รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ *Holothuria atra* Jaeger, 1833 (Echinodermata: Holothuroidea) โดยอาศัยการปรับเปลี่ยนสภาพแวดล้อมบางประการ

Induction of Gamete Release in Lollyfish, *Holothuria atra* Jaeger, 1833 (Echinodermata: Holothuroidea) by Change of Some Environmental Factors

นางสาวแขวลี วิบูลย์กิจ

ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ 2554
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร

ชื่อโครงการ การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ *Holothuria atra* Jaeger, 1833 (Echinodermata: Holothuroidea) โดยอาศัยการปรับเปลี่ยนสภาพแวดล้อมบางประการ
แหล่งเงิน เงินรายได้
ประจำปีงบประมาณ 2554 **จำนวนที่ได้รับการสนับสนุน** 170,000 บาท
ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี **ตั้งแต่** ตุลาคม 2553 ถึง กันยายน 2554
หัวหน้าโครงการวิจัย นางสาวแขวลี วิบูลย์กิจ **หน่วยงานต้นสังกัด** สาขาวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

บทคัดย่อ

ปลิงดำ (lollyfish*; Holothuria atra* Jaeger, 1833) ที่ถูกรวบรวมจากธรรมชาตินำมากระตุ้นให้มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ โดยอาศัยเทคนิคการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิและช่วงเวลาการได้รับแสง ผลการศึกษาพบว่าช่วงเวลาการได้รับแสงไม่มีผลต่อการกระตุ้นการปล่อยปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ปลิงดำ เทคนิคการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิทั้ง 4 วิธี สามารถกระตุ้นให้ปลิงดำปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ ในขณะที่ชุดควบคุมไม่มีผลกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงที่ทำการศึกษา การช๊อคด้วยอุณหภูมิต่ำเป็นวิธีการที่สามารถกระตุ้นให้มีการปล่อยไข่และอสุจิจำนวนมากที่สุด ไข่ที่ได้จากวิธีนี้มีอัตราการฟักสูงที่สุด (50.794±15.492 เปอร์เซ็นต์) และมีระยะเวลาฟักสั้นที่สุด (45.667±0.577 ชั่วโมง) ทั้งยังมีขนาดของคัพภะระยะ blastula, gastrula และ auricularia ใหญ่ที่สุด ดังนั้นการช๊อคด้วยอุณหภูมิต่ำจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ

คำสำคัญ: ปลิงดำ การกระตุ้น เซลล์สืบพันธุ์ สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ

Research Title: Induction of Gamete Release in Lollyfish, *Holothuria atra* Jaeger, 1833 (Echinodermata: Holothuroidea) by Change of Some Environmental Factors
Researcher: Kaewalee Viboonkit
Faculty: Prince of Chumphon Campus, Chumphon Province
Department: Agricultural Technology

ABSTRACT

The Lollyfish (*Holothuria atra* Jaeger, 1833) were collected from the wild, induced to gamete release by technique of temperature change and photoperiods. The results showed that the technique of photoperiods be ineffective stimulated to release gamete of broodstock lollyfish during time of study. Four methods of temperature modification techniques can stimulate the release of lollyfish gamete. While the control (none stimulate) ineffective stimulate gamete release during the time of study. The low temperatures shock can stimulate release the eggs and sperm numbers the most. Eggs obtained from low temperature shocks have the highest hatching rate (50.794 ± 15.492 percent) and shortest hatching period (45.667±0.577 hours). It also the size of the embryos stages blastula, gastrula and auricularia largest. Therefore the low temperature shock is the most appropriate method to stimulate the release of lollyfish gametes.

Keywords: Lollyfish, Induction, Gamete, Environment, Temperature

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณชาวประมงในพื้นที่อำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร ทุกท่าน ที่ให้ความกรุณาอนุเคราะห์ อำนวยความสะดวก และสนับสนุน การเก็บรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลิงดำ ขอกราบขอบพระคุณ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร หน่วยงานต้นสังกัด ที่สนับสนุนทุนวิจัย เอื้อเฟื้อและอำนวยความสะดวก เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับการดำเนินการวิจัย สุดท้ายนี้ขอขอบคุณนักศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์การประมงและหลักสูตรเทคโนโลยีการประมงทุกท่าน ที่เป็นส่วนสำคัญในอำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัย

“การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง จากแหล่งทุนเงินรายได้ วิทยาเขตชุมพรเขตรอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2554”

นางสาวแขวลี วิบูลย์กิจ

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญภาพ	VI
บทที่ 1 บทนำ	
- ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
- วัตถุประสงค์	2
- ขอบเขตของการวิจัย	2
- คำสำคัญของการวิจัย	3
- ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	
- ปลิงทะเล	4
- ปลิงดำ	7
- ระบบสืบพันธุ์และการเจริญพันธุ์ของปลิงทะเล	9
- ความสำคัญของปลิงทะเล	13
- สภาวะการทำการประมงปลิงทะเล	16
- การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	
- อุปกรณ์	19
- วิธีการ	20
บทที่ 4 ผลการวิจัย	
- ผล	25
- วิจารณ์ผล	36
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	
- สรุป	38
- ข้อเสนอแนะ	39
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	40
ประวัตินักวิจัย	47

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปลิงทะเลที่มีการจับเพื่อบริโภคและเพื่อจำหน่ายของประเทศไทย	5
2	การส่งออกปลิงทะเลไปยังประเทศต่าง ๆ 12 ประเทศ	15
3	จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ	28
4	ระยะเวลาการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ	29
5	อัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักของไข่ปลิงดำ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ	30
6	ขนาดของคัพภะปลิงดำที่ระยะต่าง ๆ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ	31
7	ระยะเวลาการพัฒนาของคัพภะปลิงดำระยะต่าง ๆ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ	32
8	การพัฒนาของคัพภะปลิงดำระยะต่าง ๆ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ	33

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะภายนอกของปลิงทะเล	4
2	วงจรชีวิตการเพาะเลี้ยงปลิงขาว	7
3	ลักษณะของปลิงดำ	8
4	การแพร่กระจายของปลิงดำ	8
5	ระยะ Blastula	12
6	ระยะ Gastrula	12
7	ลักษณะอัณฑะของปลิงดำ	25
8	ลักษณะรังไข่ของปลิงดำ	25
9	ลักษณะการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ	26
10	ลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์: ไข่ (A-C) และอสุจิ (D)	26
11	ลักษณะภายในถังทดลองเมื่อพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ปล่อยไข่และอสุจิ	27
12	การพัฒนาการของตัวอ่อนปลิงดำระยะต่าง ๆ	34

บทที่ 1
บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปลิงดำเป็นสัตว์ทะเลหน้าดินที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงจึงได้รับความนิยมจากผู้บริโภค มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาในหลายได้จึงมีการนำมาสกัดสารเพื่อใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกี่ยวข้องกับกล้ามเนื้อ และการเสื่อมสมรรถภาพทางเพศ นอกจากนี้ยังมีความสำคัญต่อระบบนิเวศทางทะเลบริเวณชายฝั่ง ปัจจุบันปลิงดำมีมูลค่าทางเศรษฐกิจสูงขึ้น มีการจับเพื่อการจำหน่ายในประเทศและส่งออกต่างประเทศ และเนื่องจากสัตว์ชนิดนี้ไม่มีอวัยวะสำหรับการป้องกันตัว ประกอบกับแหล่งอาศัยอยู่บริเวณน้ำตื้นตามแนวชายฝั่ง จึงสามารถจับได้ง่ายจนอยู่ในสภาพเกินศักยภาพการผลิตหรือการเกิดทดแทน (overfishing) ส่งผลให้ทรัพยากรปลิงดำอยู่ในสภาพเสื่อมโทรม (มีจำนวนลดลงอย่างรวดเร็ว) ซึ่งปัญหานี้มิได้เกิดเฉพาะในประเทศไทยเท่านั้นแต่เกิดในหลายประเทศที่มีการทำการประมงปลิงทะเลทั่วโลก และจากการสอบถามข้อมูลจากชาวประมงที่ทำประมงบริเวณชายฝั่งอำเภอปะทิว จังหวัดชุมพร พบว่าตามแนวชายฝั่งของอำเภอปะทิวเคยเป็นแหล่งอาศัยที่สำคัญของปลิงดำ แต่ในปัจจุบันมีปริมาณลดลงอย่างมาก โอกาสที่จะพบปลิงดำบริเวณชายฝั่งในช่วงน้ำลงเป็นไปได้ยากและอาจไม่มีเลยในอนาคต

การแก้ปัญหาความเสื่อมโทรมของทรัพยากรปลิงทะเลอาจกระทำได้สองวิธีหลักคือ ลดปริมาณการจับรวมถึงกำหนดขนาดที่สามารถจับได้ เพื่อให้ปลิงดำสามารถเกิดทดแทนได้ทันและสามารถเจริญเติบโตจนมีขนาดที่สามารถสืบพันธุ์เพิ่มจำนวนได้ตามธรรมชาติ ส่วนวิธีการที่สองคือการเพาะเลี้ยงทั้งนี้ส่วนหนึ่งเพื่อการปล่อยทดแทนในธรรมชาติ และอีกส่วนเพื่อจำหน่ายในเชิงการค้าเพื่อลดปริมาณการจับจากธรรมชาติ ซึ่งพบว่าในแง่ของการเพาะเลี้ยงนั้นสำหรับประเทศไทยยังอยู่ในระยะเริ่มต้นเท่านั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาทดลองเพื่อรวบรวมข้อมูลและปัจจัยต่าง ๆ ที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง หน่วยงานที่เริ่มมีการทดลองเพาะพันธุ์ปลิงทะเลมีเพียงแห่งเดียวคือศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ กรมประมง ซึ่งเป็นการเพาะพันธุ์ปลิงขาวและยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควรทั้งในแง่ของการผสมพันธุ์ การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ และอัตรารอด

กลวิธีการสืบพันธุ์ (reproductive strategies) ซึ่งรวมถึงการปล่อยไข่และน้ำเชื้อ เป็นข้อมูลที่มีสำคัญอย่างยิ่งในการเพาะพันธุ์สัตว์น้ำ ประกอบกับการนำสัตว์น้ำขึ้นมาเพาะพันธุ์ในโรงเพาะฟักนั้นจะทำให้สัตว์เกิดความเครียดและจะไม่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ถึงแม้ระบบสืบพันธุ์จะสมบูรณ์ก็ตามซึ่งจะต้องใช้ระยะเวลานานในการเพาะพันธุ์แต่ละครั้ง ทำให้สิ้นเปลืองระยะเวลาและค่าใช้จ่าย ดังนั้นจึงจำเป็นกระตุ้นให้สัตว์สามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้เร็วขึ้น โดยในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลัง มักอาศัยการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะอย่างยิ่งการปรับอุณหภูมิน้ำ (Loosanoff and Davis, 1963) และในต่างประเทศมีรายงานการใช้วิธีนี้ในปลิงทะเล (Morgan, 2000) นอกจากการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำแล้วระยะเวลาการได้รับแสง (photoperiod) ก็เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเล (Battaglene *et al*., 2002) ทั้งนี้เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่

เปลี่ยนไปจะทำให้สัตว์กลัวว่าจะสูญพันธุ์ จึงมีการสืบพันธุ์เพื่อดำรงเผ่าพันธุ์ อย่างไรการพัฒนาเทคนิคและวิธีการในการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในปลิงทะเลมีน้อย และมักใช้กับปลิงทะเลเพียงไม่กี่ชนิด (James *et al*., 1994) สำหรับปลิงทะเลนั้นเป็นพวกที่ไม่มีการจับคู่ผสมพันธุ์ แต่จะอาศัยการปล่อยไข่และน้ำเชื้อออกมาผสมกันในน้ำ การปฏิสนธิจึงเป็นแบบสุ่มดังนั้นจึงต้องปล่อยไข่และน้ำเชื้อออกมาในปริมาณมาก และเนื่องจากการกระตุ้นเป็นการเร่งให้มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ จึงอาจส่งผลต่อความสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อน จึงต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบเพื่อให้ได้วิธีการที่เหมาะสม

2. วัตถุประสงค์

2.1. ศึกษารูปแบบการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิและระยะเวลาการได้รับแสงที่เหมาะสมในการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ
2.2. ศึกษาพฤติกรรมการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ
2.3. ศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อนปลิงดำระยะแรก (early development) ตั้งแต่ได้รับการปฏิสนธิ จนกระทั่งฟักออกจากไข่

3. ขอบเขตของการวิจัย

เป็นการทดลองเพื่อศึกษาวิธีการที่เหมาะสมในการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ โดยวิธีการที่เหมาะสมดังกล่าว จะต้องเป็นวิธีที่สามารถกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปลิงดำปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (ไข่และน้ำเชื้อ) ในระยะเวลาที่รวดเร็ว ในปริมาณมาก เซลล์สืบพันธุ์อยู่ในสภาพที่สมบูรณ์ มีอัตราการปฏิสนธิสูง (fertilization rate) ตัวอ่อนระยะแรกมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์ และมีอัตราการฟัก (hatching rate) สูง รวมถึงตัวอ่อนที่ฟักออกจากไข่มีสภาพสมบูรณ์ แบ่งการทดลองออกเป็น 2 ช่วง คือ

ช่วงที่ 1 ทำการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (ไข่และน้ำเชื้อ) ของพ่อแม่พันธุ์ปลิงดำที่อยู่ในระยะสมบูรณ์เพศ โดยอาศัยหลักการปรับเปลี่ยนสภาพแวดล้อมบางประการ ได้แก่ รูปแบบการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ (Thermal stimulation) และช่วงระยะเวลาที่ได้รับแสง (Photoperiod stimulation) ตรวจสอบระยะเวลาที่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ จำนวน ขนาด และความสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์ พร้อมสังเกตพฤติกรรมในระหว่างการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เมื่อกระตุ้นในรูปแบบต่าง ๆ

ช่วงที่ 2 ศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อนระยะแรกตั้งแต่ไข่ได้รับการปฏิสนธิจนกระทั่งฟักออกเป็นตัว ซึ่งกระทำต่อเนื่องจากช่วงที่ 1 โดยการนำไข่และน้ำเชื้อที่ได้จากการกระตุ้นในรูปแบบต่าง ๆ มาใส่ในถังฟักเพื่อให้เกิดปฏิสนธิและฟักออกเป็นตัว ตรวจสอบการพัฒนาของตัวอ่อนในแต่ละระยะตั้งแต่เริ่มมีการแบ่งเซลล์จนกระทั่งฟัก หาอัตราอัตราการฟัก และตรวจสอบความสมบูรณ์ของตัวอ่อนปลิงดำที่ได้จากการกระตุ้นด้วยวิธีการต่างๆ

4. คำสำคัญของการวิจัย

4.1. ปลิงทะเล (sea cucumber; *Holothuria atra* Jaeger, 1833)
4.2. ปลิงดำ (lollyfish)
4.3. การกระตุ้น (induction)
4.4. เซลล์สืบพันธุ์ (gamete)
4.5. สภาพแวดล้อม (environment)
4.6. อุณหภูมิ (temperature)
4.7. ช่วงเวลาการได้รับแสง (photoperiod)

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

5.1. ทราบรูปแบบการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิและระยะเวลาการได้รับแสงที่เหมาะสมในการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ

5.2. ทราบถึงพฤติกรรมของปลิงดำในระหว่างการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งเป็นผลสืบเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและช่วงระยะเวลาการได้รับแสง

5.3. ทราบรูปแบบพัฒนาการของตัวอ่อนปลิงดำระยะแรก (early development) ตั้งแต่ได้รับการปฏิสนธิ จนกระทั่งฟักออกจากไข่

5.4. ได้องค์ความรู้ที่จะนำไปต่อยอดงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการเพาะขยายพันธุ์ปลิงทะเลทั้งเพื่อปล่อยทดแทนในธรรมชาติและเชิงพาณิชย์ต่อไป

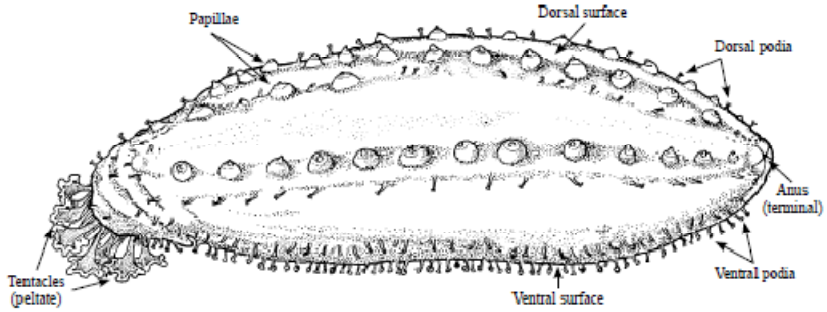
5.5. ข้อมูลจากงานวิจัยนำไปตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสารหรือการประชุมสัมมนาต่าง ๆ ซึ่งถือเป็นการเผยแพร่ชื่อเสียงของสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพร นอกจากนี้ยังนำไปปรับใช้ประกอบการเรียนการสอนในหลักสูตรเทคโนโลยีการประมง

บทที่ 2
ตรวจเอกสาร

1. ปลิงทะเล

1.1. ลักษณะทั่วไป (ภาพที่ 1)

ปลิงทะเล (sea cucumber) เป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในไฟลัม Echinodermata ชั้น Holothuroidea (มาจาก holothourion = ปลิงทะเล, eidos = รูปร่าง, ea = ลักษณะ) หมายถึง สัตว์ที่มีหนามหรือแผ่นหินปูนตามลำตัว เป็นสัตว์ที่มีช่องว่างในลำตัวที่แท้จริง ส่วนใหญ่มีรูปร่างเป็นรูปทรงกระบอก คล้ายหนอน ลำตัวอ่อนนุ่ม (Mackey, 2001) แบ่งออกเป็น 2 ด้าน ในแนวนอน คือ ด้านปากหรือส่วนหัว และด้านท้ายหรือทวารหนัก ด้านปากจะมีช่อหนวดอยู่รอบปาก ทำหน้าที่ในการจับอาหารส่งเข้าปาก หนวดของปลิงทะเลมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปตามลักษณะการกินอาหาร เช่น หนวดแบบจาน (peltate) จะพบในปลิงทะเลที่หาอาหารอยู่ตามพื้นท้องทะเล หนวดที่มีลักษณะแตกแขนงแบบกิ่งไม้ (dendritic) จะพบในปลิงทะเลที่ดักจับตะกอนและแพลงก์ตอนที่ล่องลอยอยู่ในมวลน้ำ ส่วนหนวดที่มีลักษณะแบบขนนก (pinnate) จะพบในปลิงทะเลที่คอยกินตะกอนที่ตกลงมาตามพื้นหรือบนตัวสัตว์ชนิดอื่น ด้านท้ายหรือทวารหนักประกอบด้วยช่องเปิดเพื่อการขับถ่ายและติดต่อกับอวัยวะสำหรับแลกเปลี่ยนก๊าซ (respiratory tree) และลำไส้ (จิตติมา, 2544) ปลิงทะเลมีขนาดที่แตกต่างกัน บางชนิดมีขนาดใหญ่ยาวถึง 1 เมตร บางชนิดมีขนาดเล็กเพียง 2–3 เซนติเมตร (อารมณ์, 2545) ปลิงทะเลมีวงจรชีวิตประมาณ 2–5 ปี (จรัสศรี และคณะ, 2551)



ภาพที่ 1 ลักษณะภายนอกของปลิงทะเล
ที่มา: Purcell *et al*. (2012)

1.2. การจัดลำดับทางอนุกรมวิธานและความหลาย

Conand (1998) จัดปลิงทะเลไว้ในอาณาจักรสัตว์ (Animalia kingdom) ไฟลัม (phylum) Echinodermata ชั้น (class) Holothuroidea ปัจจุบันมีรายงานจำนวนปลิงทะเลทั่วโลกประมาณ

25 วงศ์ (families) 200 สกุล (genera) จำนวน 1,400 ชนิด (species) (Rowe and Gates, 1995) ในจำนวนนี้มี 2 วงศ์ ที่มีจำนวนวงศ์ละ 1 ชนิด มี 5 วงศ์ ที่มีจำนวนมากกว่า 50 ชนิด แต่ไม่ถึง 100 ชนิด และอีก 5 วงศ์ จำนวนมากกว่า 100 ชนิด เฉลี่ยแล้วแต่ละวงศ์มีจำนวนประมาณ 46 ชนิด (Fell, 1982) และจากการศึกษาความหลากหลายของปลิงทะเลในภูมิภาคแปซิฟิกตะวันตก พบปลิงทะเลจำนวน 9 วงศ์ 286 ชนิด และในเขตภูมิภาคย่อย คือ อินเดียตะวันออกซึ่งประกอบด้วย ไทย สิงคโปร์ มาเลเซีย และอินโดนีเซีย พบปลิงทะเลจำนวนทั้งสิ้น 141 ชนิด และพบว่าเป็นปลิงทะเลที่พบเฉพาะถิ่น (endemic species) ในภูมิภาคย่อยนี้จำนวนถึง 28 ชนิด (อารมณ์, 2545; Clark and Rowe, 1971) นอกจากนี้ยังมีรายงานปลิงทะเลชนิดใหม่ในมหาสมุทรอินเดียคือ *Phyllophorus (Phyllophorella) parvides* ซึ่งพบแพร่กระจายบริเวณชายฝั่งด้านตะวันตกของออสเตรเลียและสิงคโปร์ (James, 1965) Munprasit (2008) รายงานว่าในประเทศไทยมีปลิงทะเล 102 ชนิด ในจำนวนนี้มี 12 ชนิดที่นำมาบริโภคเป็นอาหารและมีคุณค่าทางเศรษฐกิจ

ตารางที่ 1 ปลิงทะเลที่มีการจับเพื่อบริโภคและเพื่อจำหน่ายของประเทศไทย

ชื่อวิทยาศาสตร์	ชื่อสามัญ (อังกฤษ)	ชื่อสามัญ (ไทย)	ชื่อวงศ์
Holothuria scaba	Sand fish	ปลิงขาว	Holohturiidae
Holothuria atra	Lolly fish	ปลิงดำ	Holohturiidae
Holohturia argus	-	-	Holohturiidae
Holohturia spinifera	-	-	Holohturiidae
Holohturia leucospilota	-	ปลิงดำ	Holohturiidae
Holohturia nobile	-	-	Holohturiidae
Holohturia edulis	Pink fish	-	Holohturiidae
Actinopyga echinites	Deep-water-red fish	-	Holohturiidae
Bohadschia marmorata	Chalky fish	ปลิงสีน้ำตาล	Holohturiidae
Stichopus chloronotus	Teat fish	-	Stichopodidae
Stichopus variegates	-	-	Stichopodidae
Thelenota ananas	-	-	Stichopodidae

ที่มา: Munprasit (2008)

1.3. ชีววิทยาบางประการ

1.3.1 อาหารและการกินอาหาร: ปลิงทะเลมีรูปแบบการกินอาหาร 2 แบบ คือ กินอาหารที่แขวนลอยอยู่ในมวลน้ำและกินอาหารที่ตกอยู่กับพื้นหรือปนอยู่กับตะกอน

- กินอาหารที่แขวนลอยอยู่ในมวลน้ำ อาหารที่กินได้แก่ แพลงก์ตอนและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก เช่น โปรโตซัว สาหร่ายทะเล และไดอะตอม ปลิงทะเลพวกนี้จะใช่หนวดแบบพุ่ม

จับอาหารโดยอาศัยเมือกเหนียว ซึ่งอาบอยู่ตามผิวหนวดคอยดักจับอาหารที่ปะปนมากับน้ำ ตัวอย่างปลิงในกลุ่มนี้ ได้แก่สกุล *Cucumaria*, *Thyone*, *Holothuria* (มัทนา, 2516)

- กินอาหารที่ตกอยู่กับพื้นหรือปนอยู่กับตะกอน อาหารที่กินเป็นพวกอินทรีย์สารที่ตกอยู่ใต้ท้องน้ำมักจะปนไปกับโคลนและทรายที่ปลิงทะเลฝังตัวอยู่ ตัวอย่างได้แก่ปลิงทะเลในสกุล *Stichopus*

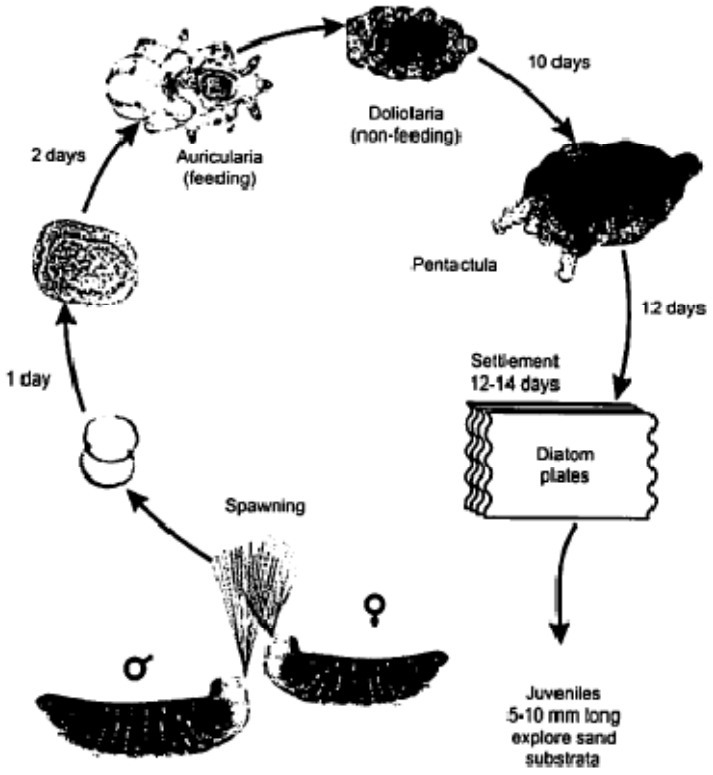
จากการศึกษาของ Wiadnyana (2008) พบว่ากลุ่มแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหารหลักที่ปลิงทะเลชอบกิน คิดเป็นสัดส่วนมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เป็นแพลงก์ตอนพืชในกลุ่มของไดอะตอม ได้แก่ *Chaetoceros* sp., *Plagothix* sp., *Amphora* sp. และ *Thallasiotrix* sp. โดยใช้หนวดที่มีสารเมือกฉาบอยู่ที่บริเวณผิวหนวด คอยดักอาหารที่มากับน้ำ และที่ตกอยู่ใต้พื้นท้องน้ำที่ปะปนอยู่กับโคลนหรือทรายที่มันฝังตัวอยู่ (ชรินทร์, 2535) ปลิงดำเป็นพวกกินอาหารที่ตกตะกอนบริเวณพื้นทะเล (deposit feeder) โดยการกินทรายที่มีสารอินทรีย์เข้าไปและขับทรายออกมาทางทวารหนัก ท่อทางเดินอาหารของปลิงทะเล มีลักษณะเป็นสายยาวขดเป็นรูปตัว S ซึ่งแบ่งเป็นส่วนต่างๆ ตามลำดับ คือ ปาก คอหอย (pharynx) หลอดหลอดกระเพาะ (stomach) ลำไส้ (intestine) และโคลเอก้า (cloaca) กากอาหารออกทางช่องโคลเอกา มีน้ำย่อยสำหรับย่อยโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต (มัทนา, 2516)

1.3.2 การหายใจและแลกเปลี่ยนก๊าซ: การหมุนเวียนของเหลวเกิดขึ้นภายในลำตัวขนาดใหญ่ เยื่อบุช่องผนังลำตัวมีขน (ciliated epithelium) ซึ่งมีประโยชน์ช่วยในการโบกพัดให้เกิดกระแสการไหลเวียนอยู่ภายในตัว ภายในช่องตัวมี coelomocyte ทำหน้าที่ลำเลียงก๊าซ เรียกว่า ฮีโมไซท์ (hemocyte) ลักษณะเป็นแผ่นแบนบาง ถ้าอยู่รวมกันเป็นจำนวนมากจะทำให้ของเหลวเป็นสีแดง อวัยวะที่ใช่แลกเปลี่ยนก๊าซมีลักษณะท่อแตกแขนงจากโคลเอกา (cloaca) คล้ายต้นพืชอยู่สองข้างของท่อทางเดินอาหาร เรียกว่า respiratory tree ในกลุ่ม Apodida จะไม่มีอวัยวะนี้แต่จะอาศัยการแลกเปลี่ยนก๊าซผ่านทางผิวหนังโดยตรง (มัทนา, 2516)

1.3.3 การสืบพันธุ์

ปลิงทะเลมีอวัยวะสืบพันธุ์เพียง 1 เดียว (single gonad) บางชนิดมีเพศแยก (dioecious) บางชนิดมีเพศรวม (hermaphrodite) พวกที่มีเพศแยกจะมีอวัยวะสืบพันธุ์อยู่ค่อนไปทางหัว ประกอบด้วยท่อ (tubules) แตกแขนงจำนวนมากหรืออาจเป็นท่อเดียวรวมกันเป็นช่อ ต่อจากอวัยวะสืบพันธุ์จะเป็นท่อนำไข่หรือท่อนำสเปิร์ม (gonoduct) ซึ่งอยู่ติดกับเนื้อเยื่อโยงยึดอวัยวะภายในด้านบน (dorsal mesentery) บริเวณนี้จะเป็นรูเปิดของท่อนำไข่ เรียกว่า gonopore พวกที่มีเพศรวมจะมีอวัยวะสืบพันธุ์ที่มีการสร้างทั้งไข่และสเปิร์มออกมาผสมภายในตัว โดยการสร้างไข่จะเกิดขึ้นก่อนส่วนสเปิร์มจะถูกสร้างขึ้นมาภายหลัง ไข่ที่ได้รับการผสมจะถูกส่งไปฟักบริเวณถุงฟักตัวอ่อน (brooding pockets) เมื่อเจริญเต็มที่ถุงนี้จะแตกและตัวอ่อนจะออกมาทางช่องขับถ่าย ในปลิงทะเลที่ไม่มีถุงฟักตัวอ่อนจะมีการปฏิสนธิภายนอกตัว ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิแล้วจะดำรงชีวิตเป็น

แพลงก์ตอนอาศัยอยู่ในน้ำ จากนั้นจะพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนระยะต่าง ๆ และเจริญเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (มัทนา, 2516)



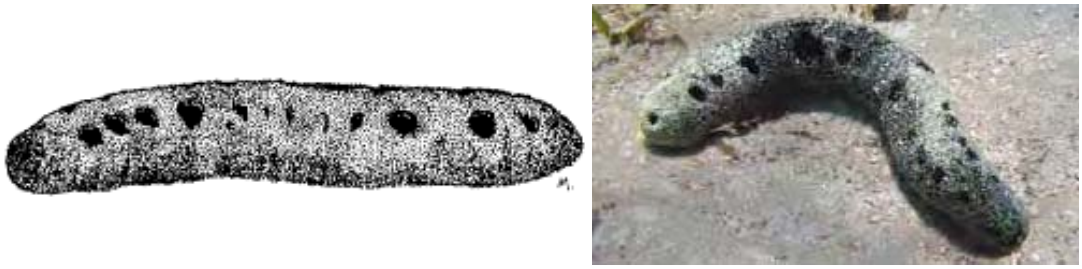
ภาพที่ 2 วงจรชีวิตการเพาะเลี้ยงปลิงขาว
ที่มา: Battaglene (1999)

2. ปลิงดำ

2.1 ลักษณะทั่วไปของปลิงดำ (ภาพที่ 3)

Munprasit (2008) รายงานว่าปลิงดำ (*Holothuria atra* : lollyfish) เป็นสมาชิกที่อยู่ในชั้น Holothuroidae มีลักษณะคล้ายหนอน (worm-like) มีร่างกายอ่อนนุ่ม (Mackey, 2001) เป็นปลิงทะเลที่มีสีดำ ลำตัวยาว รูปทรงกระบอก หัวและท้ายมน ผิวลำตัวเรียบมักปกคลุมด้วยทรายมีอนุภาคขนาดกลาง แต่จะมีปื้นกลมๆ ที่ไม่มีทรายปกคลุม ซึ่งเรียงเป็นแถวบริเวณด้านหลังตลอดความยาวลำตัว ปากอยู่ทางด้านล่างล้อมรอบด้วยหนวด (tentacle) ที่มีสีดำ จำนวน 20 เส้น ไม่มีท่อ cuvierian (Purcell *et al*., 2012) ปลิงดำมีผนังลำตัวหนาประมาณ 4 มิลลิเมตร ความยาวมากที่สุดถึง 450 มิลลิเมตร แต่ที่พบโดยทั่วไปมีความยาวเพียงประมาณ 200 มิลลิเมตร น้ำหนักประมาณ 200 กรัม (อาจหนักถึง 1 กิโลกรัม) (Conand, 1998) Purcell *et al*. (2012) ได้รายงานขนาดน้ำหนักและความยาวเฉลี่ยของปลิงดำที่แตกต่างกันในแต่ละแหล่ง ได้แก่ ปาปัวนิวกีนีและอินเดีย (200 กรัม

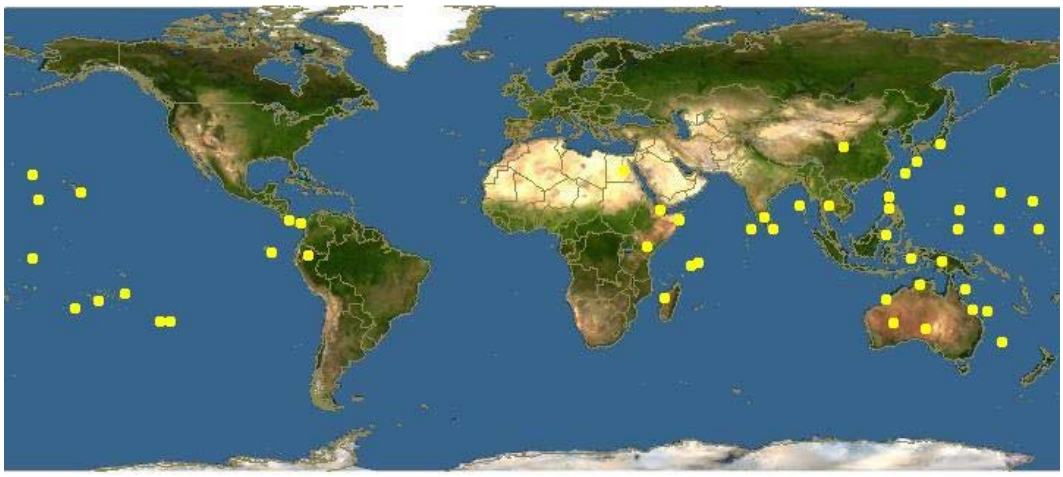
20 เซนติเมตร) อียิปต์ (300 กรัม 30 เซนติเมตร) เวียดนาม (335 กรัม 23 เซนติเมตร) และเกาะ Mauritius (400 กรัม 15 เซนติเมตร)



ภาพที่ 3 ลักษณะของปลิงดำ
ที่มา: Purcell *et al*. (2012)

2.3. การแพร่กระจายของปลิงดำ

ปลิงดำพบอาศัยทั้งบริเวณด้านนอกและด้านไนของหาดโคลน ด้านหลังของแนวปะการัง บริเวณที่ตื้นของทะเลสาบ ที่มีลักษณะของพื้นท้องทะเลเป็นทรายปนโคลนและมีเศษหิน แหล่งหญ้าทะเล ตั้งแต่ระดับความลึก 0-20 เมตร พบแพร่กระจายทั่วไปในเขต Indo-Pacific บริเวณเกาะมัสคารีน ด้านตะวันออกของแอฟริกา เกาะมาดากาสกา ทะเลแดง ด้านตะวันออกเฉียงใต้ของอาหรับ อ่าวเปอร์เซีย มัลดีฟส์ ศรีลังกา อ่าวเบงกอล อินเดีย ตอนเหนือของออสเตรเรีย ฟิลิปปินส์ จีน และตอนใต้ของญี่ปุ่น เกาะทะเลใต้ เกาะฮาวาย (Munprasit, 2008; Purcell *et al*., 2012) ในประเทศไทยพบแพร่กระจายทั้งฝั่งอ่าวไทยและฝั่งอันดามัน Putchagarn and Sounchaeng (2004) รายงานว่าฝั่งอ่าวไทยพบที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ ชุมพร และสุราษฎร์ธานี เป็นต้น ทางฝั่งอันดามันพบที่จังหวัดตรัง จังหวัดพังงาพบที่ อ่าวเคย อุทยานแห่งชาติเขาหลัก-ลำรู่ แหลมพันวา จังหวัดภูเก็ต เป็นต้น



ภาพที่ 4 การแพร่กระจายของปลิงดำ
ที่มา: http://www.eol.org/pages/587662?vetted=true

3. ระบบสืบพันธุ์และการเจริญพันธุ์ของปลิงทะเล

3.1. ระบบสืบพันธุ์

ปลิงทะเลส่วนใหญ่เป็นพวกแยกเพศแต่พบว่ามีบางชนิดที่เป็นกะเทย (hermaphrodites) การสืบพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction) แต่ส่วนใหญ่มักสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (Smiley *et a*l.,1991)

3.1.1 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

เป็นการสืบพันธุ์ที่พบในปลิงทะเลส่วนใหญ่ ประกอบด้วย 2 ระยะหลัก คือ กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) เป็นการสร้างน้ำเชื้อของเพศผู้ (spermatogenesis) การสร้างไข่ (oogenesis) ของเพศเมีย และการวางไข่ (spawming) ซึ่งเป็นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ลงในน้ำ ปลิงทะเลบางชนิดจะปล่อยไข่และอสุจิออกภายนอกแต่บางชนิดจะมีการฟักไข่ที่บริเวณช่องว่างภายในลำตัว (coelom) รอบอวัยวะภายใน ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะมีพ่อแม่คอยดูแลจนกว่าจะฟักออกจากไข่ (Mackey, 2001)

3.1.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นอีกวิธีหนึ่ง ที่ปลิงทะเลใช้ในการแพร่พันธุ์โดยการแบ่งตัวออกตามขวาง (transverse fission) ออกเป็นสองส่วนอย่างช้า ๆ บริเวณที่จะเกิดการแบ่งตัวคือบริเวณกึ่งกลางของลำตัว โดยการบิดตัวและแยกออกจากกันเป็นสองส่วน จากนั้นก็จะมีการพัฒนาในส่วนต่าง ๆ ที่ยังไม่สมบูรณ์ให้สมบูรณ์เต็มที่เหมือนตัวเดิมทุกประการ (Mackey, 2001)

3.2. ลักษณะและพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์

3.2.1 ลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์

ปลิงดำมีลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) เหมือนกับปลิงทะเลทั่วไป คือ มีอัณฑะ 1 อัน และรังไข่ 1 อัน ลักษณะเป็นพูเรียวยาวแตกแขนกออกเป็นหลายพู และมีช่องเปิดของเซลล์สืบพันธุ์อยู่ระหว่างหนวดด้านหลังของลำตัว

3.2.2 พัฒนาการของอัณฑะในปลิงดำเพศผู้

Abdel-Razek *et al.* (2005) แบ่งระยะการพัฒนาของอัณฑะในปลิงดำเพศผู้ไว้ 4 ระยะ คือ ระยะเริ่มสร้างน้ำเชื้อ ระยะน้ำเชื้อสมบูรณ์ ระยะน้ำเชื้อสมบูรณ์เต็มที่ และระยะปล่อยน้ำเชื้อโดยแต่ละระยะมีลักษณะดังนี้

ระยะที่ 1 ระยะเริ่มสร้างน้ำเชื้อ (immature stage) อัณฑะมีลักษณะสั้นและบาง ท่อเล็กๆ ที่เป็นแขนงต่างๆ ของเส้นใยจะมีสีเหลืองและขาว ความยาวของท่อประมาณ 6.5-

17.0 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4-0.6 มิลลิเมตร มีค่า G.S.I. เท่ากับ 1.2-2.7 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับน้ำหนักของลำไส้ของปลิงด้วย

ระยะที่ 2 ระยะน้ำเชื้อสมบูรณ์ (maturing stage) อัณฑะมีลักษณะยาวและบาง ท่อเล็ก ๆ ที่เป็นแขนงต่าง ๆ ของเส้นใยจะมีสีครีมและขาว ความยาวของท่อจะยาวประมาณ 14.0-47.0 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4-1.2 มิลลิเมตร มีค่า G.S.I. เท่ากับ 1.0-29.4

ระยะที่ 3 ระยะน้ำเชื้อสมบูรณ์เต็มที่ (rip stage) อัณฑะมีการแตกแขนงเป็นจำนวนมาก ลักษณะยาวและมีสีขาว เส้นใยที่อยู่ในท่อขยายใหญ่ ในระยะนี้จะมีน้ำเชื้อตัวผู้อยู่ในท่อนี้ ความยาวของท่อประมาณ 33-60 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-5 มิลลิเมตร ค่า G.S.I. เท่ากับ 27.2

ระยะที่ 4 ระยะปล่อยน้ำเชื้อ (spent stage) เป็นระยะที่ปลิงปล่อยน้ำเชื้อเพศผู้ออกจากตัวแต่ก็ยังคงเหลือตกค้างบ้างบางส่วน ในระยะนี้ท่อเล็ก ๆ ที่เป็นแขนงต่าง ๆ ของเส้นใยจะมีสีขาว ใส โปร่งแสง ท่อเล็ก ๆ นี้จะเรียงตัวตามแนวยาว มีความยาวประมาณ 5-36 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2.0-0.9 มิลลิเมตร มีค่า G.S.I เท่ากับ 0.3-6.2

3.2.3 พัฒนาการของรังไข่ในปลิงดำเพศเมีย

Abdel-Razek *et al.* (2005) แบ่งระยะการพัฒนาของรังไข่ในปลิงดำเพศเมียไว้ 4ระยะ คือ ระยะเริ่มพัฒนา ระยะไข่สมบูรณ์ ระยะไข่สุก และระยะวางไข่ โดยแต่ละระยะมีลักษณะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ระยะเริ่มพัฒนา (immature stage) รังไข่มีลักษณะสั้น บาง ท่อเล็ก ๆที่เป็นแขนงต่าง ๆ ของเส้นใยจะมีสีเหลืองและขาว ความยาวของท่อจะยาวประมาณ 4.0-12.0 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.2-1.0 มิลลิเมตร ค่า G.S.I. เท่ากับ 2.2-7.7 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับน้ำหนักของลำไส้

ระยะที่ 2 ระยะไข่สมบูรณ์ (maturing stage) จะสังเกตเห็นแขนงที่อยู่ในท่อเล็ก ๆ มีสีเหลือง ความยาวของท่อประมาณ 21.0-51.0 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.7-2.0 มิลลิเมตร ค่า G.S.I. เท่ากับ 4.1-14.3 ไม่โปร่งแสง ไข่ที่สมบูรณ์จะมีลักษณะเป็นทรงกลม

ระยะที่ 3 ระยะไข่สุก (rip stage) รังไข่จะมีลักษณะยาว แขนงต่าง ๆ หนาและมีสีแดง ความยาวของท่อประมาณ 24-130 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.0-2.5 มิลลิเมตร ค่า G.S.I. เท่ากับ 9.8-13.7 ในระยะนี้จะสามารถมองเห็นนิวเคลียสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 75-175 ไมครอน ได้อย่างชัดเจน

ระยะที่ 4 ระยะวางไข่ (spent stage) แขนงและท่อต่าง ๆ เหี่ยว ไม่เต่งและมีสีเหลือง บางครั้งอาจพบเซลล์ไข่ที่ยังเหลือตกค้างอยู่บ้าง ความยาวของท่อประมาณ 20-24 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.4-1.0 มิลลิเมตร ค่า G.S.I. เท่ากับ 1.7-8.4

3.3. พัฒนาการของตัวอ่อนปลิงทะเล

รายงานว่าพัฒนาการของตัวอ่อนปลิงดำมีลักษณะคล้ายกับในปลิงทะเลชนิดอื่น จึงขอนำเสนอในภาพรวมของปลิงทะเลดังนี้

3.3.1.พัฒนาการของตัวอ่อนระยะแรก (Embryonic development, Early development)

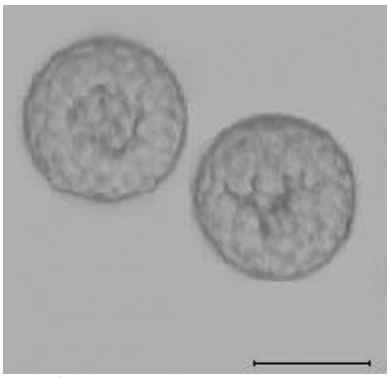
จากการศึกษาในปลิงทะเลชนิด *Stichopus japonicus* พบว่าปลิงชนิดนี้จะวางไข่ในน้ำที่มีอุณหภูมิในช่วง 15–23 องศาเซลเซียส แต่ที่เหมาะสมมากที่สุดคือ 18–20 องศาเซลเซียส ช่วงเวลาที่เพศเมียปล่อยไข่คือช่วงระหว่างเที่ยงคืนถึงเที่ยงวันของวันถัดไป การวางไข่แต่ละครั้งจะใช้เวลาประมาณ 5-15 นาที หรือนานกว่านั้น แม่ปลิงแต่ละตัวจะมีความดกไข่ (fecundity) ประมาณ 300,000–500,000 ฟอง (Yellow Sea Fisheries Research Institute in Qingdao, 1991) ภายหลังจากมีการปฏิสนธิเกิดขึ้น ไข่จะเริ่มมีการพัฒนาในส่วนต่าง ๆ อย่างช้า ๆ ที่อุณหภูมิของน้ำประมาณ 21-24 องศาเซลเซียส ไข่ที่ได้รับการผสมจะใช้เวลาประมาณ 45 นาที เพื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะ Blastula เป็นระยะที่เริ่มมีเส้นขน สามารถหมุนได้รอบ และเคลื่อนไหวได้ หลังจากระยะนี้ไปประมาณ 2-3 ชั่วโมง ตัวอ่อนที่อยู่ในไข่ก็จะเริ่มมีการฟักตัวออกมา สามารถยืดออกและเคลื่อนไหวได้ที่บริเวณผิวน้ำ จากนั้นจะเริ่มเข้าสู่ระยะ Gastrula เป็นระยะที่มีการพัฒนาอย่างเต็มที่ ประมาณ 24-28 ชั่วโมง โดยนับตั้งแต่เริ่มมีการปฏิสนธิ หลังจากระยะนี้ประมาณ 12-20 ชั่วโมง ปลิงทะเลจะเริ่มมีการขยายและยืดตัวได้ ซึ่งจะเริ่มเข้าสู่การพัฒนาระยะหลังต่อไป (Liao, 1997)

สำหรับในปลิงดำนั้น Laxminarayana (2005) กล่าวว่าปลิงดำจะวางไข่ในน้ำที่มีอุณหภูมิในช่วง 27-30 องศาเซลเซียส ซึ่งเพศผู้จะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ก่อนเพศเมีย แม่ปลิงแต่ละตัวจะมีความดกไข่ถึง 800,000 ฟอง ภายหลังจากมีการปฏิสนธิเกิดขึ้น ไข่จะเริ่มมีการพัฒนาในส่วนต่างๆ อย่างช้าๆ ที่อุณหภูมิของน้ำประมาณ 26-28 องศาเซลเซียส ความเค็ม 34-35 ส่วนในพันและความเป็นกรดเป็นด่างประมาณ 8.2-8.4 (Ramofafia *et al.*, 1995) พบว่าไข่ที่ได้รับการผสมขนาดเฉลี่ยของ 138.65 ± 1.6 ไมโครเมตร จะใช้เวลา 1-2 ชั่วโมง ในการแบ่งเป็น 2 เซลล์ (ตารางที่ 1) และ 24 ชั่วโมง เพื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะ Blastula (ภาพที่ 5) เป็นระยะที่เริ่มมีเส้นขน สามารถหมุนได้รอบ และเคลื่อนไหวได้ หลังจากระยะนี้ตัวอ่อนที่อยู่ในไข่ก็จะเริ่มมีการฟักตัวออกมา สามารถยืดออกและเคลื่อนไหวได้ที่บริเวณผิวน้ำ จากนั้นจะเริ่มเข้าสู่ระยะ Gastrula (ภาพที่ 6) เป็นระยะที่มีการพัฒนาอย่างเต็มที่ ประมาณ 24-28 ชั่วโมง โดยนับตั้งแต่เริ่มมีการปฏิสนธิปลิงทะเลจะเริ่มมีการขยายและยืดตัวได้ ซึ่งจะเริ่มเข้าสู่การพัฒนาระยะหลังต่อไป (Liao, 1997)

3.3.2.พัฒนาการของตัวอ่อนระยะหลัง (Larval development, Late development)

คุณสมบัติที่เหมาะสมในการฟักไข่ปลิงทะเลชนิด *H. atra* ได้แก่ อุณหภูมิประมาณ 26-28 องศาเซลเซียส ความเป็นกรดเป็นด่างประมาณ 8.2-8.4 และความเค็มประมาณ 34-35 ส่วน

ในพัน (Laxminarayana, 2005) ไข่ *H. atra* ที่ได้รับการปฏิสนธิจะพัฒนาเข้าสู่ระยะ auricularia ภายในเวลา 7-10 วัน ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับตัวอ่อนระยะเดียวกันของ *B. marmorata* ตัวอ่อน auricularia ระยะแรก (early auricularia) มีลักษณะสมมาตรกันทั้งสองด้าน ความยาวของลำตัวประมาณ 320-600 ไมโครเมตร ส่วนตัวอ่อน auricularia ระยะหลัง (late auricularia) มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 404 ไมโครเมตร จะมีกระเพาะอาหารที่เจริญมากขึ้น และลักษณะลำตัวจะค่อย ๆ เริ่มมีลักษณะเป็นทรงกลม และจะใช้ระยะเวลาอีก 15 วัน เพื่อพัฒนาเข้าสู่ระยะ doliolaria ซึ่งมีลักษณะคล้ายถังเบียร์ (barrel-shaped) ขนาดเฉลี่ยประมาณ 360 ไมโครเมตร ต่อมาอีก 4-5 วัน จะพัฒนาเข้าสู่ระยะ pentactula ที่มีลักษณะคล้ายท่อ (tube shaped) มีหนวด (tentacle) 5 เส้น มีเท้าท่อ (tube foot) มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 550 ไมโครเมตร และเริ่มกินอาหารพวกสาหร่ายและเศษซาก (Liao, 1997; Laxminarayana, 2005)



ภาพที่ 5 ระยะ Blastula (100 µm)

ภาพที่ 6 ระยะ Gastrula (100 µm)

3.4. ปัจจัยที่มีผลต่อความสมบูรณ์เพศและการสืบพันธุ์

3.4.1 ฤดูกาล: Alwi (1995) ฤดูกาลวางไข่ของปลิงทะเลอยู่ในช่วงฤดูฝน เพราะในช่วงฤดูฝนความเค็มของน้ำทะเลจะต่ำลง ทำให้มีผลต่อการพัฒนาของเซลล์เพศ และกระตุ้นให้เกิดการวางไข่ ในกรณีของปลิงดำส่วนใหญ่มักจะมีการสืบพันธุ์เป็นฤดูกาล Abdel-Razek *et al.* (2005) ทำการศึกษาการสืบพันธุ์ของปลิงดำบริเวณชายฝั่งทะเลแดงในประเทศอียิปต์พบว่าปลิงเพศดำผู้มีความสมบูรณ์เพศเต็มที่อยู่ในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายน ส่วนที่ปลิงดำเพศเมียจะมีความสมบูรณ์เพศในช่วงเดือนมิถุนายนถึงเดือนพฤศจิกายน และระยะที่หยุดการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์อยู่ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม Harriott (1985) พบว่าปลิงดำที่อาศัยอยู่ตามแนวปะการังของเกาะเฮอรอน (Heron Island) จะมีความสมบูรณ์เพศตลอดทั้งปี แต่จะมีความสมบูรณ์เพศที่สุดในช่วงฤดูร้อนถึงต้นฤดูใบไม้ร่วง

3.4.2 อุณหภูมิ: อุณหภูมิของน้ำเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการวางไข่มากกว่าฤดูกาลเจริญพันธุ์ ปลิงหลายชนิดมีการสร้างและการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงหลังฤดูหนาวเมื่ออุณหภูมิน้ำสูงขึ้นและจะนำไปสู่การวางไข่ที่เกิดขึ้นในฤดูร้อน (Costelloe, 1985)

ปัจจัยที่มีผลต่อการสืบพันธุ์ส่วนใหญ่เป็นปัจจัยจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล ตลอดจนการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ของพ่อพันธุ์แม่พันธุ์ สิ่งแวดล้อมเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญต่อการสืบพันธุ์ซึ่งรวมถึง อุณหภูมิ แพลงก์ตอน สารเคมี ในการสืบพันธุ์จำเป็นต้องอาศัย พลังงานในการทำให้เซลล์ไข่สุกรวมถึงการใช้พลังงานในการปล่อยเซลล์เพศออกมา หากสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์มันก็จะไม่มีการขยายพันธุ์ นอกจากนี้ชนิดของปลิงทะเลก็มีผลต่อการวางไข่ อาหารเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการสืบพันธุ์เพราะช่วงที่มีอาหารน้อย เช่น สาหร่ายที่มีผนังเซลล์ประกอบด้วยธาตุที่พบทั้งในน้ำเค็มและในน้ำจืด หรือเศษซากต่าง ๆ เศษหินเศษทรายซึ่งมีความสำคัญต่อการสืบพันธุ์ในช่วงฤดูหนาว เนื่องจากปลิงทะเลจะเริ่มหยุดกินอาหารในช่วงที่มีการแยก หรือการงอกใหม่ เพื่อลดอาหารในช่องว่างภายในลำตัวเนื่องจากการไม่แน่นอนของสภาพแวดล้อม ที่อยู่อาศัย การผันผวนของอุณหภูมิในน้ำ ความเค็มและเหล่งอาหารทำให้เกิดความเครียดในตัวปลิงเพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้เกิดอันตราย ดังนั้นเพื่อรักษาความหนาแน่นของประชากรจึงทำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ทั้งนี้เนื่องมาจากปัจจัยทางสภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล อีกหนึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการวางไข่ซึ่งเป็นปัจจัยภายนอกคือ วัฏจักรของดวงจันทร์โดยจะมีการวางไข่ในช่วง 2 วันแรกหลังจากพระจันทร์เต็มดวงและวันที่น้ำขึ้นสูงสุด (Mackey, 2001)

5. ความสำคัญของปลิงทะเล

5.1. ความสำคัญทางเศรษฐกิจ: มนุษย์นิยมบริโภคปลิงเนื่องจากมีสรรพคุณทางยา และเป็นอาหารที่มีโปรตีนสูง ปัจจุบันมีการทำประมงปลิงทะเลในหลายประเทศโดยเฉพาะประเทศที่อยู่ในบริเวณชายฝั่งของมหาสมุทรอินเดีย และทางตอนใต้ของมหาสมุทรแปซิฟิก สำหรับประเทศไทยมีการทำประมงปลิงทะเลทั้งชายฝั่งทะเลอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน เพื่อนำมาบริโภคภายในท้องถิ่น ร้านอาหาร และเพื่อการส่งออก (Munprasit, 2008) ปัจจุบันการทำประมงปลิงทะเลของประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกรวมถึงประเทศไทย อยู่ในสภาวะที่เกินศักยภาพการผลิต (over fishing) และประชากรปลิงทะเลในธรรมชาติมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัด ปลิงทะเลบางชนิดอยู่ในสภาพใกล้สูญพันธุ์ (Abdel-Razek *et al.*, 2005) ลักษณะการทำประมงปลิงทะเลยังเป็นลักษณะเดียวกับในอดีต คือการเก็บ ด้วยมือในช่วงน้ำลงในเขตน้ำขึ้นน้ำลง เขตน้ำตื้นบริเวณชายฝั่งและในแนวหญ้าทะเล มีการใช้ท่ออากาศและแว่นดำน้ำ (skin driving) บางครั้งอาจใช้วิธีการดำน้ำลึก (scuba driving) ในความลึกประมาณ 5-10 เมตร ปลิงทะเลบางชนิดต้องจับในเวลากลางวัน เช่น *H. leucospilota* บางชนิดต้องจับในเวลากลางคืน เช่น *S. variegatus* ซึ่งจะพบได้ง่ายในช่วงคืนเดือนมืดหรือข้างขึ้น เพราะปลิงชนิดนี้จะออกมาจากใต้ซอกหินที่เป็นแหล่งหลบซ่อนตัว ในต่างประเทศไม่ว่าจะเป็นญี่ปุ่น จีน เกาหลี อินโดนีเซีย และอีกหลายประเทศมีการทำการประมงปลิงทะเลอย่างจริงจัง และมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ประเทศที่มีผลผลิตปลิงทะเลสูงที่สุดคือ ญี่ปุ่น รองลงมาเป็นจีน อินโดนีเซีย และเกาหลี ตามลำดับ

สุเมตต์ (2542) กล่าวไว้ว่าในประเทศไทยมีปลิงทะเลที่นำมาบริโภคและซื้อขายมีประมาณ 12 ชนิด คือ *Holothuria scabra, H. atra, H. edulis, H. nobilis, H. spinifera, H.*

leucospilota, Bohadschia marmorata, B.argus และ Stichopus chloronotus, S. variegatus และ *Thelonota ananas* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bussarawit and Thongtham (1999) พบว่าในจำนวนนี้มี 2 ชนิด ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจสูงที่สุด คือ ปลิงขาว (*Holothuria scraba*) และปลิงดำ (*Holothuria atra*) ปลิงขาว ปลิงทะเลสองชนิดนี้ มีค่านิยมในการบริโภคต่างกัน ปลิงสีขาวจะเป็นที่นิยมมากกว่าชนิดอื่นและมีราคาแพง (Bruckner, 2005; Munprasit (2008) โดยการจับเพื่อจำหน่ายจะพบตลอดแนวชายฝั่งของจังหวัดทางฝั่งทะเลอันดามัน สำหรับทางฝั่งอ่าวไทยบริเวณจังหวัดระยองและชลบุรี มีการจับปลิงทะเลเพื่อจำหน่ายหลายชนิด ได้แก่ *H. scabra, H. leucospilota, H. edulis, B. marmorata, T. ananas, S. chloronotus* และ *S. herrmanni* (Bussarawit and Thongtham, 1999)

ในแต่ละปีปลิงทะเลถูกนำมาบริโภคทั่วโลกประมาณ 30,000 ตันต่อปี โดยมีตลาดการค้าใหญ่ คือ ประเทศญี่ปุ่น เกาหลีใต้ มาเลเซีย และกลุ่มประเทศ West Central Pacific สำหรับประเทศไทย จากสถิติการประมง ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2510–2532 มีการประมงปลิงทะเลส่งเป็นสินค้าออกแล้วไม่น้อยกว่า 1,100 ตัน คิดเป็นมูลค่าประมาณ 10 ล้านบาท โดยในปี พ.ศ. 2521 มีการส่งออกมากที่สุดคิดเป็นปริมาณ 226 ตัน มูลค่า 2.27 ล้านบาท หลังจากนั้นลดลงมา จนกระทั่งในช่วง 2–3 ปีที่ผ่านมามีปริมาณการจับเพิ่มขึ้น ปลิงทะเลที่จำหน่ายจะผ่านกรรมวิธีตากแห้ง ต้ม นึ่ง รมควัน หรือจำหน่ายในสภาพสด ราคาของปลิงทะเลถ้าจำหน่ายในสภาพสดจะมีราคากิโลกรัมละ 100–120 บาท แปรรูปเป็นปลิงตากแห้งราคาจะเพิ่มสูงขึ้นถึง กิโลกรัมละ 700–1,000 บาท โดยมีแหล่งรับซื้อใหญ่อยู่ที่จังหวัดสตูลและระนอง (สุเมตต์, 2542)

ประเทศไทยมีการส่งออกปลิงทะเลไปยังประเทศต่าง ๆ 12 ประเทศ (ตารางที่ 2) นอกจากประเทศไทยจะมีการส่งออกปลิงทะเลไปยังต่างประเทศแล้วยังมีการนำเข้าปลิงทะเลด้วยเช่นกัน โดยประเทศที่นำเข้ามากที่สุดคือ มาดากาสกา รองลงมาเป็น แทนซาเนีย จีน ฮ่องกง และปาปัวนิวกินี ตามลำดับ (Munprasit, 2008)

5.2. ความสำคัญทางด้านโภชนาการ: ปลิงทะเลสามารถนำมาประกอบอาหารได้หลายอย่าง เช่น ผัดซอส ผัดร่วมกับผัก ปลิงน้ำแดง แกงจืดหรือน้ำซุป ชาวจีนนำปลิงทะเลมาประกอบอาหารเป็นยาบำรุงกำลังที่ให้โปรตีนสูงเช่นเดียวกับรังนกนางแอ่นและหูฉลาม นักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นพบว่าในเนื้อปลิงทะเล *Stichopus japonicus* มีมิวโคโปรตีนสูง โดยในมิวโคโปรตีนจะมีกรด chondroitin sulfuric เป็นองค์ประกอบที่สำคัญของส่วนต่าง ๆ ของร่างกายมนุษย์ เช่น กระดูกอ่อน เอ็น และของเหลวที่หล่อลื่นตามข้อต่อต่าง ๆ การรับประทานปลิงทะเลจึงไปช่วยเสริมให้กล้ามเนื้อและข้อต่อต่าง ๆ ทำงานได้ดีขึ้น ซึ่งเป็นเหตุผลสำคัญที่ชาวจีนนิยมบริโภคปลิงทะเลเพื่อเป็นยาอายุวัฒนะมาตั้งแต่สมัยโบราณ (สุเมตต์, 2542) จากการเปรียบเทียบคุณค่าทางโภชนาการของปลิงทะเลกับสัตว์น้ำบางชนิด พบว่าโปรตีนในเนื้อปลาและกุ้งมีปริมาณสูงกว่าปลิงทะเลเล็กน้อย ส่วนสัตว์น้ำอื่น ๆ เช่น หมึกกล้วย ปูม้า หอยแมลงภู่ และหอยลาย จะมีปริมาณโปรตีนไม่ต่างจากปลิงทะเล ดังนั้นการบริโภคปลิงทะเลจึงเป็นการเสริมโปรตีนแก่ร่างกายเช่นเดียวกับการบริโภคหอยลายหรือหอยแมลงภู่ และเนื้อปลิงทะเลยังมีโปรตีนสูงกว่าหอยนางรมถึง 2 เท่า นอกจากนี้เนื้อ

ปลิงทะเลยังมีปริมาณไขมันต่ำ จึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งของคนที่ควบคุมไขมันได้เป็นอย่างดี (มัทนา, 2516)

ตารางที่ 2 การส่งออกปลิงทะเลไปยังประเทศต่าง ๆ 12 ประเทศ

ลำดับ	ประเทศ	ปริมาณ (กิโลกรัม)	จำนวนเงิน (บาท)	ปี
1	ฮ่องกง	120, 045	11,350,128	2003
2	ญี่ปุ่น	30, 000	1,095,000	1997
3	จีน	18, 900	245,303	1999
4	สหรัฐอเมริกา	5, 880	849,744	1997
5	เวียดนาม	3, 810	511,145	2001
6	สิงคโปร์	1, 423	472,650	1996
7	ไนเจอร์	1,235	344,902	1996
8	เกาหลี	790	189,172	2001
9	ใต้หวัน	762	121,043	2002
10	ออสเตรเลีย	200	84, 779	1996
11	มาเลเซีย	120	47, 170	2000
12	อินเดีย	31	45, 992	1997

ที่มา : Munprasit (2008)

5.3. ความสำคัญทางการแพทย์: สุเมตต์ (2542) กล่าวว่า ในทางการแพทย์นั้นปลิงทะเลบางชนิดมี holothurin ที่มีคุณสมบัติในการขัดขวางการส่งความรู้สึกของกระแสประสาทได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการบรรเทาความเจ็บปวดของผู้ป่วยหลังการผ่าตัดได้ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งโปรโตซัวได้ สารซาโปนินที่เรียกว่า holotoxin ที่สกัดจากปลิงทะเล *S. japonicus*, *H. mexicana* และอีกหลายชนิด แสดงผลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราบางชนิดได้ ในปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยที่จะใช้ประโยชน์จากซาโปนินในปลิงทะเล เพื่อนำมาใช้ในยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งในการบำบัดโรคมะเร็ง นอกจากนี้ยังมีการนำปลิงทะเลมาเป็นส่วนผสมของโลชั่นบำรุงผิว สบู่ ยาสีฟัน หรือบรรจุแคปซูลเป็นอาหารเสริมสุขภาพ แม้กระทั่งน้ำจากการต้มปลิงทะเลแล้วยังนำมาทำยาแก้แผลพุพองหรือแก้อาการคันจากยุงกัดได้อีกด้วย

Hung (2008) พบว่า ปลิงทะเลเป็นอาหารบำรุงกำลังและมีประโยชน์ทางยา รวมถึงการใช้รักษาโรค เช่น ลำไส้อักเสบ (ulcerative) กระเพาะอาหารอักเสบ (stomach inflammation) โลหิตจาง (anemia) ความดันโลหิตสูง (high blood pressure) ท้องผูก (constipation) ปวดหลัง (backache) โรคลมบ้าหมู (epilepsy) ข้ออักเสบรูมาดอยด์ (rheumatoid arthritis) โรคข้อเสื่อม (osteoarthritis) โรคข้อกระดูกสันหลังอักเสพชนิดติดยึด (ankylosing spondylitis) และภาวะผิดปกติทางเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue disorder) เนื่องจากปลิงทะเลสามารถรักษาสมดุลของสาร prostaglandin ซึ่งมีส่วนในกระบวนการทำให้กล้ามเนื้ออักเสบ โครงสร้างของลำตัวของ

ปลิงทะเลประกอบด้วย กระดูกอ่อนที่เป็นแหล่งของสาร mucopolysaccharides ที่มี chondroitin sulfuric acid ที่สามารถช่วยลดอาการปวดจากข้ออักเสบ และรักษาโรคเอดส์

5.4. ความสำคัญทางนิเวศวิทยา: ปราณี (2545) กล่าวว่า ปลิงทะเลมีบทบาทที่สำคัญในระบบนิเวศ เนื่องจากทำหน้าที่เป็นผู้ย่อยสลาย (decomposer) ซึ่งช่วยทำให้อินทรียวัตถุขนาดใหญ่มีขนาดเล็กลง และเป็นการปลดปล่อยสารอาหารที่มีขนาดเล็กให้กับสัตว์ขนาดเล็กและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บริเวณพื้นและในตะกอน และยังขับถ่ายสารออกมาในรูปแอมโมเนีย ซึ่งแพลงก์ตอนพืชสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้ ทำให้เกิดการหมุนเวียนของสารอาหารในระบบนิเวศ นอกจากอาหารที่ปลิงกินเข้าไปและสามารถย่อยได้ ส่วนที่เหลือจะถูกขับออกมาพร้อมกับตะกอนที่กินเข้าไป และปล่อยสารในรูปแขวนลอยและโมเลกุลที่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นประโยชน์กับสัตว์ที่กรองกินอาหารจากน้ำ

6. สภาวะการทำการประมงปลิงทะเล

ในอดีตการทำประมงปลิงทะเลในประเทศไทย มีเป้าหมายเพื่อการบริโภคเฉพาะในท้องถิ่นและภายในประเทศ แต่หลังจากปี 1970 เป็นต้นมา มีการทำประมงปลิงทะเลเพื่อการส่งออกมากขึ้นเป็นลำดับ ถึงแม้เมื่อเปรียบเทียบกับประเทศอื่นในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้จะมีปริมาณผลผลิตไม่มากก็ตาม (Bruckner, 2006) ทั้งนี้เนื่องจากผลผลิตที่ได้มาจากการจับจากธรรมชาติทั้งสิ้น ส่งผลให้ทรัพยากรปลิงทะเลในธรรมชาติอยู่ในสภาวะเสื่อมโทรม และมีจำนวนลดลงอย่างต่อเนื่อง และปลิงทะเลบางชนิดเกิดการสูญพันธุ์ (Abdel-Razek *et al.*, 2005) ลักษณะการทำประมงปลิงทะเลในประเทศไทยยังเป็นลักษณะเดียวกับในอดีต คือการเก็บด้วยมือขณะน้ำลงในเขตน้ำขึ้นน้ำลง เขตน้ำตื้นชายฝั่ง และในแหล่งหญ้าทะเล บางครั้งอาศัยการดำผิวน้ำ (skin driving) และบางครั้งอาจใช้วิธีการดำน้ำลึก (scuba diving) ในระดับความลึกประมาณ 5-10 เมตร ปลิงทะเลบางชนิดต้องจับในเวลากลางวัน เช่น *H. leucospilota* บางชนิดจับในเวลากลางคืน เช่น *S. variegates* ในต่างประเทศไม่ว่าจะเป็นญี่ปุ่น จีน เกาหลี อินโดนีเซีย และอีกหลายประเทศ มีการทำการประมงปลิงทะเลอย่างจริงจัง และมีการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ประเทศที่มีผลผลิตปลิงทะเลสูงที่สุดคือ ญี่ปุ่น รองลงมาเป็น จีน อินโดนีเซีย และเกาหลี ตามลำดับ (Conand, 2004)

7. การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

ในทางการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมักอาศัยวิธีการและปัจจัยต่างๆ มากระตุ้นพ่อแม่พันธุ์ให้มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เร็วกว่าปกติ ทำให้การเพาะและขยายพันธุ์สัตว์น้ำกระทำได้รวดเร็วโดยไม่ต้องรอให้พ่อแม่พันธุ์มีความพร้อม ทั้งนี้เนื่องจากเมื่อเรานำพ่อแม่พันธุ์ที่อยู่ในธรรมชาติมาทำการเพาะพันธุ์จะทำให้พ่อแม่พันธุ์เกิดความเครียดและปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ช้ากว่าปกติ สัตว์น้ำที่นิยมใช้วิธีการดังกล่าวคือกลุ่มของหอยสองฝา เช่น หอยแมลงภู่ หอยนางรม และหอยเชลล์ เป็นต้น สำหรับวิธีการในการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยสองฝา ได้แก่ การปรับอุณหภูมิของน้ำทะเลที่ใช้เพาะ การเปลี่ยนถ่ายน้ำสลับกับการผึ่งแห้ง และการใช้สารเคมี เป็นต้น (คเชนทร, 2544) พบว่าปลิงทะเลที่อาศัยในเขตร้อนและเขตอบอุ่นจะถูกกระตุ้นจากสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงในช่วงสั้น ๆ ทำให้เกิดความเครียดและปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา ปัจจัยสภาพแวดล้อมที่มีผลควบคุมการพัฒนาการ

สร้างเซลล์สืบพันธุ์ในปลิงทะเลและและกระตุ้นการปล่อยไข่ ได้แก่ อุณหภูมิหรือการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงเวลาที่ได้รับแสง ความเค็ม การเปลี่ยนแปลงระดับน้ำขึ้นน้ำลง ความสมบูรณ์ของอาหารและการเปลี่ยนชนิดอาหาร สำหรับระยะเวลาในการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์หลังจากการกระตุ้นโดยวิธีการต่างๆ พบว่าจะแตกต่างกันในปลิงแต่ละชนิด ซึ่งอาจใช้ระยะเวลาตั้งแต่ 1 ชั่วโมงจนถึง 5 วัน (Battaglene *et al*., 2002)

สำหรับในปลิงทะเลของไทยยังไม่การศึกษาด้านนี้อย่างจริงจัง จากการตรวจสอบเอกสาร พบว่ามีรายงานเพียงฉบับเดียวที่กล่าวถึงการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเล แต่ไม่ได้กล่าวถึงรายละเอียดอย่างชัดเจน และเป็นการศึกษาเพียงวิธีการเดียวยังไม่ได้ระบุว่าเป็นวิธีการที่เหมาะสม สำหรับในต่างประเทศมีรายงานการศึกษาด้านนี้หลายฉบับแต่มักเป็นปลิงชนิดอื่น ๆ ที่มีการแพร่กระจายในแต่ละประเทศที่ศึกษา ซึ่งมีวิธีการหลัก ๆ 2 วิธีคือ วิธีการผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำและการปรับอุณหภูมิ (temperature shock) (Renbo and Yuan, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับสภาพตามธรรมชาติจากการศึกษาของ Costelloe (1985) ที่พบว่าอุณหภูมิของน้ำเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการวางไข่มากกว่าฤดูกาลเจริญพันธุ์ ปลิงหลายชนิดมีการสร้างและการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงหลังฤดูหนาวเมื่ออุณหภูมิน้ำสูงขึ้นและจะไปสู่การวางไข่ที่เกิดขึ้นในฤดูร้อน

จากการรวบรวมข้อมูลจากเอกสารต่าง ๆ พบว่าการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเลได้รับอิทธิพลจากปัจจัยหลายประการ ได้แก่ อุณหภูมิน้ำ ช่วงเวลาการได้รับแสง แพลงก์ตอนพืช ข้างขึ้นข้างแรม และสารเคมี ซึ่งพบว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่มีผลต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเล

7.1 อุณหภูมิ Mackey (2001) กล่าวว่าอุณหภูมิเป็นปัจจัยหลักที่มีอิทธิพลต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเล โดยยืนยันจากการศึกษาของ Tanaka's (1958) ที่ทำการศึกษาการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของ *Stichopus japonicus* ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Morgan (2000) ที่กล่าวว่าการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำเพียงไม่กี่องศา จะทำให้เกิดการผสมพันธุ์วางไข่ได้ในปลิงทะเลบางชนิด นอกจากนี้อุณหภูมิมีอิทธิพลอย่างยิ่งต่อวงจรการสืบพันธุ์ของปลิงทะเล โดย Conand (1993) ปลิงทะเลหลายชนิดจะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพิ่มขึ้นหลังสิ้นสุดฤดูหนาว ซึ่งนำไปสู่การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เมื่ออุ่นขึ้นในฤดูร้อน ซึ่งพบทั้งปลิงทะเลที่อาศัยในเขตร้อนและเขตอบอุ่น (Chao *et al*., 1994) จากรายงานของ Yellow Sea Fisheries Research Institute (1991) ระบุว่าการสืบพันธุ์ของปลิงทะเล *S. japonicus* มีปัจจัยเกี่ยวที่สำคัญคืออุณหภูมิ ซึ่งจะมีการวางไข่ในช่วงอุณหภูมิ 15-23 องศาเซลเซียส แต่ปกติจะอยู่ในช่วง 18-20 องศาเซลเซียส ภายใน 2,100-2,400 ชั่วโมง การวางไข่จะไม่ค่อยปรากฏในช่วงเวลาหลังเที่ยงคืนหรือตอนบ่าย

7.2 ช่วงเวลาการได้รับแสง (photoperiod) เป็นอีกปัจจัยที่ยังไม่ได้รับการศึกษาอย่างจริงจังในปลิงทะเล แต่ปัจจัยนี้มีผลต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของเอคไคโนเดิร์มกลุ่มอื่น เช่น เม่นทะเลชนิด *Strongylocentrotus purpuratus* (Mackey, 2001) โดยช่วงเวลาการได้รับแสงมีอิทธิพลสูงต่อการเริ่มต้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งพบว่าเมื่อเม่นทะเลชนิดนี้ได้รับแสงในช่วงเวลาสั้นประมาณ 8- 12 ชั่วโมง ในช่วงกลางวัน เซลล์สืบพันธุ์จะมีการพัฒนาและมีความสมบูรณ์ แต่เมื่อได้รับ

แสงในช่วงเวลากลางวันนานขึ้นการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์จะหยุดชะงัก (Schmith and Pearse, 1987)

7.3 แพลงก์ตอนพืช (phytoplankton) เป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเล ทั้งนี้เนื่องจากหลายชนิดมีระยะตัวอ่อนที่เป็นแพลงก์ตอน ซึ่งกินแพลงก์ตอนพืชเป็นอาหาร (Smiley *et al*., 1991) โดยจากการศึกษาในปลิงทะเล *Cucumaria frondosa* พบว่าจะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในทันทีที่ความเข้มข้นของคลอโรฟิลในน้ำมีค่าสูง ซึ่งแสดงถึงการพลูมของแพลงก์ตอนพืช (Hamel and Mercier, 1995) อย่างไรก็ตามอาจมีกลไกทางสรีรวิทยาบางอย่าง หรือสารเคมีบางชนิดที่แพลงก์ตอนพืชปล่อยออกมาแล้วไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาของปลิงทะเล

7.4 วัฏภาคของดวงจันทร์ (lunar cycle) หรือข้างขึ้นข้างแรม เป็นปัจจัยเร้าการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในปลิงทะเลอีกหนึ่งประการ โดย Babcock *et al*. (1992) สามารถทำนายวันและชั่วโมงในการวางไข่ของปลิงทะเล 3 ชนิด คือ *Bohadschia argus, Euapta godeffroyi* และ *Stichopus chloronotus* โดยพบว่าจะวางไข่หลังพระอาทิตย์ตกดินในคืนที่ 1, 2 และ 3 หลังพระจันทร์เต็มดวงในช่วงฤดูสืบพันธุ์ ในปลิงทะเลชนิด *Polycheira rufescens และ Holothuria scabra* นั้น ฤดูกาลวางไข่จะสัมพันธ์กับจังหวะการเคลื่อนที่ของดวงจันทร์ โดยจะวางไข่ในช่วงเวลาค่ำของคืนใกล้พระจันทร์เต็มดวง ในช่วงที่น้ำขึ้นสูงสุด (Kubota and Tomari, 1998; Morgan, 2000) วัฏภาคของดวงจันทร์จึงอาจควบคุมการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ โดยการกระตุ้นปัจจัยภายในร่างกายของปลิงทะเล (Kubota and Tomari, 1998)

7.5 สารเคมี จัดว่าเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ที่เพิ่งได้รับความสนใจเมื่อไม่นานมานี้ โดย Hamel and Mercier (1996) ทดลองใช้สารเคมี ในการกระตุ้นระหว่างช่วงวงจรการสืบพันธุ์ของปลิงทะเลชนิด *Cucumaria frondosa* พบว่าในสภาพแวดล้อมที่คงที่ปลิงทะเลที่ได้รับการกระตุ้นจะมีการพัฒนาในช่วงแรกของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

วัสดุ

สัตว์ทดลอง ได้แก่ ปลิงดำ (*Holothuria atra* Jaeger,1833) ขนาดน้ำหนักตั้งแต่ 250 กรัม ขึ้นไป มีความยาวลำตัวประมาณ 20 เซนติเมตร

เครื่องมือ/อุปกรณ์

1. สำหรับการเตรียมน้ำ

- ปั๊มน้ำแบบแช่และสายยาง
- หลอด UV สำหรับฆ่าเชื้อน้ำ
- ถุงกรองขนาดช่องตา 69 ไมครอน
- ถังกรองทราย
- ถังพลาสติกความจุ 500 ลิตร
- ถังไฟเบอร์กลาสความจุ 1,000 ลิตร
- ชุดอุปกรณ์ให้อากาศพร้อมสายยางและหัวทราย

2. สำหรับการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

- ถังพลาสติกความจุ 160 ลิตร
- ตู้แช่แข็ง
- แผ่นให้ความร้อน (hot plate) หรืออุปกรณ์เพิ่มอุณหภูมิ (heater)
- หลอดไฟสำหรับให้แสง
- ปั๊มน้ำพร้อมสายยาง

3. สำหรับการตรวจสอบความหนาแน่นและความสมบูรณ์ของไข่และสเปิร์ม

- บีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร
- บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
- สไลด์หลุมพร้อมแผ่นปิดสไลด์
- กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ (compound microscope)
- หลอดหยด (dropper) พร้อมจุกยาง
- อุปกรณ์วัดขนาดผ่านกล้องจุลทรรศน์ ได้แก่ micrometer
- กล้องถ่ายรูปแบบดิจิตอล

4. สำหรับวัดขนาด-ชั่งน้ำหนัก

4.1 สำหรับวัดขนาด

- เวอร์เนียคาร์ลิปเปอร์ (vernier caliper) ชนิดพลาสติก ยี่ห้อ sonic ขนาด 15 เซนติเมตร x 1 มิลลิเมตร

4.2 สำหรับชั่งน้ำหนัก

- เครื่องชั่งสปริงขนาด 1 กิโลกรัม x 5 กรัม ยี่ห้อ CAMRY
- เครื่องชั่งทศนิยม 3 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Metter Toledo รุ่น PL -303

วิธีการ

การทดลองที่ 1 การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ

1. การวางแผนการทดลอง

การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยอาศัยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ (thermal stimulation) อาศัยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomized Design; CRD) ประกอบด้วย 5 ชุดการทดลอง ชุดทดลองละ 3 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 15 หน่วยทดลอง สิ่งทดลอง (ชุดการทดลอง) คือรูปแบบการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ ดังนี้

1) ชุดการทดลองที่ 1 ไม่มีการกระตุ้น (ชุดควบคุม)
2) ชุดการทดลองที่ 2 กระตุ้นด้วยวิธีการช็อกอุณหภูมิต่ำ
3) ชุดการทดลองที่ 3 กระตุ้นด้วยวิธีช็อกอุณหภูมิสูง
4) ชุดการทดลองที่ 4 กระตุ้นด้วยวิธีผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ
5) ชุดการทดลองที่ 5 กระตุ้นด้วยวิธีผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน

2. การเตรียมการทดลอง

2.1. การเตรียมวัสดุและอุปกรณ์: จัดหาวัสดุและอุปกรณ์ให้เพียงพอสำหรับการทดลอง โดยวัสดุที่เป็นพ่อแม่พันธุ์จะทำการรวบรวมจากธรรมชาติ บริเวณหน้าหาดสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง วิทยาเขตชุมพรเขตอุดมศักดิ์ จังหวัดชุมพร และหาดที่อยู่บริเวณใกล้เคียง อุปกรณ์ต่างๆ จะนำมาล้างทำความสะอาดและฆ่าเชื้อด้วยฟอร์มาลีนความเข้มข้น 300 ส่วนในล้าน จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด ผึ่งให้แห้งก่อนนำไปใช้ในการทดลอง

2.2. การเตรียมน้ำ: เตรียมโดยการสูบน้ำทะเลมาพักไว้ให้ตกตะกอน จากนั้นทำการผ่านระบบกรองทรายตามวิธีการของ Xiyin *et al.* (2004) และผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสงยูวีตามวิธีการของ ธเนศ (2551) จากนั้นกรองโดยใช้ถุงกรองละเอียดอีกครั้งเพื่อกำจัดสิ่งแขวนลอยในน้ำ

และปรับความเค็มให้อยู่ในช่วงระหว่าง 34-35 ส่วนในพัน (Laxminarayana, 2005) พักไว้เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง

2.3 การเตรียมพ่อแม่พันธุ์: ทำการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์ปลิงทะเล ขนาดน้ำหนักตั้งแต่ 250 กรัม ขึ้นไป มีความยาวลำตัวประมาณ 20 เซนติเมตร นำมาพักไว้ในถัง 800 ลิตร ภายในอาคารเป็นเวลา 1 คืน จึงนำมาทดลอง

3. การทดลอง

ทำการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำในแต่ละวิธี โดยใช้พ่อแม่พันธุ์หน่วยทดลองละ 10 ตัว และทำการทดลองในถังพลาสติกขนาด 160 ลิตร รายละเอียดในแต่ละวิธีดังนี้

3.1. การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตามธรรมชาติ: โดยการปล่อยพ่อแม่พันธุ์ลงในถังทดลองซึ่งมีระดับความสูงของน้ำประมาณ ¾ ของถัง รอจนกระทั่งมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

3.2. การช๊อคด้วยอุณหภูมิต่ำ: โดยการเตรียมน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิสูงกว่าปกติ 5 องศาเซลเซียส นานประมาณ 30 นาที ย้ายพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิปกติไปใส่ลงในน้ำอุณหภูมิสูงที่เตรียมไว้ นานประมาณ 30 นาที จากนั้นย้ายพ่อแม่พันธุ์ลงสู่ถังที่มีอุณหภูมิน้ำปกติ รอจนกระทั่งมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

3.3. การช๊อคด้วยอุณหภูมิสูง: โดยการเตรียมน้ำทะเลที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าปกติ 5 องศาเซลเซียส นำพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในน้ำอุณหภูมิปกติใส่ลงในน้ำอุณหภูมิสูงที่เตรียมไว้ นานประมาณ 30 นาที จากนั้นย้ายพ่อแม่พันธุ์ลงสู่ถังที่มีอุณหภูมิน้ำปกติ รอจนกระทั่งมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

3.4. การผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ: โดยการนำพ่อแม่พันธุ์มาผึ่งแห้งในที่ร่มเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นฉีดด้วยน้ำทะเลนาน 30 นาที จากนั้นย้ายพ่อแม่พันธุ์ลงสู่ถังที่มีอุณหภูมิน้ำปกติ รอจนกระทั่งมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

3.5 การผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน: โดยการนำพ่อแม่พันธุ์มาผึ่งแห้งในที่ร่มเป็นเวลา 30 นาที แล้วปล่อยน้ำทะเลให้ไหลผ่านนาน 30 นาที จากนั้นย้ายพ่อแม่พันธุ์ลงสู่ถังที่มีอุณหภูมิน้ำปกติ รอจนกระทั่งมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

การทดลองที่ 2 การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยอาศัยช่วงเวลาการได้รับแสง

1. การวางแผนการทดลอง

กระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยอาศัยการปรับเปลี่ยนช่วงเวลาการได้รับแสง โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด ประกอบด้วย 3 ชุดการทดลอง ชุดทดลองละ 5 ซ้ำ รวมทั้งสิ้น 15 หน่วยทดลอง กำหนดให้สิ่งทดลองคือช่วงเวลาที่ได้รับแสง ดังนี้

1) ชุดการทดลองที่ 1 ไม่มีการกระตุ้น (ชุดควบคุม) โดยการให้แสงตามธรรมชาติ

2) ชุดการทดลองที่ 2 กระตุ้นโดยให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง

3) ชุดการทดลองที่ 3 กระตุ้นโดยให้แสง 6 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 6 ชั่วโมง

2. การเตรียมการทดลอง

2.1. **การเตรียมวัสดุและอุปกรณ์:** สำหรับการเตรียมวัสดุและอุปกรณ์การทดลองกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยอาศัยช่วงเวลาการได้รับแสง จะเหมือนกับในการทดลองที่ 1 ส่วนที่แตกต่างกันคือ อุปกรณ์เพิ่มเติมเกี่ยวกับการให้แสง ได้แก่ หลอดไฟ (หลอดหลอดเรืองแสงหรือหลอดฟลูออเรสเซนต์) และอุปกรณ์สำหรับควบคุมระยะเวลา (timer) การเปิดปิดหลอดไฟ

2.2. การเตรียมน้ำและพ่อแม่พันธุ์: อาศัยวิธีการเดียวกันกับการทดลองที่ 1

3. การทดลอง

ทำการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำโดยอาศัยช่วงเวลาการได้รับแสงในแต่ละวิธี โดยใช้พ่อแม่พันธุ์หน่วยทดลองละ 10 ตัว และทำการทดลองในถังพลาสติกขนาด 300 ลิตร รายละเอียดในแต่ละวิธีดังนี้

3.1. ชุดการทดลองที่ 1 การให้แสงตามธรรมชาติ เป็นชุดควบคุม โดยการนำพ่อแม่พันธุ์ลงเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 300 ลิตร ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน โดยไม่มีการติดตั้งอุปกรณ์ให้แสงและตัวควบคุม รอจนกระทั่งพ่อแม่พันธุ์ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

3.2. ชุดการทดลองที่ 2 กระตุ้นโดยให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง โดยการนำพ่อแม่พันธุ์ลงเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 300 ลิตร ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน โดยติดตั้งอุปกรณ์สำหรับให้แสง โดยมีระดับความเข้มแสงประมาณ 400 ลักซ์ และติดตั้งอุปกรณ์ควบคุมการเปิด-ปิดไว้ที่ 12 ชั่วโมง รอจนกระทั่งพ่อแม่พันธุ์ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

3.3. ชุดการทดลองที่ 3 กระตุ้นโดยให้แสง 6 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 6 ชั่วโมง โดยการนำพ่อแม่พันธุ์ลงเลี้ยงในถังพลาสติกขนาด 300 ลิตร ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน โดยติดตั้งอุปกรณ์สำหรับให้แสง โดยมีระดับความเข้มแสงประมาณ 400 ลักซ์ และติดตั้งอุปกรณ์ควบคุมการเปิด-ปิดไว้ที่ 6 ชั่วโมง รอจนกระทั่งพ่อแม่พันธุ์ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

4. การจัดการระหว่างการทดลอง: สำหรับในการทดลองที่ 2 จะมีการให้อาหารสำหรับเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ โดยอาหารที่ให้จะเป็นอาหารกุ้ง วันละ 1 มื้อ ในช่วงเช้าเวลา 08.00 น. และมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำสัปดาห์ละ 1 ครั้ง ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์

การทดลองที่ 3 การศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนระยะแรก

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงหรือการพัฒนาของตัวอ่อนระยะแรกหรือคัพภะ (embryonic development) โดยเริ่มจากไข่ปลิงดำได้รับการผสมจนกระทั่งฟักออกจากไข่ ซึ่งต่อเนื่องจากการทดลองที่ 1 และ 2 โดยการรวบรวมไข่จากการกระตุ้นในแต่ละชุดการทดลอง มาใส่ในถังฟักขนาด 200 ลิตร ที่ระดับความเค็มและอุณหภูมิเท่ากับถังวางไข่ โดยวางแผนการทดลองต่อเนื่องกับการทดลองที่ 1 และ 2

การเก็บรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

1. การเก็บรวบรวมข้อมูล: ข้อมูลที่ทำการรวบรวม ได้แก่

- จำนวนไข่และอสุจิที่ปล่อยออกมาจากแม่พันธุ์และพ่อพันธุ์แต่ละตัว จากการกระตุ้นในแต่ละวิธี ซึ่งรายงานผลเป็นจำนวนต่อพ่อหรือแม่พันธ์ 1 ตัว

- ระยะเวลาการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ หลังการกระตุ้นในแต่ละวิธี

- ลักษณะและขนาดของไข่และน้ำเชื้อที่ปล่อยออกมา จากการกระตุ้นด้วยวิธีการต่าง บันทึกรายละเอียด พร้อมถ่ายภาพประกอบ

- อัตราการปฏิสนธิ (fertilization rate) โดยการนำไข่ที่ปล่อยออกมาและผสมกับเสปิร์มแล้วมาฟักในน้ำทะเลที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน รอจนกระทั่งตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะ gastrula นับจำนวน และคำนวณอัตราการปฏิสนธิจาก

$$\text{อัตราการปฏิสนธิ (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อนระยะ gastrula}}{\text{จำนวนไข่ดีทั้งหมด}} \times 100$$

- อัตราฟัก (hatching rate) คำนวณจาก

$$\text{อัตราฟัก (เปอร์เซ็นต์)} = \frac{\text{จำนวนตัวอ่อน gastrula ที่ฟักออกจากไข่}}{\text{จำนวนไข่ทั้งหมด}} \times 100$$

- ระยะเวลาการฟัก คิดจากระยะเวลาที่เริ่มทำการทดลองจนกระทั่งตัวอ่อนฟักออกจากไข่

- พัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงของคัพภะ โดยตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของคัพภะตั้งแต่ไข่ได้รับการผสมจนกระทั่งพัฒนาเข้าสู่ระยะ auricularia โดยทำการตรวจสอบทุก 1 ชั่วโมง บันทึกการเปลี่ยนแปลง และวัดขนาดของแต่ละระยะผ่านกล้องจุลทรรศน์พร้อมบันทึกภาพประกอบ

4.2 การวิเคราะห์ข้อมูล: นำข้อมูลที่รวบรวมได้มาเปรียบเทียบความแตกต่างโดยหาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance, ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan’ s New multiple Range Test (DMRT) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

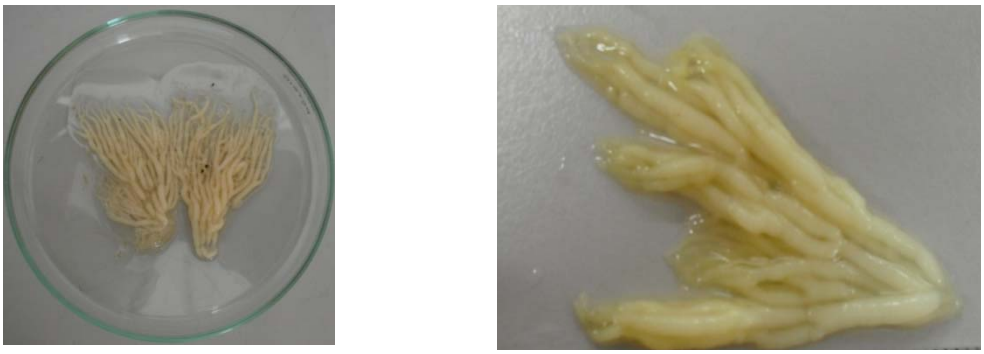
บทที่ 4
ผลการวิจัย

ผล

จากการทดลองกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ โดยการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติมาทำการกระตุ้นด้วยการปรับเปลี่ยนสภาพแวดล้อมบางประการ ประกอบด้วย 3 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 เป็นการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ การทดลองที่ 2 เป็นการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยอาศัยช่วงเวลาการได้รับแสง และการทดลองที่ 3 เป็นการศึกษาการพัฒนาของตัวอ่อนระยะแรก ที่ได้มาจากการกระตุ้นในการทดลองที่ 1 และ 2 พบว่าผลจากการทดลองเป็นดังต่อไปนี้

1. การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ

การตรวจสอบลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ พบว่าปลิงดำมีลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) เหมือนกับปลิงทะเลทั่วไป คือ มีอัณฑะ 1 อัน และรังไข่ 1 อัน ทั้งอัณฑะและรังไข่มีลักษณะเรียวยาวแตกแขนกออกเป็นหลายพู (ภาพที่ 7 และ 8) และมีช่องเปิดของเซลล์สืบพันธุ์อยู่ระหว่างหนวดด้านหลังของลำตัว



ภาพที่ 7 ลักษณะอัณฑะของปลิงดำ

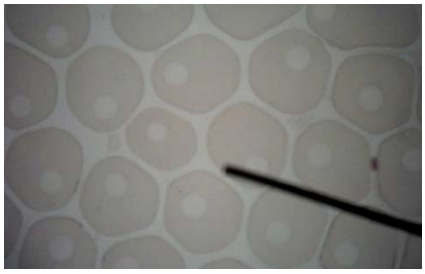
ภาพที่ 8 ลักษณะรังไข่ของปลิงดำ

การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำนั้น จากการทดลองพบว่าพ่อพันธุ์จะปล่อยอสุจิออกมาก่อน จากนั้นแม่พันธุ์จึงปล่อยไข่ ระยะเวลาระหว่างการปล่อยอสุจิและไข่จะแตกต่างกันขึ้นกับวิธีการกระตุ้น โดยลักษณะการปล่อยอสุจินั้นจะมีลักษณะฟุ้งคล้ายกับควันบุหรี่ (ภาพที่ 9) เซลล์อสุจิมีรูปร่างทรงกลม (ภาพที่ 10D) ไม่สามารถวัดขนาดได้จากกล้องจุลทรรศน์เชิงประกอบ (compound microscope) ส่วนลักษณะการปล่อยไข่จะคล้ายกับการปล่อยอสุจิแต่เห็นได้ชัดเจนกว่า (ภาพที่ 9) เนื่องจากเซลล์ไข่มีขนาดใหญ่กว่าเซลล์อสุจิและมีสีสันสดใสกว่าคือมีสีแดงอมส้มหรือสีชมพูอมส้ม ไข่เมื่ออยู่ในรังไข่จะมีขนาดแตกต่างกัน แต่เมื่อปล่อยลงน้ำจะมีการขยายขนาดเล็กน้อยเนื่องจากมีการซึมผ่านของน้ำ ซึ่งมีขนาดอยู่ในช่วง 140-150 ไมครอน (ภาพที่ 10A-C)

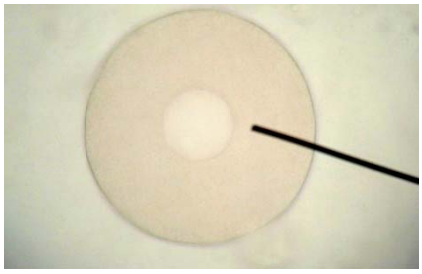
ลักษณะการปล่อยอสุจิของพ่อพันธุ์

ลักษณะการปล่อยไข่ของแม่พันธุ์

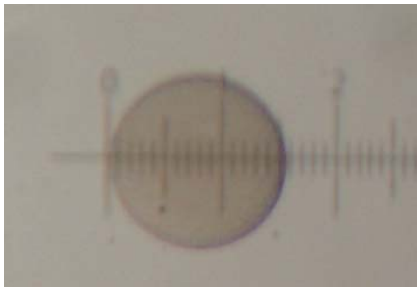
ภาพที่ 9 ลักษณะการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ



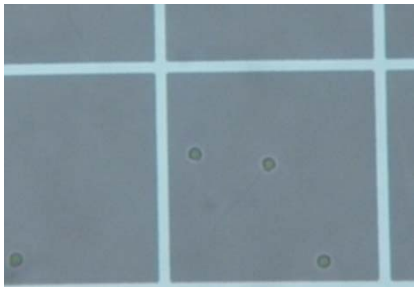
A



B



C



D

ภาพที่ 10 ลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์: ไข่ (A-C) และอสุจิ (D)

ภาพที่ 11 ลักษณะภายในถังทดลองเมื่อพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ปล่อยไข่และอสุจิ

2. การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ

การนำเทคนิคการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิมาใช้ในการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ ซึ่งประกอบด้วยอสุจิ (sperms) และไข่ (eggs) ผ่านวิธีการต่าง ๆ 4 วิธี ได้แก่ การช็อคอุณหภูมิต่ำ การช็อคอุณหภูมิสูง การผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ และการผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน โดยในชุดควบคุมจะไม่มีการกระตุ้น หรือปล่อยให้พ่อแม่พันธุ์ปล่อยเซลล์ออกมาเองตามธรรมชาติ พบว่าผลการทดลองที่ได้ เป็นดังนี้

2.1. จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ (ตารางที่ 3)

การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ โดยอาศัยวิธีการกระตุ้นด้วยเทคนิคการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ 4 วิธี คือ การช็อคอุณหภูมิต่ำ การช็อคอุณหภูมิสูง การผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ และการผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน สามารถกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปล่อยไข่และอสุจิได้ ส่วนในชุดควบคุมนั้น ตลอดการทดลองไม่พบว่าพ่อแม่พันธุ์มีการปล่อยไข่และอสุจิแต่อย่างใด

ไข่ปลิงดำที่ได้จากการกระตุ้นทั้ง 4 วิธี มีจำนวนแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำสามารถกระตุ้นให้แม่ปลิงปล่อยไข่ได้จำนวนมากที่สุดเฉลี่ย $9.567 \times 10^5 \pm 0.513 \times 10^5$ ฟอง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการกระตุ้นด้วยวิธีอื่น ในขณะที่การช็อคด้วยอุณหภูมิสูงมีผลกระตุ้นให้แม่พันธุ์ปล่อยไข่ได้จำนวนน้อยที่สุดเฉลี่ย $6.073 \times 10^5 \pm 0.395 \times 10^5$ ฟอง แต่ไม่แตกต่างกันกับวิธีผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน

สำหรับจำนวนอสุจิพบว่า ทั้ง 4 วิธี สามารถกระตุ้นให้พ่อพันธุ์ปลิงดำปล่อยอสุจิได้ในจำนวนที่แตกต่างกันทางสถิติเช่นกัน โดยการการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำสามารถกระตุ้นให้พ่อพันธุ์ปล่อยอสุจิได้ที่สุดเฉลี่ย $1.529 \times 10^{10} \pm 0.058 \times 10^{10}$ เซลล์ แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการกระตุ้นด้วยการผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ ส่วนการช็อคอุณหภูมิสูงและผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่านสามารถกระตุ้นให้พ่อพันธุ์ปล่อยอสุจิได้ในจำนวนที่ไม่แตกต่างกัน โดยการช็อคอุณหภูมิสูงให้จำนวนของอสุจิน้อยที่สุดเฉลี่ย $0.600 \times 10^{10} \pm 0.132 \times 10^{10}$

จะเห็นได้ว่าการกระตุ้นการปล่อยไข่และอสุจิ โดยอาศัยเทคนิคการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิทั้ง 4 วิธี สามารถกระตุ้นการปล่อยไข่และอสุจิได้ทุกวิธี แต่เมื่อเปรียบเทียบจากจำนวนพบว่าการช็อคอุณหภูมิต่ำจะเป็นวิธีที่ดีที่สุด เนื่องจากกระตุ้นให้ปลิงดำปล่อยอสุจิและไข่ได้จำนวนมากที่สุด

ตารางที่ 3 จำนวนเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ

ชุดการทดลอง	จำนวนเซลล์สืบพันธุ์	
	อสุจิ ($\times 10^{10}$ เซลล์)	**ไข่** ($\times 10^{5}$ ฟอง)
ไม่มีการกระตุ้น	-	-
ช็อคอุณหภูมิต่ำ	1.529 ± 0.058^{a}	9.567 ± 0.513^{a}
ช็อคอุณหภูมิสูง	0.600 ± 0.132^{b}	6.073 ± 0.395^{c}
ผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ	1.167 ± 0.635^{ab}	7.833 ± 1.274^{b}
ผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน	0.643 ± 0.093^{b}	6.150 ± 0.328^{c}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแตกต่างกันกำกับแสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

2.2. ระยะเวลาการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (ตารางที่ 4)

การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ โดยอาศัยวิธีการกระตุ้นด้วยเทคนิคการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิทั้ง 4 วิธี พบว่าหลังจากการกระตุ้น พ่อพันธุ์จะมีการปล่อยอสุจิออกมาก่อนและแม่พันธุ์จะปล่อยไข่ออกมาในภายหลัง โดยระยะเวลาในการปล่อยอสุจิและไข่ เมื่อได้รับการกระตุ้นในแต่ละวิธีพบว่ามีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งรวมถึงเวลาระหว่างการการปล่อยอสุจิและไข่ด้วย

ระยะเวลาในการปล่อยอสุจิเมื่อกระตุ้นด้วยการช็อคอุณหภูมิต่ำ การช็อคอุณหภูมิสูง การผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ และการผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน มีค่าเฉลี่ย 18.333 ± 1.528, 22.333 ± 2.517, 5.000 ± 3.464 และ 20.667 ± 2.082 นาที ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ จะเห็นว่าการการผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ สามารถกระตุ้นให้พ่อพันธุ์ปล่อยอสุจิได้เร็วที่สุดและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอีกสามวิธี ซึ่งทั้ง 3 วิธีดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

สำหรับระยะเวลาการปล่อยไข่ พบว่าแม่พันธุ์จะปล่อยไข่หลังจากที่พ่อพันธุ์ปล่อยอสุจิ โดยจะปล่อยหลังจากได้รับการกระตุ้นคิดเป็นเวลาเฉลี่ย 30.667 ± 4.041, 41.667 ± 3.512, 19.333 ± 0.577 และ 36.667 ± 2.887 นาที ตามลำดับ โดยการผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำมีการปล่อยปล่อยไข่ได้เร็วที่สุดสอดคล้องกับการปล่อยอสุจิ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอีกสามวิธี สำหรับวิธีที่ปล่อยไข่ช้าที่สุดคือการช็อคด้วยอุณหภูมิสูง ซึ่งไม่แตกต่างกันกับการผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน

เมื่อพิจารณาระยะเวลาระหว่างการปล่อยอสุจิและไข่ พบว่าทั้ง 4 วิธี มีค่าเฉลี่ยแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการช็อคด้วยอุณหภูมิสูงมีระยะเวลาระหว่างการปล่อยอสุจิและไข่นานที่สุดแต่ไม่แตกต่างกับการผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน ในขณะที่การผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำมีระยะเวลาห่างน้อยที่สุด แต่ไม่แตกต่างกับการผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ

ตารางที่ 4 ระยะเวลาการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ

ชุดการทดลอง	เวลา (นาที)		
	อสุจิ	ไข่	ความแตกต่าง
ไม่มีการกระตุ้น	-	-	-
ช็อคอุณหภูมิต่ำ	18.333±1.528[a]	30.667±4.041[b]	12.333±3.055[b]
ช็อคอุณหภูมิสูง	22.333±2.517[a]	41.667±3.512[a]	19.333±1.155[a]
ผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ	5.000±3.464[b]	19.333±0.577[c]	14.333±3.786[ab]
ผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน	20.667±2.082[a]	36.667±2.887[a]	16.000±1.000[ab]

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแตกต่างกันกำกับแสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

2.3. การปฏิสนธิ (ตารางที่ 5)

ในการตรวจสอบการปฏิสนธิของไข่ปลิงดำ จะอาศัยการพัฒนาของคัพภะเมื่อเข้าสู่ระยะ gastrula ซึ่งถือว่าการปฏิสนธิเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ พบว่าจากจำนวนไข่เฉลี่ยจากการกระตุ้นในแต่ละวิธีคือ $9.567x10^5 \pm 0.513x10^5$, $6.073x10^5 \pm 0.395x10^5$, $7.833x10^5 \pm 1.274x10^5$ และ $6.150x10^5 \pm 0.328x10^5$ ฟอง ตามลำดับ สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะ gastrula หรือได้รับการปฏิสนธิสมบูรณ์จำนวนเฉลี่ย $4.600x10^5 \pm 3.412 x10^5$, $2.477x10^5 \pm 0.236x10^5$, $6.037 x10^5 \pm 1.757 x10^5$ และ $3.087x10^5 \pm 0.539x10^5$ ฟอง ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการปฏิสนธิเฉลี่ย 48.199±35.026, 40.944±5.459, 76.097±10.074 และ 50.109±7.850 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่พบว่าจากค่าเฉลี่ยดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำมีอัตราการปฏิสนธิสูงที่สุด ในขณะที่การช็อคด้วยอุณหภูมิสูงมีอัตราการปฏิสนธิต่ำที่สุด

2.4. การฟัก (ตารางที่ 5)

พบว่าไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจากการกระตุ้นแต่ละวิธี สามารถพัฒนาจนกระทั่งเข้าสู่ระยะ auricularia และฟักออกจากไข่ได้จำนวนเฉลี่ย $2.000x10^5 \pm 0.917x10^5$, $0.736x10^5 \pm 0.142x10^5$, $2.167x10^5 \pm 0.874 x10^5$ และ $0.699x10^5 \pm 0.054x10^5$ ตัว ตามลำดับ คิดเป็นอัตราการฟักเฉลี่ย 50.794±15.492, 29.860±5.971, 35.302±8.846 และ 22.974±2.966 เปอร์เซ็นต์

ตามลำดับ ซึ่งมีค่าแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยการช๊อคด้วยอุณหภูมิต่ำมีอัตราการฟักสูงที่สุด และไม่แตกต่างกันกับการผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ ในขณะที่การผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่านให้อัตราการฟักต่ำที่สุดและไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการช๊อคอุณหภูมิสูงและการผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ

ตารางที่ 5 อัตราการปฏิสนธิและอัตราการฟักของไข่ปลิงดำ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ

ชุดการทดลอง	อัตราการปฏิสนธิ^{ns} (เปอร์เซ็นต์)	อัตราการฟัก (เปอร์เซ็นต์)
ไม่มีการกระตุ้น	-	-
ช็อคอุณหภูมิต่ำ	48.199±35.026	50.794±15.492^{a}
ช็อคอุณหภูมิสูง	40.944±5.459	29.860±5.971^{b}
ผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ	76.097±10.074	35.302±8.846^{ab}
ผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน	50.109±7.850	22.974±2.966^{b}

หมายเหตุ: 1. ^{ns} คือ non significant แสดงความไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกัน

2. ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแตกต่างกันกำกับแสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

2.5. พัฒนาการของคัพภะ

การพัฒนาของคัพภะหรือตัวอ่อนระยะแรก ซึ่งเริ่มศึกษาตั้งแต่ไข่ได้รับการผสมจนกระทั่งพัฒนาเข้าสู่ระยะ auricularia พบว่าคัพภะมีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่มีขนาดของแต่ละระยะ และช่วงเวลาในพัฒนาการแต่ละระยะแตกต่างกัน ดังนี้

2.5.1 ขนาดของคัพภะ (ตารางที่ 6)

ไข่ที่จากการกระตุ้นด้วยวิธีการต่าง ๆ เมื่อรับการผสม และนำไปฟักที่ระดับความเค็ม 30 ส่วนในพัน พบว่าไข่มีการแบ่งเซลล์และมีการพัฒนาของคัพภะ โดยมีขนาดของคัพภะที่ระยะ blastula, gastrula และ auricularia แตกต่างกันดังนี้

- ระยะ blastula: ไข่ปลิงดำที่ได้จากการกระตุ้นทั้ง 4 วิธี มีขนาดของคัพภะระยะ blastula เฉลี่ย 146.667±5.774, 145.000±5.000, 143.333±5.774 และ 146.667±2.887 ไมครอน ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าคัพภะที่ได้จากการกระตุ้นด้วยวิธีช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำ มีขนาดใหญ่ที่สุด แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับคัพภะที่ได้จากการกระตุ้นอีก 3 วิธี

- ระยะ gastrula: ขนาดของคัพภะระยะ gastrula ที่ได้จากการกระตุ้นในแต่ละวิธีมีขนาดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำมีขนาดของคัพภะใหญ่ที่สุด เฉลี่ย 250.000±10.000 ไมครอน แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการช็อคด้วยอุณหภูมิสูง (235.000±30.414 ไมครอน) และการผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน (233.333±15.275 ไมครอน) ในขณะที่การผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำมีขนาดของคัพภะเล็กที่สุดเฉลี่ย 210.000±10.000 ไมครอน

- ระยะ auricularia: ขนาดของตัวอ่อนระยะ auricularia ที่ได้จากการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ที่ 4 วิธี มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยตัวอ่อน auricularia ที่ได้จากการกระตุ้นด้วยวิธีการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำมีขนาดมีขนาดใหญ่ที่สุด เฉลี่ย 413.333±32.146 ไมครอน และวิธีการผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำมีขนาดเล็กที่สุด เฉลี่ย 383.333±57.735 ไมครอน

จากขนาดของคัพภะซึ่งพัฒนามาจากไข่ที่ได้รับการกระตุ้นในแต่ละวิธี จะเห็นได้ว่าการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำจะให้คัพภะทุกระยะ ขนาดใหญ่ที่สุด และการผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำให้ขนาดของคัพภะเล็กที่สุดทั้งระยะ blastula, gastrula และ auricularia

ตารางที่ 6 ขนาดของคัพภะปลิงดำที่ระยะต่าง ๆ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ

ชุดการทดลอง	ขนาด (ไมครอน)		
	Blastula^{ns}	Gastrula	Auricularia^{ns}
ไม่มีการกระตุ้น	-	-	-
ช็อคอุณหภูมิต่ำ	146.667±5.774	250.000±10.000^{a}	413.333±32.146
ช็อคอุณหภูมิสูง	145.000±5.000	235.000±30.414^{ab}	400.000±20.000
ผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ	143.333±5.774	210.000±10.000^{b}	383.333±57.735
ผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน	146.667±2.887	233.333±15.275^{ab}	393.333±40.415

หมายเหตุ: 1. ^{ns} คือ non significant แสดงความไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกัน

2. ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแตกต่างกันกำกับแสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

2.5.2 ระยะเวลาการพัฒนาของคัพภะ (ตารางที่ 7)

เวลาการพัฒนาของคัพภะปลิงดำในแต่ละระยะคือ blastula, gastrula และ auricularia ของไข่ที่ได้การกระตุ้นจากแต่ละวิธี มีผลดังนี้

- ระยะ blastula: เมื่อไข่ได้รับการผสมพบว่า แต่ละวิธีมีระยะเวลาในการพัฒนาเข้าสู่ระยะ blastula เฉลี่ย 19.667±0.577, 21.000±1.000, 18.667±0.577 และ 21.667±1.155 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการกระตุ้นด้วย

การผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำจะมีระยะการพัฒนาของไข่เข้าสู่ระยะ blastula สั้นหรือเร็วที่สุด แต่มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำ ในขณะที่การผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่านใช้ระยะเวลานานที่สุดและไม่แตกต่างกันกับการช็อคด้วยอุณหภูมิสูง

- ระยะ gastrula: ไข่ที่รับการกระตุ้นด้วยวิธีการต่าง ๆ ใช้ระยะเวลาพัฒนาเข้าสู่ระยะ gastrula หรือระยะเวลาที่ปฏิสนธิสมบูรณ์เฉลี่ย 29.333±0.577, 30.333±1.528, 26.667±0.577 และ 31.000±1.000 ชั่วโมง ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำใช้ระยะเวลาสั้นที่สุด ซึ่งแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญกับอีก 3 วิธี ในขณะที่อีกสามวิธีมีระยะเวลาในการพัฒนาเข้าสู่ระยะ gastrula ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

- ระยะ auricularia: ระยะเวลาที่พัฒนาเข้าสู่ระยะ auricularia เทียบได้กับระยะเวลาฟักของไข่ปลิงดำ โดยทั้ง 4 วิธี มีระยะเวลาฟักที่แตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ โดยการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำให้ระยะเวลาฟักสั้นหรือเร็วที่สุดเฉลี่ย 45.667±0.577 ชั่วโมง ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการช็อคด้วยอุณหภูมิสูงและการผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน ในขณะที่การผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำให้ระยะเวลาฟักนานที่สุด เฉลี่ย 48.000±0.000 ชั่วโมง แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับการช็อคด้วยอุณหภูมิสูงและการผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน

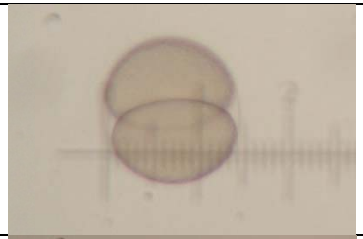
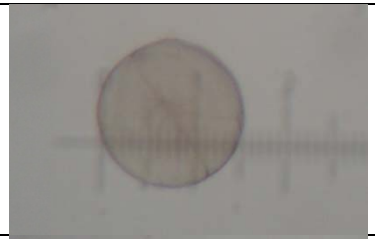
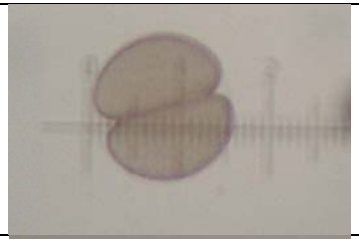
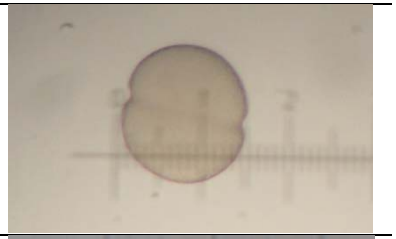
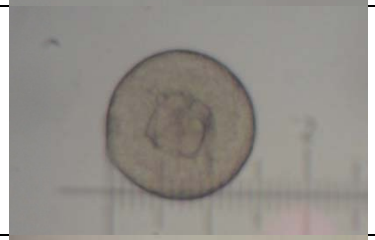
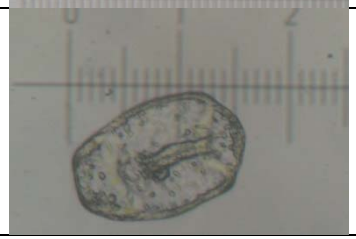
จากข้อมูลระยะเวลาการพัฒนาของคัพภะ พบว่าถ้าหากให้ความสำคัญกับระยะเวลาในการฟักเป็นหลัก การกระตุ้นโดยการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำจึงเป็นวิธีที่น่าสนใจ

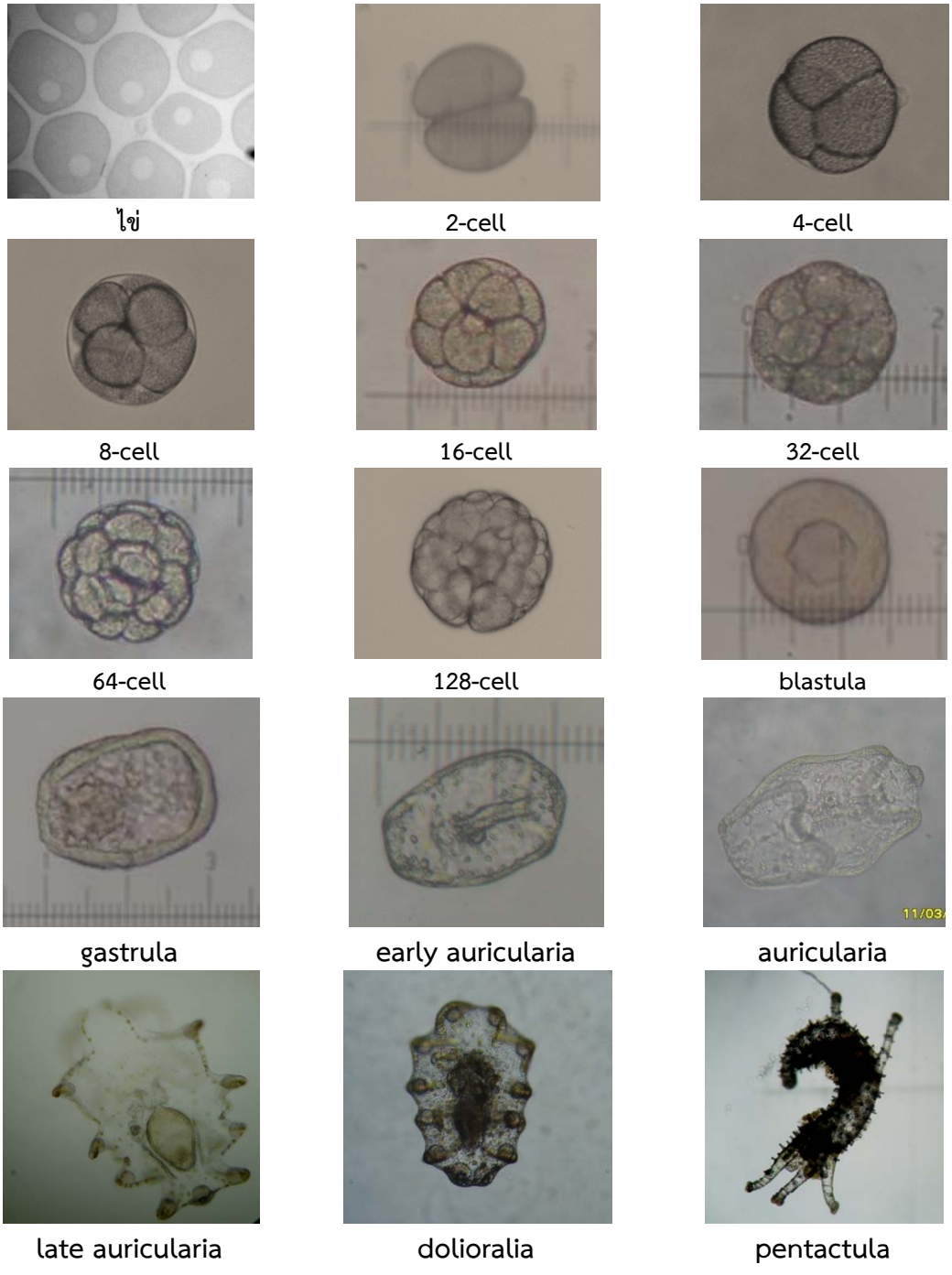
ตารางที่ 7 ระยะเวลาการพัฒนาของคัพภะปลิงดำระยะต่าง ๆ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ

ชุดการทดลอง	เวลา (ชั่วโมง)		
	Blastula	Gastrula	Auricularia
ไม่มีการกระตุ้น	-	-	-
ช็อคอุณหภูมิต่ำ	19.667±0.577^{bc}	29.333±0.577^{a}	45.667±0.577^{b}
ช็อคอุณหภูมิสูง	21.000±1.000^{ab}	30.333±1.528^{a}	46.333±1.155^{ab}
ผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ	18.667±0.577^{c}	26.667±0.577^{b}	48.000±0.000^{a}
ผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน	21.667±1.155^{a}	31.000±1.000^{a}	46.667±1.155^{ab}

หมายเหตุ: ค่าเฉลี่ยที่มีอักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กแตกต่างกันกำกับแสดงความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญในสดมภ์เดียวกัน

ตารางที่ 8 การพัฒนาของคัพภะปลิงดำระยะต่าง ๆ จากการกระตุ้นด้วยวิธีการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ

ระยะ	ช็อคอุณหภูมิต่ำ	ช็อคอุณหภูมิสูง	ผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ	ผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน
2-cell				
blastula				
gastrula				
auricularia				



ภาพที่ 12 การพัฒนาการของตัวอ่อนปลิงดำระยะต่าง ๆ

3. การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยอาศัยช่วงเวลาการได้รับแสง

สำหรับการทดลองกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ โดยอาศัยเทคนิคการปรับเปลี่ยนช่วงเวลาการได้รับแสงและไม่ได้รับแสงทั้ง 3 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 ไม่มีการกระตุ้น (ชุดควบคุม) โดยการให้แสงตามธรรมชาติ ชุดการทดลองที่ 2 กระตุ้นโดยให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง และชุดการทดลองที่ 3 กระตุ้นโดยให้แสง 6 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 6 ชั่วโมง พบว่าไม่มีผลกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของทั้งเพศผู้และเพศเมีย

วิจารณ์ผล

การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ ด้วยการปรับเปลี่ยนสภาพแวดล้อมบางประการ โดยสภาพแวดล้อมที่จำเป็นสำหรับการดำรงชีวิตที่ถูกนำมาใช้เป็นปัจจัยในการทดลองศึกษา คือ อุณหภูมิและช่วงเวลาการได้รับแสง ข้อมูลที่ทำการรวบรวม ได้แก่ ช่วงเวลาในการปล่อยไข่และอสุจิรวมถึงจำนวนที่ปล่อยออกมาต่อพ่อแม่พันธุ์ 1 ตัว การปฏิสนธิ การฟัก และพัฒนาการของคัพภะ จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่า การกระตุ้นโดยอาศัยเทคนิคการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิสามารถกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปลิงดำปล่อยเซลล์สืบพันธ์ออกมาได้ ในขณะที่ช่วงเวลาการได้รับแสงไม่สามารถกระตุ้นให้มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา ทั้งนี้อาจเนื่องจากช่วงเวลาได้รับแสงและไม่ได้รับแสงที่กำหนดในแผนการทดลองคือ ให้แสง 12 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 12 ชั่วโมง (12:12) และให้แสง 6 ชั่วโมง สลับกับการไม่ให้แสง 6 ชั่วโมง (6:6) เปรียบเทียบกับการไม่กระตุ้นหรือได้รับแสงตามธรรมชาติ อาจเป็นช่วงเวลาที่นานเกินไปส่งผลให้พ่อแม่พันธุ์ปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมดังกล่าว ซึ่ง Battaglene *et al*. (2002) รายงานไว้ว่าการวางไข่ของปลิงทะเลที่อาศัยในเขตร้อนและเขตอบอุ่น มักเกิดจากความเครียดเนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมในช่วงเวลาสั้น ๆ อย่างไรก็ตาม มีรายงานการศึกษาหลายฉบับกล่าวว่า สภาพแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดเนื่องจากความร้อนกับสัตว์ที่อาศัยในบริเวณดังกล่าว (Hofmann and Somero, 1995; Brian *et al*., 2001)

Mackey (2001) กล่าวว่าการสืบพันธุ์ของปลิงทะเลจะมีปัจจัยสภาพแวดล้อมต่าง ๆ มาเป็นตัวกำหนดช่วงเวลาทั้งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ โดยปัจจัยสภาพแวดล้อมที่มีผลควบคุมการสร้างและปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงทะเล holothurians ได้แก่ อุณหภูมิและการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ ความเข้มแสง ช่วงเวลาการได้รับแสง ความเค็ม ระดับน้ำขึ้นน้ำลง ความเหมาะสมของอาหาร และการเปลี่ยนแปลงประเภทอาหาร (Smiley *et al*., 1991) การกระตุ้นด้วยอุณหภูมิเป็นวิธีการที่ได้รับความนิยมนำมาใช้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด (Loosanoff and Davis, 1963) และยังเป็นวิธีการที่นิยมนำมาใช้กับปลิงทะเล (Smiley *et al*., 1991; Morgan, 2000) สำหรับในธรรมชาตินั้นปลิงทะเล holothurians จะมีช่วงที่สมบูรณ์เพศปีละ 2 ครั้ง (Conand, 1993) ซึ่ง Morgan (2000) กล่าวว่าในช่วงแรกของฤดูใบไม้ผลิจะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพิ่มขึ้นเนื่องจากความสมบูรณ์ของอาหารและอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้น และเมื่อตรวจสอบจากเอกสารหลายฉบับกล่าวถึงข้อมูลที่สอดคล้องกัน คืออุณหภูมิมีผลต่อความสมบูรณ์เพศและการสืบพันธุ์วางไข่ของปลิงทะเลหลายชนิด เช่น *Apostichopus japonicus* และยังเป็นปัจจัยสำคัญที่สุดที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและสรีรวิทยาของสัตว์น้ำที่เป็นกลุ่มของสัตว์เลือดเย็น (Dong *et al*., 2006)

จากผลการทดลองพบว่าการช๊อคด้วยอุณหภูมิสูงสามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำได้ แต่อสุจิและไข่ที่ได้มีจำนวนน้อยที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับวิธีอื่น นอกจากนี้ยังมีระยะเวลาในการปล่อยอสุจิและไข่นานที่สุด ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปลิงดำเป็นปลิงที่อาศัยในเขตร้อน และมีการวางไข่ในช่วงฤดูน้ำมีอุณหภูมิสูง ดังนั้นปลิงดำจึงน่าจะสามารถปรับตัวที่อุณหภูมิสูงกว่าปกติเพียงเล็กน้อยได้ ทำให้ไม่เกิดสภาวะเครียดจึงปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ช้า ซึ่งต่างกับในพื้นที่ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า

เช่น ญี่ปุ่นและจีนที่นิยมกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในปลิง *Apostichopus japonicas* ด้วยการช๊อคอุณหภูมิสูง (thermal shock) (Xilin, 2004; Eeckhaut *et al*., 2012)

จากผลการกระตุ้นในครั้งนี้จะเห็นได้ว่า เพศผู้จะมีการปล่อยอสุจิออกมาก่อนจากนั้นเพศเมียจึงปล่อยไข่ สอดคล้องกับรายงานของ James (2004) ที่ทำการกระตุ้นในปลิงขาว แต่จากการกระตุ้นในปลิงดำครั้งนี้มีการปล่อยไข่หลังจากปล่อยอสุจิอยู่ในช่วง 9-20 นาที ในขณะที่ตามรายงานของ James (2004) มีเวลาห่างกันประมาณ 1 ชั่วโมง และจากการกระตุ้นด้วยอุณหภูมิต่ำแม่พันธุ์สามารถปล่อยไข่ได้ในช่วง 900,000–1,000,000 ฟอง ซึ่งมีจำนวนมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับ Laxminarayana (2005) ที่รายงานไว้ 800,000 ฟอง จากการกระตุ้นด้วยวิธีการเดียวกัน แต่จากรายงานดังกล่าวพบว่ามีอัตราการฟักค่อนข้างสูงถึง 93.8 เปอร์เซ็นต์ และสูงกว่าการศึกษาในครั้งนี้ที่มีอัตราการฟักเฉลี่ยเพียง 50.794±15.492 เปอร์เซ็นต์

บทที่ 5
สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การศึกษาวิธีการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ (*Holothuria atra* Jaeger, 1833) โดยอาศัยการปรับเปลี่ยนสภาพแวดล้อมบางประการ สามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. การกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยอาศัยเทคนิคการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิและช่วงเวลาการได้รับแสง พบว่าการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิสามารถกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปลิงดำปล่อยไข่และอสุจิออกมาผสมกันได้ ส่วนช่วงเวลาการได้รับแสงไม่สามารถกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา

2. การกระตุ้นโดยอาศัยเทคนิคการปรับเปลี่ยนอุณหภูมิ 5 วิธี คือ ไม่มีการกระตุ้น (ชุดควบคุม) การช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำ การช็อคด้วยอุณหภูมิสูง การผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำ และการผึ่งแห้งสลับกับการให้น้ำไหลผ่าน พบว่าชุดควบคุมหรือการไม่กระตุ้นจะไม่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษา ส่วนอีก 4 วิธี มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

3. การช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำเป็นวิธีการที่สามารถกระตุ้นให้มีการปล่อยไข่และอสุจิจำนวนมากที่สุด ไข่ที่ได้มีอัตราการฟักสูงที่สุด (50.794±15.492 เปอร์เซ็นต์) และมีขนาดของคัพภะใหญ่ที่สุดทั้ง blastula, gastrula และ auricularia และมีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ auricularia หรือฟักออกเป็นตัวได้เร็วที่สุด (45.667±0.577 ชั่วโมง)

4. การผึ่งแห้งสลับกับการฉีดน้ำเป็นวิธีการที่สามารถกระตุ้นให้พ่อแม่พันธุ์ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้เร็วที่สุด ไข่ที่ได้สามารถพัฒนาเข้าสู่ระยะ blastula และและมีการปฏิสนธิได้เร็วที่สุด

5. เมื่อพิจารณาในภาพรวมประกอบกับผลจากการวิเคราะห์ทางสิติ พบว่าการช็อคด้วยอุณหภูมิต่ำเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุดในการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำ เนื่องจากให้เซลล์สืบพันธ์จำนวนมาก ไข่มีอัตราการฟักสูง ระยะเวลาการฟักสั้นและได้ตัวอ่อน auricularia ขนาดใหญ่

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการกระตุ้นโดยเทคนิคการได้รับแสง ไม่สามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปลิงดำได้ในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งอาจเกี่ยวเนื่องกับช่วงเวลาการได้รับแสงและไม่ได้รับแสงที่นานเกินไป ทำให้พ่อแม่พันธุ์สามารถปรับตัวต่อช่วงเวลาการได้รับและไม่ได้รับแสงดังกล่าว จึงอาจจำเป็นต้องลดช่วงเวลาให้สั้นลง เช่น 3:21, 6:18, 9:15 และ 12:12 เป็นต้น

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

คเชนทร เฉลิมวัฒน์. 2544. การเพาะเลี้ยงหอย. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี. 253 น.

จรัสศรี อ่างตันญา, สันติสุข ไทยปาล, วัชราภรณ์ ไตรพาณิชย์กุล, วัลลภา เกื้อด้วง, ศิรินทิพย์ สังข์จีน, ทัศนี จันทร์ดนตรี และ ไผทรัตน์ สิงห์ดำ. 2551. พิพิธภัณฑ์สัตว์และพืชทะเล สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน. เอกสารเผยแพร่ กลุ่มพิพิธภัณฑ์และสถานแสดงพันธุ์สัตว์และพืชทะเล ลำดับที่ 6. กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, กรุงเทพฯ.

จารุภัทร วงศ์จักร. 2550. การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการกินอาหารของปลิงทะเล. โครงการครุวิจัย-วิทยาศาสตร์ทางทะเล. 18 น.

ชรินทร์ แสงรุ่งเรือง. 2535. การศึกษาฤดูกาลสืบพันธุ์ของปลิงทะเลที่ใช้ปรับปรุงคุณภาพหน้าดินในบ่อกุ้งบริเวณอ่าวคุ้งกระเบน. เอกสารวิชาการ. กรมประมง. 12 น.

ธเนศ พุ่มทอง. 2551. การเพาะเลี้ยงปลิงทะเลในประเทศจีน. ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งเพชรบุรี.

นพดล ภูวพานิช. 2551. ปลิงทะเลสัตว์เศรษฐกิจจากท้องทะเลสู่การเพาะเลี้ยงที่ยั่งยืน. วารสารเม็ดทราย. 4(2): 8-9.

ปราณี วัฒนาวรสกุล. 2545. การตอบสนองทางสรีรวิทยาของปลิงทะเลต่อการเปลี่ยนแปลงความเค็มและองค์ประกอบตะกอน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2516. การศึกษาชนิดและคุณค่าของปลิงทะเลในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2523. ปลิงทะเลของไทย. วารสารประมง. 1(33): 25-32.

ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์. มปป. การเพาะพันธุ์ปลิงทะเลชนิด *Holuthuria atra* Jager, 1833. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 3 น.

สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน. 2549. คู่มือสัตว์ในแหล่งหญ้าทะเลฝั่งทะเลอันดามัน. กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, กรุงเทพฯ. 242 น.

สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน. 2551. เอกสารเผยแพร่ กลุ่มพิพิธภัณฑ์และสถานแสดงพันธุ์สัตว์และพืชทะเลทะเล. กรมประมง, กรุงเทพฯ. 63 น.

สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. 2547. รายงานผลการดำเนินโครงการบริหารจัดการทรัพยากรชายฝั่งและอุทยานทางทะเลในบริเวณอ่าวพังงา. แหล่งที่มา: http://www.pmbc.go.th/ReportAct/, 29 สิงหาคม 2551.

สุเมตต์ ปุจฉาการ, อารมณ์ มุจรินทร์ และ พิชัย สนแจ้ง. 2543. ปลิงทะเลอันดับ Aspidochirotida ที่อาศัยอยู่ในแนวปะการังหมู่เกาะล้านและหมู่เกาะไผ่ จังหวัดชลบุรี, น. 92-100. *ใน* การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 38. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

อารมณ์ มุจรินทร์. 2545. ปลิงทะเลบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.

Abdel-Razek, F.A., S.H. Abdel-Rahman, N.A. El-Shimy and H.A. Omar. 2005. Reproductive biology of the tropical sea cucumber *Holothuria atra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Red Sea coast of Egypt. Egyptian Journal of Aquatic Research. 31 (2): 383-402.

Alwi, W. 1995. Some Aspects of Biological Reproduction and Habitat Quality of Economic sand Fish (*Holothuria scabra*) Exploited in Lampung Bay. Skipsi Bogor Agricultural Instistute (IPB) Bogor. 58 p.

Babcock, R., C. Mundy, J. Keesing and J. Oliver. 1992. Predictable and unpredictable spawning events:*in situ* behavioural data from free-spawning coral reef invertebrates. Invertebrate Reproduction and Development. 22:213-228.

Baine, M. and P.S. Choo. 1999. Sea cucumber fishery and trade in Malaysia, p. 49-63. *In* M. Baine. ed. The Conservation of Sea Cucumbers in Malaysia: Their Ecology, Taxonomy and Trade: Proceedings of an International Conference, 25 February 1999, Department of Agriculture, Kuala Lumpur, Malaysia. Heriot-Watt University, Orkney, Scotland.

Bakus, G.J. 1973. The biology and ecology of tropical holothurians, p. 235-267. *In* O.A. Jones and R. Endean, eds. Biology and Geology of Coral Reef. Academic Press, New York.

Bandaranayake, V.M. and A. Des Rocher. 1999. Role of secondary metabolites and pigments in the epidermal tissues, ripe ovaries, viscera, gut contents and diet of the sea cucumber *Holothuria atra*. Marine Biology. 133: 163-169.

Basri, D.F. and K.A. Wahab. 2003. Fatty acid composition of five species of holothurians from tropical waters. Malaysian Journal of Science. 22 (2): 49-54.

Battaglen, S.C., J.E. Seymour and C. Ramofafia. 1999. Survival and growth of cultured juvenile sea cucumbers, *Holothuria scabra*. 178(Issues 3–4): 293–322.

Battaglene, S.C., J.E. Seymour, C. Ramofafia and I. Lane. 2002. Spawning induction of three tropical sea cucumbers, *Holothuria scabra*, *H. fuscogilva* and *Actinopyga mauritiana*. Aquaculture. 207: 29-47.

Bohadschia marmorata and *Holothuria atra* in Mauritius. SPC Beche-De -Mer Information Bulletin. 22: 48-51

Brian, S., Helmuth, T., Hofmann, G.E. 2001. Microhabitats, thermal heterogeneity, and patterns of physiological stress in the rocky intertidal zone. The Biological Bulletin. 201: 374–384.

Bruckner, A.W. 2006. The Proceedings of the Technical Workshop on the Conservation of Sea Sucumbers in the Families Holothuridae and Stichopodidae. NOAA Technical Memorandum. 44. 239 pp.

Chao, S.M., C.P. Chen and P.S. Alexander. 1994. Reproduction and growth of *Holothuria atra* (Echinodermata: Holothuroidea) at two contrasting sites in southern Taiwan. Marine Biology. 119: 565-570.

Clark, A. M. and F. W. E. Rowe. 1971. Monograph of Shallow-Water Indo-West Pacific Echinoderms. Trustees of the British Museum (Natural History), London.

Conand, C. 1990. The fishery resources of Pacific island countries. Part 2: Holothurians. *In* FAO Fisheries Technical Paper, No. 272(2). Rome.

Conand, C. 1993. Reproductive biology of the holothurians from the major communities of the New Caledonian Lagoon. Marine Biology. 116:439-450.

Conand, C. 2004. Present status of world sea cucumber resources and utilization: an international overview, p. 13-24. *In* A. Lovatelli, C. Conand, S. Purcell, S. Uthicke, J.F. Hamel and A. Mercier, eds. Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. FAO Fisheries Technical Paper 463. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Conand, C. 1998. Holothurians (Sea cucumber, Class Holothuroidea), p. 1158–1190. *In* Carpenter, K.E. and V.H. Niem, eds. FAO Species Identification Guide for Fishery Purposes: The Living Marine Resources of the Western Central Pacific, Volume 2 Cephalopods, Crustaceans, Holothurians and Sharks. FAO Fisheries Technical Paper 463. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Costelloe, J. 1985. The annual reproductive cycle of the Holothurians *Aslia lefevrei* (Dendrochirota: Echinodermata). Marine Biology. 88:155-165.

Dammantay,T.S.1931. Autotomy my in Holothurians. Nat.Appl. Sci. Bull. Univ. Phillip.,389-404.

Dong, Y.W., S.L. Dong, X.L. Tian, F. Wang and M.Z. Zhang. 2006. Effects of diel temperature fluctuations on growth, oxygen consumption and proximate body composition in the sea cucumber *Apostichopus japonicus* Selenka. Aquaculture. 255: 514–521.

Dowbin, W. H.,1949. Auto-evisceration and regeneration viscera in the Holothurian Stichopus mollis(Hutton). Trans. Roy. Soc. N.Z,77,497-523.

Eeckhaut, I., T. Lavitra, A. Leonet, M. Jangoux and R. Rasolofonirina. 2012. *In-vitro* fertilization: A simple, efficient method for obtaining sea cucumber larvae year round, p. 40–49. *In* C.A. Hair, T.D. Pickering and D.J. Mills, eds. Asia-

Pacific tropical sea cucumber aquaculture. Proceedings of an international symposium held in Noumea, New Caledonia, 15–17 February 2011. ACIAR Proceedings No. 136. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra.

Hamel J.F., R.Y. Hidalgo and A. Mercier. 2003. Larval development and juvenile growth of the Galapagos sea cucumber *Isostichopus fuscus*. SPC Beche-de-mer Information Bulletin. 18(3-8):3-5.

Hamel, J.F. and A. Mercier. 1995. Spawning of the sea cucumber *Cucumaria frondosa* in the St. Lawrence Estuary, eastern Canada. SPC Beche-de-mer Information Bulletin. 7:12-18.

Hamel, J.F. and A. Mercier. 1996. Evidence of chemical communication during the gametogenesis of holothuroids. Ecology. 77:1600-1616.

Harriott, V.J. 1985. Reproductive biology of three congeneric sea-cucumber species *Holothuria impatiens* and *Holothuria edulis* at Heron Reef, Great Barrier Reef. Austraian Journal of Marine and Freshwater Research. 36: 52-57.

Hofmann, G.E. and G.N. Somero. 1995. Evidence for protein damage at environmental temperatures: seasonal changes in levels of ubiquitin conjugates and Hsp70 in the intertidal mussel *Mytilus trossulus*. The Journal of Experimental Biology. 198: 1509–1518.

Hung, N.Q. 2008. Sea cucumber fisheries, utilization and trade in Vietnam, pp. 113-125. *In* Report of the Regional Study on Sea Cucumber Fisheries, Utilization and Trade in Southeast Asia 2007-2008. The Secretariat Southeast Asian Fisheries Development center, Philippines.

James, D.B. 1965. *Phyllophorus (Phyllophorella) parvipedes* Clark (Holothuroidea) a new record to the Indian seas. Journal Marine Biological Associative of Indea. 7(2): 325–327.

James, D.B. 2001. Twenty sea cucumbers from seas around India. Naga. 24 (1-2): 4-8.

James, D.B. 2004. Captive breeding of the sea cucumber, *Holothuria scabra*, from India, p. 385-395. *In* A. Lovatelli, C. Conand, S. Percell, S. Uthike, J.F. Mamel and A. Mercier, eds. Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management Session III Aquaculture Advances. FAO Fisheries Technical Paper 463. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

James, D.B., M.E. Rajapandian, C.P. Gopinathan, B.K. Baskar. 1994. Breakthrough in induced breeding and rearing of the larvae and juveniles of *Holothuria (Metriatyla) scabra* Jaeger at Tuticorin. CMFRI Bulletin. 46: 66– 70.

Jaxin, C. 2003. Overview of sea cucumber farming and sea ranching practices in China, pp. 613-750. *In* Reproduction of Marine Invertebrates Vol. VI: Echinoderms and Lophophorates. The Boxwood Press, Pacific Grove, CA**.**

Kanjana-vanit, D. 1978. Stududies on the distribution and abundance of Hothurians at Pan Wa Beach, Phukeket, Thailand. Phuket Marine Biological Center.

Kubota, T. and M. Tomari. 1998. Reproduction in the apodid sea cucumber *Polycheira rufescens*: semilunar spawning rhythm and sex change. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom. 78:249-267.

Laxminarayana, A. 2005. Induced spawning and larval rearing of the sea cucumbers,

Liao, Y.L. 1997. Fauna Sinica, Phylum Echinodermata, Class Holothuroidea. Science Press, Beijing. 334 p.

Liu, X., B. Gu and X. Zhang. 2002. Analyses and countermeasures on common problems occurring in hatcheries of sea cucumber. Modern Fisheries Message. 26-27.

Liu,X,. G, Zhu,. Q ,Zhao.,L,Wang and B, Gu,. 2004. Studies on hatchery techniques of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus,* pp. 287-295. *In* A. Lovatelli, C. Conand, S. Percell, S. Uthike, J.F. Mamel and A. Mercier, eds. Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management Session III Aquaculture Advances. FAO Fisheries Technical Paper 463. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Loosanoff, V.L. and H.C. Davis. 1963. Rearing bivalve molluscs. Advance of Marine Biology. 1: 1–36.

Mackey, A. 2001. Factors that Influence the reproduction of sea cucumbers, pp. 95-115. *In* http://www.sdsu.cdu.

McEuen, F. S. 1988. Spawning behaviors of northeast Pacific sea cucumbers (Holothuroidea: Echinodermata). Marine Biology. 98: 565-585.

Mohamed A. Zaki. 2005. Effects of the crude toxin of sea cucumbers *Holotthuria atra* on some hematological and biochemical parameters in rats. Egyptian Journal of Natural Toxins. 2(71-86):71-72.

Morgan, A. D. 2000. Induction of spawning in the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea). Journal of the World Aquaculture Society. 31: 186-194.

Munprasit, R. 2008. Sea Cucumber Fisheries, Utilization and Trade in Thailand, pp. 95-112. *In* Report of the Regional Study on Sea Cucumber Fisheries, Utilization and Trade in Southeast Asia 2007-2008. The Secretariat Southeast Asian Fisheries Development center, Philippines.

Purcell, S.W., Y. Samyn and C. Conand. 2012. Commercially Important Sea Cucumbers of the World. FAO Species Catalogue for Fishery Purposes No. 6. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Putchagarn, S and P. Sonchaeng. 2004. Echinoderm fauna of Thailand: history and inventory review. Science Asia. 30: 417-428.

Ramofafia C., M. Gervis and J. Bell. 1995. Spawning and early larval rearing of *Holothuria atra*, SPC Beche-de-mer Information Bulletin #7. ICLARM Coastal Aquaculture Centre P.O. Box 438, Honiara, Solomon Islands.

Ramofafia, C., M. Byrne and S.C. Battaglena. 2005. Development of commercial sea cucumbers, *Holothuria scraba, H. fascogilva* and *Actinopyga mauritiana*: larval structure and growth. Marine and Fresh Water Research. 54(5): 657-667.

Ramofafia, C., S.C. Battaglene, J.D. Bell and M. Byrne. 2000. Reproductive biology of the commercial sea cucumber *Holothuria fuscogilva* in the Soloman Islands. Marine Biology. 136: 1045-1054.

Renbo, W. and C. Yuan. 2004. Breeding and culture of the sea cucumber, *Apostichopus japonicus,* Liao, p. 277-286. *In* A. Lovatelli, C. Conand, S. Purcell, S. Uthicke, J.F. Hamel and A. Mercier, eds. Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. FAO Fisheries Technical Paper 463. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Rowe, F.W.E. and J. Gates. 1995. Echinodermata, p. 1–510. *In* Wells, A. eds. Zoological Catalogue of Australia, vol. 33: i–xiii. CSIRO Australia, Melbourne.

Smiley S, F-S. McEuen, C. Chaffee, S. Krishan. 1991. Echinodermata: Holothuroidea, pp 663-750. *In* A.C. Giese, J.S. Pearse, V.B. Pearse, eds. Reproduction of marine invertebrates Vol. VI: Echinoderms and Lophophorates. The Boxwood Press, Pacific Grove, CA.

Tanaka, Y. 1958. Seasonal changes occurring in the gonad of *Stichopus japonicus*. Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University. 9:29-36.

Wiadnyana, N. 2008. Sea cucumber fisheries, utilization and trade in Indonesia, pp. 30-37. *In* Report of the Regional Study on Sea Cucumber Fisheries, Utilization and Trade in Southeast Asia 2007-2008. The Secretariat Southeast Asian Fisheries Development center, Philippines.

Xin, C.J. 1990. Brief Introduction to Mariculture of Five Selected Species in China. UNDP/FAO Seafarming Development and Demonstration Project, National Inland Fisheries Inst., Bangkok (Thailand). 39 p.

Xiyin, L., Z. Guanghui, Z. Qiang, W. Liang and G. Benxue. 2004. Studies on hatchery techniques of the sea cucumber, *Apostichopus japonicas*, p. 287-296 Session III

- Aquaculture advances. *In* Advances in Sea Cucumber Aquaculture and Management. FAO Fisheries Technical Paper 463. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Yellow Sea Fisheries Research Institute in Qingdao. 1991. Training manual on Breeding and Culture of Scallop and Sea Cucumber in China. Training Manual 9. Regional Seafarming Development and Demonstration Project (RAS/90/002). 55 p.