



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การประมง)

ปริญญา

..... วิทยาศาสตร์การประมง ชีววิทยาประมง

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง

การอ่านอายุจากหนามของปลาฉลามหลังหนาม
(*Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903) ในทะเลอันดามัน

Age Determination from Dorsal Fin Spine of Shortspine Spurdog
(*Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903) in the Andaman Sea

นามผู้วิจัยผู้วิจัย นางสาวกนกวรรณ ไพบูลย์ลีสกุล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(..... รองศาสตราจารย์ธนิษฐา ทรรพนันท์ ใจดี, ปร.ด.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(..... รองศาสตราจารย์ศุภลักษณ์ โรมนันท์ พ.ท.ม.)

หัวหน้าภาควิชา

(..... รองศาสตราจารย์อนงค์ จีระภัทร์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(..... รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การอ่านอายุจากหนามของปลาฉลามหลังหนาม
(*Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903) ในทะเลอันดามัน

Age Determination from Dorsal Fin Spine of Shortspine Spurdog
(*Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903) in the Andaman Sea

โดย

นางสาวกนกวรรณ ไพบูลย์ลีสกุล

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตรการประมง)

พ.ศ. 2556

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

กนกวรรณ ไพบูลย์ลีสกุล 2556: การอ่านอายุจากหนามของปลาฉลามหลังหนาม (*Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903) ในทะเลอันดามัน ปรินญาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย (วิทยาศาสตร์การประมง) สาขาวิทยาศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยา ประมง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ชนิษฐา ทรรพนันท์ ใจดี, ปร.ด. 79 หน้า

เก็บรวบรวมตัวอย่างปลาฉลามหลังหนามจากเรือสำรวจประมงจุฬารักษ์ที่สำรวจบริเวณ ใกล้เคียงทะเลอันดามันจากเครื่องมือเบ็ดราวหน้าดินแนวตั้งและลอบน้ำลึก ช่วงเดือนมีนาคม 2550 เพศผู้จำนวน 20 ตัว และเพศเมีย 45 ตัว ผลการศึกษาอายุจากวงปีของหนามบริเวณครีบหลังอันสอง โดยการอ่านจากผิวหนามด้านนอกประมาณอายุได้ 4 - 12 ปี ความยาวเหยียดของปลาฉลามหลังหนามระหว่าง 43.4 – 72.1 เซนติเมตร มีค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรของการอ่านจากการใช้ผู้อ่าน 2 คน เท่ากับ 22.90% การอ่านอายุจากผิวหนามด้านนอกเปรียบเทียบกับการตัดหนามตามขวางไม่มีความแตกต่างกัน ($\chi^2 = 0.848, p > 0.05$) การวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วมพบว่า ปลาฉลามเพศผู้ และเพศเมียที่อายุเท่ากันมีความยาวเหยียดไม่แตกต่างกัน ($F = 0.9966, p = 0.3221$) ดังนั้นจึงวิเคราะห์ตัวแบบการเติบโต ของฟอนเบอร์ทาแลนฟี ที่เป็นตัวแทนของปลาฉลามหลังหนามทั้ง 2 เพศได้เป็น $L_t = 90.67 \times (1 - e^{-0.12 \times (t+1.72)})$ โดยมีสมการความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนัก จากการศึกษาครั้งนี้คือ $W = 0.0014TL^{3.29}$ ระยะเวลาการตั้งท้องประมาณ 1 ปี 9 เดือน ความยาวแรกฟักเท่ากับ 16.6 เซนติเมตร และผลการศึกษาการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์โดยกระบวนการทางมิถุวิทยา ศึกษาได้เฉพาะในเพศผู้พบระยะการพัฒนา immature spermatozoa และ mature spermatozoa

Kanokwan Paiboonleeskul 2013: Age Determination from Dorsal Fin Spine of Shortspine Spurdog (*Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903) in the Andaman Sea. Master of Science (Fisheries Science), Major Field: Fisheries Science, Department of Fishery Biology. Thesis Advisor: Associate Professor Thanitha Thapanand-Chaidee, Ph.D. 79 pages.

Sixty five samples (20 males and 45 females) of shortspine spurdogs (*Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903) were collected from R.V. Chulabhorn in the continental shelf of the Andaman Sea with bottom vertical longline (BVL) and deep sea trap during March 2007. The second dorsal spine was removed for counting growth band and the estimated ages were between 4 to 12 years with total length of shortspine spurdog ranged from 43.4-72.1 cm. Estimation of age was validated by two readers gave a low Coefficient of Variation (CV) as 22.90% and was implied as consistency of age reading. Age reading from external surface of spine compared to cross section using resin embedding showed non-significant different ($\chi^2 = 0.848, p > 0.05$). Result from Analysis of Covariance (ANCOVA) of length at age between male and female were non-significant different ($F = 0.9966, p = 0.3221$), which indicated that the growth rate between both sex were similar. It is therefore the sex combined of von Bertalanffy growth function was estimated as $L_t = 90.67 \times (1 - e^{-0.12 \times (t+1.72)})$ and the weight-length relationship from this study was $W = 0.0014TL^{3.29}$. The gestation period about 1 years and 9 months and length at birth was about 16.6 cm. The histological study of gonad could study in males showed two stages of developing testes as immature spermatozoa and mature spermatozoa.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ธนัญญา ทรพพนันท์ใจดี ประธานกรรมการ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ศุภลักษณ์ โรมรัตนพันธ์ กรรมการ ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์สาขาวิชารอง ที่ให้คำปรึกษาในการเรียน การค้นคว้างานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ และกราบขอบพระคุณอาจารย์อุไรรัตน์ เนตรหาญ และรองศาสตราจารย์ ดร.เจริญ นิต ธรรมขง ที่ได้ให้คำแนะนำ รวมทั้งกรุณาตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่มอบทุน (ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา) เพื่อการตีพิมพ์ผลงานในวารสารนานาชาติ ปี 2552) สนับสนุนการศึกษาและวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีประมงทะเลเล็ก สำนักวิจัยและพัฒนาประมงทะเล กรมประมง ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปลาฉลามหลังหนามในการศึกษาครั้งนี้ และขอขอบพระคุณ Dr. Michio Fukushima, National Institute of Environmental Studies (NIES) ประเทศญี่ปุ่น, รองศาสตราจารย์ ดร. ทวนทอง จุฑาเกตุ นายพิสิฐ ภูมิคง และนายปิยะเทพ อวาทกุล สาขาประมง คณะเกษตร ศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี สำหรับความอนุเคราะห์เครื่องมือ low speed diamond saw และห้องปฏิบัติการในการเตรียมตัวอย่าง ตลอดจนให้ความช่วยเหลือและคำแนะนำตลอดการทำงาน

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน ว่ากล่าวตักเตือน และคอยให้กำลังใจเสมอมา และขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการวิจัยพลศาสตร์การประมง ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนและเป็นกำลังใจให้ในการทำวิทยานิพนธ์

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณป้า คุณพ่อ คุณแม่ คณาจารย์ ที่คอยให้การสนับสนุน อบรมและคอยให้กำลังใจผู้วิจัยในทุกเรื่อง

กนกวรรณ ไพบูลย์สีสกุล

เมษายน 2556

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	4
การตรวจเอกสาร	5
อุปกรณ์และวิธีการ	35
อุปกรณ์	35
วิธีการ	36
ผลและวิจารณ์ผล	42
สรุปและข้อเสนอแนะ	58
สรุป	58
ข้อเสนอแนะ	59
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	60
ภาคผนวก	68
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	79

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ขนาดแรกสืบพันธุ์ ของปลาฉลามหลังหนาม	13
2	ขนาดแรกสืบพันธุ์ได้ร้อยละ 50 ของปลาฉลามหลังหนาม	13
3	ระยะเวลาในการให้กำเนิด และความยาวแรกฟักของปลาฉลามหลังหนาม	14
4	การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาฉลามเพศผู้	15
5	การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาฉลามเพศเมีย	16
6	ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนัก	22
7	พารามิเตอร์การเติบโต	25
8	ข้อมูลนำเข้าในการวิเคราะห์พารามิเตอร์การเติบโต	51
9	พารามิเตอร์การเติบโต	53
ตารางผนวกที่		
1	ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อการศึกษาทางมิถุนวิทยาด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ	69
2	ขั้นตอนการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (H&E)	70
3	ข้อมูลปลาฉลามหลังหนาม และอายุที่อ่านจากวิธีฟันหนามด้านนอก	71

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทั่วไปของปลาฉลาม	5
2	ลักษณะทั่วไปของปลาฉลาม ลักษณะปากและตา	6
3	ลักษณะของหนามบริเวณครีบหลังอันแรก	7
4	ลักษณะทั่วไปของหางปลาฉลาม	7
5	<i>Squalus mitsukurii</i> Jordan & Snyder, 1903	9
6	บริเวณการแพร่กระจายของปลาฉลามหลังหนาม	9
7	บริเวณการแพร่กระจายของปลาฉลามหลังหนามในเขตร้อน	10
8	ระบบสืบพันธุ์ของ <i>Squalus acanthias</i>	12
9	การพัฒนาตัวอ่อนปลาฉลามในถุงหุ้มไข่ภายในตัวแม่	20
10	เส้นโค้งการเติบโตในรูปของความยาว ตามตัวแบบการเติบโตของ ฟอนเบอร์ทาแลนฟี	23
11	เส้นโค้งการเติบโตในรูปของน้ำหนัก ตามตัวแบบการเติบโตของ ฟอนเบอร์ทาแลนฟี	23
12	โครงสร้างหนามภายนอกของ <i>Cntrophorus acus</i>	26
13	โครงสร้างของหนาม	27
14	โครงสร้างหนามของ <i>Squalus acanthias</i>	28
15	ภาพแสดงการจำแนกวงปี	29
16	ภาพตัดตามขวางหนามของ <i>Squalus blainvillei</i>	29
17	หนามครีบหลังอันแรกและหนามครีบหลังอันสอง	36
18	การวัดขนาดของหนาม	37
19	ลักษณะกระดูกสันหลัง	43
20	โครงสร้างภายนอกของหนามปลาฉลามหลังหนาม	43
21	โครงสร้างภายในของหนามปลาฉลามหลังหนาม	44
22	การประมาณอายุจากผิวหนามด้านนอกของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนาม ประมาณอายุได้ 9 ปี	44
23	การประมาณอายุในชั้น inner dentine จากการตัดตัวอย่างหนามตามขวาง ของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนาม ประมาณอายุได้ 9 ปี	45

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
24	ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเหยียดของปลาและEBD จากหนามของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนามจำนวน 65 ตัวอย่าง	46
25	อายุและความยาวเหยียดของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนามเพศผู้และเพศเมีย	47
26	ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเหยียดและน้ำหนักของปลาฉลามหลังหนาม	48
27	ตัวอย่างปลาฉลามหลังหนาม	49
28	หนามของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนาม	50
29	การติดตามเส้นโค้งการเติบโต	51
30	การติดตามเส้นโค้งการเติบโต และเส้นโค้งการเติบโตวิธีฟอร์ดและวอล์ฟฟอร์ด	52
31	การติดตามเส้นโค้งการเติบโต และเส้นโค้งการเติบโต	53
32	ลักษณะภายในของอวัยวะระยะการพัฒนากของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกระยะที่ 1	56
33	ลักษณะภายในของอวัยวะระยะการพัฒนากของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกระยะที่ 2	57
ภาพผนวกที่		
1	หนามที่ฝังในน้ำยาเรซิน	76
2	ท่าตำแหน่งก่อนการตัดตัวอย่าง	76
3	เครื่องมือ low speed diamond saw	77
4	ตัวอย่างหนามที่ผ่านการตัดตามขวาง	77
5	ตัวอย่างหนามที่ตัดแล้วติดลงบนแผ่นสไลด์	78
6	ขีดตัวอย่างให้มีความหนาประมาณ 200-400 ไมโครเมตร	78

การอ่านอายุจากหนามของปลาฉลามหลังหนาม
(*Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903) ในทะเลอันดามัน

Age Determination from Dorsal Fin Spine of Shortspine Spurdog
(*Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903) in the Andaman Sea

คำนำ

ปลาฉลามเป็นปลากระดูกอ่อน (elasmobranch) ลำตัวเพรีชยาวแบบกระสวย (fusiform) ว่ายน้ำได้ว่องไว มีเกล็ดปกคลุมแบบปลาโคยด์ (placoid) คือ เป็นแผ่นฐานสี่เหลี่ยมเรียงต่อกัน มีหนามยื่นไปทางด้านท้ายลำตัว มีทั้งครีบคู่ และครีบเดี่ยว หางเป็นแบบ heterocercal คือ หางแยกเป็นสองแฉก โดยแฉกบนจะใหญ่และยาวกว่าแฉกด้านล่าง หัวแบน ปากยาวตามขวางทางด้านท้อง มีตา 1 คู่ ก่อนข้างรีแบบไข่ มีช่องเหงือก (gill openings) 5-7 ช่อง มีการสืบพันธุ์แบบแยกเพศ (dioecious) การปฏิสนธิเป็นแบบภายในตัว (internal fertilization) ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิมีการเจริญและพัฒนา 3 แบบ ได้แก่ oviparous ไข่ได้รับการปฏิสนธิภายในร่างกาย ตัวอ่อนเจริญและพัฒนาโดยอาศัยอาหารจากถุงไข่แดง viviparous ไข่ได้รับการปฏิสนธิภายในตัว ตัวอ่อนเจริญและพัฒนาโดยอาศัยอาหารทางสายสะดือ และ ovoviviparous ไข่ได้รับการผสมภายใน ตัวอ่อนเจริญและพัฒนาโดยอาศัยอาหารที่สะสมไว้ในไข่ (yolk sac) (สุภาพร, 2550)

ปลาฉลามหลังหนาม (*Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903) หรือ shortspine spurdog จัดอยู่ในสกุล *Squalus* ครอบครัวย *Squalidae* เป็นปลาฉลามที่อาศัยบริเวณหน้าดิน แนวไหล่ทวีป จากผิวน้ำถึงระดับความลึก 950 เมตร (Froese and Pauly, 2006) ส่วนใหญ่อยู่ที่ระดับความลึก 100 ถึง 700 เมตร มีการแพร่กระจายเป็นบริเวณกว้างในมหาสมุทรแปซิฟิก และมหาสมุทรอินเดีย (Cavanagh *et al.*, 2007) จากการรายงานของ ชนิษฐา และคณะ (2551) พบว่าปลาฉลามหลังหนาม มีการแพร่กระจายบริเวณเขตไหล่ทวีประดับความลึกตั้งแต่ 90 เมตร ในเขตน่านน้ำไทยทางฝั่งทะเลอันดามัน

แนวโน้มของปริมาณการจับปลาฉลามทุกชนิดในน่านน้ำไทย จากข้อมูลสถิติกรมประมง แห่งประเทศไทยตั้งแต่ พ.ศ. 2535-2548 พบว่าในพ.ศ. 2535 จับปลาฉลามได้ 2,210 ตัน และเพิ่ม มากขึ้นตั้งแต่ พ.ศ. 2538 จนมีปริมาณการจับเพิ่มสูงสุดเป็น 14,400 ตันในพ.ศ. 2546 จากนั้นลดลง เหลือ 7,800 ตันในพ.ศ. 2548 เครื่องมือประมงพาณิชย์ที่สามารถจับปลาฉลามได้มีหลากหลายชนิด แต่ไม่มีเครื่องมือที่จับปลาฉลามโดยเฉพาะ อนุวัฒน์ และอมรา (2545) และ Southeast Asian Fisheries Development (SEAFDEC) (2004) รายงานว่า ระหว่าง พ.ศ. 2528-2545 เครื่องมือที่ สามารถจับปลาฉลามได้มากที่สุดทางฝั่งอ่าวไทยและอันดามัน คือ อวนลากแผ่นตะเฆ่ โดยมี ปริมาณการจับเฉลี่ย 3,059 ตัน หรือร้อยละ 80.46 ของปริมาณการจับปลาฉลามทางฝั่งอ่าวไทย และ 1,755 ตัน หรือร้อยละ 78.76 ของปริมาณการจับปลาฉลามทางฝั่งอันดามัน ตามลำดับ นอกจากนี้ สามารถจับปลาฉลามหลังหนามได้ด้วยเครื่องมือเบ็ดราวหน้าดินแนวตั้งและลอบน้ำลึก (ธนินฐา และคณะ, 2551) สาเหตุหลักของการลดลงของปริมาณปลาฉลาม คือ การทำประมง ความต้องการ ทางตลาด เช่น การบริโภคในรูปของเนื้อฉลามแช่แข็งหรือหูฉลามแห้ง หรือการนำกระดูกอ่อนและ ตับมาแปรรูปทางอุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์ทางด้านเภสัชกรรม นอกจากนี้ลักษณะทางชีววิทยาของ ปลาฉลามที่มีการเติบโตช้า การตั้งท้องนาน ออกลูกช้า และมีจำนวนน้อย ทำให้เป็นการเร่งการ ลดลงของปลาฉลามมากขึ้น และในปลาฉลามหลังหนามก็มีปริมาณลดลงเช่นกัน จากการรายงาน ผลจับของปลาฉลามหลังหนามในบริเวณน่านน้ำของประเทศออสเตรเลีย พ.ศ. 2519-2520 มีผลจับ เฉลี่ย 44.8 กิโลกรัมต่อชั่วโมง แต่ในพ.ศ. 2539-2540 ลดลงเหลือเพียง 1.2 กิโลกรัมต่อชั่วโมง (Cavanagh *et al.*, 2003) และลักษณะทางชีววิทยา มีการสืบพันธุ์แบบแยกเพศที่ปฏิสนธิภายในตัว ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิมีการเจริญและพัฒนาแบบ ovoviviparous ออกลูกครั้งละ 4-10 ตัว (อนุวัฒน์ และอมรา, 2545; Compagno, 1984) อย่างไรก็ตาม จากการประเมินสถานภาพตามเกณฑ์การ พิจารณาของสหภาพนานาชาติเพื่อการอนุรักษ์ธรรมชาติและทรัพยากรธรรมชาติ (International Union of Conservation of Nature and Natural Resources: IUCN) ยังคงจัดสถานภาพปลาฉลามหลัง หนามอยู่ในระดับ Data Deficient (DD) หมายถึง สัตว์ป่าชนิดพันธุ์ที่มีข้อมูลไม่เพียงพอในการ ประเมินความเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ (Cavanagh *et al.*, 2007) แต่ตามการประเมินของประเทศ ออสเตรเลีย และประเทศนิวซีแลนด์ได้จัดให้ปลาฉลามชนิดพันธุ์นี้อยู่ในระดับ Endangered Species (EN) หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่ใกล้การสูญพันธุ์และ Near Threatened (NT) หมายถึง สิ่งมีชีวิตที่เกือบอยู่ ในข่ายเสี่ยงต่อการสูญพันธุ์ ตามลำดับ โดยพิจารณาจากประชากรของปลาฉลามชนิดนี้ในแต่ละ ประเทศ (Cavanagh *et al.*, 2003)

ในปัจจุบันข้อมูลด้านชีววิทยาของปลาฉลามหลังหนามยังมีน้อยรวมถึงในประเทศไทย การศึกษาอายุและการเติบโตในครั้งนี้ คาดว่าจะได้รับประโยชน์ด้านวิธีการศึกษาอายุและเติบโตของปลาฉลามหลังหนามจากโครงสร้างแข็ง เพื่อนำข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้ไปใช้เป็นแนวทางในการศึกษาอายุและการเติบโตในปลาฉลามชนิดอื่น รวมถึงเป็นข้อมูลพื้นฐานทางด้านชีววิทยาบางประการของปลาฉลามชนิดนี้ ตลอดจนการใช้ประกอบการพิจารณาการประเมินสถานะทรัพยากรของปลาฉลามหลังหนาม รวมถึงปลาฉลามชนิดอื่นๆ ต่อไป



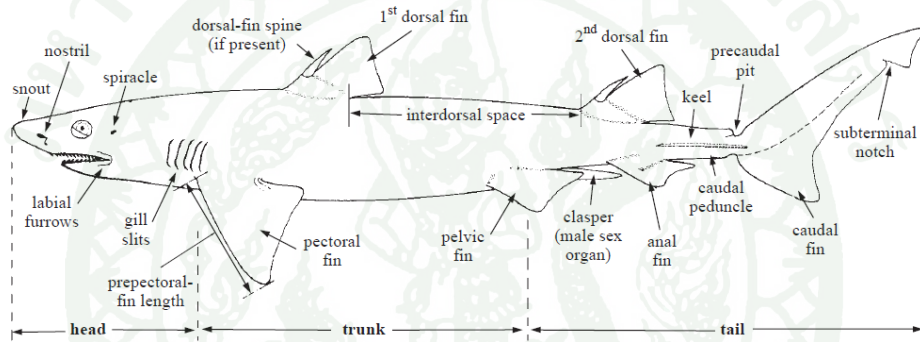
วัตถุประสงค์

1. ศึกษาเทคนิคการอ่านวงปีจากส่วนแข็ง
2. วิเคราะห์อายุจากการอ่านวงปีจากส่วนแข็ง
3. วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างอายุกับความยาวของปลาฉลาม และชีววิทยาอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเติบโต
4. ศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางมิถุนวิทยา (histology) ของอวัยวะสืบพันธุ์

การตรวจเอกสาร

1. ลักษณะทั่วไปของปลาฉลาม

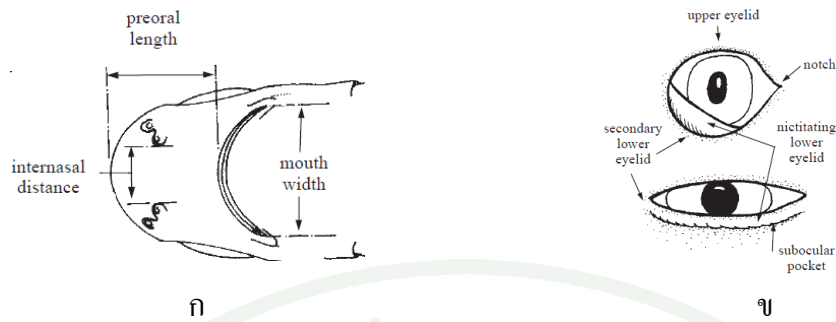
ปลาฉลามมีลำตัวเพรีชวยาวแบบกระสวย (fusiform) ลำตัวแบ่งเป็น 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว ลำตัว และหาง (ภาพที่ 1) ส่วนหัวเริ่มจากบริเวณปลายสุดของจงอยปากไปถึงช่องเหงือกช่องสุดท้าย ส่วนลำตัววัดจากช่องเหงือกช่องสุดท้ายไปถึงรูก้น และส่วนหางจากรูก้นไปจนสุดปลายของครีบทหาง



ภาพที่ 1 ลักษณะทั่วไปของปลาฉลาม

ที่มา: Compango (2002)

ส่วนหัว ประกอบด้วย จงอยปาก (snout) มักยาวแหลมและแบนลง อยู่บริเวณปลายสุดด้านหน้า ตำแหน่งที่ตั้งของปากอยู่ทางด้านล่าง (inferior) ตอนหน้าของส่วนหัว ลักษณะคล้ายรูปพระจันทร์เสี้ยว (ภาพที่ 2ก) จมูก (nostrils) มี 1 คู่ อยู่ด้านหน้าปาก ตา (eyes) มีลักษณะค่อนข้างรี ยาวรูปไข่ บางชนิดอาจมีเยื่อหุ้มตา (nictitating membrane) (ภาพที่ 2ข) มีช่องหายใจ (spiracle) อยู่ทางด้านหลังตา สำหรับช่วยในการหายใจ มีช่องเหงือก (gill slit) 5-7 คู่ อยู่ทางด้านข้างทั้งสองด้าน



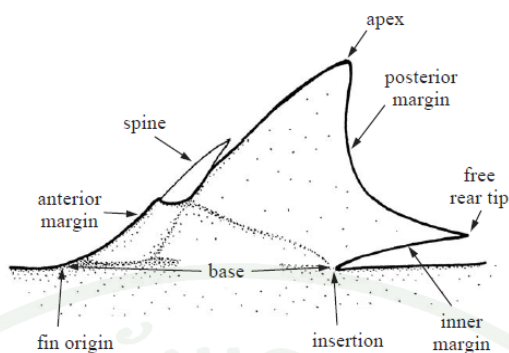
ภาพที่ 2 ลักษณะทั่วไปของปลาฉลาม

ก. ลักษณะของปาก

ข. ลักษณะตา

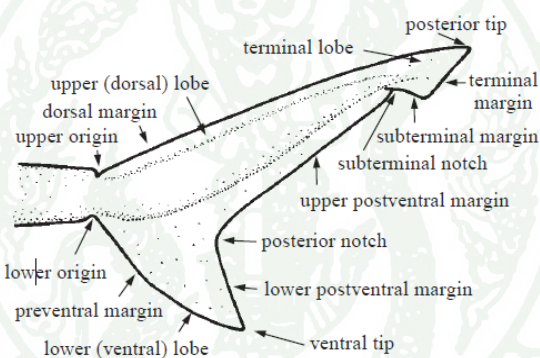
ที่มา: Compango (2002)

ส่วนลำตัวและส่วนหาง ประกอบด้วยครีบเดี่ยวและครีบคู่ ครีบคู่ ได้แก่ ครีบอกหรือครีบหู (pectoral fin) อยู่ใกล้บริเวณส่วนหัวทางด้านล่างจะขนานในแนวราบ ช่วยในการพยุงตัว และเคลื่อนที่ ครีบท้อง (pelvic fin) อยู่บริเวณส่วนท้ายของลำตัว ใกล้กับรูก้น ส่วนครีบเดี่ยว ได้แก่ ครีบหลังอันที่หนึ่ง (first dorsal fin) ครีบหลังอันที่สอง (second dorsal fin) ในปลาฉลามหลังหนาม จะมีหนาม (spine) ที่บริเวณครีบหลัง (ภาพที่ 3) ครีบก้น (anal fin) อยู่ด้านหลังรูก้นยาวไปทางด้านหลัง ปลาฉลามเพศผู้มี clasper เป็นอวัยวะที่ช่วยในการสืบพันธุ์ติดอยู่ทางด้านในของครีบท้อง ครีบหาง (caudal fin) เป็นแบบ heterocercal tail คือ แพนหางด้านบน (upper lobe) ยาวกว่าแพนหางด้านล่าง (lower lobe) (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ลักษณะของหนามบริเวณคืบหลังอันแรก

ที่มา: Compango (2002)



ภาพที่ 4 ลักษณะทั่วไปของหางปลาฉลาม

ที่มา: Compango (2002)

2. ลักษณะทางอนุกรมวิธานของปลาฉลามหลังหนาม

ปลาฉลามหลังหนามชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903 (ภาพที่ 5) มีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า shortspine spurdog และชื่อสามัญทางภาษาไทยว่า ปลาฉลามแมว หรือปลาฉลามหลังหนาม Bailly (2009) ได้จัดจำแนกลักษณะทางอนุกรมวิธาน ดังนี้

Phylum	Chordata
Subphylum	Vertebrae
Class	Elasmobranchii
Subclass	Neoselachii
Superorder	Squalomorphi
Order	Squaliformes
Family	Squalidae
Genus	Squalus
Species	<i>Squalus mitsukurii</i> Jordan & Snyder, 1903

ปลาฉลามในวงศ์ Squalidae (dogfish sharks) อยู่ใน Order Squaliformes มีการแพร่กระจายทั่วไปบริเวณมหาสมุทรแอตแลนติก มหาสมุทรอินเดีย และมหาสมุทรแปซิฟิกในเขตร้อน ลักษณะสำคัญของปลาฉลามในกลุ่มนี้คือ ครีบหลังทั้งสองมีหนาม (spines) ที่ไม่มีร่อง (grooves) ไม่มีครีบก้น (anal fin) มีช่องเหงือก (gill slits) 5 ช่อง และมีช่องอากาศ (spiracle) 2 ช่อง ด้านข้างของคอคอดหาง (caudal peduncle) มีสันนูนขึ้นมาหนึ่งคู่ (lateral keels) และมีร่องตื้นด้านบน (precaudal pit) (Nelson, 1994)

ในการจำแนกชนิดทางอนุกรมวิธาน นักอนุกรมวิธานยังมีความสับสนและไม่มั่นใจในการจำแนกชนิดของปลาฉลามชนิดนี้ออกจากปลาฉลามชนิดอื่นๆ ในวงศ์เดียวกัน โดยเฉพาะ *Squalus acanthias* (Cavanagh *et al.*, 2003) ปลาฉลามหลังหนามมีรูปร่างแบบ elongate ปากอยู่ในตำแหน่ง inferior จงอยปากค่อนข้างยาว กว้าง และมน ตาอยู่ในตำแหน่งด้านข้างแต่ไม่มีเยื่อหุ้มตาลำตัวไม่มีจุดสีขาว ส่วนหลังมีสีเทา ท้องสีขาว มีช่องอากาศขนาดใหญ่ มีช่องเหงือก 5 ช่อง อยู่ทางด้านหน้าครีบทู ครีบหลังมี 2 อัน โดยครีบหลังอันแรกจะมีขนาดใหญ่กว่า ยอดหนามที่ครีบหลังอันแรกมีสีดำ ค่อนข้างยาว และหนามของครีบหลังอันที่สองมีความยาวเท่ากับความสูงของครีบหลัง ครีบท้อง มีลักษณะกว้างและค่อนข้างโค้ง ครีบทู อยู่ในตำแหน่งใกล้กับครีบหลังอันที่สอง และในปลาฉลามหลังหนามจะไม่มีครีบก้น หางเป็นแบบ heterocercal tail ครีบทูมีลักษณะเป็นแบนแคบและยาว บริเวณของคอคอดหางมี precaudal pit และ lateral keel



ภาพที่ 5 *Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903

3. การแพร่กระจายและถิ่นอาศัย

ปลาลามหลังนามมีการแพร่กระจายบริเวณมหาสมุทรแปซิฟิกเหนือทางฝั่งตะวันตกในประเทศจีน ไต้หวัน มหาสมุทรแปซิฟิกใต้ทางฝั่งตะวันตกในประเทศนิวซีแลนด์ มหาสมุทรแปซิฟิกตอนกลาง เช่นทางเกาะฮาวาย (ภาพที่ 6) ชายฝั่งของประเทศออสเตรเลีย ฟิลิปปินส์ มหาสมุทรอินเดีย ถิ่นอาศัยอยู่แถบทะเลเขตอบอุ่นและเขตร้อน บริเวณที่ใกล้หรือพื้นทะเลส่วนที่เป็นไหล่ทวีป ที่ระดับความลึกต่างๆ เช่น บริเวณเกาะฮาวายพบที่ระดับความลึก 165 – 518 เมตร บริเวณชายฝั่งของฟิลิปปินส์ 50 – 740 เมตร บริเวณชายฝั่งทางตอนใต้ของออสเตรเลียและทัสมาเนียพบที่ระดับความลึก 190 เมตร เป็นต้น (Compagno, 1984)

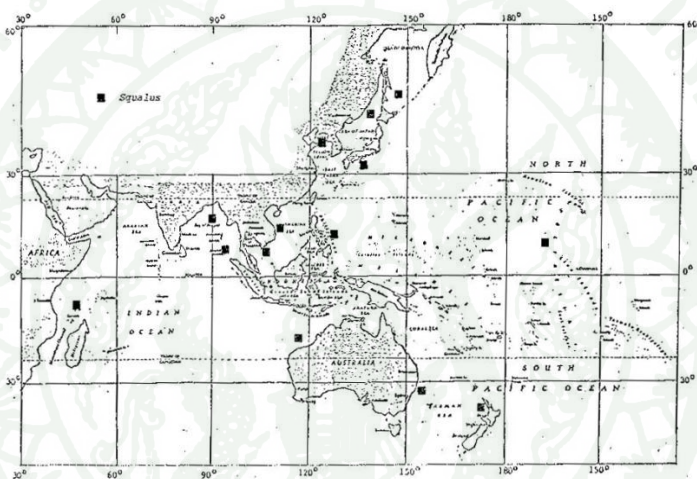


ภาพที่ 6 บริเวณการแพร่กระจายของปลาลามหลังนาม

ที่มา: Compagno (1984)

ปลาฉลามหลังหนามมีการแพร่กระจายเป็นบริเวณกว้างในมหาสมุทรอินเดีย แปซิฟิก และแอนแลนติก อาศัยบริเวณที่เป็นแหล่งน้ำตื้นบริเวณเกาะ และบริเวณพื้นที่ท้องทะเล ส่วนใหญ่พบที่ระดับความลึก 100 – 700 เมตร (Cavanagh *et al.*, 2003)

Monkolprasit (1989) ศึกษาปลาระดุกอ่อนที่พบในน่านน้ำไทยและพื้นที่ติดกัน (สิงคโปร์, อ่าวเบงกอล และทะเลจีนใต้) พบ *Squalus mitsukurii* และ *Squalus acanthias* โดยทั่วไปมีการแพร่กระจายอย่างกว้างในเขตร้อน (ภาพที่ 7) อาศัยอยู่ระหว่างผิวน้ำจนถึงระดับความลึกมากกว่า 150 เมตร สามารถจับได้ด้วยเครื่องมือเบ็ดราว อวนลาก ฯลฯ



ภาพที่ 7 บริเวณการแพร่กระจายของปลาฉลามหลังหนามในเขตร้อน

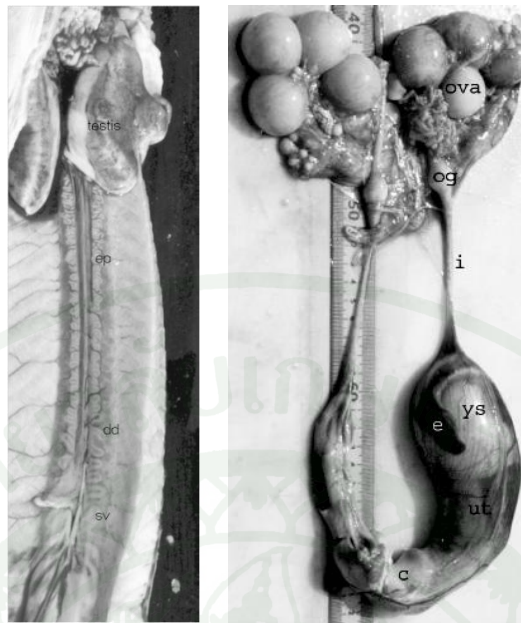
ที่มา: Monkolprasit (1989)

4. อุปนิสัยการกินอาหาร

ปลาฉลามหลังหนามเป็นปลาที่มีพฤติกรรมการรวมฝูงเพื่อหาอาหาร ภายในฝูงจะเป็นเพศเดียวกันและมีขนาดใกล้เคียงกัน (Cavanagh *et al.*, 2003) อาหารเป็นพวกปลาระดุกแข็ง ปลาหมึก ครัสเตเชีย แมงกะพรุน ปลาฉลามหรือปลาที่มีขนาดเล็กกว่าและไข่ปลาฉลาม (Kiraly *et al.*, 2003; Monkolprasit, 1989) โดยหาอาหารกินบริเวณใกล้พื้นทะเล

5. การสืบพันธุ์

ระบบสืบพันธุ์ของปลาฉลามเพศผู้ (ภาพที่ 8ก) ประกอบด้วย อัณฑะ (testes) ทำหน้าที่สร้างสเปิร์มและซอร์โมน, genital ducts (ductus efferens, epididymis, ท่อนำน้ำเชื้อ: ductus deferens และ ถุงเก็บสเปิร์ม: seminal vesicle), accessory gland เป็นต่อมที่สร้างอาหารเพื่อไปเลี้ยงเลี้ยงสเปิร์ม และมีคลาสเปอร์ (claspers) เป็นอวัยวะช่วยในการสืบพันธุ์ ซึ่งจะมีการปล่อยน้ำเชื้อเข้าไปผสมกับไข่ในตัวเมียผ่านทางคลาสเปอร์ Conrath (2005b) อ้างถึง Pratt (1988) ได้มีการจำแนกรูปแบบของอัณฑะในปลากระดูกอ่อน โดยจำแนกตามรูปแบบต้นกำเนิดของ seminiferous follicle และการแพร่กระจายได้ 3 แบบ คือ แบบ radial, แบบ diametric และแบบ compound การสร้างอสุจิของปลาเพศผู้เกิดในส่วนของ seminiferous tubules แล้วส่งต่อมาทางท่อนำน้ำเชื้อ เข้าสู่ถุงเก็บสเปิร์ม พร้อมปล่อยออกสู่ตัวเมียทางคลาสเปอร์ ขนาดของคลาสเปอร์จะแตกต่างกันตามขนาดหรืออายุและชนิดพันธุ์



ก

ข

ภาพที่ 8 ระบบสืบพันธุ์ของ *Squalus acanthias*

ก. เพศผู้

ข. เพศเมีย

หมายเหตุ ep = epididymis, dd = ductis defferents, sv = seminal vesicle
 ov = oviducal gland, ova = ovary, i =isthmus, e = uterine embryo,
 ys = embryonic yolk sac, ut = uterus และ c = cervix

ที่มา: Conrath (2005a)

อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย คือ รังไข่ (ovary) ซึ่งในปลาฉลามและกระเบนบางชนิดจะมีรังไข่พัฒนาด้านขวาเพียงด้านเดียว (Conrath, 2005a) ระบบสืบพันธุ์ของเพศเมีย ประกอบด้วย รังไข่ (ovary), ต่อมท่อนำไข่ (oviduct gland), isthmus, ถุงไข่แดง (yolk sac), มดลูก (uterus) และปากมดลูก (cervix) (ภาพที่ 8ข) ปลาฉลามเพศเมียมี cloaca เป็นช่องเปิดของท่อทางเดินอาหารและท่อจากระบบสืบพันธุ์ที่มาเปิดร่วมกัน

การสืบพันธุ์ของปลาฉลามหลังหนามเป็นแบบแยกเพศ ก่อนการผสมพันธุ์ ปลาฉลามเพศผู้จะไล่ตามและกัดปลาฉลามเพศเมียตัวที่สนใจ สามารถสังเกตเห็นรอยแผลบนตัวของปลาฉลามเพศเมียได้ (ชาญชัย, 2546; Conrath, 2005a) การปฏิสนธิเป็นแบบภายในตัว (internal fertilization) ไข่ที่ได้รับการผสมจะออกลูกเป็นตัวโดยไม่มีรก (aplacental viviparous) (Conrath, 2005a) คือเมื่อไข่ได้รับการผสมภายในตัว ตัวอ่อนจะพัฒนาโดยอาศัยอาหารจากไข่แดงซึ่งถูกเก็บสะสมในถุงที่ติดกับตัวอ่อนเอง จะมีมดลูกเพียงป้องกันอันตราย (ชาญชัย, 2546)

ขนาดแรกสืบพันธุ์ (size at first maturity) ปลาฉลามหลังหนามมีขนาดแรกสืบพันธุ์ต่างกันตามพื้นที่ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ขนาดแรกสืบพันธุ์ ของปลาฉลามหลังหนาม

พื้นที่	ขนาดแรกสืบพันธุ์ (ซม.)		ที่มา
	เพศผู้	เพศเมีย	
Off the east coast of S. Africa - S Atlantic	58-60	69	Bass <i>et al.</i> (1976)
Rio de la Plata Mouth - SW Atlantic	51-55	52-60	Lucifora <i>et al.</i> (1999)
E. coast of S. Africa – S Atlantic	65	72	Compagno (1984)

ขนาดสืบพันธุ์ได้ร้อยละ 50 (size at 50% maturity) ปลาฉลามหลังหนามมีขนาดสืบพันธุ์ได้ร้อยละ 50 ดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ขนาดแรกสืบพันธุ์ได้ร้อยละ 50 ของปลาฉลามหลังหนาม

พื้นที่	ขนาดแรกสืบพันธุ์ได้		ที่มา
	ร้อยละ 50 (ซม.)		
	เพศผู้	เพศเมีย	
SE Hancock Seamount-Central North Pacific	48	69	Wilson and Seki (1994)
NE Brazil – SW equatorial Atlantic Ocean	65	77.8	Fischer <i>et al.</i> (2006)
Uruguayan continental shelf, SW Atlantic	43.1	51.9	Oddone <i>et al.</i> (2010)

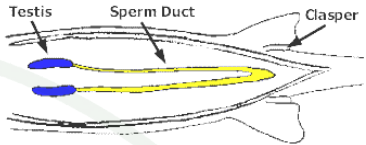
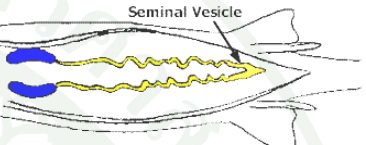


ช่วงเวลาในการให้กำเนิด (parturition) และความยาวแรกฟักของปลาฉลาม
หลังหามได้มีผู้ศึกษาไว้หลายท่าน ซึ่งสามารถสรุปได้ ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ระยะเวลาในการให้กำเนิด และความยาวแรกฟักของปลาฉลามหลังหาม

พื้นที่	ระยะเวลาในการ ให้กำเนิด	ความยาวแรกฟัก (ซม.)	ที่มา
Off the east coast of S. Africa - S Atlantic	ช่วงเดือน เมษายน	22-26	Bass <i>et al.</i> (1976)
SE Hancock Seamount-Central North Pacific	ส่วนมากในฤดู ใบไม้ร่วง	22-26	Compagno (1984)
SE Hancock Seamount-Central North Pacific	-	21-26	Wilson and Seki (1994)
NE Brazil – SW equatorial Atlantic Ocean	ช่วงฤดูร้อน	22.5	Fischer <i>et al.</i> (2006)
Uruguayan continental shelf, SW Atlantic	ฤดูใบไม้ร่วง ถึง ฤดูหนาว	22-24	Oddone <i>et al.</i> (2010)

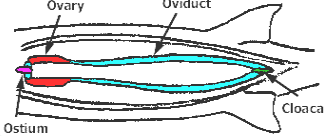


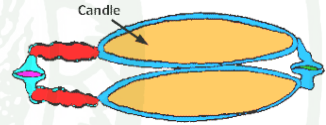
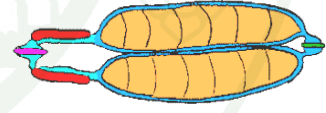
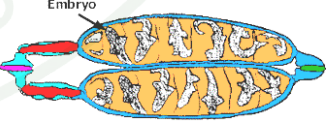
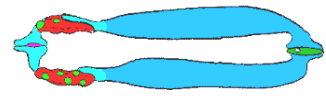
การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาฉลาม แบ่งระยะการเจริญพันธุ์ของปลาฉลาม
จากลักษณะภายนอก (Anon, 2008; วราพร, 2552; Clarke *et al.*, 2002) ดังตารางที่ 4 และ 5

ตารางที่ 4 การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาฉลามเพศผู้

ระยะการพัฒนา	ลักษณะการพัฒนา
<p>ระยะที่ 1 Juvenile</p> <p>คลาสเปอร์ยังไม่พัฒนา ถุงอัณฑะมีขนาดเล็ก, สีขาว ท่อนำน้ำเชื้อเป็นเส้นตรง</p>	
<p>ระยะที่ 2 Sub-adult</p> <p>คลาสเปอร์มีลักษณะเป็นแท่ง แต่มีความอ่อนนุ่มและยืดหยุ่น ถุงอัณฑะมีขนาดใหญ่ขึ้น ท่อนำน้ำเชื้อคดไปคดมา</p>	
<p>ระยะที่ 3 Adult</p> <p>คลาสเปอร์พัฒนาเต็มที่ ลักษณะเป็นแท่งแข็ง ถุงอัณฑะมีสีค่อนข้างแดง ภายในเต็มไปด้วยน้ำเชื้อ ท่อนำน้ำเชื้อขดแน่น</p>	
<p>ระยะที่ 4 Active</p> <p>เป็นระยะพร้อมสืบพันธุ์ คลาสเปอร์ยื่นยาวและบวม มีร่อง ถุงอัณฑะบวมภายในมีน้ำเชื้ออยู่เต็ม พร้อมในการปล่อยสุร่งของอวัยวะที่ใช้ในการสืบพันธุ์</p>	

ที่มา: Anon (2008)

ตารางที่ 5 การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาฉลามเพศเมีย

ระยะพัฒนาการ	ลักษณะพัฒนาการ
<p><u>ระยะที่ 1 Juvenile</u></p> <p>ระบบการสืบพันธุ์ยังไม่พัฒนา รังไข่มีขนาดเล็ก เม็ดไข่ยังมีขนาดเล็ก และท่อนำไข่เป็นเส้นตรง</p>	
<p><u>ระยะที่ 2 Ripening</u></p> <p>รังไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น มีผนังค่อนข้างใส เม็ดไข่มีขนาดต่างกัน ท่อนำไข่พัฒนาเป็นมดลูกมีลักษณะเป็นเส้น</p>	
<p><u>ระยะที่ 3 Ripe</u></p> <p>เข้าสู่ระยะที่พร้อมสืบพันธุ์ รังไข่เจริญเต็มที่ที่มีขนาดใหญ่ ค่อนข้างกลม เม็ดไข่แก่ มีขนาดใหญ่และขนาดเท่ากัน</p>	
<p><u>ระยะที่ 4 Uterine stage developing</u></p> <p>มดลูกเต็มไปด้วยไข่แดงแต่ยังไม่แบ่งเป็นปล้อง ขยายเต็มช่องท้อง</p>	
<p><u>ระยะที่ 5 Differentiating</u></p> <p>ภายในมดลูกมีไข่แดงที่แบ่งเป็นปล้องๆ สำหรับการเจริญของ ตัวอ่อนหลังปฏิสนธิ ตัวอ่อนยังมีขนาดเล็กและไม่มีเม็ดสี มีถุง ไข่แดงขนาดใหญ่ ในระยะนี้ปลาฉลามที่กำลังจะวางไข่มีการ สร้างเปลือกหุ้มไข่ (egg case)</p>	
<p><u>ระยะที่ 6 Expecting</u></p> <p>ตัวอ่อนพัฒนาสมบูรณ์ มีเม็ดสีที่ผิวหนัง ถุงไข่แดงมีขนาด เล็กลง พร้อมที่จะคลอด สามารถนับจำนวนตัวอ่อนได้ ใน ระยะนี้ปลาฉลามจะปล่อยไข่สู่ภายนอกเพื่อรอการฟักต่อไป</p>	
<p><u>ระยะที่ 7 Postnatal</u></p> <p>รังไข่อยู่ในระยะพัก ภายในมดลูกไม่มีตัวอ่อนอยู่ แต่ยังมีขนาดใหญ่</p>	

ที่มา: Anon (2008)

การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์

เพศผู้ กระบวนการสร้างเซลล์อสุจิ (spermatogenesis) ไปเป็นอสุจิ เริ่มจากเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น (primordial germ cell) แบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis) เกิดเป็น spermatogonia แล้วผ่านการแบ่งแบบไมโทซิสต่อไป ได้เป็น primary spermatocyte หลังจากนั้นจะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (meiosis I) ได้ secondary spermatocyte และแบ่งไมโอซิสขั้นที่สอง (meiosis II) ได้ spermatid 4 เซลล์ แต่ละเซลล์จะมีโครโมโซมเพียงครึ่งเดียว จากนั้น spermatid จะผ่านการเปลี่ยนรูปร่าง กลายเป็นตัวอสุจิ (spermatozoa)

จากการศึกษาของ Hazin *et al.* (2006) ใน *Squalus megalops* จำแนกระยะการพัฒนาของเพศผู้ โดยใช้น้ำหนักของอวัยวะในการจำแนก ได้ดังนี้

ระยะ Juvenile คือ ยังไม่มีการพัฒนา อวัยวะมีน้ำหนักน้อยกว่า 0.5 กรัม

ระยะ Maturing คือ มีน้ำหนักตั้งแต่ 1.5 กรัมขึ้นไป และมีน้ำเชื้อ (seminal fluid) ภายใน

ระยะ Adult คือ มีน้ำหนักอวัยวะตั้งแต่ 5.5 กรัมขึ้นไป

Conrath and Musick (2002) แบ่งระยะการพัฒนาของ *Mustelus canis* เพศผู้ 7 ระยะ จากการศึกษาทางมิถุนวิทยา ดังนี้

ระยะที่ 1 ประกอบด้วย spermatogonia และ germ cells ที่อยู่กันแบบหลวมๆ

ระยะที่ 2 ส่วนของ spermatogonia และ sertoli cell ซึ่งอยู่รอบๆ lumen และถูกล้อมด้วย basement membrane ซึ่งต่อไปพัฒนาเป็น spermatocyst

ระยะที่ 3 spermatogonia ผ่านขั้นตอนการแบ่งแบบไมโทซิส พัฒนาเป็น primary spermatocyte และผ่านขั้นตอนการแบ่งแบบไมโอซิส ครั้งที่ 1 กลายเป็น secondary spermatocyte

ระยะที่ 4 secondary spermatocyte แบ่งตัวแบบไมโอซิส ครั้งที่ 2 พัฒนาเป็น spermatid

ระยะที่ 5 ประกอบด้วย immature sperm ซึ่งคือ spermatid ที่ผ่านกระบวนการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) มีส่วนหัวและหาง แต่ยังไม่รวมกัน อยู่แบบเดี่ยวๆ (individual sperm)

ระยะที่ 6 ตัวอสุจิ (spermatozoa) หาง (flagella) มีลักษณะเป็นเกลียว อยู่บริเวณขอบนอกของ spermatocyst

ระยะที่ 7 ระยะนี้เป็นระยะ degenerate คือ empty spermatocyst, free spermatogonia และ free spermatozoa

Moreno and Magana (2006) แบ่งระยะการพัฒนาของ spermatocyst ของ *Isurus oxyrinchus* ดังนี้

ระยะที่ 1 spermatocyst มี germ cell อยู่รอบๆ lumen เมื่อ germ cell และ sertoli cell มากขึ้นจากการแบ่งตัวแบบไมโทซิส ทำให้ spermatocyst มีขนาดใหญ่ขึ้นด้วย จะเห็น nucleus ของ germ cell กลมมีขนาดใหญ่กระจายอยู่ใน nucleoplasm และ sertoli cell ลักษณะเป็นรูปไข่ ขนาดเล็กมาก มีนิวเคลียสแบบ amoeboid

ระยะที่ 2 ระยะเริ่มการสร้างอสุจิ spermatogonia ที่อยู่ในไซโตพลาซึมของ sertoli cell จะเริ่มสร้างอสุจิ โดยจะมีการวางตัวอยู่แนวรอบนอก และจะแบ่งตัวแบบไมโทซิส ทำให้ spermatogonia มีขนาดเล็กมาก

ระยะที่ 3 เรียกว่าระยะ middle spermatogenesis คือ spermatocyst มีขนาดใหญ่ขึ้น และมี primary spermatocyte ที่มีขนาดใหญ่มากกว่า spermatogonia และนิวเคลียสของ sertoli cell อยู่บริเวณขอบ

ระยะที่ 4 ระยะ middle spermatogenesis จะมี spermatocyst พบใกล้ๆ กับขอบของ lobule และ spermatocyte ติดสีม่วง เมื่อเชื่อมด้วยสีฮีมาทอกซิลิน

ระยะที่ 5 ระยะ later spermatogenesis คือ spermatocyst จะอยู่ติดกับขอบของ lobule มากที่สุด และมี spermatid เล็กๆ จำนวนมาก มีนิวเคลียสเป็นรูปครึ่งวงรี

ระยะที่ 6 ระยะ spermatogenesis คือ spermatocyst มีการสร้าง spermatid จะเห็นนิวเคลียสสมบูรณ์ แม้ว่าจะมีการเคลื่อนไปอยู่บริเวณขอบของ spermatocyst โดยมีส่วนของ pseudoflagella ชี้ไปทาง lumen ของ spermatocyst

ระยะที่ 7 ระยะ maturity คือ spermatocyst จะมีขนาดใกล้เคียงกับระยะที่ 6 หรือมีขนาดเล็กกว่าเล็กน้อย อยู่บริเวณขอบของ lobule ส่วนของ spermatozoa มีนิวเคลียสยาว และจะรวมตัวกันแน่นอยู่ที่บริเวณขอบของ spermatocyst มีส่วนหางชี้ไปตรงกลางเป็นรูปเกลียว และสุดท้ายเมื่ออสุจิถูกปล่อยออกสู่ด้านนอกคือ ปล่อย spermatozoa ไปยัง efferent ductules และอาจเห็นส่วนของ sertoli cell ที่บริเวณขอบของ spermatocyst

เพศเมีย กระบวนการสร้างไข่ (oogenesis) ภายในรังไข่จะมีเซลล์ฟอลลิเคิล (follicle cell) เป็นจำนวนมาก ภายในมีเซลล์สืบพันธุ์เบื้องต้น จะมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและเพิ่มจำนวนเซลล์ เรียกแต่ละเซลล์ว่า โอโอโกเนีย (oogonia) และแบ่งเซลล์ต่อไปจนถึงสิ้นสุดการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสขั้นแรก (meiosis I) ได้เป็นโอโอไซต์ (oocyte) จากนั้นโอโอไซต์จะผ่านกระบวนการสร้างไข่แดง (vitellogenesis) และการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสขั้นที่สอง (meiosis II) เกิดอย่างสมบูรณ์เมื่ออสุจิเข้ามาผสมกับเซลล์ไข่ สำหรับปลาฉลามหลังหนามไข่ที่ได้รับการผสมมีการเจริญแบบ ovoviviparous คือไข่จะมีการสร้างตัวขึ้นและฟักเป็นตัวอ่อนอยู่ภายในท่อนำไข่ (oviduct) โดยตัวอ่อนได้รับอาหารจากไข่แดงที่ติดมากับตัวอ่อนก่อนที่จะคลอดออกมา

การศึกษาระยะการพัฒนารังไข่ (ovary) ในปลากระดูกอ่อน โดยทั่วไปศึกษาได้จากวงจรการตกไข่ (ovulation cycle), การวัดขนาดของตัวอ่อน (pups) ที่อยู่ในมดลูกในรอบปี (gestation cycle) หรือการศึกษาทางมิถุนวิทยา เป็นต้น

Hazin *et al.* (2006) จำแนกระยะการพัฒนารังไข่ของเพศเมียใน *Squalus megalopas* โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของ follicle ที่ใหญ่ที่สุด (diameter of the largest ovarian follicle: DLOF) ดังนี้

ระยะ Juvenile รังไข่ยังไม่มีการพัฒนา ขนาดของ follicle น้อยกว่า 0.1 เซนติเมตร

ระยะ Maturing รังไข่กำลังพัฒนาเห็นลักษณะของ follicle มีสีค่อนข้างเหลือง มีขนาดอยู่ระหว่าง 0.8-4.2 เซนติเมตร

ระยะ Gravid แบ่งเป็น 3 ระยะ

1 ไข่พัฒนาสมบูรณ์ follicle มีขนาดระหว่าง 0.5-1.6 เซนติเมตร

2 ไข่มีการขยายขนาดขึ้น follicle มีขนาดระหว่าง 0.9-3.8 เซนติเมตร

3 ขนาดของ follicle มีขนาดระหว่าง 3.2-4.4 เซนติเมตร

การพัฒนาของไข่และตัวอ่อนของปลาฉลามหลังหนามที่ได้รับการปฏิสนธิ จะมีการพัฒนาภายในถุงหุ้มไข่ที่มีลักษณะเยื่อบางๆ หุ้มไว้อยู่ด้านในตัวแม่ (ภาพที่ 9) จนกระทั่งตัวอ่อนของปลาฉลามจะดูดซึมไข่แดงหมด ตัวอ่อนจึงออกมาจากถุงหุ้มไข่



ภาพที่ 9 การพัฒนาตัวอ่อนปลาฉลามในถุงหุ้มไข่ภายในตัวแม่

ที่มา: Anonymous (2011)

6. การเติบโต

การเติบโต หมายถึง การเพิ่มความยาวหรือขนาด และน้ำหนัก เมื่อสัตว์น้ำมีอายุหรือเวลาเพิ่มขึ้น มวลชีวภาพหรือน้ำหนักของสัตว์น้ำที่มีน้ำหนักเพิ่มขึ้นจะทดแทนส่วนที่สูญเสียไปจากการตายโดยธรรมชาติ และการตายโดยการประมง ดังนั้นการเติบโตเป็นปัจจัยทางบวกที่สำคัญ และจำเป็นที่จะทำให้ประชากรของสัตว์น้ำคงอยู่ได้ โดยไม่เกิดการเสื่อมโทรมหรือสูญพันธุ์ (ธนียฐา, 2552)

การเติบโตเป็นกระบวนการทางสรีรวิทยาของสิ่งมีชีวิตประกอบด้วย กระบวนการเปลี่ยนอาหารให้เป็นเนื้อเยื่อ หรือกระบวนการสร้าง (anabolism) และกระบวนการเปลี่ยนแปลงพลังงานที่สะสมไว้ให้เป็นพลังงานที่สัตว์น้ำนำไปใช้ในการดำรงชีวิต หรือกระบวนการสลาย (catabolism) ดังนั้นการเติบโตจึงเป็นผลต่างระหว่างกระบวนการสร้างและกระบวนการสลายของร่างกาย

6.1 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนัก และรูปแบบการเติบโต

โดยทั่วไป น้ำหนักของปลาและสัตว์น้ำจำพวกไม่มีกระดูกสันหลังชั้นสูง น้ำหนักจะเป็นสัดส่วนกับความยาว ตามสมการ (Ricker, 1958)

$$W = qL^b \text{ ----- (1)}$$

เมื่อ

W = น้ำหนักของสัตว์น้ำ (กรัม)

L = ความยาวของสัตว์น้ำ (เซนติเมตร)

q = ค่าคงที่เกี่ยวกับปัจจัยสถานะ

b = ค่าคงที่เกี่ยวกับการเติบโต

ในกลุ่มสัตว์น้ำต่างชนิดพันธุ์ ต่างกลุ่ม หรือในสัตว์น้ำชนิดเดียวกัน อาจมีค่าคงที่ q และ b แตกต่างกันไป ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า q เช่น เพศ ฤดูกาล เป็นต้น ในขณะที่ค่า b ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของสัตว์น้ำ ซึ่งเมื่อเทียบค่าทั้งสองแล้ว พบว่าค่า b มีความแปรผันน้อยกว่าค่า q มาก

รูปแบบการเติบโตของสัตว์น้ำ หากเป็นแบบไอโซเมตริก (isometric) คือสัตว์น้ำมีการเติบโตที่ทุกส่วนของร่างกายเป็นสัดส่วนกันโดยตรง น้ำหนักของสัตว์น้ำมีค่าใกล้เคียงกับปริมาตรของสัตว์น้ำ และเป็นไปตามกฎกำลังสาม (cube law) ดังนั้น

$$W = qL^3 \text{ ----- (2)}$$

ถ้าสัตว์น้ำมีการเติบโตไม่เป็นไปตามกฎกำลังสาม คือ การเติบโตของร่างกายไม่เป็นสัดส่วนกันโดยตรง จะเรียกว่าการเติบโตแบบอัลโลเมตริก (allometric) โดยค่าคงที่เกี่ยวกับการเติบโตจะไม่เท่ากับสาม (ธนิชฐา, 2552)

ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนักของปลาฉลามหลังหนาม มีการศึกษาไว้หลายท่านดังนี้

ตารางที่ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนัก

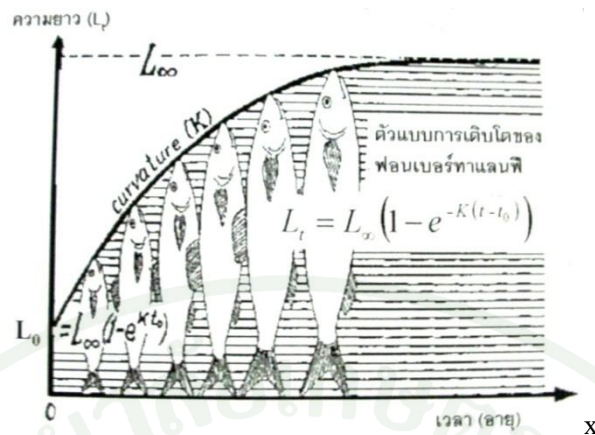
สมการ	เพศ	ช่วงความยาว (เซนติเมตร)	พื้นที่	ที่มา
$W = 0.017TL^{2.687}$	ผู้	20.8 - 72.2	ฮาวาย	Wilson and Seki (1994)
$W = 0.004TL^{3.089}$	เมีย	20.6 - 79.5		
$W = 0.00217TL^{3.176}$	รวม	59.4 - 89.8	บราซิล	Frota <i>et al.</i> (2004)
$W = 0.0022TL^{3.13}$	ผู้	-	ฮาวาย	Cotton <i>et al.</i> (2011)
$W = 0.0007TL^{3.45}$	เมีย	-		
$W = 0.011TL^{2.774}$	รวม	-	SW แอตแลนติก	Lucifora <i>et al.</i> (1999)

6.2 เส้นโค้งการเติบโต

เส้นโค้งการเติบโต เป็นเส้นโค้งที่แสดงการเพิ่มความยาวและน้ำหนัก เมื่ออายุหรือเวลาเพิ่มขึ้น เส้นโค้งการเติบโตแบ่งเป็นสองแบบคือ เส้นโค้งการเติบโตในรูปของความยาว และรูปของน้ำหนัก

1) เส้นโค้งการเติบโตในรูปของความยาว

เส้นโค้งการเติบโตในรูปของความยาว มีลักษณะเป็นเส้นโค้งที่มีเส้นกำกับที่ความยาวอนันต์ (L_{∞}) (ภาพที่ 10) โดยอัตราการเติบโตจะลดลงเรื่อยๆ เมื่ออายุเพิ่มขึ้น จนมีค่าเข้าใกล้ศูนย์เมื่ออายุมีค่าเข้าใกล้ค่าอนันต์ และความยาวเข้าใกล้ความยาวอนันต์ (ธนัญญา, 2552)

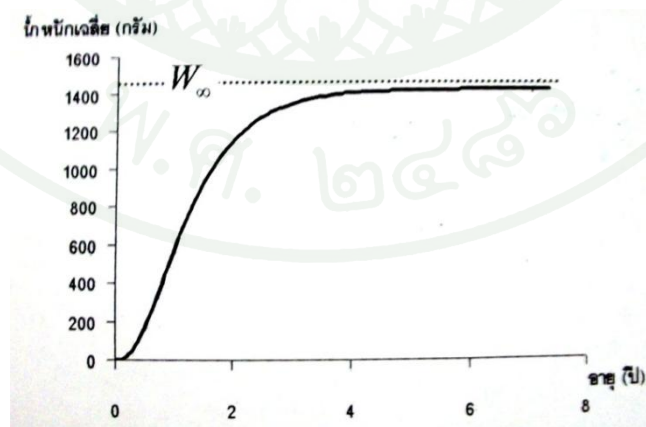


ภาพที่ 10 เส้นโค้งการเติบโตในรูปของความยาว ตามตัวแบบการเติบโตของฟอนเบอร์ทาแลนพี

ที่มา: ธนิยฐาน (2552)

2) เส้นโค้งการเติบโตในรูปของน้ำหนัก

เส้นโค้งการเติบโตในรูปของน้ำหนัก มีลักษณะเป็นเส้นโค้งคล้ายรูปตัว S เรียกว่า เส้นโค้งแบบซิกมอยด์ (asymptotic sigmoid curve) (ภาพที่ 11) คือบนเส้นโค้งจะมีจุดเปลี่ยนเว้า ซึ่งเป็นจุดที่มีอัตราการเติบโตมากที่สุด ช่วงแรกของจุดเปลี่ยนเว้า สัตว์น้ำมีอัตราการเติบโตแบบอัตราเร่งตามอายุ แต่หลังจากจุดเปลี่ยนเว้า อัตราการเติบโตจะลดลงเมื่ออายุเพิ่มขึ้น และมีค่าเข้าใกล้ศูนย์เมื่ออายุเข้าใกล้ค่าอนันต์ และน้ำหนักมีค่าเข้าใกล้น้ำหนักอนันต์ (W_{∞})



ภาพที่ 11 เส้นโค้งการเติบโตในรูปของความยาว ตามตัวแบบการเติบโตของฟอนเบอร์ทาแลนพี

ที่มา: ธนินฐา (2552)

6.3 ตัวแบบการเติบโตของฟอนเบอร์ทาแลนฟี

ตัวแบบการเติบโตมีความสำคัญมากต่อการศึกษาทางพลวัตประชากรรวมถึงการประเมินสถานะการประมง เนื่องจากค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากการเติบโตจะถูกนำมาใช้เป็นตัวประมาณนำเข้า (input parameters) ในการศึกษาการตายและตัวแบบผลจับที่ได้จากสัตว์น้ำในระยะยาว ตลอดจนใช้ในการวิเคราะห์รุ่นสัตว์น้ำ การวิเคราะห์ประชากรเสมือน เป็นต้น (ธนินฐา, 2552)

ตัวแบบการเติบโตของฟอนเบอร์ทาแลนฟี (von Bertalanffy) (มาลา และเจริญ, 2544x อ้างถึง von Bertalanffy, 1934) เป็นตัวแบบอธิบายการเติบโตของสิ่งมีชีวิต โดยมีพื้นฐานทางสรีรวิทยาเป็นหลัก ตัวแบบนี้เป็นที่นิยมทางด้านชีววิทยาประมง เนื่องจากเป็นแบบที่มีลักษณะสอดคล้องกับเส้นโค้งการเติบโตของสัตว์น้ำหลายชนิด มีโครงสร้างทางคณิตศาสตร์ค่อนข้างง่าย สะดวกในการทำความเข้าใจ และการประมาณค่าพารามิเตอร์แต่ละตัวทำได้ไม่ยากนัก ตัวแบบของฟอนเบอร์ทาแลนฟีที่ใช้ความยาวเป็นฟังก์ชันกับอายุ คือ เป็นฟังก์ชันเส้นโค้งเชิงเส้นกำกับ (asymptotic function) โดยมีค่าความยาวอนันต์เป็นเส้นกำกับ ดังสมการที่ 3

$$L_t = L_\infty \left(1 - e^{-K(t-t_0)} \right) \text{----- (3)}$$

เมื่อ

L_t = ความยาวของสัตว์น้ำที่มีอายุ t (เซนติเมตร)

L_∞ = ความยาวอนันต์ (เซนติเมตร)

K = ค่าพารามิเตอร์ความโค้ง (ต่อปี)

t = อายุสัตว์น้ำ (ปี)

t_0 = อายุของสัตว์น้ำที่มีความยาวเท่ากับศูนย์ (ปี)

พารามิเตอร์การเติบโตของปลาฉลามหลังหนาม มีการศึกษาไว้หลายท่านดังนี้

ตารางที่ 7 พารามิเตอร์การเติบโต

L_{∞} (เซนติเมตร)	K (ต่อปี)	t_0 (ปี)	เพศ	พื้นที่	ที่มา
66	0.155	-4.64	ผู้	ฮาวาย	Wilson and Seki (1994)
107	0.041	-10.09	เมีย		
72	0.080	NA	ผู้	ฮาวาย	Cotton <i>et al.</i> (2011)
126	0.082	14.83	เมีย		

6.4 การศึกษาอายุและการเติบโต

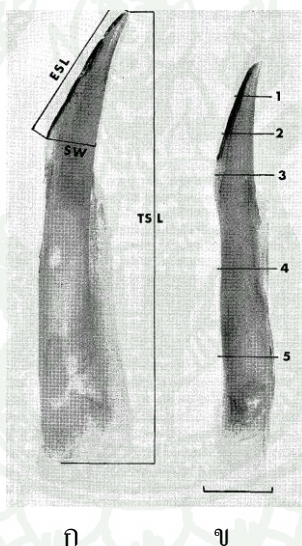
การศึกษาการเติบโต หมายถึง การประมาณขนาดตัวตามอายุ ในเขตหนาวและเขตอบอุ่นข้อมูลองค์ประกอบอายุได้จากการนับวงปีบนโครงสร้างส่วนแข็ง เช่น เกล็ดและกระดูกหู (otolith) เป็นการศึกษาการเติบโตเมื่อทราบอายุที่แท้จริงของสัตว์น้ำ เนื่องจากความผันแปรของสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันอย่างมากในฤดูหนาว อุณหภูมิในรอบปีมีความแตกต่างกันมาก ในช่วงฤดูร้อนสัตว์น้ำจะมีอาหารอุดมสมบูรณ์เกิดการเติบโตอย่างรวดเร็ว ส่วนในฤดูหนาวจะขาดแคลนอาหารปลาจะมีการหยุดชะงักการเติบโต ทำให้เกิดเป็นร่องรอยบนส่วนแข็ง เรียกว่า วงปี (annual ring) วงปีนี้เกิดตามฤดูกาล คือ วงหนึ่งสำหรับฤดูร้อน และวงหนึ่งสำหรับฤดูหนาว (มาลา และเจริญ, 2544ก)

การศึกษาอายุของกลุ่มปลากระดูกอ่อนซึ่งขาดโครงสร้างแข็งอย่างในกลุ่มปลากระดูกแข็ง เช่น กระดูกหู หรือเกล็ด นั้นจำเป็นต้องใช้โครงสร้างแข็งส่วนอื่น โครงสร้างแข็งของปลากระดูกอ่อนที่มีการนำมาเพื่อใช้ศึกษาอายุและการเติบโต เช่น กระดูกสันหลัง (vertebra), หนาม, neural arches เป็นต้น โดยในกลุ่มปลาฉลามทั่วไปจะนำกระดูกสันหลังของปลาฉลามมาใช้ โดยใช้กระดูกสันหลังบริเวณใต้ครีบหลังอันแรกซึ่งมีขนาดใหญ่ (Lessa *et al.* 1999, Goldman, 2005; Joung *et al.*, 2004) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอน คือ การเก็บส่วนแข็งของตัวอย่าง การเตรียมชิ้นส่วนแข็งสำหรับการอ่านวงปี การตรวจสอบ (การอ่านตาชั่ง) ประเมินความน่าเชื่อถือของผลข้อมูล การแปลผล และการสร้างตัวแบบการเติบโต (Cailliet and Goldman, 2004)

6.4.1 การศึกษาอายุกับวงปีจากหนามของปลาฉลามหลังหนาม

1) ปลาฉลามในครอบครัว Squalidae (dogfish sharks) นิยมใช้หนามจากครีบล้างในการศึกษา เนื่องจากกระดูกสันหลัง บางและเปราะแตกง่าย เมื่อผ่านกระบวนการทำความสะอาด (Machado and Figueiredo, 2000; Cailliet and Goldman, 2004; Rice *et al.*, 2009)

Tanaka, 1990 ศึกษาโครงสร้างหนามของ *Centrophorus acus* Garman, 1906 (Needle dogfish) โดยวัดส่วนต่างๆ ของหนามอันแรก และอันที่สองได้แก่ External spine length (ESL), Spine width (SW), Total spine length (TSL) (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 โครงสร้างหนามภายนอกของ *Centrophorus acus*

ก. หนามบริเวณครีบล้างอันแรก

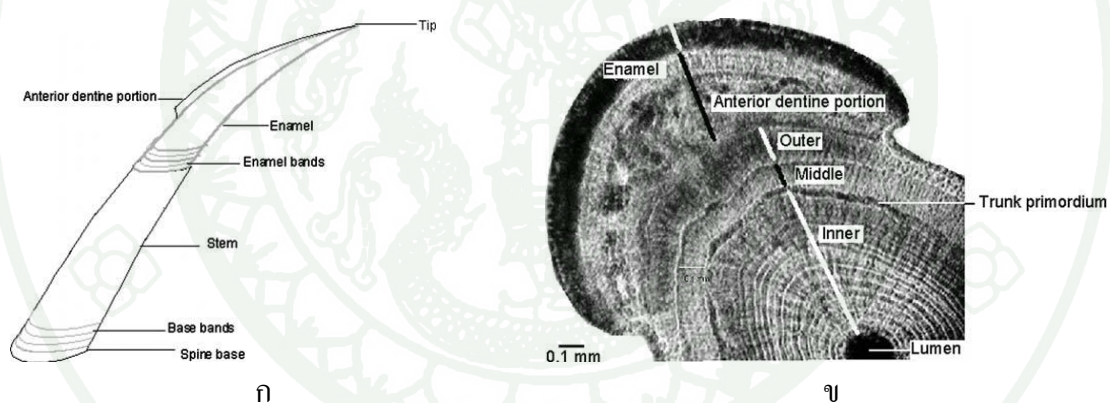
ข. หนามครีบล้างอันที่สอง

ที่มา: Tanaka (1990)

ส่วนโครงสร้างภายในของหนาม ประกอบด้วย 5 ส่วน ดังนี้

1. Mantle ประกอบด้วยชั้นนอกเป็น enamel และชั้นในเป็น pigment
2. External anterior dentine portion
3. Stem ประกอบด้วย dentine 3 ชั้น คือ inner, middle และ outer
4. Pulp cavity
5. Cartilaginous tissue

Clarke and Irvine (2006) ได้ให้คำนิยามของโครงสร้างแต่ละส่วนของหนาม ทั้งโครงสร้างภายนอกและภายใน (ภาพที่ 13) เช่น tip หมายถึง ส่วนยอดของหนาม, spine base หมายถึง ฐานของหนาม เป็นต้น วงการเติบโตแสดงให้เห็นใน 3 บริเวณ ได้แก่ enamel, stem และ band inner dentine layer



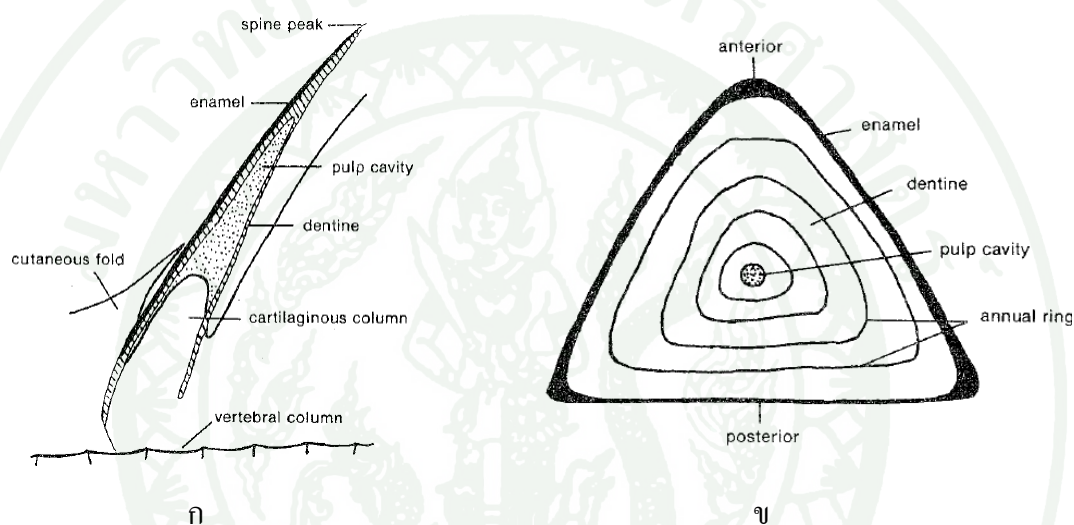
ภาพที่ 13 โครงสร้างของหนาม

ก. ภายนอก

ข. ภายใน

ที่มา: Clarke and Irvine (2006)

Soldat (1982) ศึกษาอายุและขนาดของปลาฉลามชนิด *Squalus acanthias* ในบริเวณ Northwest Atlantic โดยใช้หนามบริเวณครีบล้างอันที่สอง การวัดเส้นผ่านศูนย์กลางหนามที่ฐานของชั้น enamel จะวัดจากด้านหน้าและด้านหลัง และวัดความยาวทั้งหมดของหนามจากการตัดหนามตามยาว แสดงให้เห็นว่า วงปีของการเติบโตจะลดลงเมื่อเข้าสู่ส่วนของปลายหนาม และจะเห็นวงปีของการเติบโตได้ชัดเจนจากการตัดตามขวาง (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 โครงสร้างหนามของ *Squalus acanthias*

- ก. ภาพตัดตามยาว
- ข. ภาพตัดตามขวาง

ที่มา: Soldat (1982)

2) การจำแนกวงปีจากหนามของปลาฉลามจะพิจารณาจากวงปี ประกอบด้วยสองส่วน คือ ส่วนใส (transparent zone) และส่วนขุ่น (opaque zone) (Avsar, 2001; Cailliet *et al.*, 2006; Clarke and Irvine, 2006; Tribuzio *et al.*, 2010) โดยจำแนกจากส่วนผิวนอกของหนาม (Campana *et al.*, 2006; Rizzo *et al.*, 2006) (ภาพที่ 15) ร่องรอยที่ปรากฏเกิดจากช่วงที่มีอาหารอุดมสมบูรณ์จะมีสารอินทรีย์สะสม เกิดเป็นแถบขุ่น และในฤดูหนาวที่อาหารขาดแคลน จะเกิดเป็นแถบใสขึ้นจากกระบวนการสลายแคลเซียม หลักการจำแนกวงปี คือ ในหนึ่งปีจะเกิดแถบใสและแถบขุ่นขึ้นอย่างละ 1 ครั้ง สลับกัน (Stenberg, 2005; Rizzo *et al.*, 2006; Goldman, 2005)



ภาพที่ 15 ภาพแสดงการจำแนกวงปี

ที่มา: Campana *et al.* (2006)

นอกจากนี้สามารถจำแนกอายุโดยการตัดตามขวาง ส่วนมากใช้หนามบริเวณ ครีบหลังอันที่สอง (Rizzo *et al.* 2006; Goldman, 2005; Beamish and McFarlane, 1985) ซึ่งวงของการเติบโตจะสามารถเห็นได้ในชั้น inner dentine layer อยู่รอบๆ ส่วนของ pulp cavity (Rizzo *et al.* 2006; Irvine *et al.*, 2006b) (ภาพที่ 16)



ภาพที่ 16 ภาพตัดตามขวางของ *Squalus blainvillei*

ที่มา: Rizzo *et al.* (2006)

3) การเก็บตัวอย่าง นำนามบริเวณกิริบหลังอันที่สองออกจากตัวปลาฉลาม (Tanaka, 1990; Avsar, 2001; Campana *et al.*, 2006; Irvine *et al.*, 2006a; Tribuzio *et al.*, 2010) โดยตัดเนื้อบริเวณกระดูกสันหลัง จากนั้นนำไปแช่แข็งหรือแช่ทันทีใน 70-95% ethyl alcohol หรือ 95% isopropyl alcohol (Goldman, 2005) ก่อนการจำแนกวงปีจะนำนามมาทำความสะอาดเอาเนื้อเยื่อส่วนเกินออกโดยจุ่มในน้ำที่ต้มเดือดแล้ว จากนั้นให้ขูดเอาเนื้อเยื่อออก (Calis *et al.*, 2005; Irvine *et al.*, 2006a; Tribuzio *et al.*, 2010) และทิ้งไว้ให้แห้ง นับจำนวนวงปีภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสองตา

สำหรับการเตรียมตัวอย่างในการตัด section หลังจากทำความสะอาดเรียบร้อยแล้ว ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้นนำตัวอย่างมาฝังในเรซิน (epoxy resin) ตัดตัวอย่างตามแนวขวาง และขัดตัวอย่างที่ตัดให้มีความหนาประมาณ 35 ไมครอน (Irvine *et al.*, 2006b; Tovar-Avila *et al.*, 2007)

7. วิธีการทางมิถวิทยา (Histology)

7.1 การเตรียมตัวอย่างจนเป็นบล็อกพาราฟิน

ศุภลักษณ์ (2545ก) กล่าวถึง ขั้นตอนทางพาราฟินเทคนิค ตั้งแต่การเก็บตัวอย่างไปถึงการฝังตัวอย่างลงในบล็อกพาราฟิน มีดังนี้

1) การเก็บตัวอย่าง

ในการเก็บตัวอย่างเพื่อจะนำไปศึกษาควรทำให้เนื้อเยื่ออยู่ในสภาพเดิม หรือใกล้เคียงกับสภาพเดิมมากที่สุด เพื่อจะได้เป็นประโยชน์ในการศึกษา

2) การคงสภาพ (fixation)

การคงสภาพ คือ การรักษาเซลล์และเนื้อเยื่อให้มีสภาพใกล้เคียงกับตอนที่สัตว์ยังมีชีวิตอยู่มากที่สุด รวมไปถึงระมัดระวังไม่ให้เซลล์และเนื้อเยื่อของตัวอย่างเกิดการย่อยสลายหรือเน่า (พงศัพัตน์, 2538) และคำนึงถึงขนาด รูปร่าง ลักษณะ และตำแหน่งขององค์ประกอบทางเคมี (ศุภลักษณ์, 2545ก) ตัวอย่างที่ได้การคงสภาพ จะป้องกันไม่ให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนรูปทรงจากการที่ตัวอย่างจุ่มในสารละลายต่างๆ เนื้อเยื่อที่มีความเปราะบางจะแข็งขึ้น และยังมีส่วนช่วยในขั้นตอนของการย้อมสี ช่วยให้ติดสีในขณะย้อมดีขึ้น สีที่ย้อมไม่จางลงได้ง่าย ซึ่งคุณสมบัติของน้ำยาคงสภาพแต่ละชนิดอาจต่างกันและเลือกใช้ตามวัตถุประสงค์ เช่น

- สารละลายบูแองส์ (Bouin's fluid) เหมาะในการคงสภาพเนื้อเยื่อต่างๆ ไป และเก็บรักษา (preserve) โครงสร้างสัณฐานได้ดีโดยเฉพาะเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน แต่ในส่วนของนิวเคลียสจะเก็บรักษาสภาพได้ไม่ดี

- สารละลายนิวทรอลบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (neutral buffer formalin solution) เป็นน้ำยาคงสภาพที่นิยมใช้ทั่วไป ระดับความเข้มข้นที่ 10 เปอร์เซ็นต์ เหมาะสำหรับเก็บรักษาเนื้อเยื่อต่างๆ ไป และเป็นสารที่คงสภาพของโปรตีนได้ดี (ศุภลักษณ์, 2545ก; พงศ์พันธุ์, 2538)

พงศ์พันธุ์ (2538) กล่าวว่า ที่ระดับความเข้มข้นของฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ เหมาะกับการคงสภาพตัวอย่างทั้งชิ้น ก่อนนำมาตัดเป็นชิ้นเล็ก การคงสภาพตัวอย่างในฟอร์มาลิน ไม่ควรแช่ไว้นานเกิน 24 ชั่วโมง อาจเกิดตะกอนสีน้ำตาลที่เป็นเม็ดสีของฟอร์มาลิน ตกค้างในเนื้อเยื่อได้

3) การล้าง (washing)

ตัวอย่างที่ผ่านการคงสภาพในน้ำยาคงสภาพแต่ละชนิด เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด จะนำเนื้อเยื่อมาล้างน้ำยาคงสภาพออก วิธีในการล้างจะแตกต่างกันน้ำยาที่ใช้ในการคงสภาพ เช่น คงสภาพด้วยฟอร์มาลิน ล้างด้วยน้ำประปา โดยเปิดน้ำแบบไหลผ่านตลอดเวลา ใช้เวลาประมาณ 30 นาที -1 ชั่วโมง คงสภาพด้วยสารละลายบูแองส์ ล้างด้วยแอลกอฮอล์ 50% หลายๆ ครั้ง แล้วเปลี่ยนมาที่แอลกอฮอล์ 70% หลายๆ ครั้ง จนสีของแอลกอฮอล์ไม่เปลี่ยนเป็นสีเหลืองแล้ว ก็ถือว่าการล้างสมบูรณ์ ทำขั้นตอนต่อไปได้ เป็นต้น

4) การขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration)

การขจัดน้ำออกจากเซลล์เป็นการทำให้น้ำออกจากเซลล์หรือเนื้อเยื่อให้หมด เพื่อเตรียมเนื้อเยื่อให้มีสภาพพร้อมให้สารที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อเข้ามาแทนที่น้ำ โดยสารที่นิยมในการใช้เพื่อขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ คือ เอทิลแอลกอฮอล์ ที่สามารถขจัดน้ำออกได้ดีและไม่ทำให้นเนื้อเยื่อแข็งจนเปราะ (ศุภลักษณ์, 2545ข อ้างถึง เวคิน, 2524) โดยการนำเนื้อเยื่อแช่แอลกอฮอล์จากระดับความเข้มข้นต่ำ (70% แอลกอฮอล์) ผ่านความเข้มข้นระดับสูง 80%, 95% จนถึงระดับความเข้มข้นสูงสุด (100% แอลกอฮอล์) เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อเกิดการหดตัว

5) การขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing or dealcoholization)

การนำสารเคมีที่ทำหน้าที่แทนสารที่ใช้ขจัดน้ำเข้าสู่เนื้อเยื่อ และเป็นตัวกลางในการนำสารที่ใช้สำหรับฝังเนื้อเยื่อ เช่น พาราฟิน พาราพลาสติก ฯลฯ เข้าสู่ภายในเซลล์หรือเนื้อเยื่อนั้น สารที่ใช้มีหลายชนิด เช่น ไซลีน โทลูอีน เบนซีน และคลอโรฟอร์ม ซึ่งสารเคมีดังกล่าวจะเป็นตัวกลางที่สามารถละลายได้ดีทั้งในแอลกอฮอล์และพาราฟิน และสารบางชนิดมีคุณสมบัติที่ทำให้เนื้อเยื่อตัวอย่างมีความใสขึ้น (พงศพัทธ์, 2538)

6) การแทรกซึม (infiltration)

หลังจากขั้นตอนของการขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส ต่อมาเป็นการนำสารที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อแทรกซึมเข้าไปในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ซึ่งจะทำการห่อหุ้มประกอบภายในของเซลล์มีความแข็งทั่วทั้งเซลล์ และสม่ำเสมอ สารที่นิยมใช้ในการฝังเนื้อเยื่อ ได้แก่ พาราฟิน และพาราพลาสติก

7) การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding)

ศุภลักษณ์ (2545) อ้างถึง เวคิน (2524) กล่าวว่า iva การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน เป็นการนำเนื้อเยื่อที่ผ่านการแทรกซึมของสารที่ใช้ในการฝังเนื้อเยื่อ มาฝังในพาราฟินที่หลอมเหลว มีเนื้อเยื่ออยู่ตรงกลาง และพาราฟินที่หลอมเหลวเกิดการแข็งตัวขึ้น โดยภาชนะที่ใช้ในการฝังอาจเป็นกระถางโลหะ (mold หรือ mould) หรือกระถางที่ทำจากกระดาษตะกั่วที่พับเป็นกระถางสี่เหลี่ยม หรืออูมินัมฟอยล์

จากขั้นตอนของการขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ จนถึงการแทรกซึมของพาราฟิน หากงานมีปริมาณมากและเป็นห้องปฏิบัติการใหญ่ๆ จะใช้เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) ซึ่งทำให้มีความสะดวกมากยิ่งขึ้น

7.2 การตัดเนื้อเยื่อและติดเนื้อเยื่อบนสไลด์

เนื้อเยื่อที่ฝังในบล็อกพาราฟินแล้วแกะออกจากกระถงโลหะ ต้องมีการตัดแต่งหน้าบล็อก (trimming) ก่อน เมื่อนำไปตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางจะได้เป็นแถบยาวของเนื้อเยื่อ (ribbon) โดยใช้มีดโกนหรือใบมีดเก่าปาดที่ผิวหน้าของพาราฟินจนใกล้เนื้อเยื่อ และตัดด้านมุมทั้งสี่ของบล็อกให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู ควรให้คู่ขนานของสี่เหลี่ยมขนานกัน เพราะส่วนที่ขนานจะเป็นส่วนที่เนื้อเยื่อเกิดเป็นแผ่นยาว (ribbon)

เมื่อตัดแต่งหน้าบล็อกเรียบร้อยแล้ว ก่อนที่จะนำไปตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง (sectioning) ต้องนำบล็อกและใบมีดไปแช่ช่องแข็ง (freeze) ในตู้เย็น โดยวางให้ผิวหน้าของบล็อกสัมผัสกับพื้นผิวที่เย็น และห้องในการตัดเนื้อเยื่อต้องเปิดเครื่องปรับอากาศให้เย็นพอสมควร เพราะเนื้อเยื่อที่ตัดออกมาจะได้ไม่เป็นกระจุกอยู่บริเวณหน้ามีด สำหรับการตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางทั่วไปมีความหนาประมาณ 4-6 ไมครอน เมื่อได้เนื้อเยื่อที่เป็นแผ่นบางแล้วจึงใช้ฟุ้งก้อนชิ้นมาลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อที่มีอุณหภูมิประมาณ 43-45 องศาเซลเซียส แผ่นบางของเนื้อเยื่อจะค่อยๆ ขยายตัวเล็กน้อย จากนั้นใช้แผ่นสไลด์ที่ทำแอสซีซีฟไว้ซ้อนเนื้อเยื่อให้ติดบนสไลด์ขึ้นมา ใช้กระดาษทิชชูซับน้ำออกให้หมดแล้วจึงวางสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์ อุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส ควรปล่อยให้สไลด์ไว้ข้ามคืนให้แห้งสนิท

7.3 การย้อมสี

ศุภลักษณ์ (2545ก) กล่าวว่า ขั้นตอนในการย้อมสีฮีมาท็อกซิลินและอีโอซิน (H&E) มีดังนี้

- 1) การขจัดพาราฟิน (deparaffinization) คือ การล้างพาราฟินส่วนเกินออกจากเนื้อเยื่อ
- 2) การเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (hydration) คือ การนำน้ำเข้าเซลล์และเนื้อเยื่อโดยเริ่มจากแอลกอฮอล์ระดับสูงไปต่ำ
- 3) การย้อมสีครั้งแรก (primary stain) ย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซิลิน ซึ่งเป็นการย้อมนิวเคลียสจะติดสีม่วง

4) การล้างสีส่วนเกิน (differentiation) สีย้อมฮีมาท็อกซิลิน เป็นการย้อมชนิดรีเกรสซีฟสแตนนิง (regressive stain) คือการย้อมสีให้มากเกินพอ แล้วล้างสีส่วนเกินนั้นออกโดยใช้กรดอ่อน คือ 1% แอซิดแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ 1% แอซิดแอลกอฮอล์ ยังใช้ล้างคราบของแอคซิฟที่ทาบนสไลด์ ทำให้สไลด์สะอาดขึ้น

5) การปรับเนื้อเยื่อให้มีภาพเป็นกลาง (neutralization) คือ ทำให้สไลด์เป็นกลางโดยใช้สารละลายของลิเทียมคาร์บอเนต เนื้อเยื่อที่ย้อมสีฮีมาท็อกซิลินจะเป็นสีฟ้ามากยิ่งขึ้น

6) การย้อมสีซ้ำ (counter stain) สีย้อมที่ใช้ คือสีอีโอซิน ใช้ย้อมไซโทพลาซึม จะติดสีแดงหรือชมพูเข้ม สีย้อมอีโอซินเป็นการย้อมสีชนิดโปรเกรสซีฟสแตนนิง (progressive stain) คือใช้ระยะเวลาที่เหมาะสมในการย้อมโดยไม่ต้องล้างสีส่วนเกิน

7) การขจัดน้ำ (dehydration) โดยเริ่มจากการจุ่มแอลกอฮอล์จากระดับต่ำไปสูง เพื่อให้น้ำออกจากเซลล์

8) การขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) โดยใช้ไซลีนเป็นสารละลาย จะช่วยให้เนื้อเยื่อที่ย้อมสีมีความใสมากยิ่งขึ้นและเป็นตัวกลางระหว่างแอลกอฮอล์กับสารละลายที่ใช้สำหรับปิดสไลด์ (mounting media)

9) การปิดสไลด์ (mounting) ใช้กระจกปิดสไลด์ (cover slip) ปิดลงบนแผ่นสไลด์ที่ย้อมสีแล้ว โดยใช้สารละลายเปอร์มาต์ (permount) เป็นตัวเชื่อมให้ติดกัน

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. การเตรียมตัวอย่าง
 - 1.1 ชุดเครื่องมือผ่าตัด
 - 1.2 ถาดใส่ตัวอย่าง
 - 1.3 เครื่องมือวัดขนาดและชั่งน้ำหนัก
 - 1.4 กล้องถ่ายภาพ
2. การตัด Section
 - 2.1 Low speed diamond saw
 - 2.2 กระดาษทรายน้ำ (wet sandpaper)
 - 2.3 เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)
 - 2.4 กล้องจุลทรรศน์
3. มิถุนวิทยา (Histology)
 - 3.1 ไมโครโทม (microtome)
 - 3.2 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor)
 - 3.3 เครื่องหยอดพาราฟิน (dispenser)
 - 3.4 เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer) และอ่างลอยเนื้อเยื่อ (water bath)
 - 3.5 ตลับใส่เนื้อเยื่อ (cassette)
 - 3.6 กระจกโลหะ (mold) และ กรอบพลาสติก (embedding ring)
 - 3.7 แผ่นสไลด์ และกระจกปิดสไลด์
 - 3.8 กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)
4. การวิเคราะห์ข้อมูล
 - 4.1 computer พร้อมโปรแกรมสำเร็จรูปเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ข้อมูล

วิธีการ

รวบรวมตัวอย่างที่ได้รับความอนุเคราะห์ตัวอย่างจากเรือสำรวจประมงจุฬารักษ์ กรมประมง ออกสำรวจบริเวณไหล่ทวีป เขตเศรษฐกิจจำเพาะของทะเลอันดามัน โดยใช้เครื่องมือเบ็ดราวหน้าดินแนวตั้งและลอบน้ำลึก ช่วงเดือนมีนาคม พ.ศ. 2550

1. การศึกษาอายุของปลาฉลามหลังหนาม

ตัวอย่างปลาฉลามหลังหนาม นำมาวัดความยาวเหยียด (total length, TL) หน่วยเป็นเซนติเมตร และชั่งน้ำหนัก (weight, W) หน่วยเป็นกรัม นำหนามจากบริเวณครีบหลังทั้งสองออกมา โดยตัดเหนือบริเวณกระดูกสันหลัง ทำความสะอาดโดยจุ่มหนามลงในน้ำที่ต้มเดือดแล้ว ประมาณ 1-2 นาที ขึ้นกับขนาดหนาม หากยังไม่เข้าสู่กระบวนการศึกษาอาจนำไปแช่แข็งก่อน หนามที่จุ่มในน้ำต้มเดือดแล้ว ค่อยๆ ใช้มีดผ่าตัดขูดเอาเนื้อเยื่อส่วนเกินออก (Calis *et al.*, 2005; Tribuzio *et al.*, 2010) และทิ้งไว้ให้แห้ง(ภาพที่17)



ภาพที่ 17 หนามครีบหลังอันแรก (ล่าง) และหนามครีบหลังอันสอง (บน)

ในการศึกษาเลือกใช้นามจากบริเวณครีบล้างอันสองมาใช้ในการศึกษาอายุ (Beamish and McFarlane, 1985; Irvine *et al.*, 2006b; Campana *et al.*, 2006; Tribuzio *et al.*, 2010) เนื่องจากการเตรียมตัวอย่างสังเกตพบว่า นามจากครีบล้างอันแรกมีขนาดเล็กกว่า ส่วนมากบริเวณปลายนามจะหักมากกว่าครีบล้างอันสอง (Irvine *et al.*, 2006b) และลักษณะของวงการเติบโตที่ผิวนอกในนามครีบล้างอันสองชัดเจนมากกว่า ก่อนการอ่านอายุจากนามจะต้องวัดขนาดของนามตามวิธีการศึกษาของ Tribuzio *et al.* (2010) ได้แก่ last readable point (LRP), enamel base diameter (EBD), spine base diameter (SBD), base length (BL) และ spine total length (TL) (ภาพที่ 18) การวัดขนาดที่ใช้ในการศึกษา คือ EBD ใช้ในการหาความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงกับความยาวของปลาฉลาม และ LRP ใช้ในการจำแนกลักษณะของนาม ตามการจำแนกของ Tribuzio *et al.* (2010) มีสองแบบ คือ worn มีขนาดความกว้าง LRP น้อยกว่า 2.45 มิลลิเมตร และ non worn มีขนาดความกว้างของ LRP มากกว่า 2.45 มิลลิเมตร



ภาพที่ 18 การวัดขนาดของนาม

จำแนกวิธีการอ่านอายุจากนาม 2 วิธี คือ การอ่านอายุจากผิวนามด้านนอก และการอ่านอายุจากการตัดนามตามขวาง

1.1 การตัดนามตามขวาง (cross-section)

- นามที่ผ่านการอ่านอายุจากวิธีผิวนามด้านนอกแล้ว นำมาฝังด้วยน้ำยาเรซิน (epoxy resin) (ภาพผนวกที่ 1) และทิ้งไว้ให้แห้ง
- ทำเครื่องหมายลงบนตัวอย่าง (ภาพผนวกที่ 2) โดยขีดเป็นแนวเส้นตรงตามขวางตลอดตัวอย่าง ก่อนเข้าสู่ขั้นตอนการตัด
- เครื่องมือที่ใช้สำหรับการตัดตัวอย่าง คือ low speed diamond saw (ภาพผนวกที่ 3) ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากสาขาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ตัดให้ตัวอย่างมีความหนาประมาณ 0.5-1 มิลลิเมตร (ภาพผนวกที่ 4)

- นำตัวอย่างที่ตัดติดลงบนแผ่นสไลด์ (ภาพผนวกที่ 5) โดยใช้ crystal bond เป็นตัวยึดตัวอย่างไว้ และทิ้งไว้ให้แห้งสักครู่
- ชัดด้วยกระดาษทรายน้ำ (Silicon carbide) (ภาพผนวกที่ 6) เพื่อให้ผิวหน้าสัมผัสของตัวอย่างที่ตัดเรียบขึ้น และมองเห็นวงการเติบโตได้ชัดเจนขึ้น จัดจนกระทั่งตัวอย่างมีความหนาประมาณ 200-400 ไมโครอน

1.2 การจำแนกวงปี

การจำแนกวงปีหรือการนับอายุจะใช้หลักการเกี่ยวกับการจำแนกในสัตว์น้ำอื่น คือ อายุ 1 ปี ประกอบด้วยวงขุ่น (opaque band) และวงใส (translucent band) โดยวิธีการอ่านจากผิวหนามด้านนอก นับจากฐานของหนาม (enamel base) ที่มีวงการเติบโตสร้างขึ้น นับไปเรื่อยๆ จนถึงปลายหนาม และวิธีการอ่านจากการตัดหนามตามขวาง โดยวงการเติบโตจะเกิดในชั้นของ inner dentine (Irvine *et al.*, 2006b; Clarke and Irvine, 2006; Rizzo *et al.*, 2006) นับจากขอบของ pulp cavity ไปจนถึงขอบของชั้น inner dentine

หลังจากทำความสะอาด และทิ้งไว้ให้แห้งเรียบร้อยแล้ว นำตัวอย่างที่อ่านจากวิธีการอ่านผิวหนามด้านนอกแล้วมาฝังด้วยน้ำยาเรซิน (epoxy resin) และตัดตัวอย่างตามแนวขวาง (cross section) ตามขั้นตอนการตัดตามขวางดังที่กล่าวไว้ข้างต้น

ในการศึกษาใช้ผู้อ่าน 2 คน แต่ละผู้อ่านอ่านคนละ 2 ครั้ง โดยทิ้งระยะห่างการอ่านจากครั้งแรกประมาณสองสัปดาห์ จะอ่านคนละ 2 ครั้ง ทิ้งระยะห่างการอ่านครั้งที่สองจากครั้งแรกประมาณสองสัปดาห์

2. การศึกษาระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาฉลามหลังหนามทางมิถุนวิทยา

- นำรังไข่และถุงอัมตะ คงสภาพด้วย 10% buffer formalin เป็นเวลา 1 วัน เพื่อให้ตัวอย่างมีความแข็งตัวมากขึ้น จากนั้นเปลี่ยนเป็น แอลกอฮอล์ 70% แล้วนำมาผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อการศึกษาทางมิถุนวิทยา ตามวิธีการของศุภลักษณ์ (2545ก) (ตารางผนวกที่ 1) ซึ่งจะตัดแปลงการใช้สารเคมีและระยะเวลาที่ใช้

- ตัวอย่างที่ผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ นำมาตัดด้วยเครื่องไมโครทอม ความหนาประมาณ 5-6 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปลอยน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 40 องศาเซลเซียส โดยน้ำอุ่นจะช่วยให้แผ่นเนื้อเยื่อที่ตัดเรียบขึ้น ใช้แผ่นสไลด์ที่ทาแอสีซีฟที่แห้งแล้ว ซ้อนตัวอย่างในอ่างลอยน้ำอุ่นขึ้นมาวางไว้บนเครื่องอุ่นสไลด์ ที่อุณหภูมิประมาณ 40-45 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้แห้งอย่างน้อย 1 วัน

- แผ่นสไลด์ที่แห้งแล้ว นำมาผ่านกระบวนการย้อมสี โดยใช้สีย้อมสีมาที่ออกซีลินและอีโอซิน (H&E) ตามวิธีการของศุภลักษณ์ (2545ก) (ตารางผนวกที่ 2) ปิดสไลด์ที่ย้อมสีด้วยกระจกปิดสไลด์โดยใช้เปอร์มาตซ์เป็นตัวเชื่อมแผ่นสไลด์กับกระจกปิดสไลด์

- นำสไลด์ถาวรที่ได้มาศึกษาลักษณะการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะเพศ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ บันทึกรายละเอียด

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

การวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้นใช้โปรแกรม Microsoft Excel รวมถึงการประมาณค่าพารามิเตอร์การเติบโต และการวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม (ANCOVA) ใช้โปรแกรม R (R Development Core Team, 2011)

วิเคราะห์ข้อมูล ดังนี้

1) ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนัก ด้วยวิธีกำลังสองน้อยสุด (least square) เป็นการวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (linear regression analysis) ที่เปลี่ยนรูปจากฟังก์ชันกำลัง (power function) ในสมการ (1) เป็นสมการเชิงเส้น จากนั้นจึงประมาณค่า b และ q โดยวิเคราะห์ใน Microsoft Excel โดยใช้คำสั่ง Data analysis และนำค่า b ที่ประมาณได้ ทดสอบรูปแบบการเติบโต โดยพิจารณาจากช่วงความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ของค่า b ว่าครอบคลุมค่าสาม หรือไม่

2) การวัดสัมประสิทธิ์ความผันแปร ทดสอบค่าความผันแปรของการอ่านอายุระหว่างผู้อ่าน และการอ่าน (Campana, 2001) จากสมการ

$$CV_j = 100 * \frac{\sqrt{\frac{\sum_{i=1}^R (X_{ij} - \bar{X}_j)^2}{R-1}}}{\bar{X}_j} \quad (4)$$

เมื่อ

- CV_j = การประมาณค่าความแม่นยำของอายุสำหรับปลาแต่ละตัว
 R = จำนวนการครั้งในการอ่านอายุ,
 X_{ij} = อายุที่อ่านได้ ของปลาแต่ละตัว, และ
 \bar{X}_j = ค่าเฉลี่ยของอายุที่อ่านได้ของปลาแต่ละตัว

3) การเติบโต ใช้การวิเคราะห์การถดถอยแบบเชิงเส้น โดยใช้คู่อันดับของอายุ (ปี) กับ ความยาว (เซนติเมตร) ที่ได้จากการติดตามเส้นการเติบโต จากนั้นประมาณค่าพารามิเตอร์ การเติบโต (L_{∞} , K , t_0) ในโปรแกรม Microsoft Excel และนำค่าพารามิเตอร์ทั้งสามตัวที่ได้ เป็นค่าประมาณนำเข้า (input estimator) ในโปรแกรม R วิเคราะห์การถดถอยแบบไม่เชิงเส้น (nonlinear regression) เป็นการใช้เทคนิคความควรจะเป็นสูงสุด (maximum likelihood) และใช้ ค่าพารามิเตอร์ที่เป็นตัวประมาณนำเข้าเกิดกระบวนการคำนวณหวนซ้ำจนกว่าจะได้ค่าผลรวม เศษตกค้างกำลังสอง (sum of squared residual, SSR) ต่ำที่สุดเพื่อสร้างตัวแบบการเติบโตของ ฟอนเบอร์ทาแลนพี

ผลและวิจารณ์ผล

ตัวอย่างปลาฉลามหลังหนามที่ใช้ในการศึกษารวบรวมจากเรือสำรวจประมงพาณิชย์ กรมประมง ในบริเวณไหล่ทวีปเขตเศรษฐกิจจำเพาะฝั่งทะเลอันดามัน ระหว่างเดือนมีนาคม 2550 จำนวนทั้งสิ้น 65 ตัว โดยใช้เครื่องมือเบ็ดราวหน้าดินแนวตั้ง (25 ตัว) และลอบน้ำลึก (40 ตัว) โดยเป็นปลาฉลามหลังหนามเพศผู้ 20 ตัว (ช่วงความยาวเหยียดระหว่าง 44.9-50.5 เซนติเมตร) และเพศเมีย 45 ตัว (ช่วงความยาวเหยียดระหว่าง (43.3-72.1 เซนติเมตร)

1. วิธีการตัดและการอ่าน

จากการศึกษาเบื้องต้น โดยใช้ส่วนของกระดูกสันหลังเพื่อการประมาณอายุของตัวอย่าง ปลาฉลามหลังหนาม ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในการศึกษาอายุของกลุ่มปลาฉลามทั่วไป เช่น ปลาฉลาม แมว *Alopias pelagicus* (ภาพที่ 19ก) เป็นต้น (Goldman, 2005; Rizzo *et al.*, 2006) พบว่ากระดูกสันหลังของปลาฉลามหลังหนามมีลักษณะไม่เหมาะกับการศึกษาอายุของกลุ่มปลาฉลามอื่นๆ เนื่องจากลักษณะของกระดูกมีลักษณะเป็นโคนลึก (deep cone) เปราะ และขนาดเล็กมาก (ภาพที่ 19 ข) (Machado and Figueiredo, 2000; Cailliet and Goldman, 2004) ดังนั้น จึงใช้วิธีการศึกษาอายุและการเติบโตโดยใช้ส่วนของหนามบริเวณครีบหลัง ซึ่งเป็นส่วนแข็งที่นำมาใช้ศึกษาเรื่องอายุสำหรับในกลุ่ม dogfish sharks (Cailliet *et al.*, 1986; Goldman, 2005; Stenberg, 2005)

การใช้ส่วนหนามในการประมาณอายุปลาฉลามหลังหนามครั้งนี้ เป็นการศึกษาเป็นครั้งแรกของประเทศไทย อย่างไรก็ตาม ในตัวอย่างของหนามบางอันไม่สามารถใช้ในการจำแนกอายุได้ชัดเจน เนื่องจากแถบอายุที่เกิดขึ้นเกิดการซ้อนทับของแถบ คือไม่สามารถแยกแถบอายุได้ชัดเจน เป็นผลทำให้การประมาณอายุเกิดความคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปควรมีจำนวนตัวอย่างสำหรับการศึกษาที่มีมากขึ้น เพื่อที่จะให้ได้ข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างอายุและความยาวของปลาฉลามที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น และสามารถนำไปใช้เป็นข้อมูลที่ใช้ประเมินและอธิบาย ตัวแบบ การเติบโตของปลาฉลามที่ใกล้เคียงกับสภาพความเป็นจริงตามธรรมชาติของปลาฉลามชนิดนี้



ภาพที่ 19 ลักษณะกระดูกสันหลัง

ก. ปลาฉลามหางยาว (*Alopias pelagicus*)

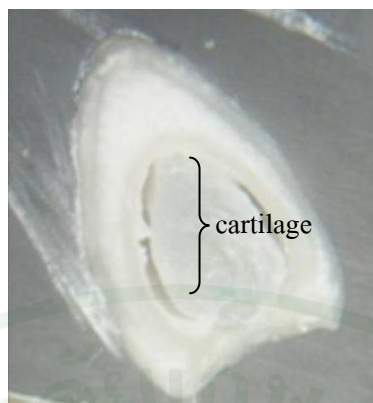
ข. ปลาฉลามหลังหนาม (*Squalus mitsukurii*)

จากการศึกษาของ Beamish and McFarlane (1985) รายงานไว้ว่า ลักษณะโครงสร้างของหนาม ประกอบด้วย 3 ส่วนหลัก คือ Cartilaginous interior, Stem และ Mantle (ภาพที่ 20 และ 21)

- Cartilaginous interior เป็นส่วนภายในของหนามที่เป็นกระดูกอ่อน จะเชื่อมกับครีบทันหลัง
- Stem อยู่ล้อมรอบส่วนของกระดูกอ่อนที่อยู่ภายในและเป็นแกนหลักของหนาม ในส่วนของ stem ประกอบด้วย 3 ชั้น คือ inner dentine, middle dentine และ outer dentine วงการเติบโตจะอยู่ภายในชั้นของ inner dentine
- Mantle เป็นบริเวณที่มีส่วนเคลือบ (enamel) อยู่ มีส่วนเรียบและส่วนที่เป็นสัน (ridge) จะเป็นสีเข้มที่เกิดจากการสะสมของเม็ดสี (melanin pigment) (Clarke and Irvine, 2006)



ภาพที่ 20 โครงสร้างภายนอกของหนามปลาฉลามหลังหนาม

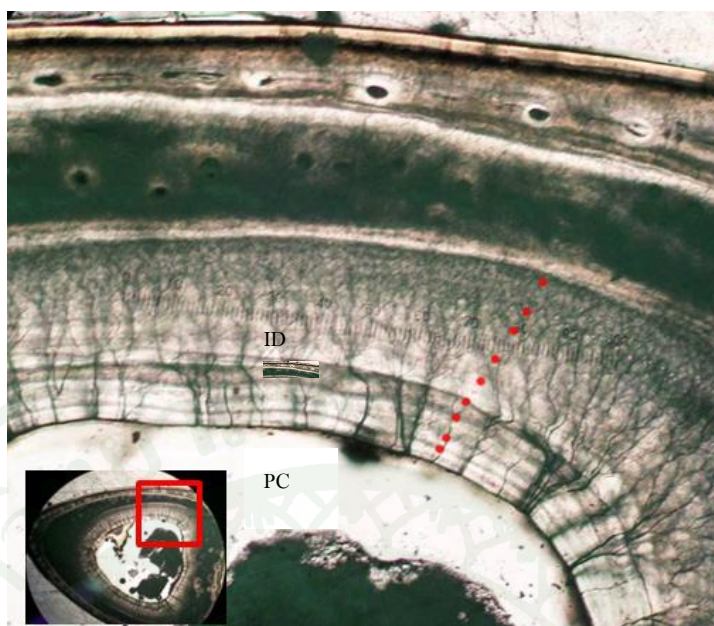


ภาพที่ 21 โครงสร้างภายในของหนามปลาฉลามหลังหนาม

ในการอ่านอายุวงปีหนึ่งวงนั้น จะประกอบด้วย ส่วนใส (translucent zone) และส่วนขุ่น (opaque band) สามารถอ่านได้จาก 2 วิธี คือ วิธีอ่านจากผิวหนามด้านนอก (enamel surface) จะเห็นลักษณะของแถบมืด (dark band) และแถบสว่าง (light band) นับจากฐานด้านล่าง (enamel base) ที่เป็นจุดเริ่มการสร้างวงการเติบโตไปถึงปลายหนาม (tip) (ภาพที่ 22) และวิธีจากการตัดหนามตามขวาง (cross section) อ่านอายุในชั้นของ inner dentine เริ่มนับจากขอบของแกนกลางหนาม (pulp cavity) ไปเรื่อยๆ จนถึงขอบของชั้น inner dentine เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (reflected light) จะเห็นลักษณะของวงขุ่น (opaque band) เป็นแถบสว่าง และวงใส (translucent band) เป็นแถบมืด (ภาพที่ 23) (Clarke and Irvine, 2006)



ภาพที่ 22 การประมาณอายุจากผิวหนามด้านนอกของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนาม
ประมาณอายุได้ 9 ปี



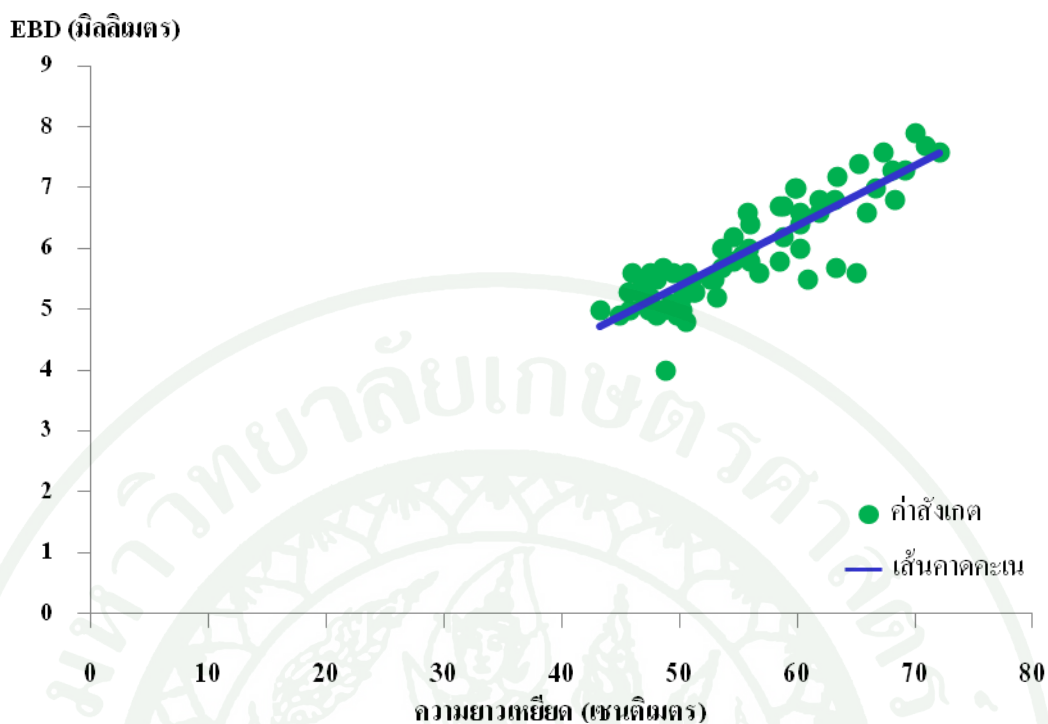
ภาพที่ 23 การประมาณอายุในชั้น inner dentine จากการตัดตัวอย่างหนามตามขวางของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนาม ประมาณอายุได้ 9 ปี

หมายเหตุ PC; Pulp cavity และ ID; Inner dentine layer

2. การตรวจสอบอายุ

หนามบริเวณกรีบหลังอันที่สอง ของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนาม จำนวน 65 ตัวอย่าง (เพศผู้ 20 ตัว และเพศเมีย 45 ตัว) หนามสามารถนำมาใช้ประเมินอายุได้ทั้งหมด 65 หนาม เนื่องจากมีหนามที่หักบริเวณปลายหนามเล็กน้อยจำนวน 14 หนาม ซึ่งไม่มีผลต่อการอ่านอายุ โดย หนามทั้งหมดเป็นแบบ Non worn คือ หนามมีลักษณะโค้งตรงปลาย (last readable point: LRP > 2.45 มิลลิเมตร) (Tribuzio *et al.*, 2010) การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเหยียดของปลาและ enamel base diameter (EBD) มีความสัมพันธ์เชิงเส้นตรงดังสมการ

$EBD=0.43+0.09TL$ ($R^2=0.75$, $S_{x,y}=0.07$) จากสมการความสัมพันธ์ แสดงให้เห็นว่า เมื่อความยาวของปลาเพิ่มขึ้น ขนาดของ EBD จะมีการเพิ่มขึ้นไปในทิศทางเดียวกัน (ภาพที่ 24) และจากการประมาณอายุจากฟิวส์ด้านนอกของหนาม พบว่า อายุของตัวอย่างปลาฉลามเพศผู้ อยู่ในช่วง 4-8 ปี (ความยาวเหยียด 46.0-50.5 เซนติเมตร) และเพศเมียอยู่ในช่วง 4-12 ปี (ความยาวเหยียด 43.3-72.1 เซนติเมตร) อายุที่อ่านได้จากฟิวส์ด้านนอกระหว่างการอ่านของผู้อ่านทั้งสองคน มีค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการตัดสินใจอายุที่ประเมินได้ มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 22.90%

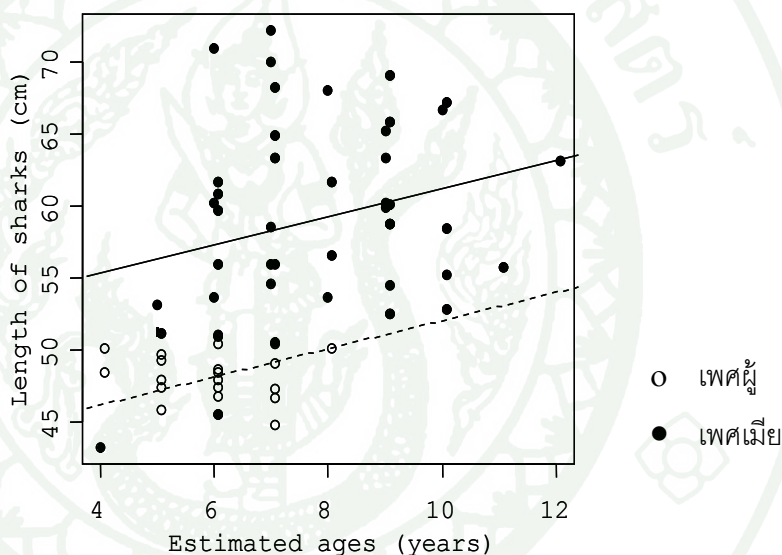


ภาพที่ 24 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเฉลี่ยของปลาและEBD จากหนามของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนามจำนวน 65 ตัวอย่าง

หนามบริเวณครีบทองที่สองจำนวน 12 ตัวอย่างได้ถูกนำมาตัดตามขวางเพื่อประมาณอายุการเติบโตจากชั้นด้านใน อายุอยู่ในช่วง 7 – 11 ปี การวัดสัมประสิทธิ์ความผันแปรของการอ่านจากผู้อ่านสองคนเฉลี่ย เท่ากับ 12.58% จากนั้นนำข้อมูลอายุที่อ่านได้จากฟิวคานนอกของหนามและการตัดตามขวางเปรียบเทียบความแตกต่างของอายุที่อ่านได้ โดยการวิเคราะห์ทางสถิติไคกำลังสองที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 มีค่าวิกฤติจากตารางเท่ากับ 3.8415 ($df = 2$) พบว่าอายุที่อ่านได้จากฟิวคานนอกและการตัดตามขวางไม่แตกต่างกัน ($\chi^2 = 0.848$, $p > 0.05$) ดังนั้นจึงเลือกใช้การอ่านอายุของปลาฉลามหลังหนามจากฟิวคานนอกซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกและประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่า

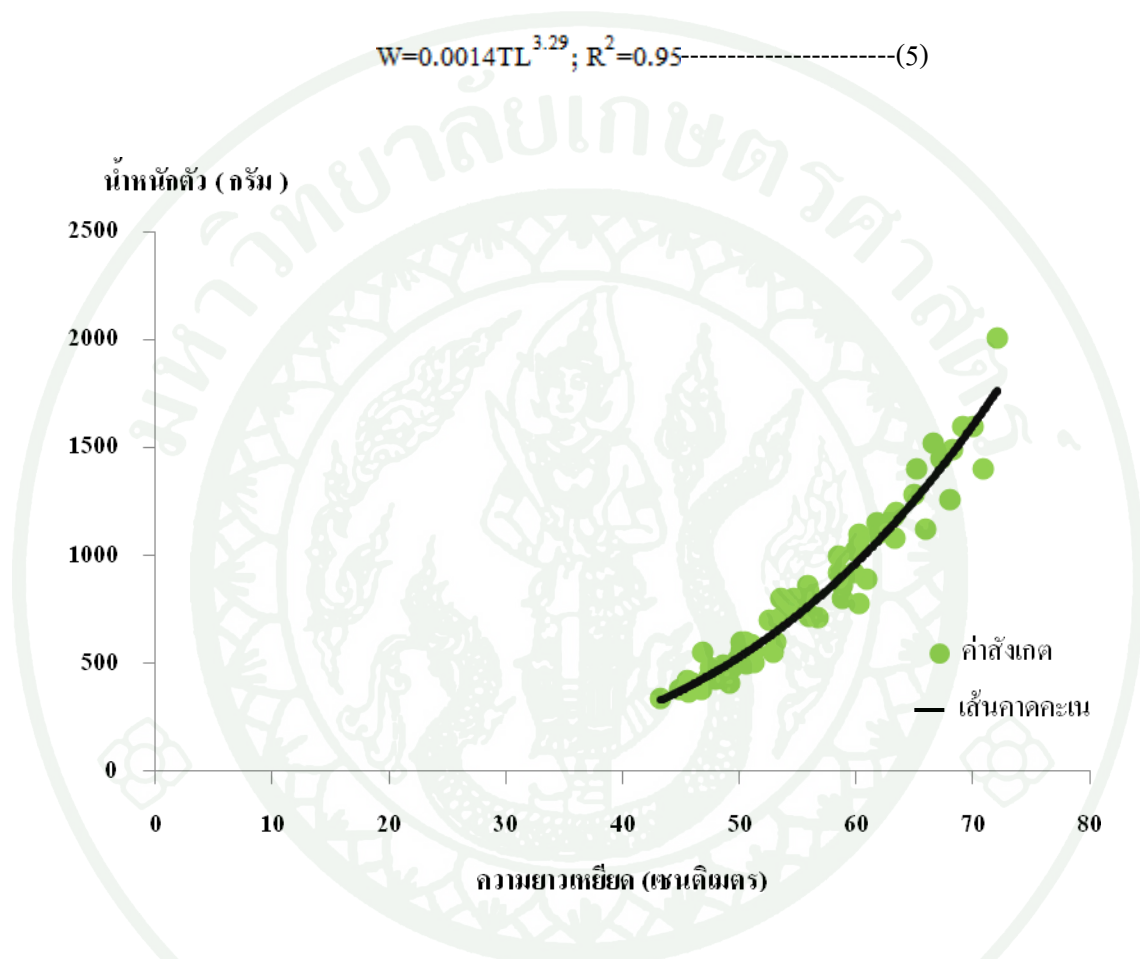
3. การวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วม

ความสัมพันธ์ระหว่างอายุและความยาวของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนามเพศเมียจะมีแนวโน้มที่มีความยาวมากกว่าตัวอย่างปลาเพศผู้ที่อายุเดียวกัน (ภาพที่ 25) แต่จากการวิเคราะห์ความแปรปรวนร่วมที่มีอายุเป็นปัจจัยร่วมของความยาวเหยียดของปลา พบว่า อัตราการเติบโตระหว่างเพศผู้และเพศเมียไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($F = 0.9966$, $p = 0.3221$) ดังนั้น การวิเคราะห์การเติบโตจะใช้ข้อมูลการวิเคราะห์แบบรวมเพศ ซึ่งต่างจากรายงานของ Wilson and Seki (1994); Fischer *et al.* (2006) และ Oddone *et al.* (2010) ที่ศึกษาปลาฉลามหลังหนาม รายงานว่า ปลาฉลามชนิดนี้เพศเมียมีขนาดตัวใหญ่กว่าเพศผู้



ภาพที่ 25 อายุและความยาวเหยียดของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนามเพศผู้ (วงใส) และเพศเมีย (วงทึบ)

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนักตามสมการ (1) วิเคราะห์แบบรวมเพศ ประมาณค่าพารามิเตอร์ของสมการ โดยวิธีกำลังสองน้อยสุด ได้ค่าประมาณ b และ q เท่ากับ 3.29 และ 0.0014 ตามลำดับ มีค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน ($S_{y.x}$) เท่ากับ 0.09 (ภาพที่ 22) ดังสมการ



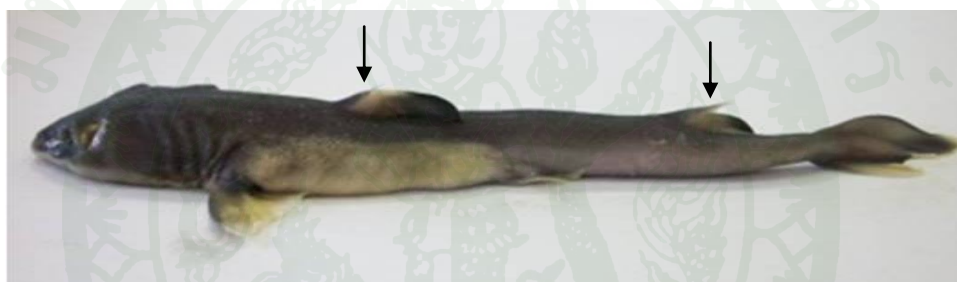
ภาพที่ 26 ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเหยียดและน้ำหนักของปลาฉลามหลังหนาม

จากความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนักที่วิเคราะห์โดยวิธีกำลังสองน้อยสุด มีค่า b เท่ากับ 3.29 เมื่อคำนวณช่วงความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95 ของค่ายกกำลังในความสัมพันธ์ระหว่างความยาวเหยียดและน้ำหนักของปลา ที่องศาแห่งความอิสระ (df) เท่ากับ 63 ค่า $S_b = 0.0917$ มีค่าอยู่ระหว่าง $3.1058 \leq b \leq 3.4724$ ซึ่งไม่ครอบคลุมค่า 3 แสดงว่ารูปแบบการเติบโตของปลาฉลามหลังหนามในการศึกษานี้เป็นแบบอัลโลเมตริก เมื่อเปรียบเทียบค่า b แบบรวมเพศ พบว่ามีค่าใกล้เคียงกับ ข้อมูลของ Frota *et al.* (2004) มีค่าเท่ากับ 3.176 และข้อมูลแบบแยกเพศ ค่า b ของเพศผู้และเพศเมีย มีค่า เท่ากับ 3.13 และ 3.45 ตามลำดับ (Cotton *et al.*, 2011) และจากการศึกษาของ Wilson and Seki (1994) ที่ศึกษาในบริเวณ Central North Pacific Ocean ได้ค่า b ของเพศผู้เท่ากับ

2.687 และเพศเมีย เท่ากับ 3.089 ซึ่งเป็นไอโซเมตริกมากกว่าการศึกษาในครั้งนี้อย่างไรก็ตาม ซึ่งอาจเกิดเนื่องจากพื้นที่ศึกษา จำนวนตัวอย่าง และช่วงความยาวของตัวอย่างต่างกัน คือ เพศผู้ 102 ตัว (ช่วงความยาวเฉลี่ย 20.8-72.2 เซนติเมตร) และเพศเมีย 105 ตัว (ช่วงความยาวเฉลี่ย 20.6-79.5 เซนติเมตร)

4. การเติบโต

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ตัวอย่างของตัวอ่อนปลาฉลามหลังหนาม (ภาพที่ 27) ทั้งหมด 4 ตัว มีค่าความยาวเฉลี่ยเท่ากับ 16.6 เซนติเมตร และนำค่าความยาวของตัวอ่อนเฉลี่ยเป็นค่าอ้างอิงของความยาวของสัตว์น้ำเมื่อมีอายุเท่ากับศูนย์ (L_0) ในการติดตามเส้นโค้งการเติบโต ซึ่งหนามที่บริเวณครีบหลังได้มีการเติบโตตั้งแต่อยู่ในท้องแม่ (ภาพที่ 28)



ภาพที่ 27 ตัวอ่อนปลาฉลามหลังหนาม

หมายเหตุ สัญลักษณ์ ↓ หนามครีบหลังอันแรกและหนามครีบหลังอันสองของตัวอ่อน

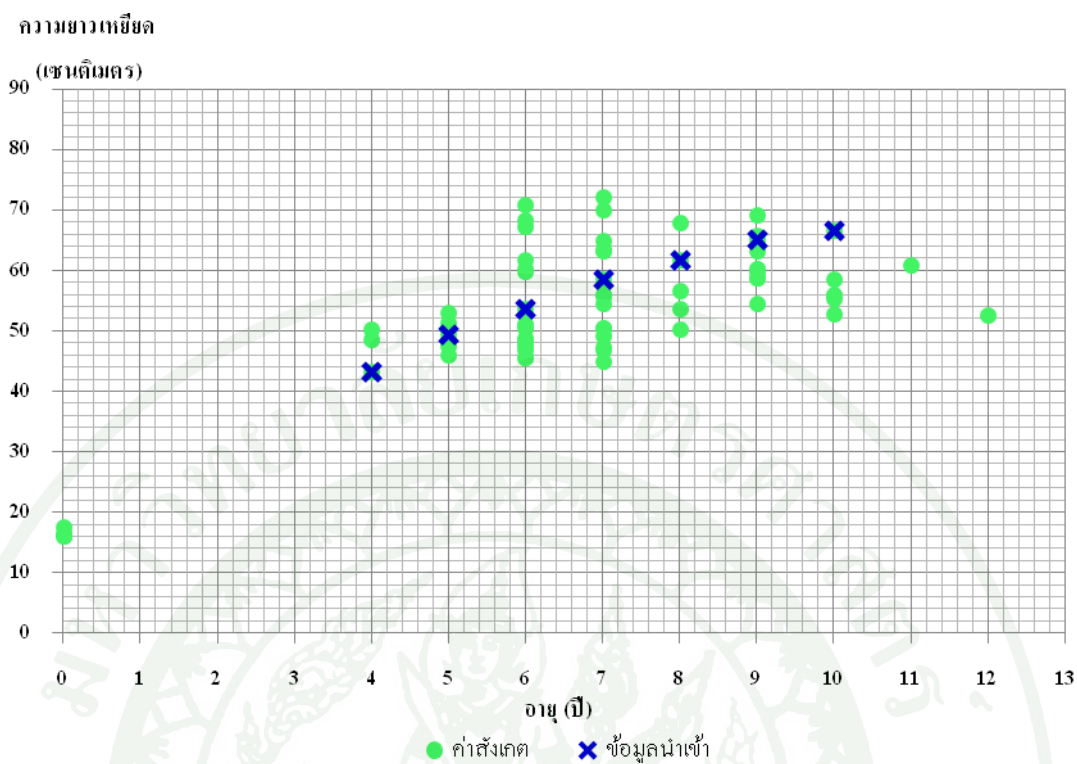


ภาพที่ 28 หนามของตัวอ่อนปลาฉลามหลังหนาม

หมายเหตุ - หนามคิริบหลังอันแรก (ซ้าย)

หนามคิริบหลังอันสอง (ขวา)

เมื่อนำข้อมูลอายุและความยาวเหยียดของตัวอย่างปลาฉลามหลังหนามมาสร้าง ความสัมพันธ์ เพื่อติดตามเส้นโค้งการเติบโต และใช้เป็นข้อมูลนำเข้าในการประมาณพารามิเตอร์ การเติบโต ดังภาพที่ 29 โดยการติดตามเส้นโค้งการเติบโตเส้นที่สอดคล้องกับข้อมูลความยาวมากที่สุด (ภาพที่ 29 สัญลักษณ์ X) และได้ความสัมพันธ์เป็นความยาวในแต่ละอายุดังตารางที่ 8



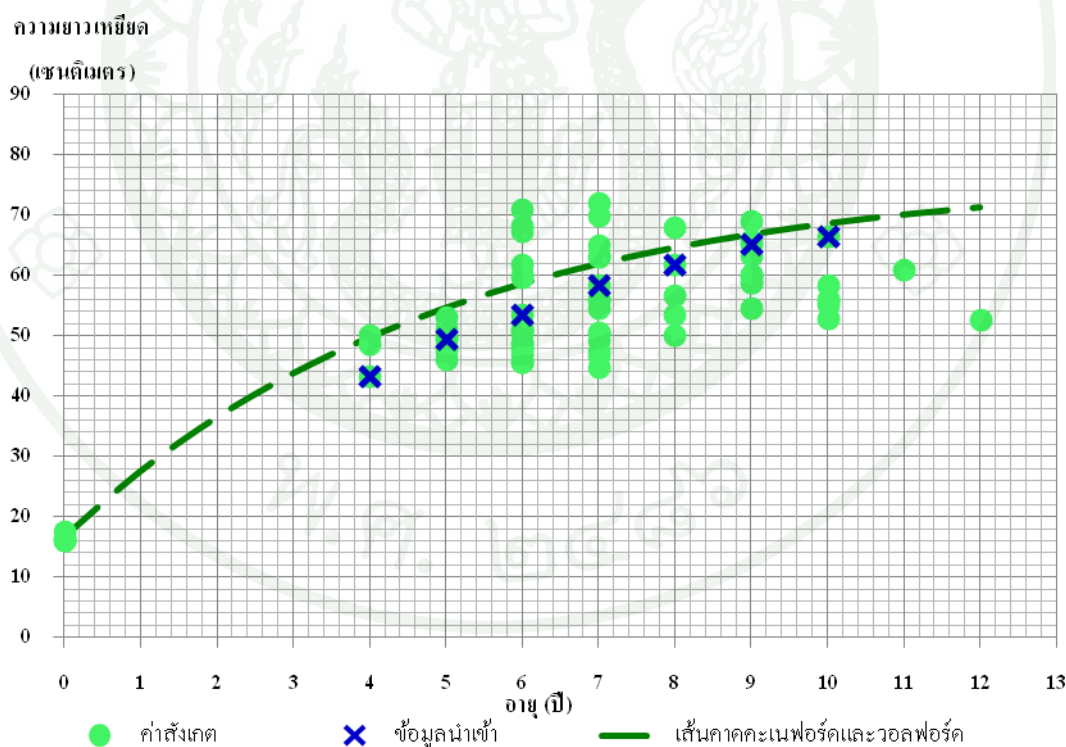
ภาพที่ 29 การติดตามเส้นโค้งการเติบโต

ตารางที่ 8 ข้อมูลนำเข้าในการวิเคราะห์พารามิเตอร์การเติบโต

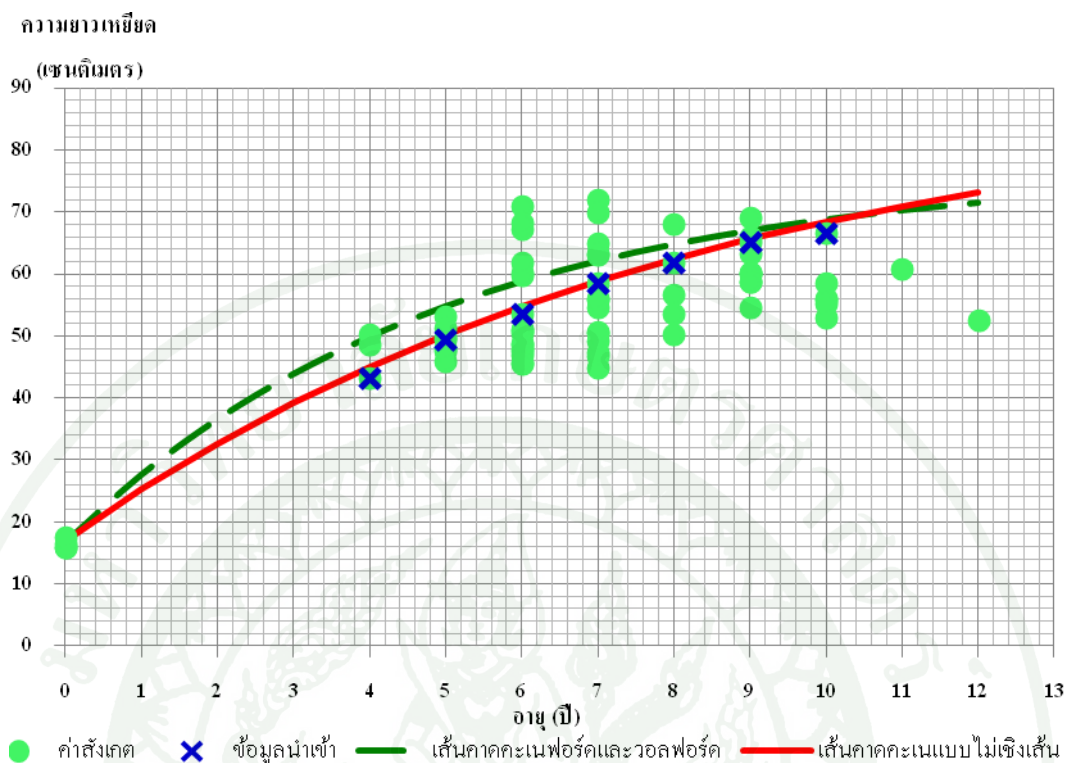
อายุ (ปี)	ความยาวเหยียด (เซนติเมตร)
4	43.3
5	49.4
6	53.6
7	58.5
8	61.8
9	65.2
10	66.6

เมื่อวิเคราะห์การถดถอยแบบเชิงเส้นจากข้อมูลอายุและความยาวในตารางที่ 8 โดยการประมาณค่าพารามิเตอร์การเติบโต L_{∞} , K ใช้วิธีของฟอร์ตและวอลฟอร์ด และ t_0 ประมาณค่าใช้ นิยามของค่าความยาวแรกฟัก (ธนียฐา, 2552) โดยมีใช้ค่าความยาวแรกฟักที่ได้มาจากการเก็บ ตัวอย่าง มีความยาวเหยียดเฉลี่ย เท่ากับ 16.6 เซนติเมตร ซึ่งค่าพารามิเตอร์ที่ประมาณได้ คือ $L_{\infty} = 76.88$ เซนติเมตร $K = 0.20$ ต่อปี และ $t_0 = -1.22$ ปี (ภาพที่ 30) จะเห็นได้ว่าเส้นคาดคะเนที่ได้ จากวิธีนี้ไม่สอดคล้องกับข้อมูลความยาวที่ติดตามเส้นโค้งการเติบโต ค่าพารามิเตอร์การเติบโตที่ ประมาณได้มีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง ดังนั้นจึงนำค่าพารามิเตอร์ที่ได้จากวิธีของฟอร์ตและวอล ฟอร์ดเป็นข้อมูลนำเข้าไปในโปรแกรม R เพื่อวิเคราะห์การถดถอยแบบไม่เชิงเส้น (nonlinear regression) ได้ค่า $L_{\infty} = 90.67$ เซนติเมตร $K = 0.12$ ต่อปี และ $t_0 = -1.72$ ปี (ภาพที่ 31 เส้นคาดคะเนแบบไม่เชิงเส้น) ดังสมการ

$$L_t = 90.67 \times (1 - e^{-0.12(t+1.72)}) \text{-----(6)}$$



ภาพที่ 30 การติดตามเส้นโค้งการเติบโต และเส้นโค้งการเติบโตวิธีฟอร์ตและวอลฟอร์ด



ภาพที่ 31 การติดตามเส้นโค้งการเติบโต และเส้นโค้งการเติบโต

ผลการประมาณค่าพารามิเตอร์การเติบโต โดยใช้วิธีของฟอร์ดและวอลฟอร์ด และการถดถอยแบบไม่เชิงเส้น ได้ค่าพารามิเตอร์ดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 พารามิเตอร์การเติบโต

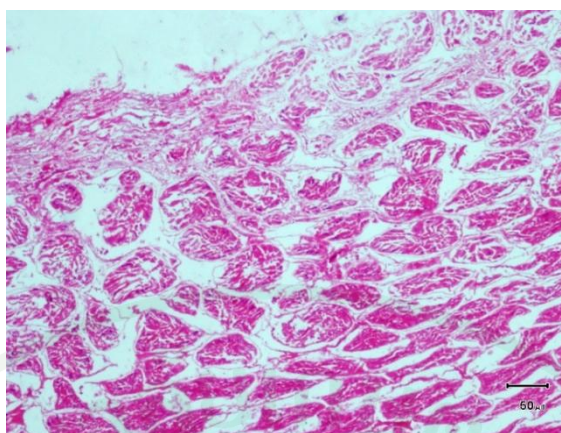
วิธีการ	L_{∞} (เซนติเมตร)	K (ต่อปี)	t_0 (ปี)
ฟอร์ดและวอลฟอร์ด	76.88	0.20	-1.22
การถดถอยแบบไม่เชิงเส้น	90.67	0.12	-1.72

จากผลการวิเคราะห์จะเห็นว่าวิธีวิเคราะห์การถดถอยแบบไม่เชิงเส้น สามารถประมาณค่าพารามิเตอร์การเติบโตได้ใกล้เคียงกับความเป็นจริงและสอดคล้องกับค่าสังเกตของข้อมูลมากขึ้น (ภาพที่ 30 เส้นคาดคะเนแบบไม่เชิงเส้น) เนื่องจากเป็นวิธีที่อาศัยเทคนิคความควรจะเป็นสูงสุด (maximum likelihood) คือ ตัวประมาณนำเข้าสู่ข้อมูลของค่าที่ต้องการเกิดกระบวนการทวนซ้ำจนได้ค่าผลรวมเศษกำลังสองตกค้างน้อยที่สุด ทำให้ได้ค่าประมาณที่มีความเอนเอียงน้อยที่สุดและเกิดผลดีต่อการศึกษา (ธนินฐา, 2552) จากการวิเคราะห์หาค่าผลรวมเศษกำลังเท่ากับ 2.429 ค่าพารามิเตอร์การเติบโต L_{∞} ที่ได้จากการศึกษาเท่ากับ 90.67 เซนติเมตร มีค่าใกล้เคียงกับการรายงานของ Wilson and Seki (1994) วิเคราะห์ข้อมูลแบบแยกเพศ L_{∞} ของเพศเมีย เท่ากับ 107 เซนติเมตร เพศผู้ เท่ากับ 66 เซนติเมตร และการรายงานของ Cotton *et al.* (2011) L_{∞} ของเพศเมีย เท่ากับ 126 เซนติเมตร เพศผู้ เท่ากับ 72 เซนติเมตร ศึกษาในพื้นที่ของประเทศฮาวาย ในขณะที่ค่าอายุของสัตว์น้ำเมื่อความยาวเท่ากับศูนย์ (t_0) จากการศึกษาค้างนี้มีค่าเท่ากับ -1.72 ปี คือ ระยะเวลาตั้งท้องของปลาฉลามหลังหนามประมาณ 1 ปี 9 เดือน ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับระยะเวลาตั้งท้องของปลาชนิดนี้ ตั้งแต่ 2 ปีขึ้นไป (Compagno, 1984; Cavanagh and Lisney, 2003) และค่าความยาวแรกฟักจากการศึกษามีค่าต่ำกว่าการรายงานของ Compagno (1984) มีความยาวแรกฟักประมาณ 22-26 เซนติเมตร และ Oddone *et al.* (2010) มีค่าประมาณ 22-24 เซนติเมตร อาจเนื่องจากตัวอ่อนที่ได้จากการศึกษาค้างนี้ยังไม่ถึงช่วงระยะเวลาการคลอด คือระยะเวลาตั้งท้องน้อยกว่าสองปีและ ตัวแม่ที่ตั้งท้องอยู่ถูกจับขึ้นมาก่อน ซึ่งตัวแม่มีการขับตัวอ่อนออกมาทันทีที่ถูกจับขึ้นมา

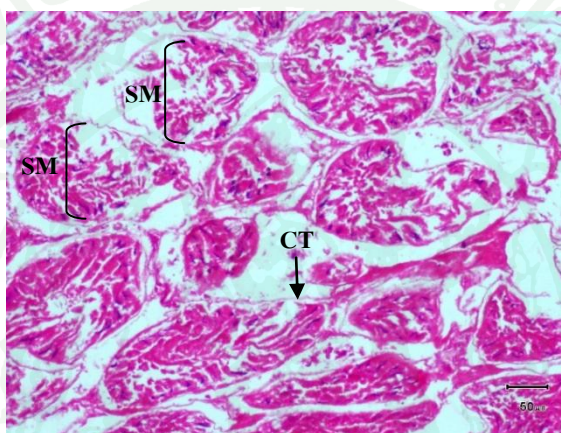
5. การสืบพันธุ์

รังไข่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถศึกษาการพัฒนาของรังไข่ได้ เนื่องจากตัวอย่างถูกเก็บเป็นระยะเวลานาน เนื้อเยื่อมีการเสื่อมสภาพจนไม่สามารถนำมาเข้าสู่กระบวนการเตรียมตัวอย่างได้

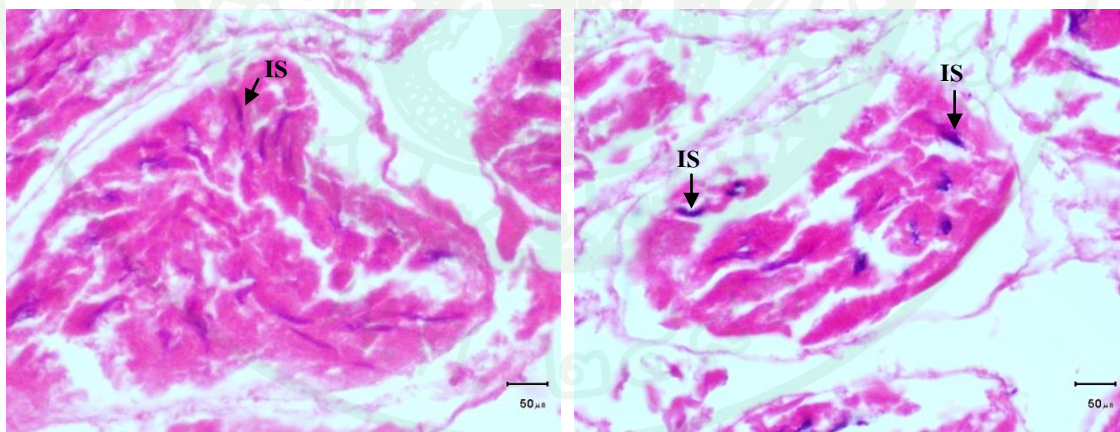
อวัยวะ จากตัวอย่างปลาฉลามหลังหนามเพศผู้ 5 ตัว ช่วงความยาวอยู่ในช่วง 46.8-50.5 เซนติเมตร การพัฒนาของอวัยวะ (testes) ด้วยวิธีศึกษาทางมิถุนวิทยา ภายในจะพบ seminiferous tubules จำนวนมาก มีลักษณะเป็นท่อที่ขดไปมา และมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นชั้นบางๆ อยู่ล้อมรอบท่อเหล่านี้ไว้ ภายในท่อ seminiferous tubules (ภาพที่ 31) จะเกิดกระบวนการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) ในการศึกษาครั้งนี้พบระยะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ใน seminiferous tubules ในระยะที่เป็น immature spermatozoa หรือระยะ early spermatozoa คือตัวอสุจิเริ่มมีส่วนหัวและหาง แต่ยังไม่มีการรวมกลุ่มกันแน่น โดยส่วนของหัวจะหันไปทาง basement membrane ของ seminiferous tubules ส่วนหางจะชี้ไปทาง lumen และพบตัวอสุจิอยู่ในปริมาณน้อยภายใน seminiferous tubules เทียบกับการพัฒนาโดยสังเกตจากอวัยวะที่ใช้ในการสืบพันธุ์ภายนอกหรือ คลาสเปอร์อยู่ในระยะที่ 1 และปริมาณ seminiferous tubules มีความหนาแน่นน้อย เมื่อคลาสเปอร์พัฒนาเข้าสู่ระยะที่ 2 ปริมาณ seminiferous tubules มีความหนาแน่นมากขึ้น และจะพบทั้งส่วนของ immature spermatozoa และ mature spermatozoa คือ อสุจิจะมีการรวมกลุ่มกันแน่น (bundles) เห็นลักษณะของหางอสุจิเป็นรูปเกลียว (spiral shape) จะคิดสีน้ำเงิน มีตัวอสุจิมีปริมาณมากกว่าอวัยวะระยะที่ 1 (ภาพที่ 32) การเปลี่ยนแปลงของระยะการพัฒนาในปลาฉลามหลังหนามเพศผู้พบในช่วงระยะท้ายของการพัฒนา อาจเนื่องจากตัวอย่างที่ได้มีขนาดที่พร้อมสืบพันธุ์ และมีขนาดใกล้เคียงกับขนาดแรกสืบพันธุ์ได้ร้อยละ 50 จากการรายงานของ Oddone *et al.*(2010) เท่ากับ 43.1 เซนติเมตร และ Wilson and Seki (1994) เท่ากับ 48 เซนติเมตร



ก



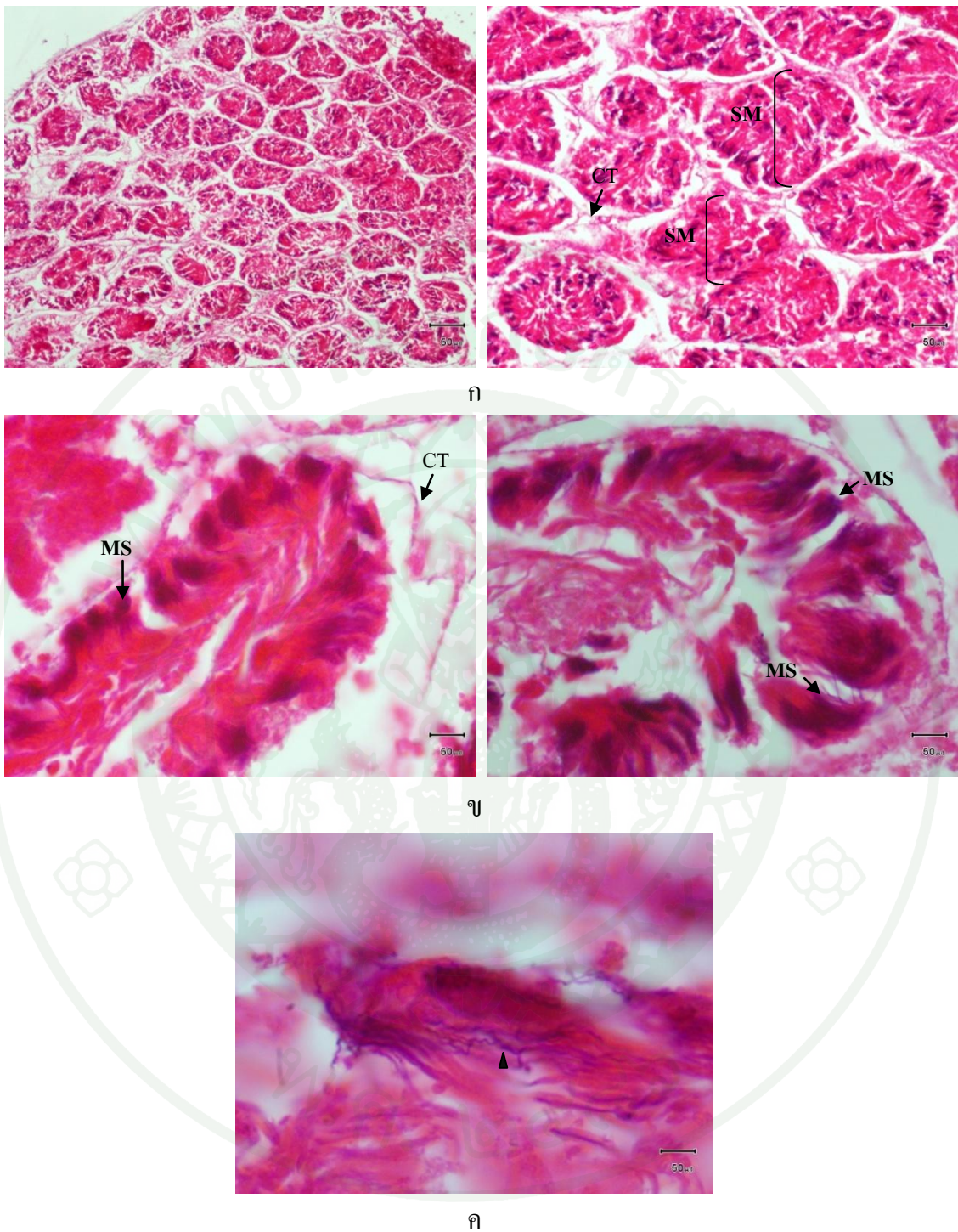
ข



ค

ภาพที่ 32 ลักษณะภายในของอวัยวะระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ภายนอกในระยะที่ 1

- ก. ภาพรวมลักษณะภายในของอวัยวะ
- ข. พบ seminiferous tubules (SM), connective tissue (CT)
- ค. Immature spermatozoa (IS)



ภาพที่ 33 ลักษณะภายในของอวัยวะระยะการพัฒนากของวัยระยะสี่บพันธุ์ภายนอกกระษะที่ 2

- ก. พบ seminiferous tubules (SM), connective tissue (CT)
- ข. mature spermatozoa (MS) ที่มีการรวมกลุ่มกันแน่น (bundle)
- ค. ลักษณะของตัวอสุจิที่มีลักษณะเป็นเกลียว (spiral shape) (▲)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. ตัวอย่างปลาฉลามหลังหนาม (*Squalus mitsukurii*) รวบรวมจากเรือสำรวจพาณิชย์สำรวจแนวไหล่ทวีป ทะเลอันดามัน ช่วงเดือนมีนาคม 2550 ทั้งหมด 65 ตัวอย่าง จากเครื่องมือเบ็ดราวหน้าดินแนวตั้งและลอบน้ำลึก ช่วงความยาวเหยียดระหว่าง 43.3-72.1 เซนติเมตร
2. การศึกษาอายุและการเติบโตของปลาฉลามหลังหนามไม่สามารถใช้ส่วนของกระดูกสันหลังเหมือนปลาฉลามชนิดอื่นๆ เนื่องจากลักษณะของกระดูกมีขนาดเล็กมากและเกิดการแตกหักง่ายเมื่อผ่านกระบวนการทำความสะอาด และส่วนของหนามจากครีบล้างอันที่หนึ่งจากการสังเกตสามารถมองเห็นแถบการเติบโตชัดเจนน้อยกว่าบริเวณครีบล้างอันที่สอง ในการศึกษาจึงเลือกใช้ หนามจากบริเวณครีบล้างอันที่สอง โดยใช้เทคนิคการอ่านจากผิวหนามด้านนอก ซึ่งให้ผลการศึกษาไม่ต่างจากเทคนิคการตัดตัวอย่างตามขวาง (cross section) อีกทั้งสะดวกและประหยัดค่าใช้จ่ายในการศึกษา และสามารถใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องจากการวัดขนาดของ EBD กับความยาวเหยียดของปลาได้อีกวิธีหนึ่ง ซึ่งเทคนิคในการศึกษาสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับปลาฉลามชนิดอื่นในกลุ่ม Squalidae
3. ความสัมพันธ์ระหว่างความยาวและน้ำหนัก คือ $W = 0.0014TL^{3.2891}$ มีรูปแบบการเติบโตของปลาฉลามหลังหนามบริเวณทะเลอันดามันเป็นแบบอัลโลเมตริก
4. ตัวแบบการเติบโตของฟอนเบอร์ทาแลนฟีดังสมการ $L_t = 90.67 \times (1 - e^{-0.12(t+1.72)})$ ระยะเวลาตั้งท้องประมาณ 1 ปี 9 เดือน
5. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางมิถุนวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์สำหรับเพศผู้ในการศึกษาพบระยะการพัฒนานี้ 2 ระยะ คือ ระยะ immature spermatozoa และระยะ mature spermatozoa

ข้อเสนอแนะ

1. ปลาฉลามจัดเป็นสัตว์น้ำที่สำคัญทางเศรษฐกิจชนิดหนึ่ง ควรมีการศึกษาทางด้านชีวประวัติของปลาฉลาม และทางด้านพลวัตประชากร เพื่อให้ผลการวิเคราะห์ข้อมูลถูกต้องและใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด ซึ่งจะนำไปสู่การใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในด้านอื่นๆ เช่น การประเมินสถานะทรัพยากร
2. การศึกษาอายุและการเติบโตจากโครงร่างแข็ง คือ หนาม ในปลาฉลามกลุ่ม Squalidae รวมถึงกลุ่มอื่นๆ ในประเทศไทยยังให้ความสนใจน้อย ควรสนับสนุนให้มีการศึกษาทางเพิ่มขึ้น เพื่อเป็นการพัฒนาความรู้และวิธีการในการศึกษาทางด้านนี้
3. ควรเก็บรวบรวมตัวอย่างให้มีจำนวนมากขึ้น และต่อเนื่อง โดยอาจซื้อต่อจากแพปลา เพื่อให้ข้อมูลการศึกษาถูกต้องและใกล้เคียงกับความเป็นจริงมากที่สุด

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชาญชัย บุรณะวนิชกุล. 2546. โลกของปลาฉลาม. สำนักพิมพ์ ที เจ เจ จำกัด. กรุงเทพฯ.

แปลจาก Sheikh-Miller J ed. **Sharks**.

ธนัญญา ทรรพนนทน ใจดี, เรียงชัย สุจิตโตสกุล, ไพโรจน์ หน่ายมี และ พิทักษ์ ใจดี. 2551.

โครงสร้างสังคมของปลาฉลามหลังหนาม (*Squalus mitsukurii* Jordan and Snyder, 1903):
กรณีศึกษาจากผลจับโดยเบ็ดราวหน้าดินแนวตั้งบริเวณไหล่ทวีปอันดามัน, น. 308-318 ใน
รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46: สาขาประมง.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ธนัญญา ทรรพนนทน ใจดี. 2552. **พลวัตประชากรสัตว์น้ำในเขตร้อน**. มิสเตอร์ก๊อปปี้, กรุงเทพฯ.

พงศ์พันธุ์ กองทอง. 2538. **ไมโครเทคนิค**, พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยรามคำแหง,
กรุงเทพฯ.

มาลา สุพงษ์พันธุ์ และเจริญ นิตินธรรมยง. 2544ก. **การประเมินสถานะทรัพยากรสัตว์น้ำในเขตร้อน
เล่มที่ ๑: คู่มือ**. องค์การอาหารและเกษตรแห่งประชาชาติ, สำนักงานประจําภูมิภาคเอเชีย
และแปซิฟิก. แปลจาก Per Sparre and Siebren C. Venema. **Introduction to tropical fish
stock assessment part 1: Manual**. FAO.

มาลา สุพงษ์พันธุ์ และเจริญ นิตินธรรมยง. 2544ข. **การประเมินสถานะทรัพยากรสัตว์น้ำในเขตร้อน
เล่มที่ ๑: คู่มือ**. องค์การอาหารและเกษตรแห่งประชาชาติ, สำนักงานประจําภูมิภาคเอเชีย
และแปซิฟิก. อ้างถึง von Bertalanffy. 1934. **Untersuchungen über die Gesetzlichkeit
des Wachstums. I. Allgemeine Grundlagen der Theorie; mathematische and
physiologische Gesetzlichkeiten des Wachstums bei Wassertieren**. Arch.
Entwicklungsmech.

วราพร ศิษุม. 2552. **ชนิดแลชีวิทยาบางประการของปลาฉลามและปลากะเบนที่ท่าเทียบเรือฝงอ่าว
ไทยและทะเลอันดามัน**. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศุภลักษณ์ โรมนันตพันธ์. 2545ก. **เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

ศุภลักษณ์ โรมนันตพันธ์. 2545ข. **เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์**. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. อ้างถึง เวคิน นพนิตย์. 2524. **เทคนิคทางเนื้อเยื่อ
วิทยา**. สำนักพิมพ์ห้างขายยาตราวุฒ, กรุงเทพฯ.

สุภาพร สุกสีเหลือง. 2550. **มินวิทยา**. บริษัท พิมพ์ดี จำกัด. กรุงเทพฯ.

อนุวัฒน์ นทีวัฒนา และอมรา ชื่นพันธุ์. 2545. ฉลาม!, ใน **International Plan of Actions for the
Conservation and Management of Sharks and the Shark Fisheries of Thailand.
RAP Publication no.2002/28. FAO Regional Office for Asia and the Pacific,
Bangkok.**

Anon. 2008. **Standardized maturity stages for Love-Bearing Shark**. Available Source:
http://www.elasmo-research.org/research/maternity_stages.htm, March 5 2011.

Anonymous. 2011. **Fertilization**. Available Source:
<http://www.sharktrust.org/content.asp?did=35453>, March 10 2011.

Avsar, D. 2001. Age, Growth, Reproduction and Feeding of the Spurdog (*Squalus acanthias*
Linnaeus, 1758) in the South-eastern Black Sea. **Estuarine, Coastal and Shelf Science**
52: 269-278.

Bailly, N. 2009. *Squalus mitsukurii* Jordan & Snyder, 1903. In: Nicolas Bailly (2009). World
Database of Marine Pisces. Available Source : <http://www.marinespecies.org>,
August 11 2010.

- Bass, A.J., J.D. D'Aubrey and N. Kistanasamy. 1976. Sharks of the east coast of southern Africa. VI. The families Oxynotidae, Squalidae, Dalatiidae and Echinorhinidae Invest. Rep. Oceanogr. **Res. Inst. Durban**. 45: 1–103.
- Beamish, R.J. and G.A. McFarlane. 1985. Annulus Development on the Second Dorsal Spine of the Spiny Dogfish (*Squalus acanthias*) and Its Validity for Age Determination. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** Vol. 42: 1799-1805.
- Cailliet, G.M. and K.J. Goldman. 2004. Age determination and validation in chondrichthyan fishes. In Carrier, J., Musick, J.A., Heithaus, M.S. (eds). *Biology of sharks and their relatives*. **CRC Press**. 399-447.
- Cailliet, G.M., R.L. Radtke and B.A. Welden. 1986. In Elasmobranch Age Determination and Verification: A Review, pp. 345-360. In T. Uyeno, R. Arai and K. Matura, eds. *In Indo-Pacific Fish Biology: proceedings of the second international conference on Indo-Pacific Fishes*. Ichthyol Soc. Tokyo, Japan.
- Cailliet, G.M., W.D. Smith, H.F. Mollet and K.J. Goldman. 2006 Age and growth studies of chondrichthyan fishes: the need for consistency in terminology, verification, validation, and growth function fitting. **Environ Bio Fish.** 77: 211-228.
- Calis, E., E.H. Jackson, C.P. Nolan and F. Jeal. 2005. Preliminary Age and Growth Estimate of the Rabbitfish, *Chimera monstrosa*, with Implications for Future Resource Management. **J. Fish Northw Atl Sci.** Vol. 35: 15–26.
- Campana, S.E. 2001. Accuracy, precision and quality control in age determination, including a review of the use and abuse of age validation methods (REVIEW PAPER). **Journal of Fish Biology** 59: 197-242.

- Campana, S.E., C. Jones, G.A. McFarlane and S. Myklevoll. 2006. Bomb dating and age validation using the spines of spiny dogfish (*Squalus acanthias*). **Environ Biol Fish.** 77: 327-336.
- Cavanagh, R.D., P.M. Kyne, S.L. Fowler, J.A. Musick and M.B. Bennett. 2003. The Conservation Status of Australian Chondrichthyans, 170 p. **In Report of the IUCN Shark Specialist Group Australia and Oceania Regional Red List Workshop.** The University of Queensland, School of Biomedical Sciences, Brisbane, Australia.
- Cavanagh, R.D. and T.J. Lisney. 2003. The Conservation Status of Australian Chondrichthyans. **In Report of the IUCN Shark Specialist Group Australia and Oceania Regional Red List Workshop.** The University of Queensland, School of Biomedical Sciences, Australia. 17-19.
- Cavanagh, R.D., T.J. Lisney and W. White. 2007. *Squalus mitsukurii*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of threatened Species. Version 2010.1. Available Source: <http://www.iucnredlist.org>, June 13 2010.
- Clarke, M.W., P.L. Connolly and J.J. Bracken. 2002. Catch, discarding, age estimation, growth and maturity of the squalid shark *Deania calceus* west and north of Ireland. **Fisheries Research** 56: 139–153.
- Clarke, M.W. and S.B. Irvine. 2006. Terminology for the ageing of chondrichthyan Fish using dorsal-fin spines. **Environ Biol Fish.** 77: 273-277.
- Compagno, L.J.V. 1984. **FAO Species Catalogue. Vol 4: Sharks of the World. An annotated and illustrated catalogue of shark species known to date. Part 1: Hexanchiformes to Lamniformes.** FAO Fisheries Synopsis 125(4/1): 1 – 249.
- Compagno, L.J.V. 2002. **The living marine resources of the western central atlantic, Vol 1.** FAO. 358-371.

- Conrath, C.L. 2005a. **Reproductive.**, pp. 133-164. In J.A. Musick and R. Bonfil, eds. **Management techniques for elasmobranch fisheries**. FAO Fisheries Technical Paper. No. 474. Rome.
- Conrath, C.L. 2005b. **Management techniques for elasmobranch fisheries**. No. 474: 138. *Cited* H.L. Pratt. 1988. Elasmobranch gonad structure: A description and survey. **Copeia**. 719-729.
- Conrath, C.L. and J.A. Musick. 2002. Reproductive biology of the dusky smooth-hound, *Mustelus canis*, in the northwest Atlantic Ocean. **Environ Biol Fish**, 64: 367-377.
- Cotton, C.F., R.D. Grubbs, T.S. Daly-Engel, P.D. Lynch and J.A. Musick. 2011. Age growth and reproduction of a common deep-water shark, shortspine spurdog (*Squalus cf. mitsukurii*), from Hawaiian waters. **Marine and Freshwater Research** 62: 811-822.
- Fischer, A.F., D.P. Veras, F.H.V. Hazin, M.K. Broadhurst, G.H. Burgess and P.G.V. Oliveira. 2006. Maturations of *Squalus mitsukurii* and *Cirrhigaleus asper* (Squalidae, Squaliformes) in the southwestern equatorial Atlantic Ocean. **J. Appl. Ichthyol.** 22: 495-501.
- Frota, L.O., P.A.S. Costa and A.C. Braga. 2004. Length-weight relationships of marine fishes from the central Brazilian coast. **NAGA, WorldFish Center Quarterly** 27(1-2): 20-26.
- Goldman, K.J. 2005. Age and growth of elasmobranch fishes., pp. 97-132. In: Musick, J.A., Bonfil, R., eds. **Management techniques for elasmobranch fisheries**. FAO Fisheries Technical Paper. No. 474. Rome.
- Hazin, F.H.V., A.F. Fischer, M.K. Broadhurst, D. Veras, P.G. Oliveira and G.H. Burgess. 2006. Notes on the reproduction of *Squalus megalops* of northeastern Brazil. **Fisheries Research** 79: 251-257.

- Irvine, S.B., J.D. Stevens and L.J.B. Laurenson. 2006a. Surface bands on deepwater squalid dorsal-fin spines: an alternative method for ageing *Centroselachus crepidater*. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 63: 617-627.
- Irvine, S.B., J.D. Stevens and L.J.B. Laurenson. 2006b. Comparison external and internal dorsal-spine bands to interpret the age and growth of the giant lantern shark, *Etmopterus baxteri* (Squaliformes: Etmopteridae). **Environ Biol Fish.** 77:253-264.
- Joung, S.J., Y.Y. Liao and C.T. Chen. 2004. Age and Growth of sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*, in northeastern Taiwan waters. **Fish. Res.** 70: 83-96.
- Kiraly, S.J., J.A. Moore and P.H. Jasinski. 2003. Deepwater and Other Sharks of the U.S. Atlantic Ocean Exclusive Economic Zone. **Marine Fisheries Review** 65 (4): 1-63.
- Lessa, R., F.M. Santana and R. paglerani. 1999. Age, growth and stock structure of the oceanic whitetip shark, *Carcharhinus longimanus*, from the southwestern equatorial Atlantic. **Fisheries Research** 42: 21-30.
- Lucifora, L.O., J.L. Valero and V.B. Garcia. 1999. Length at maturity of the greeneye spurdog shark, *Squalus mitsukurii* (Elasmobranchii: Squalidae), from the SW Atlantic, with comparison with other regions. **Marine and Freshwater Research** 50: 629-32.
- Machado, P.B. and I. Figueiredo. 2000. A technique for ageing the birdbeak dogfish from dorsal spine. **Fisheries Research** 45: 93-98.
- Monkolprasit, S. 1989. **The Cartilaginous fishes (Class Elasmobranchii) found in Thai water and adjacent area.** Department Fishery Biology Faculty of Fisheries Kasetsart University., Bangkok. P. 260.

- Moreno, M.C. and F.G. Magana. 2006. Reproductive biology of the mako shark *Isurus oxyrinchus* on the south-western coast of Baja California, Mexico. **Cybiurn** 30(4): 75-83.
- Nelson, J.S. 1994. **Fishes of the world**. Third edition. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Oddone, M.C., L. Paesch and W. Norbis. 2010. Size Structure, Abundance and Preliminary Information on the Reproductive Parameters of the Shortspine Spurdog (*Squalus mitsukurii*) in the Argentinean-Uruguayan Common Fishing Zone from the mid-1990s. **J. Fish Northw Atl Sci**. Vol. 43: 13-26.
- Rice, J.S., V. F. Gallucci and G.H. Kruse. 2009. Evaluation of the precision of age estimates for spiny dog fish. **American Fisheries Society** 161-168.
- Ricker, J. 1958. **Handbook of computation for biological statistics of fish population**. Fish. Res. Board Can. Bull. No. 119.
- Rizzo, P., S. Gancitano, C. Badalucco, S. Enajjar, C. Mancusi, A. Mosteiro Cabanelas, B. Saidi and L. Sion. 2006. Contribution to Guidelines for Age Determination of Chondrichthyes fish from the Mediterranean Sea (application to selected species). P. **In Report of the MedSudMed Training Course on Age Determination of Selacean Fish**, 22 November-01 December 2004. Mazara del Vallo, Italy. 1-22.
- Southeast Asian Fisheries Development Center [SEAFDEC]. 2004. The Study on Conservation and Management of Shark Fisheries in Southeast Asian Region. P. **In Report of Shark Fisheries in Thailand**. Southeast Asian Fisheries Development Center: SEAFDEC.
- Soldat, V.T. 1982. Age and Size of Spiny Dogfish, *Squalus acanthias*, in the Northwest Atlantic. **Sci. Coun. Studies**, No. 3: 47-52.

- Stenberg, C. 2005. Life History of the Pike Dogfish (*Squalus acanthias* L.) in Swedish Waters. **J. Northw. Atl. Fish Sci.** 35: 155-164.
- Tanaka, S. 1990. The Structure of the dorsal spine of the deep sea squaloid shark *Centrophorus acus* and its utility for age determination. **Nippon Suisan Gakkai Shi (Bull Jpn Soc Sci Fish)** 56(6): 903-909.
- Tovar-Avila, J.,C. Izzo, T.I. Walker, J.M. Braccini and R.W. Day. 2007. Dorsal-fin spine growth of *Heterodontus portusjacksoni*: a general model that applies to dorsal-fin spines of chondrichthyans?. **Can. J. Fish. Aquat. Sci.** 65: 74-82.
- Tribuzio C.A., G.H. Rouse and J.T. Fujioka. 2010. Age and growth of spiny dogfish (*Squalus acanthias*) in the Gulf of Alaska analysis of alternative growth models. **Fish. Bull.** 108: 119-135.
- Wilson, C. D. and M. P. Seki. 1994. Biology and population characteristics of *Squalus mitsukurii* from a seamount in the central North Pacific Ocean. **Fish. Bull** 92: 851–864.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อทางมิถุนวิทยาด้วยเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ

โลหี่	สารเคมี	ระยะเวลาที่ใช้	
1	70% isopropanol	40	นาที
2	70% isopropanol	40	นาที
3	80% isopropanol	40	นาที
4	80% isopropanol	40	นาที
5	95% isopropanol	40	นาที
6	95% isopropanol	40	นาที
7	100% isopropanol	60	นาที
8	100% isopropanol	60	นาที
9	Xylene	60	นาที
10	Xylene	60	นาที
11	พาราฟินหลอมเหลว	40	นาที
12	พาราฟินหลอมเหลว	40	นาที

ตารางผนวกที่ 2 ขั้นตอนการข้อมลีสีมาที่ออกซิลินและอีไอซิน (H&E)

	ขั้นตอน	ระยะเวลาที่ใช้	
1	Xylene I	5	นาที
2	Xylene II	5	นาที
3	100% แอลกอฮอล์	2	นาที
4	95% แอลกอฮอล์	2	นาที
5	70% แอลกอฮอล์	2	นาที
6	ล้างน้ำประปาไหลผ่าน	1-2	นาที
7	ข้อมลีสีมาที่ออกซิลิน	5	นาที
8	ล้างน้ำประปาไหลผ่าน	1-2	นาที
9	จุ่มเร็วๆใน 1% แอซิดแอลกอฮอล์	1-2	ครั้ง
10	ล้างน้ำประปาไหลผ่าน	1	นาที
11	จุ่มลงในลิเทียมคาร์บอเนต	1	นาที
12	ล้างน้ำประปาไหลผ่าน	1	นาที
13	ข้อมลีสีอีไอซิน	2	นาที
14	จุ่มลง 70% แอลกอฮอล์	1	นาที
15	95% แอลกอฮอล์ I	2	นาที
16	95% แอลกอฮอล์ II	2	นาที
17	100% แอลกอฮอล์ I	2	นาที
18	100% แอลกอฮอล์ II	2	นาที
19	Xylene I	5	นาที
20	Xylene II	5	นาที
21	ปิดกระจกปิดสไลด์ด้วยเปอร์เมตต์		

ตารางผนวกที่ 3 ข้อมูลปลาจลามหลังนาม และอายุที่อ่านจากวิธีฟันหนามด้านนอก

ตัวที่	เครื่องมือ	เพศ	ความยาว เหยียดปลา (ซม.)	น้ำหนักตัว (ก.)	การวัดหนาม (มม.)			อายุที่อ่านจากผู้อ่าน 1 (ปี)		อายุที่อ่านจากผู้อ่าน 2 (ปี)	
					TL	EBD	LPR	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
1	BVL	ผู้	49.2	410	42.00	5.10	2.46	6	6	8	7
2	BVL	เมีย	72.1	2005	47.40	7.60	2.62	7	7	8	9
3	BVL	เมีย	70.0	1600	43.40	7.90	2.57	6	6	9	8
4	BVL	เมีย	58.5	1000	53.00	5.80	2.45	7	7	7	8
5	BVL	เมีย	60.2	1100	47.50	6.40	2.49	5	5	8	8
6	BVL	เมีย	53.6	800	51.10	6.00	2.50	5	5	9	7
7	BVL	เมีย	65.2	1400	61.30	7.40	2.57	7	7	14	10
8	BVL	ผู้	50.2	600	35.50	5.20	2.47	3	3	5	4
9	BVL	ผู้	50.5	600	42.40	4.80	2.47	4	4	8	7
10	BVL	เมีย	54.6	800	47.20	5.80	2.52	7	7	9	8
11	BVL	ผู้	46.9	550	36.00	5.20	2.45	4	4	7	7
12	BVL	เมีย	68.0	1260	60.00	7.30	2.58	7	7	10	11
13	BVL	เมีย	66.6	1520	55.00	7.00	2.55	10	10	13	11
14	BVL	ผู้	48.0	430	38.00	4.90	2.46	3	3	9	6

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ตัวที่	เครื่องมือ	เพศ	ความยาว เหยียดปลา (ซม.)	น้ำหนักตัว (ก.)	การวัดหนาม (มม.)			อายุที่อ่านจากผู้อ่าน 1 (ปี)		อายุที่อ่านจากผู้อ่าน 2 (ปี)	
					TL	EBD	LPR	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
15	BVL	ผู้	48.6	490	40.20	5.70	2.45	3	3	6	4
16	BVL	เมีย	60.2	1070	51.00	6.60	2.47	7	7	14	11
17	BVL	เมีย	63.3	1080	49.40	5.70	2.50	9	9	11	10
18	BVL	เมีย	59.9	1020	44.40	7.00	2.49	10	10	11	10
19	BVL	เมีย	70.9	1400	47.40	7.70	2.60	5	5	7	7
20	BVL	ผู้	47.4	440	41.70	5.00	2.47	6	6	9	9
21	BVL	ผู้	45.6	420	44.00	5.30	2.48	4	4	7	7
22	BVL	เมีย	43.3	340	28.80	5.00	2.46	4	4	4	4
23	BVL	เมีย	53.6	710	50.60	5.70	2.48	7	7	11	9
24	BVL	เมีย	53.1	600	48.00	5.20	2.47	3	3	7	7
25	BVL	เมีย	55.9	860	50.50	6.00	2.46	5	5	9	10
26	TRAP	เมีย	51.3	505	38.00	5.30	2.52	4	4	5	4
27	TRAP	เมีย	52.9	550	47.70	5.50	2.49	7	7	14	11
28	TRAP	ผู้	48.0	450	42.90	5.50	2.46	4	4	6	7

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ตัวที่	เครื่องมือ	เพศ	ความยาว เหยียดปลา (ซม.)	น้ำหนักตัว (ก.)	การวัดหนาม (มม.)			อายุที่อ่านจากผู้อ่าน 1 (ปี)		อายุที่อ่านจากผู้อ่าน 2 (ปี)	
					TL	EBD	LPR	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
29	TRAP	ผู้	50.5	530	44.40	5.50	2.47	5	5	8	7
30	TRAP	ผู้	49.8	515	41.80	4.90	2.45	3	3	6	5
31	TRAP	เมีย	56.0	830	48.50	5.80	2.49	3	3	9	6
32	TRAP	เมีย	67.3	1450	65.00	7.60	2.51	8	8	12	10
33	TRAP	เมีย	55.8	740	44.00	6.60	2.47	7	7	14	13
34	TRAP	เมีย	60.9	890	56.70	5.50	2.48	4	4	7	7
35	TRAP	ผู้	47.5	435	43.60	5.20	2.45	4	4	8	5
36	TRAP	เมีย	51.0	590	36.60	5.50	2.48	4	4	7	6
37	TRAP	ผู้	47.5	480	37.60	5.60	2.46	3	3	6	6
38	TRAP	ผู้	46.0	410	28.70	5.60	2.45	3	3	7	5
39	TRAP	ผู้	46.8	380	40.80	5.40	2.47	5	5	9	8
40	TRAP	ผู้	48.8	440	44.00	4.00	2.47	5	6	7	6
41	TRAP	เมีย	68.3	1490	56.90	6.80	2.53	5	7	9	6
42	TRAP	เมีย	63.2	1180	56.40	6.80	2.49	11	11	12	11

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ตัวที่	เครื่องมือ	เพศ	ความยาว เหยียดปลา (ซม.)	น้ำหนักตัว (ก.)	การวัดหนาม (มม.)			อายุที่อ่านจากผู้อ่าน 1 (ปี)		อายุที่อ่านจากผู้อ่าน 2 (ปี)	
					TL	EBD	LPR	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
43	TRAP	เมีย	52.6	700	46.80	5.50	2.45	8	9	10	9
44	TRAP	เมีย	69.1	1600	49.10	7.30	2.54	9	8	10	8
45	TRAP	เมีย	65.9	1120	58.20	6.60	2.49	11	6	12	7
46	TRAP	เมีย	58.5	920	68.00	6.70	2.46	11	8	12	8
47	TRAP	เมีย	58.8	800	46.40	6.70	2.46	7	9	9	9
48	TRAP	เมีย	59.8	920	54.00	7.00	2.49	5	5	6	5
49	TRAP	เมีย	61.8	1100	56.00	6.60	2.47	7	7	8	10
50	TRAP	เมีย	65.0	1280	49.70	5.60	2.46	4	8	6	9
51	TRAP	เมีย	61.8	1150	55.00	6.80	2.48	5	6	6	5
52	TRAP	เมีย	56.7	710	49.50	5.60	2.45	6	7	9	8
53	TRAP	เมีย	63.4	1200	69.80	7.20	2.51	6	7	8	7
54	TRAP	เมีย	60.2	780	55.20	6.00	2.49	7	7	9	10
55	TRAP	ผู้	50.2	560	42.00	5.00	2.46	6	6	8	8
56	TRAP	เมีย	54.6	760	49.00	6.20	2.45	7	7	13	9

ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

ตัวที่	เครื่องมือ	เพศ	ความยาว เหยียดปลา (ซม.)	น้ำหนักตัว (ก.)	การวัดหนาม (มม.)			อายุที่อ่านจากผู้อ่าน 1 (ปี)		อายุที่อ่านจากผู้อ่าน 2 (ปี)	
					TL	EBD	LPR	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2
57	TRAP	เมีย	58.8	860	54.00	6.20	2.47	9	9	9	9
58	TRAP	เมีย	55.3	770	44.40	5.90	2.45	8	8	12	10
59	TRAP	เมีย	56.0	720	51.40	6.40	2.48	5	5	8	7
60	TRAP	เมีย	51.2	560	47.50	5.30	2.46	5	5	6	6
61	TRAP	เมีย	45.7	370	42.90	5.00	2.45	5	5	6	6
62	TRAP	ผู้	44.9	380	41.10	4.90	2.47	6	6	7	7
63	TRAP	เมีย	50.6	500	45.00	5.60	2.49	6	6	7	7
64	TRAP	ผู้	49.4	480	41.60	5.60	2.53	4	4	7	5
65	TRAP	ผู้	48.6	450	41.40	5.00	2.48	5	5	8	6

หมายเหตุ BVL เครื่องมือเบ็ดราวหน้าดินแนวตั้ง

TRAP เครื่องมือลอบน้ำลึก

TL spine total length

EBD enamel base diameter

LRP last readable point



ภาพผนวกที่1 หนามที่ฝังในน้ำยาเรซิน



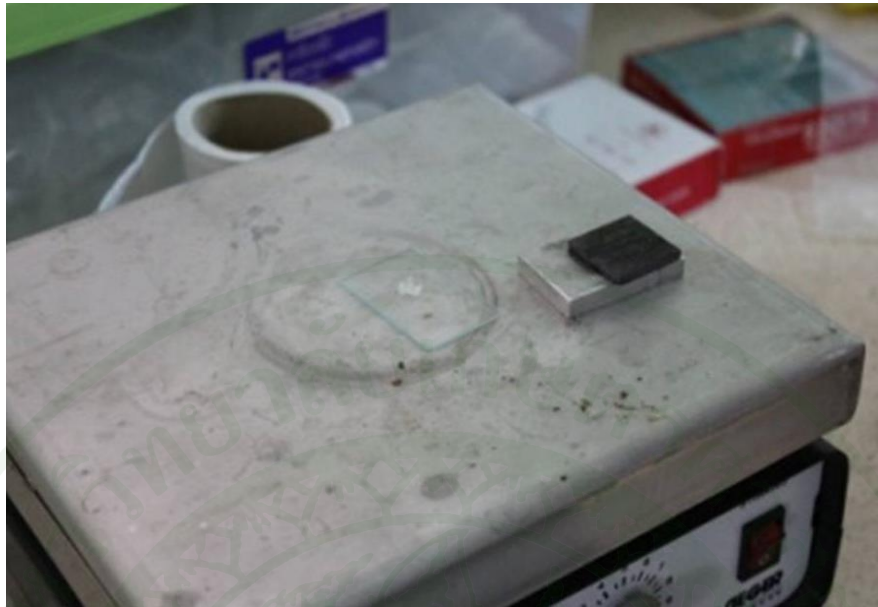
ภาพผนวกที่2 ทำตำแหน่งก่อนการตัดตัวอย่าง



ภาพผนวกที่3 เครื่องมือ low speed diamond saw



ภาพผนวกที่4 ตัวอย่างหนามที่ผ่านการตัดตามขวาง



ภาพผนวกที่5 ตัวอย่างหนามที่ตัดแล้วติดลงบนแผ่นสไลด์



ภาพผนวกที่6 จัดตัวอย่างให้มีความหนาประมาณ00-400 ไมโครเมตร

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวกนกวรรณ ไพบูลย์ลีสกุล
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 9 พฤษภาคม 2529
สถานที่เกิด	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการจัดการทรัพยากร ทะเลและชายฝั่ง) มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา เพื่อการตีพิมพ์ผลงานใน วารสารนานาชาติ ปี 2552 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์