การศึกษาฤดูวางไข่ การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ และองค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra*

The study of seasonal breeding, gonad development, and chemical compositions of gonad in sea cucumber *Holothuria scabra*

วิจิตรา ตุ้งซี่[1*], ภัททิรา พงษ์ทิพย์พาที[2], ดวงแข กาญจนโสภา[2], นพแก้ว เจริญทิพากร[2], วุฒิพร พรหมขุนทอง[3] และ บุญเสริม วิทยชำนาญกุล[2, 4]

Wijittra Tungse[1], Pattira Pongtippatee[2], Duangkhae Kanjanasopa[2], Nopphakaew Chareonthiphakorn[2], Wutiporn Phromkunthong[3], and Boonsirm Withyachumnarnkul[2, 4]

[1] สาขาวิชาวาริชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ.สงขลา

[2]สถานวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพสัตว์น้ำ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตสุราษฎร์ธานี จ.สุราษฎร์ธานี [3]คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จ.สงขลา

[4]หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ

Abstract

The aims of this research were to studying the seasonal breeding, gonad development and gonad chemical compositions of sea cucumber *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833), for providing the basic knowledge in sea cucumber culture and sea cucumber broodstock feed mill in the future. In January to December 2012, sea cucumber *H. scabra* weight of more than 500 gram from Andaman sea (Poo island, Krabi province) were collected. Their gonads were removed for histological, gonado-somatic index (G.S.I.) and chemical composition study. The results showed that *H. scabra* has annual spawning pattern, from October to December. An average Gonado-somatic index was highest in November (9.3±2.2% in male and 16.2±2.8% in female). Gonad of both male and female *H. scabra* showed a central long tubule that extended many branches around. Size, color, shape, branches number, and stages of gametes depended on the stages of gonad development. Gonad development was divided into 5 stages; 1) Indeterminate stage 2) Growing stage 3) Mature stage 4) Partly spawned stage and 5) Spent stage. Chemical composition of male and female gonad showed high amount of carbohydrate in indeterminate stage and Growing stage, highest amount of fat crude and protein crude in Mature stage, and lowest amount of carbohydrate, fat crude and protein crude in Spent stage. Spawning cycle was taken place in every 2 weeks.

Keywords: *Holothuria scabra, chemical composition, gonadosomatic index, spawning, histology*

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤดูวางไข่ การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ และองค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra* (Jaeger, 1833) เพื่อใช้เป็นความรู้พื้นฐานสำคัญในการเพาะเลี้ยงปลิงทะเลขาว และพัฒนาสูตรอาหารพ่อแม่พันธุ์ปลิงทะเลขาวในอนาคต การทดลองได้ใช้ปลิงทะเลขาวจากฝั่งอันดามัน บริเวณเกาะปู จ.กระบี่ โดยรวบรวมปลิงทะเลขาวระยะพ่อแม่พันธุ์ น้ำหนัก 500 กรัม ขึ้นไป ในช่วงเดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 โดยนำอวัยวะสืบพันธุ์มาศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา ดัชนีความสมบูรณ์เพศ องค์ประกอบทางเคมี และรอบของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ พบว่า ปลิงทะเลขาวมีฤดูวางไข่ปีละครั้ง ในเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม ซึ่งมีค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (G.S.I.) เฉลี่ยมากที่สุดในเดือนพฤศจิกายน โดยในเพศผู้เท่ากับ 9.3±2.2% และเพศเมียเท่ากับ 16.2±2.8% ลักษณะอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งของเพศผู้และเพศเมีย มีท่อยาวเป็นแกนกลางและมีแขนงยื่นออกไปโดยรอบ ขนาด สี รูปร่าง จำนวนแขนง และลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ ขึ้นอยู่กับระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ ระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์มี 5 ระยะ คือ 1) Indeterminate stage 2) Growing stage 3) Mature stage 4) Partly spawned stage และ 5) Spent stage สำหรับองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย พบว่าในระยะแรกของพัฒนาการได้แก่ Indeterminate stage และ Growing stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมาก ในระยะ Mature stage มีปริมาณไขมันรวมและโปรตีนรวมมากที่สุด และระยะ Spent stage มีคาร์โบไฮเดรต ไขมันรวมและโปรตีนรวมน้อยที่สุด และพบว่าการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในแต่ละครั้งใช้เวลาประมาณ 2 สัปดาห์

คำสำคัญ: *ปลิงทะเลขาว, องค์ประกอบทางเคมี, ดัชนีความสมบูรณ์เพศ, การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์, เนื้อเยื่อวิทยา*

บทนำ

ปลิงทะเลเป็นทรัพยากรสัตว์น้ำเค็มชนิดหนึ่ง ซึ่งมีคุณค่าทางเศรษฐกิจเป็นอย่างยิ่ง เป็นที่นิยมบริโภคโดยเฉพาะในหมู่ชาวจีน เกาหลี และญี่ปุ่น ปลิงทะเลเป็นสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในไฟลัม Echinodermata และคลาส Holothuroidea (Agudo, 2006) พบว่าปลิงทะเลมีสารอาหารบางอย่างที่ทำให้สุขภาพแข็งแรงด้วย เช่น สาร philinopside A ที่ยับยั้งการสร้างเส้นเลือดหล่อเลี้ยงเซลล์มะเร็ง คือเป็น anti-angiogenic substance และเป็น tyrosine kinase inhibitor ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ (Tong *et al*., 2005) ในการแปรรูปได้มีการนำปลิงทะเลสดมาผ่านกระบวนการทำแห้ง ที่เรียกว่า "trepang" หรือ "beche-de-mer" ซึ่งเป็นสินค้าส่งออกและสินค้านำเข้าที่สำคัญของหลายๆ ประเทศ ปัจจุบันพบว่ามีการทำการประมงแบบเกินกำลังผลิต ก่อให้เกิดปัญหาสำคัญคือทรัพยากรปลิงทะเลได้ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วโดยเฉพาะปลิงทะเลขาว (*Holothuria scabra*, sandfish) ซึ่งเป็นชนิดที่มีราคาแพงและเป็นที่ต้องการของตลาดได้ถูกลักลอบจับเพื่อนำไปขาย ดังนั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการส่งเสริมการทำประมงปลิงทะเลอย่างยั่งยืนโดยการเพาะเลี้ยง

เนื่องจากปลิงทะเลขาวเป็นปลิงชนิดที่ยังไม่มีการเพาะเลี้ยงในประเทศไทยมาก่อนนอกจากที่ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งประจวบคีรีขันธ์ ต.คลองวาฬ อ.เมือง จ.ประจวบคีรีขันธ์ แต่ยังไม่มีการเลี้ยงเชิงพาณิชย์ ทำให้สูตรอาหารสำหรับการเลี้ยงปลิงทะเลขาวโดยเฉพาะสูตรอาหารสำหรับพ่อแม่พันธุ์ยังไม่มีการพัฒนา ในปัจจุบันด้วยความร่วมมือระหว่างศูนย์วิจัยและพัฒนาสายพันธุ์กุ้ง (ศวพก.) อ.ไชยา จ.สุราษฎร์ธานี และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้ทำการเพาะเลี้ยงปลิงทะเลขาวขึ้น มีวัตถุประสงค์เพื่อขยายพันธุ์ปลิงทะเลขาวคืนกลับสู่ท้องทะเลและพัฒนาให้เป็นอาชีพใหม่สำหรับเกษตรกร ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้ จะทำการศึกษาฤดูวางไข่

การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ และศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาวเพื่อใช้เป็นความรู้พื้นฐานสำคัญในการเพาะเลี้ยงและพัฒนาสูตรอาหารพ่อแม่พันธุ์ปลิงทะเลขาวในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเล *H. scabra* จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา และกระตุ้นการวางไข่
2. เพื่อศึกษาดัชนีความสมบูรณ์เพศในรอบปีของปลิงทะเล *H. scabra*
3. เพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเล *H. scabra* ซึ่งได้แก่ ความชื้น (moisture) เถ้า (ash) โปรตีนรวม (crude protein) ไขมันรวม (crude fat) และคาร์โบไฮเดรต ในแต่ละระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ และเปรียบเทียบระหว่างเพศ

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง

รวบรวมปลิงทะเลขาวระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 บริเวณเกาะปู จ.กระบี่ ห่างจากฝั่งประมาณ 10-15 กิโลเมตร น้ำลึกประมาณ 1-2 เมตร น้ำหนักปลิงทะเล 500 กรัม ขึ้นไป ทำการเก็บตัวอย่างทุกเดือน เลือกเฉพาะปลิงที่มีสุขภาพดี ไม่มีแผลที่ผิวหนัง ผิวหนังเรียบมีความแวววาว เมื่อถูกสัมผัสจะเคลื่อนไหวได้ช้าๆ นำมาบันทึกน้ำหนักตัวโดยการผ่าเอาน้ำในตัวออกและชั่งน้ำหนักตัว บันทึกน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ และตัดชิ้นส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ความยาวประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร แช่ในน้ำยารักษาสภาพ Davidson's fixative เพื่อนำไปผ่านกระบวนการเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อศึกษาพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ และนำอวัยวะสืบพันธุ์ส่วนที่เหลือพร้อมทั้งกล้ามเนื้อผนังลำตัวเก็บไว้ในน้ำแข็งแห้ง เมื่อมาถึงห้องปฏิบัติการเก็บตัวอย่างไว้ที่ -80 ºC เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

2. การศึกษาพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์

ทำการศึกษาระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์โดยกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยนำอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละตัวเก็บไว้ใน Davidson's fixative เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นแช่ใน 50 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ 2 ครั้ง ครั้งละ 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 70 เปอร์เซ็นต์แอลกอฮอล์ และนำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อตามวิธีของ Humason (1979) นำตัวอย่างที่ผ่านการย้อมสี haematoxylin และ eosin มาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) นำปลิงทะเลขาวที่ยังมีชีวิตอยู่มาทำการศึกษารอบของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ โดยการกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ เริ่มจากให้ปลิงอยู่ในที่แห้งสนิท (dry treatment) หรือมีน้ำทะเลในแทงค์ สูงประมาณ 2 เซนติเมตรในที่ร่ม 30-45 นาที จากนั้นฉีดด้วยน้ำทะเลที่แรงมาก 2-3 นาที (water pressure) และ shock ด้วยความเย็นเป็นเวลา 1 ชั่วโมง (อุณหภูมิน้ำ 23-26 ˚C) ก่อน shock ด้วยความร้อน เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (อุณหภูมิน้ำ 32-33 ˚C) และกระตุ้นโดยใช้อาหาร (food stimulants) โดยเพิ่มสาหร่ายแห้ง (*Spirulina*) ที่อัตรา 30 กรัม ต่อ 300-500 ลิตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นย้ายปลิงทะเลขาวไปยังแทงค์วางไข่ เริ่มทำการกระตุ้นครั้งแรกในวันพระจันทร์เต็มดวง (ขึ้น 15 ค่ำ) เนื่องจากสัตว์ทะเลส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์ที่ได้รับอิทธิพลจากดวงจันทร์ในวันข้างขึ้นหรือข้างแรม

และครั้งต่อมาในทุกๆ 1 สัปดาห์ ซึ่งจะตรงกับวันพระจันทร์มืดครึ่งดวง (แรม 8 ค่ำ) พระจันทร์มืดเต็มดวง (แรม 15 ค่ำ) และพระจันทร์มืดครึ่งดวง (ขึ้น 8 ค่ำ) เพื่อหาช่วงเวลาที่ปลิงทะเลสืบพันธุ์และรอบของการสืบพันธุ์ครั้งถัดไป

3. การศึกษาเพื่อหาฤดูวางไข่

จากการเก็บตัวอย่างในข้อ 1 และกระบวนการทางเนื้อเยื่อวิทยาในข้อ 2 นำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของปลิงทะเลขาวเพศผู้และเพศเมียที่อยู่ในระยะเจริญพันธุ์ (เสาวนีย์, 2539) และคำนวณค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index ; G.S.I.) (ธนิษฐา, 2543) ในแต่ละเดือน ดังนี้

การหาเปอร์เซ็นต์ของปลิงทะเลขาวเพศผู้และเพศเมียที่อยู่ในระยะเจริญพันธุ์

$$= \frac{\text{จำนวนปลิงทะเลขาวเพศผู้หรือเพศเมียที่อวัยวะสร้างเซลสืบพันธุ์อยู่ในระยะเจริญพันธุ์}}{\text{จำนวนปลิงทะเลขาวเพศผู้หรือเพศเมียทั้งหมด}} \times 100$$

การหาค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index ; G.S.I.)

$$= \frac{\text{น้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ (น้ำหนักเปียก) (กรัม)}}{\text{น้ำหนักตัว (เอาน้ำในตัวออก) ของปลิงทะเลขาวที่มีรังไข่รวมอยู่ด้วย (น้ำหนักเปียก) (กรัม)}} \times 100$$

4. การเตรียมการสกัดเพื่อศึกษาองค์ประกอบทางเคมี

นำอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะพัฒนาการ อบแห้งที่ 60 ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นบดให้เป็นผงละเอียดเพื่อใช้ในการวิเคราะห์ เถ้า โปรตีนรวม และไขมันรวม พร้อมทั้งนำอวัยวะสืบพันธุ์แต่ละระยะพัฒนาการ ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วย Polytron ใน NaCl 35 ppt ที่อุณหภูมิ 4 ºC จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 5000 xg ที่อุณหภูมิ 5 ºC เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใส (supernatant) เก็บไว้ที่ -80 ºC สำหรับวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรต ส่วนกล้ามเนื้อผนังลำตัวระยะ mature stage ของแต่ละเพศ บดให้เป็นเนื้อเดียวกันใน 10% trichloroacetic acid ที่อุณหภูมิ 4 ºC และ ปั่นเหวี่ยงที่ 5000 xg ที่อุณหภูมิ 5 ºC เป็นเวลา 15 นาที นำส่วน supernatant เก็บไว้ที่ -80 ºC เพื่อวิเคราะห์คาร์โบไฮเดรตภายหลัง (Ruiz-Verdugo *et al*., 2001)

5. การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณ (proximate composition)

5.1 ความชื้น (moisture)

ชั่งถ้วยอลูมิเนียม (W_1) ที่ผ่านการอบ (อุณหภูมิ 100 °C) อย่างละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) แล้วใส่ตัวอย่างลงในถ้วยอลูมิเนียมประมาณ 1 กรัม ทำการบันทึกน้ำหนักรวมของถ้วยอลูมิเนียมและตัวอย่าง (W_2) นำไปใส่ตู้อบที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำออกมาวางทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ชั่งน้ำหนักถ้วยอลูมิเนียมและตัวอย่างแห้ง (W_3) จนกว่าน้ำหนักจะคงที่ (AOAC, 1990)

การคำนวณ

$$\%\text{วัตถุแห้ง} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังอบ } (W_3) - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า } (W_1)}{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างก่อนอบ } (W_2) - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า } (W_1)} \times 100$$

5.2 เถ้า (ash)

อบถ้วยกระเบื้อง (porcelain dish) ที่แห้งและสะอาดในตู้อบอุณหภูมิ 100 °C นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกจากตู้อบ ปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น และชั่งน้ำหนัก (W_1) จากนั้นชั่งตัวอย่างประมาณ 0.1 กรัมใส่ในถ้วยกระเบื้อง บันทึกน้ำหนักตัวอย่างพร้อมถ้วย (W_2) นำไปเผาในเตาเผา ที่อุณหภูมิ 550 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำออกจากเตาเผาและปล่อยให้เย็นในโถดูดความชื้น นำมาชั่งน้ำหนัก (W_3) (AOAC, 1990)

การคำนวณ

$$\% \text{ เถ้า} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมตัวอย่างหลังเผา } (W_3) - \text{ น้ำหนักถ้วยเปล่า } (W_1)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง } (W_2)} \times 100$$

5.3 โปรตีนรวม (crude protein)

ชั่งตัวอย่างประมาณ 0.1 กรัม ใส่หลอดย่อยโปรตีน บันทึกน้ำหนักโดยละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) จากนั้นใส่สารเร่งรวม 3 กรัม และกรดซัลฟูริคเข้มข้น 10 มิลลิลิตร นำตัวอย่างไปย่อยที่อุณหภูมิ 375 °C จนกระทั่งสารละลายในหลอดย่อยมีสีใส (สีเขียวมรกต) ทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่ผ่านการย่อยเติมน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร และนำหลอดย่อยต่อกับเครื่องกลั่น ซึ่งมี flask ใส่กรดบอริก 40 มิลลิลิตร และหยดอินดิเคเตอร์ 2-3 หยด ลงใน flask จากนั้นเติม 45% NaOH ลงในหลอดย่อยอย่างช้าๆ จนมีปริมาตร 50 มิลลิลิตร จะเห็นสารละลายมีสีดำ ต่อมานำไปกลั่นจนกรดบอริกเปลี่ยนเป็นสีเขียวแล้วทำการกลั่นต่อไปอีก 10 นาที แล้วนำตัวอย่างที่ผ่านการกลั่น มาไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริคความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล จากนั้นคำนวณหาปริมาณโปรตีนหยาบ (AOAC, 1990)

การคำนวณ

$$\% \text{ ไนโตรเจน (Total Nitrogen)} = \frac{(A - B) \times C \times 0.014 \times 100}{D}$$

$$\% \text{ โปรตีน (Crude Protein)} = \% N \times 6.25$$

A = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ไตเตรตกับตัวอย่าง

B = มิลลิลิตรของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค 0.1 นอร์มอล ที่ใช้ไตเตรตกับ blank

C = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานกรดซัลฟูริค

D = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

5.4 ไขมัน (ether extract)

อบถ้วยไขมันที่มีลูกแก้ว 2-3 เม็ด ในตู้อบที่มีอุณหภูมิ 100 °C อบจนแห้งแล้วตั้งทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น ทำการชั่งน้ำหนักถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วให้ได้น้ำหนักคงที่ (W_2) จากนั้นชั่งตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ใส่กระดาษกรอง ประมาณ 0.1 กรัม (W_1) ห่อให้มิดชิดลงในไส้กรองสารที่เตรียมไว้นำใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน นำถ้วยสกัดไขมันพร้อมลูกแก้วที่ชั่งไว้แล้วเติมสารละลายไดคลอโรมีเทน 25 มิลลิลิตร แล้วใส่เข้าเครื่องสกัดไขมัน และเปิดเครื่องสกัดไขมัน โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการสกัดคือ 130 องศาเซลเซียส เปิดน้ำเข้าเครื่อง เปิดวาล์ว

เลื่อนปุ่มไปที่ boiling ต้มให้เดือดนาน 30 นาที จากนั้นเลื่อนปุ่มไปที่ rinsing เพื่อล้างตัวอย่าง 20 นาที และปิดวาล์วเปิดสวิทซ์อากาศ เลื่อนปุ่มไปที่ evaporation เพื่อให้สารระเหยออกไป 10 นาที หลังจากนั้นปิดเครื่อง ปิดอากาศและน้ำ แล้วเลื่อนปุ่มไปที่ evaporation กลับที่เดิม นำถ้วยสกัดไขมันออกจากเครื่องแล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส จนแห้ง นำถ้วยสกัดไขมันออกมาใส่ในโถดูดความชื้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำมาชั่งน้ำหนัก (W_3) (AOAC, 1990)

การคำนวณ

$$\%\text{ไขมัน (crude fat)} = \frac{\text{น้ำหนักถ้วยพร้อมไขมันที่สกัด } (W_3) - \text{น้ำหนักถ้วยเปล่า } (W_2)}{\text{น้ำหนักตัวอย่าง } (W_1)} \times 100$$

5.5 คาร์โบไฮเดรต

วัดปริมาณน้ำตาลทั้งหมดด้วยวิธี Phenol-sulphuric method โดยนำส่วน supernatant 1 มิลลิลิตร เติมในหลอดทดลองแก้ว ขณะเดียวกัน blank จะใช้น้ำ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 5% สารละลายฟีนอล 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และเติมกรดซัลฟูริคเข้มข้น 5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที และเขย่าแรงๆ ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งต่อไปอีกประมาณ 20 นาที แล้วจึงวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร และหาปริมาณ glucose units โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของกลูโคส (Dubois *et al*., 1956)

ผลการทดลอง

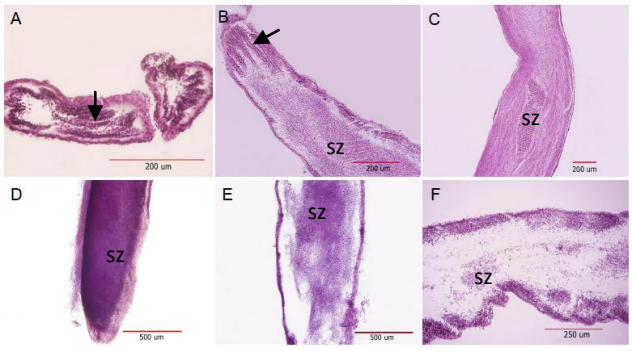
1. ระยะพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาว *H. scabra*

ผลการกระตุ้นปลิงทะเลขาวด้วยการชักนำให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ พบว่าตัวผู้จะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ก่อนตัวเมีย ซึ่งตัวเมียจะปล่อยหลังจากตัวผู้ปล่อยไปแล้ว 0.5-1 ชั่วโมง ในแต่ละครั้งตัวผู้จะปล่อยสายอสุจิ (sperm) อย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงหรือมากกว่านั้น ส่วนตัวเมียจะปล่อยไข่ (egg) โดยพ่นออกมาอย่างแรงในช่วงไม่กี่วินาที และพบว่าสามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ทุกๆ 2 สัปดาห์

ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ปลิงทะเลขาวมีท่อยาวเป็นแกนกลางและมีแขนงที่เป็นท่อ (tubules) ยื่นออกไปโดยรอบ เป็นพุ่ม ซึ่งขนาด สี รูปร่าง และจำนวน tubules ขึ้นอยู่กับระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ โครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ได้แก่ อัณฑะ (testis) ในเพศผู้ และ รังไข่ (ovary) ในเพศเมีย แบ่งออกเป็น 5 ระยะ ดังแสดงในตารางที่ 1 และการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ในแต่ละระยะพัฒนาการของเพศผู้ดังแสดงในรูปที่ 1 และ ของเพศเมีย ดังแสดงในรูปที่ 2

ตารางที่ 1. พัฒนาการและโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเล *Holothuria scabra*

ระยะของอวัยวะสืบพันธุ์	G.S.I.	ท่อแกนกลางของอวัยวะสืบพันธุ์				
		ความยาว (cm)	เส้นผ่านศูนย์กลาง (mm)	จำนวนแขนง	ลักษณะ	สี
Indeterminate stage						
เพศผู้	0.6±0.6	1-9	<0.05-0.50	0	ไม่สามารถแยกเพศได้ด้วยตาเปล่า	เหลืองเข้มปน-น้ำตาล
เพศเมีย	0.7±0.4	1-4	<0.05-0.10	0		
Growing stage						
เพศผู้	2.0±2.7	1-10	0.05-1.50	1-2	sperm มีการพัฒนา	ขาว
เพศเมีย	1.2±1.1	2-8	0.05-0.60	1-2	oocytes มีการพัฒนา (20-53 µm)	ส้มอ่อน
Mature stage						
เพศผู้	4.4±3.9	4-27	0.05-1.40	2-3	tubules ป่องออก เป็นเม็ดกลมเล็กๆ	ขาวครีม
เพศเมีย	7.6±6.3	3-18	0.30-1.60	2-3	oocytes มีการพัฒนามากขึ้น (48-156 µm)	ส้มแดง
Partly spawned stage						
เพศผู้	4.9±2.6	4-20	0.15-1.90	1-3	tubules ที่ปล่อย sperm แล้วจะเล็กลง ส่วน tubules ที่ยังไม่ ปล่อย sperm จะมี sperm หนาแน่น	ขาวครีม
เพศเมีย	6.3±4.4	6-20	0.05-1.80	1-3	follicle สลาย และพบ oocytes ที่ถูกทำลายโดย phagocytesใน tubules	ส้มแดงหรือส้มอ่อน
Spent stage						
เพศผู้	1.3±0.9	6-13	0.05-0.60	1-3	tubules จะมีลักษณะเหี่ยวย่น sperm ถูกปล่อยเกือบหมด	ขาว
เพศเมีย	1.4±1.0	5-14	0.05-0.80	1-3	tubules เล็กและหดตัว พบซากของ oocytes	ส้มอ่อน



รูปที่ 1. แสดงพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของ *Holothuria scabra*

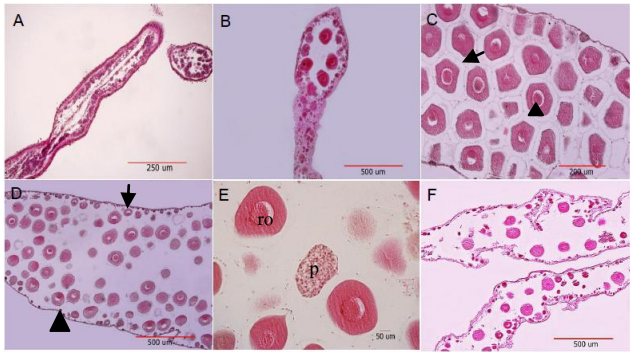
A Indeterminate testis หรือ recovering testis มีการยื่นของ germinal epithelium (ศรชี้) เข้าสู่แนวกลางของ lumen และ spermatocytes ที่กำลังพัฒนาเกาะอยู่

B, C Growing testis มีการสะสมของ spermatozoa (sz) ใน lumen มีการยื่นของ germinal epithelium (ศรชี้) ที่มี spermatocyte ที่กำลังพัฒนาเกาะอยู่

D Mature testis มีเฉพาะ spermatozoa (sz) อัดแน่น

E Partly spawned testis พบว่า spermatozoa (*sz*) หนาแน่นน้อยลง

F Spent testis พบว่าใน lumen ยังมี spermatozoa (sz) ที่ยังไม่ถูกปล่อย หรือปล่อยเกือบหมดแล้ว



รูปที่ 2. แสดงพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของ *Holothuria scabra*

A Indeterminate ovary หรือ recovering ovary พบ pre-vitellogenic oocytes

B Growing ovary พบการสร้างไข่ในช่วงแรก (early-vitellogenesis) และช่วงกลาง (mid-vitellogenesis)

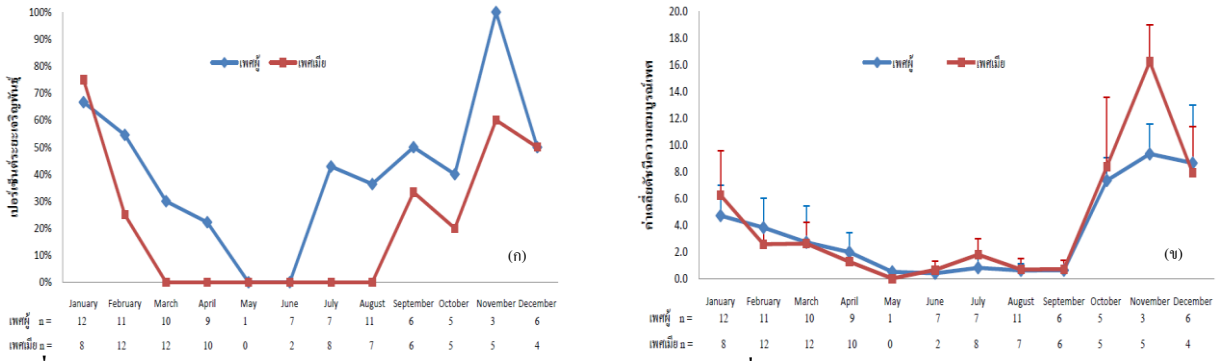
C Mature ovary พบ oocytes เจริญอย่างเต็มที่ภายใน follicle (ศรชี้) ที่มี germinal vesicle (หัวลูกศร) ขนาดใหญ่

D, E Partly spawned ovary พบว่ามี oocytes ที่ยังไม่ถูกปล่อย เริ่มมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ใหม่ในระยะ pre-vitellgenic (หัวลูกศร) และ vitellogenic oocytes (ศรชี้) พบซาก oocyte (ro) และ และ oocytes ที่สลายตัวจากการทำลายของ phagocytes (p)

F Spent ovary พบการเหี่ยวย่นและหดลงของ tubules มีซาก oocytes และ oocytes ที่สลายตัวจากการทำลายของ phagocytes

2. ฤดูการวางไข่ของปลิงทะเลขาว *H. scabra*

ผลจากการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ของปลิงทะเลขาวเพศผู้และเพศเมียที่อยู่ในระยะเจริญพันธุ์ ในเดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555 (รูปที่ 3ก) พบว่าทั้งเพศผู้และเพศเมียมีระยะการเจริญพันธุ์ในรอบปีที่ค่อนข้างสอดคล้องกัน คือ เพศผู้เริ่มมีระยะเจริญพันธุ์ตั้งแต่เดือนกรกฎาคมถึงเดือนตุลาคมในขณะที่เพศเมียเริ่มมีระยะเจริญพันธุ์ตั้งแต่เดือนกันยายนถึงเดือนตุลาคม และทั้งเพศผู้และเพศเมียมีระยะเจริญพันธุ์สูงสุดในเดือนพฤศจิกายนและเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนธันวาคมจนถึงเดือนกุมภาพันธ์ (เพศเมีย) และเดือนเมษายน (เพศผู้) ในขณะที่ช่วงเดือนมีนาคมถึงเดือนสิงหาคม (เพศเมีย) และช่วงเดือนพฤษภาคมถึงเดือนมิถุนายน (เพศผู้) ไม่พบระยะเจริญพันธุ์เลย (0%) ผลจากการศึกษาค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศ (gonadosomatic index ; G.S.I.) พบว่าปลิงทะเลขาวเพศผู้และเพศเมียเริ่มมีค่าเฉลี่ย G.S.I. สูงตั้งแต่เดือนตุลาคม (9) และมีค่าเฉลี่ยสูงสุดในเดือนพฤศจิกายน (16) และเริ่มลดลงตั้งแต่เดือนธันวาคมจนถึงเดือนเมษายน ในขณะที่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนกันยายนพบว่าค่าเฉลี่ย G.S.I. น้อยมาก (0-2) (รูปที่ 3ข) กล่าวได้ว่าฤดูการวางไข่ของปลิงทะเลขาว *H. scabra* อยู่ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม



รูปที่ 3. เปอร์เซ็นต์ระยะเจริญพันธุ์ (ก) และค่าดัชนีความสมบูรณ์เพศเฉลี่ย (gonadosomatic index; G.S.I.) (ข) ของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra* บริเวณเกาะปู จังหวัดกระบี่ ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนธันวาคม พ.ศ. 2555

3. องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว *H. scabra*

ผลจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Tukey HSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% พบว่าในเพศผู้ระยะแรกของพัฒนาการได้แก่ Indeterminate stage, Growing stage และ Mature stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมาก (1.29±0.01, 1.38±0.04 และ 1.36±0.03 ตามลำดับ) ในระยะ Mature stage มีปริมาณไขมันรวมและโปรตีนรวมมากที่สุด (2.82±0.16 และ 9.62±0.30 ตามลำดับ) และระยะ Spent stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไขมันรวม และโปรตีนรวมน้อยที่สุด (1.07±0.02, 0.46±0.06 และ 3.56±0.17 ตามลำดับ) (ตารางที่ 2) สำหรับเพศเมียพบว่าองค์ประกอบทางเคมีสอดคล้องกับในเพศผู้ คือระยะแรกของพัฒนาการได้แก่ Indeterminate stage และ Growing stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรตมาก (2.10±0.08 และ 2.10±0.07 ตามลำดับ) ในระยะ Mature stage มีปริมาณไขมันรวมและโปรตีนรวมมากที่สุด (1.88±0.09 และ 2.27±0.13 ตามลำดับ) และระยะ Spent stage มีปริมาณคาร์โบไฮเดรต ไขมันรวม และโปรตีนรวมน้อยที่สุด (0.80±0.01, 0.55±0.06 และ 0.73±0.11 ตามลำดับ) (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 2 องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra* เพศผู้

ระยะ	ความชื้น	ไขมันรวม	โปรตีนรวม	เถ้า	คาร์โบไฮเดรต
Indeterminate stage	84.89±0.83^{ab}	0.99±0.06^{c}	4.46±0.26^{c}	1.21±0.09^{c}	1.29±0.01^{a}
Growing stage	85.89±0.28^{a}	1.97±0.18^{b}	6.84±0.27^{b}	2.04±0.07^{b}	1.38±0.04^{a}
Mature stage	84.03±1.03^{ab}	2.82±0.16^{a}	9.62±0.30^{a}	2.48±0.03^{a}	1.36±0.03^{a}
Partly spawned stage	83.27±0.73^{b}	2.27±0.16^{b}	7.14±0.25^{b}	1.90±0.05^{b}	1.10±0.06^{b}
Spent stage	84.77±0.16^{ab}	0.46±0.06^{d}	3.56±0.17^{d}	2.04±0.09^{b}	1.07±0.02^{b}

ตารางที่ 3 องค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณของปลิงทะเลขาว *Holothuria scabra* เพศเมีย

ระยะ	ความชื้น	ไขมันรวม	โปรตีนรวม	เถ้า	คาร์โบไฮเดรต
Indeterminate stage	90.52±0.07^{b}	0.92±0.10^{c}	1.12±0.16^{b}	0.43±0.06^{d}	2.10±0.08^{a}
Growing stage	90.36±0.33^{b}	1.40±0.08^{b}	1.28±0.15^{b}	1.93±0.07^{b}	2.10±0.07^{a}
Mature stage	89.13±0.13^{d}	1.88±0.09^{a}	2.27±0.13^{a}	2.05±0.09^{b}	1.36±0.02^{b}
Partly spawned stage	89.80±0.19^{c}	1.38±0.18^{b}	1.34±0.12^{b}	2.62±0.07^{a}	1.15±0.02^{c}
Spent stage	91.39±0.19^{a}	0.55±0.06^{d}	0.73±0.11^{c}	1.27±0.08^{c}	0.80±0.01^{d}

การอภิปรายผล

ปลิงทะเลขาวที่รวบรวมจากบริเวณเกาะปู จังหวัดกระบี่สามารถชักนำให้เกิดการวางไข่โดยใช้หลายวิธีรวมกัน คือ วิธีทำให้แห้ง ความกดดันน้ำ การ shock ด้วยความเย็น การ shock ด้วยความร้อน และการกระตุ้นโดยใช้อาหาร ซึ่งสอดคล้องกับ Agudo (2006) ที่กล่าวไว้ว่า บ่อยครั้งที่มีการชักนำการวางไข่โดยการกระตุ้นหลายๆ วิธีรวมกัน และพบว่ามีฤดูกาลวางไข่ 1 ครั้งในรอบปี คือ ในช่วงเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม โดยพบระยะเจริญพันธุ์มากกว่า 50% คือ เดือนพฤศจิกายนและเดือนมกราคม และค่าเฉลี่ยดัชนีความสมบูรณ์เพศมีค่ามากในเดือนตุลาคมถึงเดือนธันวาคม และมากที่สุดในเดือนพฤศจิกายนซึ่งสอดคล้องกับปลิงทะเลขาวในออสเตรเลีย (Morgan, 2000) และอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาวมี 5 ระยะพัฒนาการ ได้แก่ ระยะ Indeterminate stage, Growing stage, Mature stage, Partly spawned stage และระยะ Spent stage ซึ่งมีขนาด สี รูปร่าง จำนวนแขนงของแต่ละ tubules และลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ แตกต่างกันในแต่ละระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ (Ramofafia *et al*., 2003) และองค์ประกอบทางเคมีโดยประมาณในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลขาว พบว่าระยะเจริญพันธุ์มีเปอร์เซ็นต์ความชื้นน้อยที่สุด มีเปอร์เซ็นต์โปรตีนรวมมากที่สุด รองลงมาคือไขมันรวม ซึ่งแตกต่างกับเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ของปลิงทะเลชนิด *Cucumaria frondosa* ที่เพศผู้และเพศเมีย มีไขมันมากที่สุด ตามมาด้วยโปรตีนและไกลโคเจน (David and MacDonald, 2002) แต่สอดคล้องกับอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเม่น *Strongylocentrotus droebachiensis* ที่มีโปรตีนมากกว่าไขมัน (Liyana-Pathirana *et al*., 2002) แต่คาร์โบไฮเดรตจะพบมากในระยะแรกๆ ซึ่งบ่งชี้ว่าคาร์โบไฮเดรตเป็น precursors สำหรับสังเคราะห์ไขมันและโปรตีนในอวัยวะสืบพันธุ์ (Barber and Blake, 1985)

เอกสารอ้างอิง

ธนิษฐา ทรรพนันทน์. 2543. ชีววิทยาประมง. ภาควิชาชีววิทยาประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสาวนีย์ สิงหไกรวรรณ. 2539. ชีววิทยาบางประการของปลาทรายแดง *Nemipterus peronii* และ *N. hexodon* บริเวณอ่าวไทยฝั่งตะวันออก. เอกสารวิชาการฉบับที่ 63/2539 ศูนย์พัฒนาประมงทะเลอ่าวไทยฝั่งตะวันออก กองประมงทะเล กรมประมง.

Agudo, N. 2006. Sandfish Hatchery Techniques. New Caledonia: South Pacific Commission Headquarters.

AOAC. 1990. Official Methods of Analysis (15th ed.). Washington, DC: Association of Official Analytical Chemists.

Barber, B. J. and Blake, N. J. 1985. Substrate catabolism related to reproduction in the bay scallop *Argopecten irradians concentricus*, as determined by O/N and RQ physiological indexes. Marine Biology, 87: 13-18.

David, V. M. M. and MacDonald, B. A. 2002. Seasonal biochemical composition of tissues from *Cucumaria frondosa* collected in the Bay of Fundy, Canada: feeding activity and reproduction. Journal of the Marine Biological Association of the UK, 82: 141-147.

Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28: 350-356.

Humason, G. L. 1979. Animal Tissue Techniques. (4th ed.). San Francisco: W. H. Freeman and Company.

Liyana-Pathirana, C., Shahidi, F. and Whittick, A. 2002. The effect of an artificial diet on the biochemical composition of the gonads of the sea urchin (*Strongylocentrotus droebachiensis*). Food Chemistry, 79: 461-472.

Morgan A. D. 2000. Aspects of the reproductive cycle of the sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea). Bulletin of Marine Science, 66: 47–57.

Ramofafia, C., Byrne, M. and Battaglene, C. S. 2003. Reproduction of the commercial sea cucumber *Holothuria scabra* (Echinodermata: Holothuroidea) in the Solomon Islands. Marine Biology, 142: 281-288.

Ruiz-Verdugo, C. A., Racotta, I. S. and Ibarra, A. M. 2001. Comparative biochemical composition in gonad and adductor muscle of triploid and diploid catarina scallop (*Argopecten ventricosus* Sowerby II, 1842). Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 259: 155-170.

Tong, Y., Zhang, X., Tian, F., Yi, Y., Xu, Q., Li, L., Tong, L., Lin, L. and Ding, J. 2005. Philinopsidea, a novel marine-derived compound possessing dual anti-angiogenic and anti-tumor effects. International Journal of Cancer, 114: 843-853.