รายงานการวิจัย

ชื่อเรื่อง พัฒนาการของคัพภะปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*)
โดยใช้เทคนิคเนื้อเยื่อวิทยา

Development of Nieuhofii Catfish
(*Clarias nieuhofii*) Embryos using Histological Techniques

ชื่อผู้วิจัย
วันวิภา หนูมา

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
พ.ศ. 2557

ชื่องานวิจัย พัฒนาการของคัพภะปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*) โดยใช้เทคนิคเนื้อเยื่อวิทยา
ผู้วิจัย นางสาววันวิภา หนูมา
คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
ปี 2560

บทคัดย่อ

จากการศึกษาคัพภะของปลาดุกลำพันโดยเมื่อไข่ได้รับการผสมจากเชื้อเพศผู้ ปรับอุณหภูมิให้มีค่าในช่วง 26-28 องศาเซลเซียส สุ่มตัวอย่างไข่ปลาดุกลำพันจากบ่อฟักไข่ตั้งแต่ปฏิสนธิจนถึงหลังฟักออกจากไข่ จำนวน 40 ตัวอย่าง/ครั้ง เพื่อตรวจสอบพัฒนาของเนื้อเยื่อตามระยะเวลาต่างๆ โดยบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพ พบว่าลักษณะไข่เป็นชนิดไข่จมแบบติด (Adhesive dermersal egg) มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์แบบ Meroblastic Cleavage และใช้เวลาตั้งแต่ปฏิสนธิจนฟักเป็นตัวประมาณ 36 ชั่วโมง โดยมีการเจริญและพัฒนาเป็นขั้นต่างๆ ดังนี้ เข้าสู่ระยะ Cleavage เมื่อเวลา 5 นาที - 8 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไป 7 - 9 ชั่วโมง พัฒนาเข้าสู่ระยะ Morular เมื่อเวลาผ่านไป 10 - 11 ชั่วโมง พัฒนาเข้าสู่ระยะ Blastula เมื่อเวลาผ่านไป 15-16 ชั่วโมง พัฒนาเข้าสู่ระยะ Gastrula Stage เมื่อเวลาผ่านไป 17 - 20 ชั่วโมง เข้าสู่ระยะลำตัวเริ่มเกิดปล้อง (Body Segment Appearance Stage) เมื่อเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง ลูกปลาฟักออกจากไข่ และหลังจากฟักออกจากไข่ มีการเปลี่ยนแปลงของลูกปลา ดังนี้ หลังฟัก 6 ชั่วโมง ปากยังไม่เปิดมีเนื้อเยื่อบางๆ เชื่อมติดกัน พบเนื้อเยื่อสมองเจริญอยู่ด้านบนส่วนหัวแยกออกเป็น 2 ส่วน เมื่อเวลาผ่านไปหลังจากฟัก 12 ชั่วโมง พบ Notochord และมัดกล้ามเนื้อจำนวนหลายมัด เมื่อเวลาผ่านไปหลังจากฟัก 24 ชั่วโมง ปากเริ่มเปิด ท่อทางเดินอาหารเป็นท่อตรง ไม่แบ่งเป็นส่วน ๆ พบโครงสร้างของเหงือก เมื่อเวลาผ่านไปหลังจากฟัก 3 วัน เหงือกมีการแตกแขนงของกิ่งเหงือก ทางเดินอาหารพัฒนาแบ่งเป็นอวัยวะในระบบทางเดินอาหาร มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อไต และเมื่อเวลาผ่านไปหลังจากฟัก 7 และ 15 วัน มีพัฒนาการของอวัยวะสมบูรณ์ ถุงไข่แดงสลายหลังจากฟัก 7 วัน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจาก งบประมาณกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ประจำปี พ.ศ. 2557

นางสาววันวิภา หนูมา
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มิถุนายน 2559

สารบัญ

		หน้า
บทคัดย่อ		ก
กิตติกรรมประกาศ		ข
สารบัญ		ค
สารบัญภาพ		ง
บทที่ 1	**บทนำ**	**1**
	ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	1
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
	ขอบเขตการวิจัย	2
	นิยามศัพท์เฉพาะ	2
บทที่ 2	**ทฤษฎี**	**3**
	ปลาดุกลำพัน	3
	เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยากับการศึกษาคัพภะ	3
บทที่ 3	**การทดลอง**	**7**
	กลุ่มตัวอย่าง	7
	วัสดุอุปกรณ์	7
	สารเคมี	7
	การดำเนินการวิจัย	7
บทที่ 4	**ผลการทดลองและวิจารณ์ผล**	**11**
	ผลการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของคัพภะปลาดุกลำพัน	11
	วิจารณ์ผล	17
บทที่ 5	**สรุปและข้อเสนอแนะ**	21
	เอกสารอ้างอิง	22
	ภาคผนวก	26
	ประวัติผู้วิจัย	27

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1	พัฒนาการของคัพภะปลาดุกลำพันตั้งแต่ปฏิสนธิจนฟักออกจากไข่	12
2	ลูกปลาหลังฟัก 6 ชั่วโมง	13
3	ลูกปลาหลังฟัก 12 ชั่วโมง	14
4	ลูกปลาหลังฟัก 18 ชั่วโมง	14
5	ลูกปลาหลังฟัก 24 ชั่วโมง	15
6	ลูกปลาหลังฟัก 3 วัน	15
7	ลูกปลาหลังฟัก 7 วัน	16
8	ลูกปลาหลังฟัก 15 วัน	17

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*) เป็นปลาน้ำจืดชนิดหนึ่งที่อาศัยเฉพาะถิ่น นิยมนำมาบริโภคเนื่องจากมีรสชาติดีกว่าปลาดุกทั่วไปและจากการสำรวจพบว่าปลาดุกลำพันในธรรมชาติมีแนวโน้มลดลง (ศราวุธ เจะโส๊ะ และคณะ, 2538) จึงมีความพยายามเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกลำพันเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ปลาและศึกษาความเป็นไปได้ในการเพาะเลี้ยงเชิงเศรษฐกิจ แต่เนื่องจากเป็นปลาชนิดใหม่ที่สามารถเพาะขยายพันธุ์ได้จึงขาดข้อมูลทางชีววิทยาที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงและขยายพันธุ์ซึ่งพบว่ามีการวิจัยในด้านความต้องการสารอาหารของปลา ด้านเทคนิคการเพาะฟัก และการอนุบาลลูกปลา เช่น การศึกษาผลของอาหารรูปแบบต่างๆ ต่อการเจริญเติบโต และการรอดตายของปลาดุกลำพันวัยอ่อน (Kiriratnikom *et al*. Retrieved January 30, 2014, from http://www.scisoc.or.th) ระดับของโปรตีนในอาหารที่มีผลต่อปลาดุกลำพัน (Chessadapa *et al*., 2009) ผลของระดับความหนาแน่นต่อการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและการรอดตายของปลาดุกลำพันระยะปลานิ้วในบ่อคอนกรีต (พันธสิทธิ์ โชคสวัสดิกร และคณะ, สืบค้นเมื่อ 30 มกราคม 2557, จาก http://www.bio.sci.tsu.ac.th) เป็นต้น สำหรับข้อมูลทางด้านพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของคัพภะเป็นข้อมูลสำคัญอีกด้านที่จะช่วยให้เกิดการพัฒนาวางแผนเทคนิคการเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพันในด้านการอนุบาลลูกปลาให้ประสบความสำเร็จมากขึ้นทั้งเพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ และนำไปสู่การเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพันในเชิงเศรษฐกิจต่อไป (Ortiz-Delgado *et al*., 2003)

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำวัยอ่อนให้ประสบความสำเร็จนั้นต้องอาศัยข้อมูลหลายๆ ด้าน มาประกอบกัน เนื่องจากพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำแต่ละชนิดไม่เหมือนกัน ทำให้ช่วงเวลาในการกินอาหารจากภายนอกครั้งแรก ประเภทของอาหาร อัตราการเจริญเติบโต ความต้องการด้านสภาพแวดล้อม แตกต่างกันไปตามชนิดของสัตว์น้ำวัยอ่อน ซึ่งการศึกษาด้านพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของคัพภะ จะช่วยให้สามารถวางแผนการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำได้ประสบความสำเร็จมากขึ้น (Ortiz-Delgado *et al*. (2003); Saelee *et al*. (2011); Rangsin *et al*., (2012); เบญจศุภลักษณ์ อุดรโพธิ์ (2545); ปริญญา สุทธินนท์ และคณะ (2012)) ดังนั้นการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของคัพภะปลาดุกลำพันโดยใช้องค์ความรู้ด้านเนื้อเยื่อวิทยาจึงเป็นข้อมูลอีกทางหนึ่งที่มีประโยชน์ต่อการวางแผนการเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพัน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาพัฒนาการของคัพภะปลาดุกลำพันตั้งแต่ปฏิสนธิจนถึงหลังฟักออกจากไข่เป็นเวลา 15 วัน โดยเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงพัฒนาการของคัพภะของปลาดุกลำพันตั้งแต่ปฏิสนธิจนถึงหลังฟักออกจากไข่เป็นเวลา 15 วัน เพื่อเป็นองค์ความรู้ด้านพัฒนาการของอวัยวะสัตว์วัยอ่อน

2. เป็นข้อมูลส่วนหนึ่งที่สำคัญในการพัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพัน เพื่อการอนุรักษ์พันธุ์ และนำไปสู่การเพาะเลี้ยงในเชิงเศรษฐกิจต่อไป

3. สามารถนำไปบูรณาการในการเรียนการสอนในวิชาชีววิทยาพื้นฐาน และเทคนิคทางชีววิทยาได้

ขอบเขตการวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง ศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของคัพภะปลาดุกลำพัน โดยสุ่มตัวอย่างไข่ปลาดุกลำพันจากบ่อฟักไข่ตั้งแต่ปฏิสนธิจนถึงหลังฟักออกจากไข่ เริ่มตั้งแต่ 0-60 นาที เก็บทุก 5 นาที ชั่วโมงที่ 1-3 เก็บทุก 30 นาที ชั่วโมงที่ 3-40 เก็บทุก 1 ชั่วโมง และหลังจากลูกปลาฟักออกจากไข่อายุ 15 วัน จำนวน 40 ตัวอย่าง/ครั้ง เพื่อตรวจสอบพัฒนาของเนื้อเยื่อตามระยะเวลาต่างๆ โดยบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพ และควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่องทำความร้อนขนาด 100w เพื่อปรับอุณหภูมิให้มีค่าในช่วง 26-28 ^{o}ซ.

นิยามศัพท์เฉพาะ

พัฒนาการของคัพภะของปลา หมายถึง การพัฒนาเปลี่ยนระยะของตัวอ่อนตั้งแต่ปฏิสนธิจนถึงหลังฟักออกจากไข่ ศึกษาพัฒนาการของอวัยวะ และระยะเวลาที่ลูกปลาฟักเป็นตัว

เนื้อเยื่อวิทยา หมายถึง ศึกษาเกี่ยวกับจุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยใช้เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome) ตัดเนื้อเยื่อให้บางและย้อมสี (stained) เพื่อเพิ่มความสามารถในการแยกแยะความแตกต่างของเนื้อเยื่อ แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

บทที่ 2
ทฤษฎี

ปลาดุกลำพัน

ลักษณะและที่อยู่อาศัย

ปลาดุกลำพันเป็นปลาน้ำจืดไม่มีเกล็ด มีครีบหลัง ครีบหาง และครีบก้นเชื่อมต่อกัน จัดอยู่ในกลุ่มปลากินเนื้อ ลำตัวค่อนข้างยาวและมีจุดขาวเรียงขวางกับลำตัว ลักษณะสีของลำตัวจะเปลี่ยนไปตามอายุ ขนาด และสภาพแวดล้อมมีถิ่นที่อยู่จำกัดเฉพาะในเขตป่าพรุที่รกทึบ มีกระแสน้ำไหลเอื่อย ๆ หรือเป็นแอ่งน้ำค่อนข้างนิ่งมีต้นไม้ปกคลุม อยู่ในสภาพดินหรือน้ำที่เป็นกรด มีซากวัชพืชหรือใบไม้ทับถม มีปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำต่ำ (ศราวุธ เจะโส๊ะ และคณะ, 2538)

อนุกรมวิธาน

Kingdom Animalia
Phylum Chordata
Subphylum Vertebrata
Class Actinopterygii
Order Siluriformes
Family Clariidae
Genus *Clarias*
Species *Clarias nieuhofii*

(Valenciennes. Retrieved June 6, 2013, from http://www.fishbase.org)

จากการที่ปลาดุกลำพันเป็นปลาที่อาศัยเฉพาะถิ่นในเขตป่าพรุ อีกทั้งเป็นปลาที่นิยมบริโภค เนื่องจากปัญหาการบุกรุกพื้นที่ การดักจับสัตว์น้ำ ส่งผลให้ปัจจุบันพบปลาดุกลำพันจำนวนน้อยในธรรมชาติ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ดังนั้นการศึกษาข้อมูลหลายๆ ด้าน จะช่วยให้การวางแผนเพาะเลี้ยงปลาดุกลำพันมีประสิทธิภาพมากขึ้น โดยการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของคัพภะปลาดุกลำพัน จะช่วยให้การเพาะขยายพันธุ์ปลาดุกลำพันมีความประสบผลสำเร็จมากยิ่งขึ้น (Ortiz-Delgado *et al*. (2003); Saelee *et al*. (2011); เบญจศุภลักษณ์ อุดรโพธิ์ (2545))

เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยากับการศึกษาคัพภะ

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาจะใช้อธิบายการทำงานของระบบต่างๆ ของคัพภะได้ เนื่องจากช่วยให้ทราบถึงลำดับการเกิดของระบบอวัยวะในช่วงเวลาต่างๆ ได้

สุนิตย์ โรจนพิทยากุล และคณะ (2540) ศึกษาชีววิทยาและพัฒนาการของลูกปลาเห็ดโคนวัยอ่อนระยะแรกเพื่อเป็นแนวทางในการอนุบาลลูกปลาให้มีอัตรารอดสูงขึ้นโดยสุ่มตัวอย่างลูกปลาเห็ดโคนที่เพิ่งฟักทุก 3 ชั่วโมง จนครบ 96 ชั่วโมงจากการศึกษาพบว่า ลูกปลาเห็ดโคนฟักเป็นตัวใน

เวลา 13-15 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 27-29 ^{O}ซ. ลูกปลาที่เพิ่งฟักมีความยาว 1.38 ± 0.07 มม. มีปริมาตรถุงไข่แดง (yolk sac) 0.132 ลบ.มม. และหยดน้ำมัน (oil globule) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.15 ± 0.005 มม. ลูกปลามีทวารหนัก ขากรรไกร ครีบอก และนัยน์ตาสีดำสนิทปรากฏให้เห็นชัดเจนเมื่ออายุ 3, 18, 24 และ 30 ชั่วโมงตามลำดับ ลูกปลาเริ่มเปิดปากเมื่ออายุ 36 ชั่วโมงโดยมีขนาดของปาก (mouth height) 84.79 ± 14.74 ไมครอน ถุงไข่แดงและหยดน้ำมันยุบสมบูรณ์เมื่อลูกปลาอายุ 63 และ 69 ชั่วโมง ตามลำดับ เริ่มพบโรติเฟอร์ในกระเพาะอาหารของลูกปลาหลังปากเปิด 12 ชั่วโมง และกระเพาะลม (swim bladder) เริ่มพองตัวในเวลากลางคืนเมื่อลูกปลาอายุ 57 ชั่วโมงลูกปลาที่ไม่ให้อาหารจะตายหมดภายในเวลา 81 ชั่วโมง ส่วนลูกปลาที่ให้โรติเฟอร์เป็นอาหาร มีอัตรารอดตายต่ำ

เบญจศุภลักษณ์ อุดรโพธิ์ (2545) ศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาและฮีสโตเคมีของระบบย่อยอาหารในปลาบู่ทรายระยะวัยอ่อนอายุ 0-45 วัน พบว่าทางเดินอาหารมีลักษณะเป็นท่อตรง ถุงไข่แดงขนาดใหญ่อยู่ใต้ท่อทางเดินอาหารและจะยุบหมดในวันที่ 5 หลังจากฟัก เซลล์เยื่อบุทางเดินอาหารเป็นแบบบางเรียงตัวหลายชั้น ปากและทวารหนักเปิดเมื่อปลามีอายุ 2 วัน พบ eosinophilic granule ที่ลำไส้ส่วนท้ายซึ่งแสดงถึงการเกิดการดูดซึมสารอาหารในลำไส้ และพบการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase ในทางเดินอาหาร ตั้งแต่ปลาเริ่มออกจากไข่และมีปริมาณมากขึ้นเมื่อปลามีการเจริญเติบโตมากขึ้น พบ acid mucosubstance ที่ goblet cell ของหลอดอาหารในวันที่ 2 และลำไส้วันที่ 15 โดยระบบทางเดินอาหารจะสมบูรณ์เมื่อปลาอายุ 30 วัน ซึ่งข้อมูลเหล่านี้สามารถนำไปใช้เพิ่มประสิทธิภาพในการเพาะเลี้ยง และอนุบาลลูกปลาบู่ให้ดีขึ้น

อาคม สิงหบุญ และคณะ (2546) ศึกษาพัฒนาการของคัพภะและลูกปลาวัยอ่อนของปลาเก๋าเสือพบว่าไข่ปลาเก๋าเสือเป็นไข่ลอย ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 863±27.69 ไมครอน ไข่ที่รับการผสมเริ่มมีการแบ่งเซลล์ (cleavage stage) เมื่อเวลาผ่านไป 35 นาที พัฒนาเข้าสู่ระยะมอรูล่า (morula) เมื่อเวลา 2 ชั่วโมง 20 นาที ระยะบลาสตูล่า (blastula) เมื่อเวลา 3 ชั่วโมง 5 นาที ระยะแกสตูล่า (gastrula) เมื่อเวลา 5 ชั่วโมง 35 นาที ระยะบลาสโตพอร์ปิด (closing of blastopore) เมื่อเวลา 9 ชั่วโมง 25 นาที และฟักออกเป็นตัวเมื่อเวลา 19 ชั่วโมง 5 นาที ลูกปลาแรกฟักมีความยาว 1.69±0.08 มิลลิเมตร ไข่แดงมีปริมาตร 1.31±0.27 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และหยดน้ำมันขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.19±0.01 มิลลิเมตร เมื่ออายุ 24 ชั่วโมง ท่อทางเดินอาหารเจริญมากขึ้น เริ่มมองเห็นช่องว่างภายในท่อทางเดินอาหาร ปากเริ่มเปิดเมื่ออายุ 48 ชั่วโมง ท่อทางเดินอาหารแบ่งเป็น 3 ส่วนชัดเจน คือ ทางเดินอาหารตอนต้น หรือลำคอ ทางเดินอาหารตอนกลางหรือกระเพาะอาหาร และทางเดินอาหารตอนปลายหรือลำไส้ ในแต่ละส่วนจะมีผนังที่หนาขึ้นเริ่มพบอาหารในกระเพาะเมื่ออายุ 66 ชั่วโมง ไข่แดงและหยดน้ำมันยุบสมบูรณ์เมื่ออายุ 72 และ 90 ชั่วโมง ตามลำดับ ลูกปลาเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเมื่ออายุ 7 วัน และพัฒนาเข้าสู่ระยะปลาวัยรุ่นเมื่ออายุ 39 วัน

Micale *et al*. (2006) ศึกษาระบบทางเดินอาหารของปลา Common pandora ตั้งแต่ 0-50 วัน หลังฟัก พบว่าปลาจะเริ่มกินอาหารในวันที่ 3 ซึ่งปลาจะได้รับอาหารชนิดแรกคือ โรติเฟอร์ สำหรับระบบทางเดินอาหารแบ่งเป็น 4 ส่วน คือ คอหอย หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้เล็ก หลังจากปลาได้รับอาหารภายนอกร่างกายจะพบว่า เนื้อเยื่อบุผิวของลำไส้ส่วนต้นจะมีหยดไขมัน และพบ supranuclearninhydrin-Schiff ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการดูดซึมโปรตีนในเยื่อบุผิวลำไส้ ส่วนท้าย ส่วนของลำไส้มีการขดพับในวันที่ 4 และพบเยื่อเมือกตลอดทางเดินอาหารในวันที่ 10 พบ gastric glands ปรากฏในวันที่ 28 ซึ่งสามารถใช้บ่งชี้ถึงการเปลี่ยนจากระยะตัวอ่อนเข้าสู่ระยะ juvenile

จิราพร โรจน์ทินกร และจริยา เทพฌรงค์ (2549) ศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยาของการพัฒนาของโอโอไซต์ปลากลุ่ม catfish 2 ชนิด คือ ปลาดุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*) และปลาสวาย (*Pangasius hypophthalmus*) พบว่ารังไข่ปลาแบ่งระยะโอโอไซต์ได้เป็น 6 ระยะ โดยโอโอไซต์ระยะ primary growth phase (ระยะที่ 1 และ 2) มีสภาพไม่ค่อยชัดเจนและพบได้น้อยมาก และที่พบค่อนข้างน้อยรองลงมาคือระยะที่ 3 early-vitellogenesis (central germinal vesicle, CGV) ขนาดของนิวเคลียสมีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับขนาดของเซลล์ไข่และอยู่ตรงกลางเซลล์ มีการเพิ่มจำนวนของ yolk granules ตรงขอบเซลล์และ cortical alveoli บริเวณรอบนิวเคลียส ระยะที่ 4 vitellogenic stage (migrating germinal vesicle, MGV) จะมีลักษณะของไซโตพลาสซึม (cytoplasm) เต็มไปด้วยโยค (yolk) และหยดไขมันที่ขอบเซลล์ ครอบคลุมทั้งโอโอไซต์ นิวเคลียสเริ่มเคลื่อนตัวไปที่ขั้ว animal pole เนื่องจากมองเห็นไม่ชัดเจน ระยะที่ 5 peripheral germinal vesicle (PGV) ไม่ปรากฏส่วนของไซโตพลาสซึม ส่วนโยคเต็มเซลล์ ขอบเซลล์บาง และนิวเคลียสซึ่งอยู่ที่ขอบเซลล์เห็นไม่ชัดเจน แต่เห็นการแบ่งชั้นของ zonaradiata และเนื้อเยื่อชั้น follicle ระยะที่ 6 maturation (germinal vesicle breakdown, GVBD) นิวเคลียสชิดขอบเซลล์ และ yolk granule เต็มเซลล์ ขอบเซลล์ของโอโอไซต์บางและแยกชั้นจาก follicle อย่างชัดเจน

จริยา เทพฌรงค์ และจิราพร โรจน์ทินกร (2550) ศึกษาการพัฒนาโอโอไซท์ปลาสวายด้วยวิธีการ In vitro maturation (IVM) โดยการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ชนิด ได้แก่ Leibovitz's L15, Dulbecco's Modified Eagle Medium และ M-199 medium ที่อุณหภูมิบ่ม 23, 25 และ 28^{O}C และการใช้ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของโอโอไซท์ 4 ชนิด ได้แก่ human chorionic gonadotropin (HCG), Luteinizing hormone (LH), 17α, 20β-dihydroxy-4-pregnen-3-one (DHP) และ Estradiol-17β ที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อศึกษาประสิทธิผลของสารเหล่านี้ และปัจจัยที่มีผลต่อการพัฒนาโอโอโซท์ในห้องทดลอง เพื่อใช้เป็นประโยชน์ต่อการเลี้ยงโอโอไซท์ของปลากลุ่ม *Pangasianodon* ให้สุกในห้องทดลอง ซึ่งจะประยุกต์ใช้กับปลาชนิดที่ใกล้จะสูญพันธุ์ พบว่าเลี้ยงโอโอไซท์ด้วย M-199 medium ที่อุณหภูมิ25 ^{O}C ทำให้สภาพเซลล์และอัตรารอดของโอโอไซท์ดีที่สุด จากการใช้ฮอร์โมน พบว่า Luteinizing hormone (LH) ที่ความเข้มข้น 11 และ 33 ng/ml มีการ

พัฒนาของโอโอไซท์จากระยะ germinal vesicle migration (GVM) ไปเป็น germinal vesicle beak down (GVBD)

อัธยา อรรถอินทรีย์ และคณะ (2552) ศึกษาการเพาะพันธุ์และคัพภะวิทยาของปลาหมูคอก (*Yasuhikotakia morleti*) โดยการกระตุ้นด้วยฮอร์โมนสังเคราะห์และคัดเลือกแม่ปลาแบบสุ่มฉีด Buserelin acetate ในอัตราความเข้มข้น 10, 20 และ 30 µg/kg ร่วมกับ Domperidoneในอัตรา 10 mg/kg ทุกชุดการทดลอง สำหรับปลาเพศผู้ฉีดในอัตรา 10 µg/kg ร่วมกับ Domperidoneในอัตรา 10 mg/kg พบว่าแม่ปลาที่ฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ในระดับ 20 µg/kg มีการตกไข่ ลักษณะไข่ปลาหมูคอกมีลักษณะกลม สีเทาอมเขียว เป็นแบบครึ่งจมครึ่งลอย มีพัฒนาการของคัพภะจนกระทั่งฟักออกเป็นตัวใช้เวลาประมาณ 13 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส โดยมีอัตราฟักเฉลี่ย 17 เปอร์เซ็นต์ ลูกปลาหมูคอกที่ฟัก ออกเป็นตัวมีขนาดความยาว 2.9 มิลลิเมตร และถุงอาหารยุบหมดภายใน 3 วัน

ปริญญา สุทธินนท์ และคณะ (2012) ศึกษาพัฒนาการของปลากะรังจุดฟ้าวัยอ่อน (*Plectropomus leopardus*) อายุ 1-50 วัน พบว่า ลูกปลาอายุ 1 วัน หัวติดกับถุงอาหารสำรอง ไม่ปรากฏตา ไม่มีการพัฒนาของปาก เมื่อลูกปลาอายุ 2 วัน ส่วนหัวแยกออกจากถุงอาหารสำรอง ขนาดของถุงอาหารสำรองเล็กลง ปากยังไม่เปิด ลูกตาใสไม่มีจุดสีดำสะสม เมื่อลูกปลาอายุ 3 วัน ปากเริ่มเปิดมีขนาดกว้าง 370.47±17.38 ไมครอน ถุงอาหารสำรองยุบหมดเจริญและพัฒนาไปเป็นบางส่วนของกระเพาะอาหาร ช่องเปิดของทวารหนักเห็นได้ชัดเจน ลูกตามีจุดสีดำมาสะสมจนมองเห็นได้ชัดเจน เมื่อลูกปลาอายุ 7 วัน ครีบหลังมีการพัฒนาก้านครีบแข็ง (dorsal spine) อันแรก และครีบอกทั้งสองข้างมีก้านครีบแข็ง (pelvic spine) อันแรกยื่นยาวออกมา เมื่อลูกปลาอายุ 12-24 วัน ก้านครีบแข็งอันแรกของครีบหลังและครีบอกทั้งคู่ยื่นยาวมากขึ้น เมื่อลูกปลาอายุ 25-30 วัน ก้านครีบแข็งอันแรกของครีบหลังและครีบอกทั้งคู่เริ่มหดสั้นลง เมื่ออายุ 35 วัน ครีบหลังพัฒนาจนเกือบสมบูรณ์ ครีบหู ครีบอก ครีบก้น และครีบหางพัฒนาสมบูรณ์ และเมื่อลูกปลาอายุ 50 วัน มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างสมบูรณ์เป็นลูกปลาขนาดเล็กที่มีรูปร่างลักษณะภายนอกเหมือนปลาโตเต็มวัย ลูกปลาอายุระหว่าง 1-35 วัน มีความกว้างปากสัมพันธ์กับความยาวลำตัว คือ ความกว้างปาก (ไมโครเมตร) เท่ากับ (-27.86 + 201.48) x ความยาวลำตัว (มิลลิเมตร)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มตัวอย่าง

ไข่ปลาดุกลำพันตั้งแต่ปฏิสนธิจนถึงหลังฟักออกจากไข่เป็นเวลา 15 วันของไข่ปลาดุกลำพันจากบ่อฟักไข่เพื่อนำมาตรวจสอบพัฒนาการของเนื้อเยื่อ

วัสดุและอุปกรณ์

ใบมีด (microtome knife)	กระจกปิดสไลด์ขนาด 22x40 มม. (cover slip)
ขวดใส่ตัวอย่าง (bottom)	สไลด์แก้วขนาด 25x75x2 มม. (slide)
เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)	กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)
จาร์ย้อมสี (staining jar)	กล่องใส่สไลด์ (slides box)
ตู้อบ (oven)	เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome)
บีกเกอร์ (beaker)	อ่างลอยเนื้อเยื่อ (water bath)

สารเคมี

Absolute ethyl alcohol	Acetone
Bouin's Fluid	Haematoxylin Crystal
Sodium Iodate	PotasiumAluminium Sulfate, Alum
Citric Acid	Chloral Hydrate
Eosin-Y	Acetic acid
Isopropyl Alcohol	Xylene
Paraplast	Permount

การดำเนินการวิจัย

การเพาะพันธุ์ปลาดุกลำพัน

คัดเลือกพ่อ-แม่พันธุ์ปลาดุกลำพัน ที่มีอายุระหว่าง 2-4 ปี ซึ่งเลี้ยงไว้ในอาคารปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยทักษิณ วิทยาเขตพัทลุง นำมาตรวจสอบสุขภาพ และความสมบูรณ์เพศ แล้วเพาะขยายพันธุ์ด้วยการผสมเทียม โดยการฉีดฮอร์โมนสังเคราะห์ LH-RH ร่วมกับ domperidone(พรพนม พรหมแก้ว, 2538; ศราวุธ เจะโส๊ะ และคณะ, 2538) ภายหลังการฉีดฮอร์โมนเข็มที่ 2 เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จึงรวบรวมไข่จากแม่ปลา และน้ำเชื้อจากปลาเพศผู้ ผสมพันธุ์

เช่นเดียวกับปลาดุกชนิดอื่น จากนั้นฟักไข่ปลาดุกลำพันที่ปฏิสนธิแล้วในบ่อฟักไข่ที่มีการเปลี่ยนถ่ายน้ำต่อเนื่องเพื่อลดการสะสมของของเสียจากการสลายตัวของไข่ปลาที่ไม่ปฏิสนธิ

การศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของคัพภะปลาดุกลำพัน

สุ่มตัวอย่างไข่ปลาดุกลำพันจากบ่อฟักไข่ตั้งแต่ปฏิสนธิจนถึงหลังฟักออกจากไข่โดยเริ่มตั้งแต่ 0-60 นาที เก็บทุก 5 นาที ชั่วโมงที่ 1-3 เก็บทุก 30 นาที ชั่วโมงที่ 3-40 เก็บทุก 1 ชั่วโมง และหลังจากลูกปลาฟักออกจากไข่เก็บทุก 6 ชั่วโมงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเก็บในวันที่ 3 7 และ15 วันหลังฟักจำนวน 40 ตัวอย่าง/ครั้ง เพื่อตรวจสอบพัฒนาของเนื้อเยื่อตามระยะเวลาต่างๆ โดยบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ถ่ายภาพ และควบคุมอุณหภูมิโดยใช้เครื่องทำความร้อนขนาด 100w เพื่อปรับอุณหภูมิให้มีค่าในช่วง 26-28 °ซ. รายงานตามระยะที่มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

เก็บตัวอย่างไข่ปลาดุกลำพันเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยนำตัวอย่างมาเก็บรักษาสภาพในน้ำยาบูแอง (Bouin's Fluid) เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงเปลี่ยนจากน้ำยาบูแองเป็นแอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 50 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับก่อนนำมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ (Humason, 1967)

ขั้นตอนการดึงน้ำออก (Dehydration) และการฝังเนื้อเยื่อ (Embedding)

1. ตัดแต่งตัวอย่าง (Trim) ที่ผ่านการดองแล้วให้มีขนาดพอเหมาะเพื่อสะดวกต่อการฝัง และนำไปตัด (Section)

2. นำตัวอย่างไปผ่านขั้นตอนการดึงน้ำออกจากตัวอย่าง ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
2	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
3	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
4	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
5	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
6	แอบโซลูท แอลกอฮอล์ (Absolute Alcohol)	1
7	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (Isopropyl Alcohol)	1
8	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
9	ไซลีน (Xylene)	1
10	ไซลีน	1
11	พาราพลาสท์ (Paraplast)	1
12	พาราพลาสท์	1

3. นำตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนที่ 2 ไปฝังด้วยพาราพลาสท์ จากนั้นนำบล็อค (Block) ไปแช่ตู้เย็นเพื่อง่ายต่อการนำไปตัดต่อไป

4. ตัดแต่งตัวอย่างที่มีอยู่ในบล็อคให้มีขนาดพอดีกับขนาดสไลด์ และแผ่นปิดสไลด์ จากนั้นนำไปตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ ให้มีความหนาประมาณ 5-7 ไมครอน นำไปลอยในน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

5. ใช้แผ่นสไลด์ช้อนตัวอย่าง แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อให้ตัวอย่างยึดติดแผ่นสไลด์ได้ดี

6. นำสไลด์ไปผ่านขบวนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน โดยมีขั้นตอนดังนี้

ขั้นตอนที่	สารละลาย	เวลา (นาที)
1	ไซลีน	2
2	ไซลีน	2
3	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
4	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	1
5	แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์	1
6	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
7	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	1
8	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
9	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
10	น้ำกลั่น	1
11	ฮีมาทอกซิลีน	6
12	น้ำประปา	1
13	แอลกอฮอล์ 50 เปอร์เซ็นต์	1
14	อีโอซิน	2
15	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
16	แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์	2
17	แอบโซลูท แอลกอฮอล์	2
18	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
19	ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์	2
20	ไซลีน	2
21	ไซลีน	2

7. ปิดผนึกเป็นสไลด์ถาวรโดยใช้น้ำยาเปอร์เมาท์ (Permount) หยดลงบนแผ่นเนื้อเยื่อ แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นจึงนำตัวอย่างไปศึกษาพยาธิสภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์

บันทึกภาพพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของระบบอวัยวะของคัพภะปลาดุกลำพัน รายงานผลการศึกษาโดยแสดงถึงพัฒนาการของเนื้อเยื่อตามระยะเวลาการพัฒนาของไข่ และสรุปลำดับขั้นการสร้างอวัยวะต่างๆ ของปลาดุกลำพัน

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

ผลการศึกษาพัฒนาการทางเนื้อเยื่อของคัพภะปลาดุกลำพัน

1. พัฒนาการของคัพภะ (Embryonic Development)

เมื่อได้รับการผสมจากเชื้อเพศผู้ไข่ปลาดุกลำพันเข้าสู่ระยะ Zygote Period ลักษณะกลม มีชั้น Perivitelline Space หุ้มไข่ไว้ ภายในมี Yolk Granules ติดสีแดง กระจายทั่วไซโทพลาซึม (เริ่มต้น) จากนั้นมีการเจริญและพัฒนาเป็นขั้นต่างๆ (ภาพที่ 1) ดังนี้

เวลา 5 นาที - 8 ชั่วโมง Cleavage Stage ระยะที่ไซโกต แบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ เป็นการแบ่งแบบ Meroblastic Cleavage โดยไซโกตจะแบ่งเซลล์ในด้าน Animal Pole ซึ่งเซลล์ใหม่ที่แบ่งได้จะมีขนาดเล็กลงครึ่งหนึ่งจากเซลล์เดิม ส่วนด้าน Vegetal Pole มีไข่แดงสะสมอยู่

เวลา 7 - 9 ชั่วโมง เริ่มเข้าสู่ Morular Stage เซลล์เริ่มแบ่งมากขึ้นเป็นวงมีขนาดเล็กมากจนเห็นเป็นเนื้อเดียวกัน ซ้อนกันอยู่อย่างหนาแน่น มีลักษณะเป็นหมวกครอบเหนือไข่แดง

เวลา 10 - 11 ชั่วโมง Blastula Stage มีการจัดเรียงเซลล์ใหม่ เรียกว่า Blastoderm และเกิดช่องกลวงตรงกลาง เรียกว่า Blastocoel

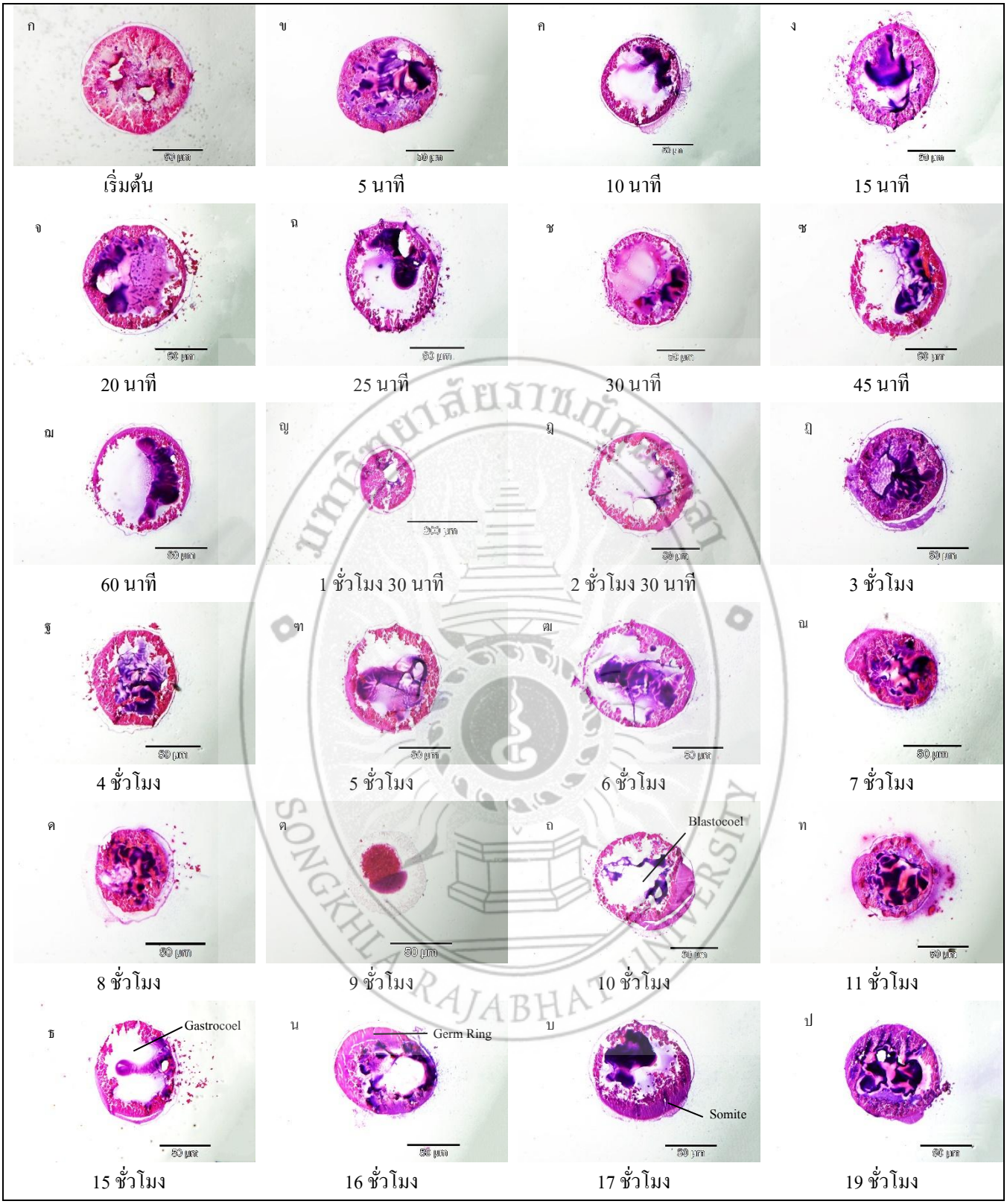
เวลา 15-16 ชั่วโมง Gastrula Stage กลุ่มเซลล์ Blastoderm เริ่มหนาขึ้น เจริญคลุมไข่แดงเกิดเป็นวงแหวน เรียกว่า Germ Ring และมีการม้วนตัวของเซลล์ผ่านช่องว่างภายใน (Gastrocoel) ซึ่งจะพัฒนาเป็นท่อทางเดินอาหาร เมื่อ Blastoderm คลุมไข่แดงจนหมด จะเป็นช่วงที่ Blastopore ปิด

เวลา 17 - 20 ชั่วโมง ระยะลำตัวเริ่มเกิดปล้อง (Body Segment Appearance Stage) เริ่มมองเห็น Somite ตัวอ่อนเจริญและยกขึ้นสูงจากไข่แดง

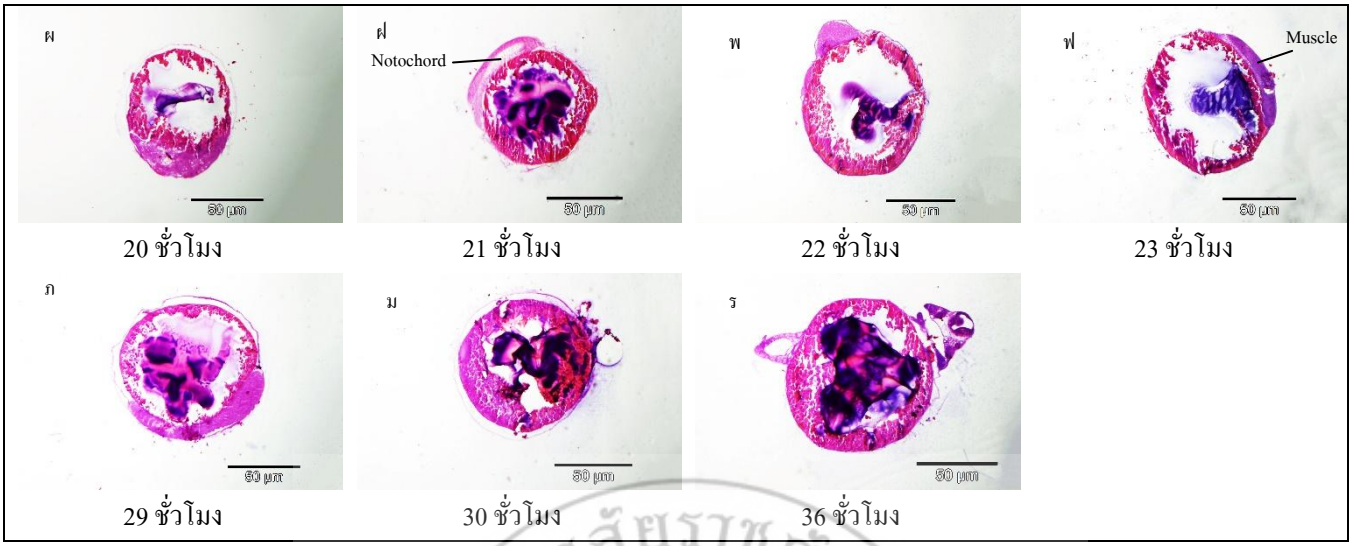
เวลา 21 ชั่วโมง เริ่มเห็นส่วนของ Notochord เมื่อดูภายนอกสังเกตส่วนของหัวและหางได้ชัดเจนขึ้น

เวลา 22 - 30 ชั่วโมงเนื้อเยื่อบางส่วนเริ่มพัฒนาเป็นกล้ามเนื้อ ทำให้ตัวอ่อนกระดิกตัวได้ มีแนวกระดูกสันหลังชัดเจนขึ้น ส่วนหัวมีการพัฒนาเป็นเนื้อเยื่อประสาทส่วนสมองและเนื้อเยื่อตา

เวลา 36 ชั่วโมง Hatching Stage ฟักเป็นตัว ตัวอ่อนจะยืดตัวใช้หัวและหางทำให้เปลือกไข่แตกออก และดิ้นออกจากเปลือกไข่



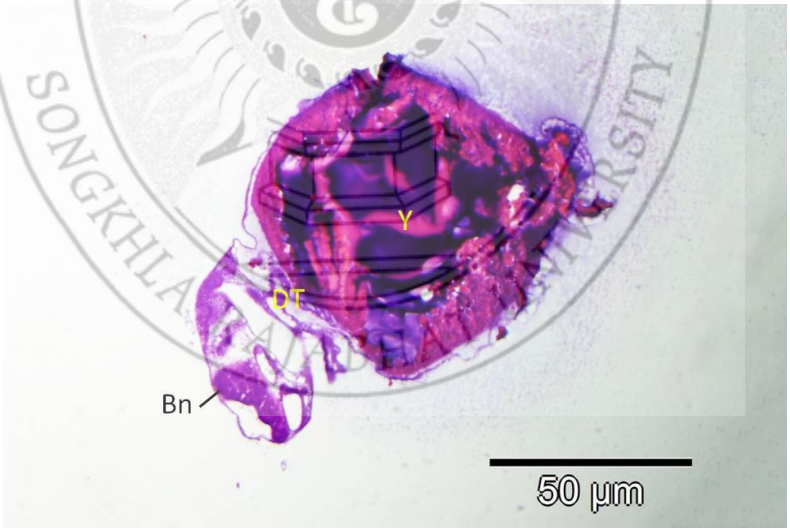
ภาพที่ 1 พัฒนาการของคัพภะปลาดุกลำพันตั้งแต่ปฏิสนธิจนฟักออกจากไข่



ภาพที่ 1 (ต่อ) พัฒนาการของคัพภะปลาดุกลำพันตั้งแต่ปฏิสนธิจนฟักออกจากไข่

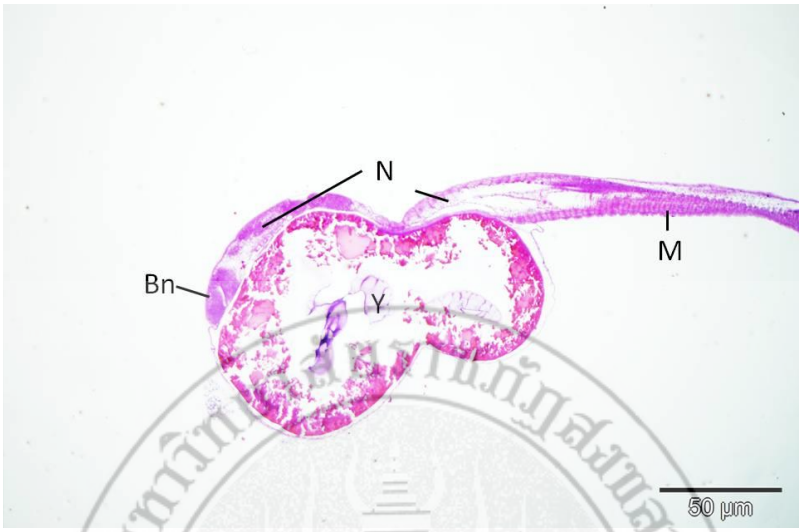
2. พัฒนาการของลูกปลาวัยอ่อน

หลังฟัก 6 ชั่วโมง รูปร่างตัวอ่อน ลักษณะลำตัวยาว ปลายหางแหลม ปากยังไม่เปิดมีเนื้อเยื่อบางๆ เชื่อมติดกัน พบเนื้อเยื่อสมองเจริญอยู่ด้านบนส่วนหัวแยกออกเป็น 2 ส่วน คือสมองส่วนต้นและสมองส่วนท้าย ท่อทางเดินอาหารเริ่มมีรูปร่างเป็นท่อไปตามแนวของลำตัว และยังมีถุงไข่แดงอยู่ทางด้านท้อง (ภาพที่ 2)



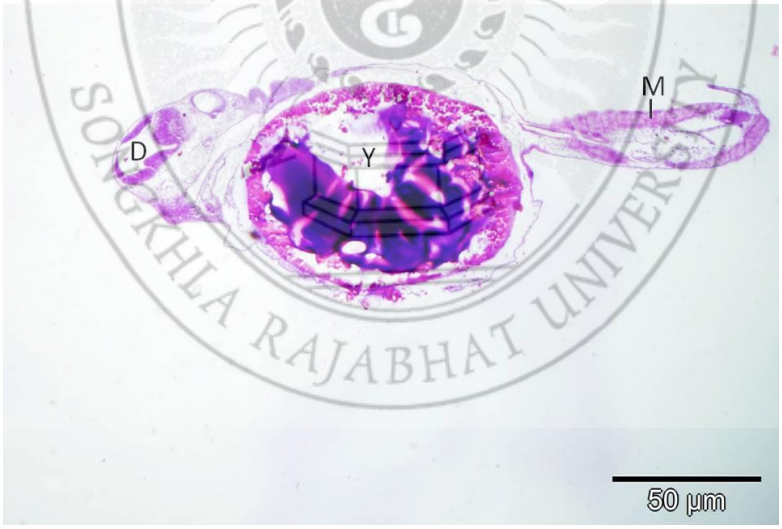
ภาพที่ 2 ลูกปลาหลังฟัก 6 ชั่วโมง Brain (Bn), Digestive tract (DT), Yolk sac (Y)

หลังฟัก 12 ชั่วโมง ลำตัวเรียวยาวเห็นจุดชัดขึ้น ปากยังปิด ถุงไข่แดงมีขนาดเล็กลง พบ Notochord อยู่ถัดจากเซลล์ประสาท เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ คล้ายเซลล์ไขมันภายในมี Matrix แทรกอยู่ ซึ่งติดกันจะพบมัดกล้ามเนื้อจำนวนหลายมัด (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ลูกปลาหลังฟัก 12 ชั่วโมง Brain (Bn), Muscle (M), Notochord (N), Yolk sac (Y)

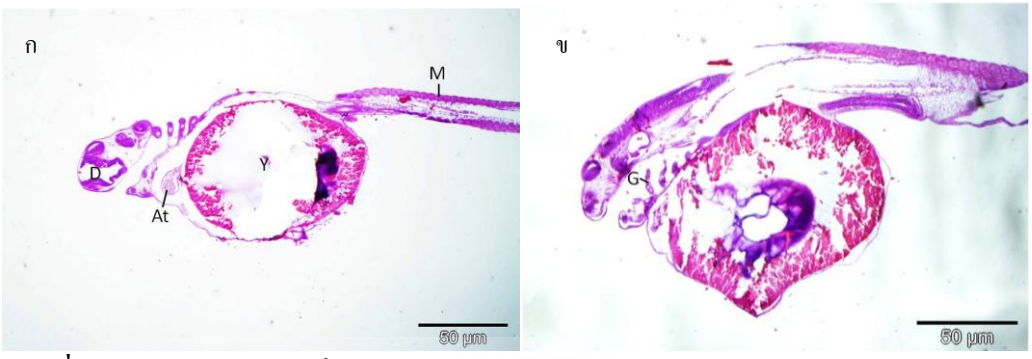
หลังฟัก 18 ชั่วโมง เนื้อเยื่อสมองเจริญมากขึ้น เริ่มแบ่งเป็นส่วนต่างๆ พบส่วนของ Diocoele ลำตัวเรียวยาวขึ้น ยังเห็นเป็นสีใส ปากยังไม่เปิด (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 ลูกปลาหลังฟัก 18 ชั่วโมง Diocoele (D), Muscle (M), Yolk sac (Y)

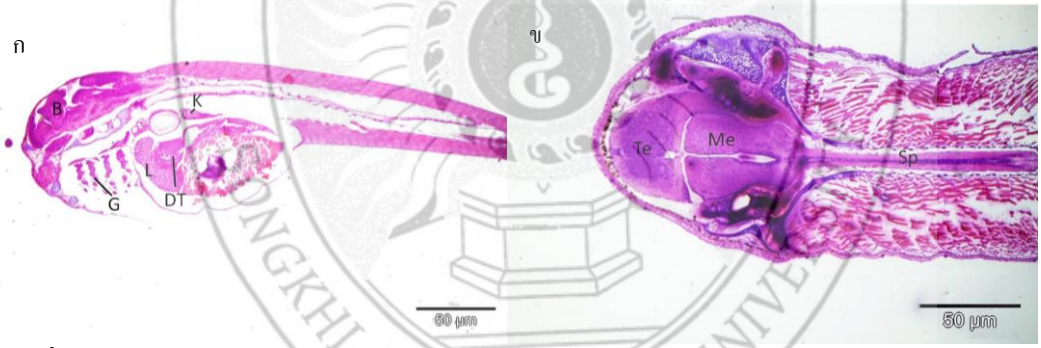
หลังฟัก 24 ชั่วโมง อวัยวะรับสัมผัสต่าง ๆ เริ่มพัฒนามากขึ้นตามเวลาที่มากขึ้น ปากเริ่มเปิด มีเซลล์สี่เหลี่ยมบริเวณริมฝีปากบนซึ่งต่อไปจะพัฒนาเป็น Olfactory organ มีหน้าที่รับความรู้สึกจากสารเคมีในน้ำ ท่อทางเดินอาหารยังเป็นท่อตรง ไม่แบ่งเป็นส่วน ๆ พบเนื้อเยื่อกล้ามเนื้อหัวใจที่

หัวใจห้อง Atrium เริ่มเห็นโครงสร้างของเหงือก มีกระดูกอ่อนบริเวณซี่เหงือก (Gill filament) แต่ยังไม่มีการแตกแขนงของกิ่งเหงือก (Gill lamelae) ถุงไข่แดงเล็กลงอีก (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 ลูกปลาหลังฟัก 24 ชั่วโมง Atrium (At), Diocoele (D), Gill (G), Muscle (M), Yolk sac (Y)

หลังฟัก 3 วัน สมองมีการแบ่งเป็นส่วนต่าง ๆ ชัดเจนขึ้น โดยพบส่วน Telencephalon อยู่ด้านหน้าและตามด้วย Mesencephalon (Me) เริ่มมีรงควัตถุสีน้ำตาลดำบริเวณชั้นผิวหนัง สำหรับเหงือกซึ่งเป็นอวัยวะช่วยหายใจเริ่มมีการแตกแขนงของกิ่งเหงือก นอกจากนี้พบส่วนของทางเดินหลอดอาหารเป็นท่อที่เริ่มพัฒนาแบ่งเป็นส่วนต่าง ๆ ในระบบทางอาหาร ถุงไข่แดงเล็กลงจากเดิมมากขึ้น พบตับติดกันกับท่อทางเดินอาหารบริเวณทางด้านหน้า และมีการพัฒนาของเนื้อเยื่อไตซึ่งอยู่ใกล้กับบริเวณกระดูกสันหลัง (ภาพที่ 6)



ภาพที่ 6 ลูกปลาหลังฟัก 3 วัน Brain (B), Digestive tract (DT), Gill (G), Kidney (K), Liver (L), Mesencephalon (Me), Spinal cord (Sp), Telencephalon (Te)

หลังจากฟักปลาอายุ 7 และ 15 วัน มีพัฒนาการของระบบอวัยวะสมบูรณ์ ประกอบด้วย ระบบประสาท พบสมองและไขสันหลัง ระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ ตับ ตับอ่อน ระบบหายใจ ได้แก่ เหงือก ระบบเลือด ได้แก่ หัวใจ ม้าม ระบบขับถ่าย ได้แก่ ไต และถุงไข่แดงสลายหลังจากฟัก 7 วัน ลูกปลาเริ่มกินอาหารจากภายนอก (ภาพที่ 7 และ 8)

ภาพที่ 7 ลูกปลาหลังฟัก 7 วัน Cerebrum (Cr), Diencephalon (Di), Gill (G), Intestine (I)Kidney (K), Liver (L), Medula oblongata (Med), Mesencephalon (Me), Spinal cord (Sp), Stomack (S), Swim bladder (SB), Olfactory lobe (OL),

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาพที่ 8 ลูกปลาหลังฟัก 15 วัน Diencephalon (Di), Gall bladder (GB), Gill (G), Intestine (I), Kidney (K), Liver (L), Mesencephalon (Me), Metencephalon (Met), Pancreas (P), Stomack (S), Telencephalon (Te),

วิจารณ์ผล

จากการศึกษาคัพภะของปลาดุกลำพันโดยเมื่อไข่ได้รับการผสมจากเชื้อเพศผู้ ปรับอุณหภูมิให้มีค่าในช่วง 26-28 องศาเซลเซียส ลักษณะไข่เป็นชนิดไข่จมแบบติด (Adhesive dermersal egg) เมื่อปฏิสนธิมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์แบบ Meroblastic Cleavage และใช้เวลาตั้งแต่ปฏิสนธิจนฟักเป็นตัวประมาณ 36 ชั่วโมง ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Kiriratnikorm และคณะ (2007) รายงานว่าลูกปลาดุกลำพันฟักออกจากไข่ในระยะเวลาประมาณ 30-36 ชั่วโมง และรายงานของกฤษณะ เรืองคล้าย และคณะ (2551)ไข่ปลาดุกลำพันใช้เวลาในการฟักตัวประมาณ 33 ชั่วโมง 15 นาที และใกล้เคียงกับระยะเวลาฟักของปลาดุกอื่นๆ ในสกุล Clarias เช่น ปลาดุกด้าน 30 ชั่วโมง (Hossain *et al*., 2006)

หลังจากฟัก ลูกปลามีการพัฒนาของเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆ ตามลำดับ โดยเวลา 21 ชั่วโมงก่อนฟัก เริ่มเห็นส่วนของ Notochord และเซลล์ประสาทเริ่มพัฒนา และพบเนื้อเยื่อสมองหลังจากฟัก 6 ชั่วโมง ซึ่งสมองเป็นส่วนที่ตั้งอยู่บริเวณส่วนหัว สามารถแบ่ง ออกได้เป็นส่วนๆ ตามลักษณะการวางตัวของเซลล์ คือส่วน Molecular Layer เป็นส่วนที่อยู่ด้านนอก ประกอบด้วยเส้นใยและนิวเคลียสจำนวนเล็กน้อย ติดสีน้ำเงินเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี H&E ส่วนด้านใน คือ Granular Layer ประกอบด้วยเซลล์เล็ก รูปกลมจำนวนมาก ย้อมติดสีน้ำเงินเข้มแทรกอยู่กับเส้นใย ระหว่างชั้น Molecular Layer และ Granular Layer พบ Purkinje Cells กระจายอยู่โดยรอบ อีกทั้งยังสามารถแบ่งส่วนของสมองได้ตามการทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของระบบร่างกายได้เช่นกัน และส่วนที่ต่อจากสมองคือไขสันหลัง ซึ่งจะทอดไปตามแนวความยาวของลำตัวจนสุดโคนหาง โดยมีส่วนของ Neural Arch ของกระดูกสันหลัง (Vertebral Column) ห่อหุ้มส่วนไขสันหลังไว้ เนื้อเยื่อกล้ามเนื้อเริ่มมีการพัฒนา เวลา 22 - 30 ชั่วโมงก่อนฟัก กล้ามเนื้อเป็นองค์ประกอบส่วนใหญ่ของร่างกาย ทำงานได้โดยมีการหดตัว (Contraction) ของเซลล์กล้ามเนื้อเมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นภายในเส้นใยกล้ามเนื้อ ประกอบด้วย Myofibrils จำนวนมาก (สุปราณี ชินบุตร และคณะ, 2536) ภายนอกร่างกายถูกปกคลุมด้วยชั้นผิวหนัง เริ่มมีรงควัตถุสีน้ำตาลดำบริเวณชั้นผิวหนังหลังฟัก 3 วัน ปลาดุกลำพันเป็นปลาไม่มีเกล็ด ผิวหนังของปลาโดยทั่วไปเป็นแบบ Unkeratinized mucous membrand ประกอบด้วยชั้นต่างๆ ได้แก่ ผิวหนังชั้นนอก (Epidermis), ผิวหนังชั้นใน (Dermis) และในบางบริเวณพบชั้นไขมัน (Hypodermis) (วิมล เหมะจันทร, 2540) การหายใจของลูกปลาดุกลำพันมีการหายใจผ่านทางเหงือกซึ่งมีการพัฒนาเป็นเหงือกหลังจากฟัก 24 ชั่วโมง แต่ยังไม่มีการแตกแขนงของกิ่งเหงือกจนถึงเวลาประมาณ 3 วันหลังฟัก เหงือกแต่ละอันจะประกอบด้วย Gill Raker เป็นส่วนช่วยบอกถึงลักษณะ การกินอาหารของปลาดุกลำพันว่าเป็นปลากินเนื้อ และซี่เหงือก (Gill Filament) ตั้งอยู่ตรงข้ามกัน บนส่วนของแกนเหงือก ในบริเวณส่วนท้ายของเหงือกแต่ละอันจะมีแกนเหงือกที่โค้งงอขึ้นด้านบน คล้ายกระดูกยื่นออกมา ซี่เหงือก มีลักษณะเป็นแขนงยื่นออกมาจากแกนเหงือก ประกอบด้วย Primary Lamellae และ Secondary Lamellae ซึ่งบริเวณ Secondary Lamellae จะมีเซลล์ Squamous Epithelial Cells ปกคลุมเป็นชั้นเนื้อเยื่อบุผิว ภายในพบ Pillar Cells เชื่อมต่อกันเป็นตัวค้ำจุน เกิดเป็นท่อเลือดขนาดเล็ก ซึ่งเป็นช่องที่เม็ดเลือดผ่านไปแลกเปลี่ยนก๊าซกับน้ำ และพบว่าหลังจากฟัก 24 ชั่วโมงมีการเจริญของเนื้อเยื่อหัวใจ โดยหัวใจของปลาดุกลำพันมีเยื่อหุ้มหัวใจ (Pericardial Sac) ซึ่งเป็นเซลล์แบบชั้นเดียวและมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแทรกหลวมๆ มี 2 ห้อง คือหัวใจห้อง Atrium มีผนังบาง และหัวใจห้อง Ventricle ซึ่งเป็นส่วนที่เห็นเด่นชัด มีสีแดง ผนังหนา จะถูกแบ่งด้วยลิ้นหัวใจ (Valve) สำหรับท่อทางเดินอาหารเริ่มมีการพัฒนาตั้งแต่หลังฟัก 6 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถแยกเป็นอวัยวะได้จนถึงเวลาหลังฟัก 7 วันจึงสามารถแยกเป็นส่วนต่างๆ ได้ คือ กระเพาะอาหาร (Stomach) มีหน้าที่เป็นที่พักอาหารและย่อยอาหาร โดยใช้น้ำย่อยจากต่อมน้ำย่อยที่มีอยู่ในผนังกระเพาะอาหาร (วิมล เหมะจันทร, 2540) ลำไส้ มีหน้าที่ย่อยและดูดซึมอาหาร

ซึ่งลักษณะสำคัญของท่อทางเดินอาหารแต่ละส่วน ประกอบด้วยชั้น Mucosa ยื่นยาวเข้าไปใน Lumen และมีการแตกแขนง เซลล์เยื่อบุเป็นรูปสี่เหลี่ยมทรงสูงชั้นเดียว มีนิวเคลียสรูปรีอยู่ค่อนไปทางด้านฐาน ระหว่างเซลล์เยื่อบุมีต่อมเมือกแทรกอยู่ ถัดลงไปเป็นชั้น Lamina Propria ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆ ค้ำจุนส่วนของ Mucosa ใต้ลงมาเป็นชั้น Submucosa ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเรียงตัวกันแน่น ถัดมาเป็นชั้น Muscularis ประกอบด้วยกล้ามเนื้อเรียบ 2 ชั้น และชั้นนอกสุด คือ ชั้น Serosa มีเซลล์รูปแบนชั้นเดียว ส่วนระบบขับถ่ายของลูกปลาดุกลำพันพบการพัฒนาของเนื้อเยื่อไตหลังฟัก 3 วัน ไตมีหน้าช่วยกำจัดของเสียพวกไนโตรเจน และช่วยควบคุมปริมาณน้ำและเกลือให้สมดุล (วิมล เหมะจันทร, 2540) เนื้อเยื่อไตประกอบด้วยส่วนของท่อไตที่มีลักษณะเป็นเซลล์สี่เหลี่ยมลูกบาศก์เรียงตัว 1 ชั้น และ Glomerulus ซึ่งเป็นกลุ่มของหลอดเลือดฝอย ที่ประกอบด้วย Endothelial Cells ของหลอดเลือดฝอย Basement Lamina และ Visceral Epithelium (Podocytes) ซึ่งเป็นชั้นของ Bowman's Capsule ที่ล้อมรอบ Glomerulus อยู่

พัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาโดยเฉพาะในระบบย่อยอาหารของลูกปลาวัยอ่อนมีการศึกษากันมาก ทั้งนี้เนื่องจากช่วยให้เข้าใจสรีรวิทยาการกินอาหารและการเจริญเติบโตของลูกปลาเพื่อเป็นประโยชน์ในการวางแผนการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนให้มีประสิทธิภาพ (Senger *et al*., 1993; Zaiss *et al*., 2006) สำหรับการทดลองครั้งนี้เริ่มให้อาหารธรรมชาติคืออาร์ทีเมียแก่ลูกปลาในวันที่ 7 หลังฟักออกจากไข่ ซึ่งการเริ่มกินอาหารครั้งแรกเป็นช่วงเวลาวิกฤตสำหรับพัฒนาการลูกปลาวัยอ่อน โดยพบว่าลูกปลามีอัตราการตายสูงในช่วงเวลานี้ (Yufera and Darias, 2007) เมื่อลูกปลาเริ่มกินอาหาร ทางเดินอาหารของลูกปลาจะต้องพร้อมที่จะทำงาน ในช่วงเวลานี้กระบวนการพัฒนาของทางเดินอาหารจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของลูกปลา โดยมีการเพิ่มอัตราการนำเข้าและการย่อยอาหารประกอบกับการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการย่อยและดูดซึมของลูกปลาวัยอ่อน ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตที่เพิ่มขึ้นของลูกปลา (Bengson, 1993) ดังนั้นจึงพบว่าช่วงเวลานี้เป็นช่วงเวลาวิกฤตของลูกปลาที่ต้องได้รับสารอาหารอย่างต่อเนื่องหลังจากสารอาหารภายในถุงไข่แดงหมดลง (Gisbert *et al*., 2004; Pena and Dumas, 2005) มีการศึกษาพบว่าในการอนุบาลลูกปลาหลายชนิดมีการรับสารอาหารแบบผสม คือ แม้ถุงไข่แดงจะยังยุบไม่หมดก็สามารถกินอาหารจากภายนอกได้แล้ว เช่น ปลาดุกยุโรปกินอาหารได้ในวันที่ 4 หลังฟัก ก่อนที่ถุงไข่แดงจะยุบหมด 2 วัน (Kozaric *et al*., 2008) ปลา *Amphiprion percula* สามารถกินอาหารได้ตั้งแต่วันแรกที่ฟัก แม้ถุงไข่แดงจะยุบหลังจากฟักในวันที่ 3 (Onal *et al*., 2008) โดยพบว่าระบบทางเดินอาหารของลูกปลาดังกล่าวมีการพัฒนาส่วนของตับและตับอ่อน ถึงแม้ว่าท่อทางเดินอาหารจะยังไม่สามารถแยกความแตกต่างและพัฒนาเต็มที่ ในช่วงที่มีการกินอาหารจากภายนอกในขณะที่ทางเดินอาหารยังไม่สมบูรณ์ ลูกปลาควรกินอาหารที่มีชีวิต เนื่องจากสามารถอาศัยเอนไซม์ภายในย่อยตัวมันเอง และมีสารอาหารที่เพียงพอต่อการเจริญเติบโตของของลูกปลา (Abol-Munafi *et al*., 2006)

อวัยวะช่วยย่อยในระบบทางเดินอาหารอีกส่วนหนึ่งคือ ตับ ซึ่งมีการพัฒนาก่อนที่ระบบท่อทางเดินอาหารจะพัฒนาแยกเป็นอวัยวะ ตับมีหน้าที่ทั้งด้านการย่อย และสะสมอาหาร โดยตับจะทำหน้าที่สร้างน้ำดีที่ช่วยในการแตกตัวของไขมันและสะสมสารอาหารหลายชนิด เช่น ไขมันในรูปของไตรกลีเซอไรด์ และคาร์โบไฮเดรตในรูปของไกลโคเจน เป็นต้น (Lovell, 1998) โดยการเริ่มสะสมไกลโคเจนและไขมันในลูกปลาวัยอ่อนแต่ละชนิดมีเวลาแตกต่างกันซึ่งเป็นการแสดงถึงความพร้อมของกระบวนการย่อย และดูดซึมอาหาร ดังเช่นในปลาดุกยุโรปที่เริ่มพบการสะสมในระหว่างวันที่ 7-9 หลังฟัก พร้อมกับการพบหยดไขมันบริเวณลำไส้ส่วนต้น (Kozaric *et al*., 2008) เป็นต้น

ถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันพบตั้งแต่แรกฟักจนถึงประมาณ 7 วันหลังฟัก เมื่อเปรียบเทียบกับปลาชนิดอื่นพบว่าถุงไข่แดงของลูกปลาดุกลำพันมีระยะเวลาในการยุบนานกว่า เช่น ปลากดเหลือง (*Mystus nemurus*) ถุงไข่แดงยุบหมดใน 3 วันหลังฟัก (Amornsakun et al.,1997) แต่ใช้เวลาใกล้เคียงกับปลาดุกยุโรปที่ถุงไข่แดงจะยุบหมดใน 6 วันหลังฟัก (Kozaric *et al*., 2008) ซึ่งอาจขึ้นอยู่กับปริมาตรของถุงไข่แดงที่แตกต่างกันจึงใช้เวลาในยุบตัวแตกต่างกัน ทวีสิน (2554) รายงานว่าถุงไข่แดงแรกฟักของลูกปลาดุกลำพันมีปริมาตรเฉลี่ย 1.735 ±0.691 ลูกบาศก์มิลลิเมตร การยุบตัวของถุงไข่แดงเป็นไปในเชิงเส้นตรงซึ่งมีการลดลงค่อนข้างสม่ำเสมอ

นอกจากการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อจะเป็นประโยชน์ในการนำเอาองค์ความรู้ไปใช้ในการช่วยให้การอนุบาลลูกปลาดียิ่งขึ้นและเหมาะสมแล้วยังมีการศึกษาประสิทธิภาพการทำงานของเอนไซม์ชนิดต่างๆ ก็จะช่วยเสริมความรู้ให้การวางแผนอนุบาลลูกปลาวัยอ่อนมีประสิทธิภาพมากขึ้น เช่น การศึกษาเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสซึ่งสามารถใช้บอกความพร้อมในการดูดซึมสารอาหารชนิดต่างๆ เช่น ไขมัน กลูโคส แคลเซียม และฟอสเฟต (Roubaty and Portmann, 1988; Mahmood *et al*., 1994)

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการศึกษา

พัฒนาการของคัพภะของปลาดุกลำพัน มีการเจริญและพัฒนาเป็นขั้นต่างๆ ดังนี้

เวลา	ระยะไข่ที่พบ
5 นาที - 8 ชั่วโมง	Cleavage Stage
7 - 9 ชั่วโมง	Morular Stage
10 - 11 ชั่วโมง	Blastula Stage
15-16 ชั่วโมง	Gastrula Stage
17 - 20 ชั่วโมง	ระยะลำตัวเริ่มเกิดปล้อง (Body Segment Appearance Stage)
36 ชั่วโมง	Hatching Stage

พัฒนาการของลูกปลาวัยอ่อน

เวลา	การเปลี่ยนแปลง
หลังฟัก 6 ชั่วโมง	ปากยังไม่เปิดมีเนื้อเยื่อบางๆ เชื่อมติดกัน พบเนื้อเยื่อสมองเจริญอยู่ด้านบนส่วนหัวแยกออกเป็น 2 ส่วน
หลังฟัก 12 ชั่วโมง	พบ Notochord และมัดกล้ามเนื้อจำนวนหลายมัด
หลังฟัก 18 ชั่วโมง	เนื้อเยื่อสมองเจริญมากขึ้นพบส่วนของ Diocoele
หลังฟัก 24 ชั่วโมง	ปากเริ่มเปิด ท่อทางเดินอาหารเป็นท่อตรง ไม่แบ่งเป็นส่วน ๆ เริ่มเห็นโครงสร้างของเหงือก
หลังฟัก 3 วัน	สมองมีการแบ่งเป็นส่วนต่าง ๆ ชัดเจนขึ้น เหงือกมีการแตกแขนงของกิ่งเหงือก ทางเดินหลอดอาหารพัฒนาแบ่งเป็นส่วนต่าง ๆ ในระบบทางอาหาร มีการพัฒนาของเนื้อเยื่อไต
หลังฟัก 7 และ 15 วัน	มีพัฒนาการของอวัยวะสมบูรณ์ ถุงไข่แดงสลายหลังจากฟัก 7 วัน ลูกปลาเริ่มกินอาหารจากภายนอก

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาพบว่าพบว่าในขั้นตอนการตัดเนื้อเยื่อไข่ปลา เนื่องจากเปลือกไข่ของปลาดุกลำพันมีความแข็ง เมื่อผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อจะทำให้เปลือกไข่แข็งมากขึ้น ดังนั้นจึงควรนำไข่ปลาดุกลำพันมาผ่านกระบวนการทำให้เปลือกไข่มีความนิ่มเพื่อให้ง่ายต่อการตัดมากขึ้น

เอกสารอ้างอิง

จริยา เทพณรงค์ และจิราพร โรจน์ทินกร. (2550). การพัฒนาโอโอไซด์ปลาสวาย (*Pangasianodon hypophthalmus*) ในห้องทดลองโดยอาหารเลี้ยงเซลล์ อุณหภูมิ และฮอร์โมน.วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 1(2) : 122-128.

จิราพร โรจน์ทินกร และจริยา เทพณรงค์. (2549). เทคนิคการศึกษาทางเนื้อเยื่อและเซลล์ของโอโอไซด์ในปลากลุ่ม Catfish.การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2549. กรมประมง ร่วมกับศูนย์พัฒนาประมงเอเชียตะวันออกเฉียงใต้. หน้า 355-377.

ทวีสิน แซ่ลี้. (2554). พัฒนาการทางวิทยาเนื้อเยื่อและฮีสโตเคมีของระบบย่อยอาหารในปลาดุกลำพันระยะวัยอ่อน. วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

เบญจศุภลักษณ์ อุดรโพธิ์. 2545. พัฒนาการทางเนื้อเยื่อวิทยาและฮีสโตเคมีของระบบย่อยอาหารในปลาบู่ทรายระยะวัยอ่อน. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ คณะทรัพยากรธรรมชาติ วิทยานิพนธ์สืบค้นจาก http://202.28.199.3/tdc/browse.php?option=show&browse_type=title&titleid=232211&display=list_subject&q=%BB%C5%D2.

ปริญญา สุทธินนท์, วราห์ เทพาหุดี,อภิชาติ เติมวิชชากร, เรณู ยาชิโร,เมธี แก้วเนิน และพุธชพล สุวรรณชัย (2012). พัฒนาการและความสัมพันธ์ระหว่างความกว้างปากกับความยาวลำตัวของลูกปลากะรังจุดฟ้า (*Plectropomus leopardus* Lacepide, 1802). The 13th Graduate Research Conference KhonKaenUniversith 1-7 กุมภาพันธ์ 2555. สืบค้นจาก http://gsbooks.gs.kku.ac.th/55/cdgrc13/files/sdp2.pdf.

พรพนม พรหมแก้ว. 2538. การศึกษาการเพาะพันธุ์และอนุบาลปลาดุกลำพัน. การสัมมนาวิชาการประจำปี 2538, วันที่ 18-20 กันยายน 2538. กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

พันธสิทธิ์ โชคสวัสดิกร, สุภฎา คีรีรัฐนิคม, กฤษณะ เรืองคล้าย และอานุช คีรีรัฐนิคม. (2551).ผลของระดับความหนาแน่นต่อการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และการรอดตาย ของปลาดุกลำพันระยะปลานิ้วในบ่อคอนกรีต. รายงานการวิจัยมหาวิทยาลัยทักษิณ. สืบค้นจาก http://www.bio.sci.tsu.ac.th/th/personal/academic_files/ 20080 8190348291390.doc.

วิมล เหมะจันทร. 2540. ชีววิทยาปลา. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย : กรุงเทพ

ศราวุธ เจะโส๊ะ, สุวิมล สี่หิรัญวงศ์ และพรพนม พรหมแก้ว. 2538. ชีววิทยาบางประการของปลาดุกลำพัน. รายงานการสัมนาประจำปี 2538 กรมประมง. กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. หน้า 329-348.

สุนิตย์ โรจนพิทยากุล, เจนจิตต์ คงกำเนิด และสรณัฏฐ์ ศิริสวย. (2540). ชีววิทยาและพัฒนาการของลูกปลาเห็ดโคน *Sillago sihama* วัยอ่อนระยะแรกเอกสารวิชาการฉบับที่ 11 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 12 หน้า.

สุปราณี ชินบุตร, กัลยา จำเริญรัตนะ และ ชลอ ลิ้มสุวรรณ. (2536). เนื้อเยื่อวิทยาของปลาช่อน. สถาบันวิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ, กรมประมง.

อภิชาต เติมวิชชาการ และศิริวรรณ สุขศรี. (2551). พัฒนาการและการจำแนกชนิดของลูกปลาดุกวัยอ่อน. วารสารประมง. 61(6): 514-519.

อัธยา อรรถอินทรีย์, สัมพันธ์ จันทร์ดำ และณัฐพล แปลกยอด. (2552). การศึกษาการเพาะพันธุ์และคัพภะวิทยาของปลาหมูคอก (*Yasuhikotakia morleti*). วารสารวิจัยเทคโนโลยีการประมง 3(1) : 25-33.

อาคม สิงหบุญ, ไพบูลย์ บุญลิปตานนท์ และสามารถ เดชสถิต. (2546). พัฒนาการคัพภะและลูกปลาวัยอ่อนของปลาเก๋าเสือ *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskal, 1775) เอกสารวิชาการฉบับที่ 28 สถาบันวิจัยการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำชายฝั่ง, กรมประมง. 29 หน้า.

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

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

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

Bengson, D.A. (1993). A comprehensive program for the evaluation of artificial diets. Journal of the World Aquaculture Society. 24(2): 285–293.

Chessadapa, N., Phromkunthong, W. and Kiriratnikom, S. (2009). Effect of dietary protein levels on growth, feed conversion, survival, protein efficiency ratio and apparent net protein utilization in Nieuhofii's waiking catfish (*Clarias nieuhofii* Valenciennes, 1840) fingerlings. in The 35th congress on science and technology of thailand (STT 35) "Science and technology for a better future". (pp. 240). October 15-17, 2009 The Tide Resort, Chonburi, Thailand. Chonburi :Burapha University.

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

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

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

Humason, G. L. (1967). Animal Tissue Techniques. San Francisco : W.H. Freeman and Company.

Kiriratnikom, S., Ruangklay, K., Choksawatdikorn, P., Anuchart, P. and Kiriratnikom, A. (2007). Effect of various forms of diet on growth performance and survival of nieuhofii catfish larvae (*Clarias nieuhofii*). in33rd Congress on Science and Technology of Thailand. Nakorn Si Thamarat: Walailak University. Retrieved january 30, 2014, from http://www.scisoc.or.th /stt/33/sec_f/paper/ stt33_F_F0007.pdf.

Kozaric, Z., Kuzir, S., Petrinec, Z., Gjurcevic, E. and Bozic, M. (2008). The development of the digestive tract in larval European catfish (*Silurus glanis* L.). Anatomia Histologia Embryologia. 37(2):141-146.

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

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

Micale, V., Garaffo, Genovese, M. L., Spedicato, M.T. and Muglia,U. (2006).The ontogeny of the alimentary tract during larval development in common pandora *Pagellus erythrinus* L. Aquaculture 251 :354– 365.

Onal, U. Langdon, C. and Celik, I. (2008). Ontogeny of the digestive tract of larval percula clownfish, *Amphiprion percula* (Lacépède, 1802): a histological perspective. Aquaculture Research. 39(10): 1077–1086.

Ortiz-Delgado, J.B., Darias, M.J., Cañavate, J.P., Yúfera,M. and Sarasquete, C.(2003). Organogenesis of the digestive tract in the white seabream, *Diplodus sargus* Histological and histochemical approaches. Histology and Histopathology 18 : 1141-1154.

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

Rangsin, W., Areechon, N. and Yoonpundh, R. (2012). Digestive enzyme activities during larval development of Striped catfish, *Pangasianodon hypophthalmus* (Sauvage, 1878). Kasetsart Journal Natural Science. 46 : 217-228.

Roubaty, C. and Portmann, P. (1988). Relation between intestinal alkaline phosphatase activity and brush border membrane transport of inorganic phosphate, D-glucose-6-phosephate. Pflügers Archiv - European Journal of Physiology. 412: 482-490.

Saelee, T., Kiriratnikon, S., Suwanjarat, J., Thongboom, L. and Pongsuwan, K. (2011). The development of the digestive system in *Clarias nieuhofii* larvae : Histology and histochemical studies. Journal of the microscopy society of Thailand 4(1) : 16-19.

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

Valenciennes, A. (1840). *Clarias nieuhofii*. Retrieved June 6, 2013, from http://www.fishbase.org/summary/speciessummary.php?id=23346.

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

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

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

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

ภาคผนวก

สารเคมีสำหรับศึกษาเนื้อเยื่อ (Humason. 1979 : 3-167)

การเตรียมน้ำยาดองเนื้อเยื่อและสีย้อม

1. น้ำยาบูแอง (Bouin's Fluid)

Saturated Aqueous Picric Acid	100	มิลลิลิตร
100% ฟอร์มาลิน	900	มิลลิลิตร
กรดอะซิติก	5	มิลลิลิตร

2. สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (Haematoxylin) เตรียมโดยใช้

ฮีมาทอกซิลิน (Haematoxtlin Crystal)	4	กรัม
โซเดียมไอโอเดท (Sodium Iodate)	0.8	กรัม
อลัม (Potasium Aluminium Sulfate, Alum)	100	กรัม
กรดซิตริก (Citric Acid)	4	กรัม
คลอรัลไฮเดรท (Chloral Hydrate)	200	กรัม
น้ำกลั่น	2,000	มิลลิลิตร

ละลายอลัมลงในน้ำกลั่น เติมฮีมาทอกซิลินผสมจนกระทั่งละลายหมด จึงเติมโซเดียมไอโอเดทผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมกรดซิตริกและคลอรัลไฮเดรทผสมจนกระทั่งเป็นเนื้อเดียวกัน ทิ้งไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำมาใช้งาน

3. สีย้อมอีโอซิน (Eosin) เตรียมโดยใช้

อีโอซิน (Eosin Y.Cl 45380)	1	กรัม
เอทธิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์	1,000	มิลลิลิตร
กรดอะซิติกเข้มข้น	5	มิลลิลิตร

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาววันวิภา หนูมา

ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Wanwipa Nooma

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์

หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ถ.กาญจนวนิช ต.เขารูปช้าง อ.เมือง จ. สงขลา โทรศัพท์ 080-0376704 โทรสาร 074-336950

E-mail wanwipa.no@gmail.com

ประวัติการศึกษา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยทักษิณ จังหวัดสงขลา (พ.ศ. 2551-2554)

วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยทักษิณ จังหวัดสงขลา (พ.ศ. 2547-2551)

สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ ชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์, เนื้อเยื่อวิทยา

ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

งานวิจัยที่สำเร็จแล้ว

ชื่อโครงการวิจัย : ผลของวิตามินซีและอีต่อการเจริญเติบโต, อัตราแลกเนื้อ, ประสิทธิภาพอาหาร, การรอดตาย, องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา, องค์ประกอบเลือดและการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*)

แหล่งทุน : สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

สถานภาพ : หัวหน้าโครงการวิจัย/โครงการสำเร็จแล้ว (28 ตุลาคม 2553 – 28 เมษายน 2554)

ผลงานวิชาการใน Conference proceedings/Abstract books/Presentation

Nooma, W., Malee, F. and Kiriratnikom, S. (2009). “Study on histology of the integument and respiratory system of Nieuhofii’s catfish (*Clarias nieuhofii*)," in The 35th congress on science and technology of thailand (STT 35) "Science and technology for a better future,” (pp. 240). October 15-17, 2009 The Tide Resort, Chonburi, Thailand. Chonburi : Burapha University.

วันวิภา หนูมา และสุภฎา คีรีรัฐนิคม. (2554). “ผลของวิตามินซีและอีต่อการเจริญเติบโต, อัตราแลกเนื้อ, การรอดตาย, องค์ประกอบทางเคมีของตัวปลา และ การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*),” ใน การประชุมวิชาการระดับชาติ “มหาวิทยาลัยบูรพา 2554”. (ซีดีรอม). วันที่ 6-7 กรกฎาคม 2554 ณ อาคาร 50 ปี มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี : มหาวิทยาลัยบูรพา.

วันวิภา หนูมา และสุภฎา คีรีรัฐนิคม. (2554). “ผลของวิตามินซีและอีต่อองค์ประกอบเลือดของปลาดุกลำพัน” ใน การประชุมวิชาการประมง ครั้งที่ 6 “เพื่อความมั่นคงด้านการประมงและทรัพยากรทางน้ำ”. (หน้า 102 - 103). วันที่ 1-3 ธันวาคม 2554 ณ คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จังหวัดเชียงใหม่. เชียงใหม่ : คณะเทคโนโลยีการประมงและทรัพยากรทางน้ำ มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

สุภฎา คีรีรัฐนิคม อานุช คีรีรัฐนิคม และ**วันวิภา หนูมา.** “ความต้องการไขมันในอาหารของปลาดุกลำพัน (*Clarias nieuhofii*) ระยะปลานิ้ว”. ในงานประชุม โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา ครั้งที่ 1 รหัสโครงการ HERP (1)-54(1) สำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาแห่งชาติ (สกอ.) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554

ศิรินุช ทองขาว มุติตา หล่อศรี และ**วันวิภา หนูมา.** ผลของสารอินทรีย์เสริม 3 ชนิดในอาหารสูตร VW และอาหารสูตร ½ MS ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของโปรโตคอร์มว่านหางช้างในสภาพปลอดเชื้อ งานประชุมวิชาการระดับชาติ วลัยลักษณ์วิจัย ครั้งที่ 6 วันที่ 3-4 กรกฎาคม 2557 ณ อาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีและพัฒนานวัตกรรม มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

นูรอารานี สาแม, นูรียะห์ สามะ, มิติ เจียรพันธุ์ และ**วันวิภา หนูมา.** 2558. ความหลากหลายของเห็บในตำบลเขารูปช้าง ตำบลเกาะแต้ว และตำบลทุ่งหวัง จังหวัดสงขลา. การประชุมวิชาการระดับชาติ “ลุ่มน้ำทะเลสาบสงขลา ครั้งที่ 3” 28-29 พฤษภาคม 2558 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

วันวิภา หนูมา. 2558. การศึกษานิเวศวิทยาและความหลากหลายทางชีวภาพของเห็บและจุลินทรีย์ของเห็บในจังหวัดสงขลาและสตูลของประเทศไทย. การประชุมใหญ่โครงการส่งเสริมการวิจัยในอุดมศึกษา ครั้งที่ 3 (HERP congress III) 9-11 มีนาคม 2558 ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช.

ภควดี รักษทอง, **วันวิภา หนูมา**, วัชรีพร ตฤณชาติวณิชย และอรุณี อหันทริก. 2015. ความหลากหลายทางชีวภาพและการกระจายตัวของเห็บในภาคใต้ของประเทศไทย. Rajabhat J. Sci. Humanit. Soc. Sci. 16(2): 310-319.