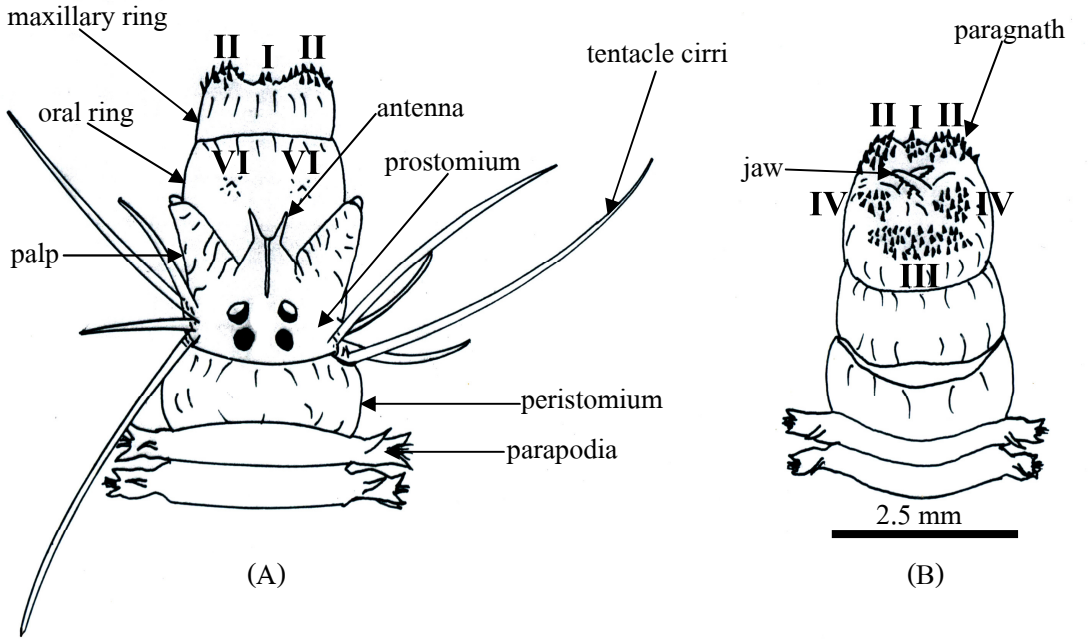
บทที่ 3

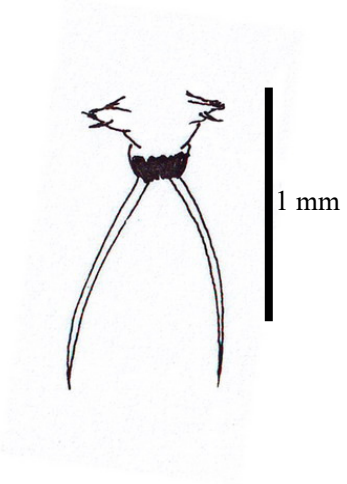
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ลักษณะทั่วไปของไส้เดือนทะเลชนิด *Neanthes glandicincta* Southern, 1921

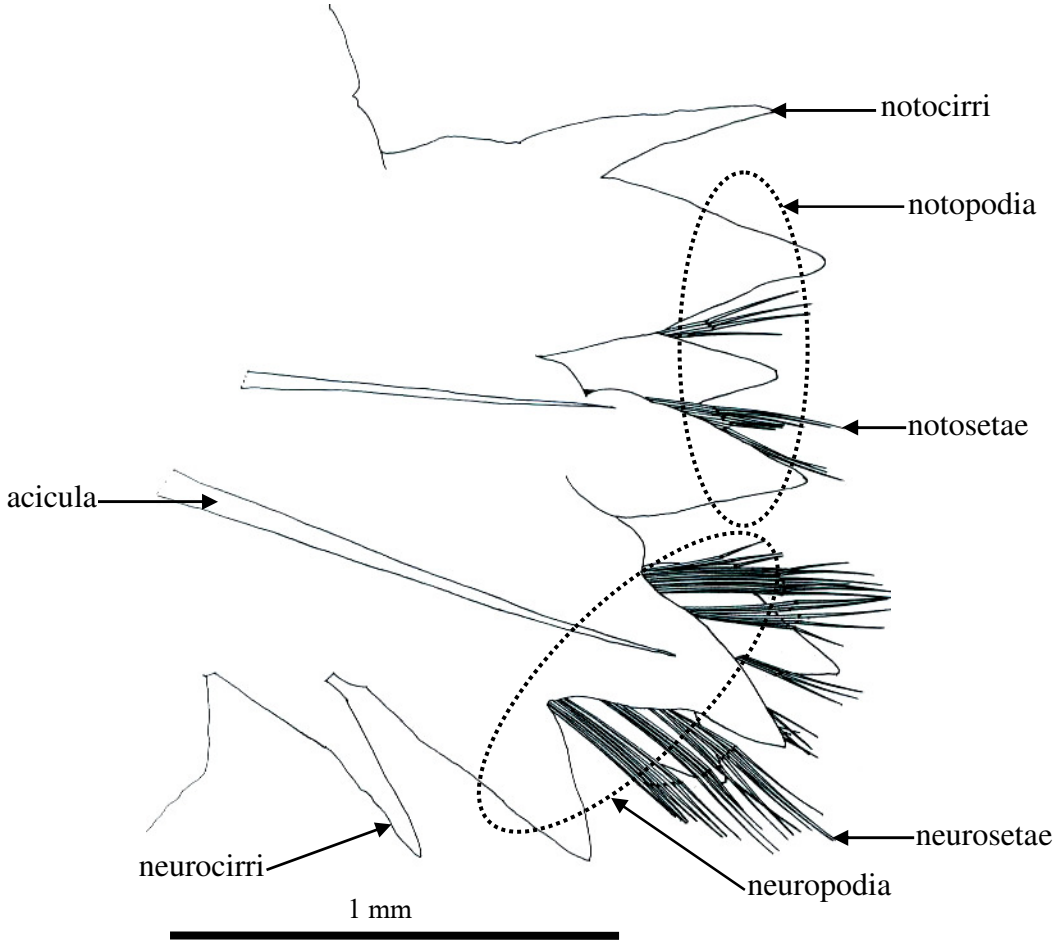
N. glandicincta ที่เก็บจากทะเลสาบสงขลาตอนล่าง และมีลักษณะเป็นตัวเต็มวัย แต่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเพื่อการสืบพันธุ์มีความยาวประมาณ 9.0-9.5 เซนติเมตร กว้างประมาณ 2.5-5.0 มิลลิเมตร เพศผู้ที่โตเต็มที่และมีลักษณะภายนอกสมบูรณ์มีจำนวนปล้องประมาณ 85-95 ปล้อง น้อยกว่าเพศเมียที่มีลักษณะภายนอกสมบูรณ์ซึ่งมีจำนวนปล้องประมาณ 102-113 ปล้อง *N. glandicincta* เพศเมียที่เข้าสู่ระยะผสมพันธุ์และมีลักษณะภายนอกสมบูรณ์มีขนาดใหญ่กว่าเพศผู้ในระยะเดียวกัน คล้ายกับไส้เดือนทะเลชนิด *P. nuntia* (สุรพล ชุณหบัณฑิต, 2544) บริเวณ prostomium ของ *N. glandicincta* มี antenna 2 อัน palps เป็นแบบ biarticulated มี tentacle cirri 4 คู่ eversible pharynx มีฟัน 2 อัน มีจำนวน conical paragnaths บน maxillary ring ตำแหน่งที่ I= 9, IIซ้าย = 14-16, IIขวา = 6-13, III= 46-50, IVซ้าย = 11-12 และ IVขวา = 8-14 และบน oral ring ตำแหน่งที่ VIซ้าย = 1 และ VIขวา = 1 อัน (รูปที่ 22) ที่ปลายหางมี cirri 2 เส้น(รูปที่ 23) พาราโพเดียเป็นแบบ biramous (รูปที่ 24) notosetae เป็นแบบ heterogomph spinigers และ neurosetae มีทั้งที่เป็น heterogomph spinigers และ heterogomph falcigers ทั้งนี้จำนวนและขนาดของซีตี้อาจแตกต่างกันขึ้นอยู่กับความสมบูรณ์ของตัวอย่าง ก่อนที่จะเข้าสู่ระยะผสมพันธุ์ลำตัวของ *N. glandicincta* จะมีสีค่อนข้างแดงอมชมพู ไม่สามารถแยกเพศได้ แต่จะสามารถแยกเพศได้เมื่อเริ่มเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ (รูปที่ 25) คล้ายกับไส้เดือนทะเลในวงศ์ Nereididae ชนิดอื่นๆ เช่น *Perinereis rulleiri* (Prevedelli and Simonini, 2003) *N. glandicincta* เพศผู้จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะที่เรียกว่า “epitokous” โดยลำตัวจะหดสั้นลงเหลือประมาณ 2.4-2.7 เซนติเมตร มีการแบ่งส่วนของร่างกายออกเป็น 2 ส่วนที่ชัดเจน (รูปที่ 26 บน) พาราโพเดียขยายกว้างขึ้น ซีตี้มีการเปลี่ยนรูปร่างเป็นแบบใบพาย ลำตัวจะมีสีขาวอมชมพูปนแดง ซึ่งสีขาวเกิดจากสีของสเปิร์ม ส่วนเพศเมียแม้ลำตัวจะหดสั้นลงเหลือประมาณ 3.3-4.5 เซนติเมตร แต่ลำตัวไม่มีการแบ่งออกเป็น 2 ส่วนที่ชัดเจนเหมือนเพศผู้ (รูปที่ 26 ล่าง) สีของลำตัวเปลี่ยนเป็นสีเขียวอ่อนเนื่องจากสีของไข่ *N. glandicincta* ทั้งเพศผู้และเพศเมียเมื่อเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจะสามารถสังเกตเห็นตุ่มสีขาวที่โคนของพาราโพเดียด้านบนได้อย่างชัดเจน (รูปที่ 27) ซีตี้ของ *N. glandicincta* มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเช่นกัน โดยพบว่าก่อนเข้าสู่ระยะที่จะผสมพันธุ์เพศผู้มีซีตี้เป็นแบบ compound spiniger setae



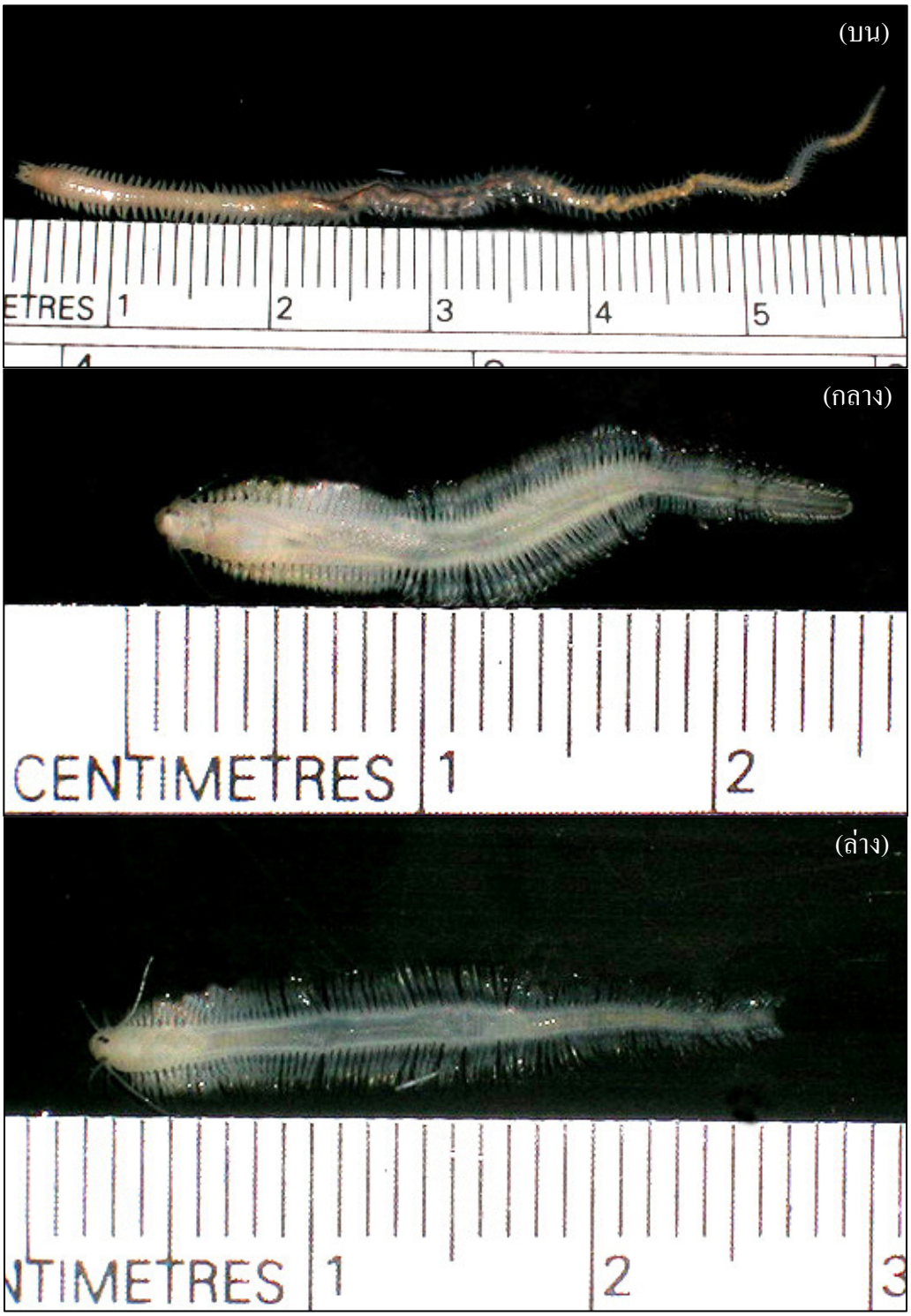
รูปที่ 22 รูปวาดลักษณะส่วนหัวของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta*: ด้านหลัง (dorsal view) (A) และ ด้านท้อง (ventral view) (B); ตัวอักษรโรมันแสดงชื่อตำแหน่งของ paragnaths



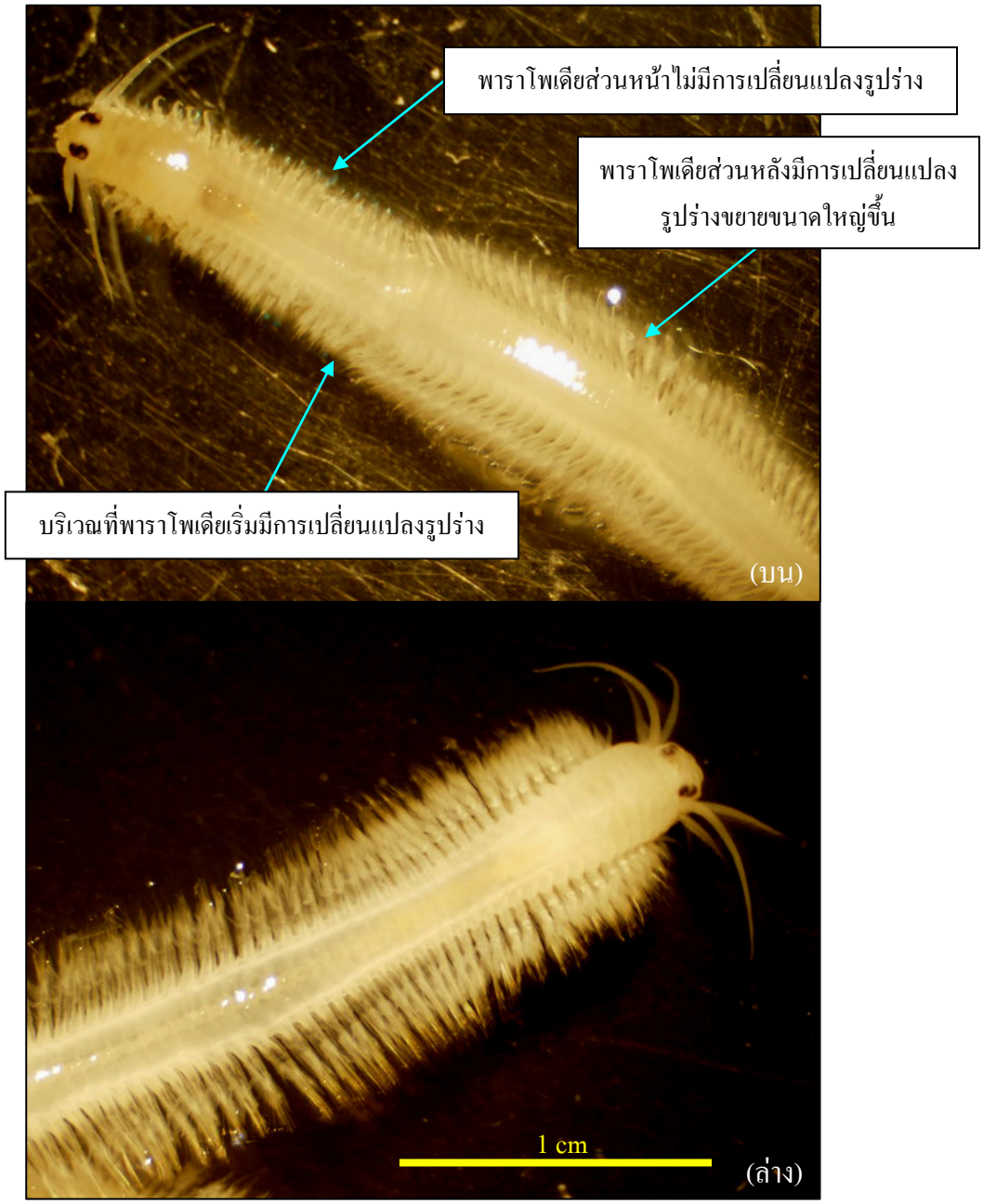
รูปที่ 23 รูปวาดลักษณะส่วนหาง (dorsal view) ของ *N. glandicincta* เพศเมีย



รูปที่ 24 รูปวาดลักษณะของพาราโพเดียคู่ที่ 5 ขวา (posterior view) ของ *N. glandicincta*



รูปที่ 25 ไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta*: ตัวโตเต็มวัยระยะที่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (บน); เพศผู้ที่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้ว (กลาง) และ เพศเมียที่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้ว (ล่าง) สเกลหน่วยเป็นเซนติเมตร

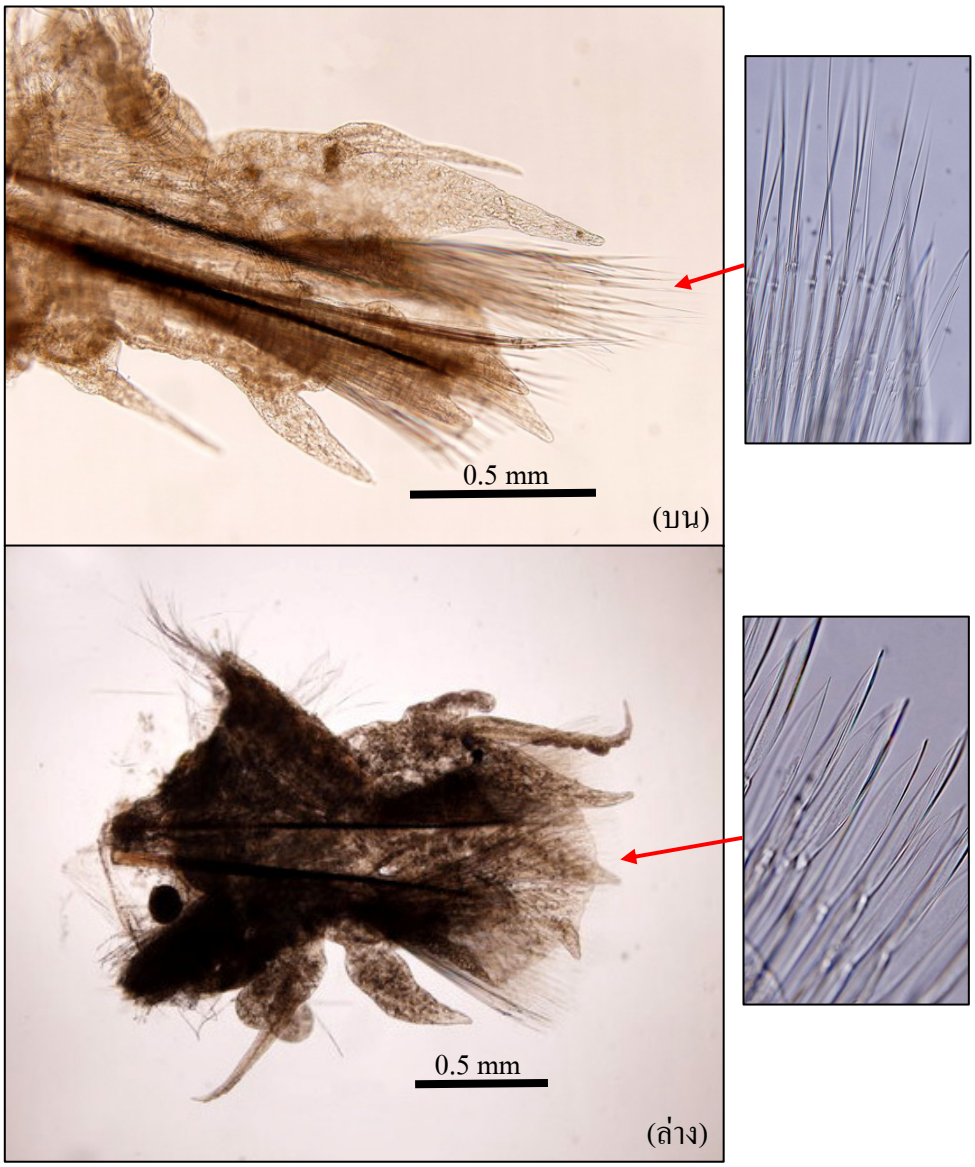


รูปที่ 26 รูปถ่ายพ่อแม่พันธุ์ไส้เดือนทะเล *N. glandicincta* ที่ขึ้นมาว่ายน้ำเพื่อผสมพันธุ์และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์แล้ว: เพศผู้ (บน) และ เพศเมีย (ล่าง)

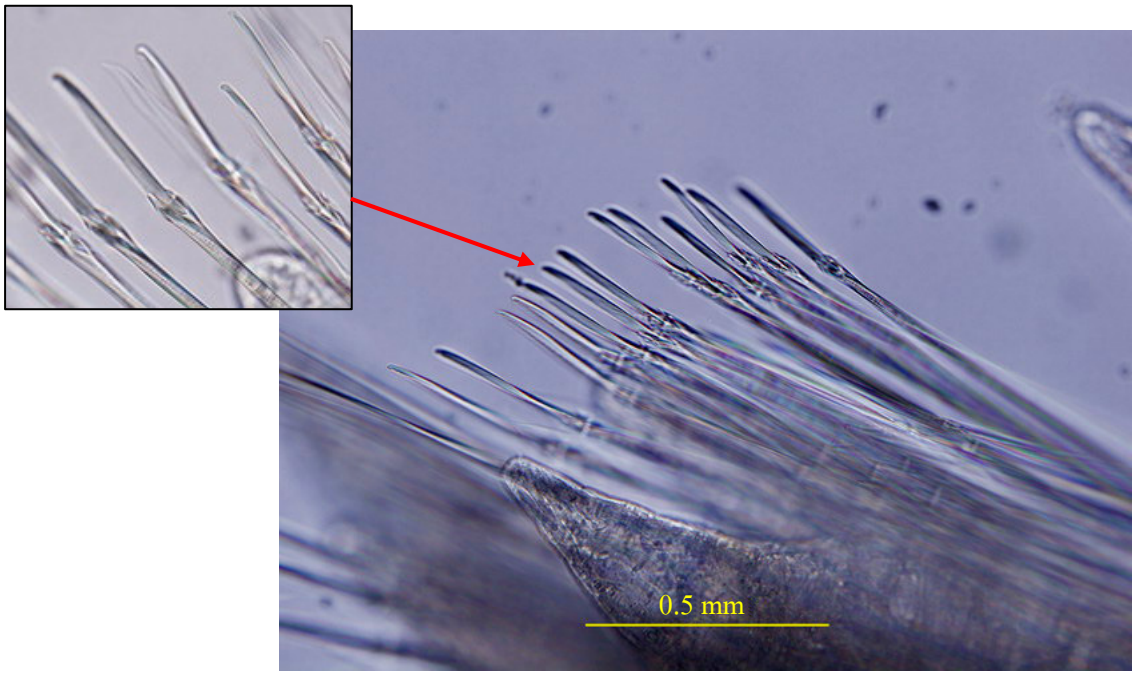
รูปที่ 27 รูปถ่ายส่วนหางของ *N. glandicincta* (dorsal view): เพศผู้ (บน) และ เพศเมีย (ล่าง)

เท่านั้น ส่วนซีตี้ของเพศเมียจะมี ทั้ง compound spiniger setae และ compound falciger setae เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะที่พร้อมจะผสมพันธุ์พบว่า *N. glandicincta* เพศเมีย compound spiniger setae บางส่วนเปลี่ยนเป็นซีตี้แบบใบพาย (paddle setae) แต่พบว่า compound falciger setae ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ส่วน *N. glandicincta* เพศผู้ซึ่งมีซีตี้ทั้งหมดเป็นแบบ compound spiniger setae เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเข้าสู่ระยะที่พร้อมจะผสมพันธุ์พบว่าซีตี้ของลำตัวส่วนหลังทั้งหมดเปลี่ยนเป็นซีตี้แบบใบพาย (รูปที่ 28 และ 29) การเปลี่ยนแปลงรูปร่างดังกล่าวพบในไส้เดือนทะเลชนิดอื่นๆ ในวงศ์ Nereididae หลายชนิด เช่น *N. irrorata* (Barnes, 1974) *N. virens* (Ushakova and Sarantchova, 2004) และ *P. cultrifera* (Gambi et al., 1994; Maltagliati *et al.*, 2001; Prevedelli and Simonini, 2003; Rouabah and Scaps, 2003) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า *N. glandicincta* เพศเมียที่โตเต็มที่มีความดกของไข่ประมาณ 32,700-150,000 ฟอง ปริมาณความดกของไข่ที่ต่างกันมากนี้อาจเกิดจากความสมบูรณ์ของแม่พันธุ์ เนื่องจากการเก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้ต้องเก็บหลายครั้งในช่วงเวลาที่ต่างกัน ซึ่งแต่ละครั้งความสมบูรณ์ของพ่อแม่พันธุ์ก็มีความแตกต่างกัน สืบเนื่องมาจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีความแตกต่างกัน

Olive และคณะ (1997) กล่าวว่าไส้เดือนทะเลในวงศ์ Nereididae ที่มีรูปแบบการวางไข่แบบ semelparous ปัจจัยสิ่งแวดล้อมจะเป็นปัจจัยที่ควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ ดังเช่น อุณหภูมิ และ ช่วงเวลาที่ได้รับแสง (Alonso *et al.*, 2006) คล้ายกับรายงานของ Simonini และ Prevedelli (2003) ซึ่งพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการสืบพันธุ์ของไส้เดือนทะเลชนิด *Dinophilus gyrociliatus* โดยมีผลต่อความดกของไข่ ขนาดของไข่ ขนาดของ ovigerous capsules และมีผลต่อการกระตุ้นการสืบพันธุ์ Rouabah และ Scaps (2003) พบว่าไส้เดือนทะเลชนิด *P. cultrifera* ซึ่งอาศัยอยู่ในเขตน้ำขึ้น-น้ำลง บริเวณชายฝั่งประเทศ Algeria ใกล้กับชายแดนประเทศ Tunisia จะเริ่มมีการวางไข่ในช่วงปลายเดือนเมษายนถึงต้นเดือนพฤษภาคมซึ่งช่วงระยะเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่น้ำทะเลมีอุณหภูมิสูงขึ้น นอกจากนั้นในไส้เดือนทะเลวงศ์ Spionidae ชนิด *Streblospio shrubsolii* และ *Streblospio benedicti* อุณหภูมิก็มีผลต่อการสืบพันธุ์ของไส้เดือนทะเลกลุ่มนี้เช่นกัน (Sarda and Martin, 1993) Levin และ Bridges (1995) พบว่าอุณหภูมิมีผลอย่างยิ่งต่อไส้เดือนทะเลชนิด *S. benedicti* (Webster) ที่โตเต็มวัย โดยมีผลต่ออัตรารอด การเจริญเติบโต และพฤติกรรมการสืบพันธุ์ ซึ่งพบว่าที่อุณหภูมิที่สูงกว่า 25 องศาเซลเซียส และต่ำกว่า 12.5 องศาเซลเซียส จะยับยั้งการเจริญเติบโตและการวางไข่ของไส้เดือนทะเลชนิดดังกล่าว



รูปที่ 28 รูปถ่ายพาราโพเดียด้านหลัง (posterior view) ของ *N. glandicincta* ที่ว่ายน้ำขึ้นมาผสมพันธุ์: พาราโพเดียคู่ที่ 31 ขวา (เพศเมีย) compound spinigers setae บางส่วนเปลี่ยนเป็นซีตี้แบบใบพาย (เล็กบน) ส่วน compound falciger setae ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง กำลังขยาย 10 เท่า (บน); พาราโพเดียคู่ที่ 31 ขวา (เพศผู้) compound spinigers setae ทั้งหมดเปลี่ยนเป็นซีตี้แบบใบพาย (เล็กล่าง) กำลังขยาย 4 เท่า (ล่าง)



รูปที่ 29 compound falcigers setae ของพาราโพเดียคู่ที่ 31 ขวา (เพศเมีย): กำลังขยาย 40 เท่า ซีตี้แบบดังกล่าวไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเมื่อเข้าสู่ระยะ epitoky

การวิเคราะห์ดินจากบริเวณพื้นที่เก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์บริเวณ หมู่ 1 บ้านอ่าวทราย ต.เกาะยอ อ.เมือง จ.สงขลา พบว่าดินบริเวณดังกล่าวมีลักษณะเป็น sandy loam (% sand = 73.5, % silt = 8.3 และ % clay = 18.2) มีปริมาณอินทรียวัตถุในดิน = 1.08% แต่ในการทดลองครั้งนี้สามารถเลี้ยง *N. glandicincta* ให้เจริญเติบโตเป็นพ่อแม่พันธุ์ได้ในวัสดุเลี้ยงที่เป็น loamy sand (% sand = 88.5, % silt = 1.0 และ % clay = 10.5) และภายหลังจากการทดลองได้นำตัวอย่างของทรายที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์มาวิเคราะห์หาปริมาณอินทรียวัตถุซึ่งได้ค่าของปริมาณอินทรียวัตถุ = 0.04% ซึ่งต่ำกว่าค่าของปริมาณอินทรียวัตถุที่ได้จากบริเวณที่เก็บตัวอย่าง เนื่องมาจากในระหว่างการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำในบ่อพ่อแม่พันธุ์ทุกวัน ทำให้ช่วยลดการสะสมของสารอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเลี้ยง

เมื่อ *N. glandicincta* พร้อมที่จะผสมพันธุ์วางไข่ ทั้งตัวผู้และตัวเมียจะว่ายน้ำขึ้นมาจับคู่ผสมพันธุ์ จากการสังเกตในบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์พบว่า หลังจากตัวเมียว่ายน้ำขึ้นมาจะปล่อยไข่อย่างรวดเร็วภายในเวลาไม่เกิน 5 นาที ส่วนตัวผู้ว่ายน้ำอยู่ได้เป็นเวลานานกว่า และจะค่อยๆปล่อยสเปิร์มจนหมดโดยใช้เวลาประมาณ 30 นาที หลังจากที่ปล่อยสเปิร์มและไข่หมดแล้วทั้งเพศผู้และเพศเมียจะตาย

จากสาเหตุดังกล่าวนี้ทำให้การทดลองครั้งนี้มีความยากลำบาก เนื่องจากไม่สามารถกำหนดให้ตัวผู้และตัวเมียขึ้นมาว่ายน้ำจับคู่ผสมพันธุ์พร้อมกันได้ทำให้ไม่สามารถเริ่มการทดลองได้ ยกตัวอย่างเช่นในกรณีที่ตัวเมียเป็นฝ่ายขึ้นมาว่ายน้ำก่อนตัวผู้ ตัวเมียดังกล่าวก็จะปล่อยไข่ออกมาอย่างรวดเร็ว ซึ่งทำให้ไข่นั้นไม่สามารถนำมาใช้ในการทดลองได้ แต่ถ้าในกรณีที่ตัวผู้ขึ้นมาว่ายน้ำก่อนและยังไม่ปล่อยน้ำเชื้อ แล้วมีตัวเมียว่ายน้ำขึ้นมาก็สามารถนำทั้งตัวผู้และตัวเมียมาใช้ทดลองได้ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่าโอกาสดังกล่าวเกิดขึ้นได้น้อยกว่า วิธีการแก้ปัญหาดังกล่าวนี้คือ ต้องมีปริมาณพ่อแม่พันธุ์ที่มากเกินพอสำหรับใช้ในการทดลอง เพื่อเพิ่มโอกาสที่ตัวผู้และตัวเมียจะขึ้นมาว่ายน้ำพร้อมกันให้มากขึ้น แม้แต่ในวิธีการผสมเทียมซึ่งเป็นการนำไข่ที่ล้างแล้วมาผสมกับน้ำเชื้อที่เจือจางแล้วโดยไม่ต้องอาศัยการว่ายน้ำวนรอบตัวกันของตัวผู้และตัวเมีย ยังจำเป็นต้องให้พ่อแม่พันธุ์ขึ้นมาว่ายน้ำพร้อมกันเพราะยังไม่มีการศึกษาว่าไข่ที่ปล่อยออกมาจากตัวเมียแล้วสามารถเก็บไว้ได้นานเท่าใด Foyn และ Gjoeu (1954) อ้างโดย ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์ และอนงค์ สวรรยาธิปัตย์ (2528) กล่าวว่าไข่ควรได้รับการผสมทันทีที่ถูกปล่อยออกจากตัวแม่ เพราะฉะนั้นในการทดลองครั้งนี้จึงจำเป็นที่จะต้องนำไข่และสเปิร์มที่ได้มาพร้อมๆ กันมาใช้ในการทดลอง เพื่อป้องกันปัญหาการไม่ปฏิสนธิซึ่งเกิดจากไข่ไม่มีคุณภาพ

จากการสังเกตพฤติกรรมในการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของ *N. glandicincta* พบว่าเมื่อตัวผู้และตัวเมียว่ายน้ำมาเจอกันจะว่ายน้ำหมุนวนรอบตัวของกันและกันอย่างรวดเร็ว เรียกพฤติกรรมดังกล่าวว่า “nuptial dance” การว่ายน้ำวนรอบตัวกันของ *N. glandicincta* จะใช้เวลาไม่กี่วินาที โดยที่ตัวเมียจะปล่อยไข่ออกมาอย่างรวดเร็วแล้วจะค่อยๆ ว่ายน้ำวนรอบตัวเองช้าลง ส่วนตัวผู้ยังคงว่ายน้ำอย่างรวดเร็ววนรอบไข่เพื่อปล่อยสเปิร์ม หลังจากนั้นก็จะว่ายต่อไปอีกระยะหนึ่ง หลังจากนั้นทั้งตัวผู้และตัวเมียจะตาย

พฤติกรรมดังกล่าวพบในไส้เดือนทะเลในวงศ์ Nereididae ชนิดอื่นๆ เช่น *P. nuntia var. brevicirrus* (ปิยะพงศ์ โชติพันธุ์ และอนงค์ สวรรยาธิปัตย์, 2528; สุรพล ชุณหบัณฑิต, 2544; Hardege and Bartels-Hardege, 1995) Zeeck และคณะ (1998) อธิบายขั้นตอนการผสมพันธุ์ของ *Nereis succinea* ไว้อย่างละเอียดว่าเมื่อ *N. succinea* เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแล้วว่ายน้ำออกมาจากรูที่อยู่อาศัยภายใต้สภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมในคืนหลังพระจันทร์เต็มดวง โดยว่ายขึ้นมารวมตัวกันบริเวณผิวน้ำ การรวมกลุ่มแต่ละครั้งมีจำนวนมากพอที่จะทำให้เกิดการจับคู่ผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้ ซึ่งเพศผู้จะทำหน้าที่ว่ายน้ำอย่างรวดเร็วเพื่อค้นหาตัวเมียที่พร้อมจะวางไข่ ในขณะที่ตัวเมียจะว่ายน้ำเป็นวงกลมช้าๆ อยู่กับที่ การค้นหาเกิดขึ้นได้จากการรับสัมผัสทางเคมีในระยะทางใกล้ๆ โดยเป็นไปตามขั้นตอนดังนี้ เริ่มจากตัวเมียจะปล่อยสัญญาณทางเคมีออกมา หลังจากนั้นเมื่อไส้เดือนทะเลเพศผู้ได้รับสัญญาณดังกล่าวก็จะ

ว่ายน้ำเข้ามาแล้วเริ่มว่ายเป็นวงกลมรอบตัวเมีย ในขณะเดียวกันนั่นเองตัวผู้ก็จะปล่อยสเปิร์มออกมาเพียงเล็กน้อยพร้อมกับของเหลวภายในร่างกายซึ่งเต็มไปด้วยฟีโรโมนที่ใช้กระตุ้นการปล่อยไข่ของตัวเมีย เมื่อได้รับการกระตุ้นดังกล่าวตัวเมียก็จะว่ายน้ำอย่างรวดเร็วเป็นวงกลมเล็กๆ โดยมีตัวผู้ว่ายวนอยู่ด้านนอกซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 10-40 วินาที ตัวเมียก็จะปล่อยไข่ออกมาทั้งหมด แล้วตัวผู้ก็จะว่ายวนรอบไข่พร้อมทั้งปล่อยสเปิร์มจำนวนมากออกมา

การเพาะพันธุ์ไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta*

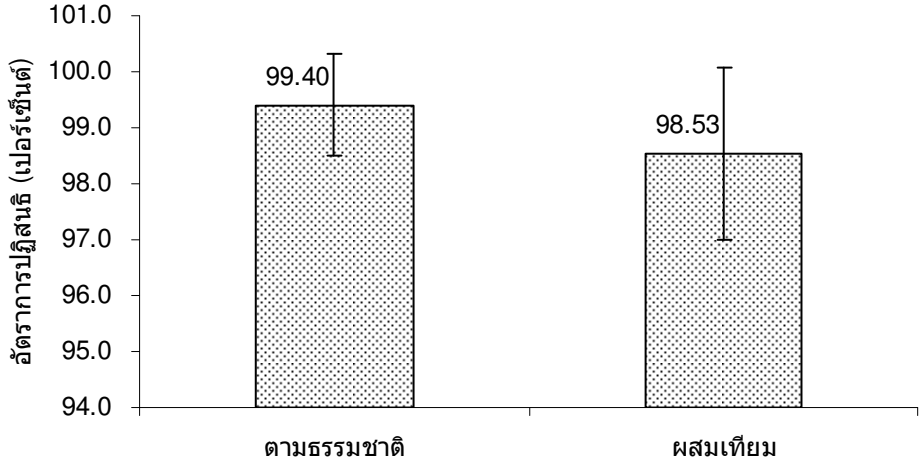
การทดลองที่ 1 เปรียบเทียบวิธีการเพาะพันธุ์ไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* โดยวิธีตามธรรมชาติ และวิธีการผสมเทียมภายในห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาจากอัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟัก และอัตราการรอด จนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง ในการทดลองที่ 1 ใช้น้ำทะเลที่มีค่าความเค็มเท่ากับ 15 ส่วนในพันส่วน ซึ่งเท่ากับค่าความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในขณะนั้น

กำหนดให้วิธีการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติเป็นชุดการทดลองที่ 1 (T1) และการเพาะพันธุ์โดยวิธีการผสมเทียมเป็นชุดการทดลองที่ 2 (T2) ทำการทดลองทั้งหมดวิธีละ 4 ครั้ง (n = 4) โดยใช้พ่อแม่พันธุ์ครั้งละ 1 คู่ กำหนดให้คู่ที่ 1, 2, 3 และ 4 คือ r1, r2, r3 และ r4 ตามลำดับ (ผลของการทดลองที่ 1 อยู่ในตารางภาคผนวกที่ 1)

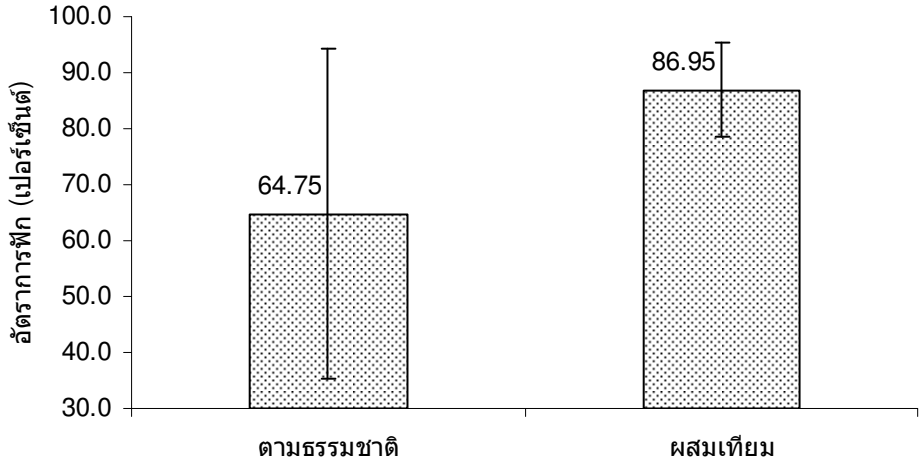
อัตราการปฏิสนธิของไข่ที่ได้จากการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 99.40±0.91 เปอร์เซ็นต์ (n = 4) และอัตราการปฏิสนธิของไข่โดยวิธีการผสมเทียมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 98.53±1.53 เปอร์เซ็นต์ (n = 4) ซึ่งค่าที่ได้จากการทดลองทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (รูปที่ 30)

อัตราการฟักของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจากการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 64.75±29.45 เปอร์เซ็นต์ (n = 4) และอัตราการฟักของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจากการผสมโดยวิธีการผสมเทียมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 86.95±8.51 เปอร์เซ็นต์ (n = 4) ซึ่งค่าที่ได้จากการทดลองทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (รูปที่ 31)

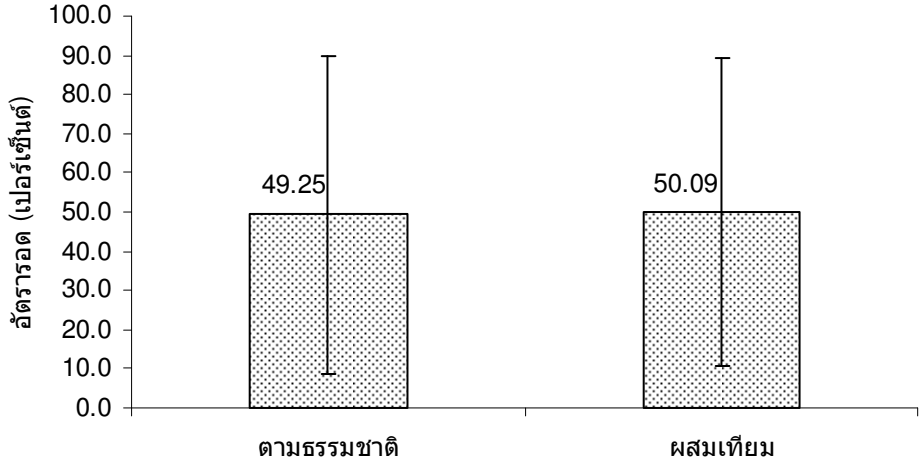
อัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของตัวอ่อนที่ฟักจากการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 49.25±40.63 เปอร์เซ็นต์ (n = 4) และอัตรารอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ของตัวอ่อนที่ฟักจากการผสมโดยวิธีการผสมเทียมมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 50.09±39.33 เปอร์เซ็นต์ (n = 4) ซึ่งค่าที่ได้จากการทดลองทั้งสองวิธีไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (รูปที่ 32)



รูปที่ 30 เปรียบเทียบอัตราการปฏิสนธิของไข่ *N. glandicincta* จากการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติ (ค่าเฉลี่ย 99.40±0.91, n = 4) และวิธีการผสมเทียม (ค่าเฉลี่ย 98.53±1.53, n = 4)

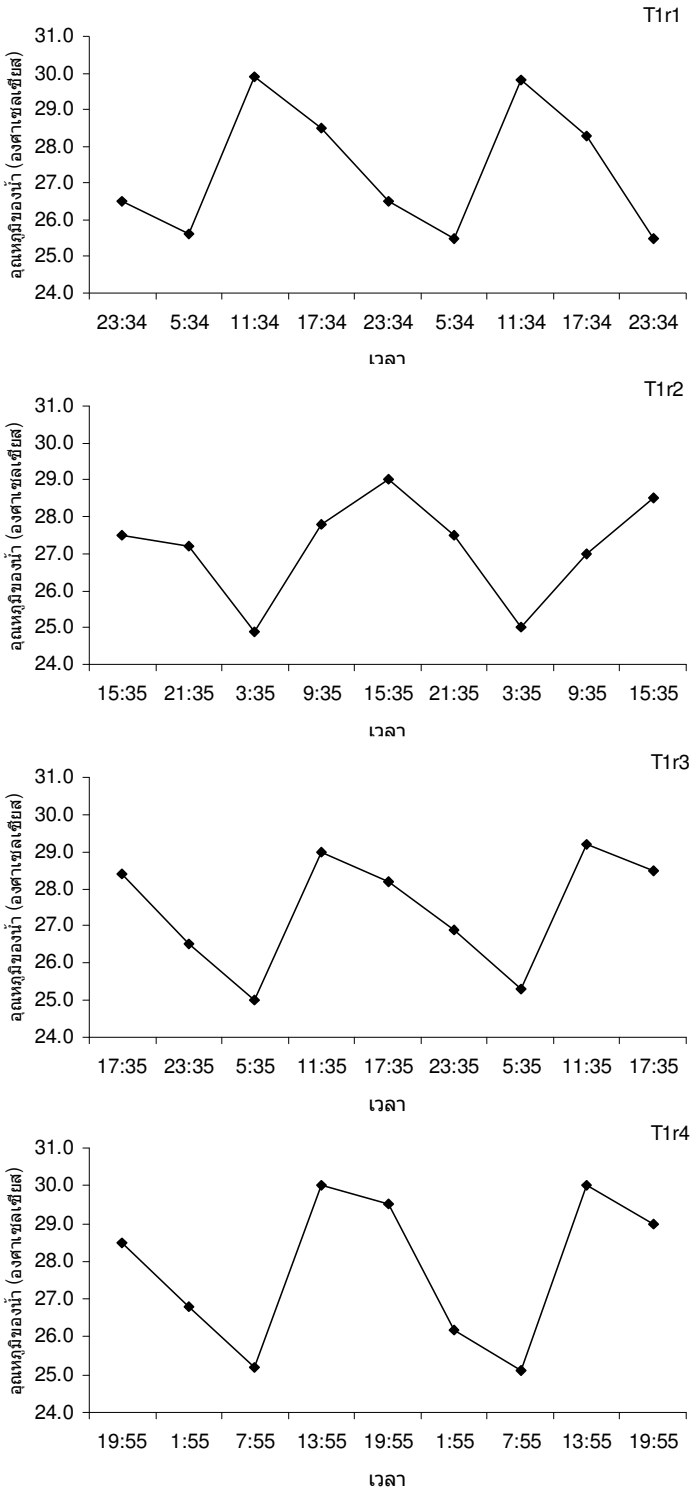


รูปที่ 31 เปรียบเทียบอัตราการฟักของไข่ *N. glandicincta* จากการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติ (ค่าเฉลี่ย 64.75±29.45, n = 4) และวิธีการผสมเทียม (ค่าเฉลี่ย 86.95±8.51, n = 4)

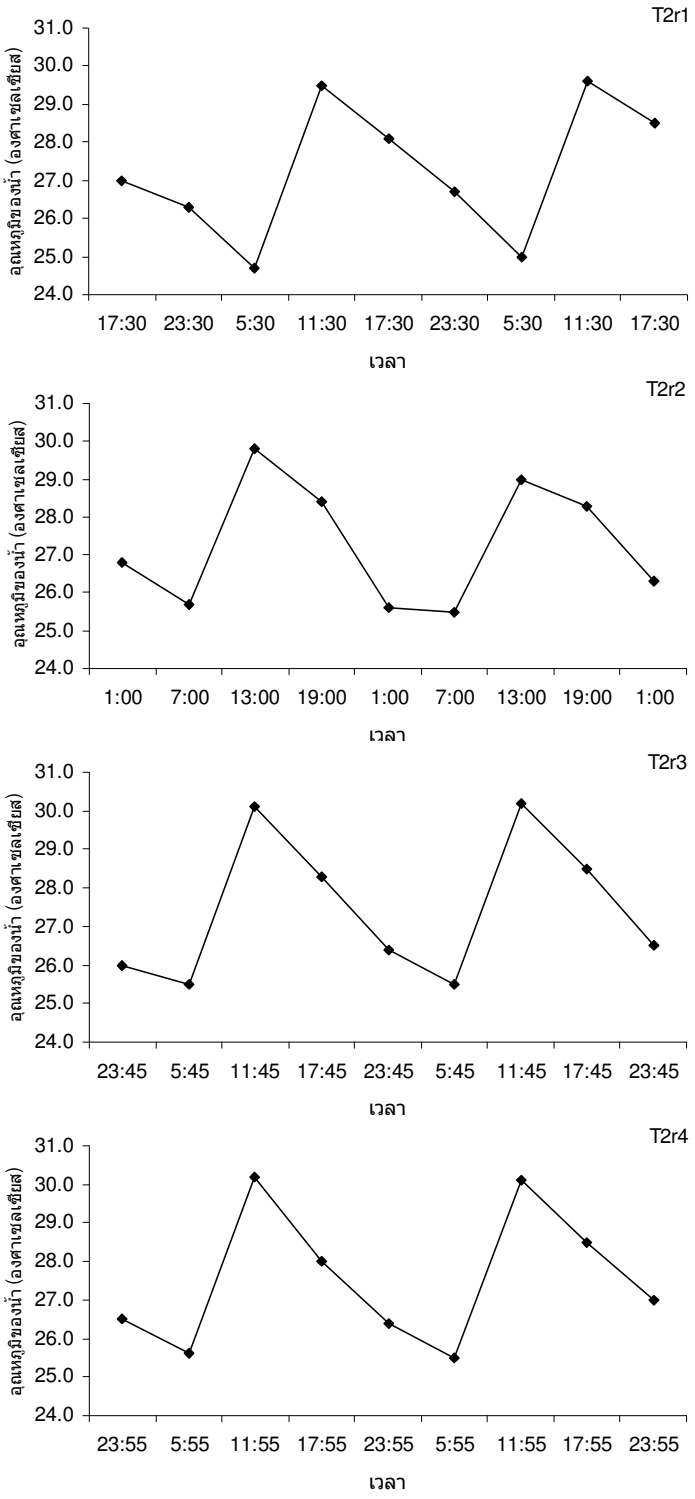


รูปที่ 32 เปรียบเทียบอัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของ *N. glandicincta* จากการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติ (ค่าเฉลี่ย 49.25±40.63, n = 4) และวิธีการผสมเทียม (ค่าเฉลี่ย 50.09±39.33, n = 4)

ระหว่างการทดลองที่ 1 มีการวัดอุณหภูมิของน้ำในขวดทดลองของแต่ละคู่ทดลองโดยทำการวัดทุก 6 ชั่วโมง (9 ครั้ง) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในแต่ละคู่ทดลองมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวันไปในทิศทางเดียวกัน คือมีการขึ้นลงเป็นปกติ และมีการเปลี่ยนแปลงในรอบวันไม่เกิน 5 องศาเซลเซียส ถึงแม้ว่าเวลาในการขึ้นมาว่ายน้ำเพื่อจับคู่ผสมพันธุ์ของไส้เดือนทะเลในแต่ละคู่ทดลองแตกต่างกันจึงทำให้อุณหภูมิเริ่มต้นทดลองแตกต่างกัน (รูปที่ 33 และ 34)



รูปที่ 33 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำในการทดลองที่ 1 ชุดการทดลองที่ 1 (วิธีการตามธรรมชาติ) (T1): ทั้ง 4 คู่ทดลอง (r1, r2, r3 และ r4)

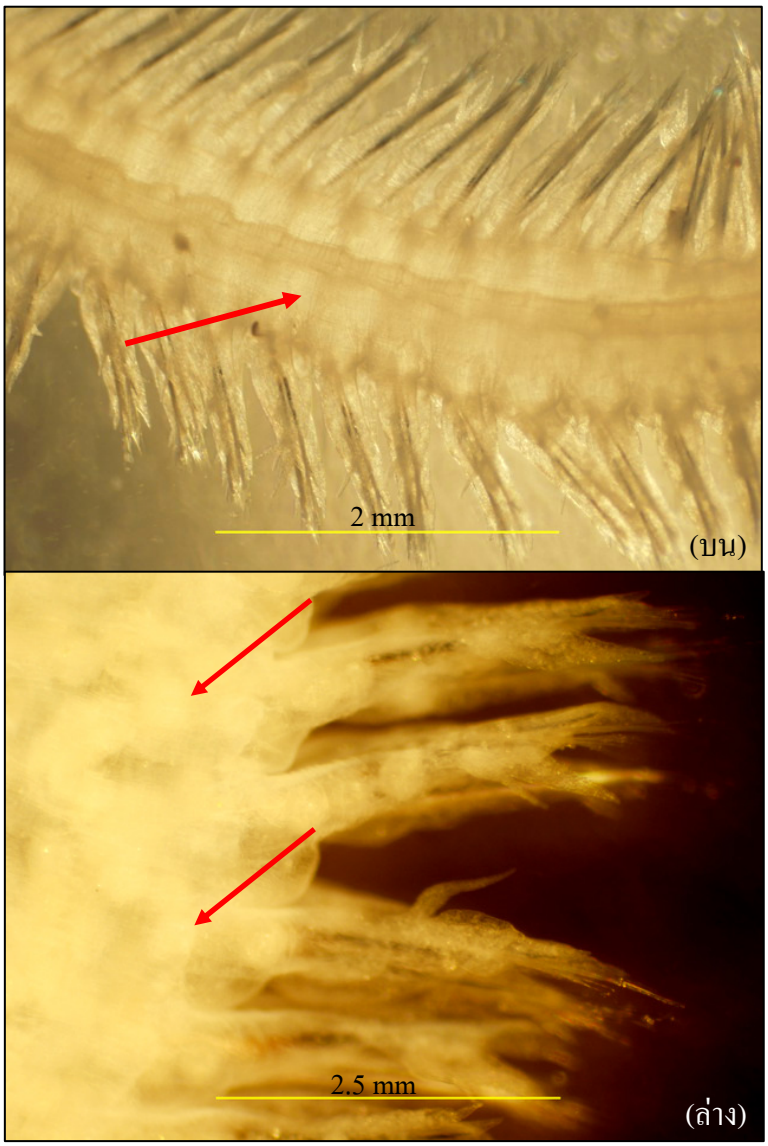


รูปที่ 34 การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำในการทดลองที่ 1 ชุดการทดลองที่ 2 (วิธีการผสมเทียม) (T2): ทั้ง 4 คู่ทดลอง (r1, r2, r3 และ r4)

ในการทดลองครั้งนี้ถึงแม้ว่าการเพาะพันธุ์ไส้เดือนทะเลโดยวิธีตามธรรมชาติ และวิธีการผสมเทียมได้ผลของอัตราการปฏิสนธิ อัตราการฟัก และอัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่พบว่าการเพาะพันธุ์โดยวิธีการผสมเทียม (86.95±8.51 เปอร์เซ็นต์) ให้ผลของอัตราการฟักที่มีแนวโน้มสูงกว่าการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติ (64.75±29.46 เปอร์เซ็นต์) แต่มีข้อสังเกตว่าค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐานของวิธีตามธรรมชาติมีค่าสูง จึงทำให้ผลของอัตราการฟักที่ได้จากทั้ง 2 วิธีไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากวิธีการและการสังเกตตัวอย่างแม่พันธุ์ไส้เดือนทะเลที่ใช้ในการเพาะพันธุ์โดยวิธีการผสมเทียม พบว่าการใช้มีดผ่าตัด ตัดตรงกลางลำตัวของไส้เดือนทะเลแล้วปล่อยให้ไข่ไหลออกมา ไม่สามารถทำให้ไข่ไหลออกมาทั้งหมดได้ ทำให้ไข่เหลือตกค้างอยู่ภายในลำตัวจำนวนหนึ่ง ซึ่งแตกต่างจากแม่พันธุ์ที่ใช้ในการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติพบว่าไม่มีไข่เหลือตกค้างอยู่ในลำตัวเลย (รูปที่ 35 บน) เพราะว่าไส้เดือนทะเลในวงศ์ Nereididae ส่วนใหญ่ไข่จะถูกปล่อยออกมาโดยการปริออกของผนังร่างกาย (Barnes, 1974) ดังนั้นการตัดตรงกลางลำตัวย่อมทำให้ไข่ไหลออกมาไม่หมด (รูปที่ 35 ล่าง) จึงทำให้ปริมาณไข่ที่ได้จากการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติมีจำนวนที่มากกว่าไข่ที่ได้จากการเพาะพันธุ์โดยวิธีการผสมเทียมเมื่อตัวเมียมีขนาด หรือปริมาณไข่ที่เท่ากัน

อย่างไรก็ตามจากการทดลองในครั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปในประเด็นนี้ได้ แต่สามารถสรุปได้ว่าการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติสามารถทำได้ง่ายกว่า และได้ปริมาณไข่ที่มากกว่า เป็นผลให้ได้ปริมาณตัวอ่อนที่มากกว่าเมื่อใช้จำนวนแม่พันธุ์เท่ากัน (ความสมบูรณ์ของแม่พันธุ์เท่ากัน)



รูปที่ 35 ลำตัวของไส้เดือนทะเลเพศเมียหลังจากทดลอง: เพศเมียที่ได้จากการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติ ลูกศรชี้ให้เห็นว่าไม่มีการตกค้างของไข่เหลืออยู่ภายในลำตัว (บน); เพศเมียที่ทดลองโดยวิธีการผสมเทียม ลูกศรชี้ให้เห็นว่ามีไข่ตกค้างอยู่ภายในลำตัวจำนวนมาก (ล่าง)

การทดลองที่ 2 ศึกษาพัฒนาการขั้นต้นของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* (ตั้งแต่เริ่มมีการปฏิสนธิจนกระทั่งเข้าสู่ระยะ nectochaete) การทดลองใช้เวลาทั้งหมด 48 ชั่วโมง ผลที่ได้จากการทดลองได้นำมาสรุปเป็นระยะเวลาในการเข้าสู่ระยะต่างๆ โดยตัดสินจากการเข้าสู่ระยะแต่ละระยะ 100 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองที่ 2 นี้ได้เลือกวิธีการเพาะพันธุ์โดยใช้วิธีตามธรรมชาติ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้พ่อแม่พันธุ์ครั้งละ 1 คู่ ผลการทดลองสามารถสรุปได้ดังตารางที่ 1 ในการทดลองที่ 2 ใช้น้ำทะเลที่มีค่าความเค็มเท่ากับ 15 ส่วนในพันส่วน ซึ่งเท่ากับค่าความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในขณะนั้น

หลังจากไข่ได้รับการปฏิสนธิจากสเปิร์มแล้วไข่เริ่มมีการพัฒนาเกิดขึ้นดังนี้ ไข่ที่เป็นไข่ดีจะมีลักษณะกลมใส มีเม็ดไขมันเล็กๆกระจายอยู่ภายในไข่ ไข่เริ่มสร้างชั้นวุ้นขึ้นมาภายใน 10 นาที ชั้นวุ้นมีความใสมากสามารถสังเกตได้ยาก แต่สามารถสังเกตได้จากสเปิร์มที่เกาะติดอยู่รอบชั้นวุ้นเป็นจำนวนมาก (รูปที่ 36 บน) หลังจากนั้นเมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 30-40 นาที เม็ดไขมันที่กระจายอยู่ภายในไข่มีการเคลื่อนไปรวมกันอยู่ด้านใดด้านหนึ่ง (รูปที่ 36 ล่าง)

เมื่อเวลาผ่านไป 50 นาที ถึง 1 ชั่วโมง 10 นาที ไข่เริ่มมีการแบ่งเซลล์ครั้งแรก จะได้ไข่ที่มี 2 เซลล์ เซลล์ของไข่ที่ได้มีขนาดแตกต่างกัน (รูปที่ 37 บน)

หลังจากนั้นประมาณ 10-20 นาทีมีการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 2 ได้ไข่ที่มี 4 เซลล์ (รูปที่ 37 ล่าง)

20 นาทีต่อมามีการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 3 ได้ไข่ที่มี 8 เซลล์ (รูปที่ 38 บน)

10-20 นาทีต่อมามีการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 4 ได้เป็นไข่ 16 เซลล์ การแบ่งเซลล์ของไข่ในระยะดังกล่าวนี้สังเกตจำนวนเซลล์ได้ยาก เนื่องจากการแบ่งเซลล์ 2 ครั้งแรกจะเป็นแบบ meridional ซึ่งได้ผลลัพธ์ออกมาเป็น 4 เซลล์ โดยมีเซลล์หนึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อื่นๆ จากนั้นเกิดการแบ่งเซลล์ครั้งที่ 3 ได้เซลล์ขนาดเล็กที่เรียกว่า “micromeres” ซึ่งอยู่คนละแกนกับ macromeres ในแนวดิ่ง ตำแหน่งของเซลล์ใหม่จะหมุนไปจากตำแหน่งเดิม 45 องศา ซึ่งได้เป็น 8 เซลล์ ลักษณะการแบ่งเซลล์แบบดังกล่าวเรียกว่า “spiral cleavage” หากการหมุนที่เกิดในระยะ spiral cleavage นี้มีทิศทางตามเข็มนาฬิกาเรียกว่า “dextrotropic” และหากมีทิศทางทวนเข็มนาฬิกาจะเรียกว่า “laevotropic” ในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบ spiral cleavage การหมุนทั้ง 2 แบบ จะเกิดสลับกัน (Borradaile, 1967; Wilmoth, 1967) การหมุนที่เกิดขึ้นจากการแบ่งเซลล์แบบดังกล่าวทำให้การนับจำนวนเซลล์ที่ได้จากการแบ่งเซลล์ทำได้ยากมาก โดยเฉพาะในการทดลองครั้งนี้ได้ศึกษาจากตัวอย่างที่ดองแล้วทำให้ไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้เลยหลังจากระยะ 8 เซลล์ (แต่ผู้วิจัยได้มีการศึกษาทดลองเบื้องต้นจากไข่ที่ยังมีการพัฒนา)

ไข่จะมีการแบ่งเซลล์ต่อไปเรื่อยๆ จนเวลาผ่านไป 4 ชั่วโมง 30 นาที ถึง 6 ชั่วโมง 30 นาที ไข่จะพัฒนาจนเข้าสู่ระยะที่เรียกว่า morula คือไข่จะไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ (รูปที่ 38 ล่าง และ 39 บน) เซลล์ที่ได้ในระยะนี้มีขนาดเล็กมากจนทำให้ไข่มีลักษณะผิวเกือบกลมเรียบ (ในระยะก่อนหน้าเซลล์จะมีขนาดใหญ่กว่าทำให้สังเกตเห็นผิวของไข่ค่อนข้างขรุขระ) ในระยะนี้ไข่จะยังคงพัฒนาอยู่ภายในชั้นวุ้น

เมื่อเวลาผ่านไป 7 ชั่วโมง 30 นาที ถึง 8 ชั่วโมง ตัวอ่อนในระยะดังกล่าวเริ่มมีซีเลีย (cilia) เกิดขึ้นบริเวณค่อนไปทางส่วนหัวของตัวอ่อน ตัวอ่อนในระยะนี้จะเริ่มมีมิติในด้านยาวขึ้น ถึงแม้จะสังเกตได้ไม่ชัดเจน ปริมาณของเม็ดไขมันมีจำนวนน้อยลงแต่มีขนาดใหญ่ขึ้น เม็ดไขมันจะอยู่บริเวณค่อนไปทางส่วนหัวเช่นกันเรียกตัวอ่อนระยะนี้ว่า “early trochophore larvae” (รูปที่ 39 ล่าง)

เมื่อเวลาผ่านไป 7 ชั่วโมง 30 นาที ถึง 9 ชั่วโมง 30 นาที ตัวอ่อนจะฟักออกมาจากชั้นวุ้น เรียกตัวอ่อนระยะดังกล่าวนี้ว่า “trochophore larvae” ตัวอ่อนในระยะนี้จะมีแถบของซีเลีย 2 แถบ แถบแรกอยู่บริเวณค่อนไปทางส่วนหัวเรียกว่า prototroch แถบที่ 2 อยู่บริเวณส่วนท้ายของลำตัวเรียกว่า telotroch (รูปที่ 40 บน) จากการศึกษาเบื้องต้นจากตัวอย่างที่มีชีวิตพบว่าตัวอ่อนระยะดังกล่าวมีการว่ายน้ำหมุนวนรอบตัวเองและมีการพุ่งไปข้างหน้าอย่างรวดเร็วมาก ตัวอ่อนจะว่ายน้ำอย่างนี้ตลอดเวลา ระหว่างนั้นภายในลำตัวของตัวอ่อนจะมีการพัฒนาของซีตี้อยู่ภายใน

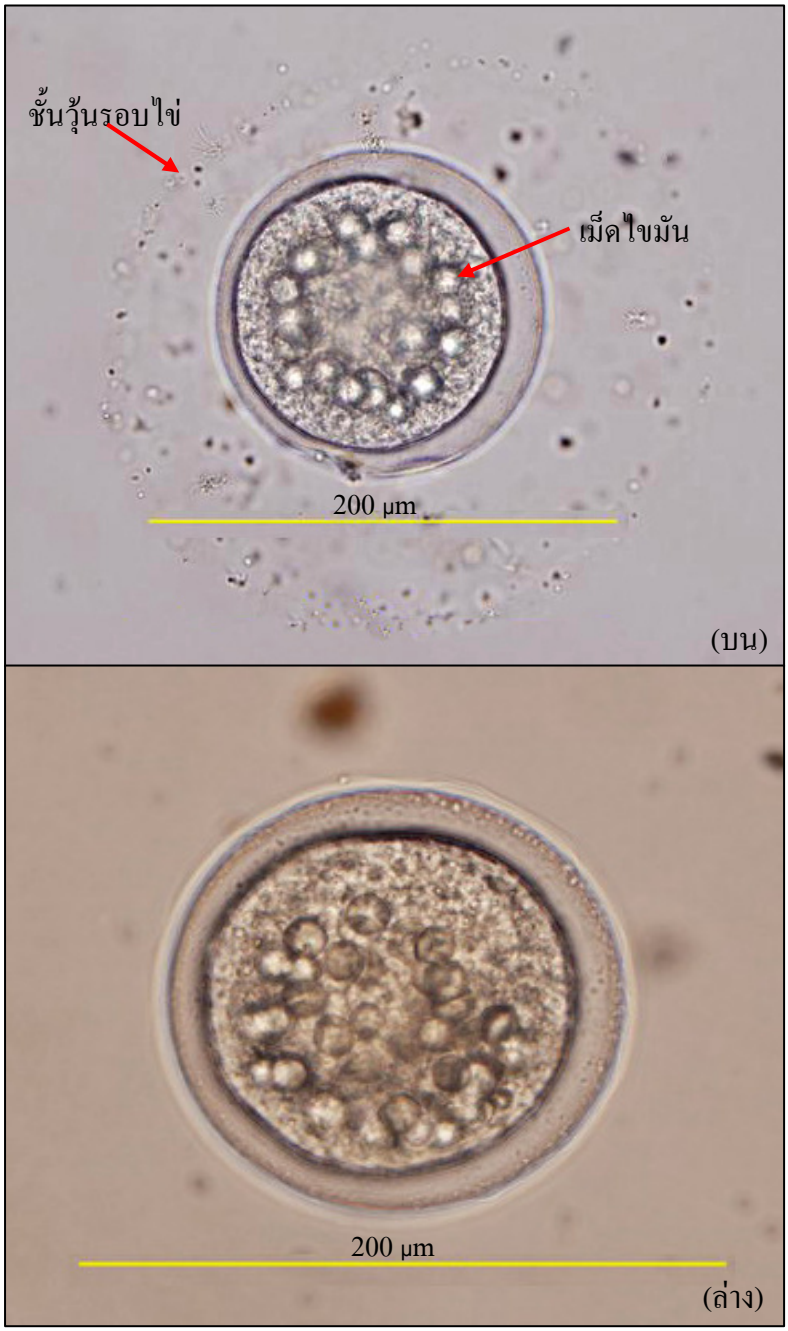
เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 20-23 ชั่วโมง ซีตี้เริ่มงอกออกมาเกือบพร้อมกันทั้ง 2 ปล้อง แต่ละปล้องประกอบด้วย notosetae และ neurosetae ซีตี้ที่เพิ่งงอกออกมาใหม่จะไม่สามารถสังเกตได้ว่าเป็นซีตี้แบบใดเรียกตัวอ่อนระยะนี้ว่า “metatrochophore larvae” (รูปที่ 40 ล่าง) แต่เมื่อซีตี้งอกยาวขึ้นจะสามารถสังเกตได้ว่าซีตี้ทุกอันเป็นแบบ compound setae เรียกตัวอ่อนในระยะนี้ว่า “nectochaete” (รูปที่ 41 บน) ในระยะแรกซีตี้ที่งอกออกมาจะเป็นลักษณะที่งอกแทงออกมาจากลำตัว แต่เมื่อเวลาผ่านไปบริเวณฐานของซีตี้มีลักษณะนูนออกมา และระหว่างฐานของแต่ละปล้องจะมีลักษณะเว้าคอด ซึ่งทำให้เห็นเป็นลักษณะการพัฒนาของพาราโพเดีย ตัวอ่อนในระยะนี้เริ่มมีจุดตาเกิดขึ้น

เมื่อเวลาผ่านไป 22-27 ชั่วโมง ซีตี้ของปล้องที่ 3 เริ่มงอกออกมา ซึ่งมีทั้ง notosetae และ neurosetae (รูปที่ 42 บน) ตัวอ่อนในระยะ nectochaete เริ่มว่ายน้ำช้าลงและจะเริ่มเกาะนิ่งๆ อยู่กับพื้น พาราโพเดียมีขนาดยาวขึ้น และเริ่มมีส่วนที่ยื่นยาวออกมา (แต่ยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็น cirri หรือ lobe) (รูปที่ 43 บน) บริเวณส่วนท้ายของร่างกายมีติ่งที่ยื่นยาวออกมาที่ปลายของติ่งดังกล่าวมีขนเล็กๆงอกอยู่ด้วย ติ่งดังกล่าวนี้น่าจะเป็น anal cirri บริเวณส่วนหัวมีติ่งที่ยื่นออกมาด้านหน้าสุด 2 อัน และด้านข้างอีกด้านละ 1 อัน สันนิษฐานว่าน่าจะพัฒนาไปเป็น antenna และ

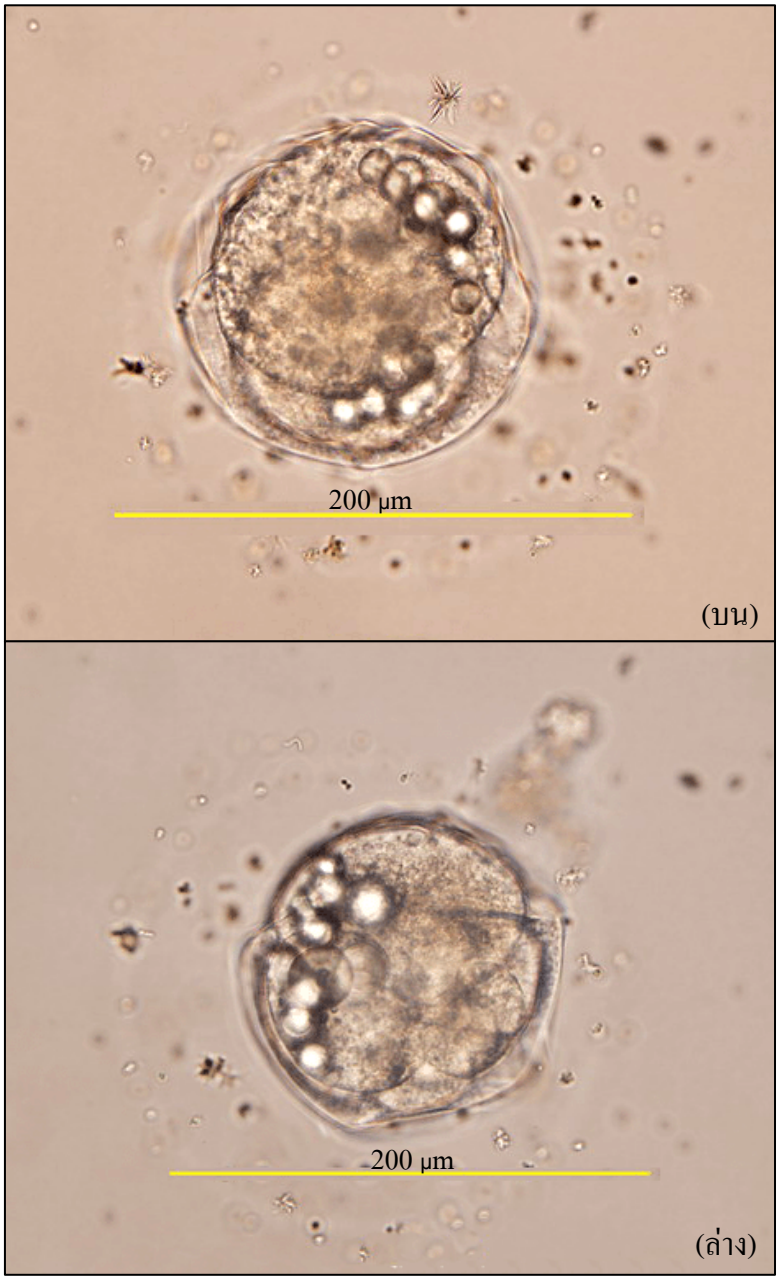
palps ตามลำดับ แต่ไม่สามารถระบุได้ว่ารยางค์อันไหนเป็น antenna และ อันไหนเป็น palps เพราะลักษณะยังไม่ชัดเจน ตัวอ่อนจะมีการพัฒนาที่ช้าลงจากระยะแรกๆ แต่จะเห็นอวัยวะต่างๆ มีความชัดเจนขึ้น ตัวอ่อนจะค่อยๆ ยาวขึ้น จนเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง (รูปที่ 43 ล่าง)

ตารางที่ 1 ระยะพัฒนาการขั้นต้นของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta*

ลักษณะ	ระยะเวลาภายหลังการปฏิสนธิ (ชั่วโมง)
- ไข่มีลักษณะกลมใส มีเม็ดไขมันเม็ดเล็กๆกระจายอยู่ภายในไข่ ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิเริ่มมีชั้นวุ้น (รูปที่ 36 บน)	0:10
- เม็ดไขมันภายในไข่ไปรวมอยู่ด้านใดด้านหนึ่ง (รูปที่ 36 ล่าง)	0:30-0:40
- ไข่เริ่มแบ่งออกเป็น 2 เซลล์ ขนาดของเซลล์ไม่เท่ากัน (รูปที่ 37 บน)	0:50-1:10
- ไข่เริ่มแบ่งออกเป็น 4 เซลล์ (รูปที่ 37 ล่าง)	1:10-1:20
- ไข่เริ่มแบ่งออกเป็น 8 เซลล์ (รูปที่ 38 บน)	1:30-1:40
- ไข่เริ่มแบ่งออกเป็น 16 เซลล์ การแบ่งเซลล์ในระยะนี้จะสังเกตยากมาก	1:50-2:00
- ไข่จะแบ่งเซลล์ต่อไปเรื่อยๆจนเข้าสู่ระยะ morula ซึ่งจะไม่สามารถสังเกตนับจำนวนเซลล์ได้ เริ่มสังเกตเห็นเม็ดไขมันมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่มีจำนวนน้อยลง ในระยะนี้ตัวอ่อนยังคงอยู่ภายในชั้นวุ้น (รูปที่ 38 ล่าง และ 39 บน)	4:30-6:30
- ตัวอ่อนเริ่มมีซีเลียเรียกตัวอ่อนระยะนี้ว่า “early trochophore larvae” (รูปที่ 39 ล่าง)	7:30-8:00
- เข้าสู่ระยะ trochophore larvae ตัวอ่อนออกมาจากชั้นวุ้นแล้ว(รูปที่ 40 บน)	7:30-9:30
- ตัวอ่อนมีปล้อง 2 ปล้อง โดยนับจากจำนวนแถวของซีตี้ ซีตี้ที่เพิ่งงอกออกมาใหม่จะไม่สามารถสังเกตได้ว่าเป็นซีตี้แบบใด เรียกตัวอ่อนระยะนี้ว่า "metatrochophore larvae" (รูปที่ 40 ล่าง)	20:00-23:00
- ตัวอ่อนมีปล้อง 2 ปล้อง แต่ละปล้องมีทั้ง notosetae และ neurosetae ซีตี้ทุกอันเป็น compound setae เรียกตัวอ่อนระยะนี้ว่า “nectochaete” (รูปที่ 41 บน และ ล่าง)	21:00-24:00
- ตัวอ่อนมี 3 ปล้อง ปล้องที่ 3 มีทั้ง notosetae และ neurosetae ซีตี้ทุกอันเป็น compound setae (รูปที่ 42 บน และ ล่าง)	22:00-27:00
- เริ่มมีติ่งที่บริเวณ pygidium 2 อัน ที่ฐานของพาราโพเดีย มีส่วนที่ยื่นออกมาสันนิษฐานว่าน่าจะเป็น cirri หรือ lobe (รูปที่ 43 บน)	30:00-33:00
- ตัวอ่อนมี 3 ปล้องมีตา 1 คู่ บริเวณส่วนหัวน่าจะมี antenna และ palps แต่ไม่สามารถระบุได้ มี lobe หรือ cirri ที่ฐานของพาราโพเดีย (รูปที่ 43 ล่าง)	48:00



รูปที่ 36 ไข่ของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* กำลังขยาย 40 เท่า: ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิสามารถสังเกตเห็นชั้นวุ้นล้อมรอบไข่ เม็ดไขมันขนาดเล็กกระจายอยู่ภายในไข่ (บน); 30-40 นาที เม็ดไขมันไปรวมตัวอยู่ด้านหนึ่ง (ล่าง)

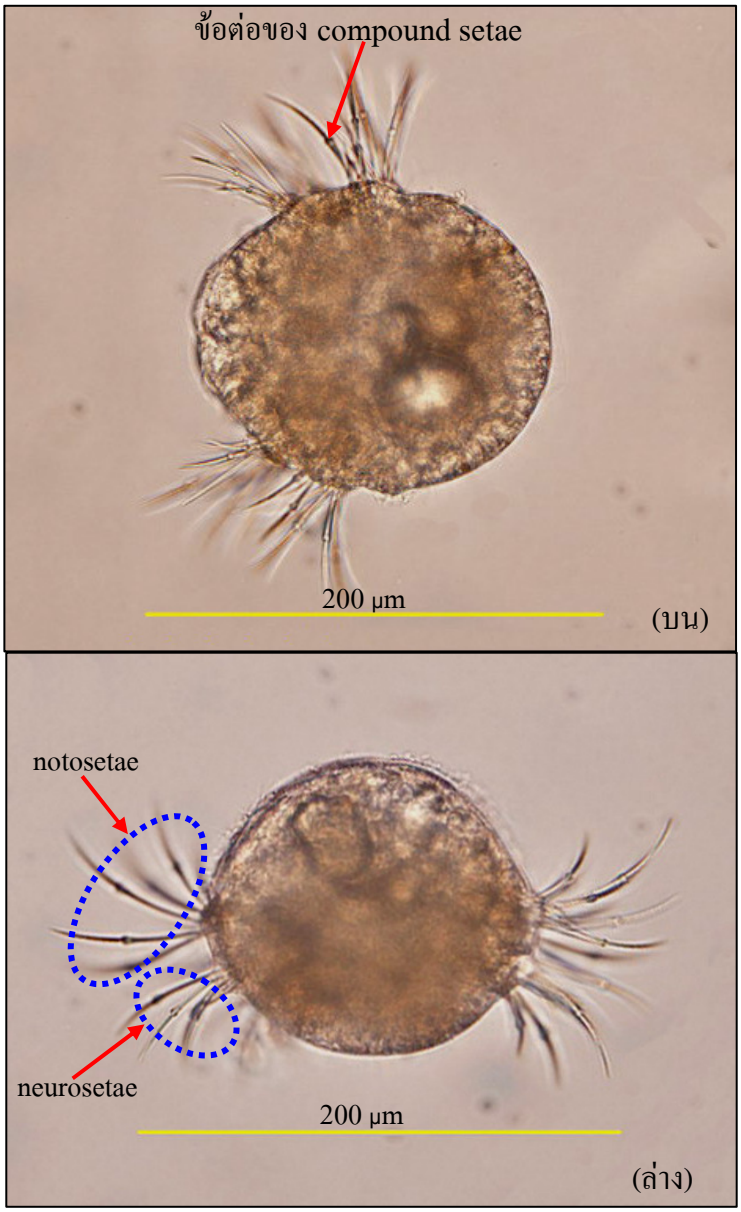


รูปที่ 37 การแบ่งเซลล์ของไข่ของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta*: ไข่แบ่งออกเป็น 2 เซลล์ มีขนาดไม่เท่ากัน (50 นาที) (บน); ไข่แบ่งออกเป็น 4 เซลล์ (1 ชั่วโมง 10 นาที) (ล่าง)

รูปที่ 38 การแบ่งเซลล์ของไข่ของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta*: ไข่แบ่งออกเป็น 8 เซลล์ (1 ชั่วโมง 20 นาที) (บน); ไข่มีการแบ่งเซลล์จนไม่สามารถนับจำนวนเซลล์ได้ (4 ชั่วโมง 30 นาที) เม็ดไขมันมีจำนวนน้อยลงแต่มีขนาดใหญ่ขึ้น (ศรชี้) (ล่าง)

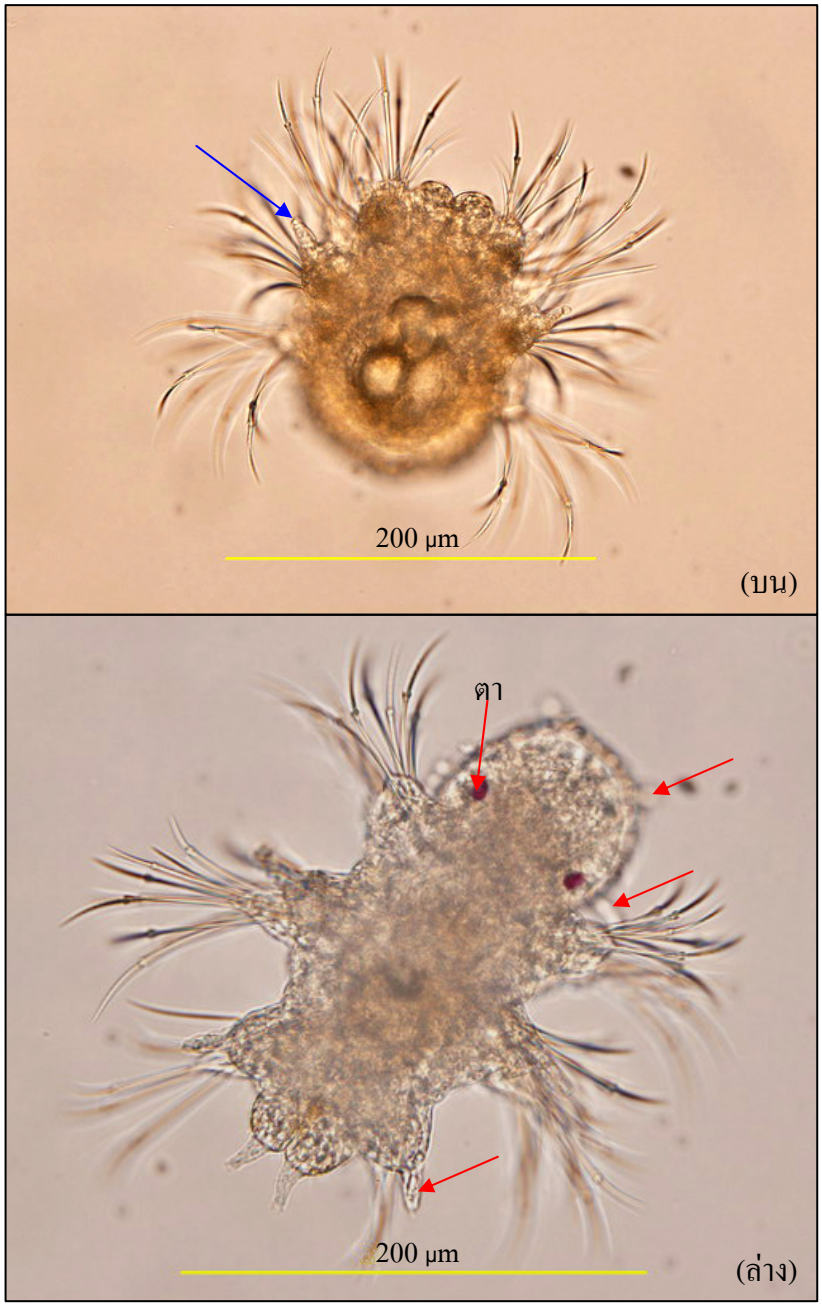
รูปที่ 39 พัฒนาการของตัวอ่อนของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta*: ตัวอ่อนพัฒนาจนเข้าสู่ระยะ morula (6 ชั่วโมง) (บน); ตัวอ่อนระยะ early trochophore larvae ตัวอ่อนเริ่มมีซีเลียงอกออกมา (ศรชี้) ตัวอ่อนระยะนี้ยังพัฒนาอยู่ภายในชั้นวุ้น (7 ชั่วโมง 30 นาที) (ล่าง)

รูปที่ 40 พัฒนาการของตัวอ่อนของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta*: ตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะ trochophore ตัวอ่อนออกจากชั้นวุ้นแล้ว มีซีเลีย 2 แถว (ศรชี้) ทั้ง prototroch และ telotroch เพื่อช่วยในการว่ายน้ำ (20 ชั่วโมง) (บน); ตัวอ่อนระยะ metatrochophore larvae ตัวอ่อนเริ่มมีซีตี้งอกออกมาทั้ง 2 ปล้อง (ศรชี้) (23 ชั่วโมง) (ล่าง)



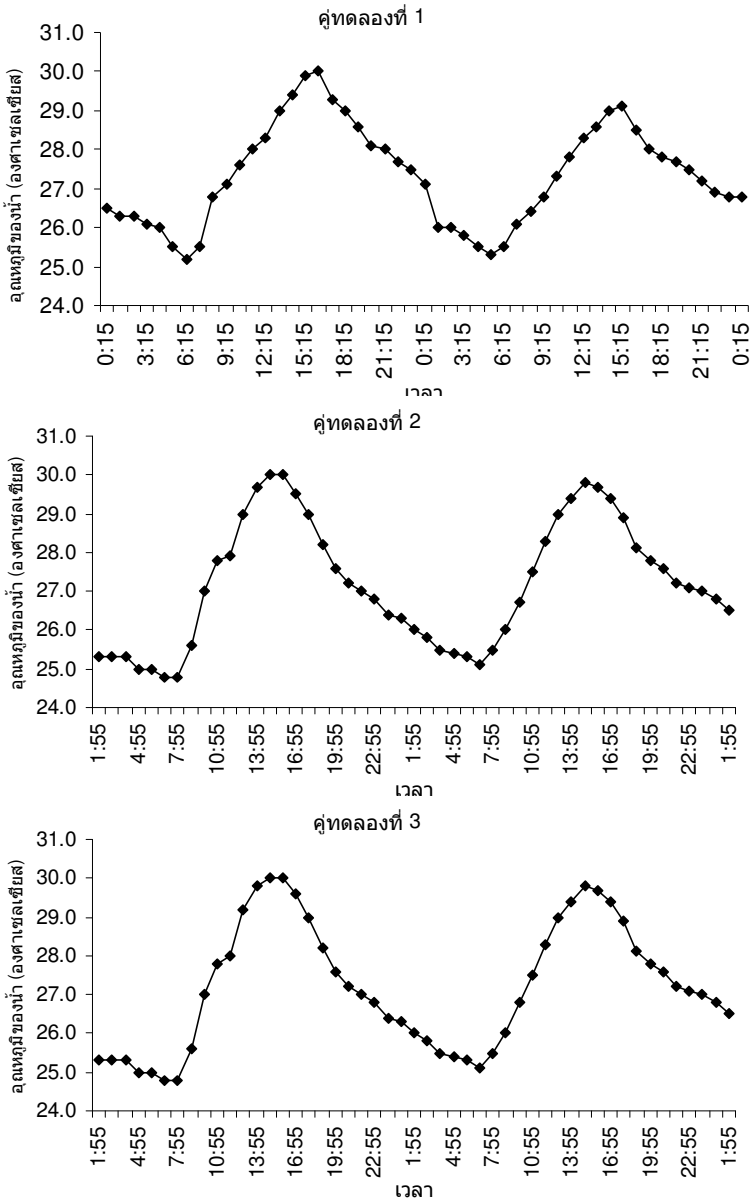
รูปที่ 41 พัฒนาการของตัวอ่อนของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta*: ตัวอ่อนระยะ nectochaete มีปล้อง 2 ปล้อง ซีตี้ทุกอันเป็น compound setae (ศรชี้) มีเม็ดไขมันขนาดใหญ่อยู่ภายใน (25 ชั่วโมง) (บน); ภาพถ่ายจากด้านท้ายของลำตัว แสดงให้เห็นว่าตัวอ่อนมีทั้ง notosetae และ neurosetae (ศรชี้) (ล่าง)

รูปที่ 42 พัฒนาการของตัวอ่อนของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta*: ตัวอ่อนเริ่มมีซีตี้ของปล้องที่ 3 งอกออกมา สามารถสังเกตเห็นตาของตัวอ่อน ตัวอ่อนระยะนี้ยังคงมีซีเลียอยู่ (ศรชี้) (26 ชั่วโมง) (บน); ตัวอ่อนมีปล้องที่ 3 งอกออกมายาวมากขึ้น เริ่มเห็นพาราโพเดียชัดขึ้น ซีตี้ทุกอันเป็น compound setae (28 ชั่วโมง) (ล่าง)



รูปที่ 43 พัฒนาการของตัวอ่อนของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* : ที่บริเวณฐานของพาราโพเดีย มีส่วนที่ยื่นออกมาสันนิษฐานว่าน่าจะเป็น cirri หรือ lobe (ศรชี้) (32 ชั่วโมง) (บน); ตัวอ่อนระยะ nectochaete ที่มีปล้อง 3 ปล้อง มีตา 1 คู่ บริเวณส่วนหัวน่าจะมี antenna และ palps แต่ไม่สามารถระบุได้ มี lobe หรือ cirri ที่ฐานของพาราโพเดีย (48 ชั่วโมง) (ล่าง) (อวัยวะต่างๆ ยังไม่สามารถระบุได้แน่ชัดดูรายละเอียดหน้า 58 และ 59)

ในระหว่างการทดลองที่ 2 นี้ได้มีการตรวจวัดอุณหภูมิน้ำ 49 ครั้ง โดยเก็บทุกๆ 1 ชั่วโมงพบว่า ทิศทางการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิในรอบวันเป็นไปในทิศทางเดียวกันทั้ง 3 คู่ทดลอง (รูปที่ 44) ถึงแม้ว่าเวลาการทดลองแตกต่างกันทำให้อุณหภูมิเริ่มต้นในการทดลองแตกต่างกันก็ตาม โดยมีอุณหภูมิของน้ำอยู่ในช่วง 25.2-30.0, 24.8-30.0 และ 24.8-30.0 องศาเซลเซียส ของคู่ทดลองที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ



รูปที่ 44 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำในรอบวันของการทดลองที่ 2 ทั้ง 3 คู่ทดลอง ทำการวัดอุณหภูมิทั้งหมด 49 ครั้ง ทุกๆ 1 ชั่วโมง

จากผลการศึกษาพัฒนาการขั้นต้นของ *N. glandicincta* พบว่า การเข้าสู่ระยะต่างๆ ของตัวอ่อนของ *N. glandicincta* ในแต่ละคู่ทดลองมีความแตกต่างกัน เช่นการเข้าสู่ระยะเดียวกันอาจใช้เวลาต่างกันตั้งแต่ 10 นาที จนถึง 5 ชั่วโมง ซึ่งสาเหตุดังกล่าวน่าจะเกิดมาจากอุณหภูมิของน้ำ ถึงแม้ว่าทิศทางการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำในรอบวันจะมีทิศทางเหมือนกันทั้ง 3 คู่ทดลอง แต่ก็มีความแตกต่างกันบ้างเล็กน้อยซึ่งทำให้การพัฒนาเข้าสู่ระยะต่างๆ มีเวลาแตกต่างกัน ดังเช่นการศึกษาของ Fidalgo e Costa (1999) ในไส้เดือนทะเลชนิด *N. diversicolor* พบว่าการเจริญเติบโตของไส้เดือนทะเลที่ทดลองเลี้ยงมีอัตราการเจริญเติบโตเร็วกว่า (มีจำนวนปล้อง 18 ปล้อง ภายใน 2 สัปดาห์) ไส้เดือนทะเลชนิดเดียวกัน ที่ทำการทดลองโดย Dales ในปี ค.ศ.1950 (มีจำนวนปล้อง 3 ปล้อง ภายใน 2 สัปดาห์) เนื่องจากอุณหภูมิเฉลี่ยในการทดลองของ Fidalgo e Costa สูงกว่าอุณหภูมิเฉลี่ยในการทดลองของ Dales เกือบ 2 เท่า Olive และคณะ (1997) กล่าวว่า อุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมมีบทบาทที่สำคัญ 2 ประการคือ ก่อให้เกิดพลังงานที่เป็นปัจจัยในการกำหนดอายุที่จะเข้าสู่ระยะที่พร้อมจะผสมพันธุ์ และเป็นปัจจัยที่ทำงานร่วมกับระยะเวลาที่ได้รับแสงในการควบคุมกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมจึงเป็นปัจจัยสำคัญในการกำหนดช่วงฤดูกาลต่างๆ ในวงจรชีวิตของไส้เดือนทะเลชนิดนั้นๆ ไส้เดือนทะเลแต่ละชนิดต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมแตกต่างกันไป Hardege และ Bartels-Hardege (1995) ทำการศึกษาไส้เดือนทะเลชนิด *P. nuntia var. brevicirrus* พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการฟักของตัวอ่อนซึ่งพัฒนาอยู่ภายใน egg capsules โดยอุณหภูมิที่ต่ำกว่าจะทำให้การฟักออกมาเป็นตัวอ่อนระยะ nectochaete ช้าลง เพราะฉะนั้นจากการทดลองในครั้งนี้ถึงแม้ว่าการพัฒนาเข้าสู่ระยะต่างๆ ของไส้เดือนทะเลที่ทำการทดลองแต่ละคู่มีความแตกต่างกันบ้าง แต่ก็ไม่มากนักเนื่องจากอุณหภูมิของน้ำที่ใช้อนุบาลตัวอ่อนในแต่ละคู่ทดลองนั้นมีแนวโน้มของการเปลี่ยนอุณหภูมิในรอบวันไปในทิศทางเดียวกัน

การทดลองที่ 3 ศึกษาผลของวิธีการคนไข่ ต่ออัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมง ของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* โดยวิธีการวางภาชนะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า วิธีการคนด้วยมือ และวิธีการวางเลี้ยงโดยให้อากาศอย่างเดียวโดยไม่มีการคนไข่ แต่ละวิธีแบ่งออกเป็น 4 ซ้ำ ทำการทดลองทั้งหมด 3 ครั้ง ใช้พ่อแม่พันธุ์ครั้งละ 1 คู่ แต่ละวิธีโดยเลือกวิธีการเพาะพันธุ์โดยวิธีตามธรรมชาติ ในการทดลองที่ 3 ใช้น้ำทะเลที่มีค่าความเค็มเท่ากับ 10 ส่วนในพันส่วน ซึ่งเท่ากับค่าความเค็มของน้ำในบ่อเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในขณะนั้น

จากการวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ค่าเฉลี่ย (n=12) พบว่าการวางภาชนะเลี้ยงบนเครื่องเขย่ามีอัตรารอดเฉลี่ย (12.11±13.96 เปอร์เซ็นต์) มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) กับการวางเลี้ยงโดยวิธีการคนด้วยมือ (50.19±18.90 เปอร์เซ็นต์) และการวางเลี้ยงโดยให้อากาศอย่างเดียว (43.15±18.12 เปอร์เซ็นต์) ส่วนการวางเลี้ยงโดยวิธีการคนด้วยมือ และวิธีการวางเลี้ยงโดยให้อากาศอย่างเดียวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) (ตารางที่ 2) (ตารางภาคผนวกที่ 2, 3 และ4)

ตารางที่ 2 ผลของวิธีการคนไข่ ต่ออัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ที่เวลา 48 ชั่วโมงของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* (ค่าเฉลี่ย±SD, n=12)

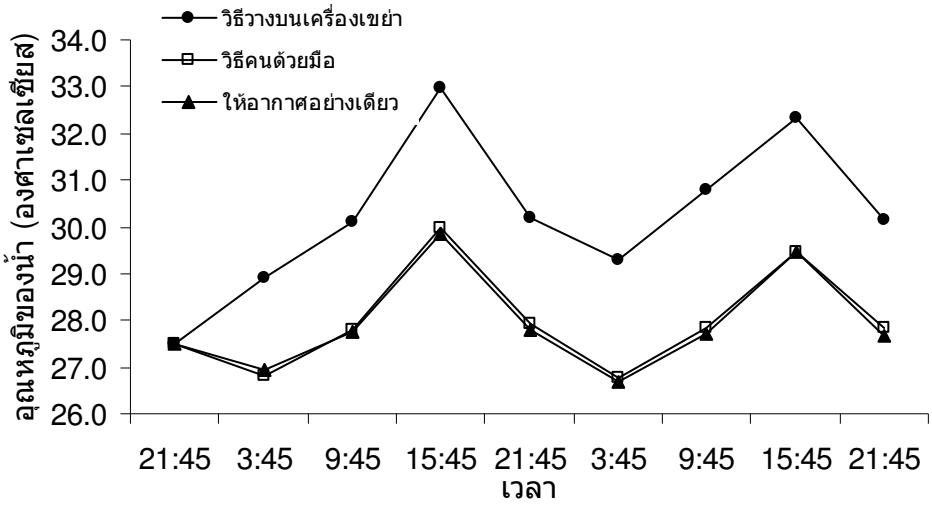
ชุดการทดลอง	อัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete (%)
วิธีการวางภาชนะเลี้ยงบนเครื่องเขย่า	12.11±13.96[a]
วิธีการคนด้วยมือ	50.19±18.90[b]
ให้อากาศอย่างเดียว	43.15±18.12[b]

ในระหว่างการทดลองที่ 3 ได้มีการวัดอุณหภูมิน้ำของทุกคู่ทดลองโดยวัดทุก 6 ชั่วโมงพบว่า

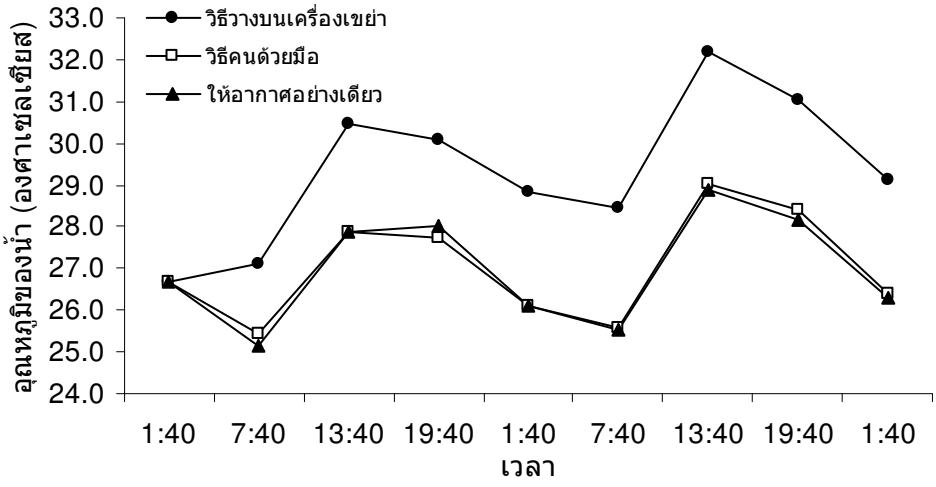
คู่ทดลองที่ 1 อุณหภูมิของน้ำในภาชนะที่วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (27.5-33.0 องศาเซลเซียส) สูงกว่าในภาชนะที่เลี้ยงโดยวิธีการคนด้วยมือ (26.8-30.0 องศาเซลเซียส) และ ภาชนะที่วางเลี้ยงโดยให้อากาศอย่างเดียวโดยไม่มีการคนไข่ (26.7-29.9 องศาเซลเซียส) (รูปที่ 45)

คู่ทดลองที่ 2 อุณหภูมิของน้ำในภาชนะที่วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (26.7-32.2 องศาเซลเซียส) สูงกว่าในภาชนะที่เลี้ยงโดยวิธีการคนด้วยมือ (25.5-29.0 องศาเซลเซียส) และ ภาชนะที่วางเลี้ยงโดยให้อากาศอย่างเดียวโดยไม่มีการคนไข่ (25.2-28.9 องศาเซลเซียส) (รูปที่ 46)

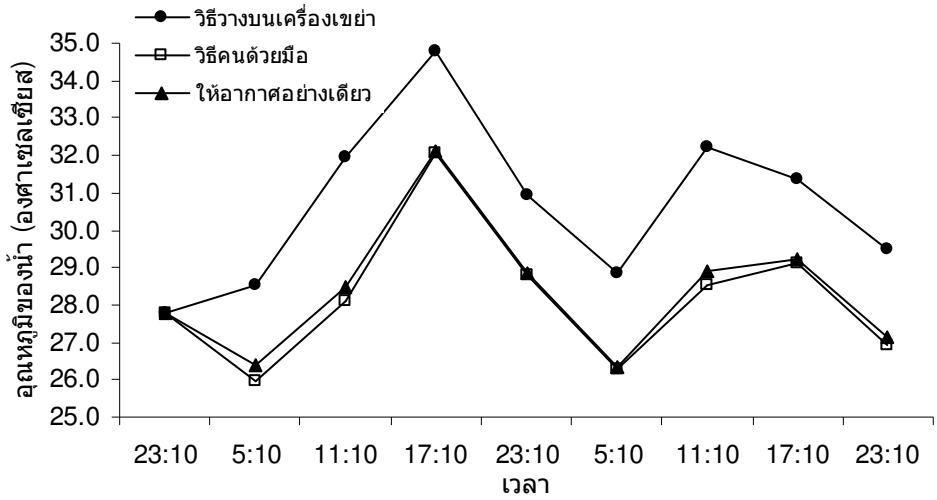
คู่ทดลองที่ 3 อุณหภูมิของน้ำในภาชนะที่วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่า (27.8-34.8 องศาเซลเซียส) สูงกว่าในภาชนะที่เลี้ยงโดยวิธีการคนด้วยมือ (26.0-32.1 องศาเซลเซียส) และ ภาชนะที่วางเลี้ยงโดยให้อากาศอย่างเดียวโดยไม่มีการคนไข่ (26.4-32.1 องศาเซลเซียส) (รูปที่ 47)



รูปที่ 45 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำระหว่างการทดลองที่ 3 ในไส้เดือนทะเลคู่ที่ 1



รูปที่ 46 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำระหว่างการทดลองที่ 3 ในไส้เดือนทะเลคู่ที่ 2



รูปที่ 47 การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิของน้ำระหว่างการทดลองที่ 3 ในไส้เดือนทะเลคู่ที่ 3

จะเห็นได้ว่าถึงแม้อุณหภูมิของน้ำในภาชนะที่วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าทุกคู่การทดลองจะมีทิศทางการขึ้นลงของอุณหภูมิในรอบวันเป็นไปในทิศทางเดียวกันกับวิธีการคนด้วยมือและการวางเลี้ยงโดยให้อากาศอย่างเดียว แต่อุณหภูมิของน้ำในภาชนะที่วางเลี้ยงบนเครื่องเขย่าก็มีแนวโน้มที่สูงกว่ามากตั้งแต่ช่วงแรกจนตลอดการทดลองจึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายของตัวอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้คือ อัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ของตัวอ่อนที่เลี้ยงบนเครื่องเขย่า ต่ำกว่าอัตรารอดของตัวอ่อนที่เลี้ยงโดยวิธีการคนด้วยมือ และเลี้ยงโดยให้อากาศอย่างเดียวโดยไม่มีการคนไข่ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

ในการทดลองครั้งนี้ถึงแม้ไม่ได้วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอุณหภูมิและอัตรารอดเนื่องจากไม่ได้วางแผนการวิเคราะห์ตั้งแต่ต้น แต่ก็แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีแนวโน้มที่มีอิทธิพลต่ออัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ของไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* เนื่องจากอุณหภูมิเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลอย่างยิ่งสำหรับไส้เดือนทะเล ไส้เดือนทะเลแต่ละชนิดต้องการอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกระบวนการสืบพันธุ์ต่างกัน Akesson (1970) อ้างโดย ปิยะพงค์ โชติพันธุ์ และ อนงค์ สวรรยาธิปัตย์ (2528) ทำการทดลองเลี้ยงตัวอ่อนของไส้เดือนทะเลชนิด *Ophryotrocha labronica* พบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการพัฒนาของไข่ โดยไข่จะมีการพัฒนาได้ดีที่สุดในน้ำที่มีอุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิน้ำ 28 องศาเซลเซียสตัวอ่อนจะมีการตายสูงในช่วงแรกๆ แต่หลังจากนั้นจะมีการเจริญเติบโตดี ไข่จะไม่พัฒนาที่อุณหภูมิน้ำ 30 องศาเซลเซียสและที่ 32 องศาเซลเซียสทั้งตัวอ่อนและตัวเต็มวัยจะตายภายใน 1 สัปดาห์ ความต้องการที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับลักษณะของที่อยู่อาศัยด้วย เช่นไส้เดือนทะเลในเขตหนาวต้องการอุณหภูมิที่ต่ำกว่าเพื่อความเหมาะสมต่อกระบวนการสืบพันธุ์ ดังเช่นรายงานของ Lewis และคณะ (2003) อ้างโดย

Ushakova และ Sarantchova (2004) กล่าวว่าการปฏิสนธิของไส้เดือนทะเลชนิด *N. virens* จากบริเวณตอนเหนือของประเทศ Ireland จะสามารถเกิดขึ้นได้เริ่มที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และจะเพิ่มขึ้นสูงสุดที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส และจะลดลงอีกครั้งที่อุณหภูมิ 22 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับรายงานของ Yokoyama (1988) ซึ่งกล่าวว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยจำกัดการแพร่กระจายของไส้เดือนทะเลชนิด *Paraprionospio* sp. (form A) และมีผลอย่างมากต่ออัตรารอด อัตราการกินอาหาร และอัตราการเจริญเติบโต ของไส้เดือนทะเลชนิดดังกล่าว เพราะฉะนั้นอุณหภูมิที่สูงเกินไป ซึ่งเกิดจากความร้อนของเครื่องเขย่า อาจเป็นสาเหตุการตายของตัวอ่อนไส้เดือนทะเลที่ทดลอง

ในการวางภาชนะเลี้ยงบนเครื่องเขย่าอาจมีปัจจัยที่ทำให้เกิดการตายของตัวอ่อนมากกว่าหนึ่งปัจจัย ได้แก่แรงสั่นสะเทือนจากการเขย่า และอุณหภูมิที่สูงขึ้นอันเกิดมาจากการเขย่า แต่ปัจจัยที่เกิดจากแรงสั่นสะเทือนนั้นไม่สามารถทดสอบได้ และจากการตรวจสอบเอกสารก็ไม่พบข้อมูลที่ศึกษาในเรื่องดังกล่าว จึงสันนิษฐานว่าปัจจัยที่เกิดจากอุณหภูมิที่สูงขึ้นน่าจะมีความเป็นไปได้มากกว่าเนื่องจากเหตุผลที่กล่าวมาข้างต้น แต่ปัจจัยที่เกิดจากแรงสั่นสะเทือนก็ไม่สามารถมองข้ามไปได้

จากการทดลองทั้ง 3 การทดลองในครั้งนี้ทำให้เกิดเป็นแนวทางในการผลิตไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* ได้ แต่ควรมีการศึกษาปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเลี้ยงเพิ่มเติม เช่นการศึกษาอุณหภูมิ และความเค็มที่เหมาะสม ถึงแม้ว่าการทดลองครั้งนี้จะมีการควบคุมความเค็มอยู่ในระดับที่เท่ากับความเค็มในบ่อพ่อแม่พันธุ์ขณะนั้นก็ตาม แต่การทดลองศึกษาระดับความเค็มที่เหมาะสมก็มีความจำเป็นเช่นกัน เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ *N. glandicincta* ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ได้เก็บตัวอย่างมาจากทะเลสาบสงขลาตอนล่าง ซึ่งเป็นระบบนิเวศที่มีความเค็มของน้ำในรอบปีค่อนข้างแปรผันมาก (0-30 psu) (Angsupanich and Rakkheaw, 1997) แต่ที่ผ่านมาการศึกษาเกี่ยวกับ *N. glandicincta* ในทะเลสาบสงขลาโดยเฉพาะอย่างยิ่งการศึกษาอิทธิพลของสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อปริมาณและความชุกชุมของ *N. glandicincta* ในรอบปียังไม่เคยมีการศึกษา เพราะฉะนั้นจึงไม่มีข้อมูลปัจจัยสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตในธรรมชาติของ *N. glandicincta* ถึงแม้ว่าการเก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ *N. glandicincta* เพื่อใช้ในการทดลองครั้งนี้สามารถเก็บตัวอย่างได้ตลอดทั้งปี ในสภาพแวดล้อมที่ต่างกันมาก ทั้งฤดูแล้งที่ปริมาตรน้ำในทะเลสาบลดต่ำลงมากและน้ำในทะเลสาบมีความเค็มสูง และฤดูกาลที่มีฝนตกหนักจนทำให้ปริมาตรน้ำในทะเลสาบสงขลาสูงขึ้นมากและทำให้ความเค็มน้ำลดลงจนกลายเป็นน้ำจืดสนิท ก็พบว่าสามารถเก็บตัวอย่างพ่อแม่พันธุ์ได้ทุกครั้ง ซึ่งพ่อแม่พันธุ์ที่เก็บมาได้แต่ละครั้งอาจมีความสมบูรณ์ที่ต่างกัน แต่ก็ยังสามารถทนอยู่ในสภาพแวดล้อมดังกล่าวและสามารถเลี้ยงให้มีการผสมพันธุ์วางไข่ได้ แต่เมื่อความสมบูรณ์ของพ่อแม่พันธุ์มีความแตกต่างกัน ก็อาจส่งผลไปยังอัตราการ

ปฏิสนธิ อัตราการฟัก และอัตราการรอดจนเข้าสู่ระยะ nectochaete ของตัวอ่อนได้ ดังนั้นความเค็มก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อความสมบูรณ์ของพ่อแม่พันธุ์เช่นกัน (Tosuji and Sato, 2006) เพราะจะทำให้สามารถทำการเพาะเลี้ยงไส้เดือนทะเลชนิด *N. glandicincta* ได้อย่างครบวงจรต่อไป

ในการนำไส้เดือนทะเลมาใช้ประโยชน์นอกจากต้องศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงแล้ว การศึกษาคุณสมบัติของไส้เดือนทะเลชนิดที่ต้องการนำมาเพาะเลี้ยงก็เป็นส่วนสำคัญยิ่ง ตัวอย่างเช่น การศึกษาองค์ประกอบของไขมันในตัวของไส้เดือนทะเลเพื่อจะได้ทราบว่าไส้เดือนทะเลชนิดที่ต้องการนำมาเพาะเลี้ยงนั้นมีคุณสมบัติเหมาะสมที่จะนำไปใช้ประโยชน์หรือไม่มากน้อยเพียงใด ซึ่งผลจากการศึกษาดังกล่าวอาจทำต่อเนื่อง หรือทำควบคู่ไปกับการศึกษาด้านอาหารที่นำมาใช้เลี้ยง ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการนำไส้เดือนทะเลที่เลี้ยงมาใช้ประโยชน์ Graeve และคณะ (1997) กล่าวว่าองค์ประกอบของกรดไขมันในสัตว์หน้าดินจะได้รับอิทธิพลมาจากกรดไขมันในอาหารที่มันกิน ดังเช่นการทดลองของ Fidalgo e costa และคณะ (1998) ซึ่งพบว่าในไส้เดือนทะเลชนิด *Hediste diversicolor* (O.F. Muller, 1776) ที่มีการให้อาหารที่มีปริมาณ total lipids DHA และ EPA เป็นผลให้มีปริมาณของไขมันในไส้เดือนทะเลระยะวัยรุ่นสูง Hylland และคณะ (1996) ทดลองวัดอัตราการเจริญเติบโตของไส้เดือนทะเลชนิด *N.* (*Hediste*) *diversicolor* ที่ทดลองเลี้ยงในสภาพที่ได้รับปริมาณสารอินทรีย์ที่แตกต่างกัน พบว่าไส้เดือนทะเลที่ได้รับปริมาณสารอินทรีย์ที่สมบูรณ์จะมีการเจริญเติบโตที่ดีกว่าไส้เดือนทะเลในกลุ่มทดลองที่ไม่ได้รับปริมาณสารอินทรีย์ที่เพียงพอ จากการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าปริมาณของอาหารเป็นปัจจัยหลักที่สำคัญต่อปริมาณผลผลิตของไส้เดือนทะเล Olive และคณะ (1997) กล่าวว่าอิทธิพลจากอาหารและสารอาหารจะส่งผลต่ออายุของไส้เดือนทะเลที่พร้อมจะผสมพันธุ์ ในไส้เดือนทะเลชนิด *N. virens* Sars

การทดลองครั้งนี้ถือว่าประสบความสำเร็จในระดับหนึ่งตามวัตถุประสงค์ของการศึกษา คือสามารถเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ *N. glandicincta* ที่เก็บมาจากธรรมชาติให้เจริญเติบโต และพัฒนาจนสามารถผสมพันธุ์วางไข่ได้ และสามารถหาเทคนิควิธีการในการผสมพันธุ์ *N. glandicincta* และอนุบาลตัวอ่อนที่ได้จนสามารถพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะ nectochaete ซึ่งมีแนวโน้มที่จะนำไปเลี้ยงให้โตเต็มวัยได้หากมีการศึกษาเพื่อค้นหาปัจจัยที่เหมาะสมต่อไป ในประเทศไทยมีไส้เดือนทะเลมากมายหลายชนิด การวิจัยเพื่อทดลองศึกษาการเพาะเลี้ยงไส้เดือนทะเลชนิดที่มีความเหมาะสมเพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ เช่น เป็นอาหารสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งพ่อแม่พันธุ์กุ้งทะเล หรือสัตว์น้ำเศรษฐกิจอื่นๆ และการผลิตไส้เดือนทะเลเพื่อจำหน่ายเป็นเหยื่อตกปลาซึ่งเป็นที่นิยมมากในตลาดต่างประเทศจึงเป็นสิ่งที่ควรกระทำอย่างเร่งด่วน นอกจากนั้นการเพาะเลี้ยงไส้เดือนทะเลเพื่อผลิตตัวอ่อนมาใช้เป็นอาหารเพื่ออนุบาลสัตว์น้ำเศรษฐกิจวัยอ่อนอื่นๆ อาจจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในอนาคต