BRT T-347008

ชีววิทยาของเพรียงหัวหอม *Eoteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 เพื่อการเพาะเลี้ยง

นายปิยะ โกษสิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2908-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

T_34 7008

436/49

RECEIVED
BY 18/5/49
DATE

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
c/o ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
73/1 ถนนพระรามที่ 6 เขตราชเทวี
กรุงเทพฯ 10400

ชีววิทยาของเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 เพื่อการเพาะเลี้ยง

นายปิยะ โกยสิน

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-53-2908-8

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOLOGY OF TUNICATE *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 FOR AQUACULTURE

Mr. Piya Koeysin

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Marine Science

Department of Marine Science

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-53-2908-8

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ชีววิทยาของเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 เพื่อการเพาะเลี้ยง
โดย	นายปิยะ โกยสิน
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชนา ชวนิชย์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร.วรณพ วิยกาญจน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เจริญ นิติธรรมยง)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชนา ชวนิชย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

(อาจารย์ ดร.วรณพ วิยกาญจน์)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล)

นายปิยะ โกยสิน : ชีววิทยาของเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 เพื่อการเพาะเลี้ยง. (BIOLOGY OF TUNICATE *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 FOR AQUACULTURE) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุชนา ชวนิชย์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : อ.ดร.วรณพ วิยกาญจน์, 82 หน้า. ISBN 974-53-2908-8.

ทำการศึกษาชีววิทยาเพื่อการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 ซึ่งพบบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน จังหวัดภูเก็ต เพรียงหัวหอมชนิดนี้ให้สารกลุ่ม Ecteinascidins ซึ่งมีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาบำบัดมะเร็ง จากการศึกษาพบว่า พัฒนาการหลังการลงเกาะของตัวอ่อน (Tadpole) *E. thurstoni* สามารถพัฒนาเข้าสู่ตัวอ่อนระยะวัยรุ่น (Juvenile) ภายใน 24 ชั่วโมง ทั้งนี้ ตัวอ่อนที่ผ่านการกระตุ้นด้วยน้ำจืดมีพฤติกรรมตอบสนองต่อการลงเกาะบนพื้นผิวในส่วนที่มืดและสว่างไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการกระตุ้นมีการลงเกาะบนพื้นผิวในส่วนมืดมากกว่าสว่างแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) อย่างไรก็ตาม ไม่พบปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวอ่อนที่ผ่านการกระตุ้นและไม่ผ่านการกระตุ้นในการลงเกาะบนพื้นผิวทั้งสอง การเลี้ยงตัวอ่อนในระบบเลี้ยงในห้องปฏิบัติการพบว่า ตัวอ่อนสามารถเจริญเติบโตได้จนถึงอายุ 14 วัน ซึ่งมีขนาดความยาวสูงสุดโดยเฉลี่ย 0.27 ± 0.02 เซนติเมตร แตกต่างจากการเลี้ยงในทะเลที่สามารถเติบโตได้จนถึง 36 วัน ขนาดความยาวสูงสุดโดยเฉลี่ย 0.82 ± 0.06 เซนติเมตร ทั้งนี้ *E. thurstoni* ที่เลี้ยงในทะเลสามารถเพิ่มจำนวนโดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้ภายหลังการลงเกาะ 20 วัน อย่างไรก็ตาม ช่วงชีวิตของ *E. thurstoni* ภายหลังการลงเกาะที่ได้จากการนำโคโลนีธรรมชาติมาทำการเลี้ยงในระบบเลี้ยงบนบกและเปรียบเทียบกับการเลี้ยงตามธรรมชาติในทะเล พบว่า *E. thurstoni* มีอายุโดยเฉลี่ย 26 วัน และ 61 วัน ตามลำดับ พบแพลงก์ตอนพืช 5 ชนิด ได้แก่ *Gyrosigma* sp., *Pleurosigma* sp., *Thalassionema* sp., *Guinardia* sp. และ *Chaetoceros* sp. เป็นองค์ประกอบของอาหารของเพรียงหัวหอม แต่ไม่พบความแตกต่างของสารอินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารเมื่อเปรียบเทียบกับสารอินทรีย์ที่แขวนลอยในมวลน้ำบริเวณแหล่งที่อยู่อาศัยจากการวิเคราะห์อัตราส่วนของคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน

ภาควิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์ทางทะเล	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา	2548	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4572384423 : MAJOR MARINE SCIENCE

KEY WORD : *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 / TUNICATE / AQUACULTURE

PIYA KOEYSIN: BIOLOGY OF TUNICATE *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 FOR AQUACULTURE. THESIS ADVISOR: ASST. PROF. SUCHANA CHAVANICH, Ph.D. THESIS COADVISOR: VORANOP VIYAKARN, Ph.D. 82 pp. ISBN 974-53-2908-8.

The biology of the colonial tunicate *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 found in the Andaman Sea, Phuket Province, Thailand was investigated for culture purpose. This tunicate produces Ecteinascidins, which can be a potential drug for cancer treatment. The development of *E. thurstoni* showed that tadpole larvae developed and metamorphosed into the juvenile stage within 24 hours. The tadpole larvae, which were stimulated for settling with freshwater showed no difference of settlement on dark and light areas ($P>0.05$) while those non-stimulated tadpoles, showed statistically difference ($P<0.05$). However, there was no difference on the interaction between stimulated and non-stimulated tadpole larvae on dark and light areas of settlement ($P>0.05$). For rearing experiment, the tadpole larvae could be raised 14 days in the land-based rearing tank with an average size of 0.27 ± 0.02 cm. However, tadpole larvae in the sea could be raised for 36 days with an average size of 0.82 ± 0.06 cm, with an asexual reproduction took place after 20 days of the settlement. The life span after settlement of *E. thurstoni* raised in the rearing tank and in the sea was 26 and 61 days, respectively. In addition, stomach content analysis showed that five genera of phytoplankton were found. These included *Gyrosigma* sp., *Pleurosigma* sp., *Thalassionema* sp., *Guinardia* sp., and *Chaetoceros* sp. However, there was no difference of organic contents found in the stomach compared to suspension organic particles in the sea, using CHN ratio method.

Department	Marine Science	Student's signature.....
Field of study	Marine Science	Advisor's signature.....
Academic year	2005	Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณอย่างสูงสำหรับผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุชนา ชวนิชย์ อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ดร.วรณพ วิยกาญจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ศาสตราจารย์ ดร.เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต และรองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล กรรมการวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร. คณิต สุวรรณบริรักษ์ สำหรับคำปรึกษาและความอนุเคราะห์ที่สำคัญยิ่ง

ขอขอบคุณ คุณสมบัติ ภู่วชิรานนท์ Prof. Dr. Akinori Kubo, Prof. Dr. Naoki Saito, Prof. Dr. Teruaki Nishikawa และ Prof. Dr. Yasunori Saito สำหรับความช่วยเหลือทางวิชาการที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่อวิทยานิพนธ์นี้

กระผมใคร่ออกนามบุคคลดังต่อไปนี้เพื่อแสดงความขอบพระคุณอย่างสูง คุณปวีณ ลิมปสายชล ผู้เชี่ยวชาญกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง อาจารย์อุดมศักดิ์ ดรุมาศ คุณสุพรรณิกา โพธิเทพ คุณไผทรัตน์ สิงห์ดำ รวมถึงเจ้าหน้าที่ทุกท่านของสถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน จังหวัดภูเก็ต ในความอนุเคราะห์ทุกประการที่ได้รับ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และเพื่อนนิสิตภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือตลอดการทำวิทยานิพนธ์นี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย จัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยและศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_347008 และได้รับการสนับสนุนจากทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2547

นอกจากนั้น จากการที่งานวิจัยในครั้งนี้ได้ดำเนินการวิจัยในพื้นที่ชายฝั่งทะเล สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน จังหวัดภูเก็ต ซึ่งได้รับผลกระทบจากธรณีภิบัติคลื่นยักษ์สึนามิ 26 ธันวาคม 2547 ก่อให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรง กระผมขอแสดงความเสียใจอย่างสุดซึ้งต่อความเสียหายที่เกิดขึ้น ทั้งชีวิตและทรัพย์สินของผู้สูญเสียทุกท่าน

ท้ายที่สุด กระผมขอแสดงความเคารพรักต่อบิดา มารดา อันเป็นที่รักยิ่งของกระผม รวมทั้งสมาชิกทุกคนในครอบครัว

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ซ

สารบัญรูป..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 3

3 วิธีดำเนินการวิจัย

1 สัตว์ทดลอง สถานที่วิจัย และระบบการเลี้ยง..... 11

2 ขั้นตอนการวิจัย รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล..... 13

4 ผลการศึกษา

1 การศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน..... 18

2 การศึกษาพฤติกรรมการลงเกาะของตัวอ่อน..... 30

3 การเติบโตของตัวอ่อนในระบบเลี้ยงบนบกและในทะเล..... 31

4 การศึกษาช่วงชีวิตหลังการลงเกาะ..... 33

5 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหารและองค์ประกอบชนิดของแพลงก์ตอนพืชบริเวณแหล่งธรรมชาติ..... 35

5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ..... 39

รายการอ้างอิง..... 45

ภาคผนวก..... 48

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 82

สารบัญรูป

		หน้า
รูปที่ 1	ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของตัวอ่อนเพรียงหัวหอมระยะว่ายน้ำอิสระ (Tadpole larva).....	4
รูปที่ 2	ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของตัวเพรียงหัวหอม.....	4
รูปที่ 3	แบบจำลองชุดทดลองเลี้ยงของโคโลนีเพรียงหัวหอม *E. turbinata* แบบ In vitro culture.....	9
รูปที่ 4	เพรียงหัวหอม *E. thurstoni*	11
รูปที่ 5	สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน จังหวัดภูเก็ต.....	12
รูปที่ 6	ระบบเลี้ยงที่ใช้ระบบน้ำหมุนเวียนแบบเปิด (ขนาดถังเลี้ยง กว้าง 0.8 เมตร ยาว 3 เมตรสูง 0.8 เมตร).....	12
รูปที่ 7	Petridish ใช้ทดลองการลงเกาะของตัวอ่อน *E. thurstoni* โดยแบ่งพื้นที่เป็นส่วนมืดและส่วนสว่างเท่ากัน.....	14
รูปที่ 8	การศึกษาพฤติกรรมการลงเกาะของตัวอ่อน *E. thurstoni*	14
รูปที่ 9	การศึกษาการเติบโตของตัวอ่อน *E. thurstoni*	15
รูปที่ 10	การศึกษาช่วงชีวิตหลังการลงเกาะของ *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง.....	16
รูปที่ 11	การศึกษาช่วงชีวิตหลังการลงเกาะของ *E. thurstoni* ในทะเล.....	16
รูปที่ 12	ระยะว่ายน้ำอิสระของ *E. thurstoni* (Tadpole larva stage).....	22
รูปที่ 13	ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 5 นาที หลังการลงเกาะ.....	22
รูปที่ 14	ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 10 นาที หลังการลงเกาะ.....	23
รูปที่ 15	ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 15 นาที หลังการลงเกาะ.....	23
รูปที่ 16	ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 30 นาที หลังการลงเกาะ.....	24
รูปที่ 17	ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 3 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ.....	24
รูปที่ 18	ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 6 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ.....	25
รูปที่ 19	ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 9 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ.....	25
รูปที่ 20	ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 12 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ.....	26
รูปที่ 21	ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 15 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ.....	26
รูปที่ 22	ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 18 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ.....	27
รูปที่ 23	ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 21 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ.....	27

หน้า

รูปที่ 24 ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 24 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ..... 28

รูปที่ 25 ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 27 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ..... 28

รูปที่ 26 ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 33 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ..... 29

รูปที่ 27 ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 72 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ..... 29

รูปที่ 28 การเปลี่ยนแปลงจำนวนและขนาดของตัวอ่อน *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง..... 31

รูปที่ 29 การเปลี่ยนแปลงจำนวนและขนาดของตัวอ่อน *E. thurstoni* ในทะเล..... 32

รูปที่ 30 ตัวอ่อน *E. thurstoni* จากการเลี้ยงในทะเล..... 32

รูปที่ 31 การเปลี่ยนแปลงพื้นที่ปกคลุมของตัว *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง ตั้งแต่วันที่ 18 ธันวาคม พ.ศ. 2547 ถึงวันที่ 4 เมษายน พ.ศ. 2548..... 33

รูปที่ 32 การเปลี่ยนแปลงพื้นที่ปกคลุมของตัว *E. thurstoni* ในทะเล ตั้งแต่วันที่ 9 มิถุนายน พ.ศ. 2548 ถึงวันที่ 17 สิงหาคม พ.ศ. 2548..... 34

รูปที่ 33 แพลงก์ตอนพืชที่พบในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในธรรมชาติ..... 37

รูปที่ 34 อนุภาคอินทรีย์ขนาดเล็กที่พบในทางเดินอาหารของ *E. thurstoni* ในธรรมชาติ..... 37

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 อักษรย่อ ชื่อภาษาอังกฤษ และชื่อภาษาไทยในอวัยวะต่างๆ ที่ใช้ในพัฒนาการตัวอ่อน..... 21

ตารางที่ 2 อัตราการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* 30

ตารางที่ 3 ชนิดแพลงก์ตอนพืชที่พบ..... 35

ตารางที่ 4 อัตราส่วนคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ของอาหารในทางเดินอาหารของ *E. thurstoni* ในธรรมชาติ..... 38

ตารางที่ 5 อัตราส่วนคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ของสารอินทรีย์แขวนลอยในทะเลบริเวณแหล่งที่อยู่ธรรมชาติของ *E. thurstoni*..... 38

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ทะเลเป็นระบบนิเวศขนาดใหญ่ ประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด มนุษย์ได้รู้จักนำทรัพยากรธรรมชาติเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่อดีตจนปัจจุบัน และมีการวิจัยในหลายสาขาเกี่ยวกับทะเลเพื่อให้ได้ผลการวิจัยที่เป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ ดังนั้นทรัพยากรธรรมชาติทางทะเลจึงมีความสำคัญต่อมนุษย์ในหลายด้าน อาทิ แหล่งอาหาร แหล่งท่องเที่ยว โดยเฉพาะในปัจจุบันที่เป็นแหล่งยาที่มีความสำคัญต่อไปในอนาคต

ยารักษาโรคที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้มาจากการค้นพบและพัฒนาจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ โดยแรกเริ่มได้จากสมุนไพรบนบกเป็นส่วนใหญ่และในทะเลเป็นส่วนน้อย อย่างไรก็ตาม หากเปรียบเทียบสัดส่วนพื้นที่ระหว่างบกกับทะเลแล้ว พื้นที่บนบกมีเพียงร้อยละ 30 ของพื้นที่ผิวโลก ในขณะที่ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 70 เป็นทะเลหรือมหาสมุทร จึงส่งผลต่อจำนวน ชนิด และความหลากหลายที่มากกว่าของสิ่งมีชีวิต จากเหตุผลดังกล่าว นักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มให้ความสนใจในการแสวงหายาบำบัดโรคจากสิ่งมีชีวิตในทะเล โดยเฉพาะกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เนื่องจากเป็นสัตว์กลุ่มใหญ่ที่สุดในทะเล หรือประมาณร้อยละ 95 ของสัตว์ทะเลทั้งหมด ได้แก่ ฟองน้ำทะเล (Sponges), ซีเลนเทอเรท (Coelenterates), เอ็คไคโนเดิร์ม (Echinoderms), ไบรโอซัว (Bryozoans) และ เพรียงหัวหอม (Tunicates, Ascidians และ Sea squirt) ปัจจุบันพบว่า สัตว์ทะเลเหล่านี้สามารถสร้างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (Marine natural products) ที่มีโครงสร้างทางเคมีชนิดใหม่ที่ไม่มีการค้นพบมาก่อน สารเคมีเหล่านี้หลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความน่าสนใจในการนำไปพัฒนาเป็นยาบำบัดโรคชนิดใหม่โดยตรง หรือสามารถนำไปใช้เป็นสารต้นแบบ (Lead compounds หรือ Prototypes) ในการพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ได้

ในประเทศไทย พบเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 บริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน จังหวัดภูเก็ต เพรียงหัวหอมชนิดนี้ให้สาร Ecteinascidins (Et) 770 และ 786 ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่ใกล้เคียงกับสาร Et 743 ที่ปัจจุบันมีการพัฒนาเป็นยาบำบัดมะเร็งได้สำเร็จและได้ทดลองใช้กับผู้ป่วยในโรงพยาบาล ทำให้สาร Et 770 และ 786 มีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นยาบำบัดมะเร็งต่อไป อย่างไรก็ตาม การพัฒนาสารดังกล่าวให้เป็นยาบำบัดมะเร็งได้สำเร็จนั้น มีความจำเป็นต้องใช้สารที่จะนำไปใช้เป็นยาในปริมาณมาก การผลิตสารในเชิงอุตสาหกรรมให้ได้ปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นการนำสารดังกล่าวจากธรรมชาติเพียงอย่างเดียวมาใช้จึงเป็นไปได้ยาก อนึ่ง ถึงแม้ว่าการ

สังเคราะห์สารทางเคมีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถกระทำได้ แต่โครงสร้างที่ซับซ้อนของสารดังกล่าวทำให้ยากต่อการสังเคราะห์และมีต้นทุนสูงในการผลิต การวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเชิงอุตสาหกรรมของ *E. thurstoni* จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้น การศึกษาด้านชีววิทยาของ *E. thurstoni* เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานจึงมีความสำคัญในการนำไปสู่ความสำเร็จด้านการเพาะเลี้ยงเชิงอุตสาหกรรมให้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญและเพียงพอต่อการพัฒนาและผลิตยาบำบัดมะเร็งต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้มีขึ้นเพื่อศึกษา

1. พัฒนาการของตัวอ่อนเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*
2. พฤติกรรมการลงเกาะของตัวอ่อนเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*
3. การเติบโตของตัวอ่อนเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล
4. ช่วงชีวิตหลังการลงเกาะของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล
5. องค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni*

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ตั้งแต่ตัวอ่อนระยะว่ายน้ำอิสระถึงระยะตัวอ่อนวัยรุ่น โดยรวบรวมตัวอ่อนจากพ่อแม่พันธุ์ในธรรมชาติ และทำการเลี้ยงที่ระบบเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล เพื่อศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน เปรียบเทียบพฤติกรรมการลงเกาะ การเติบโต ช่วงชีวิตหลังการลงเกาะ ตลอดจนองค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหาร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถนำความรู้ที่ได้ไปใช้ในการเพาะเลี้ยงเชิงอุตสาหกรรม เพื่อเป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญและเพียงพอต่อการผลิตยาบำบัดมะเร็งต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

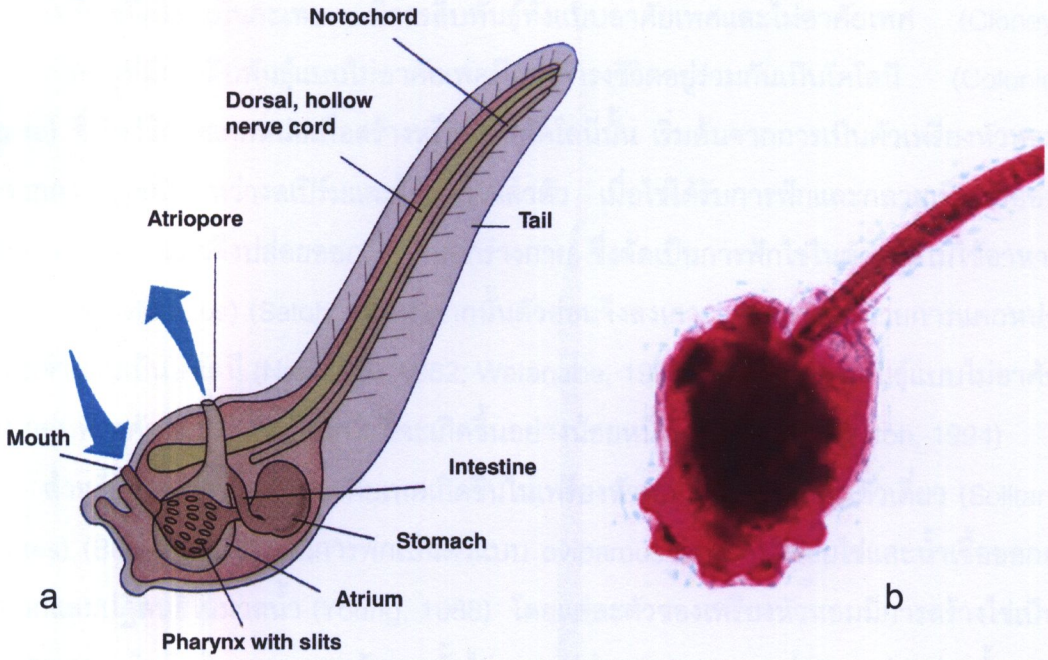
ชีววิทยาเพรียงหัวหอม

เพรียงหัวหอม (Tunicates, Ascidians และ Sea squirts) เป็นสัตว์ทะเลที่จัดอยู่ใน Phylum Chordata, Subphylum Urochordata ประกอบด้วย 3 class ได้แก่ Ascidiacea, Thaliacea และ Larvacea ทั้งนี้เพรียงหัวหอมจัดอยู่ใน Class Ascidiacea มีจำนวนสมาชิกมากที่สุดถึง 1,300 ชนิด จากทั้งหมด 2,300 ชนิด (Ruppert and Barnes, 1991) สมาชิกใน Class Thaliacea และ Class Larvacea มีการดำรงชีพเป็นแพลงก์ตอนสัตว์ตลอดชีวิต (Holoplankton)

เพรียงหัวหอมส่วนใหญ่เป็นสัตว์ที่ไม่เคลื่อนที่ พบในเขตน้ำตื้น ลำตัวห่อหุ้มด้วยเปลือกที่เรียกว่า tunic หรือ test ซึ่งเป็นสารแมทริกซ์ (matrix) ที่ประกอบด้วยโปรตีนและโพลีแซคคาไรด์ บางครั้งปรากฏเซลล์เม็ดเลือดที่ยังไม่ชัดเจนในชนิดของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของ tunic ในส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อระหว่าง tunic และผนังลำตัว ซึ่ง tunic นี้เป็นที่มาของชื่อ tunicate

เพรียงหัวหอมมีวิวัฒนาการสูง บางช่วงของวงจรชีวิตพบ notochord ซึ่งพบในระยะตัวอ่อนที่ว่ายน้ำอิสระ (Tadpole larva) เท่านั้น แต่ไม่พบในตัวเต็มวัย (Sherrard, 2005) โดยประกอบด้วยเซลล์ขนาดใหญ่ประมาณ 40 เซลล์ (Berrill, 1964) ตั้งแต่ส่วนที่ติดกับลำตัวจนถึงปลายสุดของหาง บริเวณด้านข้างของหางแต่ละด้านมีเส้นกล้ามเนื้อลาย (Striated muscle fibers) ห่อหุ้ม และมีแกนประสาท (Nerve cord) ทอดยาวไปในโพรงของส่วนหาง (Dorsal hollow nerve cord) ซึ่งเป็นลักษณะที่สามารถเทียบเคียงได้กับสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นทั่วไป และส่วนนี้จะพัฒนาเป็นปมประสาท (Nerve ganglion) ซึ่งเป็นสมองภายในลำตัวของตัวอ่อน นอกจากนี้ในส่วนหัวของตัวอ่อนประกอบด้วยอวัยวะตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วง (Statocyst) และจุดรับแสง (Ocellus) (Thorson, 1964) (รูปที่ 1) โดยตั้งอยู่อยู่ระหว่างช่องน้ำเข้า (In-current ventral brachial siphon) และช่องน้ำออก (Out-current dorsal atrial siphon) ซึ่งเป็นช่องเปิดสองช่องที่ส่วนบนสุดของลำตัว

ลำตัวของเพรียงหัวหอมสามารถแบ่งออกเป็นสามส่วน ได้แก่ ส่วนที่เป็นอก (Thorax) กับที่อยู่เหนืออก ส่วนที่เป็นระบบทางเดินอาหารและอวัยวะภายในในส่วนท้อง (Abdomen) และส่วนที่เป็นส่วนของหัวใจและระบบสืบพันธุ์ที่เรียกว่า postabdomen (Monniot *et al.*, 1991) ทั้งนี้อาหารและสารอินทรีย์จะถูกนำเข้าไปภายในลำตัว (Branchial cavity หรือ atrium) โดยนำน้ำทะเลเข้าทางช่องน้ำเข้า หลังจากนั้นจึงถูกกรองโดย branchial basket และผ่านไปยังกระเพาะอาหาร ลำไส้ จนสุดท้ายถูกขับถ่ายออกทางช่องน้ำออก (Campbell, 1999) (รูปที่ 2)

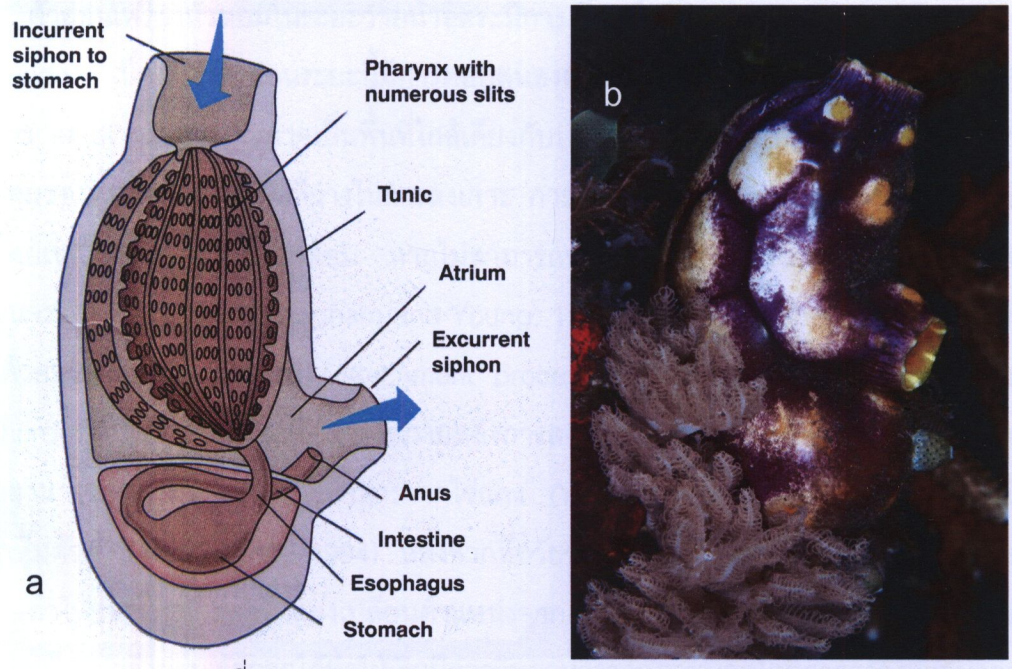


(ที่มา: Campbell *et al.*, 1999)

รูปที่ 1. ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของตัวอ่อนเพรียงหัวหอมระยะว่ายน้ำอิสระ (Tadpole larva)

a) โครงสร้างทั่วไปของตัวอ่อนเพรียงหัวหอม.

b) ตัวอ่อนเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 ย้อมด้วยสี rose bengal.



(ที่มา: Campbell *et al.*, 1999)

รูปที่ 2. ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของตัวเพรียงหัวหอม

a) โครงสร้างทั่วไปของตัวเพรียงหัวหอม.

b) เพรียงหัวหอม *Polycarpa aurata* (Quoy and Gaimard, 1834).

เพรียงหัวหอมเป็นกะเทย มีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศ (Cloney, 1990) กลุ่มที่มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศมีการดำรงชีวิตอยู่ร่วมกันเป็นโคโลนี (Colonial tunicate) ซึ่งใช้วิธีการแตกหน่อเพื่อสร้างหรือขยายโคโลนีนั้น เริ่มต้นจากการเป็นตัวเพรียงหัวหอมที่มาจากการปฏิสนธิระหว่างสเปิร์มและไข่ภายในลำตัว เมื่อไข่ได้รับการฟักและกลายเป็นตัวอ่อน (Tadpole larva) แล้วจึงปล่อยออกสู่ภายนอกร่างกาย ซึ่งจัดเป็นการฟักไข่ในตัว แต่ไม่ใช้อาหารจากแม่ (Ovoviviparous) (Satoh, 1994) จากนั้นตัวอ่อนจึงลงเกาะแล้วดำรงชีพด้วยการแตกหน่อเพื่อเพิ่มจำนวนเป็นโคโลนี (Nakauchi, 1982; Watanabe, 1988) ทั้งนี้ การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศในกลุ่มที่อาศัยอยู่ร่วมกันเป็นโคโลนีจะเกิดขึ้นอย่างน้อยหนึ่งครั้งในวงชีวิต (Satoh, 1994)

สำหรับการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเกิดขึ้นในเพรียงหัวหอมที่ดำรงชีพเป็นตัวเดี่ยว (Solitary tunicates) (Berrill, 1975) เป็นการฟักเป็นตัวแบบ oviparous โดยการปล่อยไข่และน้ำเชื้อออกสู่ภายนอกและปฏิสนธิในมวลน้ำ (Young, 1988) โดยแต่ละตัวของเพรียงหัวหอมมีการสร้างไข่เป็นจำนวนมากภายในลำตัว หลังจากนั้นไข่จะถูกปล่อยออกภายนอกร่างกายผ่านช่องน้ำออก แล้วสเปิร์มจึงถูกปล่อยออกมาในเวลาใกล้เคียงกันจากเพรียงหัวหอมตัวเดียวกัน ตัวอ่อนที่อยู่ในระยะว่ายน้ำอิสระหลังการปฏิสนธิในมวลน้ำจะทำการลงเกาะและเริ่มมีพัฒนาการในส่วนต่างๆ ภายในเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง ซึ่งต่างจากตัวอ่อนของพวกสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (Amphibian) ที่ใช้เวลานานในการพัฒนาส่วนต่างๆ ในระยะเดียวกัน (Satoh, 1994)

ตัวอ่อนเพรียงหัวหอมในระยะว่ายน้ำอิสระมีการเลือกพื้นที่ในการลงเกาะ โดยทำการเลือกพื้นที่อับแสง เนื่องจากตัวอ่อนระยะนี้มีการตอบสนองต่อแสงและแรงโน้มถ่วง (Lee, 1984; Forward *et al*., 2000) ซึ่งอาจเป็นพื้นที่ใกล้เคียงกับบริเวณพ่อแม่อาศัยอยู่เดิม ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของพื้นที่นั้น เช่น พื้นที่ว่างในการลงเกาะ การแย่งชิงพื้นที่ลงเกาะระหว่างสิ่งมีชีวิต เป็นต้น โดยเฉพาะปัจจัยสภาพแวดล้อม หากไม่สามารถหาพื้นที่เหมาะสมในการลงเกาะได้ตัวอ่อนเหล่านั้นจะตายอย่างรวดเร็ว (Bingham and Young, 1991) หลังจากนั้น ตัวอ่อนยึดตัวเองติดกับพื้นผิวด้วยอวัยวะสำหรับยึดเกาะ (Attachment processes) แล้วจึงเริ่มมีพัฒนาการโดยการหด notochord กลับเข้าไปในส่วนหัวจนหมดภายหลังการลงเกาะได้สำเร็จ ในระยะนี้ ตัวอ่อนยังไม่มีการรับอาหารจากภายนอก อาศัยอาหารจากไข่แดง (Yolk) เนื่องจากช่องน้ำเข้าออกยังปิดสนิทและถูกหุ้มด้วย tunic (Satoh, 1994) หลังจากที่อวัยวะภายในมีการกลับด้านโดยการหมุน 90 องศา ทำให้ช่องน้ำเข้าออกทั้งสองเปลี่ยนตำแหน่งจากด้านล่างที่ติดกับพื้นผิวมาเป็นด้านบนและเปิดออกแล้ว น้ำจึงผ่านเข้าออกได้ทำให้เริ่มมีการกินอาหารจากภายนอกโดยการกรองจากมวลน้ำ ซึ่งเป็นเวลาเดียวกันที่มีการสร้างปมประสาทใหม่ รวมถึงพัฒนาลักษณะทางกายภาพอย่างรวดเร็วจนเข้าสู่ระยะโตเต็มวัยและพัฒนาระบบสืบพันธุ์ (Monniot *et al*., 1991) ภายใต้กระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (Metamorphosis) นี้จัดเป็นระยะวิกฤตของตัวอ่อน เนื่องจากมีปัจจัยหลาย

ประการคุกคาม เช่น ความเร่งด่วนและความล้าช้าในการลงเกาะ การหดกลับของหางและอวัยวะอื่น การหมุนของลำตัวเพื่อเข้าสู่ลักษณะของตัวเต็มวัย การเปิดของช่องน้ำเข้าออก พัฒนาการของ branchial sac รวมทั้ง กระบวนการสร้างระบบประสาทต่างๆ (Monniot *et al.*, 1991)

ความสนใจด้านชีววิทยาของเพรียงหัวหอมส่วนมากเน้นเรื่องการสืบพันธุ์ โดยเฉพาะระยะผสมพันธุ์และการปล่อยตัวอ่อน เช่น จากการศึกษาของ Monniot *et al.* (1991) พบว่า ตัวอ่อนมีการเลือกระยะเวลาที่ดวงอาทิตย์ขึ้นและตกในการลงเกาะ ซึ่งเกี่ยวข้องกับผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการเปลี่ยนแปลงของระดับความเข้มแสง ทำให้มีการศึกษาในห้องปฏิบัติการโดยการให้แสงจากหลอดส่องสว่างในน้ำอย่างต่อเนื่อง เพื่อบ่งชี้ถึงการควบคุมภายในของตัวอ่อนเพรียงหัวหอมที่มีผลต่อการสืบพันธุ์มากกว่าเรื่องของระยะในการสืบพันธุ์ (Mendola, 2000)

เพรียงหัวหอมมีขนาดที่แตกต่างกัน กลุ่มที่ดำรงชีพเป็นตัวเดี่ยวอาจมีขนาดใหญ่ที่สุดโดยวัดจากส่วนฐานถึงช่องน้ำเข้ามีความยาวถึง 30 เซนติเมตร ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ดำรงชีพเป็นโคโลนีที่มีการวัดขนาดในระดับของมิลลิเมตรเท่านั้น อย่างไรก็ตามเพรียงหัวหอมที่ดำรงชีพเป็นโคโลนีนี้สามารถเติบโตและขยายพื้นที่ปกคลุมได้เป็นตารางเมตรหรือมากกว่า (Sherrard, 2005)

นิเวศวิทยาเพรียงหัวหอม

นิเวศวิทยาของเพรียงหัวหอมมีความแตกต่างสูงระหว่างตัวเต็มวัยและตัวอ่อน ตั้งแต่ในระยะว่ายน้ำอิสระที่ไม่มีการกินอาหารจนถึงการลงเกาะที่ไม่มีการเคลื่อนที่และเริ่มกินอาหารจนพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย

ไข่ของเพรียงหัวหอมที่ผสมแล้วมักลอยอยู่บริเวณผิวน้ำ ถูกพัดพาไปตามกระแสน้ำ โดยส่วนหนึ่งสามารถลงเกาะได้สำเร็จ ในขณะที่อีกส่วนหนึ่งกลายเป็นอาหารของผู้ล่า ((Thorson, 1964; Singarajah, 1969; Gosselin, 1997; Sherrard 2005) ด้วยสาเหตุนี้ พัฒนาการของตัวอ่อนที่ว่ายน้ำอิสระจึงเป็นไปอย่างรวดเร็วในเวลาไม่กี่ชั่วโมงหรือไม่กี่วัน เพรียงหัวหอมในเขตร้อนหลายชนิดมีการสร้างและปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตลอดปี โดยสร้างรังไข่ที่มีความเหมาะสม อย่างไรก็ตามยังไม่มีข้อมูลชัดเจนว่าการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เป็นไปอย่างต่อเนื่องหรือเป็นระยะ ซึ่งอาจแตกต่างตามชนิดตามลักษณะของไข่และน้ำเชื้อนั้น (Millar, 1971)

กรณีเพรียงหัวหอมที่ดำรงชีพเป็นโคโลนีมีลักษณะการสืบพันธุ์แบบ ovoviviparous โดยที่น้ำเชื้อเท่านั้นถูกปล่อยออกสู่มวลน้ำ (Mukai and Watanabe, 1976) การปฏิสนธิเกิดขึ้นกับไข่ที่ยังคงอยู่ภายไปในท่อนำไข่ของตัวแม่หรือใน peribranchail cavity พัฒนาการของตัวอ่อนจะไม่มีระยะที่ชัดเจนของเอ็มบริโอ แต่พัฒนาในตัวแม่จนกระทั่งถึงระยะว่ายน้ำอิสระในระยะเวลาสั้นๆ ทั้งนี้เพื่อลดโอกาสในการถูกกินจากผู้ล่าหรือถูกพัดพาหายไปตามกระแสน้ำ (Thorson, 1966; Bingham and walters, 1989; Osman and Whitlatch, 1995; Gosselin and Qian, 1997)

จากการทดลองให้ตัวอ่อนเพรียงหัวหอมลงเกาะบนวัสดุเทียมพบว่า ตัวอ่อนจำนวนมากของเพรียงหัวหอมหลายชนิดสามารถลงเกาะบนวัสดุดังกล่าวเมื่อมีแสงสว่างเพียงเล็กน้อย ในขณะที่ พื้นที่ที่ถูกทำให้มืดสามารถดึงดูดตัวอ่อนได้เป็นจำนวนมากกว่าพื้นที่ที่สว่างหากมีการให้แสงสว่างคงที่ อย่างไรก็ตาม พบว่า เพรียงหัวหอมบางชนิดมีความดึงดูดต่อแสงในการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และระดับของแสงไม่ได้ทำให้เกิดความแตกต่างของการปล่อยตัวอ่อน (Mendola, 2000)

ปัจจุบันยังไม่สามารถจำแนกสารเคมีที่มีผลต่อการวางไข่และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเพรียงหัวหอม สารเคมีบางประเภทถูกสร้างขึ้นในตัวพ่อแม่และถูกปล่อยออกสู่มวลน้ำในประชาคมเพรียงหัวหอมที่ดำรงชีพเป็นตัวเดี่ยว ซึ่งกระตุ้นให้มีการปล่อยไข่และสเปิร์มออกมาในเวลาเดียวกัน นอกจากนั้น ตัวอ่อนยังมีการสร้างสารเพื่อสื่อสารระหว่างกันเพื่อใช้การลงเกาะ จากการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า ตัวอ่อนที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มสามารถลงเกาะได้รวดเร็วกว่าตัวอ่อนเดี่ยวที่ถูกแยกให้ลงเกาะ (Mendola, 2000) มีรายงานว่า สารอนินทรีย์แต่ละประเภทมีฤทธิ์แตกต่างกันในการต่อต้านและดึงดูดการลงเกาะของตัวอ่อน เช่น ทองแดงมีฤทธิ์ในการต่อต้าน ขณะที่เหล็กมีฤทธิ์ในการดึงดูดการลงเกาะของตัวอ่อน (Monniot *et al.*, 1991) อย่างไรก็ตาม ยังมีการศึกษาในด้านผลที่เกิดจากปัจจัยของสารเคมีไม่มากนัก

การเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม

Ecteinascidia turbinata เป็นเพรียงหัวหอมที่พบในทะเลแคริเบียนบริเวณ Florida Keys บาร์ฮาม่า และอ่าวเม็กซิโก เพรียงหัวหอมชนิดนี้เกาะอาศัยอยู่บริเวณรากของต้นโกงกาง ใบหญ้าทะเล กัลปังหา ฟองน้ำ พื้นผิวของหินปูนในแนวปะการัง รวมทั้ง วัสดุต่างๆ ที่มนุษย์สร้างขึ้น เช่น เชือก เสา และท่าเรือ พบที่ระดับความลึกตั้งแต่ 0.3–12 เมตร โดยเฉพาะในช่วง 1–3 เมตร (Mendola, 2000) *E. turbinata* เป็นเพรียงหัวหอมที่มีความใกล้เคียงกับ *E. thurstoni* ซึ่งมีการให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในกลุ่มเดียวกัน

E. turbinata มีพฤติกรรมการลงเกาะของระยะที่เป็นตัวอ่อนว่ายน้ำอิสระแตกต่างกันตามลักษณะของวัสดุยึดเกาะในแต่ละสถานที่ของการทดลอง จากการศึกษาบริเวณของพื้นผิวที่เป็นหินปูน แนวหญ้าทะเล และรากต้นโกงกาง บริเวณ Florida Keys พบว่า จำนวนตัวของเพรียงหัวหอม (Zooid) ต่อโคโลนี รวมถึง น้ำหนัก ความยาว และกิจกรรมการสืบพันธุ์ มีความแตกต่างกันตามสถานที่ โดยตัวอ่อนที่ลงเกาะบนพื้นผิวหินปูนมีขนาดตัวที่ใหญ่กว่าและมีพฤติกรรมการสืบพันธุ์สูงกว่าพื้นที่อื่น ในขณะที่บริเวณแนวหญ้าทะเลมีจำนวนตัวต่อโคโลนีน้อยที่สุด และมีอัตราการตายสูงที่สุดภายใน 36 วันของการศึกษา (Bingham and Young, 1991)

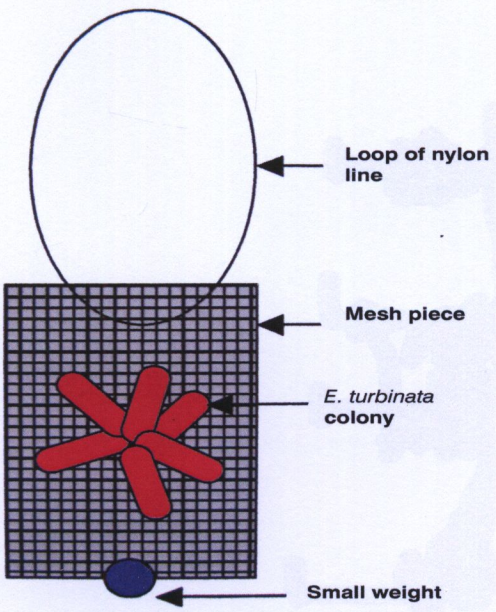
Bingham and Walters (1989) ศึกษาองค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอมที่ดำรงชีพเป็นตัวเดี่ยว โดยใช้วิธีการตัดทางเดินอาหารตั้งแต่ branchial basket ถึง

ปลายสุดของกระเพาะอาหารแล้วแยกออกมาโดยปิเปต นำส่วนที่ได้ผสมกับน้ำทะเลกรองเพื่อยับยั้งเมือกจากทางเดินอาหาร แล้วจึงจำแนกชนิดและนับจำนวน พบว่า เพรียงหัวหอมที่ดำรงชีพเป็นตัวเดี่ยวมีการกินตัวอ่อนของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในทะเลหลายชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับชนิดของแพลงก์ตอนในบริเวณเดียวกัน บ่งชี้ว่า การกินของเพรียงหัวหอมในธรรมชาติไม่ได้เป็นการลดจำนวนของตัวอ่อนสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในแหล่งธรรมชาติ

Duckworth *et al.* (2004) ทดลองเลี้ยงเพรียงหัวหอม *E. turbinata* ในทะเล โดยการรวบรวมโคโลนีขนาดใหญ่ที่ประกอบด้วยตัวเพรียงหัวหอมประมาณ 100-200 ตัวต่อโคโลนี ทั้งหมด 15 โคโลนี จากระดับความลึก 10-15 เซนติเมตร ใน Indian River Lagoon รัฐ Florida แต่ละโคโลนีที่รวบรวมประกอบด้วยตัวเพรียงหัวหอมและ stolon ที่ปราศจากสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ยึดเกาะบนโคโลนี จากนั้นทำการแยกแต่ละโคโลนีออกให้มีขนาดเล็กลงเหลือโคโลนีละ 20 ตัว โดยประมาณ โดยทั้งหมดต้องยึดติดอยู่กับ stolon เดิม นำไปผูกติดกับตาข่ายไนล่อนขนาด 3x6 เซนติเมตร ที่มีขนาดช่องตาข่าย 1 มิลลิเมตร มัดโคโลนีด้วยเชือกไนล่อนเพื่อช่วยในการยึดเกาะของ stolon ในระยะแรก จัดทำห่วงสำหรับแขวนบริเวณด้านบนของแผ่นตาข่าย พร้อมติดตุ้มน้ำหนักขนาดเล็กถ่วงบริเวณด้านล่าง (รูปที่ 3) นำแผ่นตาข่ายซึ่งมีผูกโคโลนีเรียบร้อยแล้วไปแขวนในแนวดิ่งที่ระดับกลางน้ำในตู้เลี้ยงขนาด 25x29x41 เซนติเมตร บรรจุน้ำทะเลธรรมชาติ 15 ลิตร ที่ผ่านการกรองด้วยตัวกรองขนาดรูพรุน 1 ไมโครเมตร และผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแสงอัลต้าไวโอเล็ต ทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 5–6 ครั้งต่อสัปดาห์ เพื่อกำจัดเศษอาหารและสิ่งขับถ่าย ตลอดจนเพื่อป้องกันไม่ให้ระดับแอมโมเนียในน้ำสูงมากกว่าเกินระดับที่เหมาะสม ควบคุมอุณหภูมิเลี้ยงที่ 25 องศาเซลเซียส ความเค็ม 33 ส่วนในพันส่วน และค่าความเป็นกรดด่างที่ 8.1 นอกจากนี้ ได้จำลองสภาพแวดล้อมของระบบเลี้ยงให้ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติของ Indian River Lagoon ในระยะเวลาที่ทำการรวบรวมตัวอย่าง ให้อากาศในน้ำทะเลโดยหัวทราย 2 หัว บริเวณมุมตรงกันข้ามของตู้เลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ การหมุนเวียนของน้ำ และการแขวนลอยอาหารในมวลน้ำ ทั้งนี้ ป้องกันไม่ให้โคโลนีสัมผัสฟองอากาศ จากการทดลองพบว่า แพลงก์ตอนพืช 3 ชนิด คือ *Chaetoceros gracil*, *Isochrysis galbana* และ *Nannochloropsis* sp. ที่ให้เป็นอาหารนั้น *E. turbinata* มีการเติบโตที่ดีที่สุดเมื่อได้รับ *I. galbana* เพียงชนิดเดียว หรือจากที่ได้รับร่วมกับ *C. gracilis* ที่ระดับความเข้มข้น 80,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเพิ่มระดับความเข้มข้นของเซลล์ให้สูงขึ้นพบว่า ระดับความเข้มข้นของเซลล์ที่ดีที่สุดมีค่าสูงขึ้นที่ 160,000 และ 320,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้ *E. turbinata* ที่ได้รับอาหารผสมระหว่าง *C. gracilis* และ *I galbana* ยังคงให้จำนวนตัวต่อโคโลนีมากที่สุด ซึ่งมีผลต่อการผลิตสาร ecteinascidins อย่างมีนัยสำคัญ

นอกจากนี้ Mendola (2000) ศึกษาเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมชนิดนี้ในถังควบคุมสภาพแวดล้อมและในทะเล โดยใช้โคโลนีจากธรรมชาติและปล่อยให้ตัวอ่อนลงเกาะบนวัสดุต่างๆ หลายชนิดที่บรรจุไว้ในถัง พบว่า *E. turbinata* ที่เลี้ยงในถังควบคุมสภาพแวดล้อมสามารถสร้างสาร Ecteinascidins ได้เช่นเดียวกับเพรียงหัวหอมชนิดนี้ที่เลี้ยงในทะเล และพบว่าปริมาณตัวอ่อนจากพ่อแม่พันธุ์ที่เก็บจากธรรมชาติประมาณ 1 กิโลกรัม จะเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยที่ให้น้ำหนักมวลรวม 50–60 กิโลกรัม ภายในเวลา 60–90 วัน

อย่างไรก็ตาม การศึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงและการใช้ประโยชน์จากเพรียงหัวหอมยังมีน้อย โดยเฉพาะการเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบในการผลิตสารต้านมะเร็ง ส่วนมากเป็นการศึกษาเกี่ยวกับอนุกรมวิธานและชีววิทยาของเพรียงหัวหอม ทั้งนี้ มีเพรียงหัวหอมไม่กี่ชนิดเท่านั้นที่พบว่ามีสารทุติยภูมิที่มีศักยภาพในการพัฒนาเป็นยาบำบัดมะเร็ง เช่น พบสารในกลุ่ม didemnin จากเพรียงหัวหอมบางชนิดในสกุล Didemnum (Crews *et al.*, 1996) และพบสารในกลุ่ม ecteinascidins ในเพรียงหัวหอมสองชนิด คือ *E. turbinata* และ *E. thurstoni* (Suwanborirux *et al.*, 2002) แต่เมื่อนำมาศึกษาทางด้านเคมีและเภสัชวิทยาพบว่า สารในกลุ่ม ecteinascidins เท่านั้นที่สามารถพัฒนาเป็นยาบำบัดมะเร็งได้ เพรียงหัวหอมที่สามารถผลิตสารดังกล่าวจึงมีความจำเป็นในการเพาะเลี้ยงเพื่อให้เพียงพอต่อการใช้เป็นแหล่งวัตถุดิบ เนื่องจากเพรียงหัวหอมมีขนาดเล็กและประชากรในธรรมชาติมีปริมาณไม่มากนัก การใช้ประชากรจากธรรมชาติโดยตรง สามารถก่อให้เกิดผลกระทบต่อระบบนิเวศทางทะเลได้ หากเกิดภาวะคุมคามมากเกินกำลังผลิตตามธรรมชาติ



(ที่มา: Duckworth *et al.*, 2004)

รูปที่ 3. แบบจำลองชุดทดลองเลี้ยงของโคโลนีเพรียงหัวหอม *E. turbinata* แบบ In vitro culture

การใช้ประโยชน์จากเพรียงหัวหอม

ปัจจุบัน มีรายงานว่า เพรียงหัวหอม *E. turbinata* สามารถนำไปสกัดสาร Ecteinascidin 743 ซึ่งนำไปพัฒนาเป็นยาบำบัดมะเร็งได้สำเร็จ (Wright *et al.*, 1990; Jeedigunta, 2000; Scotto, 2002) และมีการนำไปใช้ในโรงพยาบาลของกลุ่มประเทศยุโรปตั้งแต่ปี ค.ศ.2001 และสหรัฐอเมริกาในปี ค.ศ. 2004 ดังนั้นสารดังกล่าวจึงเป็นสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากสิ่งมีชีวิตในทะเลที่พัฒนาเป็นยาต้านมะเร็งชนิดใหม่ ความต้องการสารนี้เพื่อใช้ในการบำบัดโรคมะเร็งในอนาคตมีแนวโน้มที่มากขึ้น แม้ว่าจะมีคณะวิจัยหลายกลุ่มที่พยายามเตรียมสารนี้โดยวิธีการสังเคราะห์ทางเคมี แต่วิธีการดังกล่าวให้สารในปริมาณน้อย เนื่องจากมีหลายขั้นตอน และมีความซับซ้อนมากในการสังเคราะห์

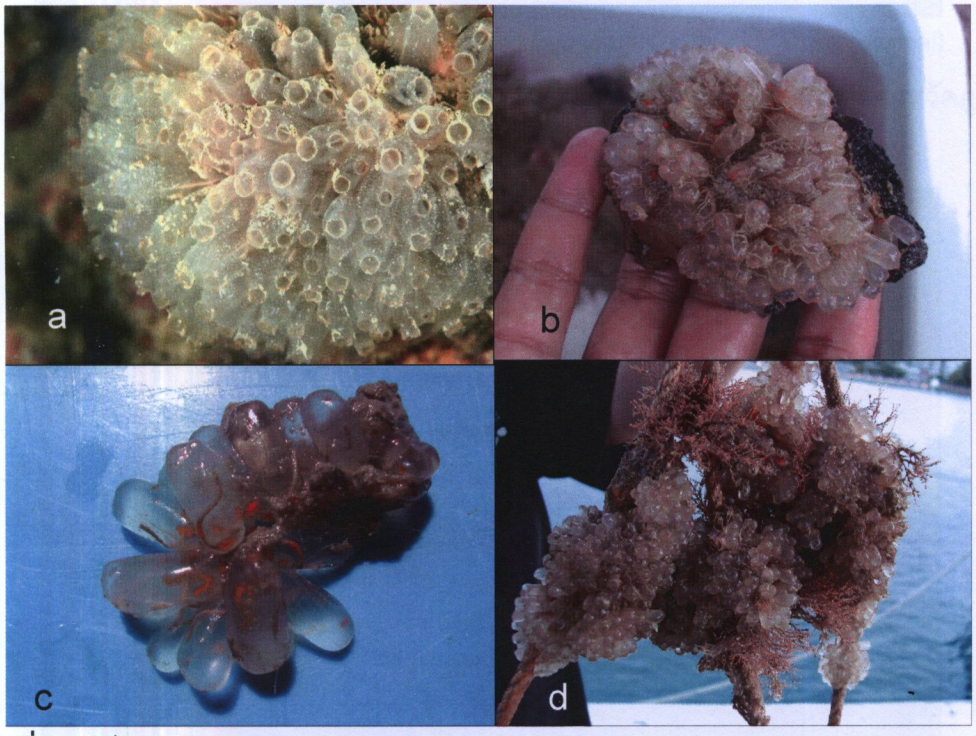
สำหรับการศึกษาในประเทศไทยพบว่า เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ที่พบเฉพาะในทะเลจังหวัดภูเก็ต สามารถสร้างสารกลุ่ม Ecteinascidins (Et) ที่นำมาใช้ในการแยกสาร Et 770 และ Et 786 ได้ในปริมาณมาก โดยสาร Et 770 สามารถเปลี่ยนเป็น Et 743 ได้ในปริมาณที่สูงถึงร้อยละ 96 สาร Et 770 และ Et 786 แสดงฤทธิ์ต่อความเป็นพิษของเซลล์มะเร็งอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะสาร Et 786 ที่มีผลต้านเซลล์มะเร็งปอด NCI-H460 ได้ดีมากกว่าเซลล์มะเร็งชนิดอื่น (Suwanborirux *et al.*, 2002)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

1. สัตว์ทดลอง สถานที่วิจัย และระบบการเลี้ยง

ทำการศึกษาเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 (รูปที่ 4) ณ สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน จังหวัดภูเก็ต (สวพ ภูเก็ต) (รูปที่ 5) โดยเปรียบเทียบระหว่างการเลี้ยงที่ระบบเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยง และในธรรมชาติ บริเวณท่าเรือ สวพ ภูเก็ต ทั้งนี้ ระบบเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยงเป็นระบบน้ำหมุนเวียนแบบเปิดที่น้ำทะเลผ่านการกรองด้วยทรายหยาบ โดยใช้ถังเลี้ยงขนาด กว้าง 0.8 เมตร ยาว 3 เมตร สูง 0.8 เมตร (รูปที่ 6)



รูปที่ 4. เพรียงหัวหอม *E. thurstoni*

a) โคโลนีในธรรมชาติ b) โคโลนีในระยะโตเต็มวัยที่ใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการทดลอง.
c) ตัวเดี่ยวซึ่งห่อหุ้มด้วย tunic ใส มองเห็นอวัยวะภายในได้. d) โคโลนีจากการเลี้ยงในทะเล.

(ที่มา: Google earth professional)

รูปที่ 5. สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน จังหวัดภูเก็ต

รูปที่ 6. ระบบเลี้ยงที่ใช้ระบบน้ำหมุนเวียนแบบเปิด

(ขนาดถังเลี้ยง กว้าง 0.8 เมตร ยาว 3 เมตร สูง 0.8 เมตร)

2. ขั้นตอนการวิจัย รวบรวม และวิเคราะห์ข้อมูล

2.1 การศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน

รวบรวมพ่อแม่พันธุ์ *E. thurstoni* จากธรรมชาติบริเวณท่าเรือ สวพ ภูเก็ต โดยการดำน้ำลึกแบบ scuba diving นำพ่อแม่พันธุ์ดังกล่าวใส่ในภาชนะพลาสติกบรรจุน้ำทะเลธรรมชาติ เมื่อพ่อแม่พันธุ์เกิดภาวะเครียดโดยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิ จากอุณหภูมิปกติในน้ำทะเลเป็นอุณหภูมิปกติของห้อง ตัวอ่อนระยะว่ายน้ำอิสระ (Tadpole larva) จึงถูกปล่อยออกมาจากตัวพ่อแม่พันธุ์ นำตัวอ่อนที่ได้ไปกระตุ้นด้วยการปล่อยทิ้งไว้ในน้ำจืดเป็นเวลา 50-60 วินาทีเพื่อให้ลงเกาะบน petridish หลังจากนั้น จึงรวบรวมตัวอ่อนไปอนุบาลในระบบเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ สวพ ภูเก็ต เพื่อศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน โดยสุ่มเลือกตัวอ่อนครั้งละ 3 ตัว สังเกตและบันทึกการเปลี่ยนแปลงอวัยวะภายนอกและภายในภายใต้กล้องจุลทรรศน์พร้อมพร้อมวาดภาพประกอบตามระยะเวลาดังนี้

1) ทุก 3 ชั่วโมง ในระยะ 2 วันแรกหลังการลงเกาะ
2) ทุก 6 ชั่วโมง ในระยะ 3–7 วันหลังการลงเกาะ
3) ทุก 1 สัปดาห์ ตั้งแต่สัปดาห์ที่สองหลังการลงเกาะ จนตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะวัยรุ่น

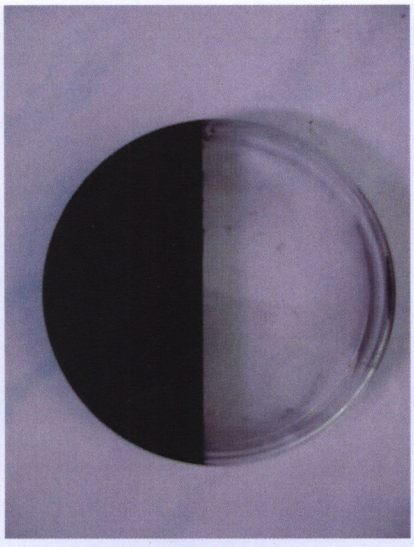
2.2 การศึกษาพฤติกรรมการลงเกาะของตัวอ่อน

รวบรวมตัวอ่อน *E. thurstoni* ด้วยวิธีเดียวกับการศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน หลังจากนั้น นำตัวอ่อนมาศึกษาพฤติกรรมการลงเกาะบน petridish ซึ่งแบ่งพื้นที่ออกเป็นสองส่วนเท่ากัน ด้านหนึ่งทำให้มืดโดยใช้สีดำย้อมภายนอก และอีกด้านเป็นด้านสว่างตามปกติ (รูปที่ 7) แบ่งการทดลองเป็นสองชุดดังนี้

1) ชุดการทดลองที่ 1 (ชุดควบคุม) นำตัวอ่อน *E. thurstoni* จำนวน 30 ตัว ปล่อยให้ลงเกาะอิสระใน petridish ที่บรรจุน้ำทะเลธรรมชาติปริมาตร 30 มิลลิลิตร ทำทั้งหมด 3 ซ้ำ หลังจากนั้นจึงทำการปิดฝา petridish

2) ชุดการทดลองที่ 2 (ชุดทดลอง) ใช้วิธีการเช่นเดียวกับชุดการทดลองที่ 1 ยกเว้นได้นำตัวอ่อนมาทำการกระตุ้นให้ลงเกาะด้วยการปล่อยทิ้งไว้ในน้ำจืดเป็นเวลา 50-60 วินาที ก่อนปล่อยลงเกาะอิสระโดยอิสระบน petridish (รูปที่ 8)

ทั้งนี้ ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการชีววิทยาทางทะเล สวพ ภูเก็ต ควบคุมปริมาณแสงโดยใช้หลอดไฟส่องสว่างแบบ fiber optic bifurcated Olympus model LGPS เป็นแหล่งกำเนิดแสงในการทดลอง ปล่อยทิ้งไว้จนตัวอ่อนลงเกาะสำเร็จ บันทึกข้อมูลการลงเกาะโดยเปรียบเทียบจำนวนตัวอ่อนที่ลงเกาะในพื้นผิวส่วนมืดและพื้นผิวส่วนสว่างในแต่ละหน่วยการทดลอง



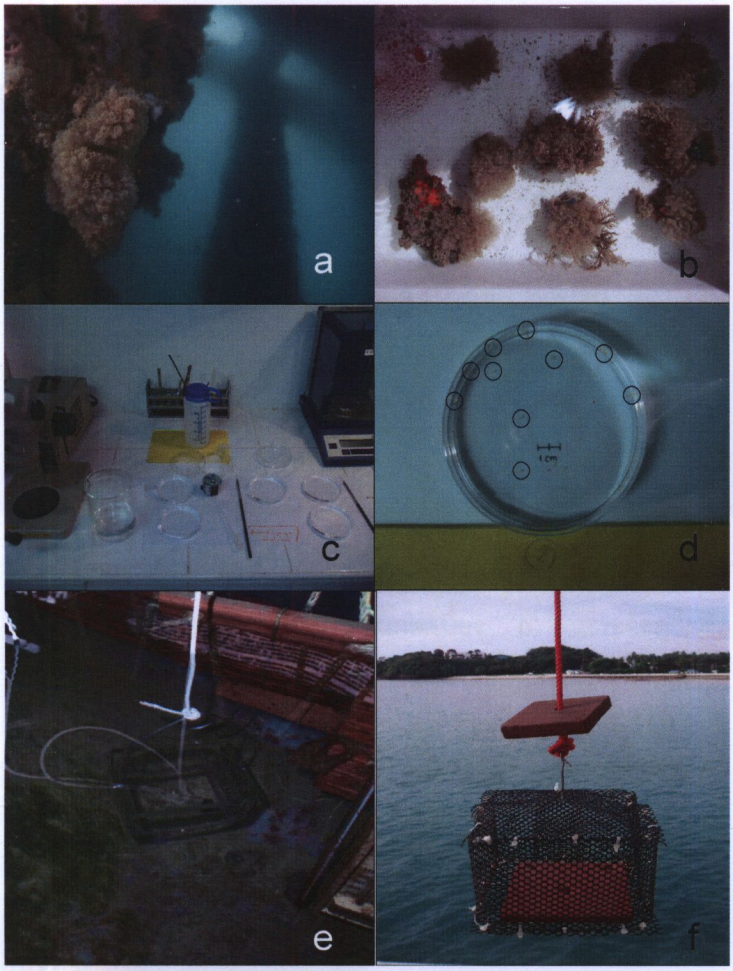
รูปที่ 7. Petridish ใช้ทดลองการลงเกาะของตัวอ่อน *E. thurstoni* โดยแบ่งพื้นที่เป็นส่วนมืดและส่วนสว่างเท่ากัน

รูปที่ 8. การศึกษาพฤติกรรมการลงเกาะของตัวอ่อน *E. thurstoni*

2.3 การศึกษาการเติบโตของตัวอ่อนในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล

รวบรวมตัวอ่อน *E. thurstoni* และทำการกระตุ้นให้ลงเกาะบน petridish ด้วยวิธีเดียวกับการศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน หลังจากนั้นจึงทำการแยกตัวอ่อน (Zooid) มาทดลองเลี้ยงเปรียบเทียบในระบบเลี้ยงที่โรงเพาะเลี้ยงและในทะเลธรรมชาติ (รูปที่ 9) ของ สวพ ภูเก็ต โดยใช้ตัวอ่อนสถานที่ละ 20 ตัว ทำการเก็บข้อมูลทุก 1 สัปดาห์ โดยการนับจำนวนตัวอ่อน พร้อมสุ่มวัดขนาดและบันทึกภาพ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการเปรียบเทียบอัตรารอดและขนาดของตัวอ่อนในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล บันทึกอุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเลบริเวณที่ทำการศึกษา (ภาคผนวกที่ 2)



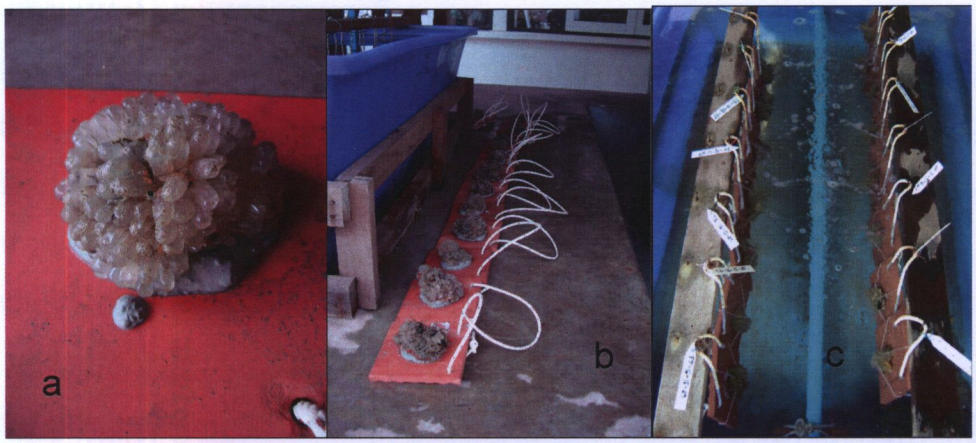
รูปที่ 9. การศึกษาการเติบโตของตัวอ่อน *E. thurstoni*

a) พ่อแม่พันธุ์ธรรมชาติบริเวณที่ศึกษา. b) พ่อแม่พันธุ์จากการรวบรวมและถูกกระตุ้นให้ปล่อยตัวอ่อน. c) การกระตุ้นตัวอ่อนให้ลงเกาะใน petridish. d) ตัวอ่อนที่ลงเกาะหลังผ่านการกระตุ้น. e) ถาดแก้วสำหรับอนุบาลตัวอ่อนในถังเลี้ยง. f) กล่องตาข่ายสำหรับอนุบาลตัวอ่อนในทะเล.

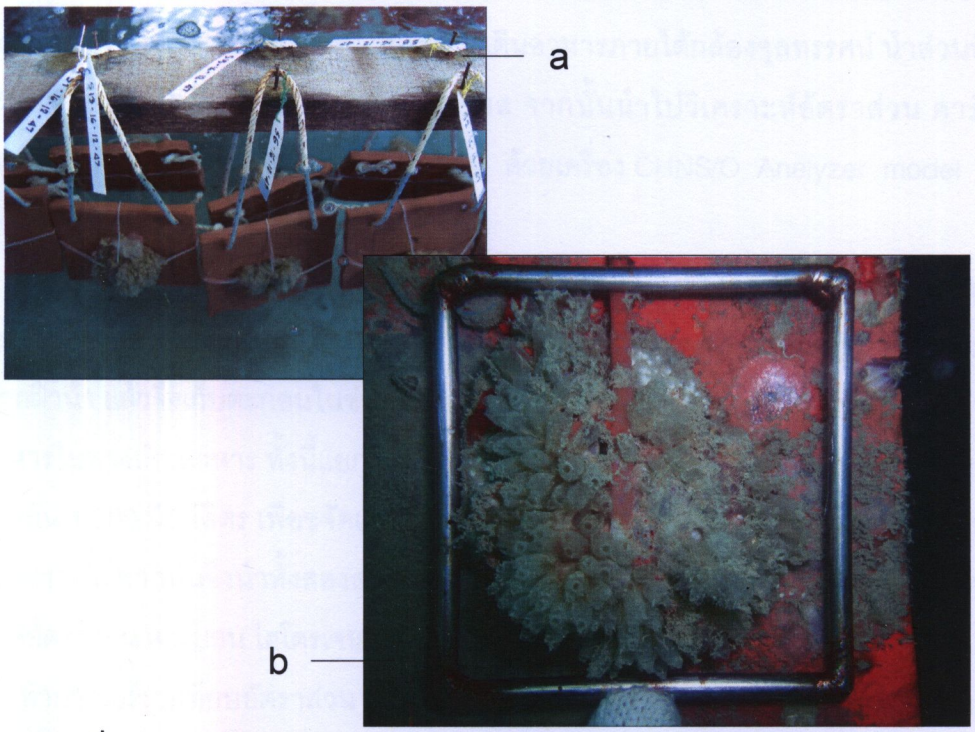
2.4 การศึกษาช่วงชีวิตหลังการลงเกาะในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล

ทำการสุ่มโคโลนีที่สมบูรณ์ของ *E. thurstoni* จากธรรมชาติบริเวณท่าเรือ สวพ ภูเก็ต โดยนำโคโลนีมาติดกับแผ่นกระเบื้องดินเผาด้วยสายรัดพลาสติกหรือกาวสำหรับใช้ในน้ำทะเล แล้วจึงนำไปเลี้ยงในถังเลี้ยงระบบเปิดที่โรงเพาะเลี้ยง (รูปที่ 10)เปรียบเทียบกับในทะเลธรรมชาติบริเวณท่าเรือ ที่ระดับความลึก 3 เมตรจากผิวน้ำทะเล (รูปที่ 11) ของ สวพ ภูเก็ต โดยใช้จำนวนโคโลนีสถานที่ละ 15 โคโลนี

เก็บข้อมูลการศึกษาวงชีวิตโดยการวัดพื้นที่ปกคลุมของตัวเพรียงหัวหอม (Zooids) บนพื้นผิว (Substrates) โดยใช้กรอบสี่เหลี่ยมขนาด 10x10 เซนติเมตร ทุก 10 วัน จนครบ 2 รอบของวงชีวิต บันทึกภาพโคโลนีที่อยู่ภายในกรอบ และนำภาพโคโลนีที่ได้ไปวิเคราะห์พื้นที่ปกคลุมตัวเพรียงหัวหอมโดยใช้โปรแกรม ENVI 4.0



รูปที่ 10. การศึกษาช่วงชีวิตหลังการลงเกาะของ *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง
a) โคโลนีเพรียงหัวหอมที่ติดบนแผ่นกระเบื้อง. b) ขณะรอวัสดุยึดติดแห้ง.
c) การทดลองเลี้ยงในระบบน้ำหมุนเวียนน้ำแบบเปิดในโรงเพาะเลี้ยง.



รูปที่ 11. การศึกษาช่วงชีวิตหลังการลงเกาะของ *E. thurstoni* ในทะเล
a) โคโลนีที่ติดบนแผ่นกระเบื้องขณะพักในถังเลี้ยงก่อนนำไปทดลองในทะเล.
b) การบันทึกภาพพื้นที่ปกคลุมโคโลนี.

2.5 การศึกษาองค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหาร และองค์ประกอบชนิดของแพลงก์ตอนพืชบริเวณแหล่งธรรมชาติ

เปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารที่พบในทางเดินอาหารของ *E. thurstoni* กับองค์ประกอบชนิดของแพลงก์ตอนพืชที่พบในบริเวณที่อยู่อาศัยในธรรมชาติ โดยรวบรวม *E. thurstoni* บริเวณท่าเทียบเรือ สวพ ภูเก็ต นำตัวอย่างที่เก็บมาได้ใส่ใน 10% ฟอร์มาลิน หลังจากนั้นจึงสุ่มจำนวนตัวโคโลนีละ 10 ตัวมาแยกทางเดินอาหารแล้วบดบนกระจกสไลด์ ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบ light compound จำแนกชนิดแพลงก์ตอนพืชที่พบในทางเดินอาหาร

นอกจากนั้น เก็บตัวอย่างน้ำทะเลเพื่อศึกษาองค์ประกอบชนิดของแพลงก์ตอนพืชในบริเวณแหล่งธรรมชาติที่พบ *E. thurstoni* โดยใช้กระบอกเก็บน้ำแบบ Nensen ที่ระดับความลึก 4 เมตรจากผิวน้ำทะเล กรองด้วยถุงกรองแพลงก์ตอนขนาดตา 20 ไมโครเมตร บรรจุตัวอย่างในขวดรักษาตัวอย่างแล้วใส่ 2% ฟอร์มาลิน และนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อจำแนกชนิดแพลงก์ตอนพืชต่อไป

เตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารของ *E. thurstoni* โดยแยกเฉพาะอาหารที่อยู่ภายในทางเดินอาหารภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำส่วนที่แยกได้ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปวิเคราะห์อัตราส่วน คาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน (CHN ratio analysis) ด้วยเครื่อง CHNS/O Analyzer model 2400 series II

สำหรับการเตรียมตัวอย่างตะกอนเพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่พบแขวนลอยในน้ำทะเลบริเวณที่อยู่อาศัยในธรรมชาตินั้น ทำการโดยติดตั้งแท่นดักตะกอนที่ระดับความลึก 3 เมตรจากผิวน้ำ แล้วจึงเก็บตะกอนในช่วงเวลาเดียวกันกับการเก็บรวบรวมเพรียงหัวหอมเพื่อนำไปแยกอาหารในทางเดินอาหาร ทั้งนี้แยกตะกอนที่เก็บได้เป็นสองส่วน คือ สวนที่ นำตะกอนมาล้างด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เพื่อขจัดเกลือออกจากตะกอน ก่อนนำไปใช้ กับส่วนที่เป็นตะกอนไม่ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงนำทั้งสองส่วนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50–60 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์อัตราส่วน คาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน

ทำการเปรียบเทียบอัตราส่วน คาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ที่พบในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอมกับสารอินทรีย์แขวนลอยในธรรมชาติ

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. การศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน

จากการศึกษาพบว่า ตัวอ่อน *E. thurstoni* มีการพัฒนาทั้งหมด 3 ระยะ คือ 1) ระยะตัวอ่อนว่ายน้ำอิสระ (Tadpole larva) 2) ระยะตัวอ่อนหลังลงเกาะ และ 3) ตัวอ่อนระยะวัยรุ่น (Juvenile) ทั้งนี้ อักษรย่อที่ใช้แสดงอวัยวะต่างๆ ของตัวอ่อนที่มีการสังเกตแสดงในตารางที่ 1

1.1 ระยะตัวอ่อนว่ายน้ำอิสระ (Tadpole larva stage) (รูปที่ 12)

หลังจากที่ตัวอ่อน *E. thurstoni* ถูกปล่อยออกมาจากโคโลนีพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติโดยการกระตุ้นด้วยการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิน้ำทะเลในกระบะบรรจุโคโลนีพ่อแม่พันธุ์ให้สูงขึ้น ตัวอ่อนมีการเคลื่อนที่ไปมาในมวลน้ำโดยใช้ส่วนหาง (Tail) ซึ่งประกอบด้วย nerve chord ที่ทอดขนานกับ notochord เชื่อมต่อกับส่วนหัว (Head) ของตัวอ่อน

อวัยวะที่สำคัญในระยะนี้มีสองส่วนคือ otolith (Gravity sensor) ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้ตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วง และ photolith (Light receptor) ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้ตอบสนองต่อแสงสว่าง โดยอวัยวะทั้งสองพบอยู่ในบริเวณส่วนหัวของตัวอ่อน ทั้งนี้ เนื่องจากตัวอ่อนถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อบางๆ ที่เรียกว่า tunic จึงทำให้ตัวอ่อนไม่กินอาหารในระยะนี้

1.2 ระยะตัวอ่อนหลังการลงเกาะ (Settlement stage)

1) 5 นาที หลังการลงเกาะ (รูปที่ 13)

หลังจากตัวอ่อน *E. thurstoni* ลงเกาะบนพื้นผิว 5 นาที พบว่าตัวอ่อนยึดติดกับพื้นผิวด้วยอวัยวะสำหรับยึดเกาะ (Attachment process) ทั้ง 3 อัน ตัวอ่อนไม่มีการเคลื่อนที่ มีการกระตุกแบบถี่ในส่วนหาง เป็นครั้งคราว เมื่อลดแสงสว่างในขณะทดลองอย่างรวดเร็ว พบว่าตัวอ่อนมีการกระตุกแบบถี่เช่นเดียวกัน และในระยะนี้ตัวอ่อนห่อหุ้มด้วย tunic และไม่มีการกินอาหาร

2) 10 นาที หลังการลงเกาะ (รูปที่ 14)

ตัวอ่อนเริ่มพัฒนา stolon เพื่อใช้ช่วยยึดเกาะและเพื่อขยายเจริญเป็นโคโลนีต่อไป notochord ในส่วนหางเริ่มหดสั้นลงเล็กน้อย

3) 15 นาที หลังการลงเกาะ (รูปที่ 15)

ตัวอ่อนพัฒนา stolon ยาวขึ้น notochord ที่อยู่ในส่วนหางเริ่มหดกลับเข้ามาในส่วนหัวของตัวอ่อน

4) 30 นาที หลังการลงเกาะ (รูปที่ 16)

ในระยะนี้ notochord หดสั้นลงมากขึ้น ในส่วนอื่นจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อย

5) 3 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ (รูปที่ 17)

ตัวอ่อนมีพัฒนาการเพิ่มขึ้นมาก โดย stolon มีขนาดใหญ่ขึ้น เจริญปกคลุมอวัยวะสำหรับยึดเกาะ รูปร่างของส่วนหัวเปลี่ยนแปลงโดยมีลักษณะรูปร่างเป็น barrel shape ซึ่งแสดงลักษณะเข้าสู่รูปร่างของตัวอ่อนระยะวัยรุ่น (Juvenile) ตัวอ่อนเริ่มมีการแยกส่วนระหว่างทางน้ำเข้าและทางน้ำออก (Branchail aperture และ Atrial aperture) ในขณะเดียวกัน notochord หดกลับเข้าไปในส่วนหัวได้มากกว่าครึ่งหนึ่งของความยาว notochord เริ่มต้น ระยะนี้ตัวอ่อนถูกปกคลุมด้วย tunic ทั้งหมด และยังไม่กินอาหาร

6) 6 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ (รูปที่ 18)

การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ notochord หดกลับเข้ามาอยู่ส่วนหัวทั้งหมด โดยจะพัฒนาเป็นปมประสาท (Nerve ganglion) เนื้อเยื่อบริเวณจุดเชื่อมต่อระหว่างส่วนหัวและส่วนหางเริ่มขอดเข้าหากัน

7) 9 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ (รูปที่ 19)

อวัยวะภายในที่สำคัญได้มีการพัฒนา ได้แก่ branchial basket กระเพาะอาหาร และลำไส้ (Intestine) ทางน้ำเข้าและทางน้ำออกแยกออกจากกันอย่างชัดเจน notochord หดกลับเข้ามาอยู่ในส่วนหัวเป็นส่วนใหญ่ เนื้อเยื่อบริเวณจุดเชื่อมต่อระหว่างส่วนหัวและส่วนหางเริ่มขอดเข้าหากันมากขึ้น เพื่อปิดกั้นระหว่างช่องว่างของ notochord ในส่วนหางและส่วนหัว

8) 12 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ (รูปที่ 20)

Nerve cord ที่ทอดยาวใต้ notochord หดกลับเข้ามากลายเป็นปมประสาท และพัฒนาอยู่ภายในส่วนหัวของตัวอ่อนทั้งหมด เนื้อเยื่อบริเวณจุดเชื่อมต่อระหว่างส่วนหัวและส่วนหางขอดเข้าหากันจนปิดสนิท คงเหลือส่วนหางที่เป็นโครงสร้าง tunic และไม่มี notochord อยู่ภายใน ซึ่งส่วนหางได้หมดหน้าที่ลงในระยะนี้ ทางน้ำเข้าและทางน้ำออกขยายขนาดชัดเจนขึ้น

9) 15 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ (รูปที่ 21)

ตัวอ่อนมีขนาดเพิ่มขึ้น ส่วนที่เป็น tunic บริเวณทางน้ำเข้าและทางน้ำออก บางลง และมีรูปทรงแบบ barrel shape ชัดเจนขึ้น

10) 18 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ (รูปที่ 22)

ตัวอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา 15 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

11) 21 ชั่วโมงหลังการลงเกาะ (รูปที่ 23)

ทางน้ำเข้าและทางน้ำออก ของตัวอ่อนในระยะนี้ขยายใหญ่ขึ้น tunic บางลงมาก

1.3 ระยะวัยรุ่น (Juvenile stage)

เป็นระยะที่สำคัญมาก สังเกตจาก branchail aperture ซึ่งเป็นทางน้ำเข้าและ Atrial aperture หรือทางน้ำออกเปิดสู่ภายนอก ทำให้ร่างกายมีการแลกเปลี่ยนน้ำ และเริ่มกินอาหาร

1) 24 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ (รูปที่ 24)

พบว่าตัวอ่อนได้พัฒนาเข้าสู่ระยะวัยรุ่นโดยสมบูรณ์ โดยจะเห็นได้จากทางน้ำเข้าและทางน้ำออกเปิดสู่ภายนอกอย่างชัดเจน มีการแลกเปลี่ยนน้ำและเริ่มกินอาหาร พบว่าสิ่งขับถ่ายเกิดขึ้นในลำไส้ซึ่งจะนำออกภายนอกร่างกายทางช่องน้ำออก

2) 27 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ (รูปที่ 25)

ตัวอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น ระบบการแลกเปลี่ยนน้ำ การกินอาหาร และการขับถ่ายมีการทำงานต่อเนื่อง nerve ganglion ยังคงปรากฏอยู่ในตัวอ่อน ในขณะเดียวกัน stolon แผ่ขยายยาวออกไปและแตกแขนง

3) 33 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ (รูปที่ 26)

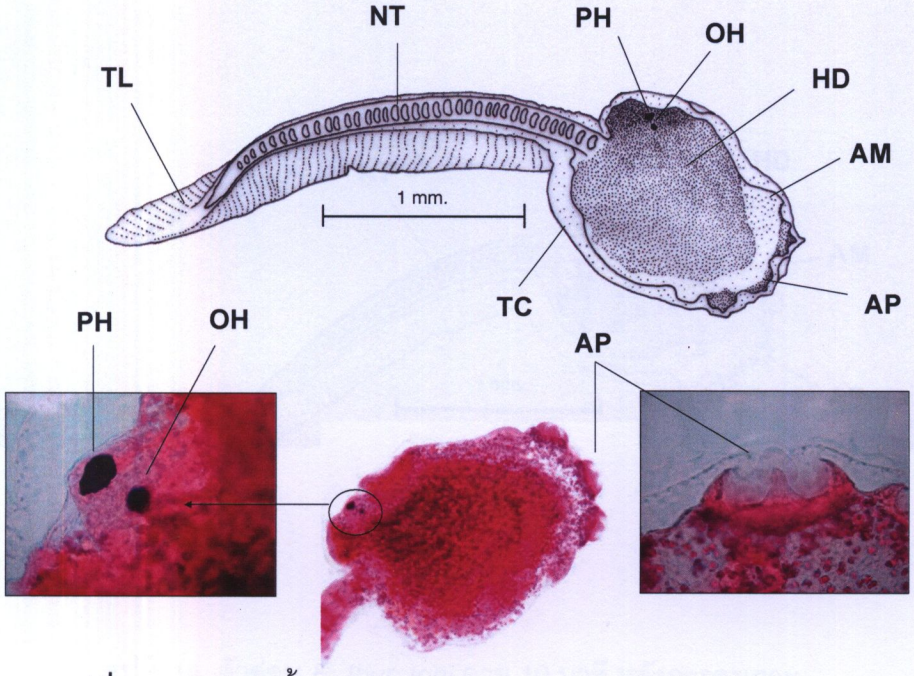
ตัวอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น ทางน้ำเข้าและทางน้ำออกขยายใหญ่ขึ้นอย่างชัดเจน nerve ganglion มีขนาดลดลงและมีรูปทรงเปลี่ยนไป ส่วนหางที่เหลือเฉพาะโครงสร้างที่เป็น tunic ยังคงปรากฏอยู่

4) 72 ชั่วโมงหลังการลงเกาะ (รูปที่ 27)

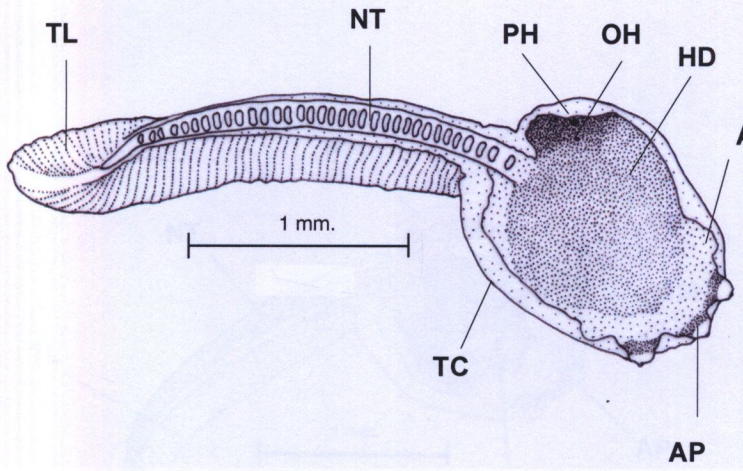
พบว่า nerve ganglion มีขนาดลดลงมาก ตัวอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น stolon ขยายยาวออกไปมากกว่าช่วงที่ผ่านมา

ตารางที่1. อักษรย่อ ชื่อภาษาอังกฤษ และชื่อภาษาไทยในอวัยวะต่างๆ ที่ใช้ในพัฒนาการตัวอ่อน

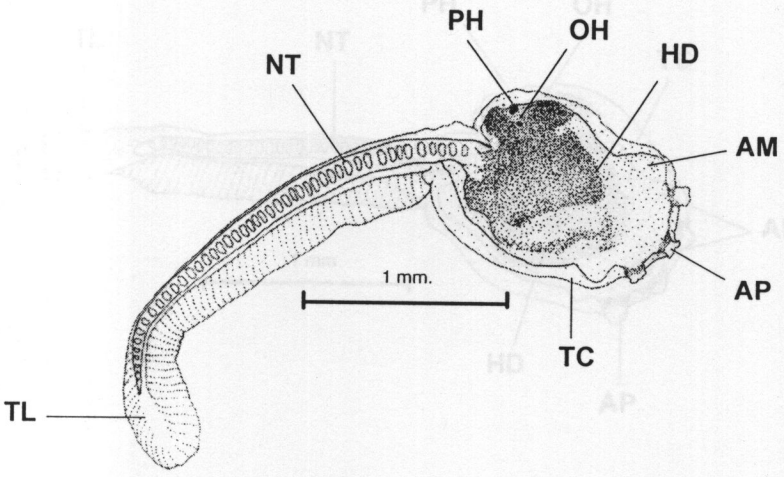
คำย่อ	ชื่อภาษาอังกฤษ	ชื่อภาษาไทย	หมายเหตุ
AA	Atrial aperture	ทางน้ำออก	เป็นช่องทางนำน้ำและสิ่งขับถ่ายออกสู่ภายนอกร่างกาย
AM	Ampulla	-	อวัยวะที่พัฒนาเป็น stolon ภายหลังทำการลงเกาะบนพื้นผิว
AP	Attachment process	-	อวัยวะสำหรับยึดเกาะ
BA	Branchial aperture	ทางน้ำเข้า	เป็นช่องทางนำน้ำและอาหารเข้าสู่ร่างกาย
BB	Branchial basket	-	ใช้ดักกรองอาหารที่ปนอยู่ในน้ำที่นำเข้าสู่ร่างกาย
HD	Head	หัว	-
IN	Intestine	ลำไส้	-
NG	Nerve Ganglion	ปมประสาท	พัฒนามาจากเส้นประสาทในส่วนหาง
NT	Notochord	-	เป็นแกนค้ำจุนร่างกายอยู่ในส่วนหางของตัวอ่อนระยะว่ายน้ำอิสระ
OH	Otolith	-	เป็นอวัยวะตอบสองต่อแรงโน้มถ่วง
PH	Photolith	-	เป็นอวัยวะตอบสนองต่อแสงสว่าง
SL	Stolon	-	พัฒนาการมาจาก Ampulla หลังการลงเกาะ
ST	Stomach	กระเพาะอาหาร	-
TC	Tunic	-	เป็นเนื้อเยื่อหุ้มร่างกาย
TL	Tail	หาง	



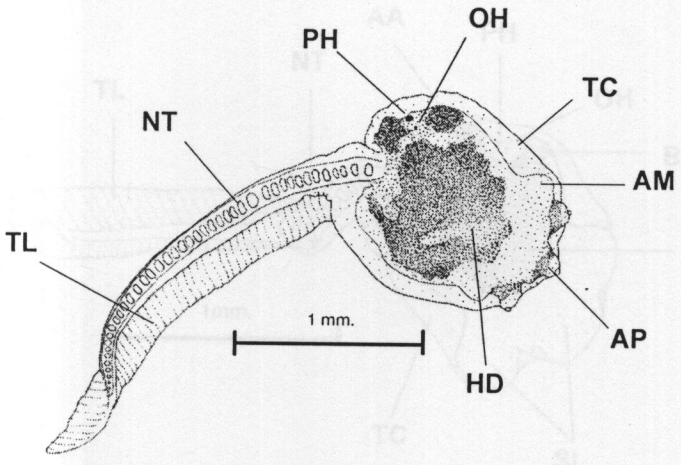
รูปที่ 12. ระยะว่ายน้ำอิสระของ *E. thurstoni* (Tadpole larva stage)



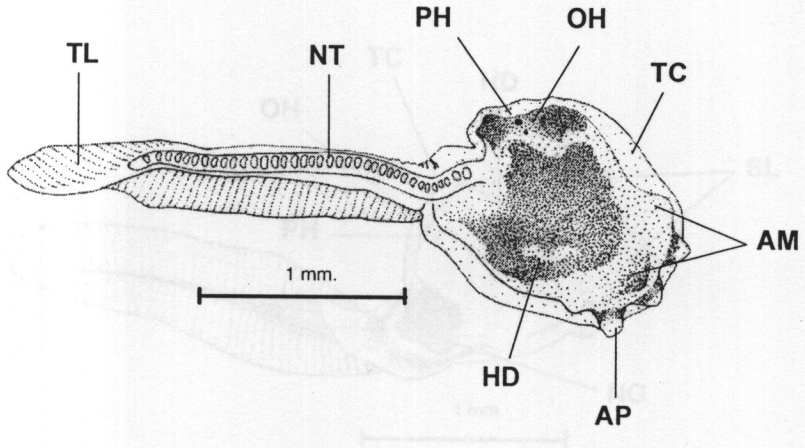
รูปที่ 13. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 5 นาที หลังการลงเกาะ



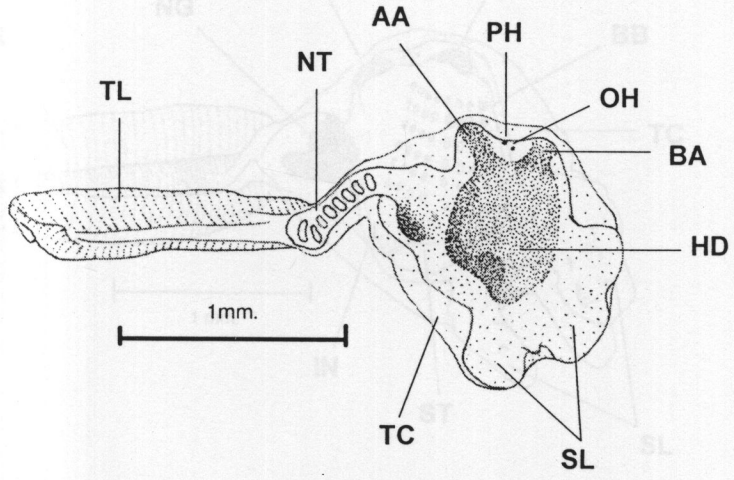
รูปที่ 14. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 10 นาที หลังการลงเกาะ



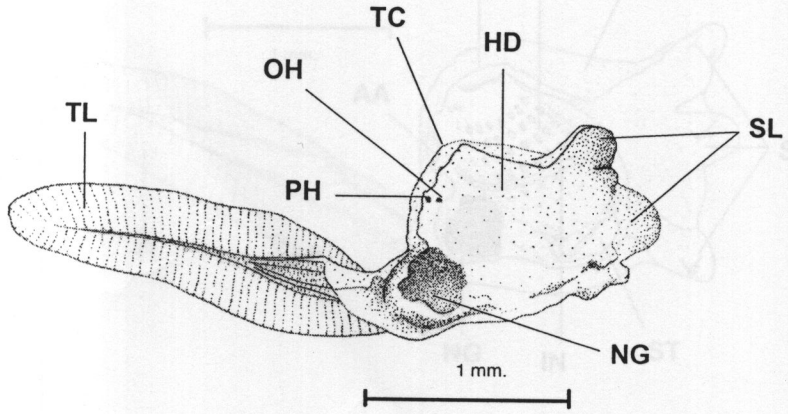
รูปที่ 15. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 15 นาที หลังการลงเกาะ



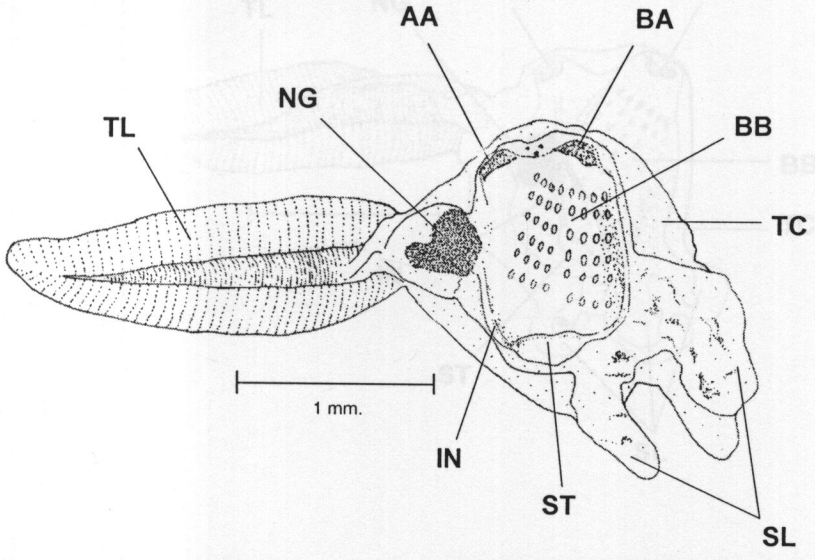
รูปที่ 16. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 30 นาที หลังการลงเกาะ



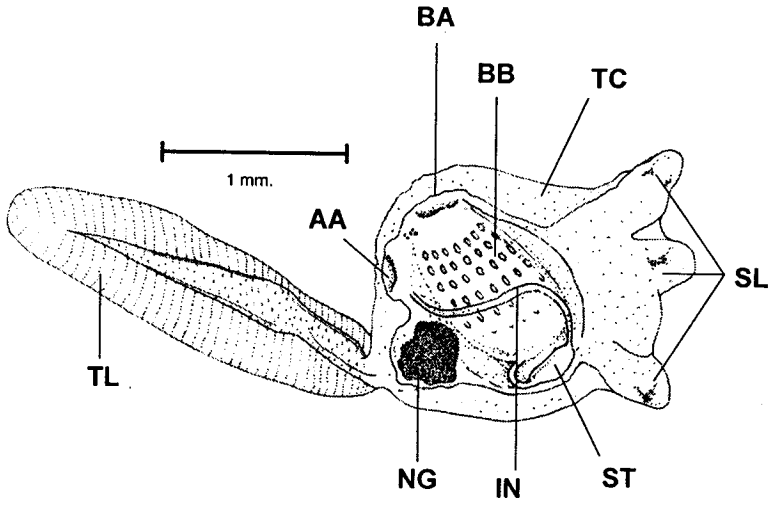
รูปที่ 17. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 3 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ



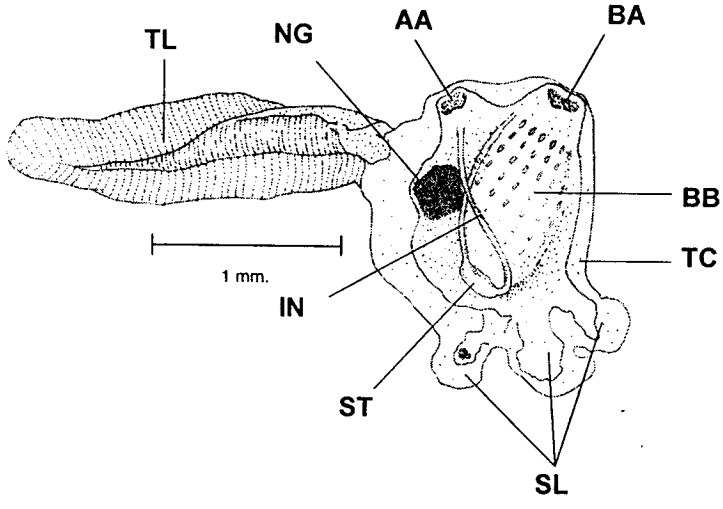
รูปที่ 18. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 6 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ



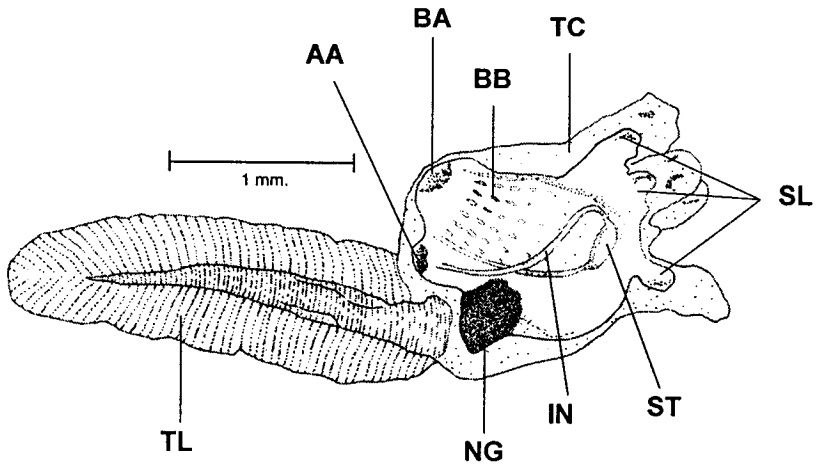
รูปที่ 19. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 9 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ



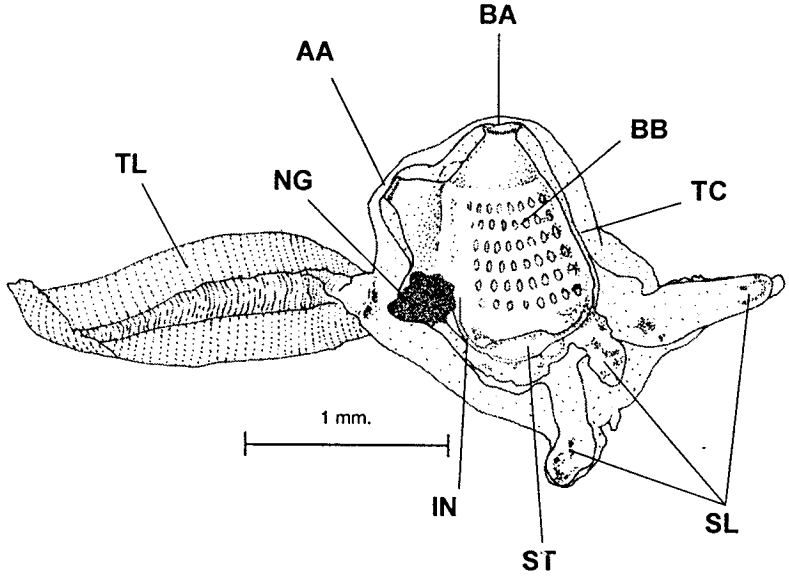
รูปที่ 20. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 12 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ



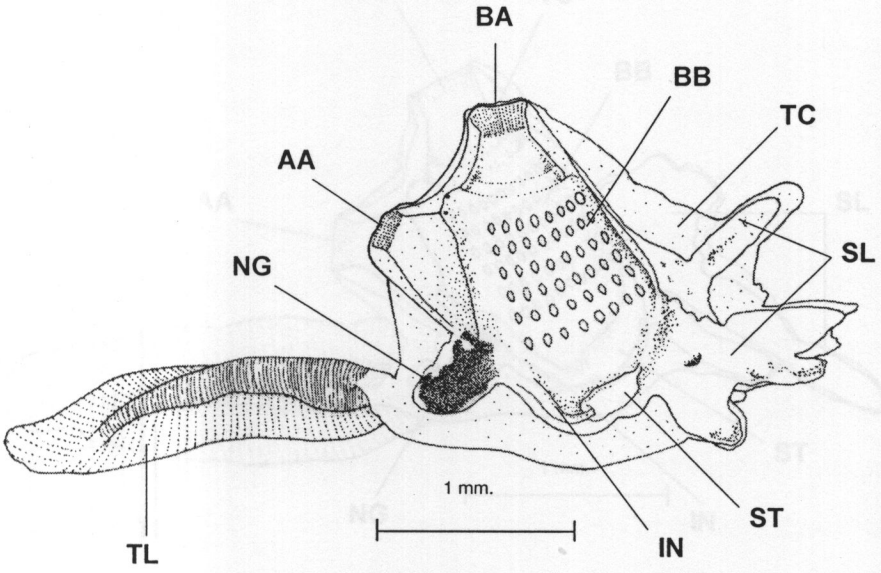
รูปที่ 21. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 15 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ



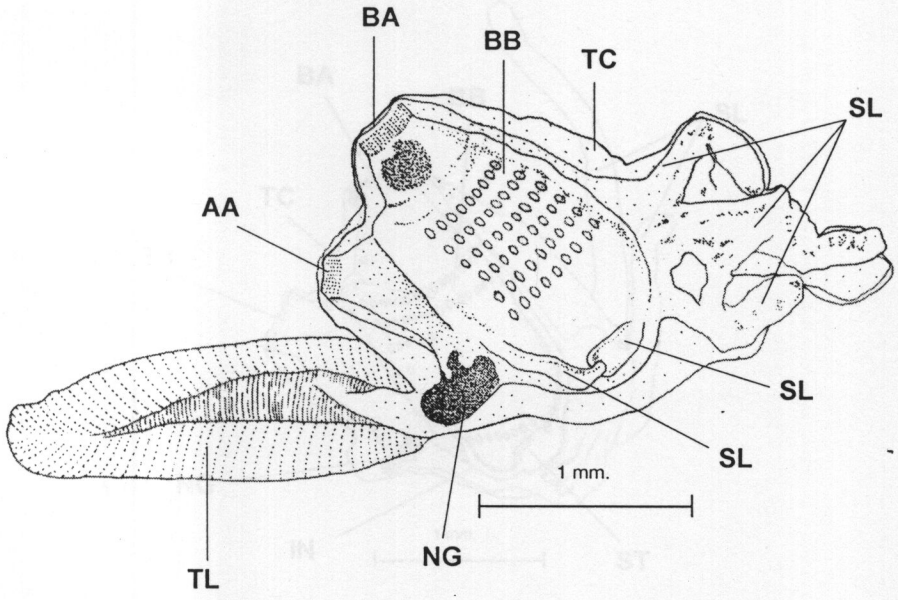
รูปที่ 22. ตัวอ่อนเ *E. thurstoni* อายุ 18 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ



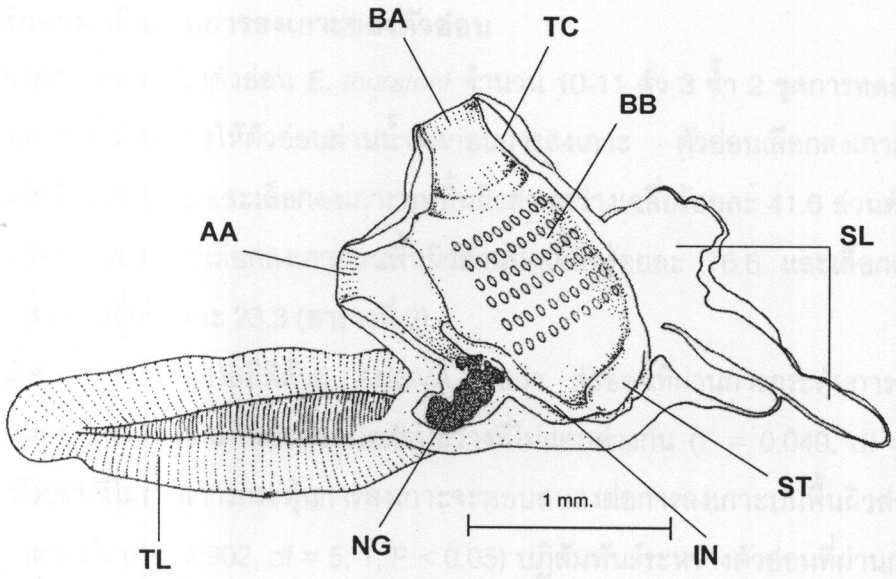
รูปที่ 23. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 21 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ



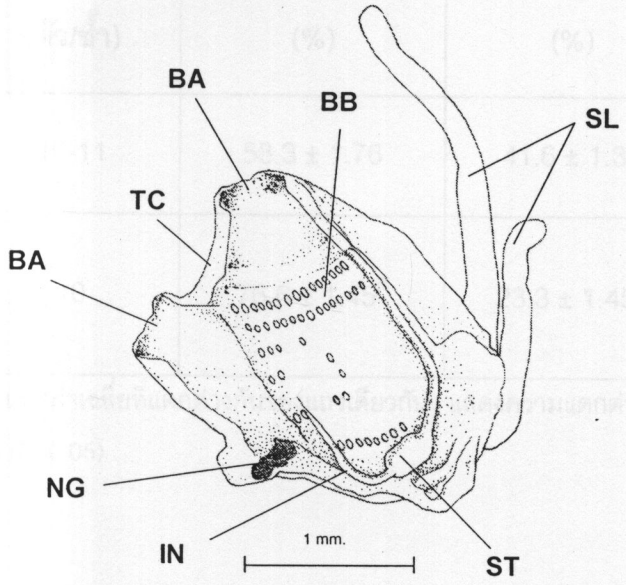
รูปที่ 24. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 24 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ



รูปที่ 25. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 27 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ



รูปที่ 26. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 33 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ



รูปที่ 27. ตัวอ่อน *E. thurstoni* อายุ 72 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

2. การศึกษาพฤติกรรมการลงเกาะของตัวอ่อน

จากการทดลองในตัวอ่อน *E. thurstoni* จำนวน 10-11 ตัว 3 ซ้ำ 2 ชุดการทดลอง พบว่าตัวอ่อนที่ถูกกระตุ้นโดยการให้ตัวอ่อนผ่านน้ำจืดก่อนการลงเกาะ ตัวอ่อนเลือกลงเกาะบนพื้นผิวส่วนมืดเฉลี่ยร้อยละ 58.3 และเลือกลงเกาะบนพื้นผิวส่วนสว่างเฉลี่ยร้อยละ 41.6 ส่วนตัวอ่อนที่ไม่ถูกกระตุ้นก่อนการลงเกาะเลือกลงเกาะบนพื้นผิวส่วนมืดเฉลี่ยร้อยละ 76.6 และเลือกลงเกาะบนพื้นผิวส่วนสว่างเฉลี่ยร้อยละ 23.3 (ตารางที่ 2)

เมื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วย ANOVA พบว่า ตัวอ่อนที่ผ่านการกระตุ้นการลงเกาะจะตอบสนองต่อการลงเกาะบนพื้นผิวส่วนมืดส่วนสว่างที่ไม่แตกต่างกัน ($F = 0.049$, $df = 5, 1$, $P > 0.05$) ตัวอ่อนที่ไม่ผ่านการกระตุ้นการลงเกาะจะตอบสนองต่อการลงเกาะบนพื้นผิวส่วนมืดส่วนสว่างที่แตกต่างกัน ($F = 5.902$, $df = 5, 1$, $P < 0.05$) ปฏิสัมพันธ์ระหว่างตัวอ่อนที่ผ่านการกระตุ้นและไม่ผ่านการกระตุ้นต่อการลงเกาะบนพื้นผิวส่วนมืดส่วนสว่างไม่แตกต่างกัน ($F = 1.220$, $df = 11, 1$, $P > 0.05$)

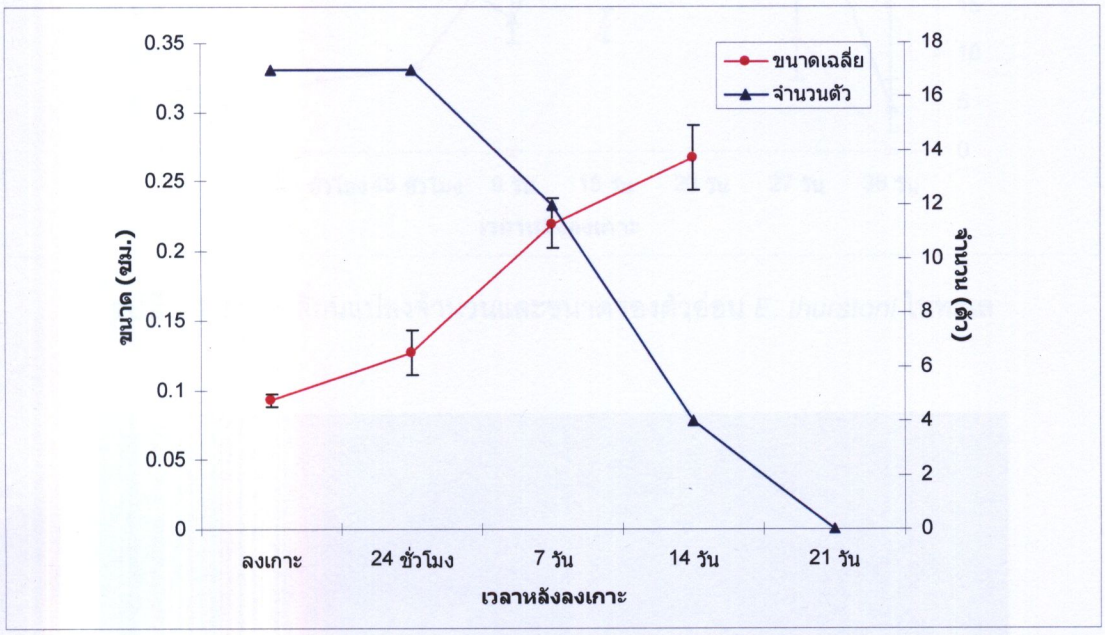
ตารางที่ 2. อัตราการลงเกาะของตัวอ่อน *E. thurstoni*

แผนการทดลอง	**จำนวนตัวอ่อน (ตัว/ซ้ำ)**	**ลงเกาะในส่วนมืด (%)**	**ลงเกาะในส่วนสว่าง (%)**	**จำนวนซ้ำการทดลอง**
ตัวอ่อนผ่านการกระตุ้น	10-11	58.3 ± 1.76	41.6 ± 1.33	3
ตัวอ่อนไม่ผ่านการกระตุ้น	10	76.6 ± 1.45[a]	23.3 ± 1.45[b]	3

หมายเหตุ : อักษรยกเหนือค่าเฉลี่ยที่แตกต่างกันของแถวเดียวกัน แสดงความแตกต่างกันของค่าเฉลี่ยอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)

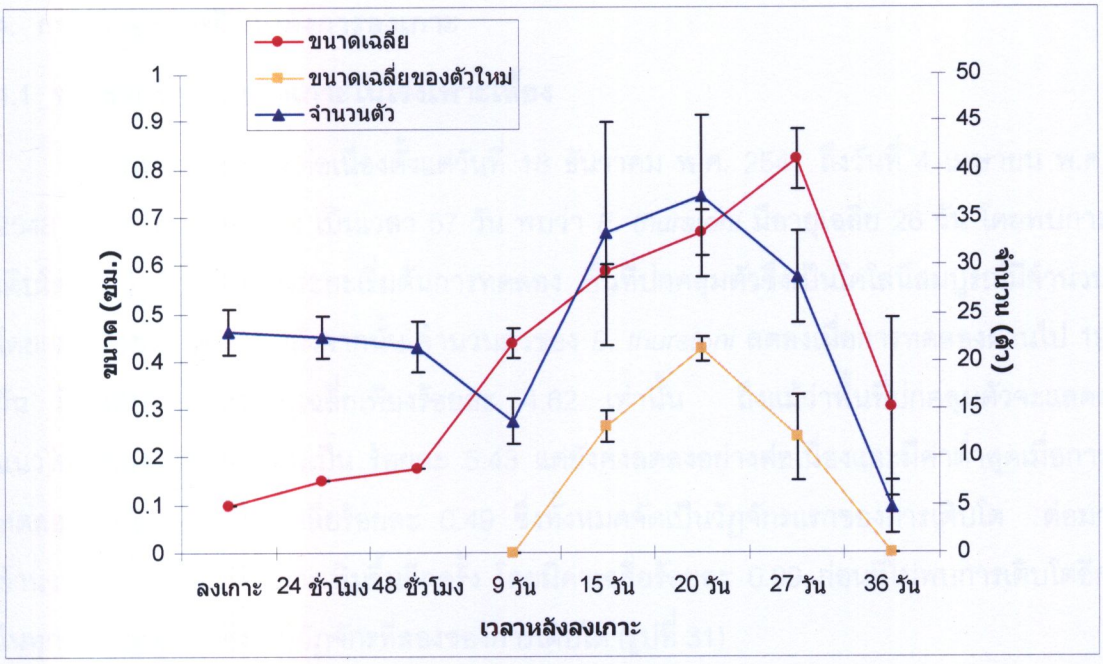
3. การเติบโตของตัวอ่อนในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล

การเติบโตของตัวอ่อน *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง พบว่า ตัวอ่อนมีจำนวนคงที่จนถึงช่วงอายุ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวนตัวอ่อนค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง ในขณะเดียวกัน ขนาดของตัวอ่อนเพิ่มขึ้นสูงที่สุดที่ช่วงอายุ 14 วัน โดยมีขนาดเฉลี่ย 0.27 เซนติเมตร หลังจากนั้นจำนวนตัวอ่อนลดลงจนตายทั้งหมดในที่สุดที่ช่วงอายุ 21 วันหลังการลงเกาะ (รูปที่ 28)

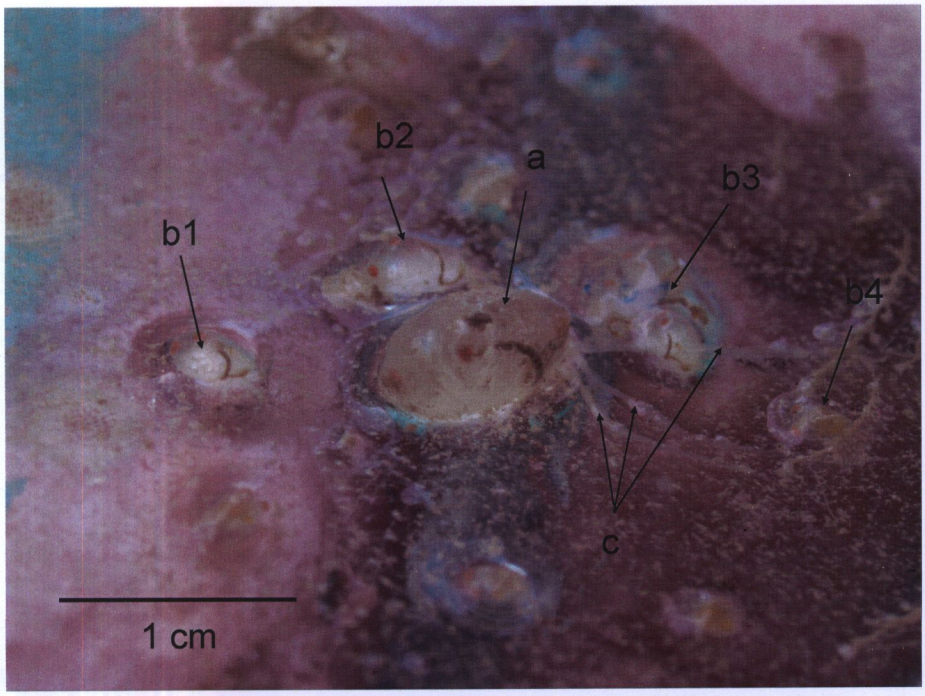


รูปที่ 28. การเปลี่ยนแปลงจำนวนและขนาดของตัวอ่อน *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง

การเติบโตของตัวอ่อน *E. thurstoni* ในทะเล พบว่าในระยะแรกตั้งแต่ลงเกาะจนกระทั่งอายุ 9 วัน ตัวอ่อนมีจำนวนลดลง หลังจากนั้นตัวอ่อนมีจำนวนเพิ่มขึ้น และเพิ่มขึ้นมากที่สุดที่ตัวอ่อนอายุ 20 วัน หลังจากนั้นจำนวนตัวอ่อนจะลดลง และลดลงน้อยที่สุดเมื่อตัวอ่อนมีอายุ 36 วัน ในขณะเดียวกันขนาดของตัวอ่อนเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ซึ่งมีขนาดโตที่สุด 0.82 เซนติเมตรโดยเฉลี่ย ที่อายุ 27 วัน นอกจากนี้ยังพบว่า มีการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อเกิดขึ้นในตัวอ่อนตั้งต้น (Pioneer zooid) ที่มีอายุ 15 วัน ทำให้ได้ตัวอ่อนขนาดเล็กตัวใหม่ ซึ่งตัวอ่อนที่เกิดใหม่นั้นมีขนาดโตที่สุดที่อายุ 20 วัน หลังจากนั้นการเติบโตเริ่มลดลง จนไม่มีตัวอ่อนใหม่เกิดขึ้นอีกในช่วงอายุ 36 วัน (รูปที่ 29 และ 30)



รูปที่ 29. การเปลี่ยนแปลงจำนวนและขนาดของตัวอ่อน *E. thurstoni* ในทะเล



รูปที่ 30. ตัวอ่อน *E. thurstoni* จากการเลี้ยงในทะเล

a) ตัว *E. thurstoni* เริ่มแรก (Pioneer zooid) มีขนาดใหญ่กว่าตัวอ่อนที่เกิดใหม่.

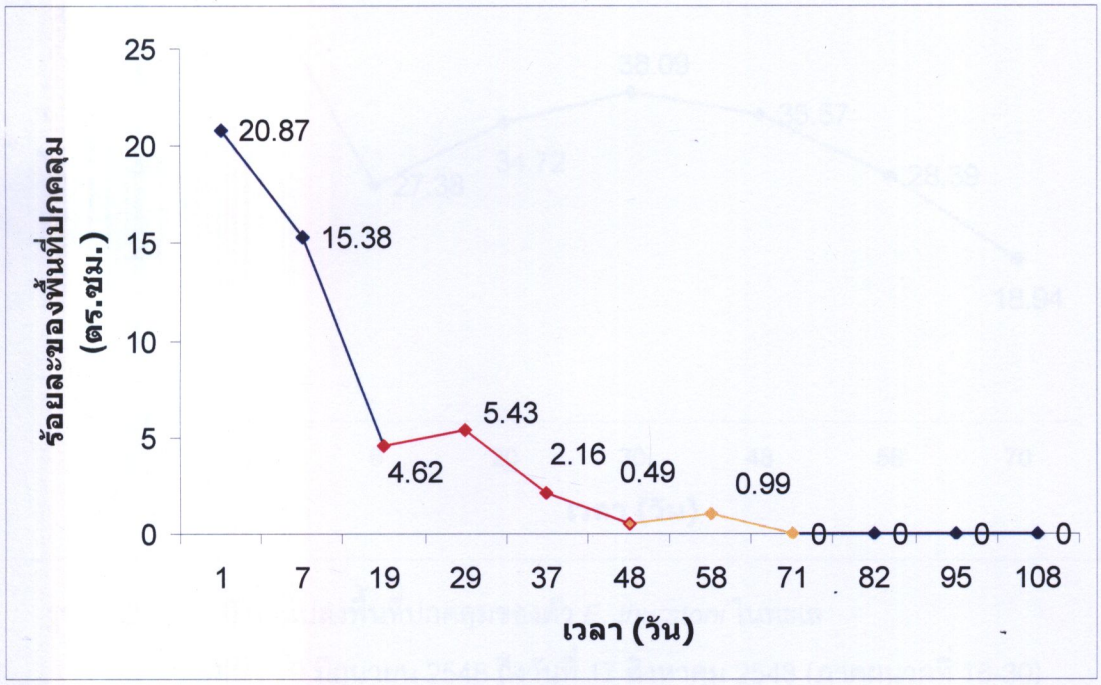
b1-b4) ตัวอ่อน *E. thurstoni* เกิดใหม่จากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (Budding).

c) stolonic vessel ที่ตัว *E. thurstoni* เริ่มแรกพัฒนาขึ้นเพื่อสร้างโคโลนีใหม่โดยการแตกหน่อ.

4. การศึกษาช่วงชีวิตหลังการลงเกาะ

4.1 ช่วงชีวิตหลังการลงเกาะในโรงเพาะเลี้ยง

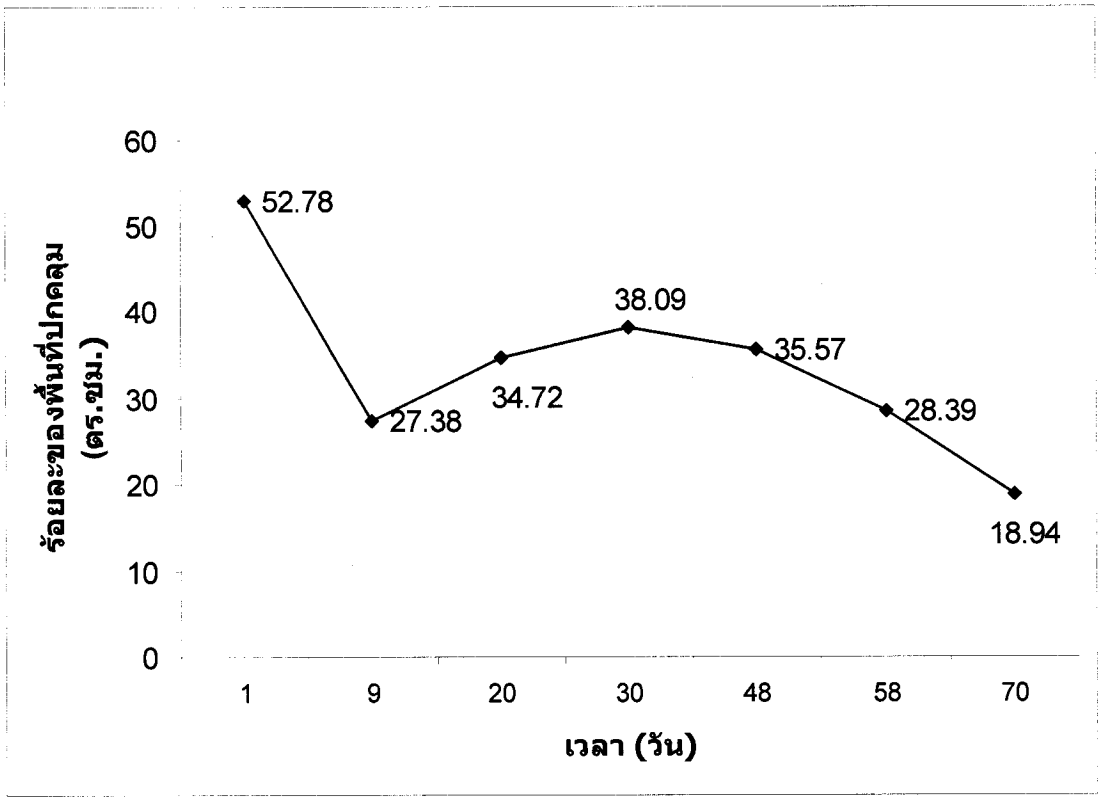
จากการเก็บข้อมูลต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 18 ธันวาคม พ.ศ. 2547 ถึงวันที่ 4 เมษายน พ.ศ. 2548 ใน 15 หน่วยทดลอง เป็นเวลา 57 วัน พบว่า *E. thurstoni* มีอายุเฉลี่ย 26 วัน โดยพบการเติบโต 2 วัฏจักร โดยในระยะเริ่มต้นการทดลอง พื้นที่ปกคลุมตัวซึ่งเป็นโคโลนีสมบูรณ์มีจำนวนโดยเฉลี่ยร้อยละ 20.87 หลังจากนั้น จำนวนตัวของ *E. thurstoni* ลดลงเมื่อการทดลองผ่านไป 19 วัน มีพื้นที่ปกคลุมตัวโดยเฉลี่ยเพียงร้อยละ 4.62 เท่านั้น ถึงแม้ว่าพื้นที่ปกคลุมตัวจะแสดงแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังจากนั้นเป็น ร้อยละ 5.43 แต่ยังคงลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าต่ำสุดเมื่อการทดลองผ่านไป 48 วัน เฉลี่ยร้อยละ 0.49 ซึ่งทั้งหมดจัดเป็นวัฏจักรแรกของการเติบโต ต่อมาจำนวนพื้นที่ปกคลุมตัวมีการเพิ่มขึ้นอีกครั้ง โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.99 ก่อนที่ไม่พบการเติบโตอีกในทุกหน่วยทดลอง ซึ่งเป็นวัฏจักรที่สองของการเติบโต (รูปที่ 31)



รูปที่ 31. การเปลี่ยนแปลงพื้นที่ปกคลุมของตัว *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง ตั้งแต่วันที่ 18 ธันวาคม พ.ศ.2547 ถึงวันที่ 4 เมษายน พ.ศ.2548. (ภาคผนวกที่1-15)

4.2 ช่วงชีวิตหลังการลงเกาะในทะเล

จากการเก็บข้อมูลต่อเนื่องตั้งแต่ วันที่ 9 มิถุนายน พ.ศ.2548 ถึงวันที่ 17 สิงหาคม พ.ศ. 2548 เป็นเวลาตลอดการทดลอง 70 วัน พบว่า *E. thurstoni* มีอายุตามธรรมชาติประมาณ 60 วัน ขณะเริ่มการทดลอง โดยพื้นที่ปกคลุมตัวโดยเฉลี่ยมีจำนวนร้อยละ 52.78 เมื่อดำเนินการทดลองผ่านไป 8 วัน พื้นที่ปกคลุมตัวโดยเฉลี่ยลดลงเหลือร้อยละ 27.38 หลังจากนั้น จึงเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดอีกครั้งที่ร้อยละ 38.09 เมื่อผ่านไป 30 วัน จากนั้นจึงเริ่มลดจำนวนลงและมีค่าต่ำที่สุดที่ร้อยละ 18.94 ในระยะ 70 วันตั้งแต่เริ่มทำการทดลอง (รูปที่ 32)



รูปที่ 32. การเปลี่ยนแปลงพื้นที่ปกคลุมของตัว *E. thurstoni* ในทะเล ตั้งแต่วันที่ 9 มิถุนายน 2548 ถึงวันที่ 17 สิงหาคม 2548 (ภาคผนวกที่ 16-30)

5. การศึกษาองค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหารและองค์ประกอบชนิดของแพลงก์ตอนพืชบริเวณแหล่งธรรมชาติ

5.1 องค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหารและองค์ประกอบชนิดแพลงก์ตอนพืชบริเวณท่าเรือ สวพ ภูเก็ต (ตารางที่ 3)

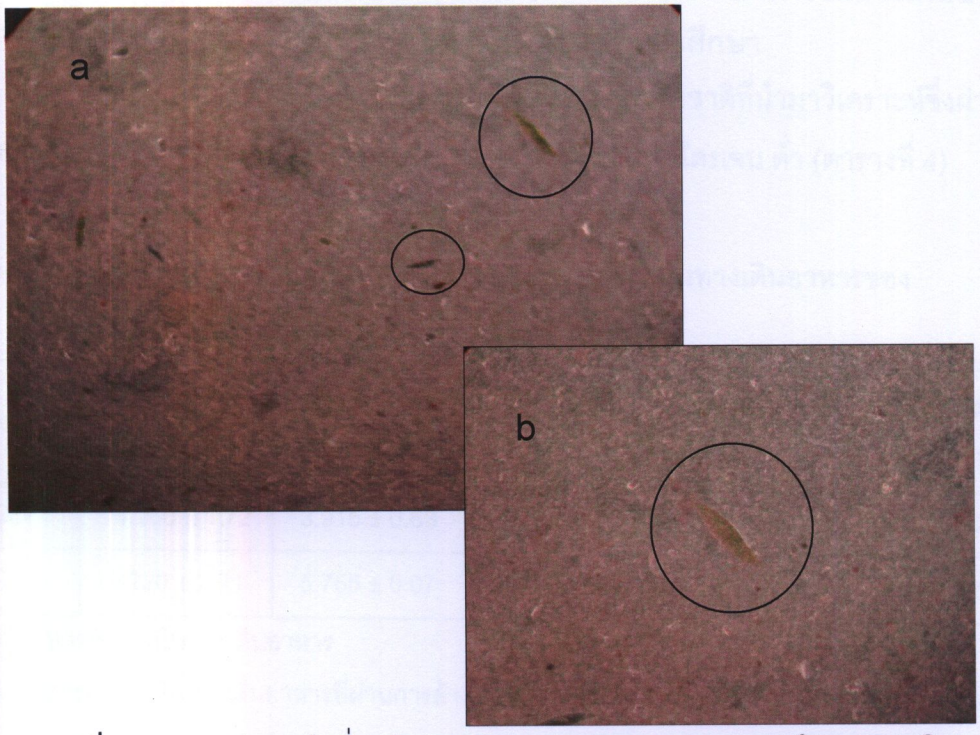
จากการศึกษาชนิดแพลงก์ตอนพืชตลอดทั้งปีบริเวณท่าเรือ สวพ ภูเก็ต โดยกลุ่มประเมินสภาวะทรัพยากรและผลผลิตชีวภาพทางทะเลและชายฝั่ง สวพ ภูเก็ต พบจำนวนแพลงก์ตอนพืชบริเวณนั้น 42 ชนิด สำหรับการศึกษาครั้งนี้เฉพาะในช่วงที่ *E. thurstoni* ในธรรมชาติบริเวณดังกล่าวมีการเติบโตเต็มที่ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม พบว่า องค์ประกอบของชนิดแพลงก์ตอนพืชมีจำนวน 16 ชนิด ในขณะที่พบเพียง 5 ชนิดในทางเดินอาหารของ *E. thurstoni* ทั้งนี้ สภาพของเซลล์แพลงก์ตอนพืชที่พบในทางเดินอาหารส่วนมากมีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์ ยกเว้น *Gyrosigma* Sp. และ *Pleurosigma* sp. (รูปที่ 33) อย่างไรก็ตาม สิ่งที่พบส่วนใหญ่ในทางเดินอาหารมีลักษณะเป็นอนุภาคอินทรีย์ขนาดเล็ก ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ (รูปที่ 34)

ตารางที่ 3. ชนิดแพลงก์ตอนพืชที่พบ

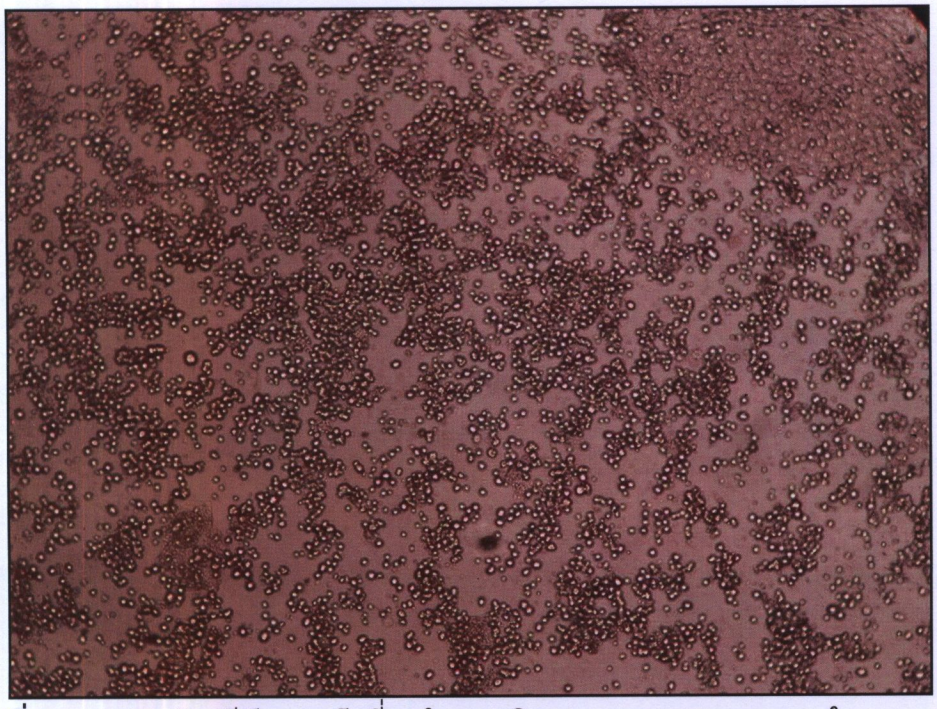
ชนิดของแพลงก์ตอนพืชที่พบบริเวณท่าเรือ สวพ ภูเก็ต		
ชนิดทั้งหมดที่พบในช่วงปี	**ชนิดที่พบระหว่างเดือน กค.-สค.(ช่วงที่ *E. thurstoni* เติบโตเต็มที่)**	
	พบในธรรมชาติ	**พบในทางเดินอาหาร**
Amphora sp.	/	
Amphiprora sp.		
Asterionella sp.		
Asteromphalus sp.		
Bacillaria sp.	/	
Bacteriastrum sp.	/	
Bellerochea sp.		
Ceratium sp.	/	
Chaetoceros sp.	/	/
Climacodium sp.		
Corethron sp.		
Coscinodiscus sp.	/	
Dactyliosolen sp.		
Dictyocysta sp		

ตารางที่ 3. (ต่อ)

ชนิดของแพลงก์ตอนพืชที่พบบริเวณท่าเรือ สวพ ภูเก็ต		
ชนิดทั้งหมดที่พบในช่วงปี	**ชนิดที่พบระหว่างเดือน กค.-สค.(ช่วงที่ *E. thurstoni* เติบโตเต็มที่)**	
	พบในธรรมชาติ	**พบในทางเดินอาหาร**
Diploneis sp.		
Diplopsalopsis sp.		
Ditylum sp.	/	
Eucampia sp.	/	
Guinardia sp.	/	/
Gyrosigma sp.	/	/
Hemiaulus sp.	/	
Lauderia sp.		
Leptocylindrus sp.		
Licmophora sp.		
Navicula sp.		
Nitzschia sp.	/	
Odontella sp.		
Oscillatoria sp.		
Palmeria sp.		
Pleurosigma sp.	/	/
Podolampas sp		
Protoperidinium sp.	/	
Peridinium sp.		
Rhizosolinia sp.	/	
Synedra sp.		
Skeletonema sp.		
Surirella sp.		
Saticholonshe sp.		
Strauracantha sp.		
Thalassiosira sp.		
Thalassionema sp.	/	/
Thallassiothrix sp.		
รวม 42 ชนิด	16	5



รูปที่ 33. แพลงก์ตอนพืชที่พบในทางเดินอาหารของ *E. thurstoni* ในธรรมชาติ
a) ไดอะตอม. b) *Gyrosigma/Pleurosigma* sp.



รูปที่ 34. อนุภาคอินทรีย์ขนาดเล็กที่พบในทางเดินอาหารของ *E. thurstoni* ในธรรมชาติ

5.2 อัตราส่วน คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน (CHN ratio) ของอาหารในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอมและสารอินทรีย์แขวนลอยในทะเลบริเวณศึกษา

พบว่าในทุกตัวอย่างอาหารจาก *E. thurstoni* ในธรรมชาติที่นำมาวิเคราะห์ซึ่งผ่านการขจัดเกลือและไม่ขจัดเกลือ มีอัตราส่วนของคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ต่ำ (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4. อัตราส่วนคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ของอาหารในทางเดินอาหารของ *E. thurstoni* ในธรรมชาติ

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ร้อยละของ คาร์บอน	ร้อยละของ ไฮโดรเจน	ร้อยละของ ไนโตรเจน	ร้อยละของ สารอนินทรีย์
GS	14.260 ± 1.72	3.915 ± 0.63	1.610 ± 0.11	0.483 ± 0.12	93.992
GF	9.220 ± 2.71	5.755 ± 0.07	1.810 ± 0.03	0.730	91.705

GS = สารอินทรีย์ในทางเดินอาหาร

GF = สารอินทรีย์ในทางเดินอาหารที่ผ่านการล้างด้วยน้ำจืดเพื่อขจัดเกลือ

เช่นเดียวกับอัตราส่วนของคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ของสารอินทรีย์แขวนลอยในทะเลบริเวณศึกษาที่พบว่า ทุกตัวอย่างทั้งที่ผ่านการขจัดเกลือและไม่ขจัดเกลือ มีอัตราส่วนของคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจนต่ำ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5. อัตราส่วนคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน ของสารอินทรีย์แขวนลอยในทะเลบริเวณแหล่งที่อยู่ธรรมชาติของ *E. thurstoni*

ตัวอย่าง	น้ำหนัก (มิลลิกรัม)	ร้อยละของ คาร์บอน	ร้อยละของ ไฮโดรเจน	ร้อยละของ ไนโตรเจน	ร้อยละของ สารอนินทรีย์
OS	16.850 ± 2.57	3.476 ± 0.56	1.056 ± 0.06	0.523 ± 0.33	94.945
OF	20.100 ± 1.84	3.650 ± 0.35	1.086 ± 0.01	0.223 ± 0.01	95.041

OS = สารอินทรีย์แขวนลอยในทะเลบริเวณแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ

OF = สารอินทรีย์แขวนลอยในทะเลบริเวณแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติที่ผ่านการล้างด้วยน้ำจืดเพื่อขจัดเกลือ

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน

ตัวอ่อน *E. thurstoni* ที่ผ่านการกระตุ้นให้ลงเกาะเริ่มมีพัฒนาการหลังจากลงเกาะแล้วประมาณ 10 นาที โดยอวัยวะแรกที่สามารถสังเกตเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ คือ notochord จากนั้นเมื่อตัวอ่อนลงเกาะได้ 3 ชั่วโมง notochord มีการเปลี่ยนแปลงโดยหดสั้นลงเหลือความยาวประมาณครึ่งหนึ่งของความยาวทั้งหมด ตัวอ่อนระยะนี้มีการเปลี่ยนรูปร่างเล็กน้อย บริเวณส่วนหัวมีรูปทรงแบบ barrel shape สามารถสังเกตเห็นทางน้ำเข้าและทางน้ำออกแยกส่วนจากกัน นอกจากนี้ stolon มีการเจริญปกคลุมอวัยวะสำหรับยึดเกาะซึ่งจะพัฒนาอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ เมื่อตัวอ่อนเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ จะเกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อจาก stolon ที่แผ่ขยายออกไปเพื่อสร้างเป็นโคโลนีใหม่ที่สมบูรณ์ (Nakauchi, 1982; Watanabe, 1988) ซึ่งการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศนั้นจะเกิดขึ้นอย่างน้อยหนึ่งครั้งในวงชีวิต และเป็นไปในลักษณะเดียวกันกับเพรียงหัวหอมทั่วไปที่ดำรงชีพเป็นโคโลนี (Satoh, 1994)

ต่อมาเมื่อตัวอ่อน *E. thurstoni* มีอายุถึง 6 ชั่วโมง notochord ได้มีการหดกลับเข้าไปในส่วนหัว ซึ่งโดยทั่วไปการหดกลับของ notochord จะเกิดขึ้นพร้อมกับการหดกลับของแกนประสาท (Nerve chord) ซึ่งพบอยู่ในโพรงของระบบประสาทที่ทอดตัวยาวขนานกับ notochord นั้น (Berrill, 1964; Sherrard, 2005) ทั้งนี้ เมื่อ notochord และเส้นประสาทหดกลับเข้ามาในส่วนหัวแล้วจะพัฒนาเป็นปมประสาท (Nerve ganglion) ต่อไป ซึ่งระบบประสาทส่วนใหญ่ของตัวอ่อนจะพัฒนาภายในลำตัวบริเวณส่วนหลังปมประสาท (Monniot *et al.*, 1991) และปมประสาทจะหายไปในที่สุดเมื่อตัวอ่อนเจริญเป็นตัวเต็มวัย (Thorson, 1964)

หลังจากนั้นเนื้อเยื่อบริเวณจุดเชื่อมต่อระหว่างส่วนหัวกับส่วนหางเริ่มขอดตัวเข้าหากันเพื่อปิดกั้นและแยกส่วนหัวออกจากส่วนหาง ซึ่งเสร็จสมบูรณ์เมื่อตัวอ่อนมีอายุ 12 ชั่วโมง ทำให้ส่วนหางหมดหน้าที่ลงเหลือเพียงโครงสร้างที่เป็น tunic ที่รอคอยการย่อยสลายต่อไป ซึ่งพบว่า ตัวอ่อนไม่มีการใช้ประโยชน์จากองค์ประกอบของ tunic ทั้งสิ้น (Monniot *et al.*, 1991)

เมื่อ *E. thurstoni* มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะวัยรุ่น (Juvenile) ในช่วงอายุ 24 ชั่วโมงหลังการลงเกาะ โดยสังเกตได้จากทางน้ำเข้าและทางน้ำออกที่เปิดออก ทำให้สามารถแลกเปลี่ยนน้ำได้ การรับอาหารโดยการกรองกินจากมวลน้ำและขับถ่ายของเสียออกสู่ภายนอกจึงเริ่มขึ้น ในขณะที่ stolon เริ่มมีการแตกแขนงและมีความยาวเพิ่มมากขึ้น ทำให้ยึดติดกับพื้นผิวได้ดีขึ้น

ปมประสาทของ *E. thurstoni* เริ่มเปลี่ยนแปลงให้เห็นเมื่อเวลาผ่านไป 33 ชั่วโมงหลังการลงเกาะ โดยมีขนาดเล็กลงอย่างต่อเนื่อง จนเล็กที่สุดเมื่อสิ้นสุดการศึกษานี้ (72 ชั่วโมงหลังการลงเกาะ) อย่างไรก็ตาม ไม่ปรากฏโครงสร้างส่วนที่เป็นหางในระยะนี้

ทั้งนี้ พัฒนาการระยะเริ่มต้นหลังการลงเกาะของ *E. thurstoni* สอดคล้องพัฒนาการของเพรียงหัวหอมทั่วไปที่พบโดยทั่วไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อตัวอ่อนอายุเพิ่มขึ้น พัฒนาการต่างๆ เช่น ทางน้ำเข้าและทางน้ำออก รวมถึงอวัยวะภายใน ได้แก่ ลำไส้ กระเพาะอาหาร และ branchial basket มีพัฒนาการเป็นไปอย่างต่อเนื่อง รวมถึง stolon ของตัวอ่อนมีขนาดและความยาวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม tunic ที่ห่อหุ้มลำตัวบางลง (Monniot *et al.*, 1991; Ruppert and Barnes, 1991; Campbell, 1999) นอกจากนั้น พัฒนาการของ *E. thurstoni* ตั้งแต่เริ่มต้นจนเป็นตัวเต็มวัย (Adult) มีความใกล้เคียงกับการศึกษาพัฒนาการของ *E. turbinata* เช่นกัน (Bingham and Young, 1991; Mendola, 2000)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า การเปลี่ยนแปลงภายนอกของ *E. thurstoni* สามารถสังเกตได้ชัดเจนกว่าการเปลี่ยนแปลงภายในร่างกาย เนื่องจากอวัยวะภายในบางระยะมีการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างช้าและมีขนาดโครงสร้างภายในที่ค่อนข้างเล็ก รวมทั้งช่วงเวลาของการเก็บข้อมูลเพื่อทำการศึกษาค่อนข้างถี่โดยเฉพาะในระยะแรกของพัฒนาการ ซึ่งเป็นข้อจำกัดในการมองเห็น จึงไม่สามารถสังเกตอวัยวะภายในได้ดีเท่าที่ควร

2. พฤติกรรมการลงเกาะของตัวอ่อน

ปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งในการเลือกพื้นที่ลงเกาะของ *E. thurstoni* คือแสง พบการกระจายและการลงเกาะของ *E. thurstoni* ในธรรมชาติบริเวณพื้นที่ที่มีแสงสว่างน้อยเป็นจำนวนมากกว่าบริเวณที่มีแสงมาก ทั้งนี้เนื่องจากมีอวัยวะรับการสัมผัสสองชนิดที่มีอยู่ในส่วนหัว ได้แก่ otolith หรือ gravity censor ที่ใช้เพื่อตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วง และ photolith หรือ photo receptor ที่ใช้เพื่อตอบสนองต่อแสงสว่าง เช่นเดียวกับเพรียงหัวหอมอื่น อวัยวะทั้งสองนี้พบเฉพาะระยะตัวอ่อนก่อนการลงเกาะเท่านั้น หลังจากนั้นจึงสลายตัวเมื่อสิ้นสุดหน้าที่ภายหลังการลงเกาะไม่นานขณะที่ตัวอ่อนมีพัฒนาการเพิ่มขึ้น (Thorson, 1964) ซึ่งโดยปกติ ตัวอ่อนเพรียงหัวหอมจะหลีกเลี่ยงพื้นที่ที่มีแสงสว่าง (Lee, 1984; Forward *et al.*, 2000) ยกเว้นเพรียงหัวหอมที่มี prochloron อาศัยร่วมอยู่ เนื่องจากมีความต้องการแสงสว่างในการดำรงชีพ (Hirose, 2004) นอกจากแสงแล้ว พบว่าสีของพื้นผิวนั้นมีผลต่อการลงเกาะเช่นกัน (Mendola, 2000)

ความมืดและความสว่างของพื้นผิวในสถานที่ที่มีแสงสว่างคงที่เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการลงเกาะ โดย *E. thurstoni* มีการลงเกาะบนพื้นผิวส่วนที่มืดมากกว่าส่วนที่สว่าง สอดคล้องกับการศึกษาในเพรียงหัวหอมหลายชนิด รวมถึง *E. turbinata* (Young, 1987;

Bingham and Young, 1991) ทั้งนี้ ไม่พบว่าปัจจัยดังกล่าวมีความสำคัญหากมีการเหนี่ยวนำโดยการกระตุ้นด้วยน้ำจืดเพื่อให้ตัวอ่อน *E. thurstoni* ลงเกาะ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลของน้ำจืดที่มีต่อประสิทธิภาพของอวัยวะที่ตอบสนองต่อแสง อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นด้วยน้ำจืดมีผลต่อการตอบสนองในระยะเวลาที่ใช้ในการลงเกาะของตัวอ่อน *E. thurstoni* ที่สั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ไม่ถูกการกระตุ้น ซึ่งเป็นข้อดีในการศึกษาพัฒนาการหลังการลงเกาะที่สามารถกำหนดและทราบจำนวนที่แน่นอนของตัวอ่อนในการลงเกาะแต่ละครั้ง ทั้งนี้ ระยะเวลาที่ใช้ในการลงเกาะตามธรรมชาติของ *E. thurstoni* และ *E. turbinata* อาจใช้เวลาในการลงเกาะโดยอิสระไม่แตกต่างกัน (Bingham and Young, 1991; Mendola, 2000)

ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งของแสงคือเป็นตัวกำหนดช่วงเวลาในการปล่อยตัวอ่อนของเพรียงหัวหอมโดยทั่วไปจากโคโลนีพ่อแม่พันธุ์ พบว่า *E. turbinata* ที่เลี้ยงในถังเลี้ยงที่ควบคุมสภาพแวดล้อม มีช่วงเวลาการปล่อยตัวอ่อนที่แน่นอนในช่วงเวลาที่ทำการเหนี่ยวนำโดยใช้แสงสว่างที่มีความเข้มสูงแทนความสว่างปกติในช่วงเวลากลางวัน (Mendola, 2000) ทั้งนี้ เพรียงหัวหอมหลายชนิดในธรรมชาติมีการเลือกเวลาในการลงเกาะในช่วงดวงอาทิตย์ขึ้นและตก (Monniot *et al.*, 1991) เนื่องจากเป็นช่วงที่มีการปล่อยตัวอ่อนของพ่อแม่พันธุ์เพรียงหัวหอมบางชนิดในธรรมชาติ และอาจมีปัจจัยแวดล้อมที่เหมาะสมต่อตัวอ่อนเพรียงหัวหอมบางชนิดในช่วงเวลาดังกล่าว

3. การเติบโตของตัวอ่อนในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล

จากการศึกษาตัวอ่อน *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยงพบว่า ตัวอ่อนไม่มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้น และเริ่มมีการลดจำนวนลงหลังการลงเกาะ 24 ชั่วโมง จนไม่พบตัวอ่อนมีชีวิตรอดในวันที่ 21 ของการศึกษา อย่างไรก็ตาม ตัวอ่อนมีขนาดตัวเพิ่มขึ้น จาก 0.1 เซนติเมตรขณะเริ่มต้น และมีขนาดสูงสุดที่ 0.27 เซนติเมตร เมื่อมีอายุ 14 วันหลังการลงเกาะ แตกต่างจากการเติบโตของตัวอ่อน *E. thurstoni* ที่ทำการเลี้ยงในทะเล โดยมีการเติบโตสูงสุดที่ช่วงอายุ 20 วัน ขนาดเฉลี่ยสูงสุด 0.82 เซนติเมตร พบตัวอ่อนที่เกิดใหม่จากการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ทั้งนี้ตัวอ่อนทั้งหมดมีอายุตลอดการทดลอง 36 วัน

การที่ตัวอ่อน *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง มีเพียงพัฒนาการสู่ระยะวัยรุ่น แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยและไม่สามารถเพิ่มจำนวนตัวโดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้นั้น อาจเนื่องมาจากปัจจัยเรื่องอาหารที่จำกัดในระบบเลี้ยง เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ ไม่มีการเสริมอาหารให้แก่ตัวอ่อนที่เลี้ยงในระบบเลี้ยง อาหารที่ได้รับจึงเป็นอาหารธรรมชาติที่ผ่านระบบกรองด้วยทรายเข้ามากับน้ำเท่านั้น ซึ่งคาดว่าไม่เพียงพอต่อความต้องการ ปัจจัยเรื่องอาหารนั้นมีความสำคัญต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอมมากเช่นกัน ดังเช่นการทดลองเลี้ยง *E. turbinata* ใน

ระบบเลี้ยงที่พบว่า การให้อาหารจำพวกแพลงก์ตอนพืชต่างชนิดกันและในปริมาณที่ต่างกัน ทำให้ *E. turbinata* มีการเติบโตที่แตกต่างกัน (Duckworth *et al.*, 2004)

สำหรับ ตัวอ่อน *E. thurstoni* ที่แยกนำไปเลี้ยงในทะเลสามารถพัฒนาได้ทั้งขนาดและจำนวนที่มากกว่า ทั้งนี้ เป็นการเพิ่มจำนวนตัวโดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกหน่อ (Nakauchi,1982; Watanabe, 19888) อีกประการหนึ่ง การที่เพรียงหัวหอมในทะเลมีขนาดใหญ่กว่าในระบบเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยงนั้น เนื่องจากในทะเลมีอาหารตามธรรมชาติที่ต้องการและมีความสมบูรณ์มากกว่าในระบบเลี้ยงของโรงเพาะเลี้ยง (Bingham and Walters, 1989; Duckworth *et al.*, 2004) มีรายงานว่า การเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม Botryllid ในประเทศญี่ปุ่นเป็นการเลี้ยงในทะเลภายหลังจากที่ได้ตัวอ่อนจากการเตรียมในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เพื่อลดปัจจัยเรื่องอาหารและเพิ่มความสมบูรณ์ของโคโลนี (Saito and Okuyama, 2003)

4. การศึกษาช่วงชีวิตหลังการลงเกาะในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล

เพรียงหัวหอม *E. thurstoni* จากธรรมชาติที่นำมาศึกษาช่วงชีวิตในโรงเพาะเลี้ยงพบว่า มีอายุประมาณ 25 วัน ซึ่งเป็นช่วงอายุที่สั้นกว่าที่ทำการเลี้ยงในทะเลที่มาอายุประมาณ 60 วัน อาจเนื่องมาจากปัจจัยเรื่องอาหารเช่นเดียวกับปัญหาในการเติบโตของตัวอ่อน *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง ทั้งนี้ เมื่อนำโคโลนีของ *E. turbinata* ตามธรรมชาติจากทะเลคาริบเบียนไปทดลองเลี้ยงในพื้นที่ต่างกัน มีผลต่อการเติบโตที่แตกต่างกัน (Bingham and young, 1991) อนึ่ง *E. turbinata* ในธรรมชาติมีช่วงอายุประมาณ 60–90 วัน (Millar, 1971; Mendola, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับอายุของ *E. thurstoni* ในธรรมชาติจากการศึกษาครั้งนี้ที่ 60 วัน

5. การศึกษาองค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหาร

จากการศึกษาองค์ประกอบของอาหารในระบบทางเดินอาหารของ *E. thurstoni* ในเดือนกรกฎาคม ถึงสิงหาคม ซึ่งเป็นช่วงที่เพรียงหัวหอมมีการเจริญเต็มที่ในธรรมชาติ พบแพลงก์ตอนพืชจำพวกไดอะตอม 5 ชนิด จากแพลงก์ตอนพืช 16 ชนิดที่พบในธรรมชาติช่วงเวลาเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการพบแพลงก์ตอนพืชจำพวกไดอะตอมในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอม 5 ชนิด ได้แก่ *Chelyosoma productum*, *Pyura haustor*, *Ascidia callosa*, *Boltenia villosa* และ *Styela gibbsii* ซึ่งอาศัยอยู่ในบริเวณเกาะซานฮวน (San Juan Islands) รัฐวอชิงตัน (Bingham and Walters,1989) นอกจากนั้น ในทางเดินอาหารของ *E. thurstoni* ยังพบทั้งอนุภาคของสารอินทรีย์ขนาดเล็กจำนวนมาก ซึ่งเพรียงหัวหอมโดยทั่วไปสามารถกินสารอินทรีย์เป็นอาหารได้ (Satoh, 1994) และจุลชีพขนาดเล็กจำนวนมากปะปนอยู่ เช่นเดียวกับที่พบจุลชีพอาศัยร่วมกับ *E. turbinata* (Mendola, 2000)

ทั้งนี้ การที่มีสารอินทรีย์ในกระเพาะอาหารนั้น อาจเป็นไปได้ทั้งในกรณีที่ *E. thurstoni* นำสารอินทรีย์เข้าสู่ร่างกาย เพื่อเป็นแหล่งอาหารให้กับจุลชีพที่อาศัยร่วมอยู่ในทางเดินอาหารอันเป็นการใช้ประโยชน์ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย หรือเพื่อใช้ประโยชน์จากสารอินทรีย์โดยตรง อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถระบุเหตุผลที่ชัดเจนในความสัมพันธ์ของการอยู่ร่วมกันระหว่างจุลชีพที่พบในกระเพาะอาหารของ *E. turbinata* (Mendola, 2000) อีกประการหนึ่ง ไดอะตอมที่พบในทางเดินอาหารของ *E. thurstoni* อาจไม่ใช่อาหารหลักเนื่องจากพบในปริมาณที่น้อยมาก และมีเซลล์ส่วนใหญ่ที่มีสภาพไม่สมบูรณ์ทำให้ยากต่อการนับจำนวนและจำแนกชนิด

ดังนั้น องค์ประกอบหลักในทางเดินอาหารที่พบใน *E. thurstoni* ซึ่งได้แก่สารอินทรีย์ที่แขวนลอยในมวลน้ำนั้นจึงอาจเป็นอาหารหลัก เช่นเดียวกับเพรียงหัวหอมทั่วไปที่กินอาหารโดยการกรองกินแพลงก์ตอนขนาดเล็ก รวมถึงสารอาหารแขวนลอยในมวลน้ำ (Satoh, 1994) อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบอัตราส่วนของคาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ของอนุภาคอินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอมในธรรมชาติกับสารอินทรีย์แขวนลอยในน้ำ ถึงแม้ว่าจะพบในอัตราส่วนที่ต่ำแต่ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าอนุภาคอินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอมมาจากการนำสารอินทรีย์ที่แขวนลอยในน้ำเข้าสู่ร่างกาย

สรุปผลโดยรวม

จากการศึกษาสรุปได้ว่า สามารถนำตัวอ่อนเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ที่ได้จากการกระตุ้นในน้ำจืดให้ลงเกาะโดยอิสระมาใช้ในการเพาะเลี้ยงได้ โดยไม่มีความแตกต่างจากการไม่กระตุ้น ทั้งยังช่วยลดระยะเวลาของพัฒนาการให้รวดเร็วขึ้น ในด้านการเลี้ยง *E. thurstoni* ระยะหลังวัยอ่อน พบว่า การเลี้ยงในทะเลธรรมชาติมีข้อดีมากกว่าการเลี้ยงในระบบเลี้ยงบนบก เนื่องจากสามารถลดปัจจัยเรื่องอาหารที่มีความสำคัญต่อการเติบโต นอกจากนั้น ยังมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำกว่า อย่างไรก็ตาม การเลี้ยงในระบบเลี้ยงบนบกของการศึกษาครั้งนี้ ไม่ได้มีการเสริมอาหารเพิ่มเติม จึงเป็นไปได้ที่ทำให้ *E. thurstoni* มีการเติบโตที่ต่ำ แตกต่างจาก *E. Turbinata* ที่สามารถเจริญได้จากการเลี้ยงในถังควบคุมสภาพแวดล้อมและในทะเล (Mendola, 2000) และการเลี้ยงในระบบเลี้ยงนั้น สามารถควบคุมผลผลิตได้ง่าย ทำการเลี้ยงได้ตลอดทั้งปี และไม่เป็นการรบกวนระบบนิเวศทางทะเล ทั้งนี้ พบว่าจากการเลี้ยงทั้งสองระบบทั้งในระบบเลี้ยงและในทะเล สามารถให้สารบำบัดมะเร็งที่มีโครงสร้างทางเคมีที่ไม่แตกต่างกัน (Mendola, 2000)

ระยะการเติบโตของเพรียงหัวหอมเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ควรนำมาพิจารณาในการเลี้ยง เริ่มจากการรวบรวมพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติที่มีตัวอ่อนที่ยังไม่ฟักเป็นตัวอยู่ภายใน แล้วนำพ่อแม่พันธุ์เหล่านั้นมากระตุ้นปล่อยตัวอ่อนลงเกาะบนวัสดุที่ต้องการในห้องปฏิบัติการ จากนั้นจึงอนุบาลตัวอ่อนที่ลงเกาะแล้วในระบบเลี้ยงบนบก ซึ่งจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการเสริมอาหารที่

เหมาะสมและเพียงพอให้แก่เพรียงหัวหอม (Duckworth, 2004) และต้องมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติด้วย เมื่อตัวอ่อนพัฒนาการเป็นตัวอ่อนระยะวัยรุ่นซึ่งมีความจำเป็นต้องขยายพื้นที่ให้เหมาะสม จึงควรนำไปเลี้ยงตามธรรมชาติในทะเลต่อไป ในลักษณะของการทำ sea ranching เพื่อลดปัญหาเรื่องการให้อาหารและการขยายพื้นที่

อย่างไรก็ตาม ยังคงควรมีการศึกษาต่อไปเกี่ยวกับปัจจัยอื่นที่ส่งผลต่อการเติบโตและการเลี้ยง *E. thurstoni* ทั้งในระบบเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล เพื่อนำผลมาใช้ในการประยุกต์วิธีการเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอมชนิดนี้ให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

รายการอ้างอิง

Berrill N. J. 1975. Reproduction of marine invertebrates. Giese A. C. and Pearse J. S. (eds), Chordata: tunicate, 82-241. New York : Academic Press,

Bingham B. L. and Walters L. J. 1989. Solitary ascidians as predators of invertebrate larvae: evidence from gut analyses and plankton samples. J Exp Mar Biol Ecol 131: 147-159.

Bingham B. L. and Young C. M. 1991. Larval behavior of ascidian *Ecteinascidia turbinata* Herdman; an in situ experimental study of the effects of swimming on dispersal. J Exp Mar Biol Ecol 145: 189-204.

Campbell N. A., Reece J. B. and Mitchell L. G. 1999. Biology. 5th Edition. World student series. USA : Addison-Wesley,

Cloney R A. 1990. Larva tunic and the function of the test cells in ascidians. Acta Zool 71: 9-151.

Crews C M, Lane W S and Schreiber S L. 1936. Didemnin binds to the protein palmitoyl thioesterase responsible for infantile neuronal ceroid lipofuscinosis. Proc Natl Acad Sci USA 93(9): 4316-4319.

Duckworth A. R., Samples G. A., Wright A. E. and Pomponi S. A. 2004. In vitro culture of the ascidian *Ecteinascidia turbinata* to supply the antitumor compounds ecteinascidins. Aquaculture 241: 427-439.

Forward R. B., Welch J. M. and Young C. M. 2000. Light induced larval release of a colonial ascidian. J Exp Mar Biol Ecol 248: 225-238.

Gosselin L. A. and Qian P. 1997. Juvenile mortality in benthic marine invertebrates. Mar Ecol Prog Ser 146: 265-282.

Hirose E., Akahori M., Oka A. T. and Kurabayashi. 2004. Some *Prochloron*-bearing didemnid ascidians collected from the reef shores of Iriomote Island (Okinawa, Japn). Biol Mag Okinawa 42: 7-15.

Jeedigunta S., Krenisky J. M. and Kerr R. G. 2000. DiketopiperaZines as advanced

intermediates in the biosynthesis of ecteinascidins. Tetrahedron 56: 3303-3307.

Lee H. 1984. Fast swimming speeds of ciliated marine invertebrate larvae: potential importance at the time of settlement. Am Zool 24: 131A.

Mendola D. Aquacultural production of bryostatin 1 and ecteinascidin 743. 2000. Fusetani N. (ed), Drugs from the sea, 120-133. Basel : Karger,

Millar R. H. 1971. Advances in marine biology. Russell F. S. and Yonge M. (eds), The biology of ascidians, 9: 1-100. New York: Academic Press,

Monniot C., Monniot F. and Laboute P. 1991. Coral reef ascidians of New Caledonia. Collection Fauna tropicale 30. Paris : ORSTOM,

Mukai H. and Watanabe H. 1976. Studies on the formation of germ cells in a compound ascidian, *Botryllus primigenus* Oka. J Morphol 148: 62-337.

Nakauchi M. 1982. Asexual development of ascidians: its biological significance, diversity and morphogenesis. Am Zool 22: 63-753.

Osman R. W. and Whitlatch R. B. 1995. Predation on early ontogenetic life stages and its effect on recruitment into a marine epifaunal community. Mar Ecol Prog Ser 117: 111-126

Ruppert E. E. and Barnes R. D. 1994. Invertebrate zoology. 6th Edition. International edition. USA : Saunders college publishing,

Saito Y. and Okuyama M. 2003. Studies on Japanese botryllid ascidians. IV. A new species of the genus *Botryllus* with a unique colony shape, from the vicinity of Shimoda. Zoological science 20: 1153-1161.

Satoh N. 1994. Developmental biology of ascidians. USA : Cambridge university press,

Sherrard K. M. and LaBarbera M. 2005. Form and function in juvenile ascidians. I. Implications of early juvenile morphologies for performance. Mar Ecol Prog Ser 287: 127-138

Suwanborirux K, Charupant K, Amnuoypol S, Pummangura S, Kubo A and Saito N. 2002. Ecteinascidins 770 and 786 from the Thai tunicate *Ecteinascidia thurstoni*. J Nat Prod 65: 935-937.

Thorson G. 1964. Light as an ecological factor in the dispersal and settlement of larvae of marine bottom invertebrates. Ophelia 1: 167-208.

Thorson G. 1966. Some factors influencing the recruitment and establishment of marine benthic communities. Neth J Sea Res 3: 267-293.

Watanabe H. 1988. Development of invertebrates. Dan K. et al. (eds), Colonial ascidians, 2: 490-539. Tokyo : Baifukan,

Young C. M. 1986. Direct observations of field swimming behavior in larvae of the colonial ascidian *Ecteinascidia turbinata*. Bull Mar Sci 39: 279-289.

Young C. M. 1988. Ascidian cannibalism correlates with larval behavior and adult distribution. J Exp Mar Biol Ecol 117: 9-26.

ภาคผนวก

ภาคผนวกที่ 1. ตัวอ่อนเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ย้อมด้วยสี rose bangal

ตัวอ่อนว่ายน้ำอิสระ

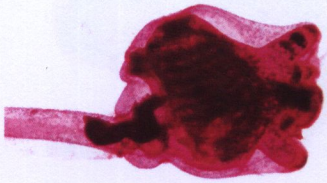
5 นาที

10 นาที

15 นาที

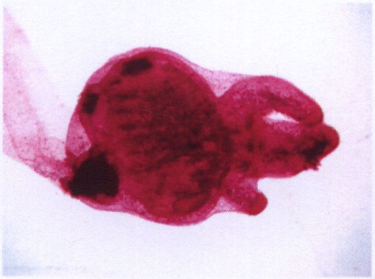
30 นาที

3 ชั่วโมง

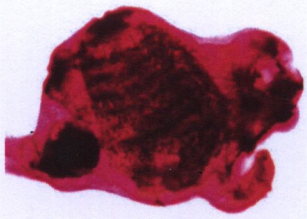


6 ชั่วโมง

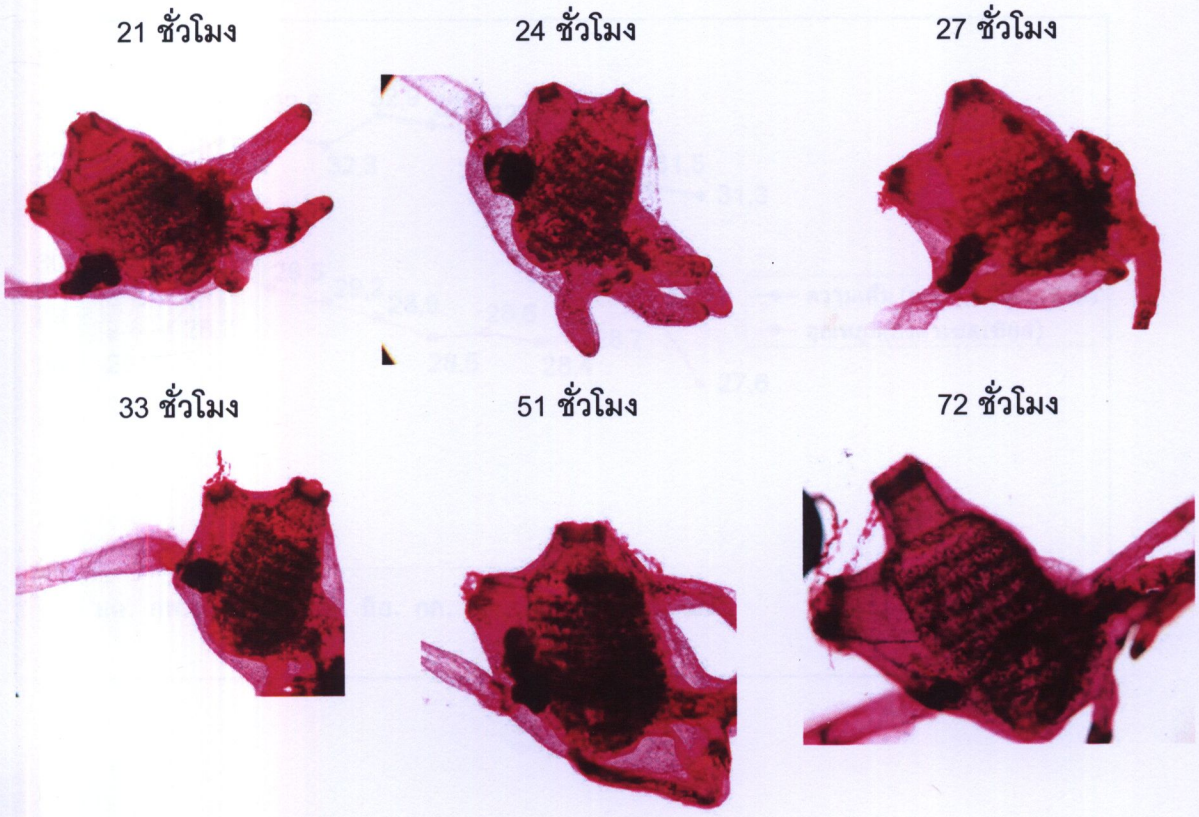
9 ชั่วโมง



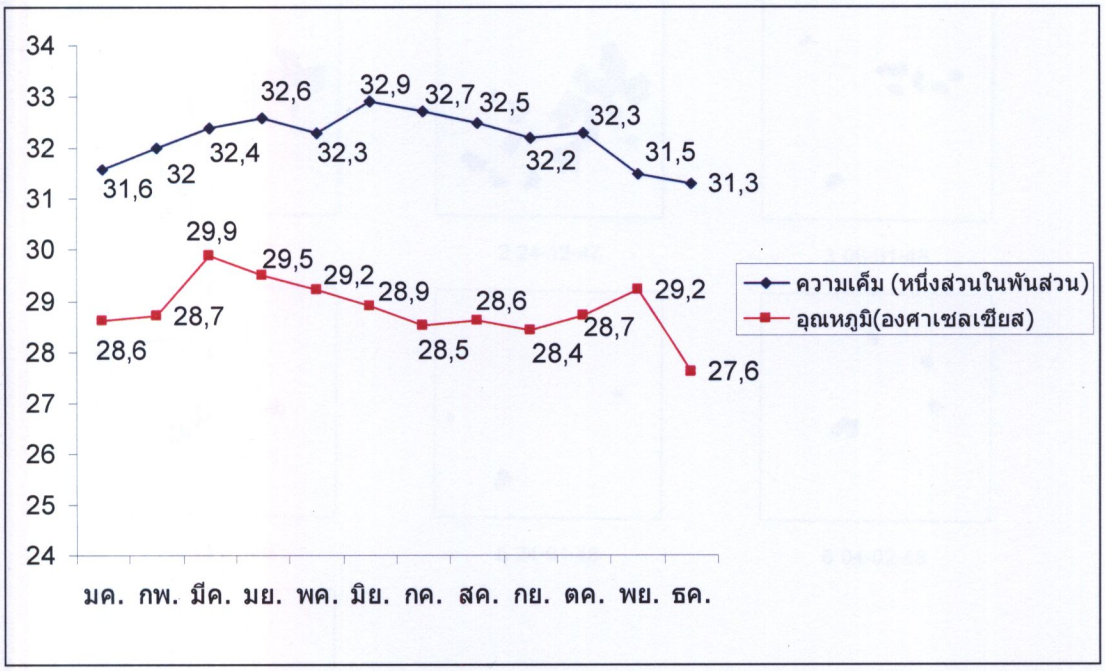
18 ชั่วโมง



ภาคผนวกที่ 1. **(ต่อ)** ตัวอ่อนเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ย้อมด้วยสี rose bangal



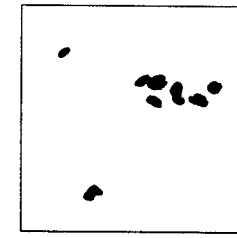
ภาคผนวกที่ 2. ความเค็มและอุณหภูมิน้ำทะเลบริเวณท่าเรือ สวพ ภูเก็ตในรอบปี พ.ศ.2548



ภาคผนวกที่ 3. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T1-16-12-47

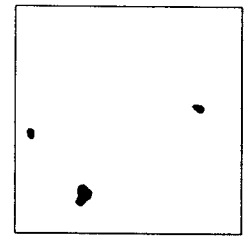
1 18-12-47

2 24-12-47

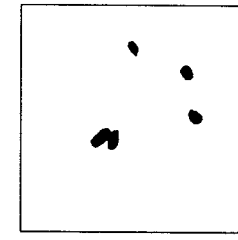


3 06-01-48

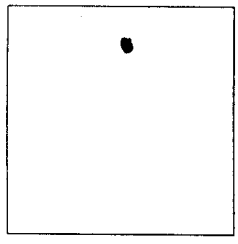
4 16-01-48



5 24-01-48



6 04-02-48



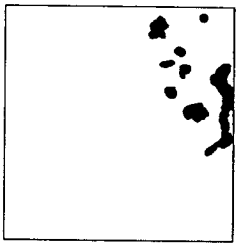
7 16-12-47

Time	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T1-16-12-47	14011	11,44
2 24-12-47	T1-16-12-47	16312	13,32
3 06-01-48	T1-16-12-47	3196	2,61
4 16-01-48	T1-16-12-47	3373	2,75
5 24-01-48	T1-16-12-47	979	0,80
6 04-02-48	T1-16-12-47	1978	1,61
7 14-02-48	T1-16-12-47	402	0,33

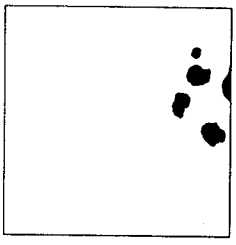
ภาคผนวกที่ 4. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T2-16-12-47

1 18-12-47

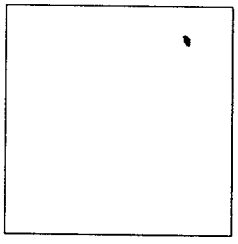
2 24-12-47



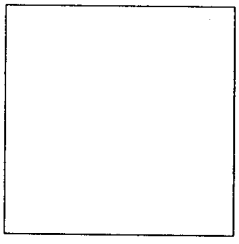
3 06-01-48



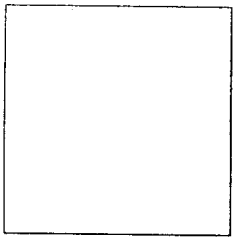
4 16-01-48



5 24-01-48



6 04-02-48



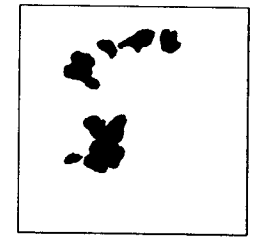
7 16-12-47

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T2-16-12-47	38303	31,27
2 24-12-47	T2-16-12-47	11872	9,69
3 06-01-48	T2-16-12-47	5110	4,17
4 16-01-48	T2-16-12-47	3429	2,80
5 24-01-48	T2-16-12-47	146	0,12
6 04-02-48	T2-16-12-47	0	0,00
7 14-02-48	T2-16-12-47	0	0,00

ภาคผนวกที่ 5. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T3-16-12-47

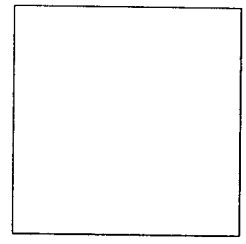
1 18-12-47

2 24-12-47

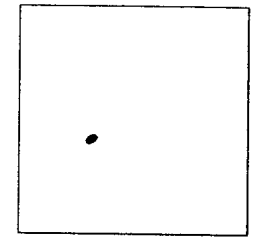


3 06-01-48

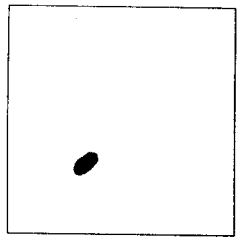
4 16-01-48



5 24-01-48



6 04-02-48

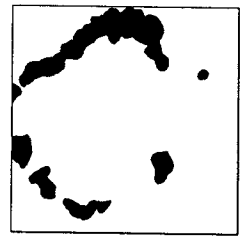


7 16-12-47

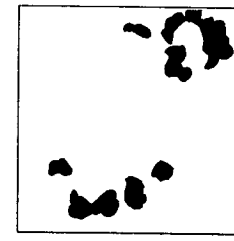
Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T3-16-12-47	9557	7,80
2 24-12-47	T3-16-12-47	7253	5,92
3 06-01-48	T3-16-12-47	9231	7,54
4 16-01-48	T3-16-12-47	3931	3,21
5 24-01-48	T3-16-12-47	0	0,00
6 04-02-48	T3-16-12-47	214	0,17
7 14-02-48	T7-16-12-47	0	0,00

ภาคผนวกที่ 6. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T4-16-12-47

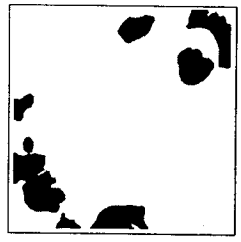
1 18-12-47



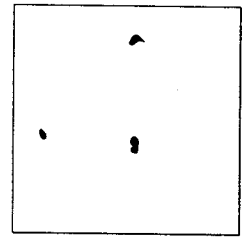
2 24-12-47



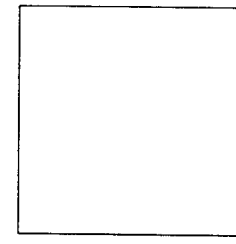
3 06-01-48



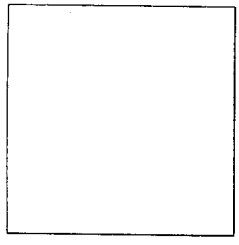
4 16-01-48



5 24-01-48



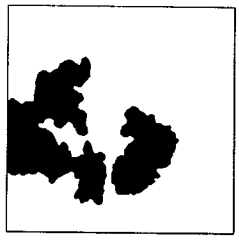
6 04-02-48



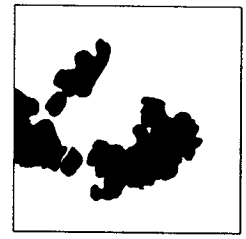
7 16-12-47

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T4-16-12-47	12881	10,52
2 24-12-47	T4-16-12-47	15348	12,53
3 06-01-48	T4-16-12-47	11816	9,65
4 16-01-48	T4-16-12-47	16062	13,11
5 24-01-48	T4-16-12-47	661	0,54
6 04-02-48	T4-16-12-47	0	0,00
7 14-02-48	T4-16-12-47	0	0,00

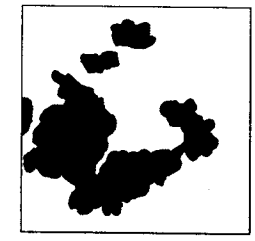
ภาคผนวกที่ 7. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T5-16-12-47



1 18-12-47



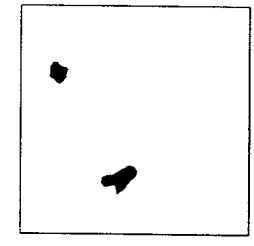
2 24-12-47



3 06-01-48

4 16-01-48

5 24-01-48

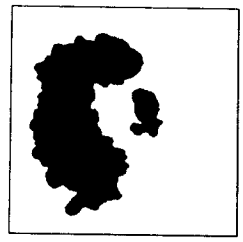


6 04-02-48

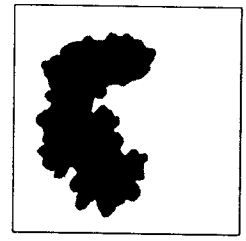
7 16-12-47

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T5-16-12-47	27878	22,76
2 24-12-47	T5-16-12-47	27621	22,55
3 06-01-48	T5-16-12-47	35705	29,15
4 16-01-48	T5-16-12-47	52933	43,21
5 24-01-48	T5-16-12-47	32353	26,41
6 04-02-48	T5-16-12-47	1887	1,54
7 14-02-48	T5-16-12-47	13705	11,19

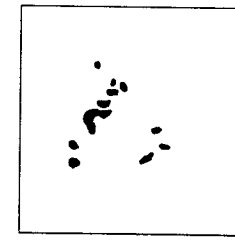
ภาคผนวกที่ 8. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T6-16-12-47



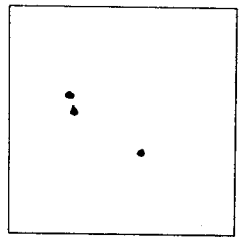
1 18-12-47



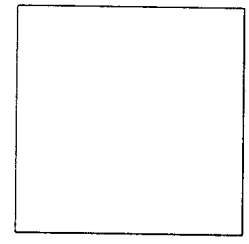
2 24-12-47



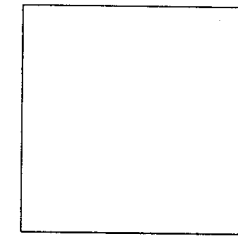
3 06-01-48



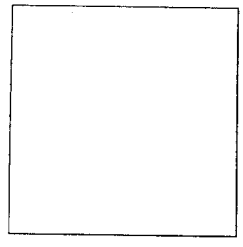
4 16-01-48



5 24-01-48



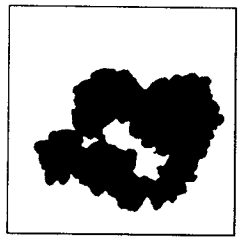
6 04-02-48



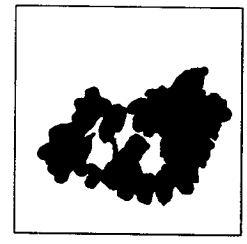
7 16-12-47

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T6-16-12-47	32072	26,18
2 24-12-47	T6-16-12-47	32281	26,35
3 06-01-48	T6-16-12-47	2378	1,94
4 16-01-48	T6-16-12-47	425	0,35
5 24-01-48	T6-16-12-47	0	0,00
6 04-02-48	T6-16-12-47	0	0,00
7 14-02-48	T6-16-12-47	0	0,00

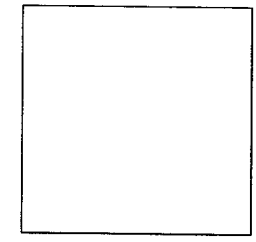
ภาคผนวกที่ 9. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T7-16-12-47



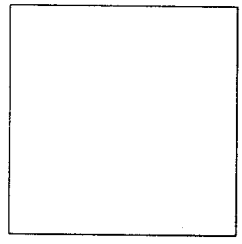
1 18-12-47



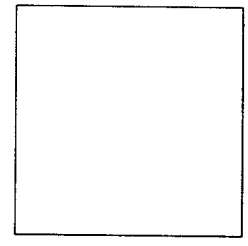
2 24-12-47



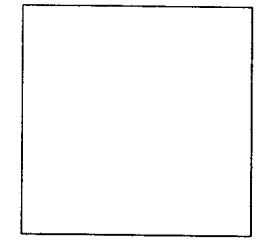
3 06-01-48



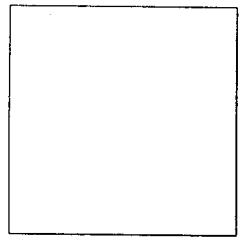
4 16-01-48



5 24-01-48



6 04-02-48

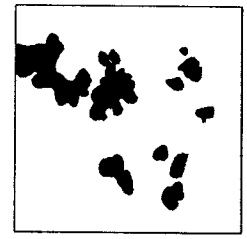


7 16-12-47

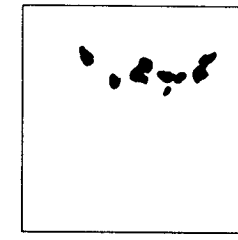
Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T7-16-12-47	38860	31,72
2 24-12-47	T7-16-12-47	33688	27,50
3 06-01-48	T7-16-12-47	0	0,00
4 16-01-48	T7-16-12-47	0	0,00
5 24-01-48	T7-16-12-47	0	0,00
6 04-02-48	T7-16-12-47	0	0,00
7 14-02-48	T7-16-12-47	0	0,00

ภาคผนวกที่ 10. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T8-16-12-47

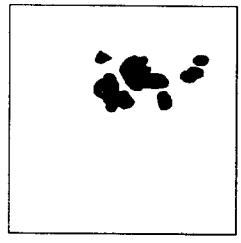
1 18-12-47



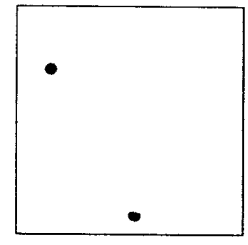
2 24-12-47



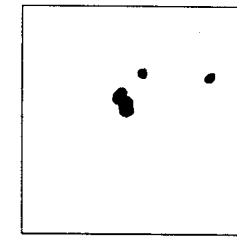
3 06-01-48



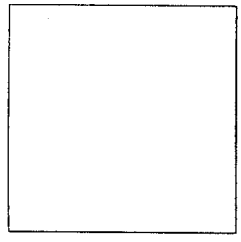
4 16-01-48



5 24-01-48



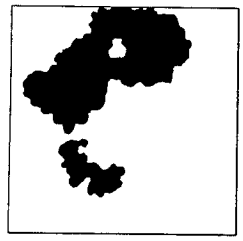
6 04-02-48



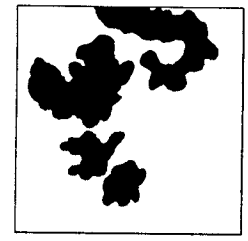
7 16-12-47

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T8-16-12-47	19529	15,94
2 24-12-47	T8-16-12-47	17123	13,98
3 06-01-48	T8-16-12-47	3351	2,74
4 16-01-48	T8-16-12-47	6722	5,49
5 24-01-48	T8-16-12-47	529	0,43
6 04-02-48	T8-16-12-47	1428	1,17
7 14-02-48	T8-16-12-47	0	0,00

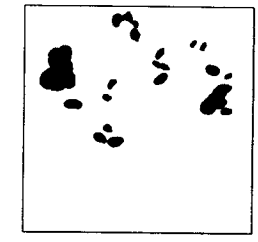
ภาคผนวกที่ 11. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T9-16-12-47



1 18-12-47

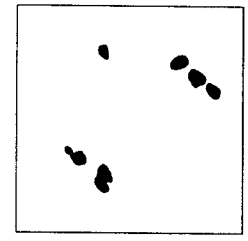


2 24-12-47

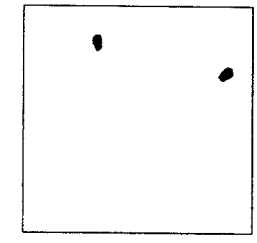


3 06-01-48

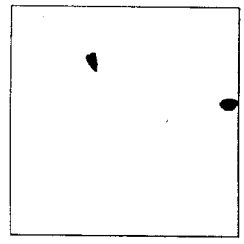
4 16-01-48



5 24-01-48



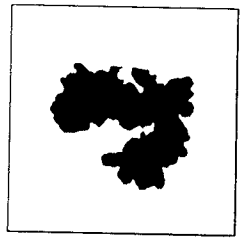
6 04-02-48



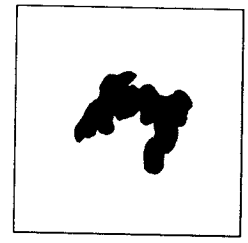
7 16-12-47

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T9-16-12-47	30611	24,99
2 24-12-47	T9-16-12-47	33562	27,40
3 06-01-48	T9-16-12-47	7782	6,35
4 16-01-48	T9-16-12-47	8069	6,59
5 24-01-48	T9-16-12-47	3338	2,72
6 04-02-48	T9-16-12-47	646	0,53
7 14-02-48	T9-16-12-47	821	0,67

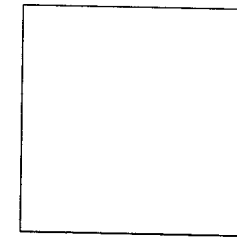
ภาคผนวกที่ 12. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T10-16-12-47



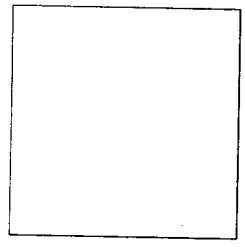
1 18-12-47



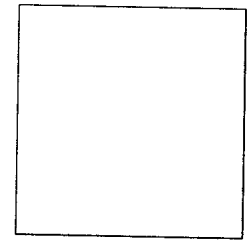
2 24-12-47



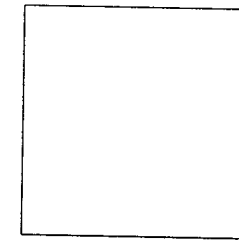
3 06-01-48



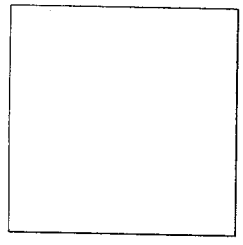
4 16-01-48



5 24-01-48



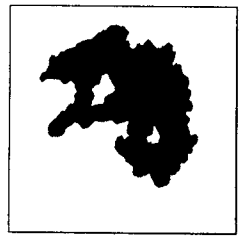
6 04-02-48



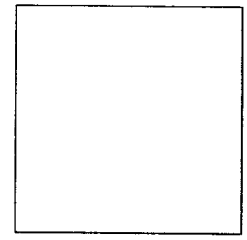
7 16-12-47

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T10-16-12-47	24376	19,90
2 24-12-47	T10-16-12-47	12889	10,52
3 06-01-48	T10-16-12-47	0	0,00
4 16-01-48	T10-16-12-47	0	0,00
5 24-01-48	T10-16-12-47	0	0,00
6 04-02-48	T10-16-12-47	0	0,00
7 14-02-48	T10-16-12-47	0	0,00

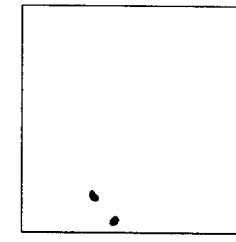
ภาคผนวกที่ 13. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T11-16-12-47



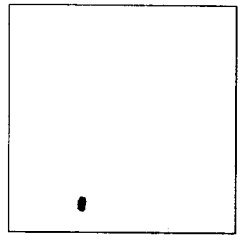
1 18-12-47



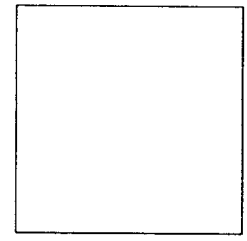
2 24-12-47



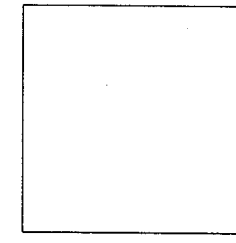
3 06-01-48



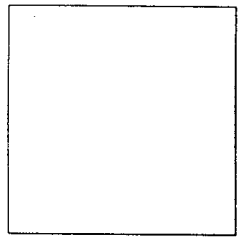
4 16-01-48



5 24-01-48



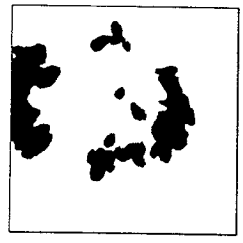
6 04-02-48



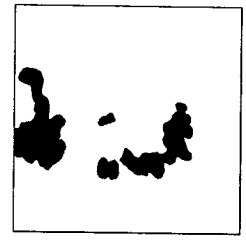
7 16-12-47

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T11-16-12-47	32473	26,51
2 24-12-47	T11-16-12-47	0	0,00
3 06-01-48	T11-16-12-47	358	0,29
4 16-01-48	T11-16-12-47	251	0,20
5 24-01-48	T11-16-12-47	0	0,00
6 04-02-48	T11-16-12-47	0	0,00
7 14-02-48	T11-16-12-47	0	0,00

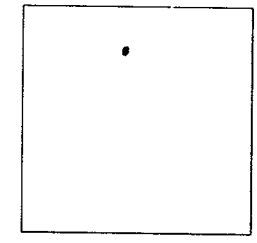
ภาคผนวกที่ 14. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T12-16-12-47



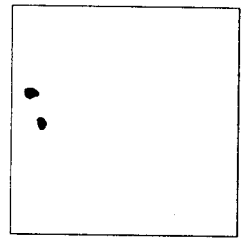
1 18-12-47



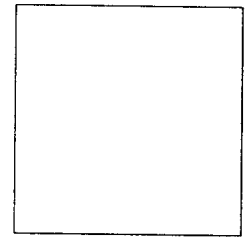
2 24-12-47



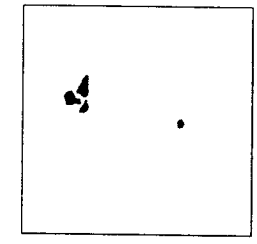
3 06-01-48



4 16-01-48



5 24-01-48

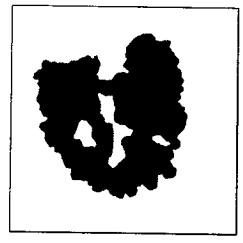


6 04-02-48

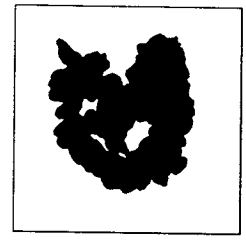
7 16-12-47

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T12-16-12-47	20141	16,44
2 24-12-47	T12-16-12-47	13661	11,15
3 06-01-48	T12-16-12-47	121	0,10
4 16-01-48	T12-16-12-47	562	0,46
5 24-01-48	T12-16-12-47	0	0,00
6 04-02-48	T12-16-12-47	1078	0,88
7 14-02-48	T12-16-12-47	589	0,48

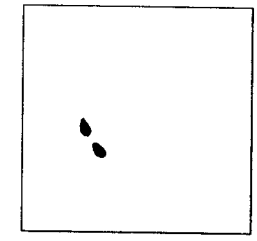
ภาคผนวกที่ 15. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T13-16-12-47



1 18-12-47

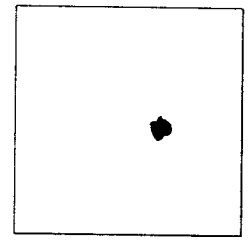


2 24-12-47

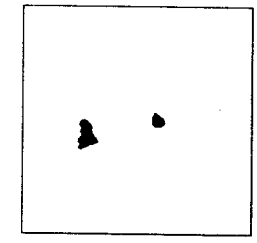


3 06-01-48

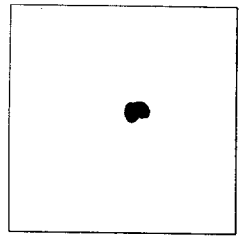
4 16-01-48



5 24-01-48



6 04-02-48

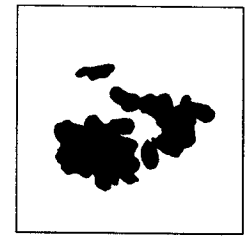


7 16-12-47

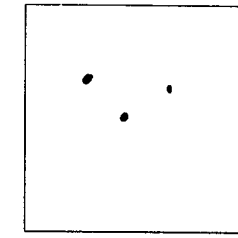
Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T13-16-12-47	38235	31,21
2 24-12-47	T13-16-12-47	38024	31;04
3 06-01-48	T13-16-12-47	693	0,57
4 16-01-48	T13-16-12-47	2614	2,13
5 24-01-48	T13-16-12-47	893	0,73
6 04-02-48	T13-16-12-47	1292	1,05
7 14-02-48	T13-16-12-47	997	0,81

ภาคผนวกที่ 16. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T14-16-12-47

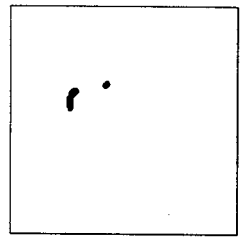
1 18-12-47



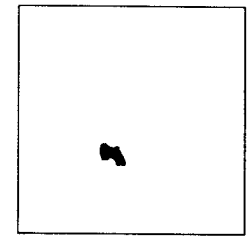
2 24-12-47



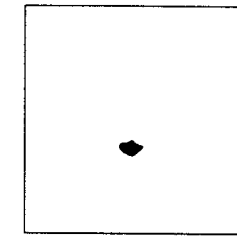
3 06-01-48



4 16-01-48



5 24-01-48



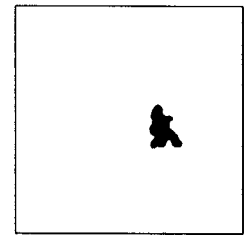
6 04-02-48

7 16-12-47

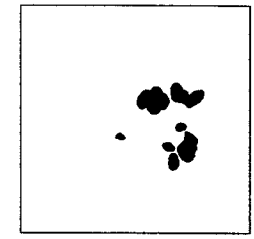
Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T14-16-12-47	23876	19,49
2 24-12-47	T14-16-12-47	21047	17,18
3 06-01-48	T14-16-12-47	404	0,33
4 16-01-48	T14-16-12-47	515	0,42
5 24-01-48	T14-16-12-47	887	0,72
6 04-02-48	T14-16-12-47	604	0,49
7 14-02-48	T14-16-12-47	1704	1,39

ภาคผนวกที่ 17. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในระบบเลี้ยงของหน่วยทดลองที่ T15-16-12-47

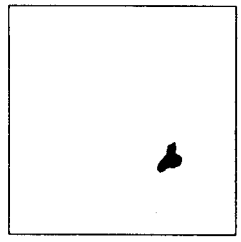
1 18-12-47



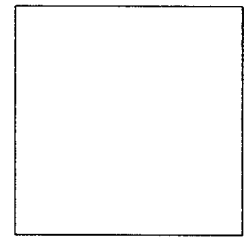
2 24-12-47



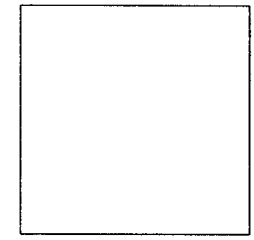
3 06-01-48



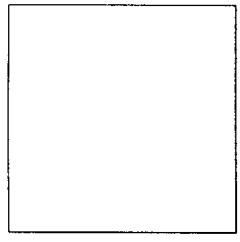
4 16-01-48



5 24-01-48



6 04-02-48

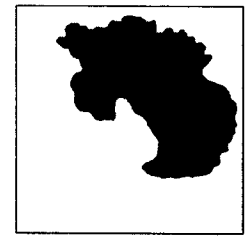


7 16-12-47

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 18-12-47	T15-16-12-47	20773	16,96
2 24-12-47	T15-16-12-47	1926	1,57
3 06-01-48	T15-16-12-47	4683	3,82
4 16-01-48	T15-16-12-47	878	0,72
5 24-01-48	T15-16-12-47	0	0,00
6 04-02-48	T15-16-12-47	0	0,00
7 14-02-48	T15-16-12-47	0	0,00

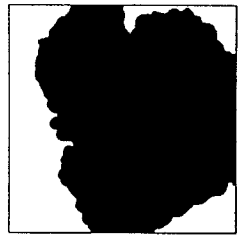
ภาคผนวกที่ 18. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S1-09-06-48

1 09-06-48

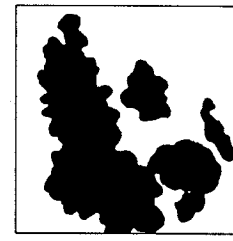


2 17-06-48

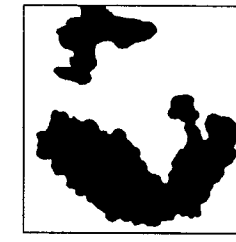
3 28-06-48



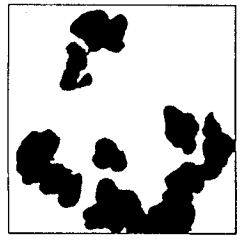
4 08-07-48



5 26-07-48



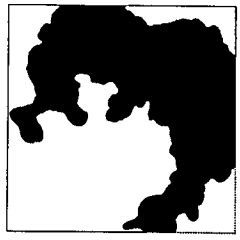
6 05-08-48



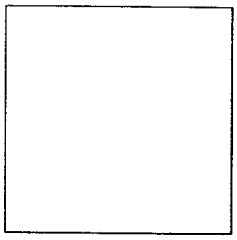
7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S1-09-06-48	46372	37,85
2 17_06_48	S1-09-06-48	11078	9,04
3 28_06_48	S1-09-06-48	60899	49,71
4 08_07_48	S1-09-06-48	86949	70,98
5 26_07_48	S1-09-06-48	49803	40,66
6 05_08_48	S1-09-06-48	42364	34,58
7 17_08_48	S1-09-06-48	34627	28,27

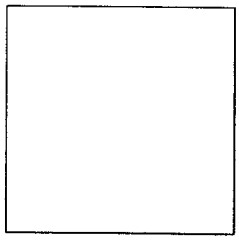
ภาคผนวกที่ 19. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S2-09-06-48



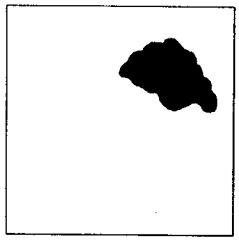
1 09-06-48



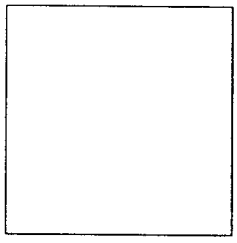
2 17-06-48



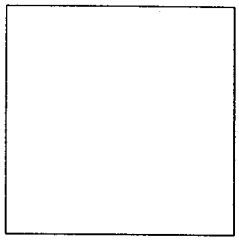
3 28-06-48



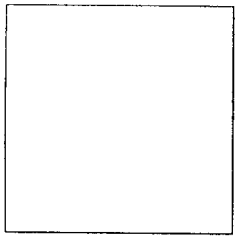
4 08-07-48



5 26-07-48



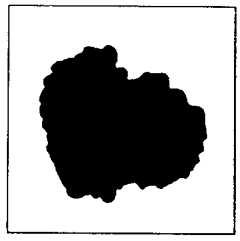
6 05-08-48



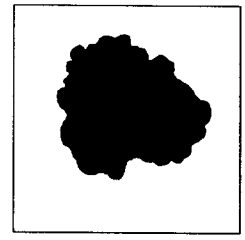
7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S2-09-06-48	63095	51,51
2 17_06_48	S2-09-06-48	0,00	0
3 28_06_48	S2-09-06-48	0,00	0
4 08_07_48	S2-09-06-48	10312	8,42
5 26_07_48	S2-09-06-48	0,00	0
6 05_08_48	S2-09-06-48	0,00	0
7 17_08_48	S2-09-06-48	0,00	0

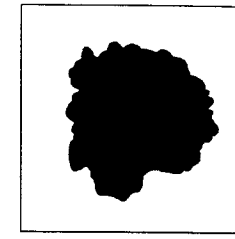
ภาคผนวกที่ 20. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S3-09-06-48



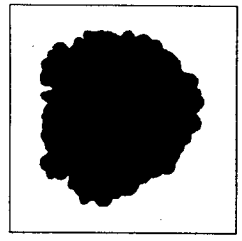
1 09-06-48



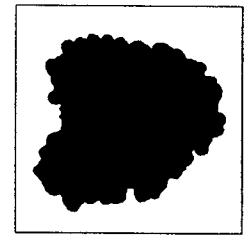
2 17-06-48



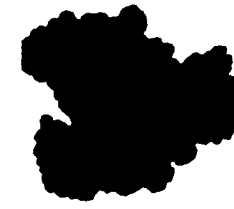
3 28-06-48



4 08-07-48



5 26-07-48



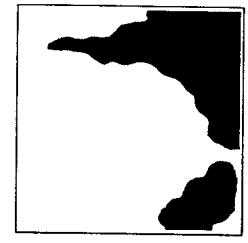
6 05-08-48

7 17-08-48

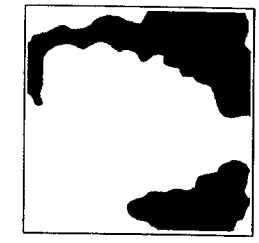
Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S3-09-06-48	43631	35,62
2 17_06_48	S3-09-06-48	36444	29,75
3 28_06_48	S3-09-06-48	40440	33,01
4 08_07_48	S3-09-06-48	51580	42,11
5 26_07_48	S3-09-06-48	57489	46,93
6 05_08_48	S3-09-06-48	70504	57,55
7 17_08_48	S3-09-06-48	36083	29,46

ภาคผนวกที่ 21. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S4-09-06-48

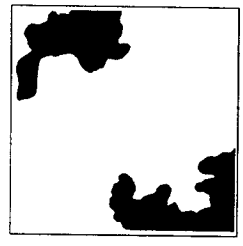
1 09-06-48



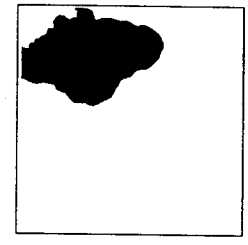
2 17-06-48



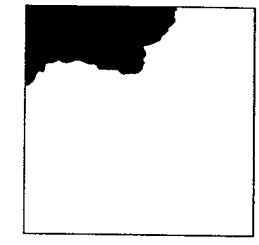
3 28-06-48



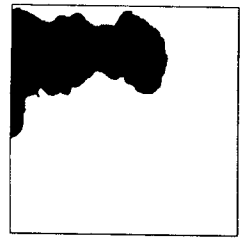
4 08-07-48



5 26-07-48



6 05-08-48



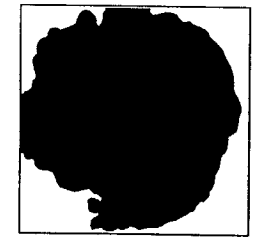
7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S4-09-06-48	31913	26,05
2 17_06_48	S4-09-06-48	35287	28,81
3 28_06_48	S4-09-06-48	39308	32,09
4 08_07_48	S4-09-06-48	25951	21,18
5 26_07_48	S4-09-06-48	20731	16,92
6 05_08_48	S4-09-06-48	19678	16,06
7 17_08_48	S4-09-06-48	26860	21,93

ภาคผนวกที่ 22. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S5-09-06-48

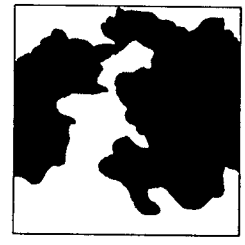
1 09-06-48

2 17-06-48

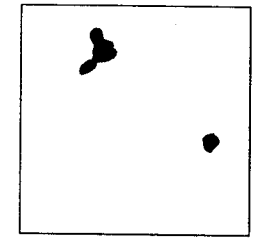


3 28-06-48

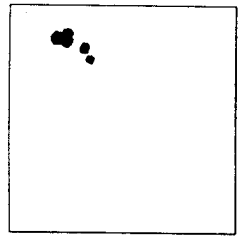
4 08-07-48



5 26-07-48



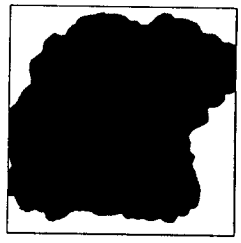
6 05-08-48



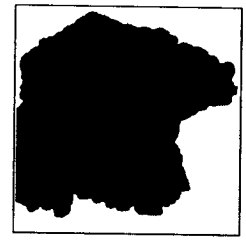
7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S5-09-06-48	86653	70,74
2 17_06_48	S5-09-06-48	92349	75,39
3 28_06_48	S5-09-06-48	86608	70,70
4 08_07_48	S5-09-06-48	103338	84,36
5 26_07_48	S5-09-06-48	71047	58,00
6 05_08_48	S5-09-06-48	2387	1,95
7 17_08_48	S5-09-06-48	1231	1,00

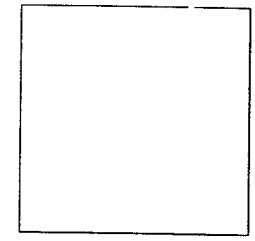
ภาคผนวกที่ 23. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S6-09-06-48



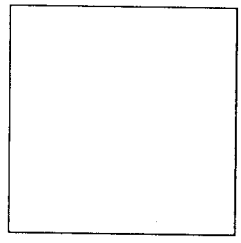
1 09-06-48



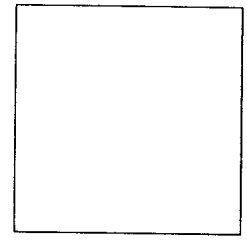
2 17-06-48



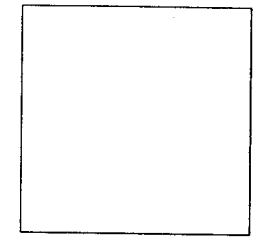
3 28-06-48



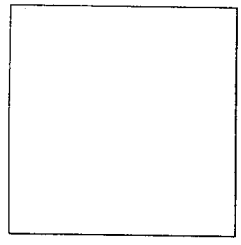
4 08-07-48



5 26-07-48



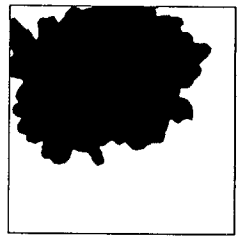
6 05-08-48



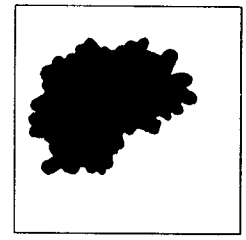
7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S6-09-06-48	88248	72,04
2 17_06_48	S6-09-06-48	77046	62,89
3 28_06_48	S6-09-06-48	77046	62,89
4 08_07_48	S6-09-06-48	0,00	0
5 26_07_48	S6-09-06-48	0,00	0
6 05_08_48	S6-09-06-48	0,00	0
7 17_08_48	S6-09-06-48	0,00	0

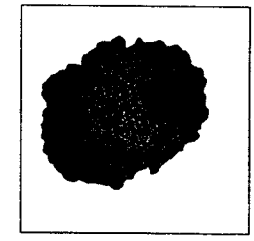
ภาคผนวกที่ 24. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S7-09-06-48



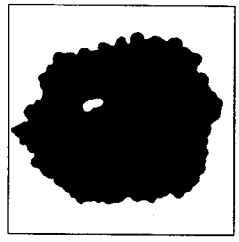
1 09-06-48



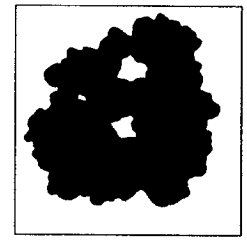
2 17-06-48



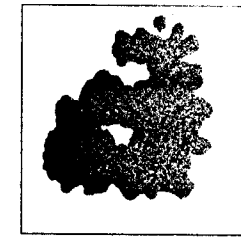
3 28-06-48



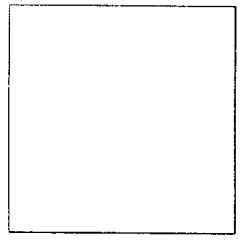
4 08-07-48



5 26-07-48



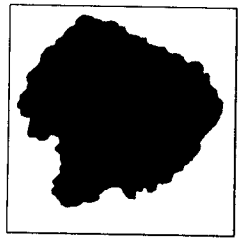
6 05-08-48



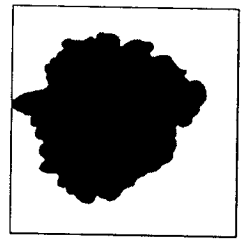
7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S7-16-12-47	56454	46,08
2 17_06_48	S7-09-06-48	35090	28,64
3 28_06_48	S7-09-06-48	44567	36,38
4 08_07_48	S7-09-06-48	61311	50,05
5 26_07_48	S7-09-06-48	60849	49,67
6 05_08_48	S7-09-06-48	45714	37,32
7 17_08_48	S7-09-06-48	0,00	0

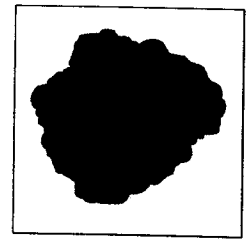
ภาคผนวกที่ 25. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S8-09-06-48



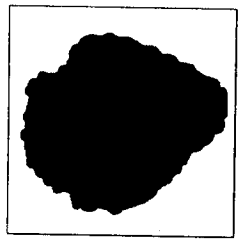
1 09-06-48



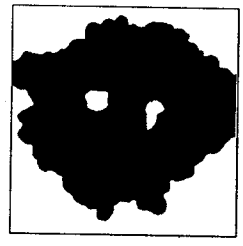
2 17-06-48



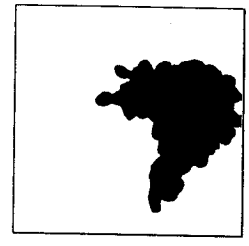
3 28-06-48



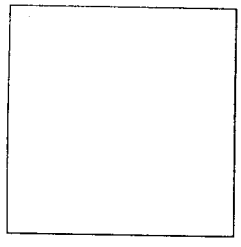
4 08-07-48



5 26-07-48



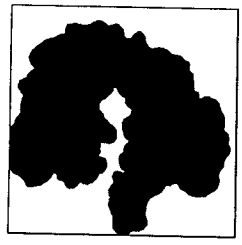
6 05-08-48



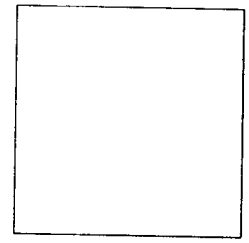
7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S8-16-12-47	60512	49,40
2 17_06_48	S8-09-06-48	49285	40,23
3 28_06_48	S8-09-06-48	53585	43,74
4 08_07_48	S8-09-06-48	61564	50,26
5 26_07_48	S8-09-06-48	72777	59,41
6 05_08_48	S8-09-06-48	26106	21,31
7 17_08_48	S8-09-06-48	0,00	0

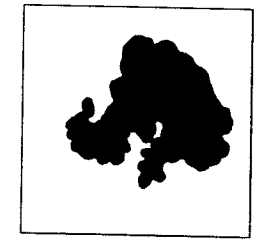
ภาคผนวกที่ 26. โคโลนีของเพรียงหัวหอม *E. thurstoni* Herdman, 1891 **ในทะเลของหน่วยทดลองที่** S9-09-06-48



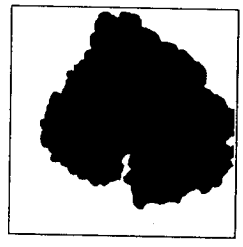
1 09-06-48



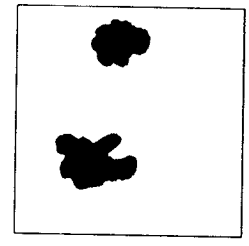
2 17-06-48



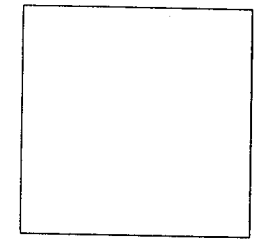
3 28-06-48



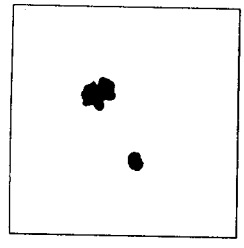
4 08-07-48



5 26-07-48



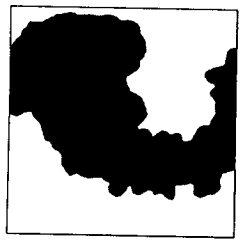
6 05-08-48



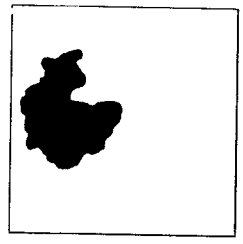
7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S9-16-12-47	68602	56,00
2 17_06_48	S9-09-06-48	0,00	0
3 28_06_48	S9-09-06-48	33760	27,56
4 08_07_48	S9-09-06-48	59490	48,56
5 26_07_48	S9-09-06-48	12142	9,91
6 05_08_48	S9-09-06-48	12142	9,91
7 17_08_48	S9-09-06-48	2409	1,97

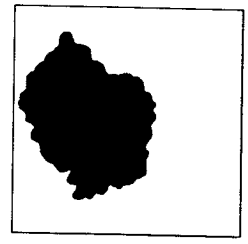
ภาคผนวกที่ 27. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S10-09-06-48



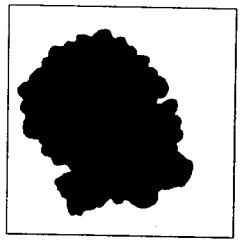
1 09-06-48



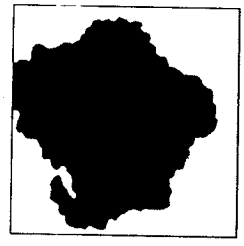
2 17-06-48



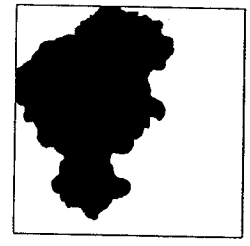
3 28-06-48



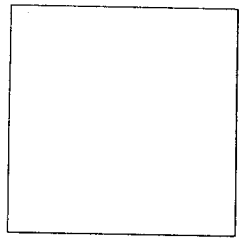
4 08-07-48



5 26-07-48



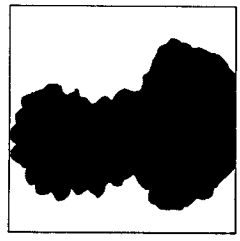
6 05-08-48



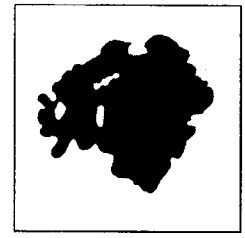
7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S10-16-12-47	60785	49,62
2 17_06_48	S10-09-06-48	16815	13,73
3 28_06_48	S10-09-06-48	34455	28,13
4 08_07_48	S10-09-06-48	50902	41,55
5 26_07_48	S10-09-06-48	66526	54,31
6 05_08_48	S10-09-06-48	47049	38,41
7 17_08_48	S10-09-06-48	0,00	0

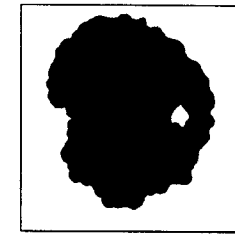
ภาคผนวกที่ 28. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S11-09-06-48



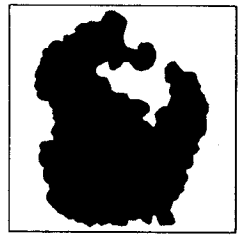
1 09-06-48



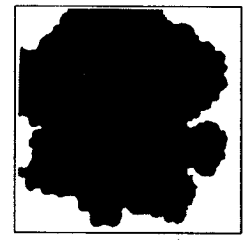
2 17-06-48



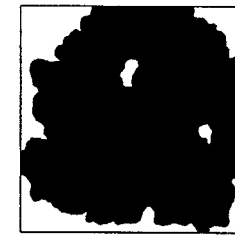
3 28-06-48



4 08-07-48



5 26-07-48

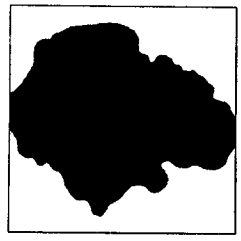


6 05-08-48

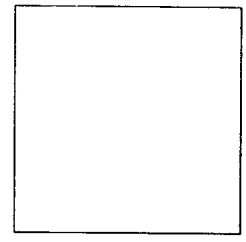
7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S11-16-12-47	61316	50,05
2 17_06_48	S11-09-06-48	39060	31,89
3 28_06_48	S11-09-06-48	55693	45,46
4 08_07_48	S11-09-06-48	59508	48,58
5 26_07_48	S11-09-06-48	85819	70,06
6 05_08_48	S11-09-06-48	97472	79,57
7 17_08_48	S11-09-06-48	97753	79,80

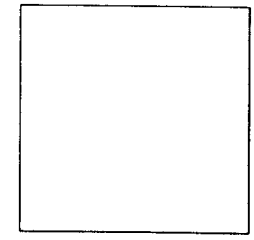
ภาคผนวกที่ 29. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S12-09-06-48



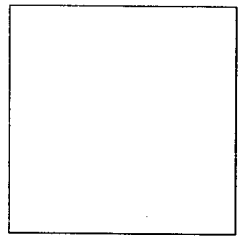
1 09-06-48



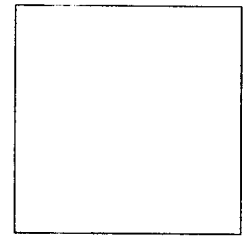
2 17-06-48



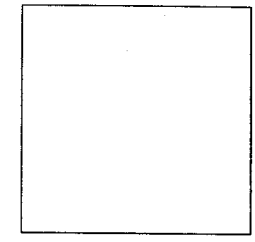
3 28-06-48



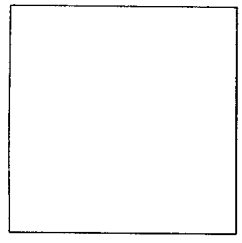
4 08-07-48



5 26-07-48



6 05-08-48



7 17-08-48

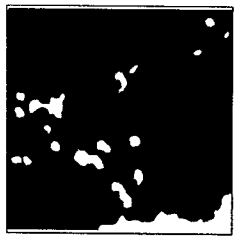
Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S12-16-12-47	66685	54,44
2 17_06_48	S12-09-06-48	0,00	0
3 28_06_48	S12-09-06-48	0,00	0
4 08_07_48	S12-09-06-48	0,00	0
5 26_07_48	S12-09-06-48	0,00	0
6 05_08_48	S12-09-06-48	0,00	0
7 17_08_48	S12-09-06-48	0,00	0

ภาคผนวกที่ 30. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S13-09-06-48

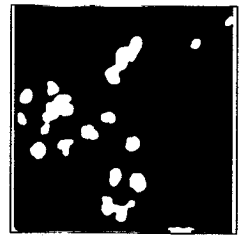
1 09-06-48

2 17-06-48

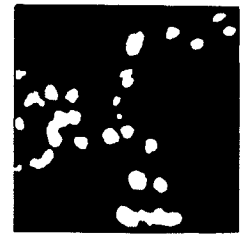
3 28-06-48



4 08-07-48



5 26-07-48

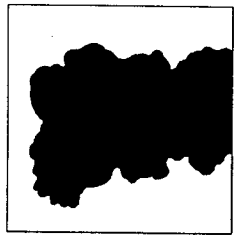


6 05-08-48

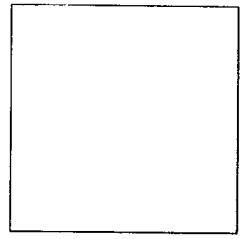
7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S13-16-12-47	114245	93,26
2 17_06_48	S13-09-06-48	110619	90,30
3 28_06_48	S13-09-06-48	97546	79,63
4 08_07_48	S13-09-06-48	110681	90,35
5 26_07_48	S13-09-06-48	108948	88,94
6 05_08_48	S13-09-06-48	110310	90,05
7 17_08_48	S13-09-06-48	107376	87,65

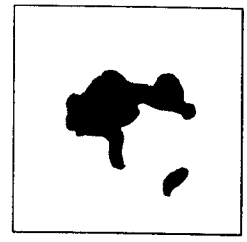
ภาคผนวกที่ 31. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S14-09-06-48



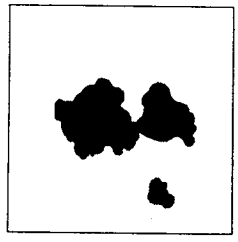
1 09-06-48



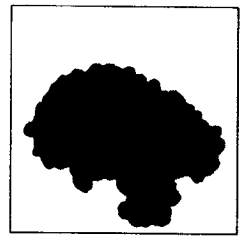
2 17-06-48



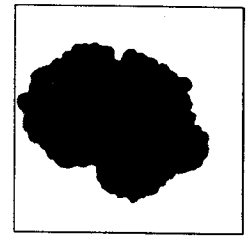
3 28-06-48



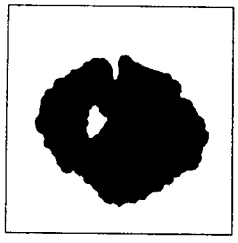
4 08-07-48



5 26-07-48



6 05-08-48

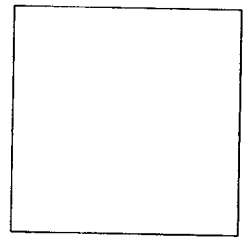


7 17-08-48

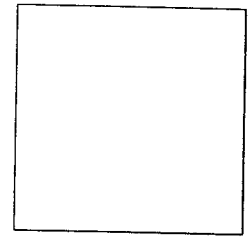
Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S14-16-12-47	59816	48,83
2 17_06_48	S14-09-06-48	0,00	0
3 28_06_48	S14-09-06-48	14139	11,54
4 08_07_48	S14-09-06-48	18409	15,03
5 26_07_48	S14-09-06-48	47543	38,81
6 05_08_48	S14-09-06-48	48088	39,26
7 17_08_48	S14-09-06-48	41663	34,01

ภาคผนวกที่ 32. โคโลนีและพื้นที่ปกคลุมของเพรียงหัวหอมในทะเลของหน่วยทดลองที่ S15-09-06-48

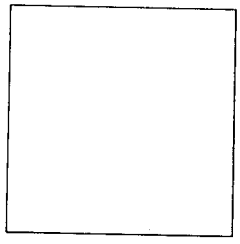
1 09-06-48



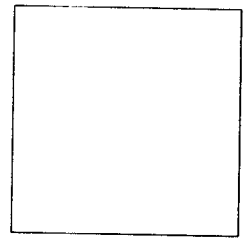
2 17-06-48



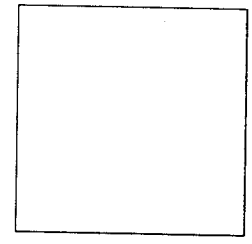
3 28-06-48



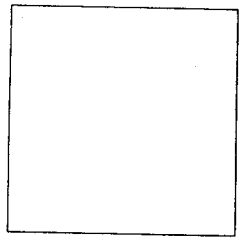
4 08-07-48



5 26-07-48



6 05-08-48



7 17-08-48

Date	Sample	Pixel	Sq.cm.
1 09_06_48	S15-16-12-47	61486	50,19
2 17_06_48	S15-09-06-48	0,00	0
3 28_06_48	S15-09-06-48	0,00	0
4 08_07_48	S15-09-06-48	0,00	0
5 26_07_48	S15-09-06-48	0,00	0
6 05_08_48	S15-09-06-48	0,00	0
7 17_08_48	S15-09-06-48	0,00	0

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายปิยะ โกยสิน เกิดวันอังคารที่ 21 สิงหาคม พ.ศ.2522 ที่จังหวัดพังงา สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษาจากโรงเรียนอนุบาลพังงา ระดับมัธยมศึกษาจากโรงเรียนดีบุกพังงาวิทยายน จังหวัดพังงา และปริญญาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล จังหวัดตรัง มีประสบการณ์เป็นผู้ช่วยวิจัยที่หน่วยวิจัยเคมีผลิตภัฑณ์ธรรมชาติทางทะเล คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ.2542-พ.ศ.2544 ผู้ช่วยวิจัยที่ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางเทคโนโลยีชีวภาพทางทะเล ซึ่งเป็นความร่วมมือระหว่างภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พ.ศ.2545-พ.ศ.2547 งานวิจัยในระดับบัณฑิตศึกษาได้รับทุนสนับสนุนงานวิจัยจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนงานวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_347008 และทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547