิวเคลียส (N) ด้านหนึ่งของเซลล์มี acrosome (หัวลูกศร) ซึ่งวางตัวอยู่บน subacrosome (ศรชี้) และพบว่าไซโตพลาสซึม (CT) มีปริมาณมาก ที่ด้านหนึ่งของเซลล์ มี centriole (C) อยู่ภายใน (ก และ ข)

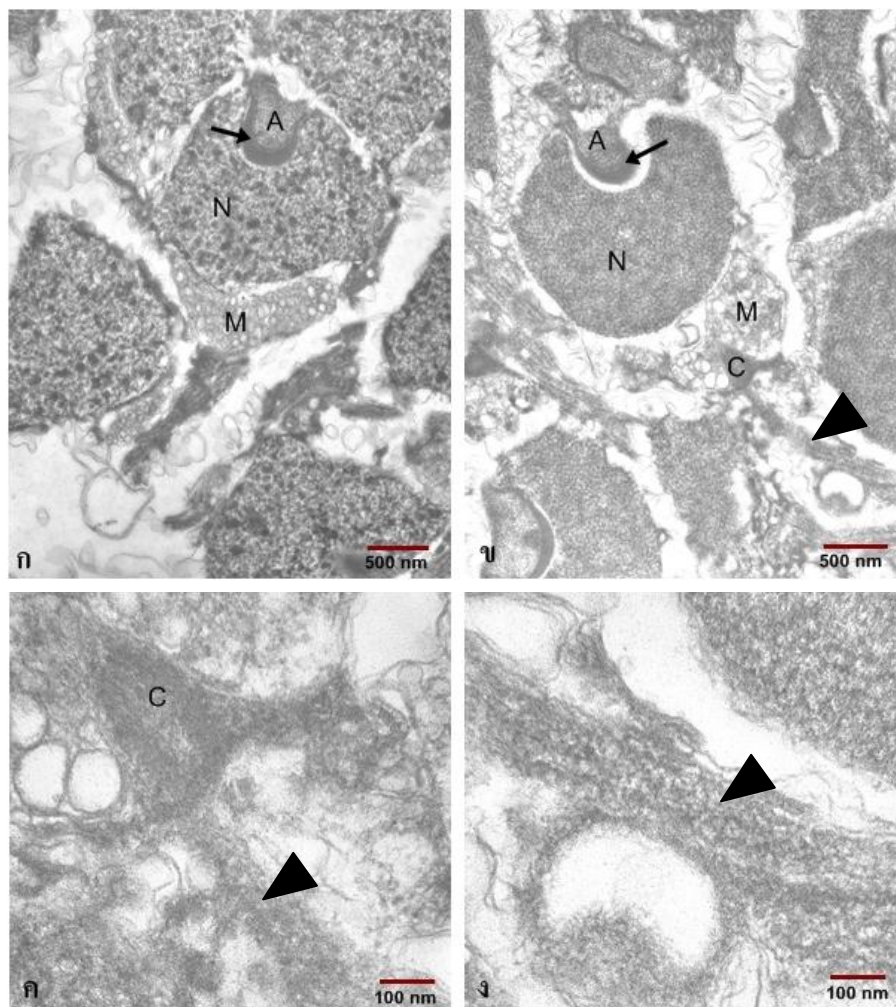


รูปที่ 36. TEM ของ immature spermatozoa ภายในนิวเคลียส (N) ของเซลล์มีการกระจายตัวของ heterochromatin (หัวลูกศร) คล้ายๆ spermatid และพบว่า acrosomal region มีขนาดใหญ่ ขึ้นประกอบด้วย acrosome (A) และ subacrosome (SA) อีกด้านหนึ่งของเซลล์ที่เป็นไซโตพลาสซึม (CT) มีการจัดตัวเป็นรูปสามเหลี่ยม พบ centriole (ศรชี้) อยู่ภายใน

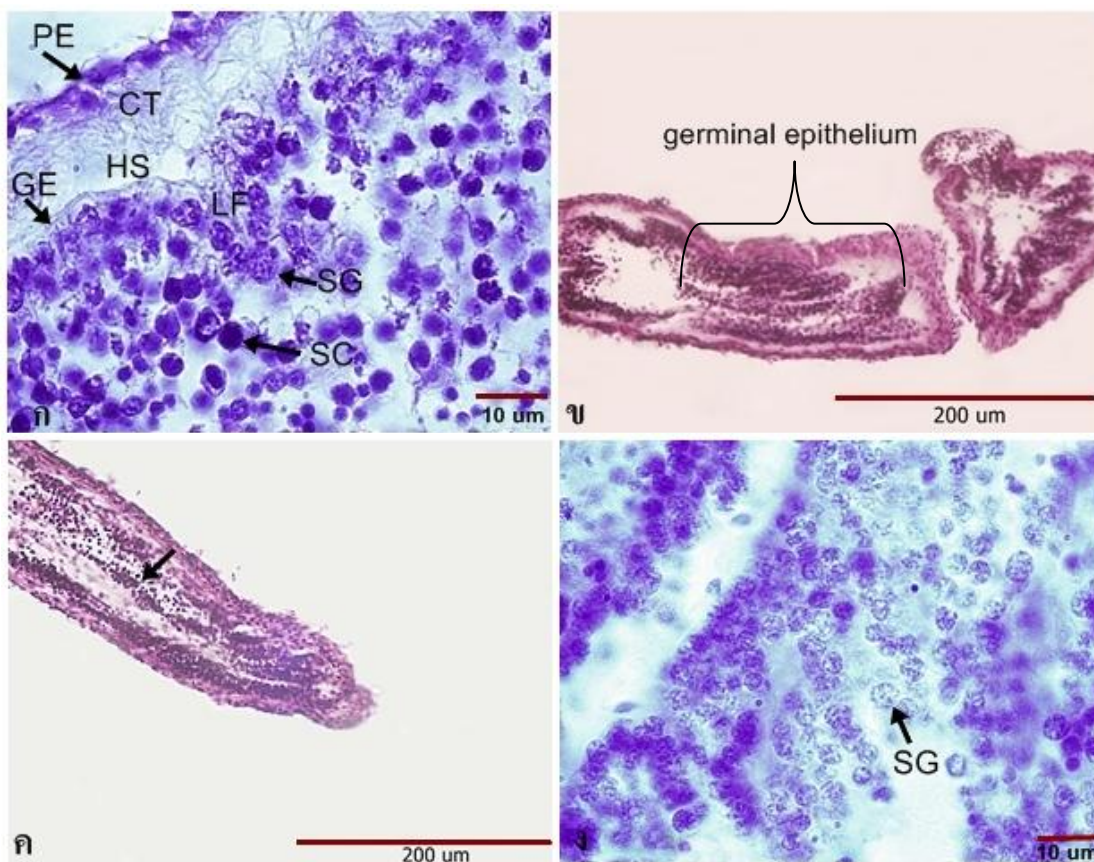


รูปที่ 37. TEM ของ mature spermatozoa แสดงส่วนหัวและคอ

- ก. ส่วนหัวมองเห็นนิวเคลียส (N) และ acrosomal region (acrosome, A; subacrosome, ศรีชี้) ที่เป็นส่วนหน้าสุด และส่วนคอประกอบด้วย mitochondria (M) ขนาดใหญ่ ส่วนหางเริ่มต้นจาก centriole (หัวลูกศร) ยึดขยายตัวลงมาเป็น microtubule
- ข. แสดงภาพตัดขวางของ mitochondria (M) รูปวงแหวนที่ระดับ centriole (หัวลูกศร)
- ค. แสดงส่วนหัวและคอของ mature spermatozoa (acrosome, A; subacrosome, ศรีชี้; mitochondria, M; centriole, หัวลูกศร)

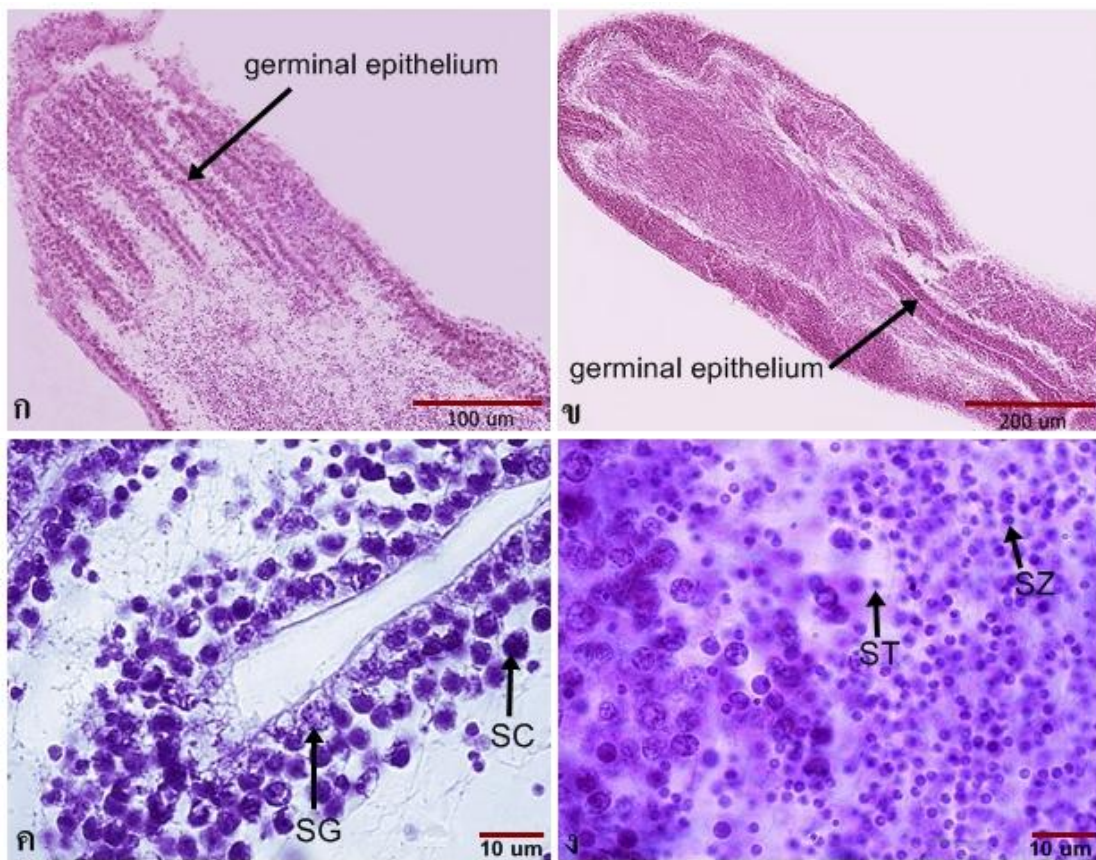


รูปที่ 38. TEM ของ mature spermatozoa ประกอบด้วยส่วนหัว คอ และหาง บริเวณส่วนหัว ประกอบด้วยนิวเคลียส (N) ที่มี heterochromatin fiber เบียดตัวหนาแน่น และบริเวณหน้าสุดของส่วนหัวมี acrosome (A) และ subacrosome (สรชี้) ส่วนคามี mitochondria (M) ขนาดใหญ่ (ก และ ข) ส่วนหางประกอบด้วยแกนที่เป็น axonemal microtubules (หัวลูกศร) ต่อมาจาก centriole (C) (ค และ ง)



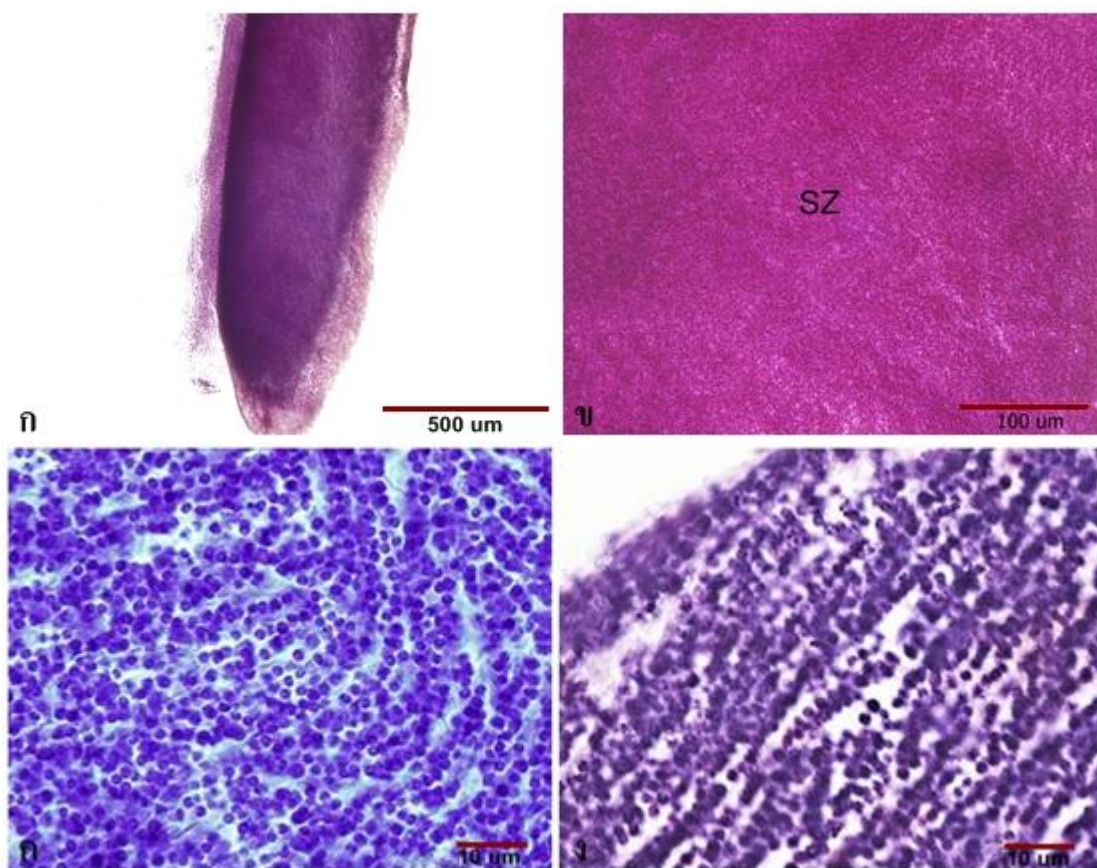
รูปที่ 39. อันตะของปลิงทะเลขาวในระยะ indeterminate stage

- ก. ผนังของอันตะประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น คือ peritoneal epithelium (PE), connective tissue (CT) ที่มี hemal sinus (HS), และ germinal epithelium (GE) พบ เซลล์อสุจิหลายระยะ (spermatogonia, SG; spermatocyte, SC) ภายใน tubule
- ข. Germinal epithelium ยื่นตัวเข้าสู่แนวกลางของ tubule
- ค. บนแถบของ germinal epithelium ที่ยื่นเข้ามาใน tubule เต็มไปด้วยเซลล์อสุจิ (สรีชี)
- ง. แถบของ germinal epithelium ที่ยื่นเข้ามาใน tubule ที่กำลังขยายสูงขึ้น สังเกตเห็น เซลล์ spermatogonia (SG) จำนวนมาก มีรูปร่างกลม เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6-7 μm นิวเคลียสใหญ่ติดสีจาง

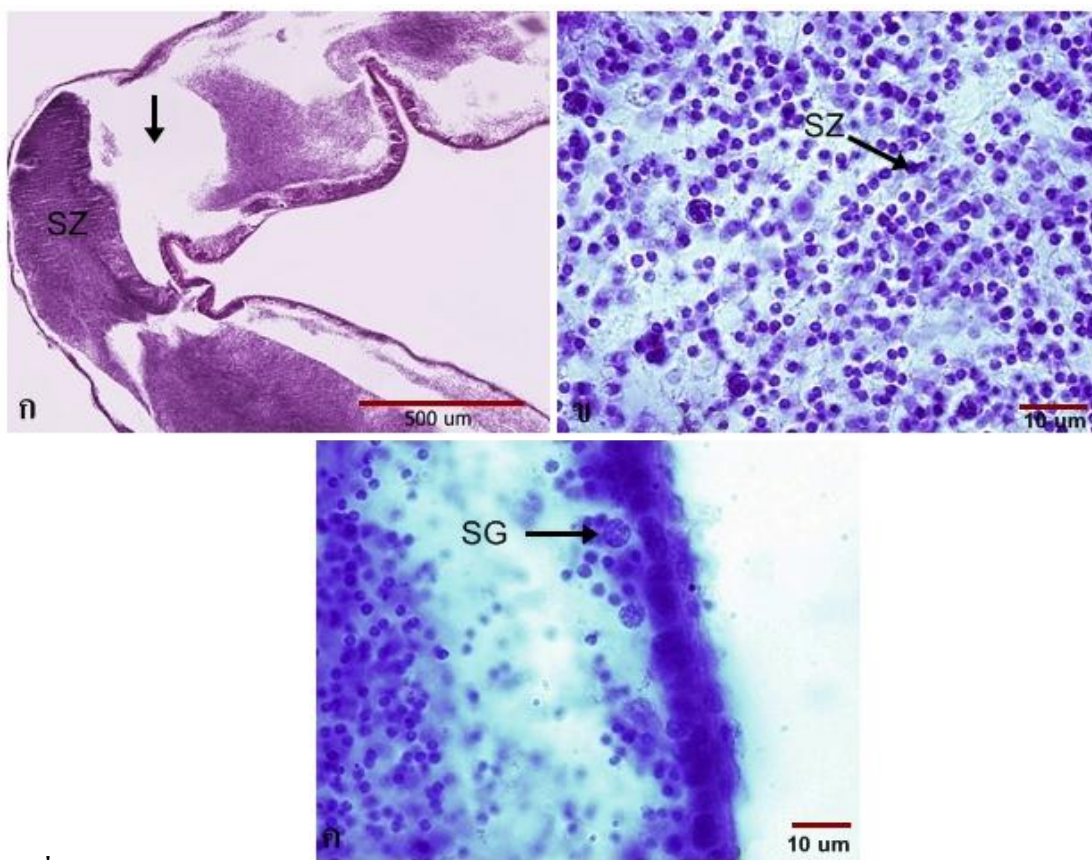


รูปที่ 40. อวัยวะของปลิงทะเลขาวในระยะ growing stage

- ก. อวัยวะในระยะแรกของ growing stage พบ germinal epithelium ที่ยื่นตัวเข้ามาในแนวกลางของ tubule จำนวนมาก
- ข. อวัยวะในระยะท้ายของ growing stage พบ germinal epithelium ที่ยื่นตัวเข้ามาในแนวกลางของ tubule มีจำนวนน้อยลง แต่พบ spermatozoa (SZ) ภายในมากขึ้น
- ค. บน germinal epithelium มีเซลล์ spermatogonia (SG) และ spermatocytes (SC) และพบเซลล์ spermatid และ spermatozoa อยู่ใน lumen ของท่อมากขึ้น
- ง. ภายใน lumen ของท่อพบเซลล์ระยะ spermatid (ST) และ spermatozoa (SZ) มากขึ้น

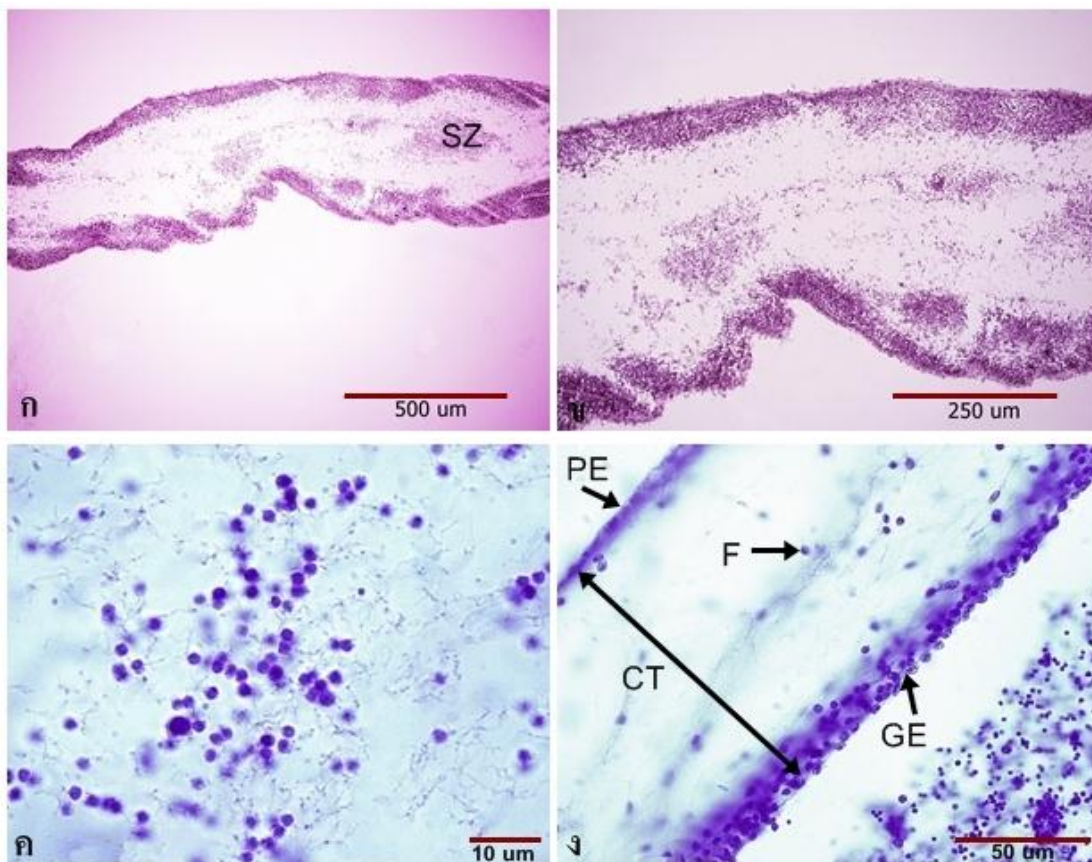


รูปที่ 41. อวัยวะของปลิงทะเลขาวในระยะ mature stage ไม่พบ germinal epithelium ที่ยื่นเข้ามาใน lumen (ก) ภายใน lumen เต็มไปด้วยเซลล์ spermatozoa (SZ) (ข และ ค) บริเวณ germinal epithelium ที่ผนังของ tubule ไม่พบเซลล์ spermatogonia (ง)



รูปที่ 42. อวัยวะของปลิงทะเลขาวในระยะ partly spawned stage

- ก. Tubule ของอวัยวะมีจำนวน spermatozoa (SZ) ลดลงในบางบริเวณ ซึ่งเห็นเป็นช่องว่าง (ลูกศร) ที่แสดงถึงการปล่อย spermatozoa ออกไป
- ข. ภายใน lumen ของ tubule มี spermatozoa (SZ) หนาแน่นน้อยลง
- ค. พบ spermatogonia (SG) มีจำนวนมากขึ้นบริเวณ germinal epithelium ที่ผนัง tubule



รูปที่ 43. อัณฑะของปลิงทะเลขาวในระยะ Spent stage

- ก. Tubule ของอัณฑะมีจำนวน spermatozoa (SZ) เหลือน้อยมาก แสดงถึงการปล่อย spermatozoa ออกไปเกือบหมด
- ข. Tubule ของอัณฑะที่กำลังขยายสูงขึ้น เห็นเซลล์สุจิจำนวนเล็กน้อยอยู่ในเซลล์ spermatozoa ภายใน lumen ของ tubule มีความหนาแน่นน้อยมาก
- ง. ผนังของอัณฑะมีความหนาแน่นมากขึ้น ซึ่งประกอบด้วย peritoneal epithelium (PE), connective tissue (CT) ภายในพบ fibroblast (F) และ germinal epithelium (GE)

1.3 เนื้อเยื่อวิทยาของรังไข่และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

รังไข่มีลักษณะเป็นท่อที่มีแขนง บรรจุเซลล์ไข่อยู่ภายใน ผนังของรังไข่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น (รูปที่ 44) ได้แก่

- **Peritoneal epithelium** เป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกสุด มีลักษณะเป็นเยื่อบุผิวที่เป็นส่วนของเยื่อบุช่องท้อง เป็นเซลล์ทรงสูงเรียงตัวแถวเดียว (simple columnar epithelium) วางตัวอยู่บน basal laminar
- **Connective tissue** เป็นเนื้อเยื่อชั้นกลาง ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันหลวม ๆ มี collagen fiber เป็นโครงร่าง ระหว่าง collagen fiber เป็นช่องว่างที่บรรจุน้ำเลือด เรียกว่า hemal space สำหรับนำอาหารมาเลี้ยงเซลล์ไข่ (Smile, 1988) (รูปที่ 44 และ 45)
- **Germinal epithelium** เป็นเนื้อเยื่อชั้นในสุด แยก connective tissue จาก ovarian lumen มีฐานเป็นเยื่อ basal laminar บางๆ พับตัวยื่นเข้ามาในท่อ บน basal laminar มีเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ไข่ (oogonia) วางตัวอยู่

ระยะพัฒนาการของรังไข่

ภายในรังไข่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Oogenesis) ระยะต่างๆ โดยสัมพันธ์กับพัฒนาการของรังไข่ ดังนี้

ระยะที่ 1 Indeterminate stage หรือ recovery stage ของรังไข่ พบเซลล์ไข่ในระยะ previtellogenic oocyte บน germinal epithelium เซลล์ไข่ในระยะนี้มีเส้นผ่าศูนย์กลาง น้อยกว่า 20 μm พัฒนามาจาก oogonia ในซัยโตพลาสซึมยังไม่พบ yolk granule สังกัดจากซัยโตพลาสซึมเป็นเนื้อเรียบเนียน ผนังของรังไข่ชั้น connective tissue ค่อนข้างหนา (รูปที่ 46)

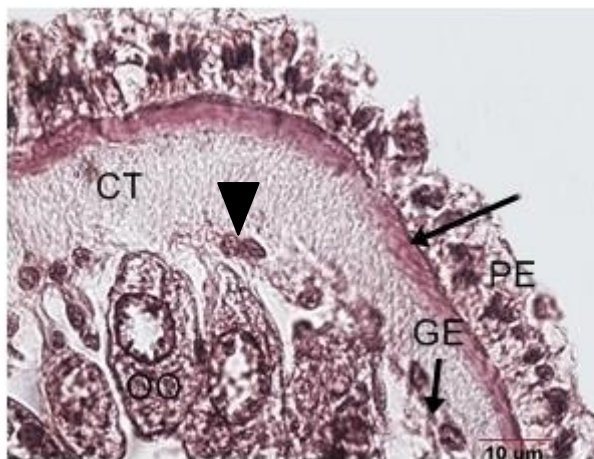
ระยะที่ 2 Growing stage ของรังไข่ พบเซลล์ไข่ระยะ vitellogenic oocyte เซลล์ไข่เริ่มหลุดออกจาก germinal epithelium เข้ามาอยู่ใน ovarian lumen แบ่งเป็นระยะ early vitellogenic oocyte ซึ่งเป็น vitellogenic oocyte ระยะต้นที่ยังมีขนาดเล็ก (เส้นผ่าศูนย์กลาง 20-40 μm) เริ่มสังเกตเห็น yolk granule ในซัยโตพลาสซึม และ mid vitellogenic oocyte ซึ่งเป็น vitellogenic oocyte ระยะกลางที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (เส้นผ่าศูนย์กลาง 40-90 μm) ในระยะนี้เซลล์ไข่เริ่มมี follicle ล้อมรอบ follicle ประกอบด้วย somatic cell ที่เรียกว่า follicular cell ซึ่งเป็นเซลล์บาง ๆ ขนาดเล็ก แผ่ตัวออกล้อมรอบเซลล์ไข่ (รูปที่ 47)

ระยะที่ 3 Mature stage ของรังไข่ พบเซลล์ไข่เต็ม tubules ของรังไข่ ส่วนใหญ่เป็นเซลล์ไข่ระยะ late vitellogenic oocyte เป็นเซลล์ไข่ที่มีพัฒนาการเต็มที่ มีขนาดใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลาง

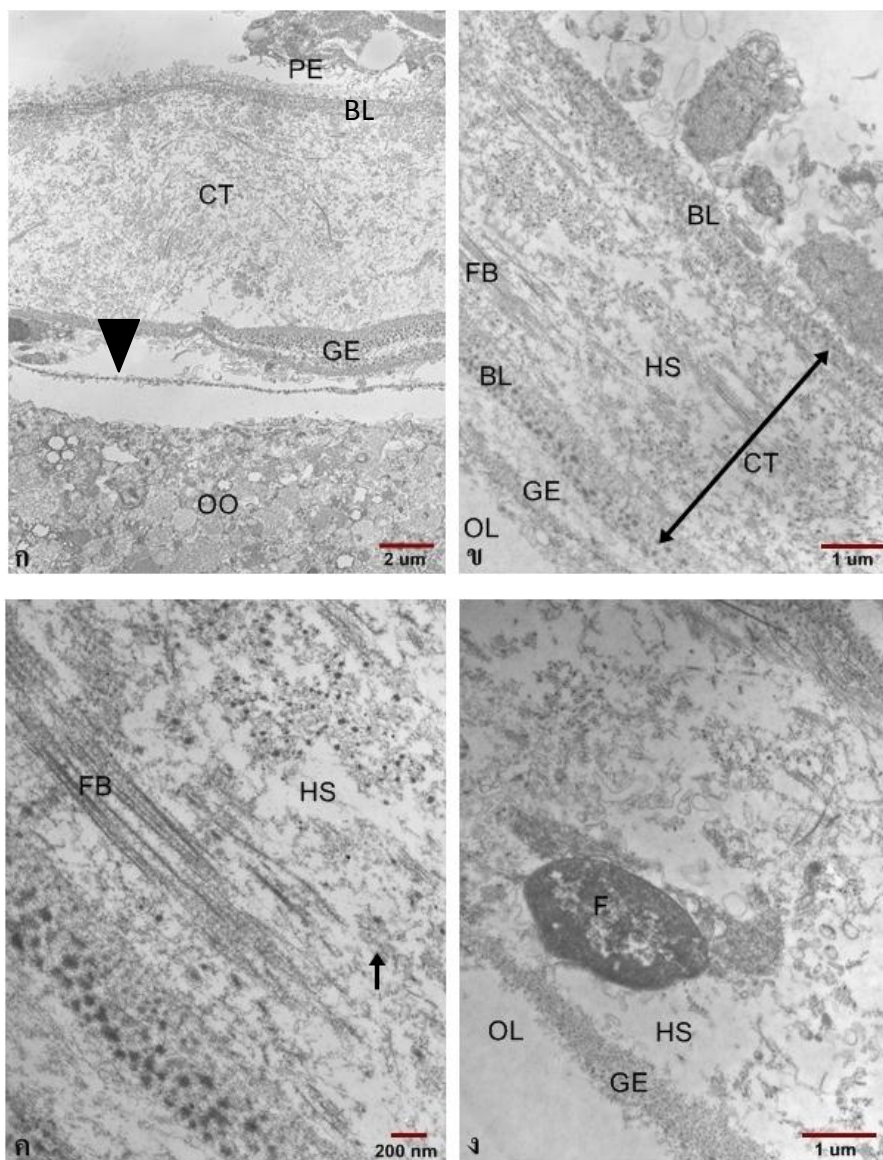
ประมาณ 100-170 μm มี microvilli ลักษณะคล้ายนิ้วมือสูงประมาณ 1-5 μm ยื่นขึ้นมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ไข่โดยรอบ รอบเซลล์ไข่มีลักษณะของ follicle ที่พัฒนาสมบูรณ์ชัดเจน เซลล์ไข่จะยึดติดกับ follicle โดยเนื้อเยื่อต่างๆ เรียกว่า protuberance และพบ germinal vesicle และ nucleolus ปรากฏชัดอยู่ภายในเซลล์ไข่ นอกจากนี้ยังพบเซลล์ petaloid amoebocyte เป็นเซลล์ขนาดเล็กแทรกอยู่ระหว่าง follicles มีหน้าที่ทำลายเซลล์ไข่ที่เสื่อมสภาพ (Smiley and Cloney, 1985) (รูปที่ 48)

ระยะที่ 4 Partly spawned stage ของรังไข่ มีการวางไข่ปล่อยไข่บางส่วนออกมา ทำให้เกิดช่องว่างมากใน lumen และพบว่าเริ่มมีการสร้างเซลล์ไข่ระยะแรกคือระยะ previtellogenic oocyte และ vitellogenic oocyte ขึ้นใหม่ที่บริเวณ germinal epithelium และพบเซลล์ไข่ที่กำลังสลายตัว โดยเฉพาะใน tubules ที่ยังไม่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งบ่งชี้ถึงการสลายตัวกลับ (resorbtion) ของเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่ได้ถูกปล่อย (รูปที่ 49)

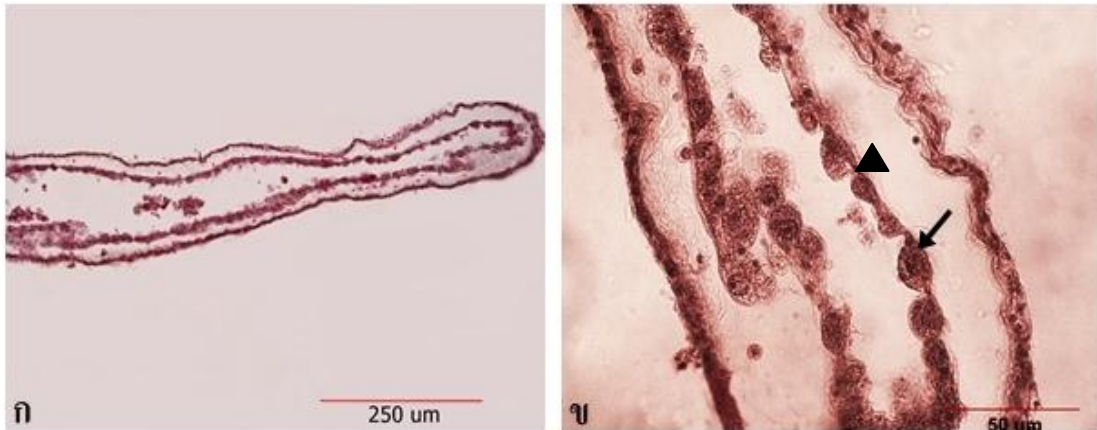
ระยะที่ 5 Spent stage ของรังไข่ ผนังรังไข่ที่หยาบย่นมีรอยพับ ภายใน lumen มีจำนวนไข่น้อยลงมาก เห็นเป็นช่องว่างมากขึ้น พบเซลล์ไข่ที่กำลังสลายตัว และมีการสร้างเซลล์ไข่ระยะ previtellogenic oocyte และ vitellogenic oocyte ที่บริเวณ germinal epithelium (รูปที่ 50)



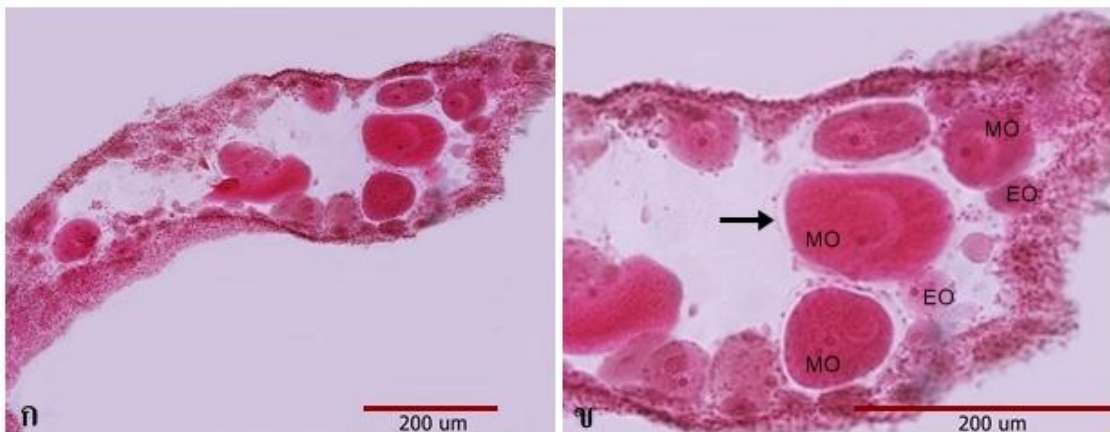
รูปที่ 44. ผนังรังไข่ประกอบด้วยเนื้อเยื่อ 3 ชั้น ได้แก่ peritoneal epithelium (PE) เป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกสุดวางตัวอยู่บน basal laminar (สรชี้) ถัดมาก็คือ connective tissue (CT) เป็นเนื้อเยื่อชั้นกลาง และ germinal epithelium (GE) เป็นเนื้อเยื่อชั้นในสุด พบเซลล์ไข่ (oocyte; OO) และมีเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ไข่ (oogonia; หัวลูกสร) วางตัวอยู่บน basal laminar



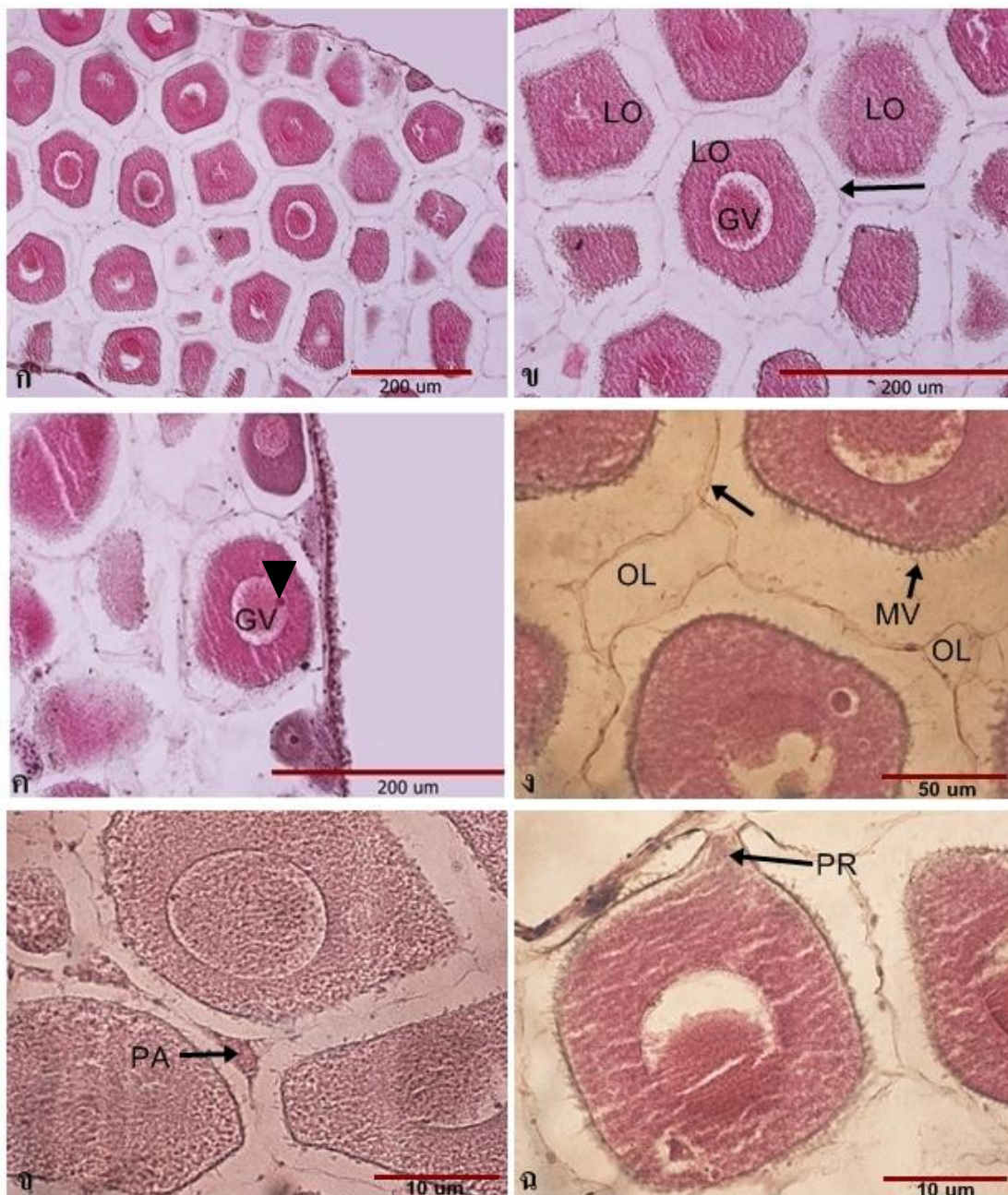
รูปที่ 45. ผนังของรังไข่เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีเนื้อเยื่อ 3 ชั้น คือ peritoneum (PE) วางตัวอยู่บน basal lamina (BL), connective tissue (CT), และ germinal epithelium (GE) โดยชั้นล่างลงมาจะพบเซลล์ไข่ (OO) ล้อมรอบด้วย follicle (หัวลูกศร) อยู่ใน ovarian lumen (OL) (ก) และ connective tissue ประกอบด้วย collagen fiber (FB), hemal fluid (สรชี้) อยู่ใน hemal space (HS) ของ hemal sinus (ข และ ค) และพบเซลล์ fibroblast (F) ในชั้น connective tissue (ง)



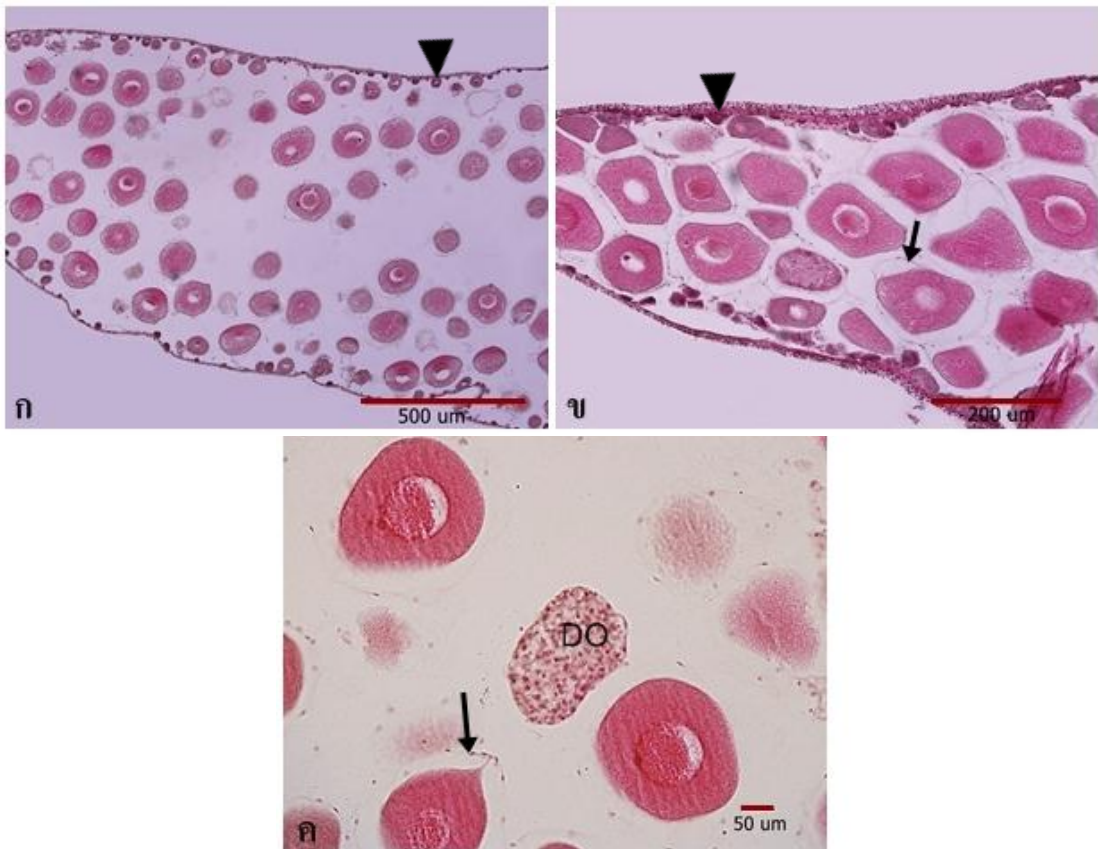
รูปที่ 46. รังไข่ระยะ indeterminate stage หรือ recovery stage (ก) พบเซลล์ไข่ในระยะ previtellogenic oocyte (สรชี) ขนาดน้อยกว่า 20 μm วางตัวเรียงอยู่บน germinal epithelium (หัวลูกสร) (ข)



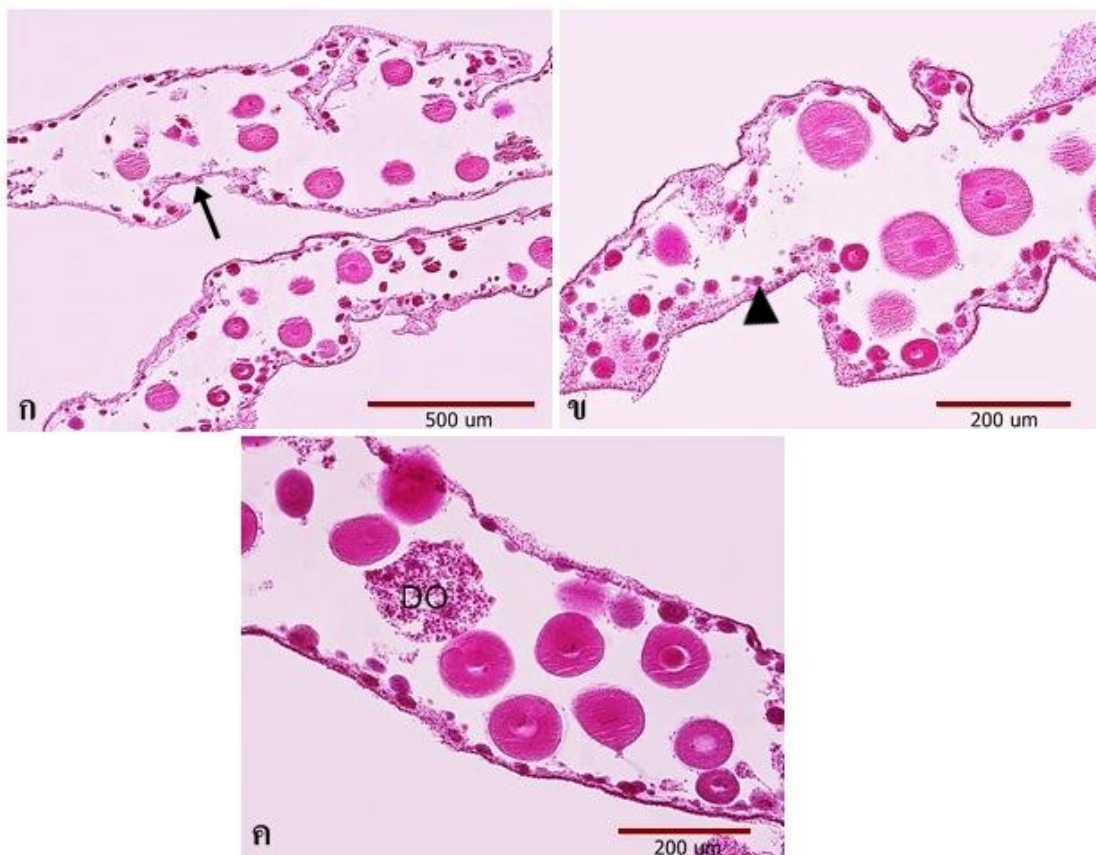
รูปที่ 47. รังไข่ระยะ growing stage (ก) พบเซลล์ไข่ในระยะ early vitellogenic oocyte (EO) และ mid vitellogenic oocyte (MO) ขนาด 20-40 μm และ 40-90 μm ตามลำดับ โดยเซลล์ไข่ระยะ mid vitellogenic oocyte เริ่มสร้าง follicle (สรชี) (ข)



รูปที่ 48. รังไข่ระยะ mature stage พบเซลล์ไข่ปริมาณมากเต็ม tubule (ก) เป็นเซลล์ไข่ในระยะ late vitellogenic oocyte (LO) ขนาด 100-170 μm เห็น follicle รอบเซลล์ไข่ชัดเจน (สรชี้) มี germinal vesicle (GV) กลางเซลล์ และ นิวคลีโอลัส (หัวลูกศร) ใน germinal vesicle (ข และ ค) ovarian lumen (OL) ระหว่าง follicle ในระยะนี้ จะมีช่องแคบลง บริเวณเชื่อมหุ้มเซลล์ไข่โดยรอบพบ microvilli (MV) ขึ้นขึ้นมา (ง) บางครั้งพบว่ามี petaloid amoebocyte (PA) แทรกอยู่ (จ) และ เซลล์ไข่จะยึดติดกับ follicle โดยเนื้อเยื่อบางๆ เรียกว่า protuberance (PR) (ฉ)



รูปที่ 49. รังไข่ระยะ partly spawned stage ภายใน tubule มีช่องว่างมากขึ้น ปริมาณไข่ลดลง (ก) follicle เริ่มสลาย (สรชี้) (ข และ ค) มีการสร้างเซลล์ไข่ระยะ previtellogenic oocyte ขึ้นใหม่ที่บริเวณ germinal epithelium (หัวลูกสร) (ก และ ข) บางบริเวณพบเซลล์ไข่ที่กำลังสลายตัว (DO, degenerated oocyte) (ค)



รูปที่ 50. รังไข่ระยะ Spent stage ภายใน tubule มีช่องว่างมากขึ้น ผนัง tubule ของรังไข่ เกี่ยวย่นมี รอยพับ (สรชี้) (ก) มีการสร้างเซลล์ไข่ระยะ previtellogenic oocyte และ vitellogenic oocyte ขึ้นใหม่ที่บริเวณ germinal epithelium (หัวลูกศร) (ข) ไม่พบ follicle รอบเซลล์ไข่ (ข และ ค) บางบริเวณพบเซลล์ไข่ที่กำลังสลายตัว (DO, degenerated oocyte) (ค)

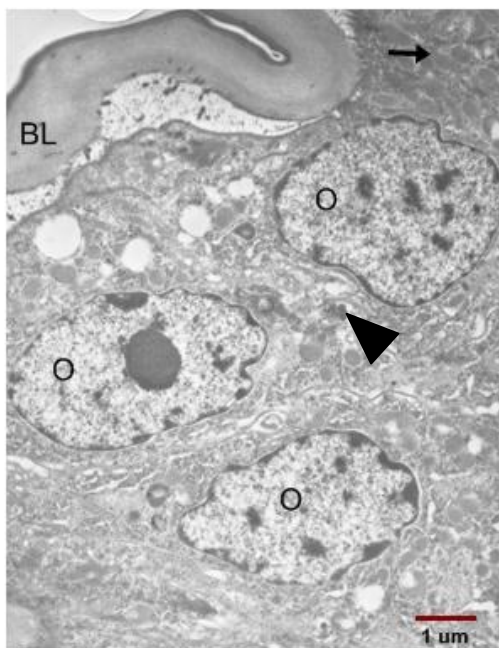
ลักษณะ ultrastructure ของเซลล์ไข่

เมื่อทำการศึกษาเซลล์ไข่ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า มีลักษณะดังนี้

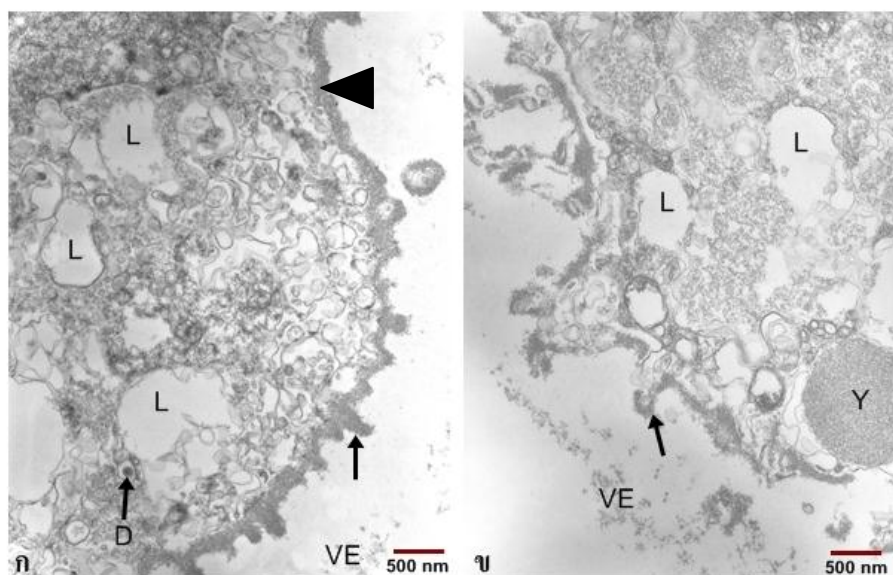
Oogonia วางอยู่บน basal laminar ของ germinal epithelium มีขนาดประมาณ 3-5 μm มีลักษณะคล้าย somatic cell แต่แตกต่างกันที่มี heterochromatin ที่เกาะเยื่อหุ้มนิวเคลียสน้อยกว่า ทำให้ทึบแสงอิเล็กตรอนน้อยกว่า ภายในนิวเคลียสมีโครมาตินกระจาย ไม่ค่อยพบกลุ่ม heterochromatin มี nucleolus อยู่กลางนิวเคลียส ในซัยโตพลาสซึมพบ mitochondria มากอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และมีโครงสร้างที่เรียกว่า electron-dense body ลักษณะกลมทึบแสงอิเล็กตรอน และไม่มีเยื่อหุ้มซึ่งเป็นโครงสร้างที่พบเฉพาะในเซลล์ไข่ (Smiley, 1988) (รูปที่ 51)

Early vitellogenic oocyte เยื่อหุ้มเซลล์ไข่ (plasma membrane) หนาประมาณ 250 nm มี microvilli ขึ้นขึ้นมาลักษณะคล้ายนิ้วมือ ความสูงประมาณ 100-500 nm กว้างประมาณ 250 nm เนื่องจาก microvilli มีเยื่อหุ้มบางๆ ล้อมรอบไข่เรียกว่า vitelline coat ในซัยโตพลาสซึม เริ่มพบ yolk granule และมีแกรนูลที่มีสีจางเรียกว่า loose granule ขนาดประมาณ 1 μm และแกรนูลที่ทึบแสงอิเล็กตรอนเรียกว่า dense granule ขนาดประมาณ 200 nm (รูปที่ 52)

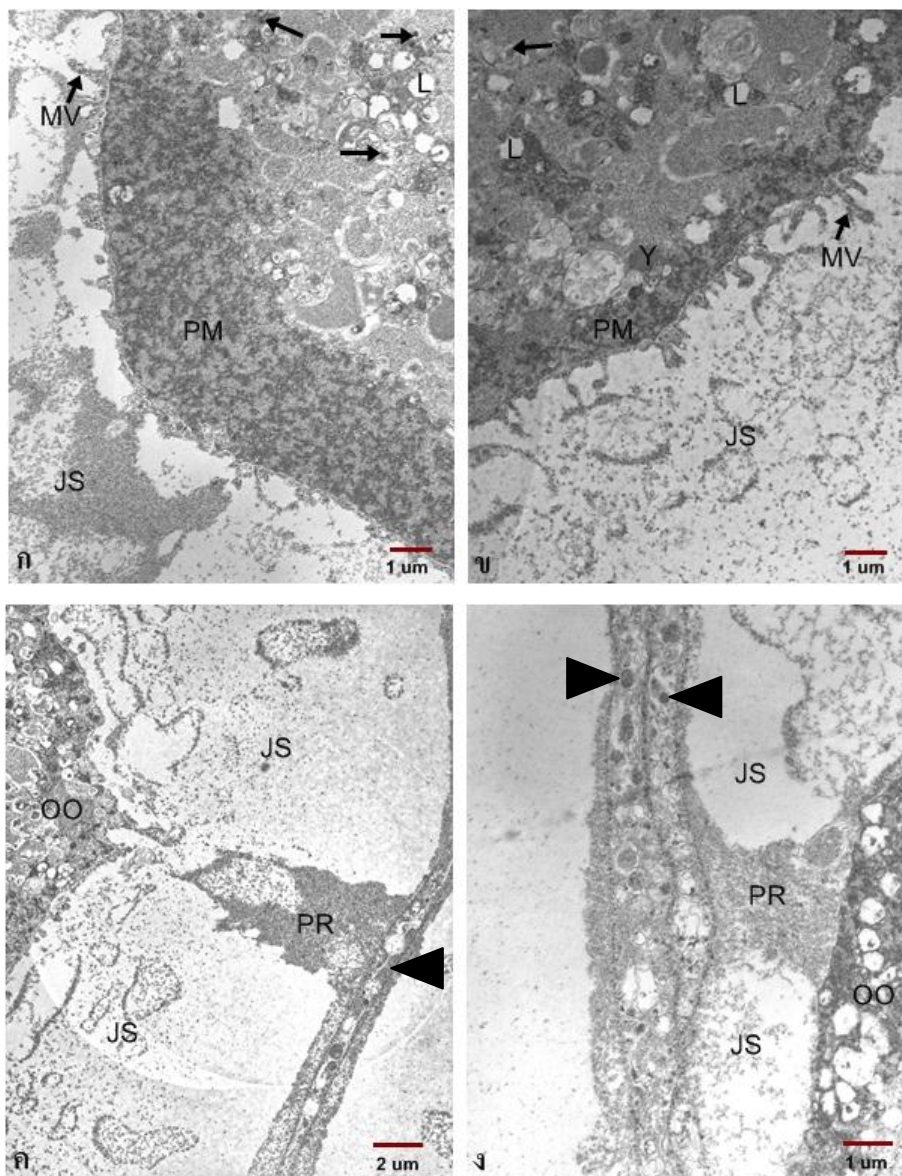
Late vitellogenic oocyte ในนิวเคลียสพบ nucleolus ชัดเจน ยังคงมีเยื่อหุ้มนิวเคลียสที่เรียกว่า germinal vesicle สมบูรณ์ (รูปที่ 54) เยื่อหุ้มเซลล์ไข่มีความหนาเพิ่มขึ้น ประมาณ 1-5 μm microvilli มีลักษณะผอมและยาวขึ้น คือ สูงประมาณ 1-5 μm และกว้างประมาณ 100-200 nm ในซัยโตพลาสซึมพบ yolk granule ปริมาณมาก ยังคงพบ loose granule และ dense granule ที่มีขนาดใกล้เคียงกับเซลล์ไข่ระยะ Early vitellogenic oocyte รอบเซลล์ไข่มีชั้น follicle ซึ่งประกอบด้วย follicular cell มีลักษณะเรียวยาวแผ่ซัยโตพลาสซึมหุ้มรอบเซลล์ไข่ และระหว่างชั้น microvilli และ follicle มีช่องว่าง jelly space บรรจุโครงสร้างที่มีรูปทรงไม่แน่นอน (amorphous substance) ที่ทึบแสงอิเล็กตรอนเป็นบางบริเวณกระจายอยู่ เซลล์ไข่ในระยะนี้มีด้านหนึ่งถูกยึดไว้กับ follicle ด้วย protuberance 1 อัน รูปร่างทรงกระบอกด้านในกลวง หนาประมาณ 2-3 μm (รูปที่ 53) นอกจากนี้ภายใน jelly space ยังพบโครงสร้างเป็นแท่งยาวประมาณ 10 μm หลายแท่งยื่นตั้งฉากมาจาก follicle (follicular stick) โดยส่วนที่ติดกับ follicle มีลักษณะทึบแสงอิเล็กตรอนหนาประมาณ 1 μm และส่วนปลายมีลักษณะทึบแสงอิเล็กตรอนน้อยกว่า หนาประมาณ 2 μm (รูปที่ 55)



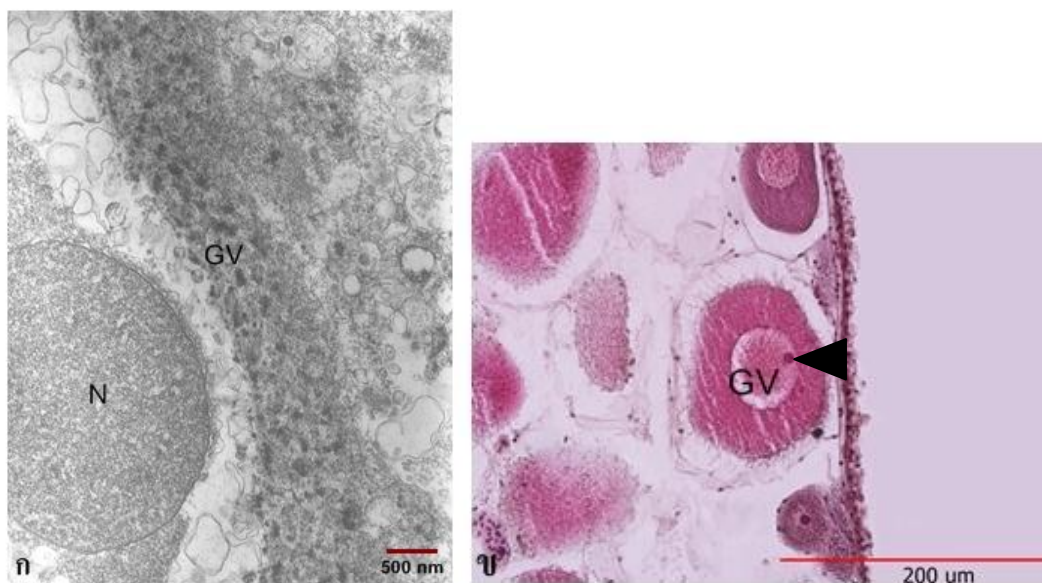
รูปที่ 51. TEM แสดง oögonia (O) วางอยู่บน basal lamina (BL) ของ germinal epithelium ภายในซัยโตพลาสมมีพบ mitochondria (สรชี้) ปริมาณมากอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และมีโครงสร้างที่เรียกว่า electron-dense body (หัวลูกศร)



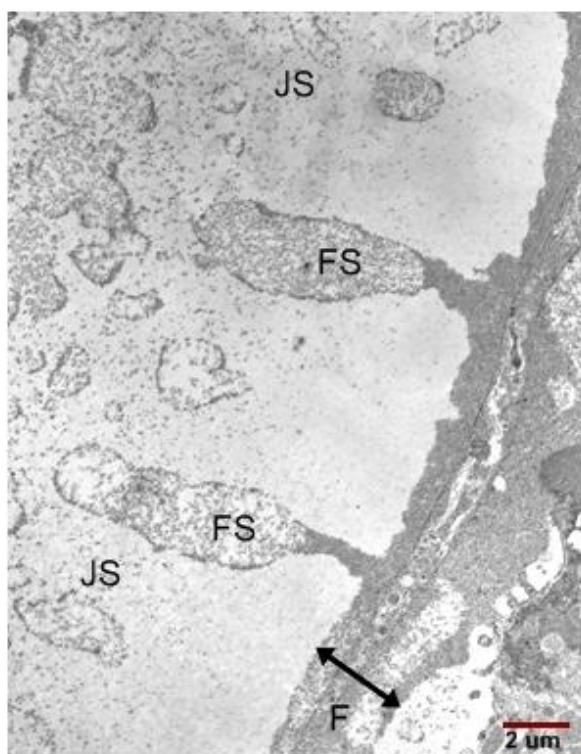
รูปที่ 52. TEM แสดง early vitellogenic oöcyte มีเยื่อหุ้มเซลล์ไซ (หัวลูกศร) หนา microvilli (สรชี้) ขึ้นขึ้นมามากขณะคล้ายนิ้วมือ เนื่องจาก microvilli มีเยื่อหุ้มบางๆ ล้อมรอบไปเรียกว่า vitelline envelope (VE) ในซัยโตพลาสมมีพบ loose granule (L), dense granule (D) และเริ่มพบ yolk granule (Y) (ก และ ข)



รูปที่ 53. TEM ของ late vitellogenic oocyte แสดงเยื่อหุ้มเซลล์ (PM) มีความหนาเพิ่มขึ้น microvilli (MV) มีลักษณะพอมและยาวขึ้น ในซัยโทพลาซึมพบ yolk granule (Y) ปริมาณมาก ยังคงพบ loose granule (L) และ dense granule (สรชี้) และมี jelly space (JS) บรรจุโครงสร้างที่มีรูปทรงไม่แน่นอนกระจายอยู่ (ก และ ข) รอบเซลล์ไข่ (OO) ถัดจาก jelly space มีชั้น follicle ซึ่งประกอบด้วย follicular cell (หัวลูกสร) มีลักษณะเรียวยาวแผ่ซัยโทพลาซึมหุ้มรอบเซลล์ไข่ และมีด้านหนึ่งของเซลล์ไข่ถูกยึดไว้กับ follicle ด้วย protuberance (PR) (ค และ ง)



รูปที่ 54. ในนิวเคลียสของ late vitellogenic oocyte พบ nucleolus (N หรือ หัวลูกศร) ชัดเจน มีเยื่อหุ้มนิวเคลียส ที่เรียกว่า germinal vesicle (GV) สมบูรณ์ (ก และ ข)



รูปที่ 55. ภายใน jelly space (JS) ของ late vitellogenic oocyte พบโครงสร้างเป็นแท่งหลายแท่ง (follicular stick, FS) ยื่นตั้งฉากมาจาก follicle (F)

2. ฤดูวางไข่ของปลิงทะเลขาว *H. scabra* แถบภาคใต้ของประเทศไทยฝั่งอันดามัน

เพื่อศึกษาเกี่ยวกับฤดูกาลผสมพันธุ์หรือฤดูกาลวางไข่ (spawning season) ของปลิงทะเลขาว ในแถบนี้ ได้ทำการศึกษาสัดส่วนปลิงทะเลขาวที่มีระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะ ต่อจำนวนปลิงทะเลขาวทั้งหมด (จำนวนปลิงทะเลขาวทั้งหมดแสดงไว้ใน ตารางที่ 14) ในแต่ละเดือน เป็นระยะเวลา 1 ปี ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ได้ผลดังนี้

ตารางที่ 14. แสดงจำนวนปลิงทะเลขาว (ตัว) เพศผู้และเพศเมียที่เก็บได้ในแต่ละเดือน

เพศ	ม.ค.	ก.พ.	มี.ค.	เม.ย.	พ.ค.	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ก.ย.	ต.ค.	พ.ย.	ธ.ค.
ผู้	12	11	10	9	1	7	7	11	6	5	3	6
เมีย	8	12	12	10	0	2	8	7	6	5	5	4
ไม่พบ gonad	7	5	6	6	20	5	5	1	3	0	0	0
รวม	27	28	28	25	21	14	20	19	15	10	8	10

เพศผู้ การเจริญของอวัยวะแบ่งเป็นระยะ indeterminate stage, growing stage, mature stage, partly spawned stage และ spent stage โดยในการศึกษาแต่ละเดือนพบสัดส่วนปลิงทะเลขาว ที่มีอวัยวะในระยะต่างๆ ดังนี้ (รูปที่ 56)

- Indeterminate stage พบมากในเดือนพฤษภาคมและเดือนมิถุนายน คือประมาณ 85-100% ของจำนวนปลิงทั้งหมด
- Growing stage พบมากในเดือนกรกฎาคมถึงเดือนกันยายน คือประมาณ 50-60% ของจำนวนปลิงทั้งหมด
- Mature stage พบเกือบทุกเดือนในรอบปี ต่างกันที่สัดส่วนที่พบตั้งแต่ 20-100% โดยพบมากที่สุดเป็น 100% ในเดือนพฤศจิกายน และไม่พบระยะนี้เลยในเดือนพฤษภาคมและเดือนมิถุนายน
- ระยะ Partly spawned stage พบ 2 ช่วง คือ เดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม ที่สัดส่วน 40-50% และเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน ที่สัดส่วน 20-35% ของจำนวนปลิงทั้งหมด
- ระยะ Spent stage พบในเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายนเท่านั้น โดยสัดส่วนของ spent stage ค่อย ๆ เพิ่มขึ้น จากเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน เป็น 10-55% ของจำนวนปลิงทั้งหมด

เพศเมีย การเจริญของรังไข่แบ่งเป็นระยะ indeterminate stage, growing stage, mature stage, partly spawned stage และ spent stage โดยในการศึกษาแต่ละเดือนพบสัดส่วนปลิงทะเลขาวที่มีรังไข่ในระยะต่างๆ ดังนี้ (รูปที่ 57)

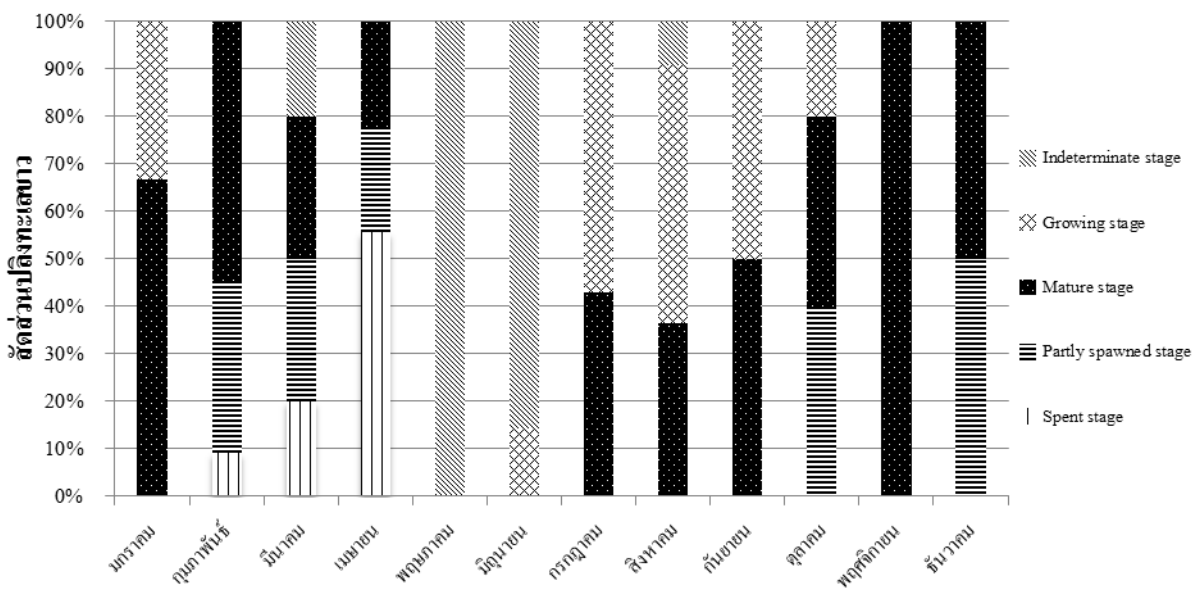
- Indeterminate stage พบมากที่สุดในเดือนมิถุนายนถึง 100% ไม่พบในเดือนกรกฎาคม เพราะมีการพัฒนาไปเป็น growing stage และพบอีกครั้งในเดือนถัดมาคือเดือนสิงหาคมและเดือนตุลาคม ที่ 55-70% ของจำนวนปลิงทั้งหมด
- Growing stage พบมากที่สุดในเดือนกรกฎาคมถึง 100% และค่อย ๆ ลดลงในเดือนสิงหาคมและเดือนกันยายน คือประมาณ 50-60% ของจำนวนปลิงทั้งหมด
- Mature stage พบตั้งแต่เดือนกันยายนไปจนถึงเดือนกุมภาพันธ์ ที่ 20-75% และไม่พบระยะนี้เลยในเดือนมีนาคมถึงเดือนสิงหาคม
- ระยะ Partly spawned stage พบตั้งแต่เดือนตุลาคมถึงเดือนเมษายน ที่ 25-60% ของจำนวนปลิงทั้งหมด
- ระยะ Spent stage พบในเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายนเท่านั้น โดยสัดส่วนของ spent stage ค่อย ๆ เพิ่มขึ้น จากเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน ที่ 10-55% ของจำนวนปลิงทั้งหมด

เมื่อพิจารณาระยะการเจริญพันธุ์หรือระยะที่มีความพร้อมในการวางไข่หรือปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลิงทะเลขาวโดยพิจารณาจากระยะ mature stage ในรอบปี พบว่า ระยะเจริญพันธุ์เริ่มมากขึ้นประมาณเดือนกรกฎาคมถึงเดือนพฤศจิกายน และมีระยะเจริญพันธุ์สูงสุดในเดือนพฤศจิกายน และเริ่มลดลงในเดือนธันวาคมถึงเดือนเมษายน หลังจากนั้นในเดือนพฤษภาคมและเดือนมิถุนายนไม่พบระยะเจริญพันธุ์เลย (รูปที่ 58)

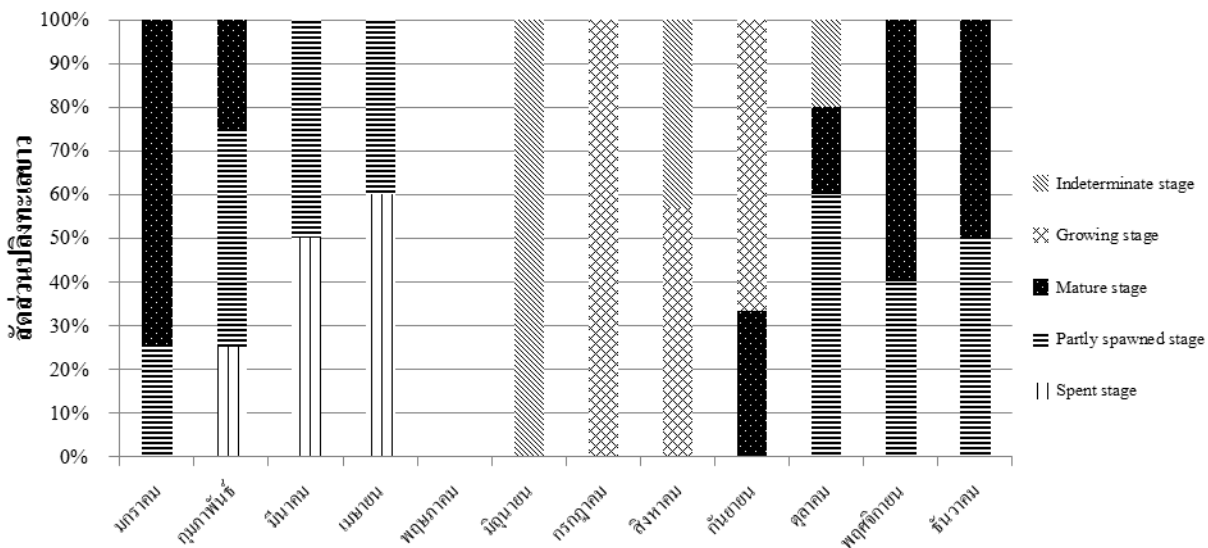
เมื่อพิจารณาระยะการเจริญพันธุ์หรือระยะที่มีความพร้อมในการวางไข่หรือปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียของปลิงทะเลขาวโดยพิจารณาจากระยะ mature stage ในรอบปี พบว่า ระยะเจริญพันธุ์เริ่มมากขึ้นในเดือนกันยายนถึงเดือนมกราคม และมีระยะเจริญพันธุ์สูงสุดในเดือนมกราคม เริ่มลดในเดือนกุมภาพันธ์ หลังจากนั้นในเดือนมีนาคมถึงเดือนสิงหาคมไม่พบระยะเจริญพันธุ์เลย (รูปที่ 58)

ผลจากการคำนวณหาค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index; G.S.I.) เฉลี่ย พบว่า ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีค่า G.S.I. สูงในเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม ซึ่งมีค่ามากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน คือ 9.3 ± 2.2 ในเพศผู้ และ 16.2 ± 2.8 ในเพศเมีย (รูปที่ 59)

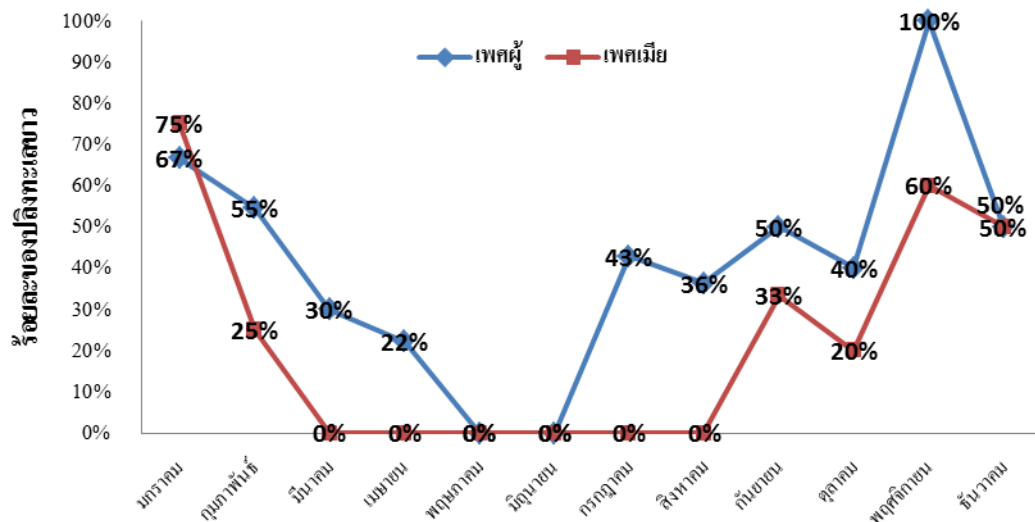
จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น กล่าวได้ว่าฤดูวางไข่ของปลิงทะเลขาวแถบภาคใต้ของประเทศ
ไทยฝั่งอันดามันอยู่ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม



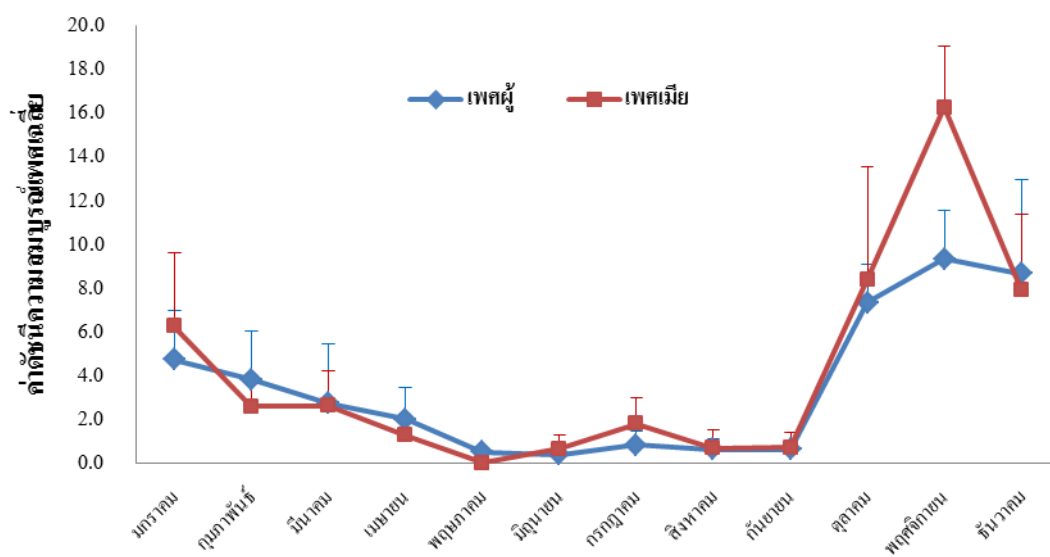
รูปที่ 56. สัดส่วนในแต่ละระยะพัฒนาการของอ้นทะเลในรอบปีของปลิงทะเลขาวเขตฝั่ง



รูปที่ 57. สัดส่วนในแต่ละระยะพัฒนาการของรังไข่ในรอบปีของปลิงทะเลขาวเขตฝั่ง



รูปที่ 58. ร้อยละของปลิงทะเลขาวในระยะเจริญพันธุ์ (mature stage) ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ในรอบปี



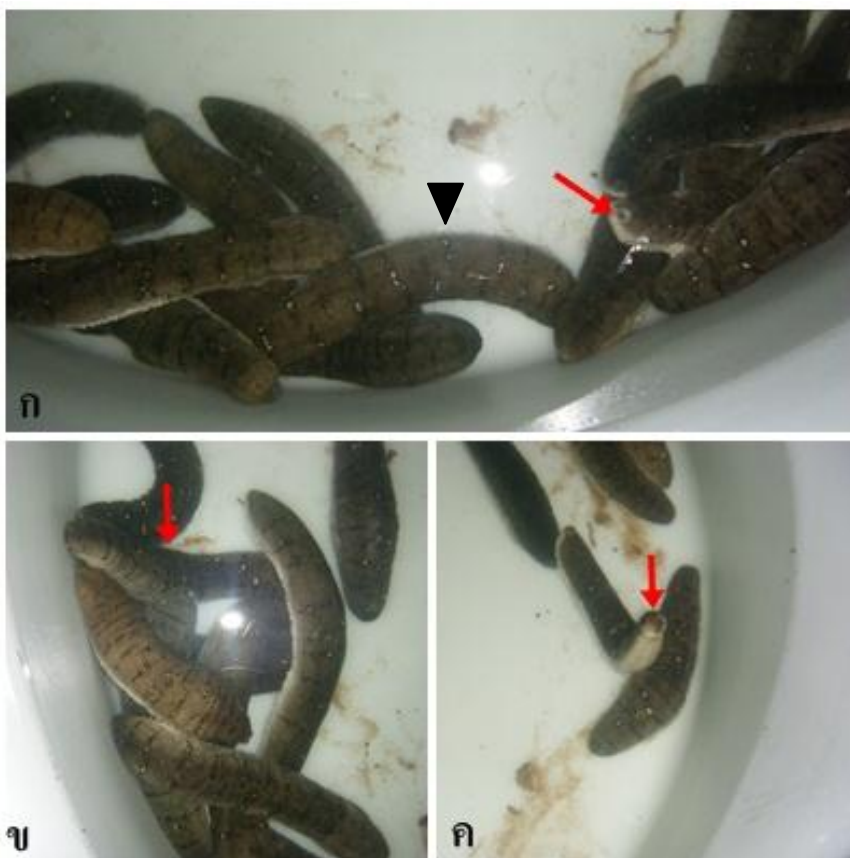
รูปที่ 59. ค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index; G.S.I.) เฉลี่ย ของปลิงทะเลขาว เปรียบเทียบระหว่างเดือนต่างๆ ในรอบปี

3. รอบของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในฤดูวางไข่

ผลการทดลองพบว่าไม่สามารถกระตุ้นให้ปลิงทะเลวางปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ในช่วงที่ไม่ใช่ฤดูวางไข่ การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์จะพบมากในช่วงฤดูวางไข่ (เดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม และอาจเลยมาถึงเดือนมกราคมของปีถัดไป) (ตารางที่ 15) เมื่อนำปลิงทะเลวางในฤดูวางไข่มากระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ พบว่าปลิงทะเลวางมี พฤติกรรมก่อนปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ คือ เคลื่อนที่เร็ว และมีการเคลื่อนที่แบบกลิ้ง มีการหดตัวเป็นจังหวะ ลำตัวยืดยาวขึ้น ปีนขึ้นที่ผนัง ด้านข้างของถังวางไข่ ชุดตัวตั้งชั้น โยคไปมา และรูทวาร (anus) เปิดกว้าง (รูปที่ 60) พบว่าปลิงทะเลเพศผู้จะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ก่อนเพศเมีย โดยปล่อยเซลล์อสุจิออกมาเป็นสายต่อเนื่อง จากรูเปิดของ อวัยวะสืบพันธุ์ (gonophores) ที่มีลักษณะโป่งพอง (รูปที่ 62) นานประมาณ 9-68 นาที (ตารางที่ 16) สายอสุจิมิสีขาวครีม (รูปที่ 61) เมื่อเพศผู้ปล่อยอสุจิเสร็จแล้วจะทำให้ น้ำมีลักษณะขุ่น หลังจากนั้น เพศเมียจะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วไปยังบริเวณที่มีอสุจิเข้มข้น ชุดตัวขึ้นตั้งชั้น และปล่อยเซลล์ไข่เห็นเป็นสี ส้มอ่อนออกมา โดยลักษณะการปล่อยจะพ่นออกมาด้วยความแรงในช่วงเวลาสั้นๆ ไม่กี่วินาที (1-3 วินาที) (ตารางที่ 16) จากรูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonophores) ที่มีลักษณะโป่งพอง ในการทดลองนี้ไม่สามารถบันทึกภาพเพศเมียที่กำลังปล่อยไข่ได้เนื่องจากใช้เวลารวดเร็วมาก แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยได้นำภาพเพศเมียที่กำลังปล่อยไข่ซึ่งเป็นงานวิจัยของปลิงทะเลวางแถบ Hervey Bay ใน เขต Queensland ของออสเตรเลีย (Giraspy และ Walsalam, 2010) มาเปรียบเทียบ (รูปที่ 63) หลังจากปล่อยไข่เสร็จแล้วเพศเมียจะวางตัวราบลงกับพื้นของถังวางไข่ และหยุดเคลื่อนที่ ในขณะที่ ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ พบว่าเพศเมียมีความไวต่อสิ่งรบกวนมากกว่าเพศผู้ กล่าวคือจะหยุดการวางไข่ทันทีที่มีการรบกวน

การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเลวางจากการกระตุ้นทั้งหมด 10 ตัว พบว่าสามารถกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ 3 ตัว ซึ่งเป็นเพศผู้ 2 ตัว และเพศเมีย 1 ตัว (ตารางที่ 16) โดยพบว่าการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์มักจะเกิดจากการกระตุ้นในเวลาเย็น ประมาณ 16.00-19.00 น. ปริมาณไข่ต่อการปล่อยหนึ่งครั้งประมาณ 1,000,000-2,000,000 ฟอง จากการทดลองพบว่าปลิงทะเลวางเพศผู้มีรอบการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้น้อยที่สุด 7 วัน ในขณะที่เพศเมียมีรอบการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้น้อยที่สุด 17 วัน (ตารางที่ 15) และการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์มักสัมพันธ์กับเวลาข้างขึ้นข้างแรม โดยสามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ทั้งข้างขึ้นและข้างแรม ซึ่งประสบผลสำเร็จในช่วง 3-5 ค่ำ และ 12-13 ค่ำ ตัวแต่อย่างไรก็ตามจากการสังเกตพบว่ามีอีกหลายปัจจัยที่มีผลต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเลวาง ได้แก่ ความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งที่อยู่อาศัย และต้องมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม คือ อยู่ในบริเวณที่เป็นทราย หรือ โคลนปนทรายที่มีความเค็มของน้ำ 30-33 ppt และระดับความลึกมากกว่า 1 เมตร มีสาหร่ายทะเลหรือหญ้าทะเล มีอาหารเพียงพอ และ

ไม่มีความเครียด ปลิงทะเลขาวที่มีความเครียดจะมีลักษณะแผลเปื่อยที่ผิวหนัง เนื่องจากสูญเสียเมือกและผิวหนังอาจเกิดบาดแผลสีขาวที่เกิดจากการกระตุ้นและการสัมผัส (Agudo, 2006) และเมื่อนำปลิงทะเลขาวที่มีแผลเปื่อยไปเลี้ยงในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม ส่งผลให้แผลเปื่อยหายเป็นปกติเองภายใน 2-3 อาทิตย์ จากการทดลองพบว่าปลิงทะเลขาวที่มีแผลเปื่อย (รูปที่ 64) ไม่สามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์จากการกระตุ้นได้แม้ว่ามีพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ในระยะ mature stage



รูปที่ 60. พฤติกรรมของปลิงทะเลขาวก่อนที่จะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

- ก. ลักษณะลำตัวยืดยาว (หัวถูกสร) และรูทวาร (anus) เปิดกว้าง (สรชี้)
- ข. ปีนขึ้นผนังด้านข้างของถังวางไข่ (สรชี้)
- ค. ยกส่วนหน้าสุดของร่างกายขึ้น (สรชี้)



รูปที่ 61. ปลิงทะเลขาวเพศผู้ปล่อยเซลล์อสุจิเป็นสายสีขาวครีม



รูปที่ 62. รูเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonophores) มีลักษณะโป่งพอง (สรชี้) ขณะปล่อยอสุจิ



รูปที่ 63. ปลิงทะเลขาวเพศเมียปล่อยไข่สีส้มอ่อน

ที่มา: Giraspy และ Walsalam (2010)



รูปที่ 64. ปลิงทะเลขาวที่มีความเครียด มีรอยเปื้อนสีขาวที่ผิวหนัง

ตารางที่ 15. แสดงวันที่ปลิงทะเลขาวปล่อยเซลล์สืบพันธุ์จากการกระตุ้น ในระยะเวลา 1 ปี

วันที่	เพศผู้	เพศเมีย	ระยะห่างระหว่างการกระตุ้นแต่ละครั้ง (วัน)
06/04/55 (ขึ้น 15 ค่ำ)	-	-	} 37 } 36 } 29 } 48 } 27 } 13 } 34 } 17 } 14 } 23 } 7 } 6 } 7 } 6
13/05/55 (แรม 8 ค่ำ)	-	-	
18/06/55 (แรม 14 ค่ำ)	-	-	
17/07/55 (แรม 14 ค่ำ)	-	-	
3/09/55 (แรม 2 ค่ำ)	-	-	
30/09/55 (ขึ้น 15 ค่ำ)	-	-	
13/10/55 (แรม 13 ค่ำ)	✓	-	
16/11/55 (ขึ้น 3 ค่ำ)	✓	✓	
03/12/55 (แรม 5 ค่ำ)	✓	✓	
17/12/55 (ขึ้น 4 ค่ำ)	✓	-	
09/01/56 (แรม 12 ค่ำ)	✓	✓	
16/01/56 (ขึ้น 5 ค่ำ)	✓	- (eviscerate)	
22/01/56 (ขึ้น 11 ค่ำ)	-	-	
29/01/56 (แรม 3 ค่ำ)	✓	-	
05/02/56 (แรม 10 ค่ำ)	-	-	

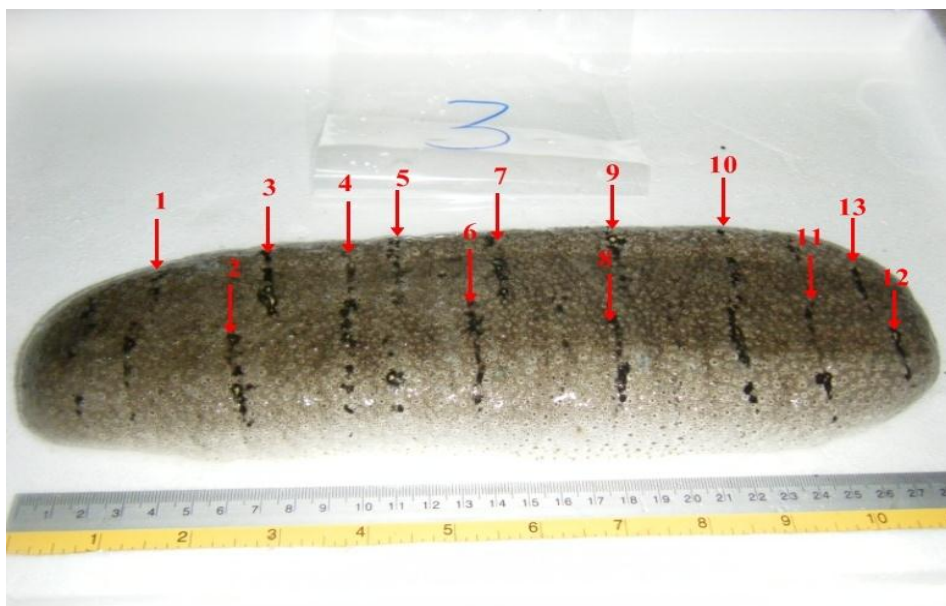
ตารางที่ 16. แสดงช่วงเวลาในการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาวในฤดูวางไข่

วันที่	เพศผู้ (1) - เวลาที่			เพศผู้ (2) - เวลาที่			เพศเมีย - เวลาที่	
	เริ่มปล่อย	ปล่อยเสร็จ	ใช้เวลา	เริ่มปล่อย	ปล่อยเสร็จ	ใช้เวลา	เริ่มปล่อย	ใช้เวลา
16/11/55	17.35	18.34	59 นาที	17.37	18.45	68 นาที	19.00	2-3 วินาที
03/12/55	16.18	17.15	57 นาที	16.20	16.29	9 นาที	18.00	1 วินาที
17/12/55	16.57	17.36	39 นาที	17.04	17.33	29 นาที	-	-
09/01/56	16.17	17.14	57 นาที	-	-	-	17.40	1 วินาที
16/01/56	17.00	17.15	15 นาที	-	-	-	-	-
29/01/56	16.55	17.06	11 นาที	-	-	-	-	-

4. การแยกเพศปลิงทะเลขาวด้วยลายเส้นบนลำตัว

ผู้วิจัยได้สังเกตเห็นว่าเพศของปลิงทะเลขาวมักมีความสัมพันธ์กับจำนวนเส้นและระยะห่างของเส้นที่พาดขวางลำตัว จึงได้ทำการทดลองเก็บข้อมูลในเบื้องต้นจากปลิงทะเลขาวจำนวน 28 ตัว ในเดือนกันยายนและตุลาคม 2555 ที่มีน้ำหนักระหว่าง 200-800 กรัม

โดยนำปลิงทะเลขาวแต่ละตัวซึ่งน้ำหนักและวัดความยาวตัว (รูปที่ 65) นับจำนวนเส้นที่มีลักษณะเป็นแนวขวางลำตัว ซึ่งแต่ละเส้นที่นับจะต้องมีความยาวเกินครึ่งลำตัวตามแนวขวาง และวัดระยะห่างระหว่างเส้นบนผิวลำตัวปลิงทะเลขาว นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย และนำอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาวไปผ่านกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อตรวจสอบเพศ ได้ข้อมูลดังตารางที่ 17



รูปที่ 65. แสดงลายเส้นของปลิงทะเลขาว (สรชี)

ตารางที่ 17. แสดงเพศ ระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ น้ำหนักตัว ความยาว จำนวนเส้นแนวขวางที่ปรากฏบนลำตัว และระยะห่างระหว่างเส้นเกล็ด ของปลิงทะเลขาว

ตัวที่	เพศ	ระยะ gonad	น้ำหนักตัว (g)	ความยาวตัว (cm)	จำนวนเส้นทั้งหมด	ระยะห่างระหว่างเส้นเกล็ด (cm)
1	ผู้	indeterminate	205	16	12	1.09
2	ผู้	growing	420	22	12	1.5
3	ผู้	growing	320	18.5	13	0.97
4	ผู้	growing	355	17.5	10	1.26
5	ผู้	growing	325	17.7	6	1.84
6	ผู้	growing	290	17	5	2.13
7	ผู้	growing	330	16.7	12	2.83
8	ผู้	growing	565	23.5	7	0.3
9	ผู้	mature	380	20	12	1.32
10	ผู้	mature	385	19	12	1.22
11	ผู้	mature	320	18	10	1.42
12	ผู้	mature	495	17.5	9	1.45
13	ผู้	mature	616	27.5	13	1.13
14	ผู้	mature	584	24	19	0.89
15	ผู้	partly spawn	686	28	13	2.52
16	ผู้	partly spawn	790	33	16	1.01
17	เมีย	indeterminate	375	18.5	14	1.25
18	เมีย	indeterminate	260	16.5	8	2
19	เมีย	indeterminate	275	18	8	1.6
20	เมีย	indeterminate	347	19.5	7	2.67
21	เมีย	growing	250	16.8	18	1.12

ตารางที่ 17. แสดงเพศ ระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ น้ำหนักตัว ความยาว จำนวนเส้นแนวขวางที่ปรากฏบนลำตัว และระยะห่างระหว่างเส้นเฉลี่ย ของปลิงทะเลขาว (ต่อ)

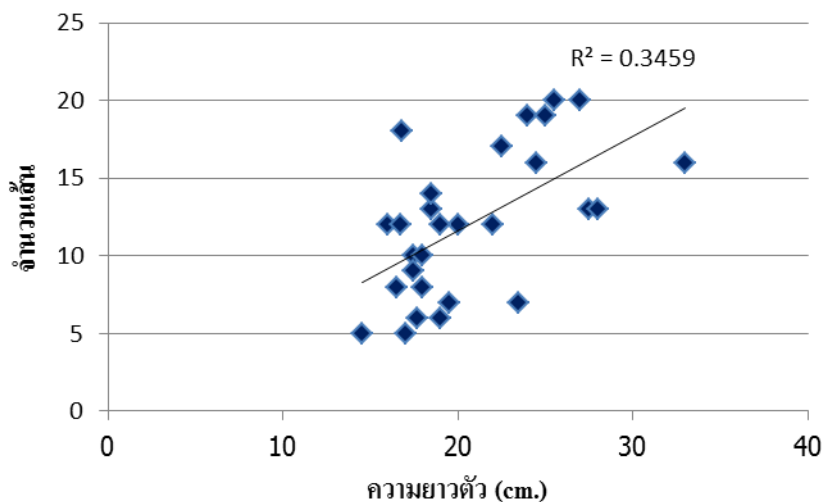
ตัวที่	เพศ	ระยะ gonad	น้ำหนักตัว (g)	ความยาวตัว (cm)	จำนวนเส้นทั้งหมด	ระยะห่างระหว่างเส้นเฉลี่ย (cm)
22	เมีย	growing	400	19	6	2.16
23	เมีย	growing	200	14.5	5	2.9
24	เมีย	growing	480	27	20	0.86
25	เมีย	mature	595	25.5	20	1.11
26	เมีย	partly spawn	434	22.5	17	1.22
27	เมีย	partly spawn	505	24.5	16	1.63
28	เมีย	partly spawn	421	25	19	0.89

เมื่อวิเคราะห์ค่าต่าง ๆ ทางสถิติได้ผลการทดลองดังนี้

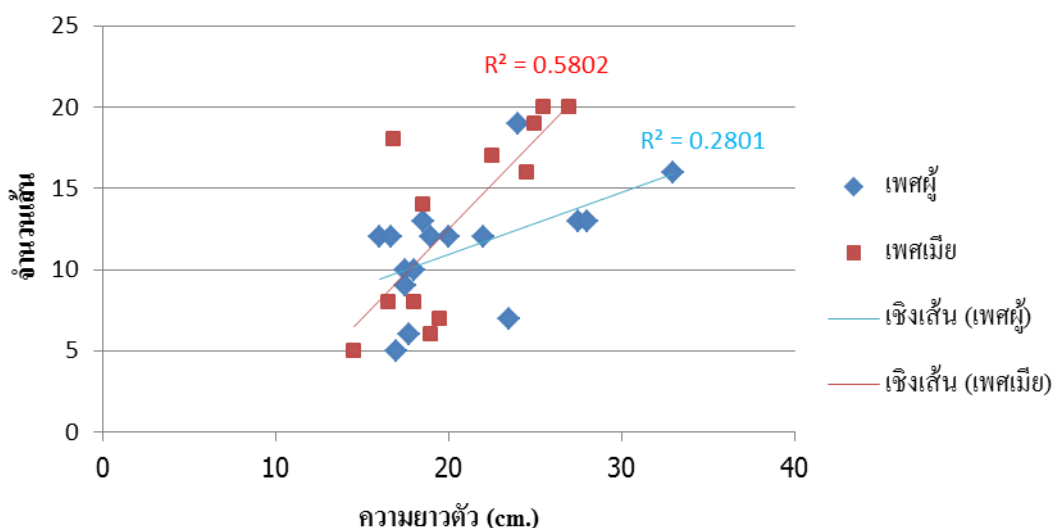
4.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของลำตัวปลิงทะเลขาวและจำนวนลายเส้นแนวขวาง

ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของลำตัวปลิงทะเลขาวและจำนวนเส้นมีค่าน้อย จากการนำค่าทั้งสองมาแสดงความสัมพันธ์ในลักษณะกราฟเชิงเส้น ได้กราฟเส้นตรงที่มีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (R^2) = 0.35 แสดงว่าความยาวของลำตัวมีผลต่อจำนวนเส้นน้อยหรือความยาวของลำตัวไม่น่าจะมีความสัมพันธ์กับจำนวนเส้น (รูปที่ 66)

เมื่อแยกเพศทำการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างความยาวของลำตัวปลิงทะเลขาวและจำนวนเส้น ภายในเพศผู้และเพศเมียก็พบว่าความสัมพันธ์มีค่าน้อยเช่นกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์การกำหนด (R^2) = 0.28 และ 0.58 ตามลำดับ แสดงว่าในแต่ละเพศความยาวของลำตัวมีผลต่อจำนวนเส้นน้อยหรือความยาวของลำตัวในแต่ละเพศก็ไม่น่าจะมีความสัมพันธ์กับจำนวนเส้นด้วยเช่นกัน (รูปที่ 67)



รูปที่ 66. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวลำตัวของปลิงทะเลขาวและจำนวนเส้นบนลำตัว



รูปที่ 67. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความยาวลำตัวของปลิงทะเลขาวและจำนวนเส้นบนลำตัว
แยกเปรียบเทียบภายในเพคซุสและเพคเมีย

4.2 ความสัมพันธ์ระหว่างเพศของปลิงทะเลขาวและลายเส้นแนวขวาง

เก็บข้อมูลจากปลิงทะเลขาวทั้งหมดจำนวน 28 ตัว โดยแบ่งช่วงของจำนวนเส้นเป็น 5 ช่วง คือ 0-4, 5-9, 10-14, 15-19 และ 20-24 เส้น พบว่าตัวที่มีจำนวนเส้นมากที่สุดมีจำนวนเส้น 20 เส้น และตัวที่มีจำนวนเส้นน้อยที่สุดมีจำนวนเส้น 5 เส้น และปลิงทะเลมีจำนวนเส้นช่วง 10-14 เส้น มาก

ที่สุดโดยพบว่าช่วงจำนวนเส้น 10-14 เส้น นี้มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียมากที่สุดด้วย คือ พบปลิงทะเลจำนวน 11 ตัว ที่มีจำนวนเส้นอยู่ในช่วง 10-14 เส้น โดยพบว่าเป็นเพศผู้ 10 ตัว คิดเป็น 91% และเป็นเพศเมีย 1 ตัว คิดเป็น 9% ในขณะที่ช่วงจำนวนเส้นอื่นคือ 5-9, 15-19 และ 20-24 เส้น พบจำนวนปลิงทะเลน้อยและมีเพศผู้ต่อเพศเมียเป็น 4:5 ตัว, 2:4 ตัว และ 0:2 ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 18)

เมื่อพิจารณาจากระยะห่างระหว่างเส้น ได้แบ่งช่วงของระยะห่างระหว่างเส้นเป็น 6 ช่วง คือ 0 - 0.4, 0.5 - 0.9, 1.0 - 1.4, 1.5 - 1.9, 2.0 - 2.4 และ 2.5 - 2.9 เซนติเมตร พบว่าระยะห่างระหว่างเส้น มีค่ามากที่สุดคือ 2.83 เซนติเมตร และน้อยที่สุดคือ 0.86 เซนติเมตร และปลิงทะเลมีช่วงระยะห่างระหว่างเส้น 1.0 - 1.4 เซนติเมตร มากที่สุด โดยพบว่าระยะห่างในช่วง 1.0 - 1.4 เซนติเมตร นี้มีความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียมากที่สุดด้วย คือ พบปลิงทะเลจำนวน 14 ตัว ที่มีระยะห่างในช่วง 1.0 - 1.4 เซนติเมตร โดยพบว่าเป็นเพศผู้ 10 ตัว คิดเป็น 71% และเป็นเพศเมีย 4 ตัว คิดเป็น 29% ในขณะที่ช่วงระยะห่างอื่นคือ 0.5 - 0.9, 1.5 - 1.9, 2.0 - 2.4 และ 2.5 - 2.9 เซนติเมตร พบจำนวนปลิงทะเลน้อยและมีจำนวนเพศผู้ต่อเพศเมียเป็น 2:2 ตัว, 1:2 ตัว, 1:2 ตัว และ 2:2 ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 19)

ตารางที่ 18. จำนวนเส้นแนวขวางบนผิวหนังตัวปลิงทะเลขาว

จำนวนเส้น (เส้น)	จำนวนปลิงทะเล ขาว ที่พบ (ตัว)	เพศผู้		% ระหว่าง เพศ	เพศเมีย		% ระหว่าง เพศ
		จำนวน(ตัว)	% ของ จำนวน ปลิง ทั้งหมด		จำนวน (ตัว)	% ของ จำนวน ปลิง ทั้งหมด	
0 - 4	0	0	0	0	0	0	0
5 - 9	9	4	25	44.44	5	41.67	55.56
10 - 14	11	10	62.5	90.91	1	8.33	9.09
15 - 19	6	2	12.5	33.33	4	39.33	66.67
20 - 24	2	0	0	0.00	2	16.67	100.00
รวม	28	16	100		12	100	

ตารางที่ 19. ระยะห่างระหว่างเส้นแนวขวางบนผิวลำตัวปลิงทะเลขาว

ระยะห่าง (cm.)	จำนวน ปลิงทะเลขาว ที่พบ (ตัว)	เพศผู้		% ระหว่าง เพศ	เพศเมีย		% ระหว่าง เพศ
		จำนวน(ตัว)	% ของ จำนวน ปลิง ทั้งหมด		จำนวน (ตัว)	% ของ จำนวน ปลิง ทั้งหมด	
0 - 0.4	0	0	0	0	0	0	0
0.5 - 0.9	4	2	12.5	50.00	2	16.67	50.00
1.0 - 1.4	14	10	62.5	71.43	4	33.33	28.57
1.5 - 1.9	3	1	6.25	33.33	2	16.67	66.67
2.0 - 2.4	3	1	6.25	33.33	2	16.67	66.67
2.5 - 2.9	4	2	12.5	50.00	2	16.67	50.00
รวม	28	16	100		12	100	

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition) ของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว

ผลจากการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว ด้วยวิธี Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าในเพศผู้ระยะแรกของพัฒนาการ ได้แก่ indeterminate stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด (2.57 ± 0.03 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมากกว่าในระยะ growing stage, mature stage, partly spawned stage และ spent stage (1.51 ± 0.15 , 1.36 ± 0.03 , 1.10 ± 0.06 และ 1.07 ± 0.02 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในระยะ mature stage มีปริมาณไขมันรวมและโปรตีนรวมมากที่สุด (2.82 ± 0.16 และ 9.62 ± 0.30 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และระยะ spent stage มีปริมาณ ไขมันรวม และโปรตีนรวมน้อยที่สุด (0.46 ± 0.06 และ 3.56 ± 0.17 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 20) สำหรับเพศเมียพบว่าองค์ประกอบทางเคมีสอดคล้องกับในเพศผู้ คือระยะแรกของพัฒนาการ ได้แก่ indeterminate stage และ growing stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมาก (2.10 ± 0.08 และ 2.10 ± 0.07 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ซึ่งมากกว่าระยะ mature stage, partly spawned stage และ spent stage (1.36 ± 0.02 , 1.15 ± 0.02 และ 0.80 ± 0.01 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ในระยะ mature stage มีปริมาณไขมันรวมและโปรตีนรวมมากที่สุด (1.88 ± 0.09 และ 5.30 ± 1.19 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และระยะ spent stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไขมันรวม

และโปรตีนรวมน้อยที่สุด (0.80 ± 0.01 , 0.55 ± 0.06 และ 0.91 ± 0.14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 22)

ผลจากการวิเคราะห์ห้อยค้ำประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาวจากน้ำหนักรวบรวมพบว่าในเพศผู้ระยะแรกของพัฒนาการได้แก่ indeterminate stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด (16.99 ± 0.17 เปอร์เซ็นต์) ซึ่งมากกว่าระยะ growing stage, mature stage, partly spawned stage และ spent stage (10.67 ± 1.04 , 8.52 ± 0.18 , 6.55 ± 0.39 และ 7.03 ± 0.15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ระยะ mature stage มีไขมันรวม โปรตีนรวม และเถ้ามากที่สุด (17.68 ± 0.98 , 60.22 ± 1.87 และ 15.51 ± 0.16 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 21) และในอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมีย ระยะแรกของพัฒนาการได้แก่ indeterminate stage และ growing stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมากที่สุด (16.99 ± 0.17 และ 21.74 ± 0.75 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) ระยะ mature stage มีไขมันรวม โปรตีนรวม และเถ้ามากที่สุด (17.33 ± 0.88 , 44.80 ± 1.76 และ 25.64 ± 0.66 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งมากกว่าระยะ mature stage, partly spawned stage และ spent stage (12.49 ± 0.21 , 11.25 ± 0.22 และ 9.29 ± 0.13 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 23) สำหรับการตรวจวัดคาร์โบไฮเดรตในกล้ามเนื้อปลิงทะเลขาวพบว่า ระยะ indeterminate stage มีปริมาณมากที่สุด และลดลงอย่างต่อเนื่องไปจนถึงระยะ spent stage ซึ่งมีปริมาณน้อยที่สุด (รูปที่ 73)

เมื่อเปรียบเทียบค่าองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมียในแต่ละระยะพัฒนาการ พบว่า คาร์โบไฮเดรตในเพศผู้มากกว่าเพศเมียในระยะ indeterminate stage อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และต่อมาในระยะ growing stage คาร์โบไฮเดรตในเพศเมียสูงกว่าเพศผู้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ต่อมาในระยะ mature stage และ partly spawned stage มีปริมาณเท่ากัน และในเพศเมียน้อยลงอีกครั้งในระยะ spent stage (รูปที่ 68) โดยที่ปริมาณคาร์โบไฮเดรตในกล้ามเนื้อของปลิงทะเลขาวไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ($P > 0.05$) ในแต่ละระยะพัฒนาการ (รูปที่ 73) ไขมันรวมในเพศผู้มากกว่าเพศเมียในระยะ growing stage, mature stage และ partly spawned stage อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 69) สำหรับโปรตีนรวมเพศผู้มากกว่าเพศเมียทุกระยะ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 64) (ตารางที่ 23) และสำหรับความชื้นมีในเพศเมียมากกว่าเพศผู้ในทุกระยะ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (รูปที่ 71) และเถ้ามีความแตกต่างระหว่างเพศผู้

และเพศเมียในทุกๆระยะ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ยกเว้นระยะ growing stage และ partly spawned stage (รูปที่ 72)

ตารางที่ 20. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra* เพศผู้ (%น้ำหนักเปียก)

ระยะ	คาร์โบไฮเดรต	ไขมันรวม	โปรตีนรวม	ความชื้น	เถ้า
Indeterminate stage	2.57±0.03 ^a	0.99±0.06 ^c	4.46±0.26 ^c	84.89±0.83 ^{ab}	1.21±0.09 ^c
Growing stage	1.51±0.15 ^b	1.97±0.18 ^b	6.84±0.27 ^b	85.89±0.28 ^a	2.04±0.07 ^b
Mature stage	1.36±0.03 ^b	2.82±0.16 ^a	9.62±0.30 ^a	84.03±1.03 ^{ab}	2.48±0.03 ^a
Partly spawned stage	1.10±0.06 ^c	2.27±0.16 ^b	7.14±0.25 ^b	83.27±0.74 ^b	1.90±0.05 ^b
Spent stage	1.07±0.02 ^c	0.46±0.06 ^d	3.56±0.17 ^d	84.77±0.16 ^{ab}	2.04±0.09 ^b

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

2. ค่าเฉลี่ยแต่ละสัณฐานที่มีอักษรต่างกันกำกับ (a, b, c, d) มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 21. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra* เพศผู้ (%น้ำหนักแห้ง)

ระยะ	คาร์โบไฮเดรต	ไขมันรวม	โปรตีนรวม	เถ้า
Indeterminate stage	16.99±0.17 ^a	6.57±0.42 ^c	29.53±1.71 ^d	8.03±0.57 ^d
Growing stage	10.67±1.04 ^b	14.00±1.25 ^b	48.45±1.92 ^b	14.48±0.48 ^{ab}
Mature stage	8.52±0.18 ^c	17.68±0.98 ^a	60.22±1.87 ^a	15.51±0.16 ^a
Partly spawned stage	6.55±0.39 ^d	13.58±0.98 ^b	42.66±1.51 ^c	11.38±0.30 ^c
Spent stage	7.03±0.15 ^d	3.03±0.42 ^d	23.37±1.14 ^c	13.40±0.58 ^b

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

2. ค่าเฉลี่ยแต่ละสัณฐานที่มีอักษรต่างกันกำกับ (a, b, c, d) มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 22. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra* เพศเมีย (% น้ำหนักเปียก)

ระยะ	คาร์โบไฮเดรต	ไขมันรวม	โปรตีนรวม	ความชื้น	เถ้า
Indeterminate stage	2.10±0.08 ^a	0.92±0.10 ^c	1.12±0.16 ^{cd}	90.52±0.07 ^b	0.43±0.06 ^d
Growing stage	2.10±0.07 ^a	1.40±0.08 ^b	2.31±0.12 ^b	90.36±0.33 ^b	1.93±0.07 ^b
Mature stage	1.36±0.02 ^b	1.88±0.09 ^a	5.30±0.19 ^a	89.13±0.13 ^d	2.79±0.07 ^a
Partly spawned stage	1.15±0.02 ^c	1.38±0.18 ^b	1.34±0.12 ^c	89.80±0.19 ^c	1.93±0.08 ^b
Spent stage	0.80±0.01 ^d	0.55±0.06 ^d	0.91±0.14 ^{dc}	91.39±0.19 ^a	1.27±0.08 ^c

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

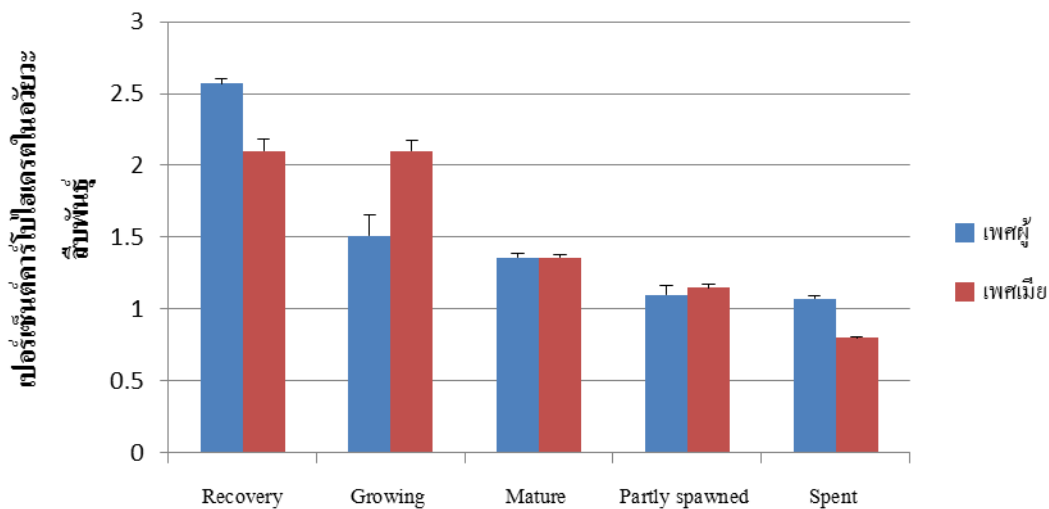
2. ค่าเฉลี่ยแต่ละสดมภ์ที่มีอักษรต่างกันกำกับ (a, b, c, d, e) มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 23. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra* เพศเมีย (% น้ำหนักแห้ง)

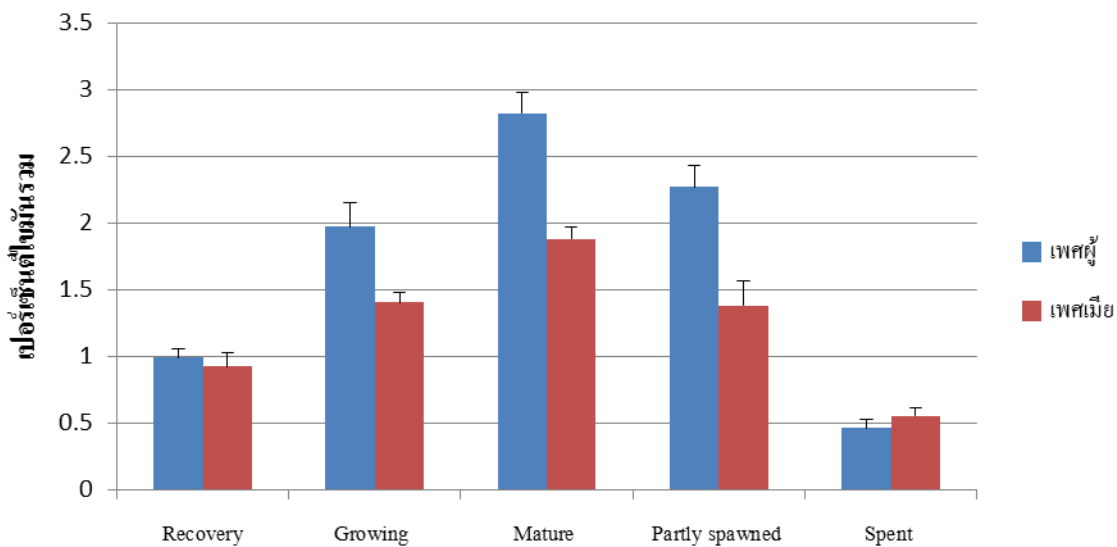
ระยะ	คาร์โบไฮเดรต	ไขมันรวม	โปรตีนรวม	เถ้า
Indeterminate stage	22.20±0.84 ^a	9.75±1.08 ^c	11.82±1.65 ^c	4.56±0.62 ^d
Growing stage	21.74±0.75 ^a	14.54±0.86 ^{ab}	23.91±1.23 ^b	20.02±0.76 ^b
Mature stage	12.49±0.21 ^b	17.33±0.80 ^a	44.80±1.76 ^a	25.64±0.66 ^a
Partly spawned stage	11.25±0.22 ^b	13.57±1.78 ^b	13.17±1.15 ^c	18.88±0.82 ^b
Spent stage	9.29±0.13 ^c	6.34±0.75 ^d	10.55±1.65 ^c	14.71±0.88 ^c

หมายเหตุ 1. ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 3 ซ้ำ

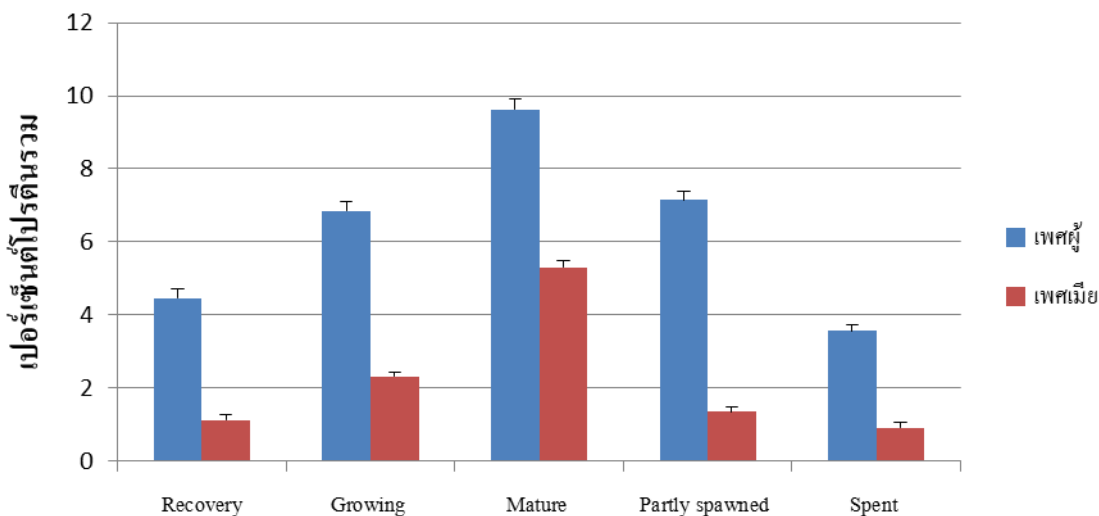
2. ค่าเฉลี่ยแต่ละสดมภ์ที่มีอักษรต่างกันกำกับ (a, b, c, d) มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซนต์



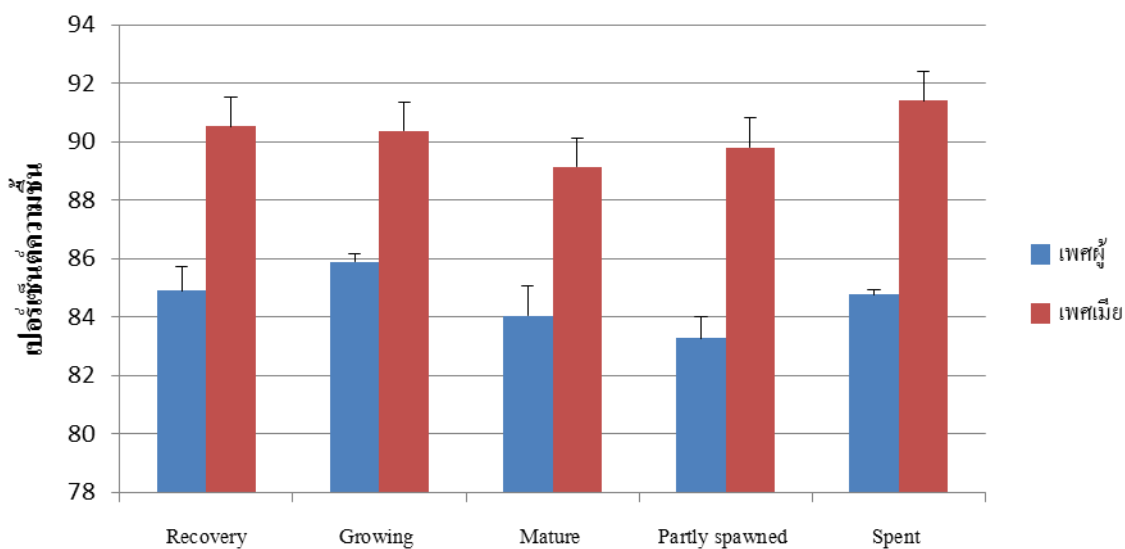
รูปที่ 68. เปอร์เซนต์คาร์โบไฮเดรตในอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra*



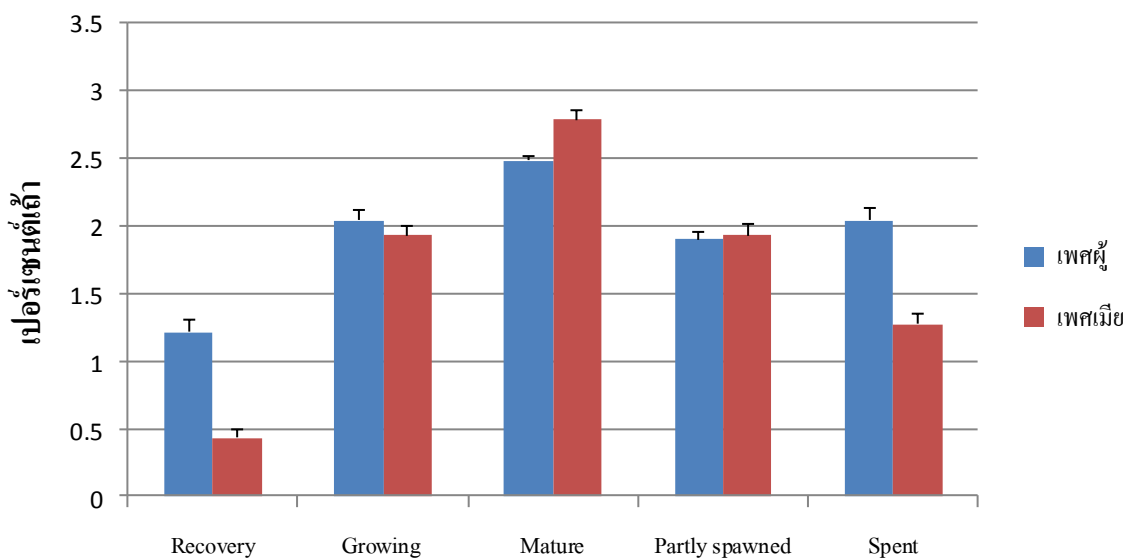
รูปที่ 69. เปอร์เซนต์ไขมันรวมในอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra*



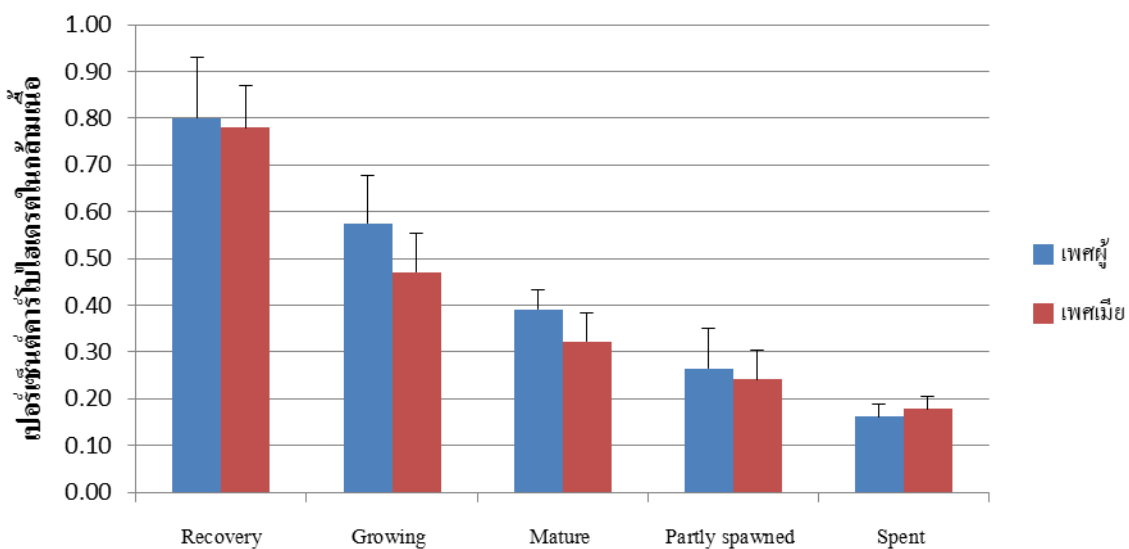
รูปที่ 70. เปอร์เซ็นต์โปรตีนรวมในอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra*



รูปที่ 71. เปอร์เซ็นต์ความชื้นในอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra*



รูปที่ 72. เปอร์เซ็นต์ไข่ในอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra*



รูปที่ 73. เปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตในกล้ามเนื้อปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra* แต่ละระยะของพัฒนาการอวัยวะสืบพันธุ์

6. กรดอะมิโนและกรดไขมันในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาว

จากผลการทดลองข้างต้นพบว่าปริมาณโปรตีนรวมและไขมันรวมของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีมากที่สุดในระยะเจริญพันธุ์ (mature stage) ดังนั้นจึงได้นำอวัยวะสืบพันธุ์ในระยะนี้ไปทำการวิเคราะห์ชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนและกรดไขมัน ได้ผลดังนี้

กรดอะมิโน (Amino acid)

พบว่าในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาวทั้งเพศผู้และเพศเมียมีกรดอะมิโน 18 ชนิด คือ Aspartic acid, Threonine, Serine, Glutamic acid, Proline, Glycine, Alanine, Cystine, Valine, Methionine, Isoleucine, Leucine, Tyrosine, Phenylalanine, Histidine, Lysine, Arginine และ Tryptophan โดยที่ Glutamic acid มีปริมาณมากที่สุดทั้งในเพศผู้ (6.79 กรัม/100 กรัม) และเพศเมีย (6.22 กรัม/100 กรัม) และปริมาณกรดอะมิโนรวมในเพศผู้มีมากกว่าในเพศเมีย (48.31 และ 34.49 กรัม/100 กรัม ตามลำดับ) (ตารางที่ 24)

กรดไขมัน (Fatty acid)

พบว่าในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาวทั้งเพศผู้และเพศเมียมีทั้งกรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัวหลายชนิด โดยที่มีจำนวน 4 ชนิด ที่พบในปริมาณมากเมื่อเทียบกับชนิดที่เหลือ คือ Cis-5, 8, 11, 14-Eicasatetraenic acid C20:4 n-6 (ARA), Cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic acid C20:5 n-3 (EPA), Stearic acid C18:0 และ Palmitic acid C16:0

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณในแต่ละเพศพบว่า ในเพศผู้มี Cis-5, 8, 11, 14-Eicasatetraenic acid C20:4 n-6 (ARA) มากที่สุด รองลงมาคือ Cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic acid C20:5 n-3 (EPA), Stearic acid C18:0 และ Palmitic acid C16:0 (1.94%, 1.62%, 1.45% และ 0.48% ตามลำดับ) และในเพศเมียพบว่า มี Palmitic acid C16:0 ในปริมาณมากที่สุด และรองลงมาคือ Cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic acid C20:5 n-3 (EPA), Stearic acid C18:0 และ Cis-5, 8, 11, 14-Eicasatetraenic acid C20:4 n-6 (ARA) (1.96%, 1.72%, 1.42% และ 1.18% ตามลำดับ)

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณกรดไขมันชนิดอิ่มตัวรวมและไม่อิ่มตัวรวมระหว่างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียพบว่า

- อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมีปริมาณกรดไขมันอิ่มตัว (saturates) รวม กรดไขมันไม่อิ่มตัวเชิงเดี่ยว (monoenes) รวม และ n-3 PUFAs มากกว่าเพศผู้ (5.22%, 2.95%; 3.39%, 1.77% และ 2.01%, 1.85% ตามลำดับ)
- อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้มีปริมาณกรดไขมัน n-6 PUFAs มากกว่าเพศเมีย (2.13%, 1.39% ตามลำดับ)
- อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียมีสัดส่วน n-3 PUFAs: n-6 PUFAs มากกว่าเพศผู้ (1.45%, 0.87% ตามลำดับ)
- โดยรวมแล้วเพศเมียมีปริมาณกรดไขมันมากกว่าเพศผู้ (15.19%, 11.04% ตามลำดับ) (ตารางที่ 25)

ตารางที่ 24. กรดอะมิโนในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra*

กรดอะมิโน (กรัม/100กรัม)	เพศผู้	เพศเมีย
Aspartic acid	4.02	3.77
Threonine	2.43	1.87
Serine	2.22	1.62
Glutamic acid	6.79	6.22
Proline	2.00	1.59
Glycine	3.83	1.50
Alanine	3.69	1.33
Cystine	0.30	0.28
Valine	2.49	1.96
Methionine	1.02	0.96
Isoleucine	2.11	1.57
Leucine	3.40	2.40
Tyrosine	1.68	1.73
Phenylalanine	1.74	1.72
Histidine	1.02	0.68
Lysine	4.63	2.95
Arginine	4.69	2.09
Tryptophan	0.26	0.26
Total	48.32	34.50

ตารางที่ 25. กรดไขมันในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra*

กรดไขมัน (กรัม/100กรัม)	โครงสร้าง	เพศผู้	เพศเมีย
Carpic acid	C10:0	0.01	0.01
Lauric acid	C12:0	0.01	0.01
Tridecanoic acid	C13:0	-	0.01
Myristic acid	C14:0	0.08	0.80
Myristoleic acid	C14:1	0.04	0.31
Pentadecanoic acid	C15:0	0.05	0.75
Cis-10-Pentadecenoic acid	C15:1	0.03	0.13
Palmitic acid	C16:0	0.48	1.96
Palmitelaidic methyl ester	C16:1t9	0.02	0.06
Palmitoleic acid	C16:1 n-7	0.16	1.06
Heptadecanoic acid	C17:0	0.22	0.30
Cis-10-Heptadecenoic acid	C17:1	0.04	0.25
Stearic acid	C18:0	1.45	1.42
	C18:1n9trans	0.01	0.03
	C18:1n11trans	0.02	0.01
Cis-9-Octadecenoic acid	C18:1 n-9	0.14	0.19
Cis-Vaccenic acid	C18:1 n-7	0.32	0.45
Cis-9,12-Octadecadienoic acid	C18:2 n-6	0.05	0.09
Trans-octadecadienoic acid	C18:2t9t12	0.03	0.01
Cis-9,12,15-Octadecatrienoic acid	C18:3 n-3	0.02	0.05
Cis-6,9,12-Octadecatrienoic acid	C18:3 n-6	0.01	0.03
Morotic acid	C18:4 n-3	0.01	0.10
Arachidic acid	C20:0	0.33	0.27
	C20:1 n-7	0.19	0.16
Cis-11-Eicosenoic acid	C20:1 n-9	0.12	0.14
	C20:1 n-11	0.46	0.38
Cis-11, 14-Eicosadienoic acid	C20:2 n-6	0.11	0.07

ตารางที่ 25. กรดไขมันในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra*
(ต่อ)

กรดไขมัน (กรัม/100กรัม)	โครงสร้าง	เพศผู้	เพศเมีย
Cis-8, 11, 14-Eicosatrienoic acid	C20:3 n-6	0.02	0.02
Cis-11, 14, 17-Eicosatrienoic acid	C20:3 n-3	0.02	0.02
Cis-5, 8, 11, 14-Eicasatetraenic acid	C20:4 n-6 (ARA)	1.94	1.18
Eicosatetraenoic acid	C20:4 n-3	0.01	0.02
Cis-5, 8, 11, 14, 17-Eicosapentaenoic acid	C20:5 n-3 (EPA)	1.62	1.72
Heneicosanoic acid	C21:0	0.11	0.10
Behenic acid	C22:0	0.11	0.21
Cis-13-Docosenoic acid	C22:1 n-9	0.04	0.04
Cis-13, 16-Docosadienoic	C22:2	0.01	0.01
Cis-4,7,10,13,16,19-Docosahexaenoic acid	C22:6 n-3 (DHA)	0.17	0.10
Tricosanoic acid	C23:0	0.04	0.05
Lignoceric acid	C24:0	0.06	0.05
	C24:1	0.18	0.18
Unidentified peak		2.3	2.44
Saturates		2.95	5.94
Monoenes		1.77	3.39
n-3PUFA		1.85	2.01
n-6PUFA		2.13	1.39
n-3/n-6 ratio		0.87	1.45
Total fatty acid		11.04	15.19

บทที่ 4

บทวิจารณ์

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาอวัยวะสืบพันธุ์และถุงวางไข่ของปลิงทะเลขาว *H. scabra* แถบภาคใต้ของประเทศไทยฝั่งอันดามัน โดยได้เก็บรวบรวมข้อมูลเป็นระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่ เดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 การศึกษาประกอบด้วย ลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาและ ultrastructure ของอวัยวะสืบพันธุ์ ถุงวางไข่ รอบของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในถุงวางไข่ การแยกเพศด้วยลักษณะลายเส้นบนลำตัว การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ และกรดอะมิโนและกรดไขมันในอวัยวะสืบพันธุ์

อวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว *H. scabra* แถบฝั่งอันดามัน มีลักษณะภายนอกคล้ายกับปลิงทะเลขาวแถบหมู่เกาะโซโลมอน (Ramofafia *et al.*, 2003) คือในระยะพัฒนาการที่สูงขึ้นมีการแตกแขนงออกเป็นพุ่ม โดยที่ ขนาด สี รูปร่าง และ จำนวนแขนง ขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนา ซึ่งแบ่งออกเป็น 5 ระยะ คือ indeterminate stage หรือ recovery stage, growing stage, mature stage, partly spawned stage และ spent stage ซึ่งในระยะเจริญพันธุ์ (mature stage) รังไข่จะมีสีส้มแดง ก่อนข้างใส สามารถเห็นเซลล์ไข่ได้จากภายนอก อันทวมีสีขาวครีม มีลักษณะโป่งพองเป็นระยะซึ่งเป็นที่รวบรวมเซลล์สุจิอยู่ภายใน การวางไข่ในแต่ละครั้งอาจวางได้ไม่หมดยังคงเหลือเซลล์ไข่อยู่ภายในรังไข่ ซึ่งจะมีการเสื่อมสลายไป และสร้างไข่ในระยะแรกขึ้นใหม่ในรอบการวางไข่ต่อไป ผลการศึกษาลักษณะภายนอกในการแยกระยะของอวัยวะสืบพันธุ์ที่สามารถสังเกตเห็นได้ด้วยตาเปล่าสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการแยกระยะพัฒนาการได้โดยไม่ต้องผ่านขั้นตอนทางเนื้อเยื่อวิทยา

เซลล์สุจิภายในอันทวมีรูปแบบพัฒนาการคล้ายสัตว์ชั้นสูง เช่น สัตว์มีกระดูกสันหลัง (Wheater *et al.*, 1987) กล่าวคือ เซลล์แบ่งเป็น 5 ระยะ คือ spermatogonia, primary spermatocyte, secondary spermatocyte, spermatid และ spermatozoa โดยที่เซลล์ตั้งต้น spermatogonia จะอยู่บริเวณขอบของท่ออวัยวะสืบพันธุ์ และเซลล์ที่แบ่งตัวจนกลายเป็น spermatozoa จะเคลื่อนที่เข้าสู่กลางท่อและถูกขับออกภายนอกในขณะผสมพันธุ์ เมื่อศึกษาลักษณะ ultrastructure พบว่าลักษณะโดยรวมคล้าย Holothuroids ทั่วไป เช่น *H. leucospilota* (Thongkukiatkul *et al.*, 2008; Chia *et al.*, 1975; Colwin *et al.*, 1975; Summers *et al.*, 1975) คือ spermatozoa ประกอบด้วย 1) ส่วนหัวที่มีลักษณะกลม ซึ่งมีนิวเคลียสอยู่ภายใน ด้านหน้าเว้าเป็นแอ่งสำหรับ acrosome ซึ่งเป็นส่วนหน้าสุด มี subacrosome รองรับ โดย acrosomal region เป็นโครงสร้างที่มีบทบาทต่อการเกิด acrosome reaction เพื่อนำเซลล์สุจิเข้าสู่เซลล์ไข่ในขณะที่เกิดการปฏิสนธิ 2) ส่วนคอ มี mitochondria ขนาด

ใหญ่เป็นองค์ประกอบ เพื่อให้พลังงานในการเคลื่อนไหวของส่วนหาง และ 3) ส่วนหาง มีลักษณะเป็น flagellum มี microtubule ที่มีต้นกำเนิดมาจาก centriole เป็นแกนอยู่ภายใน อสุจิของ *H. scabra* สามารถเคลื่อนไหวได้ มีการสืบพันธุ์ภายนอกร่างกาย

เนื้อเยื่อผนังรังไข่ในปลิงทะเลขาว *H. scabra* ในการทดลองนี้คล้ายกับในปลิงทะเล *Stichopus californicus* (Smiley and Cloney, 1985) คือประกอบด้วย 3 ชั้น ได้แก่ 1) peritoneal epithelium ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเยื่อช่องท้อง เป็นชั้นนอกสุด 2) connective tissue เป็นชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เป็นชั้นกลาง ความหนาของชั้นนี้จะลดลงเมื่อรังไข่เข้าสู่ระยะพัฒนาการที่สูงขึ้น ภายในชั้นนี้มีลักษณะของ hemal sinus ซึ่งเป็นแอ่งเลือด ใน *S. californicus* พบว่าเป็นแหล่งอาหารของเซลล์ไข่ภายในรังไข่ (Smiley and Cloney, 1985) และ 3) germinal epithelium เป็นที่อยู่ของเซลล์ไข่อ่อนที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ที่แก่ขึ้น

เซลล์ไข่มีระยะพัฒนาการคล้าย Holothuroids ทั่วไป เช่น ใน *Stichopus californicus* (Smiley, 1988; Smiley and Cloney, 1985) และ *H. scabra* ในแถบหมู่เกาะโซโลมอน (Ramofafia et al., 2003) คือแบ่งเป็นระยะ previtellogenic, early vitellogenic, mid vitellogenic และ late vitellogenic การแบ่งระยะได้ใช้ขนาดของเซลล์ ตำแหน่ง และองค์ประกอบภายในเป็นเกณฑ์ ระยะ late vitellogenic เป็นระยะที่เซลล์มีพัฒนาการสูงสุดพร้อมที่จะถูกขับออกนอกรังไข่เพื่อผสมกับอสุจิ เซลล์ไข่ในระยะนี้มีขนาดใหญ่ขึ้นมาก ภายในเต็มไปด้วย yolk granules บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์มี microvilli ที่มีความสูงเพิ่มขึ้นจากระยะ early vitellogenic ในกุ้งญี่ปุ่น *Peneaus japonicus* มีรายงานว่า microvilli ที่ผิวเซลล์ไข่มีบทบาทในการลำเลียงโปรตีนไวเทลลินจากตับและตับอ่อน (hepatopancreas) เข้าสู่เซลล์ไข่ โดยพบว่าบริเวณ microvilli ที่เจริญดีพบการเว้าเข้าไปของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นถุง ซึ่งโปรตีนไวเทลลินที่ถูกส่งมาจากช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ของ follicular cell จะเข้าสู่เซลล์ไข่ระยะ yolk granule โดยผ่านทาง microvilli ด้วยวิธี pinocytosis ที่ไม่อาศัยตัวรับ (Yano et al., 1996) ในผลการทดลองนี้ก็มีความเป็นไปได้ว่า microvilli ที่ผิวของเซลล์ไข่ซึ่งพบตั้งแต่ระยะ early vitellogenic อาจเป็นช่องทางส่งผ่านสารอาหารเข้าสู่เซลล์ไข่เพื่อเข้าสู่ระยะพัฒนาการที่สูงขึ้นได้เช่นกัน นอกจากนี้ในการทดลองนี้พบโครงสร้างลักษณะคล้ายท่อ (follicular stick) ยื่นมาจาก follicular cell เข้าสู่ช่องว่าง (jelly space) ที่อยู่รอบเซลล์ไข่ อาจเป็นไปได้ว่าโครงสร้างนี้ช่วยลำเลียงสารอาหารที่ผ่านมาจากช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ของ follicular cell เข้าสู่ jelly space ซึ่งสัมผัสโดยตรงอยู่กับ microvilli ทั้งนี้อาจต้องมีการศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมในครั้งต่อไป

การวางไข่ของปลิงทะเลขาวขนาดน้ำหนักมากกว่า 300 กรัม ในการทดลองนี้ที่รวบรวมจากบริเวณเกาะปู อ. เหนือคลอง จ. กระบี่ สามารถวางไข่ได้ประสบผลสำเร็จในช่วงเดือนตุลาคม ถึงเดือนมกราคม จากการชักนำให้เกิดการวางไข่ของปลิงทะเลขาวทั้งหมด 10 ตัว พบว่าสามารถ

วางไข่ได้ 3 ตัว และชักนำให้เกิดการวางไข่โดยใช้หลายวิธีรวมกัน เริ่มจากวิธีทำให้แห้ง ใช้ความดันน้ำ ใช้วิธีการกระตุ้นด้วยความเย็น กระตุ้นด้วยความร้อน และกระตุ้นโดยใช้อาหาร ซึ่งสอดคล้องกับ Agudo (2006) ที่ชักนำการวางไข่ของปลิงทะเลขาวโดยการกระตุ้นหลายๆ วิธีรวมกัน แต่อย่างไรก็ดีการวางไข่ของปลิงทะเลขาวในประเทศที่ใกล้เส้นศูนย์สูตรมักจะวางไข่ได้ตลอดปี พฤติกรรมของปลิงทะเลขาวที่บ่งชี้ว่าใกล้จะวางไข่ในการทดลองนี้ คือ เคลื่อนที่เร็ว เคลื่อนที่แบบกลิ้ง มีจังหวะการหดตัว ปีนไต่ขึ้นตรงผนังถึงวางไข่ รูทวาร (anus) เปิดกว้าง ลำตัวยืดยาว และส่วนหน้าสุดของร่างกายจะยกขึ้น โยกไปมา เพศผู้จะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ก่อนเพศเมีย โดยปล่อยอสุจิหลังจากลงถึงวางไข่ 5-20 นาที ซึ่งชูตัวตั้งชันและส่ายไปมาจากข้างหนึ่งไปอีกข้างหนึ่ง และปล่อยสายอสุจิอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือมากกว่านั้น สายอสุจิมีสีขาวครีม ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Agudo (2006) และเมื่อเพศผู้ปล่อยอสุจิเสร็จจะส่งผลให้น้ำขุ่น หลังจากนั้นเพศเมียจะเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วไปยังบริเวณที่มีอสุจิเข้มข้น และชูตัวตั้งชันก่อนปล่อยไข่ การปล่อยไข่จะมีสีส้มอ่อน โดยพุ่งออกมาอย่างแรงในช่วงเวลาสั้นๆ ไม่กี่วินาที จากการโป่งพองของ gonophores ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Giraspy and Walsalam (2010)

การศึกษารอบของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ พบว่าทั้งเพศผู้และเพศเมียสามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ในช่วงเย็นอย่างน้อยทุก ๆ 2 สัปดาห์ ทำให้ทราบได้ว่าการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ระยะแรกจนถึงระยะที่มีความสามารถในการปฏิสนธิใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์ แต่อย่างไรก็ดีการไม่สามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้จากการกระตุ้นในช่วงน้อยกว่า 2 สัปดาห์ อาจเกิดจากปลิงทะเลขาวมีความเครียด จากการรบกวนบ่อยเกินไป ซึ่งสังเกตจากการเกิดบาดแผลสีขาวที่ผิวหนัง ทั้งนี้ Pitt และ Duy (2004) รายงานว่าความเครียดก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้พ่อแม่พันธุ์ไม่สามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้เช่นกัน และการกระตุ้นให้วางไข่ในช่วงเช้าก็สามารถกระตุ้นให้เกิดความเครียดได้

ในการทดลองนี้ใช้ร้อยละของการมีพ่อแม่พันธุ์ในระยะ mature stage และค่า G.S.I. บ่งชี้ถึงฤดูกาลวางไข่ของปลิงทะเลขาว โดยพบว่าระยะเจริญพันธุ์ในเพศผู้เริ่มต้นประมาณเดือนกรกฎาคม ถึงเดือนพฤศจิกายน และมีระยะเจริญพันธุ์สูงสุดในเดือนพฤศจิกายน และเริ่มลดลงในเดือนธันวาคมถึงเดือนเมษายน หลังจากนั้นในเดือนพฤษภาคมและเดือนมิถุนายนไม่พบระยะเจริญพันธุ์เลย สำหรับเพศเมียพบว่าระยะเจริญพันธุ์เริ่มขึ้นในเดือนกันยายนถึงเดือนมกราคม และมีระยะเจริญพันธุ์สูงสุดในเดือนมกราคม เริ่มลดในเดือนกุมภาพันธ์ หลังจากนั้นในเดือนมีนาคมถึงเดือนสิงหาคมไม่พบระยะเจริญพันธุ์เลย ซึ่งปลิงทะเลขาวทั้งสองเพศมีค่า G.S.I. เฉลี่ยสูงในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม และมากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน ซึ่งสอดคล้องกับ Morgan (2000) ที่พบว่าค่า G.S.I. สูงที่สุดในเดือนพฤศจิกายน โดยที่เพศเมียมีค่าสูงกว่าเพศผู้ (Muthiga *et al.*, 2009) ในการทดลองนี้บ่งชี้ได้ว่าปลิงทะเลขาวจากบริเวณเกาะปุมิฤดูวางไข่เพียง 1 ครั้งในรอบปี ใดๆ

ตามช่วงเวลาในการสืบพันธุ์และวางไข่ของปลิงทะเลขาวในรอบปีมีความแตกต่างในแต่ละที่ ซึ่งพบทั้งไม่เป็นฤดูกาล และเป็นฤดูกาล 2 รูปแบบ คือ 2 ครั้งในรอบปี และ 1 ครั้งในรอบปี ซึ่งในแต่ละที่จะมีช่วงเดือนที่แตกต่างกันในรอบปี (ตารางที่ 26) และสามารถเปลี่ยนช่วงเวลาการสืบพันธุ์และวางไข่ได้หากได้รับผลกระทบจากปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม (Mackey, 2001; Ramofafia *et al.*, 2003)

จากการศึกษาเกี่ยวกับฤดูวางไข่ของปลิงทะเลขาว *H. scabra* ในแถบภูมิภาคต่าง ๆ พบว่ามีความแตกต่างกันดังนี้

ตารางที่ 26. การสืบพันธุ์และฤดูวางไข่ของ *Holothuria scabra*

ละติจูด	สถานที่	จำนวนปีที่ ทำการศึกษา	G.S.I. max	รูปแบบการสืบพันธุ์	ช่วงวางไข่	อ้างอิง
27°N	Red sea	-	-	-	มิถุนายน	Mortensen, 1937
13°N	Calatagan ฟิลิปปินส์	2	ไม่มีช่วงที่ชัดเจน	มีระยะเจริญพันธุ์ ต่อเนื่องตลอดปี	มากในเดือนมิถุนายนและตุลาคม (biannual)	Ong Che and Gomez, 1985
09°N	Krusadi Island อินเดีย	1	กรกฎาคมและตุลาคม	2 ครั้งในรอบปี	กรกฎาคม-สิงหาคม (เป็นหลัก) ตุลาคม-พฤศจิกายน	Krishnaswamy and Krishnan, 1967
04°N	Saugi Island, Sulawesi อินโดนีเซีย	1	เมษายนและพฤศจิกายน	มีระยะเจริญพันธุ์ ต่อเนื่องตลอดปี	มีนาคม-มิถุนายน และ พฤศจิกายน- ธันวาคม	Tuwo, 1999
04°S	Vanga, Kenya	3	พฤศจิกายนและธันวาคม	2 ครั้งในรอบปี	พฤศจิกายน-ธันวาคม (เป็นหลัก) และ พฤษภาคม-กันยายน	Muthiga <i>et al.</i> , 2009
06°S	Dar-es-salaam, Tanzania	1	ธันวาคม	2 ครั้งในรอบปี	กรกฎาคม-สิงหาคม และ ธันวาคม- มกราคม	Kithakeni and Ndaro, 2002
08°S	Phu Island, ไทย	1	พฤศจิกายน	1 ครั้งในรอบปี	ตุลาคม-ธันวาคม	การศึกษารุ่นนี้
09°S	Solomon Islands	3	สิงหาคมและตุลาคม (เทศเมีย), สิงหาคม (เทศผู้)	มีระยะเจริญพันธุ์ ต่อเนื่องตลอดปี	มากในเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม	Ramofafia <i>et al.</i> , 2003
23°S	Toliara, Madagascar	2.5	-	1 ครั้งในรอบปี	พฤศจิกายน-เมษายน	Rasolofonirina <i>et al.</i> , 2005
27°S	Stradbroke Island, Australia	1.5	พฤศจิกายน	1 ครั้งในรอบปี	พฤศจิกายน-ธันวาคม	Morgan, 2000

ที่มา: ดัดแปลงจาก Ramofafia และคณะ (2003) และ Muthiga และคณะ (2009)

เกี่ยวกับการศึกษาปลิงทะเลขาในในปัจจุบันซึ่งรวมไปถึงการเพาะเลี้ยงปลิงทะเลขาในที่แตกต่างกันทั่วโลก ยังมีความยากลำบากในการจัดการเรื่องพ่อแม่พันธุ์ ปัจจัยหนึ่งมาจากการไม่สามารถทราบเพศของปลิงทะเลขาได้จากลักษณะภายนอก ทำให้ต้องฆ่าปลิงมากเกินความจำเป็นเพื่อให้ได้เพศที่ต้องการสำหรับการศึกษาวิจัย หรือต้องใช้ปลิงในปริมาณมากเกินความจำเป็นเพื่อกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ที่ควรจะมาจกทั้งเพศผู้และเพศเมียในอัตราส่วนที่ใกล้เคียงกัน โดยยังไม่มียางานเกี่ยวกับการใช้ลักษณะภายนอกในการแยกเพศปลิงทะเลขา หรือปลิงทะเลชนิดอื่นๆ จากการทดลองนี้ได้หาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเส้นบนลำตัวและเพศ โดยพบว่าจำนวนเส้นบนลำตัวมีความสัมพันธ์กับความยาวของลำตัวน้อยมาก แต่พบว่ามีแนวโน้มที่จะมีความสัมพันธ์กับเพศคือ ที่จำนวนเส้น 10-14 เส้น มีแนวโน้มที่จะเป็นเพศผู้ประมาณ 91% ของจำนวนปลิงทั้งหมด แต่อย่างไรก็ดีที่จำนวนเส้นอื่นๆ คือน้อยกว่า 10 เส้น หรือมากกว่า 14 เส้น ยังไม่ทราบความแตกต่างระหว่างเพศที่ชัดเจนเนื่องจากจำนวนข้อมูลยังน้อยเกินไป อาจต้องศึกษาเพิ่มเติมในจำนวนปลิงทะเลที่มากขึ้น ทั้งนี้อาจมีความเป็นไปได้ว่าจำนวนเส้นบนลำตัวอาจเป็นลักษณะหนึ่งของ sexual dimorphism ที่สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการแยกเพศปลิงทะเลขาอย่างง่ายได้

เกี่ยวกับองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขา *H. scabra* พบว่าเพศเมียมีความชื้นมากกว่าเพศผู้ทุกระยะพัฒนาการเนื่องจากในอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมียมีน้ำเป็นองค์ประกอบมากกว่าอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้ และพบว่าระยะ mature stage มีปริมาณไขมันรวม โปรตีนรวม มากที่สุด และระยะ spent stage มีปริมาณไขมันรวม โปรตีนรวม น้อยที่สุด ซึ่งกล่าวได้ว่าการสะสมสารอาหารเอาไว้ใช้ในการสืบพันธุ์ โดยเพศผู้จะต้องมีการเคลื่อนไหวของหางเพื่อการว่ายน้ำของสเปิร์มเมื่อมีการผสมพันธุ์ ดังนั้นจึงต้องได้รับพลังงานจากไมโทคอนเดรียจากบริเวณส่วนคอของสเปิร์ม ซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่เป็นแหล่งผลิตพลังงานให้แก่เซลล์ เพื่อนำไปใช้ในกระบวนการชีวภาพต่างๆ และการผลิตพลังงานสะสมหรือนำไปใช้นี้เป็นกระบวนการที่ประกอบไปด้วยขั้นตอนของการใช้เอนไซม์มาเพื่อสลายคาร์โบไฮเดรต ไขมัน หรือโปรตีนเพื่อให้ได้มาซึ่งสารประกอบตัวใหม่ที่มีชื่อว่า adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งมีพลังงานสะสมอยู่นอกจากนั้นบริเวณหางของสเปิร์มประกอบไปด้วย microtubule ที่เป็นท่อกลาง มีผนังเป็นโปรตีนชนิด tubulin (เวคิน นพินิตย์, 2532) จึงทำให้ในระยะ mature stage ของเพศผู้มีปริมาณสารอาหารสูงกว่าระยะอื่นๆ เพื่อพร้อมที่จะผสมพันธุ์ สำหรับในเพศเมียจะมีการสะสมของ yolk granule ในไซโทพลาสซึมมากขึ้นเรื่อยๆ และมากที่สุดในระยะ mature stage ซึ่งเป็น granule ที่อุดมไปด้วยไขมันและโปรตีน เพื่อเป็นแหล่งของสารอาหารในระหว่างการพัฒนาของตัวอ่อน จึงทำให้ระยะ mature มีสารอาหารสูงที่สุด แต่ระยะ spent stage มีสารอาหารน้อยที่สุด เพราะได้ใช้พลังงานและสารอาหารที่สะสมไว้เพื่อการสืบพันธุ์ และพบว่าทั้งเพศผู้และเพศเมียของปลิงทะเลขา *H. scabra*

มีโปรตีนสูงกว่าไขมัน ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าโปรตีนเป็นสารอาหารที่ปลิงทะเลขาว *H. scabra* ต้องการมากเป็นอันดับหนึ่ง และรองลงมาคือไขมัน ซึ่งแตกต่างกับเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลชนิด *Cucumaria frondosa* ที่เพศผู้และเพศเมีย มีไขมันมากที่สุด ตามมาด้วยโปรตีนและไกลโคเจน (David and MacDonald, 2002) แต่สอดคล้องกับในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเม่นชนิด *Strongylocentrotus droebachiensis* ที่มีโปรตีนมากกว่าไขมัน (Liyana-Pathirana *et al.*, 2002) และอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาวเพศเมียมีความชื้นมากกว่าเพศผู้ซึ่งสอดคล้องกับในหอยเม่นชนิด *Evechinus chloroticus* ในรายงานของ Verachia และคณะ (2012) สำหรับคาร์โบไฮเดรตในอวัยวะสืบพันธุ์ มีการพบว่าการสะสมคาร์โบไฮเดรตในรูปของโมเลกุลไกลโคเจน เป็นสิ่งจำเป็นในอวัยวะสืบพันธุ์ เช่น ในดาวทะเลชนิด *Allostichaster capensis* พบว่าการสลายคาร์โบไฮเดรตในรูปไกลโคเจนเพื่อให้ได้กลูโคสอิสระ (กระบวนการ glycolysis) จะให้เป็นพลังงานสำหรับการปล่อย spermatozoa ออกจากอันทะ (Rubilar *et al.*, 2008) ในการทดลองนี้พบว่าในกล้ามเนื้อและอวัยวะสืบพันธุ์ในระยะแรกของการเจริญพันธุ์ (indeterminate stage) มีการสะสมของคาร์โบไฮเดรตในปริมาณสูง และเมื่อเข้าสู่พัฒนาการในระยะต่อไปของอวัยวะสืบพันธุ์ พบว่าปริมาณคาร์โบไฮเดรตในกล้ามเนื้อลดลงเรื่อยๆ และมีโปรตีนและไขมันเพิ่มขึ้นในอวัยวะสืบพันธุ์ กล่าวได้ว่ามีการสำรองคาร์โบไฮเดรตในกล้ามเนื้อและอวัยวะสืบพันธุ์ในระยะต้นเพื่อใช้เป็น precursors ในการสังเคราะห์ไขมันและโปรตีนซึ่งจำเป็นต่อพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับในหอยแครงชนิด *Argopecten irradians concentricus* ที่ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ ที่บ่งชี้ว่าคาร์โบไฮเดรตในกล้ามเนื้อจะเปลี่ยนแปลงไปเป็นไขมันเก็บไว้เพื่อการพัฒนาของเซลล์ไข่ (Barber and Blake, 1985)

กรดอะมิโนในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาวในการทดลองนี้ทั้งสองเพศ มี Glutamic acid มากที่สุด ซึ่งสอดคล้องกับในอวัยวะสืบพันธุ์ของปู *Cancer pagurus* เพศเมีย (Barrento *et al.*, 2010) แต่แตกต่างกับในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเม่นชนิด *E. chloroticus* ที่ทั้งสองเพศมีปริมาณ Glycine มากที่สุด (Verachia *et al.*, 2012) คล้ายกับหอยเม่นชนิด *S. droebachiensis* ที่มี Glycine มากที่สุดในทุกฤดูกาล และรองลงมาคือ Glutamic acid และ Aspartic acid (Liyana-Pathirana *et al.*, 2002)

กรดไขมันในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาวในการทดลองนี้ในเพศผู้มี C20:4 n-6 (ARA) มากที่สุด รองลงมาคือ C20:5 n-3 (EPA), C18:0 และ C16:0 และอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ในเพศเมียของปลิงทะเลขาวมี C16:0 มากที่สุด รองลงมาคือ C20:5 n-3 (EPA), C18:0 และ C20:4 n-6 (ARA) ซึ่งสอดคล้องกับในหอยเม่นชนิดต่างๆ ในรายงานของ Chen และคณะ (2010) ที่มี C14:0, C16:0, C16:1 n-7, C18:1 n-7, C20:5 n-3, C16:4 n-4, C20:4 n-6 เป็นกรด

ไขมันหลัก สำหรับในปลาจะละเม็ดขาวชนิด *Pampus argenteus* พบปริมาณไขมันในรังไข่มากกว่า อังทะ และจะพบมากในรังไข่ที่มี yolk เต็ม oocytes (Shi *et al.*, 2006) โดยปลาจะละเม็ดขาว *P. argenteus* มีกรดไขมันชนิด 18:1 n-9 มากที่สุดในรังไข่ และ DHA มากที่สุดในอังทะ (Huang *et al.*, 2010) และสอดคล้องกันกับรายงานของ Barrento และคณะ (2010) ที่พบว่าในกล้ามเนื้อและ อวัยวะสืบพันธุ์ของปูชนิด *C. pagurus* มี PUFA มาก และในหอยชนิด *Patella* spp. มีปริมาณ EPA, ARA, C18:1 n-7 และ C16:0 มาก (Brazao *et al.*, 2003) กรดไขมันที่จำเป็นเหล่านี้ (ARA, EPA และ DHA) มีความจำเป็นต่อการสร้างฮอร์โมนเพศ และสร้างเซลล์ใหม่ของร่างกาย เนื่องจาก ไขมันเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์และเป็นต้นกำเนิดของฮอร์โมน กรดไขมันเหล่านี้เป็นกรด ไขมันที่สัตว์น้ำไม่สามารถสังเคราะห์เองได้ และต้องได้รับจากอาหารเท่านั้น ผลจากการทดลองนี้ สามารถใช้เป็นข้อมูลในการสร้างสูตรอาหารสำหรับพ่อแม่พันธุ์ปลิงทะเลขาวได้ในอนาคต

โดยสรุปแล้วองค์ประกอบทางเคมีที่พบในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว *H. scabra* ใน ระยะเจริญพันธุ์ในการทดลองนี้จะสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานได้ว่าในสภาพธรรมชาติปลิงทะเลขาว มีความต้องการสารอาหารชนิดใดเพื่อให้มีความเหมาะสมในการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ที่จะนำมาซึ่ง การสืบพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพ และสามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลในการผลิตอาหารสำหรับพ่อแม่พันธุ์ ปลิงทะเลขาวได้ในอนาคตได้

บทที่ 5

สรุป

ปลิงทะเลเลขา *H. scabra* สามารถชักนำให้เกิดการวางไข่โดยใช้หลายวิธีรวมกัน เริ่มจากวิธีทำให้แห้ง ถัดมาใช้วิธีความกดดันน้ำ ต่อมาใช้วิธีการกระตุ้นด้วยความเย็น จากนั้นกระตุ้นด้วยความร้อน และการกระตุ้นโดยใช้อาหาร ปลิง *H. scabra* แอบอันตามันมีฤดูวางไข่เพียง 1 ครั้งในรอบปี คือในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม โดยสามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ในช่วงเย็นทุก ๆ 2 สัปดาห์ อวัยวะสืบพันธุ์มีลักษณะเป็นท่อยาวมีแขนง ขนาด สี รูปร่าง และจำนวนแขนง ขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งระยะการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ มี 5 ระยะด้วยกัน คือ indeterminate stage หรือ recovery stage, growing stage, mature stage, partly spawned stage และ spent stage พัฒนาการของเซลล์อสุจิมี่ 5 ระยะ คือ spermatogonia, primary spermatocyte, secondary spermatocyte, spermatid และ spermatozoa โดยอสุจิในระยะแรกอยู่ที่ขอบของท่ออวัยวะสืบพันธุ์และเมื่อเข้าสู่ระยะพัฒนาการจะเคลื่อนที่เข้ามาบริเวณกลางท่อ พัฒนาการของเซลล์ไข่มี 5 ระยะ คือ oogonia, previtellogenic oocyte, early vitellogenic oocyte, mid vitellogenic oocyte และ late vitellogenic oocyte องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย พบว่าในระยะแรกของการพัฒนาการได้แก่ indeterminate stage และ growing stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมาก ในระยะ mature stage มีปริมาณไขมันรวม โปรตีนรวม และเถ้ามากที่สุด และระยะ spent stage มีคาร์โบไฮเดรต ไขมันรวม โปรตีนรวม และเถ้าที่น้อยที่สุด กรดอะมิโนในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาทั้งสองเพศ มี Glutamic acid มากที่สุด และกรดไขมันในอวัยวะสืบพันธุ์ระยะเจริญพันธุ์ของปลิงทะเลขาในเพศผู้มี C20:4 n-6 (ARA) มากที่สุด รองลงมาคือ C20:5 n-3 (EPA), C18:0 และ C16:0 และในเพศเมียมี C16:0 มากที่สุด รองลงมาคือ C20:5 n-3 (EPA), C18:0 และ C20:4 n-6 (ARA)

เอกสารอ้างอิง

- กรมปศุสัตว์. 2553. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี. เข้าถึงได้จาก http://www.dld.go.th/ncna_nak/index/moisture.html (15 กรกฎาคม 2553).
- จรัสศรี อ่างตันญา, วัชรภรณ์ ไตรพณิชย์กุล, วัลลภา เกื้อด้วง, ศิรินทิพย์ สังข์จีน, ทศนี จันทร์คนตรี และไพฑริศน์ สิงห์คำ. 2551. ตัวอย่างปลิงทะเลในพิพิธภัณฑ์สัตว์และพืชทะเล สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน. เอกสารเผยแพร่ กลุ่มพิพิธภัณฑ์และสถานแสดงพันธุ์สัตว์และพืชทะเล ลำดับที่ 6. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลชายฝั่ง ทะเลและป่าชายเลน กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง.
- จริยา ก้นกำเนิด, เศรษฐพงษ์ เมฆสัมพันธ์ และ สุเมตต์ ปุจฉาการ. 2548. ความหลากหลายของชนิดปลิงทะเลและการแพร่กระจายบริเวณหาดทราย หาดหิน และแหล่งหญ้าทะเล บริเวณเกาะลันตาใหญ่ จังหวัดกระบี่. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธนัญญา ทรรพนันท์. 2543. ชีววิทยาประชากร II : อายุของสัตว์น้ำกับการเติบโต ใน ธนัญญา ทรรพนันท์. 2543. ชีววิทยาประมง. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เวลิน นพินิตย์. 2532. เซลล์และออร์แกเนลล์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : อาร์ ไอ เอ เซ็นเตอร์ และ เอเชียไดแอคโนสติกส์.
- สุทธวัฒน์ เบญจกุล. 2548. เคมีและคุณภาพสัตว์น้ำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : โอเดียนสโตร์.
- สุเมตต์ ปุจฉาการ, ธนัญญา ทรรพนันท์, สุรพล ชุมพันธ์จิต และกรกฎ หงษ์ทอง. 2541. การศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับความหลากหลายทางชีวภาพของเอคโคไนด์ริ่ม บริเวณสถานีวิจัยทรัพยากรชายฝั่ง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จังหวัดระนอง. รายงานการประชุมวิชาการ ครั้งที่ 36 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เสาวนีย์ สิงห์ไกรวรรณ. 2539. ชีววิทยาบางประการของปลาทรายแดง *Nemipterus peronii* และ *N. hexodon* บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก. เอกสารวิชาการฉบับที่ 63/2539 ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก กองประมงทะเล กรมประมง.
- อรอุมา ฐานิวัฒน์นันท์. 2544. การสำรวจชนิดและการแพร่กระจายของปลิงทะเลรอบเกาะภูเก็ต และวางแผนการจัดการทรัพยากรปลิงทะเล. รายงานการปฏิบัติงานสหกิจศึกษา. นครศรีธรรมราช : สำนักเทคโนโลยีอุตสาหกรรมและทรัพยากร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

- อารมณั มุจรินทร์. 2553. "ปลิง" สัตว์สารพัดประโยชน์. เข้าถึงได้จาก <http://www.thaigoodview.com/node/62792> (17 กรกฎาคม 2553).
- Abdel-Razek, F. A., Abdel-Rahman, S. H., El-Shimy, N. A. and Omar, H. A. 2005. Reproductive biology of the tropical sea cucumber *Holothuria atra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the red sea coast of Egypt. *Aquatic Research*, 31: 383-402.
- Agudo, N. 2006. Sandfish Hatchery Techniques. New Caledonia: South Pacific Commission Headquarters.
- Akamine, J. 2004. The status of the sea cucumber fisheries and trends in Japan. *In Advances in sea cucumber aquaculture and management.* (eds. Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J. F. and Mercier, A.) pp. 39-47. FAO Fisheries Technical Paper. No. 463. Rome: FAO.
- AOAC. 1990. Official Methods of Analysis (15th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.
- Barber, B. J. and Blake, N. J. 1985. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus*, as determined by O/N and RQ physiological indexes. *Marine Biology*, 87: 13-18.
- Barrento, S., Marques, A., Teixeira, B., Mendes, R., Bandarra, N., Vaz-Pires, P. and Nunes, M. L. 2010. Chemical composition, cholesterol, fatty acid and amino acid in two populations of brown crab *Cancer pagurus*: Ecological and human health implications. *Journal of Food Composition and Analysis*, 23: 716-725.
- Brazao, S., Morais, S., Boaventura, D., Re, P., Narciso, L. and Hawkins, S. J. 2003. Spatial and temporal variation of the fatty acid composition of *Patella* spp. (Gastropoda: Prosobranchia) soft bodies and gonads. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 136: 425-411.
- Bussarawit, S. and N. Thongtham, 1999. Sea cucumber fisheries and trade in Thailand. South Pacific Commission Beche-de-mer Information Bulletin, 12: 4.
- Cerda, J., Carrillo, M., Zanuy, S., Ramos, J. and Higuera, M. D. L. 1994. Influence of nutritional composition of diet on sea bass, *Dicentrarchus labrax* L., reproductive performance and egg and larval quality. *Aquaculture*, 128: 3-4.

- Chen, J. 2003. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China. South Pacific Commission Beche-de-mer Information Bulletin, 18: 18-23.
- Chen, J. 2004. Present status and prospects of sea cucumber industry in China. *In* Advances in sea cucumber aquaculture and management. (eds. Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J. F. and Mercier, A.) pp. 25–38. FAO Fisheries Technical Paper. No. 463. Rome: FAO.
- Chen, G., Xing, W-Z., Lau, C-C., Peng, J., Qiu, J-W., Chen, F. and Jiang, Y. 2010. A comparative analysis of lipid and carotenoid composition of the gonads of *Anthocidaris crassispina*, *Diadema setosum* and *Salmacis sphaeroides*. Food chemistry, 120: 973-977.
- Chia, F. S., Atwood, D., and Crawford, B. 1975. Comparative morphology of echinoderm sperm and possible phylogenetic implication. American Zoologist, 15: 533-565.
- Choo, P. S. 2008. Population status, fisheries and trade of sea cucumbers in Asia. *In* Sea cucumbers. A global review of fisheries and trade. (eds. Toral-Granda, V., Lovatelli, A. and Vasconcellos, M.) pp. 81-118. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper. No. 516. Rome: FAO.
- Colwin, L. H., Colwin, A. L. and Summers, R. G. 1975. The acrosomal reaction and the beginning of fertilization in the holothurian, *Thyone briareus*. In: The Functional Anatomy of the Spermatozoon. A. F. Afzelius, ed. Pergamon Press, Oxford, pp. 27-38.
- David, V. M. M. and MacDonald, B. A. 2002. Seasonal biochemical composition of tissues from *Cucumaria frondosa* collected in the Bay of Fundy, Canada: feeding activity and reproduction. Journal of the Marine Biological Association of the UK, 82: 141-147.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric Method for Determination of Sugar and Related Substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.
- FAO. 2010. Life cycle of sea cucumber. Available from <http://www.fao.org/docrep/005/y2257e/y2257e05.html> (10 June 2010).
- Giraspy, D. A. B. and Walsalam, I. G. 2010. Aquaculture potential of the tropical sea cucumbers *Holothuria scabra* and *H. lessoni* in the Indo-Pacific region. South Pacific Commission Beche-de-mer Information Bulletin, 30: 29-32.

- Hamel, J-F., Pawson, D. L., Conand, C. and Mercier, A. 2002. The sea cucumber *Holothuria scabra* (Holothuroidea: Echinodermata): Its biology and its exploitation as Beche-de-mer. *Advances in Marine Biology*, 41: 131-233.
- Huang, X., Yin, Y., Shi, Z., Li, W., Zhou, H. and Lv, W. 2010. Lipid content and fatty acid composition in wild-caught silver pomfret (*Pampus argenteus*) broodstocks: Effects on gonad development. *Aquaculture*, 310: 192-199.
- Humason, G. L. 1979. *Animal Tissue Techniques*. (4th ed.). San Francisco: W. H. Freeman and Company.
- Khruthram, T. 2006. ปลิงคามีค่า คนนำมาทำยา ชาวเกาะทะเลลูอนุรักษ์ก่อนสูญพันธุ์. เข้าถึงได้จาก http://www.agooga.com/content_detail.php?cno=330 (26 สิงหาคม 2553).
- Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F., Whittick, A. and Hooper., R. 2002. Effect of season and artificial diet on amino acids and nucleic acids in gonads of green sea urchin *Strongylocentrotus droebachiensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 133: 389-398.
- Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J.-F. and Mercier, A. 2004. Advances in sea cucumber aquaculture and management. *FAO Fisheries Technical Paper*. No. 463. Rome: FAO.
- Mackey, A. 2001. Factors That Influence the Reproduction of Sea Cucumbers. *Biology 515* at San Diego State. pp. 1-8.
- Martinez, G., Aguilera, C. and Mettifogo, L. 2000. Interactive effects of diet and temperature on reproductive conditioning of *Argopecten purpuratus* broodstock. *Aquaculture*, 183: 149-159.
- Morgan, A.D. 2000. Aspects of sea cucumber broodstock management (Echinodermata: Holothuroidea). *South Pacific Commission Beche-de-mer Information Bulletin*, 13: 2-8.
- Mourao, P. A. S. 2007. A carbohydrate-based mechanism of species recognition in sea urchin fertilization. *Medical and Biological Research*, 40: 5-17.
- Mucharin, A. and Putchakarn, S. 2005. New Thai Record : *Holothuria* (*Stauropora*) *discrepans* Semper, 1868. *The Thailand Natural History Museum Journal*, 1: 1-8.

- Muthiga N. A., Kawaka, J. A. and Ndirangu, S. 2009. The timing and reproductive output of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* on the Kenyan coast. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 84: 353–360.
- Olave, S., Bustos, E., Lawrence, J. M. and Carcamo, P. 2001. The effect of size and diet on gonad production by the Chilean sea urchin *Loxechinus albus*. *Journal of the World Aquaculture Society*, 32: 210-214.
- Otero-Villanueva, M. and Ut, V.T. 2007. Sea cucumber fisheries around Phu Quoc Archipelago: a cross–border issue between South Viet Nam and Cambodia. *South Pacific Commission Beche–de–mer Information Bulletin*, 25: 32-36.
- Pitt, R. and Duy, N. D. Q. 2004. Breeding and rearing of the sea cucumber *Holothuria scabra* in Viet Nam. *In Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management*. (eds. Lovatelli, A., Conand, C., Purcell, S., Uthicke, S., Hamel, J. F. and Mercier, A.) pp. 333–346. FAO Fisheries Technical Paper. No. 463. Rome, FAO.
- Ramofafia, C., Byrne, M. and Battaglione, C. S. 2003. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. *Marine Biology*, 142: 281-288.
- Rubilar, T., Diaz de Vivar, M. E. and Pastor de Ward, C. T. 2008. Biochemical composition of body compartments during the reproductive cycle of the starfish *Allostichaster capensis* in Patagonia, Argentina. *International Journal of Tropical Biology and Conservation Revista de Biología Tropical*, 56: 351-360.
- Ruiz-Verdugo, C. A., Racotta, I. S. and Ibarra, A. M. 2001. Comparative biochemical composition in gonad and adductor muscle of triploid and diploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 259: 155-170.
- Thongkukiatkul, A., Jungudomjaroen, S. and Ratanapahira, C. 2008. Spermatogenesis and chromatin condensation in male germ cells of sea cucumber *Holothuria leucospilota* (Clark, 1920). *Tissue and Cell*, 40: 167–175.

- Tong, Y., Zhang, X., Tian, F., Yi, Y., Xu, Q., Li, L., Tong, L., Lin, L. and Ding, J. 2005. Philinopsidea, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects. *International Journal of Cancer*, 114: 843-853.
- Shi, Z., Gao, L., Xie, Y., Luo, H., Wang, H. and Chen, B. 2006. Comparison of reproductive characteristics between *Pampus argenteus* and *Pampus cinereus* in Zhoushan fishing ground. *Journal of Fisheries of China*, 30: 647-653.
- Smiley, S. 1988. The Dynamics of Oogenesis and the Annual Ovarian Cycle of *Stichopus californicus* (Echinodermata: Holothuroidea). *Biology Bulletin*, 175: 79-93.
- Smiley, S. and Cloney, R. A. 1985. Ovulation and the fine structure of the *Stichopus californicus* (Echinodermata: Holothuroidea) fecund ovarian tubules. *Biology Bulletin*, 169: 342-364.
- Summers, R. G., Kylander, B. L., Colwin, L. H. and Colwin, A. L. 1975. The functional anatomy of the echinoderm spermatozoon and its interaction with the egg at fertilization. *American Zoologist*, 15: 523-551.
- Van Dyck, S., Gerbaux, P. and Flammang, P. 2010. Qualitative and quantitative saponin contents in five sea cucumbers from the Indian ocean. *Marine Drugs*, 8: 173-189.
- Verachia, W., Niven, B., Then, S., Brennan, N., Silcock, P. and Bremer, P. J. 2012. Determination of the similarity between gonads recovered from single sea urchins (*Evechinus chloroticus*) compared to the similarity of gonads recovered from different urchins. *LWT-Food Science and Technology*, 49: 102-107.
- Wheater, P. R., Burkitt, H. G. and Daniels, V. G. 1987. *Functional histology: A text and colour atlas*. Longman Group (FE) Ltd, Hong Kong.
- Yano, I., Krol, R. M., Overstreet, R. M. and Hawkins, W. E. 1996. Route of egg yolk protein uptake in the oocytes of kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. *Marine Biology*, 125: 773-781.
- Zhong, Y., Khan, M. A. and Shahidi, F. 2007. Compositional characteristics and antioxidant properties of fresh and processed sea cucumber (*Cucumaria frondosa*). *Agricultural and Food Chemistry*, 55: 1188-1192.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ปลิงทะเลที่สามารถรับประทานได้ 52 ชนิด

ตารางที่ 1. ปลิงทะเลที่สามารถรับประทานได้ 52 ชนิด

	China	Taiwan PC	China HK SAR	Japan	Malaysia	Thailand	Indonesia	Philippines ¹	Viet Nam	Singapore	Spratly
O: Aspidochirotida											
F: Holothuriidae											
<i>Actinopyga lecanora</i>	x	x			x	x	x	x		x	x
<i>Actinopyga mauritiana</i>	x	x		x	x	x	x	x			x
<i>Actinopyga echinites</i>	x	x			x	x	x	x			
<i>Actinopyga miliaris</i>	x				x	x	x	x			
<i>Bohadschia argus</i>	x	x		x	x	x	x	x	x		x
<i>Bohadschia graeffei</i>					x	x	x	x			x
<i>Bohadschia marmorata</i>	x	x			x	x	x	x	x		
<i>Bohadschia similis</i>							x				
<i>Bohadschia vitiensis</i>						x	x		x		
<i>Bohadschia tenuissima</i>							x				
<i>Bohadschia bivittata</i>				x					x		
<i>Holothuria atra</i>	x	x		x	x	x	x	x	x		
<i>Holothuria coluber</i>					x	x	x	x			
<i>Holothuria rigida</i>						x	x	x			
<i>Holothuria pulla</i>								x			
<i>Holothuria edulis</i>	x			x	x	x	x	x	x		
<i>Holothuria pardalis</i>	x	x	x		x	x	x				
<i>Holothuria cinerascens</i>	x	x				x					
<i>Holothuria moebii</i>	x	x	x		x	x					
<i>Holothuria whitmaei</i>	x	x			x	x	x	x	x		
<i>Holothuria fuscogilva</i>	x				x		x	x	x		
<i>Holothuria difficilis</i>		x				x					
<i>Holothuria arenicola</i>	x	x				x	x				
<i>Holothuria hilla</i>		x			x	x	x	x			
<i>Holothuria impatiens</i>	x	x			x	x	x				
<i>Holothuria leucospilota</i>	x	x	x		x	x	x	x	x		x
<i>Holothuria pervicax</i>	x	x			x		x				
<i>Holothuria conusalba</i>						x					
<i>Holothuria scabra</i>	x		x	x	x	x	x	x	x	x	
<i>Holothuria scabra versicolor</i>					x		x	x			
<i>Holothuria similis</i>							x				
<i>Holothuria fuscopunctata</i>					x	x	x	x	x		
<i>Holothuria ocellata</i>					x	x	x				
<i>Holothuria fuscocinerea</i>	x	x	x		x	x		x			
<i>Holothuria vagabunda</i>							x				
<i>Holothuria vitiensis</i>							x				
<i>Pearsonothuria graeffei</i>		x			x		x				
O: Aspidochirotida											
F: Stichopodidae											
<i>Stichopus chloronotus</i>	x			x	x	x	x	x	x		x
<i>Stichopus sp.</i>					x						
<i>Stichopus horrens</i>	x	x			x		x	x	x		
<i>Stichopus herrmanni</i>	x	x			x	x	x	x	x		
<i>Stichopus vastus</i>					x		x				
<i>Stichopus quadrifaciatus</i>							x				
<i>Parastichopus nigripunctatus</i>				x							
<i>Thelenota ananas</i>	x	x		x	x	x	x	x	x		x
<i>Thelenota anax</i>	x				x		x	x			x
<i>Apostichopus japonicus</i>	x			x							
O: Dendrochirotida											
F: Cucumariidae											
<i>Mensamaria sp.</i>	x										
<i>Cucumaria frandosa japonica</i>				x		x					
<i>Pentacta quadragulis</i>						x			x		
O: Moldavia											
F: Caudinidae											
<i>Acaudina leucoprocta</i>	x										
O: Molpadida											
F: Molpadidae											
<i>Paracaudina sp.</i>					x						
No. of commercial species	27	0	0	11	19	8	35	26	11	0	0

ที่มา: Choo (2008)

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

1. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์โปรตีนรวม (crude protein)

1. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น (H_2SO_4) 93-98%
2. สารเร่งรวม (catalyst mixture) เตรียมโดยชั่งคอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4$) 7 กรัมกับโปแทสเซียมซัลเฟต (K_2SO_4) 100 กรัม ผสมให้เข้ากัน
3. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ($NaOH$) 45% เตรียมโดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 450 กรัมในน้ำกลั่น ปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร
4. สารละลายกรดเกลือ (HCl) 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยสารละลายกรดเกลือ 9 มิลลิลิตรในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนครบ 1 ลิตร

การตรวจหาความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือมาตรฐาน (HCl)

ดูดสารละลายโซเดียมคาร์บอเนต 40 มิลลิลิตร ลงในขวดชมพูขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมเมทิลออเรนจ์ อินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ทำการไตเตรทด้วยสารละลายกรดเกลือ 0.1 นอร์มอล (จากสารละลายสีเหลืองเปลี่ยนเป็นสีส้ม แดง หรือจนสีไม่เปลี่ยน) คำนวณความเข้มข้นของสารละลายกรดเกลือ โดยใช้สูตร

$$\text{นอร์มอลลิตีของกรดเกลือ} = \frac{\text{น้ำหนัก (กรัม) ของโซเดียมคาร์บอเนต} \times 1000}{\text{สารละลายกรดเกลือ (มิลลิลิตร)} \times 52.994}$$

**หมายเหตุควรทำ 3 ซ้ำ เพื่อให้ได้ค่าที่แน่นอน

5. สารละลายกรดบอริก (boric acid, H_3BO_3) 4% เตรียมโดยสารละลายกรดบอริก 4 กรัมในน้ำกลั่น ต้มจนกระทั่งละลายหมดปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
6. อินดิเคเตอร์รวม (mixed indicator) เตรียมโดยละลายเมทิลเรด 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ 95% ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร และละลายเมทิลินบลู (methylene blue) 0.2 กรัมในแอลกอฮอล์ 95% ปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายเมทิลเรด 2 ส่วน ผสมกับสารละลายเมทิลินบลู 1 ส่วน เขย่าให้เข้ากัน
7. สารละลายโซเดียมคาร์บอเนต (sodium carbonate, Na_2CO_3) 0.1 นอร์มอล เตรียมโดยอบโซเดียมคาร์บอเนตที่อุณหภูมิ 260-270 °C เป็นเวลา 30 นาที ชั่งสารดังกล่าวมา 1.325 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตร

8. เมทิลออเรนจอินดิเคเตอร์ (methyl orange indicator) เตรียมโดยสารละลายเมทิลออเรนจ 0.1 กรัมในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรจนครบ 100 มิลลิลิตร

2. สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต

1. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) 35 ppt เตรียมโดยละลายโซเดียมคลอไรด์ 7 กรัมในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร
2. ไตรคลอโรอะซิติกแอซิด (Trichloroacetic acid; TCA; CCl_3COOH) 10% เตรียมโดยไตรคลอโรอะซิติกแอซิด 10 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร
3. สารละลายฟีนอล ($\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$) 5% เตรียมโดยละลายฟีนอล 5 กรัมในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. สารเคมีสำหรับศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา

1. Davidson's fixative (Bell & Lightner, 1988) 1000 mL

95% ethyl alcohol	330	mL
100% formalin (formaldehyde 37–39%)	220	mL
glacial acetic acid	115	mL
tap water	335	mL
เก็บที่อุณหภูมิห้อง		
2. สีย้อม haematoxylin เตรียมโดยใช้

haematoxylin crystal	4	g
sodium iodate	0.8	g
potassium aluminium sulfate	100	g
citric acid	4	g
chloral hydrate	200	g
น้ำกลั่น	2,000	mL

ละลาย potassium aluminium sulfate ลงในน้ำกลั่น haematoxylin crystal ผสมจนละลายหมดจึงเติม sodium iodate ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมกรด citric acid และ chloral hydrate ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อม eosin เตรียมโดยใช้

eosin Y.Cl 45380	1	g
70% ethanol	1,000	mL
conc. Acetic acid	5	mL

ผสมเข้าด้วยกัน

4. กลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) 4% เตรียมจาก Stockcommercial Glutaraldehyde 70% 5 มิลลิลิตร ผสมกับ 0.2 M Phosphate buffer 87.5 มิลลิลิตร เขย่าผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ประมาณ 7.2-7.3 เก็บในตู้เย็น

5. Phosphate buffer solution (PB)

การเตรียม stock solution

1. Solution A Sodium phosphate monobasic ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	27.6	g
หรือ $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	31.2	g
น้ำกลั่น	1,000	ml
2. Solution B Sodium phosphate dibasic (Na_2HPO_4)	28.4	g
หรือ $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	35.61	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

การเตรียม 0.2 M Phosphate buffer

1. Stock Solution A	23	46	69	92	ml
2. Stock Solution B	77	154	231	308	ml
Total	100	200	300	400	ml

3. นำสารละลายข้อ 1 และ 2 มาผสมกัน

4. ปรับ pH ให้ได้ 7.2-7.3 โดยใช้ 1N NaOH หรือ 1N HCl

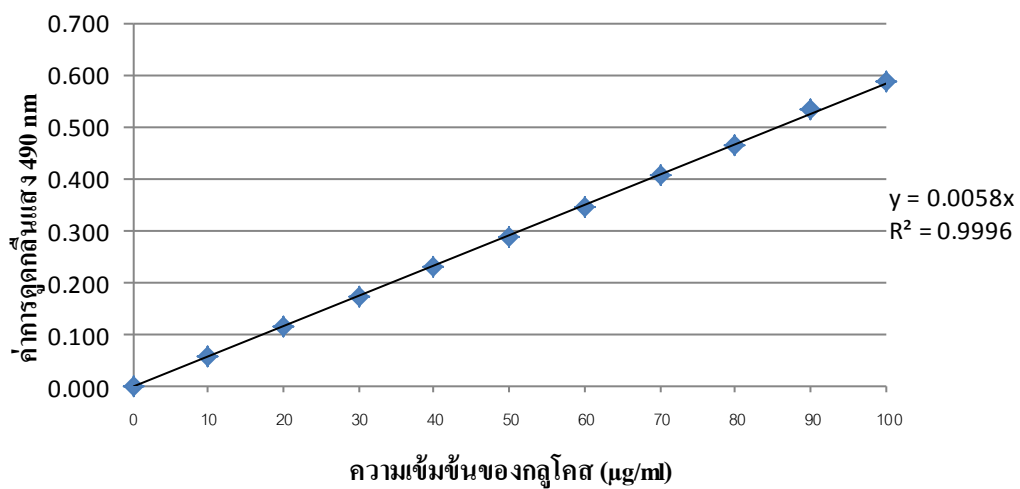
ภาคผนวก ค

การเตรียมกราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของสารละลายกลูโคส

1. เตรียม glucose stock solution ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ โดยละลายน้ำตาลบริสุทธิ์ glucose 1 กรัม ในน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร (100,000 $\mu\text{g/ml}$) จากนั้น dilute 1000 เท่า (10^{-3})
2. ทำให้น้ำตาลเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นต่างๆ ที่ 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งทำ 3 ซ้ำ
3. นำสารละลายในข้อ 2 ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล โดยใช้วิธีการ Phenol-sulfuric method และวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร
4. นำค่าที่ได้ไป Plot graph ระหว่าง OD (Optical Density) ที่วัดได้กับปริมาณน้ำตาลกลูโคส เพื่อใช้เป็นค่าเทียบมาตรฐานหาปริมาณน้ำตาลใน sample ต่อไป (รูปที่ 1)

ตารางที่ 1. การเตรียมสารละลายมาตรฐานกลูโคส และค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายกลูโคส ความเข้มข้นต่างๆ ที่ความยาวคลื่น 490 nm

ความเข้มข้นที่ ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาณที่นำมาจาก stock (100 $\mu\text{g/ml}$) μl	ปริมาณน้ำกลั่นที่เติม μl	OD ₄₉₀ เฉลี่ย
0	0	1000	0.000
10	100	900	0.059
20	200	800	0.116
30	300	700	0.173
40	400	600	0.229
50	500	500	0.286
60	600	400	0.344
70	700	300	0.408
80	800	200	0.465
90	900	100	0.532
100	1000	0	0.587



รูปที่ 1. กราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส

ภาคผนวก ง

การเตรียม stock ปลิงทะเลเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulfuric method

1. เตรียมอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเล stock solution ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$ โดยชั่งอวัยวะสืบพันธุ์ในแต่ละระยะพัฒนาการ 0.03 กรัมใน NaCl 35 ppt 30 มิลลิลิตร
2. เตรียมกล้ามเนื้อผนังลำตัวปลิงทะเล stock solution ความเข้มข้น 1000 $\mu\text{g/ml}$ โดยชั่งกล้ามเนื้อผนังลำตัวในแต่ละระยะพัฒนาการ 0.03 กรัมใน 10% trichloroacetic acid 30 มิลลิลิตร
3. ทำให้ stock solution จากข้อ 1 เจือจางด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ 100, 300, 500 และ 1,000 $\mu\text{g/ml}$ ดังแสดงในตารางที่ 1 ซึ่งทำ 3 ซ้ำ
4. นำ stock solution ในข้อ 2 และ 3 ไปวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล โดยใช้วิธีการ Phenol-sulfuric method และวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร (ตารางที่ 2, 3 และ 4)
5. นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายกลูโคส โดยการเปลี่ยนค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ให้เป็นปริมาณเนื้อสาร (ตารางที่ 3 และ 4)

ค่าความชัน (slope) ของกราฟมาตรฐานซึ่งเป็นกราฟเส้นตรง มีสมการดังนี้

$$\text{จากสมการเส้นตรง } y = mx$$

เมื่อ

$$m = \text{slope ของกราฟมาตรฐาน}$$

$$y = \text{ค่าการดูดกลืนแสง}$$

$$x = \text{ปริมาณสาร } (\mu\text{g/ml})$$

ดังนั้น

$$\text{Slope} = \frac{y_2 - y_1}{x_2 - x_1}$$

ในที่นี้สมการที่ใช้คำนวณหาปริมาณกลูโคสคือ

$$x = \frac{y}{0.0058}$$

ตารางที่ 1. การเตรียมอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเล stock solution ในแต่ละระยะพัฒนาการ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นที่ ($\mu\text{g/ml}$)	ปริมาณที่นำมาจาก stock (1000 $\mu\text{g/ml}$) μl	ปริมาณน้ำกลั่นที่เติม μl
0	0	1000
100	100	900
300	300	700
500	500	500
1000	1000	0

ตารางที่ 2. OD_{490} ของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเล stock solution ในแต่ละระยะพัฒนาการ

Stage	ความเข้มข้นที่ ($\mu\text{g/ml}$)							
	100 $\mu\text{g/ml}$		300 $\mu\text{g/ml}$		500 $\mu\text{g/ml}$		1000 $\mu\text{g/ml}$	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
indeterminate	0.099	0.149	0.297	0.485	0.504	0.585	0.995	1.322
	0.097	0.171	0.285	0.384	0.486	0.594	0.975	1.232
	0.103	0.154	0.315	0.373	0.453	0.704	0.987	1.309
เฉลี่ย	0.100	0.158	0.299	0.414	0.481	0.628	0.986	1.288
growing	0.068	0.140	0.104	0.455	0.333	0.661	0.639	1.239
	0.059	0.159	0.133	0.390	0.267	0.609	0.667	1.232
	0.070	0.188	0.105	0.375	0.237	0.590	0.551	1.311
เฉลี่ย	0.066	0.162	0.114	0.407	0.279	0.620	0.619	1.261
mature	0.069	0.069	0.124	0.192	0.209	0.323	0.484	0.720
	0.093	0.065	0.171	0.227	0.266	0.493	0.505	0.738
	0.087	0.067	0.188	0.191	0.243	0.317	0.493	0.715
เฉลี่ย	0.083	0.067	0.161	0.203	0.239	0.378	0.494	0.724

ตารางที่ 2. OD₄₉₀ ของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเล stock solution ในแต่ละระยะพัฒนาการ (ต่อ)

Stage	ความเข้มข้นที่ (µg/ml)							
	100 µg/ml		300 µg/ml		500 µg/ml		1000 µg/ml	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
partly spawning	0.037	0.051	0.075	0.164	0.134	0.257	0.355	0.640
	0.020	0.061	0.080	0.154	0.174	0.266	0.385	0.665
	0.044	0.058	0.094	0.161	0.153	0.294	0.399	0.653
เฉลี่ย	0.034	0.057	0.083	0.160	0.154	0.272	0.380	0.653
spent	0.067	0.043	0.096	0.106	0.188	0.232	0.418	0.530
	0.099	0.033	0.123	0.119	0.192	0.231	0.405	0.544
	0.053	0.038	0.101	0.132	0.180	0.243	0.401	0.543
เฉลี่ย	0.073	0.038	0.107	0.119	0.187	0.235	0.408	0.539

ตารางที่ 3. OD₄₉₀ ของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเล stock solution ในแต่ละระยะพัฒนาการและปริมาณน้ำตาล (µg/ml)

Stage	OD ₄₉₀ ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml		ปริมาณน้ำตาล (µg/ml)	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
indeterminate	0.995	1.322	171.552 (17.16%)	227.931 (22.79%)
	0.975	1.232	168.103 (16.81%)	212.414 (21.24%)
	0.987	1.309	170.172 (17.02%)	225.690 (22.57%)
เฉลี่ย	0.986	1.288	169.943 (16.99%)	222.011 (22.20%)
growing	0.639	1.239	110.172 (11.02%)	213.621 (21.36%)
	0.667	1.232	115.000 (11.50%)	212.414 (21.24%)
	0.551	1.311	95.000 (9.50%)	226.034 (22.60%)
เฉลี่ย	0.619	1.261	106.724 (10.67%)	217.356 (21.74%)

ตารางที่ 3. OD₄₉₀ ของไวรัสสปีบพันธุ์ปลิงทะเล stock solution ในแต่ละระยะพัฒนาการและปริมาณน้ำตาล (µg/ml) (ต่อ)

Stage	OD ₄₉₀ ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml		ปริมาณน้ำตาล (µg/ml)	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
mature	0.484	0.720	83.448 (8.34%)	124.138 (12.41%)
	0.505	0.738	87.069 (8.71%)	127.241 (12.72%)
	0.493	0.715	85.000 (8.50%)	123.276 (12.33%)
เฉลี่ย	0.494	0.724	85.172 (8.52%)	124.885 (12.49%)
partly spawning	0.355	0.640	61.207 (6.12%)	110.345 (11.03%)
	0.385	0.665	66.379 (6.64%)	114.655 (11.47%)
	0.399	0.653	68.793 (6.88%)	112.586 (11.26%)
เฉลี่ย	0.380	0.653	65.460 (6.55%)	112.529 (11.25%)
spent	0.418	0.530	72.069 (7.21%)	91.379 (9.14%)
	0.405	0.544	69.828 (6.98%)	93.793 (9.38%)
	0.401	0.543	69.138 (6.91%)	93.621 (9.36%)
เฉลี่ย	0.408	0.539	70.345 (7.03%)	92.931 (9.29%)

ตารางที่ 4. OD₄₉₀ ของกล้ามเนื้อผนังลำตัวปลิงทะเล stock solution ในแต่ละระยะพัฒนาการและปริมาณน้ำตาล (µg/ml)

Stage	OD ₄₉₀ ที่ความเข้มข้น 1000 µg/ml		ปริมาณน้ำตาล (µg/ml)	
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย
indeterminate	0.044	0.040	7.586 (0.76%)	6.897 (0.69%)
	0.055	0.045	9.483 (0.95%)	7.759 (0.76%)
	0.040	0.051	6.897 (0.69%)	8.793 (0.88%)
เฉลี่ย	0.046	0.045	7.989 (0.80%)	7.816 (0.78%)
growing	0.034	0.022	5.862 (0.59%)	3.793 (0.38%)
	0.027	0.031	4.655 (0.47%)	5.345 (0.53%)
	0.039	0.029	6.724 (0.67%)	5.000 (0.50%)
เฉลี่ย	0.033	0.027	5.747 (0.57%)	4.713 (0.47%)
mature	0.025	0.015	4.310 (0.43%)	2.586 (0.26%)
	0.020	0.019	3.448 (0.34%)	3.276 (0.33%)
	0.023	0.022	3.966 (0.40%)	3.793 (0.38%)
เฉลี่ย	0.023	0.019	3.908 (0.39%)	3.218 (0.32%)
partly spawning	0.012	0.018	2.069 (0.21%)	3.103 (0.31%)
	0.021	0.011	3.621 (0.36%)	1.897 (0.19%)
	0.013	0.013	2.241 (0.22%)	2.241 (0.22%)
เฉลี่ย	0.015	0.014	2.644 (0.26%)	2.414 (0.24%)
spent	0.011	0.009	1.897 (0.19%)	1.552 (0.16%)
	0.008	0.012	1.379 (0.14%)	2.069 (0.21%)
	0.009	0.010	1.552 (0.16%)	1.724 (0.17%)
เฉลี่ย	0.009	0.010	1.609 (0.16%)	1.782 (0.18%)

ภาคผนวก จ
ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Humason (1979)

1. ตบแต่ง (trim) ตัวอย่างที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการ embed
2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอน dehydration ด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	50% ethanol	1
2	70% ethanol	1
3	70% ethanol	1
4	95% ethanol	1
5	95% ethanol	1
6	absolute ethanol	1
7	isopropyl alcohol	1
8	isopropyl alcohol	1
9	xylene	1
10	xylene	1
11	paraplast	1
12	paraplast	1

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอน dehydration ไป embed ด้วย paraplast โดยใส่ใน mold และประกบด้วย embedding ring จากนั้นนำ block ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัด section

4. ตบแต่งตัวอย่างที่อยู่ใน block ให้มีขนาดพอดีกับขนาด slide และ cover glass จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ให้มีความหนาประมาณ 3–5 μm นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 °C
5. ใช้แผ่น slide ซ้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 oC เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
6. นำสไลด์ที่อบแล้วไปผ่านกระบวนการย้อมสี haematoxylin & eosin (H&E) โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	xylene	2
2	xylene	2
3	xylene	2
4	isopropyl alcohol	1
5	isopropyl alcohol	1
6	95% ethanol	1
7	70% ethanol	1
8	50% ethanol	1
9	น้ำกลั่น	1
10	haematoxylin	20
11	น้ำประปา	1
12	น้ำกลั่น	1
13	50% ethanol	2
14	eosin	4
15	70% ethanol	2
16	95% ethanol	2
17	absolute ethanol	2
18	isopropyl alcohol	2
19	isopropyl alcohol	2

20	xylene	2
21	xylene	2
22	xylene	2

7. Mount slide ด้วยน้ำยา permount ปิดทับด้วย cover glass แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope)

ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยาเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2557)

การเตรียมตัวอย่างทางชีววิทยา

- นำชิ้นตัวอย่างที่ต้องการศึกษามาตัดด้วยใบมีดคมให้ได้ขนาด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรในน้ำยาที่คงอยู่
- ทำการดองตัวอย่างครั้งแรกโดยนำชิ้นตัวอย่างมาตัดให้เล็กลงอีกประมาณ 0.1-0.5 ลูกบาศก์มิลลิเมตร แล้วดองไว้ในน้ำยารักษาสภาพ 4% glutaraldehyde ที่ 4°C อย่างน้อย 2 ชั่วโมง
- ล้างใน 0.1 M Phosphate buffer saline (PBS) ที่ 4°C 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- ทำการดองตัวอย่างครั้งที่ 2 ใน 1% Osmium tetroxide ใน 0.1M PBS ที่ 4°C นาน 1-2 ชั่วโมง
- ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
- En block-stain โดยการย้อมชิ้นตัวอย่างใน 2% Uranyl 20 นาที
- dehydrate ใน ethanol ดังนี้

70%	3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
80%	3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
90%	3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที
100%	2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
- Infiltration เป็นการนำสารตัวกลางเข้าสู่เนื้อเยื่อ มีวิธีการดังนี้

propylene oxide	2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที
propylene oxide : epoxy resin (1:1)	1-2 ชั่วโมง

propylene oxide : epoxy resin (1:2) 1-2 ชั่วโมง

pure epoxy resin 2-3 ชั่วโมง

9. embedding

- หยด Pure Epoxy resin ลงใน capsule ประมาณ ¼ ไล์ฟองอากาศออก
- นำตัวอย่างเทลงบนกระดาษ แล้วเขี่ยลงใน capsule โดยให้ชั้นตัวอย่างอยู่ปลายสุดของ capsule
- ตรวจสอบฟองอากาศแล้วเติม Pure Epoxy resin จนเต็ม

10. นำตัวอย่าง ไปอบที่อุณหภูมิ 70-80 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง

11. นำ block ที่ได้ไปตัด section ด้วยเครื่อง Ultramicrotome

11. นำไปย้อม Ultrathin section

การย้อม Ultrathin section

1. หยด 5% Uranyl acetate บนแผ่น parafilm หรือแผ่นซีฟิ่งที่สะอาด ขนาดของหยดควรมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร
2. นำ Grid ที่มี section มาลอยบนผิวของหยด Uranyl acetate โดยให้ด้านที่มี section คว่ำลง
3. ใช้ภาชนะที่ปิดบริเวณแผ่น parafilm หรือแผ่นซีฟิ่งที่มี Uranyl acetate และ Grid ลอยอยู่ที่ไว้ประมาณ 10 นาที
4. ใช้ forceps ปลายแหลมสะอาดจับ Grid และจุ่มในน้ำกลั่น-ต้ม เพื่อล้างโดยใช้เวลา 30 วินาที (ประมาณ 10-15 จุ่ม)
5. ย้อม Grid ในหยดของ Lead citrate โดยจุ่ม Grid ให้อยู่ภายในหยดของสารละลาย โดยมีเกล็ดของ HaOH วางอยู่ใกล้ๆ หยดของ Lead citrate เพื่อช่วยดูด CO₂ ในอากาศบริเวณนั้น ปิดบริเวณหยดของสารละลายด้วยฝาของ Petri dish (ใช้เวลา 5 นาที)
6. ล้างด้วยน้ำกลั่นต้ม-กรอง 2-3 ครั้งๆ ละ 10 จุ่ม
7. จับ Grid ให้แห้ง