ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

# รายงานการวิจัย

# การเจริญและการพัฒนาของตัวอ่อนและปลาวัยอ่อนในปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* Linnaeus (1758)

# Growth and Development of Saddleback Anemonefish *Amphiprion polymnus* Linnaeus (1758)

ภายใต้แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงปลาสวยงามน้ำเค็ม
ในกลุ่มปลาการ์ตูน ประจำปี 2546-2547

โดย

สุขใจ รัตนยุวกร กรรณิกา ชัชวาลวานิช
พิสุทธิ์ มังกรกาญจน์ อมรา ทองปาน

#BK-003697
AB 003458
- 6 ต.ค. 2548
197498

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2546-2547
สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา
พ.ศ. 2548

ISBN 974-3842-19-5

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้อนุมัติทุนสนับสนุนโครงการวิจัยฉบับนี้ ภายใต้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปีงบประมาณ 2546-2547 ซึ่งเป็นทุนวิจัยแบบต่อเนื่องระยะเวลา 2 ปี

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ. นสพ. ดร.พิสุทธิ์ มังกรกาญจน์ ที่ปรึกษาโครงการวิจัย และ รศ. กรรณิกา ชัชวาลวานิช รศ.ดร. อมรา ทองปาน ผู้ร่วมให้คำปรึกษาและร่วมทำวิจัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือข้าพเจ้าในการค้นคว้าทดลอง การเขียน การตรวจและปรับปรุงแก้ไขงานวิจัยชุดนี้ให้ถูกต้องครบถ้วนสมบูรณ์

กราบขอบพระคุณ ดร.พิชัย สนแจ้ง ผู้อำนวยการ ดร.วรเทพ มุธุวรรณ รองผู้อำนวยการ ดร.เสาวภา สวัสดิ์พีระ หัวหน้าหน่วยเพาะเลี้ยงแห่งสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา กราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อุทัยวรรณ โกวิทวที กรุณาให้คำแนะนำในการย้อมสีกระดูก ขอบคุณคุณนวลอนงค์ นาคคงจากศูนย์เครื่องมือกลางแห่งมหาวิทยาลัยมหาสารคามที่กรุณาให้คำแนะนำในการถ่ายภาพ พี่ๆ เพื่อนๆทุกท่านซึ่งร่วมงานในสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างและสถานที่ในการทำวิจัย

กราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ บูรพคณาจารย์ทุกท่านและครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือสนับสนุนเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์จนสำเร็จลุล่วงด้วยดี คุณค่าและประโยชน์ทางวิชาการของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอกราบเป็นกตเวทิตาแด่คณาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้าทั้งในอดีตและปัจจุบัน

สุขใจ รัตนยุวกร

พฤษภาคม 2548

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# การเจริญและการพัฒนาของตัวอ่อนและปลาวัยอ่อนในปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* Linnaeus (1758)

โดย

**สุขใจ รัตนยุวกร**[1] กรรณิกา ชัชวาลวานิช[2] พิสุทธิ์ มังกรกาญจน์[3] และ อมรา ทองปาน[4]

---

## บทคัดย่อ

พ่อแม่พันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* Linnaeus (1758) จากอ่าวไทย นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เพื่อเฝ้าสังเกตพฤติกรรมการวางไข่ การเจริญและพัฒนาของตัวอ่อน พบว่าปลาการ์ตูนอานม้าสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี โดยมีวงจรการสืบพันธุ์ทุก 14-21 วัน การเจริญและพัฒนาของตัวอ่อนแบ่งออกเป็น 26 ระยะตามรูปร่างลักษณะของตัวอ่อน ภายหลังจากปฏิสนธิ 148±8 ชั่วโมง ไข่จึงฟักออกมา ลูกปลาจะมีรูปร่างและมีแถบสีเหมือนกับพ่อแม่เมื่ออายุ 13 วันและอายุ 24-26 วันตามลำดับ สำหรับการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์และการเปลี่ยนเพศ พบว่าลูกปลาอายุ 1 เดือนยังไม่มีการแยกเพศ พบเพียง primordial germ cells อยู่กันเป็นกลุ่ม ในขณะที่ปลาอายุ 2-3 เดือนแสดงเพศเป็นกะเทย มีเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรกของทั้งเพศผู้และเพศเมียอยู่ด้วยกัน กระบวนการสร้างอสุจิเริ่มพบเมื่อปลามีอายุ 4 เดือน ซึ่งเนื้อเยื่ออัณฑะประกอบด้วยเซลล์ทุกระยะของกระบวนการสร้างอสุจิ ในขณะที่เนื้อเยื่อรังไข่ประกอบด้วย oogonia และ oocytes ระยะ chromatin nucleolus และระยะ perinucleolar การเปลี่ยนเพศจากกะเทยเป็นเพศเมียเกิดขึ้นเมื่อปลามีอายุ 12 เดือน โดยพบลักษณะการเสื่อมสลายของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ การสะสมของสารสีเหลืองอมน้ำตาล และมี vitellogenic oocytes ซึ่งพบจำนวนมากขึ้นก่อนที่จะมีการวางไข่ ปลาที่ทำหน้าที่เพศผู้อย่างสมบูรณ์จะมีทั้งเนื้อเยื่ออัณฑะและเนื้อเยื่อรังไข่ประกอบกันเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ ในขณะที่ปลาเพศเมียมีเพียงเนื้อเยื่อรังไข่อย่างเดียว ทั้งนี้ปลาเพศเมียส่วนใหญ่มีการวางไข่เมื่ออายุ 14 เดือน

**คำสำคัญ** : พัฒนาการของตัวอ่อน, พัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์, การเปลี่ยนเพศ, วงจรการสืบพันธุ์, ปลาการ์ตูนอานม้า

---

[1] สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน จังหวัดชลบุรี

[2] ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร

[3] ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต จังหวัดปทุมธานี

[4] ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพ ฯ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# Growth and Development of Saddleback Anemonefish *Amphiprion polymnus* Linnaeus (1758).

By

Sukjai Rattanayuvakorn[1] Kannika Chatchavalvanich[2] Pisut Mungkornkarn[3] Amara Thongpan[4]

## ABSTRACT

The breeding pairs of saddleback anemonefish, *Amphiprion polymnus* were brought from the Gulf of Thailand and reared in laboratory to observe their spawning behavior, eggs and embryonic development. The spawning was found to be all-year-round with the reproductive cycle between 14-21 days. The process of embryonic development could be divided into 26 stages based on morphological characteristics of the developing embryo. Hatching took place 148±8 hours after fertilization. Their shape and color stripe resembled the mature saddleback anemonefish on day 13 and days 24-26, respectively. As for their gonadal development and sex inversion, one-month juveniles had sexually undifferentiated gonads with primordial germ cells aggregated in groups, while two-to-three-month juveniles displayed immature hermaphroditic gonads containing early developmental stages of both male and female germ cells. Spermatogenesis began at 4 months having testicular tissue comprising of spermatogenic cells in all developmental stages, while ovarian tissue consisted of oogonia, oocytes in chromatin-nucleolus stage and perinucleolar stage. Protandric sex inversion first occurred at 12 months. Sex change was characterized by degeneration of male germ cells, deposition of yellow-brown pigment and the formation of vitellogenic oocytes. Before spawning activity began, their gonads contain female germ cells in all stages with numerous vitellogenic oocytes, whereas functional males had both ovarian and testicular tissues. Most females of breeding pairs had mature oocytes in their gonads and began to spawn when they reached 14 months. The gonad of mature male saddleback anemonefish was ovotestis containing both testicular and ovarian tissues, while that of mature female consisted of ovarian tissue only.

Key words; embryonic development, gonad development, sex inversion, reproductive cycle, anemonefish

[1] Institute of Marine Science, Burapha University, Bangsaen, Chonburi 20131, Thailand.

[2] Institute of Science, Rangsit University, Patumthani 12121, Thailand.

[3] Department of General Science, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

[4] Department of Zoology, Faculty of Science, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| สารบัญ | (1) |
| สารบัญภาพ | (3) |
| คำอธิบายอักษรย่อ | (9) |
| คำนำ | 1 |
| วัตถุประสงค์ | 3 |
| การตรวจเอกสาร | 4 |
| พฤติกรรมในการสืบพันธุ์และวางไข่ของปลา | 5 |
| ลักษณะของไข่ปลา | 8 |
| ประเภทของไข่ปลา | 8 |
| การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ | 10 |
| การเจริญของลูกปลาวัยอ่อนภายหลังการฟัก | 16 |
| การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์และการเปลี่ยนเพศของลูกปลา | 20 |
| การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาในระยะโตเต็มวัย | 23 |
| อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และการสร้างอสุจิ | 23 |
| อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียและการสร้างไข่ | 27 |
| พัฒนาการของรังไข่ | 35 |
| อุปกรณ์และวิธีการ | 38 |
| วิธีการ | 38 |
| สถานที่ทำการวิจัย | 41 |
| ระยะเวลาในการทำวิจัย | 41 |
| ผลการทดลอง | 42 |
| พฤติกรรมการสืบพันธุ์และวางไข่ | 42 |
| ลักษณะไข่ปลาการ์ตูนอานม้า | 43 |
| การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ | 43 |
| การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนภายหลังการฟัก | 47 |


มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สารบัญ(ต่อ)

หน้า

การเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์และการเปลี่ยนเพศในลูกปลาการ์ตูนอานม้า 51
การเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาการ์ตูนอานม้า 52
การเปลี่ยนเพศ 54
ลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ระยะโตเต็มวัยจากธรรมชาติ 55
ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้จากธรรมชาติ 55
ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ปลาการ์ตูนเพศเมียเพศเมียจากธรรมชาติ 58
วิจารณ์ผลการทดลอง 62
พฤติกรรมการสืบพันธุ์และวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า 62
ลักษณะไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า 62
การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ 63
การเจริญและพัฒนาการของลูกปลาภายหลังการฟัก 64
การเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์และการเปลี่ยนเพศ 66
ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ในระยะโตเต็มวัยจากธรรมชาติ 68
สรุปผลการทดลอง 73
เอกสารและอ้างอิง 118
ภาคผนวก 135
ภาคผนวก ก ภาพประกอบ 136
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีและสีย้อม 140
ประวัติการศึกษาและการทำงาน 149

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สารบัญภาพ


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 1 | พฤติกรรมการทำความสะอาดรัง | 75 |
| 2 | พฤติกรรมการว่ายวนรอบๆวัสดุวางไข่ | 75 |
| 3 | พฤติกรรมการวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้าเพศเมีย | 75 |
| 4 | พฤติกรรมการปล่อยน้ำเชื้อเข้าผสมกับไข่ของปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้ | 75 |
| 5 | การว่ายสลับไปมาของเพศเมียและเพศผู้เพื่อวางไข่และปล่อยน้ำเชื้อ | 75 |
| 6 | พฤติกรรมการเฝ้าดูแลไข่ | 75 |
| 7 | ภายหลังวางไข่ | 77 |
| 8 | ovotestis ของปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้ | 77 |
| 9 | ovary ของปลาการ์ตูนอานม้าเพศเมีย | 77 |
| 10 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 0 ชั่วโมง | 77 |
| 11 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 1 ชั่วโมง | 77 |
| 12 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 1 ชั่วโมง 40 นาที | 77 |
| 13 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 2 ชั่วโมง | 77 |
| 14 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 4 ชั่วโมง | 77 |
| 15 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 4 ชั่วโมง 30 นาที | 77 |
| 16 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 5 ชั่วโมง | 77 |
| 17 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 6 ชั่วโมง | 77 |
| 18 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 8 ชั่วโมง | 79 |
| 19 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 9 ชั่วโมง | 79 |
| 20 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 18 ชั่วโมง 34 นาที | 79 |
| 21 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 21 ชั่วโมง 4 นาที | 79 |
| 22 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 27 ชั่วโมง 30 นาที | 79 |
| 23 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 30 ชั่วโมง | 79 |
| 24 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 34 ชั่วโมง | 79 |
| 25 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 42 ชั่วโมง | 79 |


มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 26 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 48 ชั่วโมง | 79 |
| 27 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 55 ชั่วโมง | 79 |
| 28 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 64 ชั่วโมง | 79 |
| 29 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 75 ชั่วโมง 30 นาที | 79 |
| 30 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 93 ชั่วโมง | 81 |
| 31 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 97 ชั่วโมง | 81 |
| 32 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 109 ชั่วโมง | 81 |
| 33 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 119 ชั่วโมง | 81 |
| 34 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 127 ชั่วโมง | 81 |
| 35 | การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอที่ 148 ชั่วโมง | 81 |
| 36 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 1 วัน | 83 |
| 37 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 2 วัน | 83 |
| 38 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 3 วัน | 83 |
| 39 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 4 วัน | 85 |
| 40 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 5 วัน | 85 |
| 41 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 6 วัน | 85 |
| 42 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 7 วัน | 87 |
| 43 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 8 วัน | 87 |
| 44 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 9 วัน | 89 |
| 45 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 10 วัน | 89 |
| 46 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 13 วัน | 91 |
| 47 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 15 วัน | 91 |
| 48 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 20 วัน | 93 |
| 49 | การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนอายุ 24-26 วัน | 93 |
| 50 | แสดงตำแหน่งของ primordial germ cell | 95 |


มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 51 | แสดงลักษณะและตำแหน่งของ primordial germ cell | 95 |
| 52 | แสดงลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาอายุ 2 เดือน | 95 |
| 53 | แสดงลักษณะของ germ cells ระยะต่างๆในปลาอายุ 2 เดือน | 95 |
| 54 | แสดงลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาอายุ 3 เดือน | 95 |
| 55 | แสดงลักษณะของ germ cell ระยะต่างๆในปลาอายุ 3 เดือน | 95 |
| 56 | แสดงลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาอายุ 4 เดือนเมื่อตัดตามยาว | 97 |
| 57 | แสดงลักษณะของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาอายุ 4 เดือนเมื่อตัดตามขวาง | 97 |
| 58 | แสดงลักษณะของ ovarian cavity ในปลาอายุ 5 เดือน | 97 |
| 59 | แสดงลักษณะของ spermatogenic cell ในปลาอายุ 5 เดือน | 97 |
| 60 | แสดงลักษณะของ ovarian cavity ในปลาอายุ 6 เดือน | 97 |
| 61 | แสดงตำแหน่ง male zone และ female zoneในปลาอายุ 6 เดือน | 97 |
| 62 | การเปลี่ยนเพศ | 99 |
| 63 | การเพิ่มขนาดของ ovarian tissue เมื่อมีการเปลี่ยนเพศ | 99 |
| 64 | การลดขนาด testicular tissue และเพิ่มขึ้นของ ovarian tissue | 99 |
| 65 | การเกิด pyknotic nuclei | 99 |
| 66 | การเจริญและพัฒนาของไข่ในระยะ vitellogenic stage oocyte | 99 |
| 67 | แสดงลักษณะของไข่ในระยะ vitellogenic stage oocytes | 99 |
| 68 | ลักษณะของ ovotestis | 101 |
| 69 | ลักษณะ ovotestis พบ testicular tissue ที่ขอบของอวัยวะสืบพันธุ์ | 101 |
| 70 | ลักษณะ ovotestie พบ testicular tissue มีขนาดเพิ่มขึ้น | 101 |
| 71 | ลักษณะ ovotestie พบ ovarian tissue มีขนาดลดลง | 101 |
| 72 | ลักษณะของ testicular tissue | 101 |
| 73 | spermatogenic cell ในระยะต่างๆ | 101 |
| 74 | แสดงลักษณะovotestis โดย semithin section | 103 |
| 75 | ลักษณะ spermatogenic cell โดย semithin section | 103 |


มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 76 | ลักษณะ Sertoli cell โดย semithin section | 103 |
| 77 | ลักษณะของ primary spermatocyte โดย semithin section | 103 |
| 78 | ลักษณะของ secondary spermatocyte โดย semithin section | 103 |
| 79 | ลักษณะของ spermatid โดย semithin section | 103 |
| 80 | ลักษณะของ oogonia และ chromatin-nucleolus stage oocyte | 105 |
| 81 | ลักษณะของ perinucleolar stage oocyte | 105 |
| 82 | ลักษณะของ cortical alveoli stage oocyte | 105 |
| 83 | ลักษณะของ vitellogenic stage oocyte | 105 |
| 84 | ลักษณะของ maturation stage oocyte | 105 |
| 85 | ลักษณะของ postovulatory stage oocyte | 105 |
| 86 | ลักษณะovotestis โดย semithin section | 107 |
| 87 | ลักษณะของoogonia โดย semithin section | 107 |
| 88 | ลักษณะของperinucleolar stage oocyte โดย semithin section | 107 |
| 89 | ลักษณะของcortical alveoli stage oocyte โดย semithin section | 107 |
| 90 | ลักษณะของvitellogenic stage oocyte โดย semithin section | 107 |
| 91 | แสดงชั้น follicular cells ของไข่ โดย semithin section | 107 |
| 92 | ลักษณะของ Sertoli cell เมื่อศึกษาด้วย TEM | 109 |
| 93 | ลักษณะของ spermatogonia เมื่อศึกษาด้วย TEM | 109 |
| 94 | ลักษณะของ primary spermatocyte เมื่อศึกษาด้วย TEM | 109 |
| 95 | ลักษณะของ synaptonemal complex เมื่อศึกษาด้วย TEM | 109 |
| 96 | ลักษณะของ secondary spermatocytes เมื่อศึกษาด้วย TEM | 109 |
| 97 | ลักษณะของ secondary spermatocytes เมื่อศึกษาด้วย TEM | 109 |


มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สารบัญภาพ (ต่อ)


| ภาพที่ | | หน้า |
|---|---|---|
| 98 | แสดงรูปร่างของ spermatid | 111 |
| 99 | ลักษณะของ spermatid | 111 |
| 100 | ลักษณะของ spermatozoa | 111 |
| 101 | ลักษณะของ sperm flagellum ตัดตามขวาง | 111 |
| 102 | ลักษณะของ sperm flagellum ตัดตามยาว | 111 |
| 103 | ลักษณะของ Sertoli cell | 111 |
| 104 | ลักษณะของ oogonia | 113 |
| 105 | โครงสร้างของ oogonia | 113 |
| 106 | โครงสร้างของ oogonia | 113 |
| 107 | ลักษณะของ chromatin-nucleolus stage oocyte | 113 |
| 108 | ชั้น follicular cell ในระยะ chromatin-nucleolus stage oocyte | 113 |
| 109 | โครงสร้างของ chromatin-nucleolus stage oocyte | 113 |
| 110 | ลักษณะของ perinucleolar stage oocyte | 115 |
| 111 | โครงสร้างของ perinucleolar stage oocyte | 115 |
| 112 | ชั้น follicular cell ในระยะ perinucleolar stage oocyte | 115 |
| 113 | แสดง microvilli ในระยะ perinucleolar stage oocyte | 115 |
| 114 | ลักษณะของ cortical alveoli stage oocyte | 115 |
| 115 | ลักษณะ oil droplet ในระยะ cortical alveoli stage oocyte | 115 |
| 116 | ลักษณะoil droplet และyolk granuleในvitellogenic stage oocyte | 117 |
| 117 | ลักษณะของ vitellogenic stage oocyte | 117 |
| 118 | ชั้น zona radiata ในระยะ vitellogenic stage oocyte | 117 |
| 119 | ลักษณะของ maturation stage oocyte | 117 |
| 120 | ชั้น follicular cell ในระยะ maturation stage oocyte | 117 |
| 121 | ชั้น zona externa ในระยะ maturation stage oocyte | 117 |


มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สารบัญภาพ (ต่อ)

**ภาพผนวกที่** **หน้า**

1 ลักษณะของปลา, แหล่งที่อยู่อาศัย, โรงเพาะเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ 137

2 แสดงตำแหน่งของอวัยวะต่างๆในตัวอ่อนของลูกปลา 138

3 แสดงตำแหน่งการเกิดเซลล์สารสีของตัวอ่อนของลูกปลา 139

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# คำอธิบายอักษรย่อ

| | | |
|---|---|---|
| AF | = | Atretic follicle |
| Ax | = | Axoneme |
| BB | = | Basal body |
| BM | = | Basement membrane |
| C | = | Canal |
| CA | = | Cortical alveoli phase |
| Cs | = | Capsule |
| CNo | = | Chromatin nucleolus phase |
| Cy | = | Cytoplasm |
| D | = | Degeneration of testicular tissue |
| F | = | Flagellum |
| FC | = | Follicular cell |
| GC | = | Granulosa cell |
| I | = | Intestine |
| K | = | Kidney |
| L | = | Liver |
| M | = | Mitochondria |
| Ma | = | Maturation phase |
| Mi | = | Midpiece region |
| Mt | = | Microtubule |
| Mv | = | Microvilli |
| N | = | Nucleus |
| NM | = | Nuclear membrane |
| No | = | Nucleolus |
| NP | = | Nucleopore |
| O | = | Ovary |
| OC | = | Ovarian cavity |

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

| | | |
|---|---|---|
| Oc | = | Oocyte |
| OD | = | Oil droplet |
| Of | = | Ovarian fold |
| Og | = | Oogonia |
| OT | = | Ovarian tissue |
| P | = | Pigment |
| PGC | = | Primordial germ cells |
| PN | = | Pyknotic nuclei |
| PNo | = | Perinucleolar phase |
| PSc | = | Primary spermatocyte |
| R | = | Ribosome |
| S | = | Stomach |
| Sc | = | Spermatocytes |
| SC | = | Sertoli cell |
| Sg | = | Spermatogonia |
| SH | = | Sperm head |
| SnC | = | Synaptonemal complex |
| SSc | = | Secondary spermatocyte |
| St | = | Spermatid |
| Sy | = | Spermatocyst |
| Sz | = | Spermatozoa |
| T | = | Testis |
| TC | = | Theca cell |
| TE | = | Theca externa |
| TI | = | Theca interna |
| TT | = | Testicular tissue |
| VOc | = | Vitellogenic oocytes |
| Vt | = | Vitellogenic phase |
| YG | = | Yolk granules |

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ZE = Zona externa

ZI = Zona interna

ZR = Zona radiata

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

# การเจริญและการพัฒนาของตัวอ่อนและปลาวัยอ่อนในปลาการ์ตูนอานม้า *Amphiprion polymnus* Linnaeus (1758)

# Growth and Development of Saddleback Anemonefish *Amphiprion polymnus* Linnaeus (1758)

## คำนำ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่อุดมสมบูรณ์ไปด้วยทรัพยากรทางธรรมชาติอย่างมาก โดยเฉพาะทรัพยากรทางทะเล เนื่องจากมีแนวประการังที่สวยงามซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของพรรณไม้น้ำและสัตว์น้ำนานาชนิดเช่น กุ้ง หอย ปูและปลาชนิดต่างๆที่มีรูปร่างแปลกและมีสีสันสวยสะดุดตาเป็นที่ต้องการของผู้ที่รักในการเลี้ยงปลาทะเลประเภทสวยงาม การเลี้ยงปลาทะเลประเภทสวยงามเป็นงานอดิเรกที่ให้ความเพลิดเพลิน ผ่อนคลายความเครียดและกล่อมเกลาจิตใจให้อ่อนโยนได้ ปัจจุบันความนิยมในการเลี้ยงปลาทะเลประเภทสวยงามได้แพร่หลายมากขึ้น และส่งผลให้เกิดอาชีพการจับปลาทะเลประเภทสวยงามเพื่อธุรกิจในเชิงพาณิชย์

ก่อนปี พ.ศ.2534 ประเทศไทยส่งปลาทะเลประเภทสวยงามเป็นสินค้าออกไปจำหน่ายยังต่างประเทศเป็นมูลค่าหลายล้านบาท ปัจจุบันการส่งออกปลาทะเลประเภทสวยงามและสัตว์ในแนวปะการังถูกควบคุมไม่ให้มีการจับและส่งออก โดยกรมประมงเสนอให้กระทรวงเกษตรและสหกรณ์เสนอต่อกระทรวงพาณิชย์ออกเป็นประกาศของกระทรวงพาณิชย์ว่าด้วยการส่งสินค้าออกไปนอกราชอาณาจักรฉบับที่ 56 พ.ศ.2534 ข้อ 3 ให้ปลาทะเลประเภทสวยงามที่มีชีวิตจำนวน 400 ชนิด เป็นสินค้าที่ต้องขออนุญาตในการส่งออกไปนอกราชอาณาจักร (ราชกิจจานุเบกษาเล่ม 108 ตอนที่ 145 ลงวันที่ 20 สิงหาคม 2534) (อุ่นจิต, 2537) ถึงแม้จะมีกฎหมายห้ามจับและห้ามส่งออกปลาทะเลประเภทสวยงาม ไม่ทำให้ความต้องการลดลง กลับส่งผลให้เกิดความเสียหายเพิ่มขึ้นเนื่องจากความต้องการมีมากขึ้นและราคาสูงขึ้นตาม จึงทำให้มีการลักลอบจับมากขึ้น ส่งผลต่อระบบนิเวศที่ปลาเหล่านี้อาศัยอยู่ การออกกฎหมายห้ามจับและห้ามส่งออกไม่เป็นผลดีเท่าไรนัก รัฐควรจะมีมาตรการหรือการจัดการที่รัดกุม เช่นส่งเสริมให้มีการจับอย่างถูกวิธี มีการจัดการภายหลังการจับให้ถูกต้องเพื่อลดความเสียหาย หรือการออกใบอนุญาตให้จับในปริมาณและชนิดตามที่กำหนดเท่านั้น การใช้มาตรการเหล่านี้จะช่วยลดปัญหาได้แต่ไม่ใช่เป็นการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แก้ปัญหาในระยะยาว การแก้ไขปัญหาในระยะยาวที่ยั่งยืน คือเร่งให้มีการศึกษาวิจัยวิธีการเพาะขยายพันธุ์ปลาทะเลประเภทสวยงามที่อาศัยอยู่ในแนวปะการังและพัฒนาเทคนิคการอนุบาลให้ได้ลูกปลาเป็นจำนวนมาก ซึ่งเป็นการลดการจับปลาจากธรรมชาติหรือลดการนำเข้าจากประเทศเพื่อนบ้าน และส่งเสริมให้เป็นอาชีพกับชาวประมงต่อไป

ปลาการ์ตูนอานม้าหรือปลาการ์ตูนดำแดงหลังอาน เป็นปลาที่อาศัยในแนวปะการังของทะเลไทยอีกชนิดหนึ่งที่กำลังเกิดปัญหาดังกล่าว ส่งผลให้มีจำนวนลดลงมาก จึงทำให้เกิดความสนใจและเป็นที่มาของการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญและพัฒนาของปลาการ์ตูนอานม้า ถึงแม้ว่าการศึกษาครั้งนี้เป็นการวิจัยเพื่อหาข้อมูลพื้นฐานแต่ก็เป็นงานที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่อการศึกษาการเพาะขยายพันธุ์และการอนุบาลลูกปลาวัยอ่อน ซึ่งจะทำให้ทราบระยะเวลาและการพัฒนาของไข่ปลาตั้งแต่ไข่ได้รับการปฏิสนธิจนฟักเป็นตัว การเปลี่ยนแปลงรูปร่างหลังการฟักจนกระทั่งมีรูปร่างคล้ายพ่อแม่ ศึกษาระยะเวลาการพัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์จนกระทั่งเป็นตัวเต็มวัยพร้อมที่จะสืบพันธุ์ได้ การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างปลาการ์ตูนอานม้าพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติ การศึกษาจำเป็นต้องอาศัยความรู้พื้นฐานเหล่านี้ เพื่อที่จะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับเทคโนโลยีการเพาะพันธุ์ปลาสมัยใหม่ ให้ผลผลิตตามต้องการ เช่น การเหนี่ยวนำให้ไข่ปลามีจำนวนโครโมโซมมากขึ้นเป็น 3 ชุด (triploid) หรือการนำจีนเร่งการเจริญเติบโต (growth hormone gene) มาฉีดในไข่ปลาเพื่อให้ลูกปลาที่ฟักออกมามีอัตราการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้น เป็นต้น ในประเทศไทยไม่มีการศึกษาหรือข้อมูลของปลาการ์ตูนอานม้าชนิดนี้มากพอที่จะนำไปประยุกต์ใช้ได้ การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับปลาการ์ตูนอานม้าครั้งนี้จะทำให้ได้ข้อมูลและนำไปประยุกต์ใช้และทำให้ประเทศไทยเป็นแหล่งเพาะและผลิตปลาทะเลประเภทสวยงามเป็นสินค้าส่งออกอีกชนิดหนึ่งเหมือนกับอุตสาหกรรมส่งออกปลาน้ำจืดที่ไทยมีสถิติการส่งออกเป็นอันดับต้นๆของโลกได้ในอนาคต

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

## วัตถุประสงค์

1. ศึกษาพฤติกรรมการตกไข่ การเจริญและพัฒนาของไข่ปลาตั้งแต่ไข่ได้รับการปฏิสนธิจนฟักออกเป็นตัว และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของลูกปลาวัยอ่อน (larva) จนกระทั่งมีรูปร่างและแถบสีเหมือนพ่อแม่ทุกประการ

2. ศึกษาพัฒนาการและการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลาการ์ตูนอานม้าตั้งแต่อายุ 1 เดือนถึงอายุ 14 เดือน และการเปลี่ยนเพศ

3. ศึกษาลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาการ์ตูนอานม้า ตัวโตเต็มวัยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการและจากธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# การตรวจเอกสาร

ปลาการ์ตูนอานม้าหรือปลาการ์ตูนดำแดงหลังอาน Saddleback Anemonefish, *Amphiprion polymnus* Linnaeus (1758) เป็นปลาทะเลประเภทสวยงามชนิดหนึ่งในกลุ่มปลาการ์ตูนหลายชนิดในทะเลไทย และเป็นที่นิยมของนักเลี้ยงปลาทะเลประเภทสวยงามทั้งในและต่างประเทศ ปลาการ์ตูนอานม้ามีการจัดลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้ (วิมล, 2540; Allen,1991)

Phylum Chordata
Class Teleostomi
Subclass Actinopterygii
Order Perciformes
Suborder Percoidei
Family Pomacentridae
Subfamily Amphiprioninae
Genus *Amphiprion*
Species *Polymnus*

ปลาการ์ตูนจัดอยู่ในสกุล(genus) *Amphiprion* มีอยู่ 25 ชนิดทั่วโลก (Allen,1980) จากการสำรวจปลาการ์ตูนในประเทศไทยพบเพียง 7 ชนิด และแพร่กระจายอยู่ทั่วไปในแถบฝั่งทะเลอันดามันและฝั่งอ่าวไทย จุดที่สำรวจพบมากที่สุดคือ เกาะง่าม จังหวัดตราด เกาะง่ามที่จังหวัดชุมพร หมู่เกาะสุรินทร์และกองหินใต้น้ำบางแห่ง เช่น กองหินแดง จังหวัดตรัง เป็นต้น อุ่นจิต (2537) รายงานว่าปลาการ์ตูนที่พบในทะเลไทยฝั่งทะเลอันดามันมี 5 ชนิด ได้แก่ ปลาการ์ตูนส้มขาว False Clown Anemonefish, *Amphiprion ocellaris* Cuvier (1830) ปลาการ์ตูนอินเดียน Yellow Skunk Anemonefish, *Amphiprion akallopisos* Bleeker (1853) ปลาการ์ตูนลายปล้องหางเหลือง Sebae Anemonefish, *Amphiprion sebea* Bleeker (1853) ปลาการ์ตูนลายปล้อง Clark's Anemonefish, *Amphiprion clakii* Bennett (1830) และปลาการ์ตูนแดงดำ Red Saddleback Anemonefish, *Amphiprion ephippium* Bloch (1790) ปลาการ์ตูนที่พบในอ่าวไทยมี 2 ชนิด ได้แก่ ปลาการ์ตูนอานม้าหรือปลาการ์ตูนดำแดงหลังอาน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Saddleback Anemonefish, *Amphiprion polymnus* Linnaeus (1758) และปลาการ์ตูนอินเดียนแดง Pink Skunk Clownfish, *Amphiprion perideraion* Bleeker (1855)

ลักษณะทั่วไปของปลาการ์ตูนอานม้าที่พบในประเทศไทย ลำตัวมีสีน้ำตาลอมดำหรือดำ ส่วนหัว อกและครีบอกมีสีส้มอมเหลือง มีแถบขาว 2 แถบ แถบแรกพาดบนบริเวณส่วนหัวหลังดวงตา อีกแถบพาดบริเวณส่วนหลังของลำตัวเป็นแถบโค้งพาดเฉียงขึ้นไปถึงครีบหลัง ครีบหางมีสีดำและตัดขอบด้วยสีขาว ส่วนที่เป็นแถบสีดำจะเรียวเล็กลงไปจนถึงขอบของปลายหางdorsal rays มี10 หรือ11 หรือ13-16 อัน anal rays ส่วนใหญ่มี 13 แต่ก็เคยพบ 11 หรือ12-14 อัน pectoral rays มี19 อันบางครั้งพบแค่ 18 อัน แถบเกล็ดบนแนวเส้นข้างลำตัว (lateral-line scale) มี 32-41 อัน predorsal scales มี 10-15 อัน เมื่อเปิดแผ่นปิดเหงือกปลาขึ้นพบซี่กรองเหงือก (gill racker) บนแกนเหงือกอันแรก (first arch) ซึ่งมี 16-19 ซี่ มีฟันเป็นรูปกรวย (teeth conical) (Allen,1980, 1991) สุภาพร (2542) จำแนกลักษณะฟันที่เป็นรูปกรวยว่าเป็นชนิดฟันเขี้ยว (canine) ลักษณะคือโคนใหญ่ ปลายเรียว อาจตั้งตรงหรือโค้งงอ มีขนาดเล็กใหญ่แตกต่างกัน Robert (n.d.) กล่าวถึงการดำรงชีวิตของปลาการ์ตูนอานม้าว่าชอบอาศัยอยู่กับดอกไม้ทะเลชนิดที่ชอบฝังตัวอยู่ตามพื้นทรายคือ *Heteractis crispa* Ehrenberg (1834) ที่มีสีม่วงหรือสีน้ำตาลหนวดยาวมาก และดอกไม้ทะเล *Stichodactyla haddon* Saville-kent (1893) มีสีน้ำตาลหนวดสั้น อาศัยในระดับความลึก 2-30 เมตรหรือ 6.6-100 ฟุต อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส หรือ 77-82 องศาฟาเรนไฮน์ ตัวเต็มวัยมีขนาดโดยเฉลี่ย 13±5.1 เซนติเมตร ปลาการ์ตูนอานม้าชอบอาศัยอยู่เหนือพื้นโคลนหรือพื้นทราย ในแอ่งน้ำใต้ทะเล ตามซอกแนวปะการัง หรือบริเวณที่สามารถหลบซ่อนตัวได้ อาจพบเพียงตัวเดียวหรือเป็นคู่ และในบางครั้งมีลูกรวมอยู่ด้วย

**<u>พฤติกรรมในการสืบพันธุ์และวางไข่ของปลา</u>**

การสืบพันธุ์แบ่งได้ 3 แบบตามชนิดของปลา ดังนี้

1. การสืบพันธุ์แบบแยกเพศ (bisexual reproduction หรือ dioecious) โดยปลาเพศผู้และเพศเมียสร้างเซลล์สืบพันธุ์แยกกัน การผสมพันธุ์เป็นแบบภายนอกตัว (external fertilization) หรือแบบภายในตัว (internal fertilization) ก็ได้

2. การสืบพันธุ์แบบกะเทย (hermaphroditism หรือ monoecious) พบเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (testicular tissue) และเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ovarian tissue) อยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ตัวเดียวกัน อาจพบเนื้อเยื่อทั้งสองชนิดในเวลาเดียวกันหรือคนละช่วงเวลาก็ได้ การผสมพันธุ์อาจเกิดขึ้นภายในตัวเดียวกัน (self-fertilization) เมื่อพบเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเพศสุกพร้อมกัน หรือมีการผสมพันธุ์ข้ามตัว (cross-fertilization) เมื่อพบเซลล์สืบพันธุ์เพียงเพศเดียวที่สุกและพร้อมทำงานได้ การผสมพันธุ์ข้ามตัวสามารถแบ่งได้ 2 แบบ แบบที่ 1 คือกะเทยแบบ protandrous hermaphrodite หมายถึงปลาที่มีอวัยวะสืบพันธุ์ที่ทำหน้าที่เป็นอัณฑะก่อนจึงทำหน้าที่เป็นรังไข่ พบในปลาทะเลกลุ่มปลานกแก้ว *Sparus auratus* ปลาหัวแบน *Inegocia crocodila* และปลาการ์ตูน แบบที่ 2 คือกะเทยแบบ protogynous hermaphrodite หมายถึงปลาที่ช่วงแรกมีอวัยวะสืบพันธุ์เป็นรังไข่ก่อนแล้วจึงเปลี่ยนเป็นอัณฑะ พบในปลาทะเล เช่น ปลานกแก้ว *Dentex tumifrons* ปลากะรัง สกุล *Epinephelus*

3. การสืบพันธุ์แบบไข่ที่ไม่ได้รับการผสม (parthenogenesis หรือ gynogenesis) ไข่สามารถเจริญเป็นตัวอ่อนได้โดยเชื้อตัวผู้เป็นเพียงตัวกระตุ้นไข่ให้เกิดการเจริญและพัฒนาเท่านั้น โดยไม่ต้องผสม ลูกที่ได้จะมีโครโมโซมชุดเดียว(n) และเป็นเพศเมียทั้งหมด พบในพวกปลากินยุง เช่น ปลาสอด ปลาหางนกยูง (วิมล, 2536; สุภาพร, 2542)

วิมล (2536) รายงานว่าปลาทุกชนิดมีฤดูกาลในการวางไข่ที่แน่นอน ปลาในเขตอบอุ่นจะวางไข่ในฤดูร้อน ปลาในเขตหนาววางไข่ในฤดูใบไม้ร่วงและฤดูหนาว ปลาที่ทนต่อการปลี่ยนแปลงอุณหภูมิในช่วงกว้างมักวางไข่ในฤดูใบไม้ผลิ ส่วนปลาในเขตร้อนบางชนิดวางไข่ได้ตลอดปี ระยะเวลาในการฟักของไข่ปลาในเขตร้อนใช้เวลาน้อยกว่าไข่ปลาในเขตหนาว พฤติกรรมของปลาเมื่อถึงฤดูวางไข่จะรวมกลุ่มกัน โดยว่ายทวนน้ำเข้ามาในแม่น้ำ จากทะเลลึกเข้าสู่ทะเลตื้น จากแม่น้ำสู่มหาสมุทร เพื่อหาแหล่งที่เหมาะสมปลอดภัยในการวางไข่ ในปลาทะเล เช่น ปลากะพงและปลากระบอกหลังเขียวว่ายรวมกันเป็นกลุ่ม เพื่อหาแหล่งวางไข่บริเวณชายฝั่ง การที่ปลามีพฤติกรรมในการรวมกลุ่มเพื่อเดินทางไปวางไข่ เป็นพฤติกรรมที่น่าเป็นห่วงมาก เนื่องจากชาวประมงสามารถล้อมจับฝูงปลาได้ง่ายและจับได้เป็นจำนวนมาก

อุ่นจิต (2537) ได้ศึกษาพฤติกรรมปลาการ์ตูนส้มขาว False Clown Anemonefish, *A. ocellaris* Cuvier (1830) โดยรวบรวมพ่อแม่พันธุ์จากกองหินบริเวณหน้าสถาบันวิจัยชีววิทยาและประมงทะเล จังหวัดภูเก็ต พบว่ามีการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยปลาเพศผู้และเพศเมียสร้างเซลล์สืบพันธุ์แยกกันและผสมพันธุ์ภายนอกตัว เมื่อพ่อแม่ปลาพร้อมวางไข่ บริเวณท้องของปลาตัวเมียจะเป่งนูนกลมใหญ่กว่าปกติมาก และมี urogenital papilla รูปกรวยสีแดงจางๆโผล่ออกมาจากบริเวณช่องสืบพันธุ์ยาว 4-5 มิลลิเมตร ปลาตัวผู้จะมีท่อสีขาวขนาดเล็กโผล่ออกมาจากช่องสืบพันธุ์ความยาว 2 มิลลิเมตรเช่นกัน ทั้งคู่เฝ้าดูแลความสะอาดวัสดุที่จะวางไข่ตลอดเวลา ในขณะที่วางไข่ ตัวเมียจะว่ายวนไปมาชิดกับวัสดุที่จะวางไข่ ส่วนของ urogenital papilla สัมผัสกับวัสดุที่วางไข่ เมื่อฟองไข่หลุด ขั้วด้านล่าง (ventral pole) ของไข่มีเยื่อเหนียวใสยึดกับวัสดุด้านล่างอย่างเหนียวแน่นทันที แม่ปลาจะว่ายวนเป็นวงกลมเป็นวงแคบๆก่อนแล้วค่อยขยายวงกว้างขึ้นขณะเดียวกันก็ปล่อยไข่ลงติดกับวัสดุวางไข่เพิ่มมากขึ้น และตัวผู้ว่ายตามติดพร้อมทั้งปล่อยน้ำเชื้อผสมทันที ในการวางไข่ใช้เวลา 40-60 นาที ไข่ที่วางประมาณ 145-1,827 ฟอง ภายหลังจากวางไข่ urogenital papilla จะหดกลับเข้าที่เดิม ไข่ปลาการ์ตูนต้องอาศัยพ่อแม่เฝ้าดูแลและพัดโบก ไข่จึงจะพัฒนาและฟักออกเป็นตัวได้ หน้าที่สำคัญอีกอย่างคือ การปกป้องไม่ให้ศัตรูเข้าใกล้รังที่มีไข่ ขนิษฐาและรังสรรค์ (2543) พบภายหลังการวางไข่ พ่อแม่ปลาบางชนิดอาจมีพฤติกรรมในการดูแลไข่และมีการสร้างรังเช่นปลาการ์ตูน แต่ก็มีปลาหลายชนิดไม่มีการดูแลไข่ ปล่อยให้ฟักเองตามธรรมชาติและไม่สร้างรัง อุ่นจิต (2537) พบว่าปลาการ์ตูนส้มขาวบางคู่วางไข่สม่ำเสมอตลอดปี บางคู่หยุดวางไข่เป็นบางช่วงโดยจะทิ้งช่วงตั้งแต่ 82–365 วัน โดยวางไข่หลังเที่ยงถึงเย็น ส่วนใหญ่วางเวลา 14.00-15.00 นาฬิกา แต่ไม่พบว่ามีการวางไข่ในช่วงเช้า Verwey (1930) พบปลาการ์ตูน Clown Anemonefish, *A. percula* Lacepede (1802) ที่เลี้ยงไว้จะพักวางไข่ประมาณ 2 เดือน โดยไม่สามารถกำหนดช่วงเวลาพักที่แน่นอนได้ และจะวางไข่ในช่วง 10.00-14.00 นาฬิกาเท่านั้น (Garnaud,1951) ในปลาการ์ตูนลายปล้อง Clark's Anemonefish, *A.clakii* Bennett (1830) ที่พบทางตอนใต้ของประเทศญี่ปุ่นจะหยุดวางไข่ในช่วงฤดูหนาว และเมื่ออยู่ในเขตร้อนจะวางไข่ตลอดทั้งปี (Alien,1972; Bell,1976 ) Henningsen (1989) พบว่าในปลาการ์ตูน Tomato Clown, *A. fernatus* Brevoort (1856) วางไข่ช่วงบ่ายถึงเย็นเท่านั้น

**ลักษณะของไข่ปลา**

วิมล (2540) รายงานว่าไข่ปลาแต่ละชนิดมีรูปร่างลักษณะแตกต่างกัน ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม บางชนิดเป็นรูปรี หรือคล้ายหยดน้ำ เมื่อไข่สุกมีเยื่อบางๆห่อหุ้ม ถ้าเป็นปลาที่วางไข่จะมีเปลือกไข่หุ้มรอบไข่ ไข่ที่เจริญเต็มที่มีรูเปิดเล็กๆเรียกว่าช่องไมโครไพล์(micropyle) อยู่บริเวณเซลล์ขั้ว (polar body) ซึ่งเป็นช่องให้น้ำเข้า ทำให้เปลือกไข่ขยายออก ถ้าไข่ได้รับการผสมช่องไมโครไพล์จะปิดทำให้น้ำเข้าไม่ได้ แต่ยังคงมีการแพร่ของน้ำและก๊าซรอบๆเปลือกไข่ ไข่ที่ถูกน้ำเปลือกจะแข็งขึ้นแต่ถ้าเป็นไข่ที่เจริญในตัวแม่เปลือกจะไม่แข็ง ไข่ปลาแต่ละฟองประกอบด้วย

1. เปลือกไข่ (egg shell หรือ egg capsule) เป็นเยื่อบางๆอยู่ชั้นนอก ชั้นรองถัดมาเรียกว่าชั้น chorion ไข่ปลาที่อยู่ในน้ำมีเปลือกที่ไม่แข็ง แต่มีวุ้นหรือเมือกเหนียวล้อมรอบ

2. Perivitelline space คือ ช่องว่างระหว่างเปลือกไข่กับ perivitelline membrane พบว่ามีน้ำอยู่ภายใน ช่วยในการลอยตัวของไข่ ทำให้ไข่หมุนได้รอบๆ

3. ไซโทพลาซึม (cytoplasm) คือส่วนของตัวไข่ มี perivitelline membrane หุ้มอยู่รอบๆ ภายในมีไข่แดงและ blastodisc

4. Blastodisc หรือ germinal disc อยู่ติดกับผิวของไซโทพลาซึมส่วนใดส่วนหนึ่งที่ค่อนข้างจะหนาทึบมากกว่าส่วนอื่นๆ ภายในมีนิวเคลียส (nucleus) ซึ่งมีโครโมโซมสำหรับถ่ายทอดลักษณะของแม่ปลาไปสู่ลูกปลา

5. ไข่แดง (yolk) อยู่ใต้ blastodisc เป็นแหล่งสะสมอาหารสำหรับตัวอ่อน ภายในอาจมีหยดไขมันหรือหยดน้ำมันสะสมอยู่

**ประเภทของไข่ปลา**

การแบ่งประเภทของไข่ปลา แบ่งตามการลอยน้ำออกเป็น 3 ประเภท ดังนี้คือ

1. ไข่ลอย (pelagic egg หรือ buoyant egg) ไข่มีลักษณะเปลือกบาง ใส ไม่มีเมือกเหนียว ไข่ไม่เกาะติดกัน ในบางชนิดมีหยดน้ำมันปนในไข่แดงทำให้ลอยน้ำได้ดี และ perivitelline space แคบเพราะดูดน้ำได้เพียงเล็กน้อย พบในปลาทะเลส่วนมากและปลาน้ำจืดบางชนิด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. ไข่จม (demersal egg) เป็นไข่ที่มีขนาดใหญ่ เปลือกไข่หนาทำให้ไข่ทึบ มี perivitelline space แคบ จึงมักจะจมลงสู่ท้องน้ำ สามารถแบ่งย่อยได้เป็นไข่จมไม่เกาะติดวัสดุ (non-adhesive egg) จะไม่มีสารเหนียว (adhesive layer) ที่บริเวณเปลือกไข่ เช่นไข่ปลานิล ไข่ปลาตะพัด และไข่จมติดวัสดุ (adhesive egg) จะมีสารเหนียวที่บริเวณเปลือกไข่ ทำให้ไข่เหนียวติดวัสดุได้ง่าย ความเหนียวของไข่ปลามีความแตกต่างกันไปตามชนิดของปลาและพบว่าเมื่อไข่ฟักเป็นตัวความเหนียวจะลดลง พบในปลาบึก ปลาทอง ปลาปอมบาดัวร์ (วีระพงศ์, 2536) และปลาการ์ตูน (Allen, 1991)

3. ไข่ครึ่งลอยครึ่งจม (semibuoyant egg) จะมีความถ่วงจำเพาะใกล้เคียงกับน้ำ เมื่อไข่สัมผัสน้ำจะจม แต่เมื่อดูดน้ำเข้าใน perivitelline space ทำให้ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้นโดยจะจมน้ำเมื่ออยู่นิ่งๆ และจะลอยน้ำเมื่ออยู่ในน้ำไหล มีลักษณะครึ่งๆกลางๆระหว่างไข่ลอยและไข่จม เปลือกไข่บางและโปร่งแสง ไข่ไม่ติดกับวัตถุใดๆ พบมากในกลุ่มปลาน้ำจืด (วีระพงศ์, 2536 )

อุ่นจิต(2537) รายงานว่าไข่ปลาการ์ตูนส้มขาวที่วางใหม่ ส่วนที่เป็นไข่แดงมีสีเหลืองอ่อนๆ บางครั้งก็มีสีเหลืองอมส้มจางๆ ส่วนอื่นๆของไข่จะใส ด้านที่เป็นanimal pole มีส่วนของใยเหนียวสั้นๆสำหรับยึดไข่ให้ติดกับวัสดุวางไข่ ไข่สามารถโบกพัดไปมาได้ถึง 180 องศาเซลเซียส ตามการพัดของกระแสน้ำ ในโรงเพาะฟักวัสดุที่ปลาการ์ตูนชนิดนี้เลือกวางไข่ ได้แก่ เปลือกหอยมือเสือ แผ่นพีวีซี แผ่นกระจก หิน กระถางดินเผา แต่ในธรรมชาติปลาการ์ตูนส่วนใหญ่จะวางไข่บนหิน Moyer and Steene (1979) พบว่าปลาการ์ตูนอานม้า Saddleback Anemonefish, *A. polymnus* Linnaeus (1758) ชอบอาศัยกับดอกไม้ทะเลที่ฝังทราย หากขาดวัสดุวางไข่จะใช้เปลือกหอยเม่นในการวางไข่ โดยก่อนการวางไข่ 2-5 วัน ปลาการ์ตูนเพศผู้จะเป็นผู้คัดเลือกวัสดุในการวางไข่ อุ่นจิต (2537) รายงานว่าปลาการ์ตูนส้มขาววางไข่สม่ำเสมอตลอดปี โดยทิ้งช่วงเวลาในการวางไข่อยู่ระหว่าง 14-15 วัน และ 1 ปีวางไข่ 24 ครั้ง จำนวนไข่ที่วางน้อยที่สุด 145 ฟองและมากที่สุด 1,827 ฟอง ค่าเฉลี่ยของการวางไข่แต่ละครั้งประมาณ 876 ฟอง ขนาดของไข่ปลายาว 2.34 มิลลิเมตร กว้าง 1 มิลลิเมตร ไข่รูปทรงรี คล้ายแคปซูล Allen (1972) พบจำนวนไข่ขึ้นอยู่กับแม่ปลา ปลาที่จับคู่กันเป็นเวลานานจำนวนไข่ที่วางจะมากกว่าปลาที่เริ่มจะจับคู่กัน ทั้งนี้ปลาการ์ตูนแต่ละชนิดจำนวนไข่ที่วางแตกต่างกัน เช่น ปลาการ์ตูน Orange-Fin Anemonefish, *A.chrysopterus* Cuvier (1830) ในธรรมชาติ 1 คู่จะวางไข่ประมาณ 3,000-5,000 ฟอง ในเวลา 1 ปี ส่วนปลาการ์ตูน Pink Anemonefish, *A. perideraion* Bleeker (1855)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1 คู่วางไข่ประมาณ 2,000-4,000 ฟองต่อปี Verway (1930 ) ได้ประมาณไข่ของปลาการ์ตูน Clown Anemonefish, *A. percula* Lacepede (1802) ที่เลี้ยงใน Onrust Aquarium ใน Batavia พบว่าวางไข่ปีละ 5,000 ฟอง และจำนวนไข่ที่วางแต่ละครั้งไม่เท่ากัน ส่วนขนาดของไข่มีความยาว 2.2 มิลลิเมตรและกว้าง 0.9 มิลลิเมตร (Delsman, 1930) Ross (1978) พบปลาการ์ตูน Red and Black Anemonefish, *A. melanopus* Bleeker (1852) วางไข่แต่ละครั้งมีจำนวน 200-400 ฟอง แต่ขัดแย้งกับข้อมูลของ Fishelson (1965) ซึ่งพบว่าปลาชนิดเดียวกันนี้วางไข่ครั้งละ 600- 1,600 ฟอง Bell (1976 ) พบว่าปลาการ์ตูนลายปล้อง Clark's Anemonefish, *A. clakii* Bennett (1830) พบว่าวางไข่ครั้งละประมาณ 500-800 ฟอง ในตู้เลี้ยง

<u>การเจริญพัฒนาของเอมบริโอ (embryonic development)</u>

วิมล (2536) ให้ข้อคิดว่าในการจัดแบ่งช่วงพัฒนาการของปลา ขึ้นกับหลักเกณฑ์ที่กำหนดโดยนักชีววิทยาหรือนักวิจัยแต่ละคน ดังนั้นจึงไม่มีกฎเกณฑ์ที่แน่นอนของการแบ่งระยะต่างๆ เช่น Russell (1976) ได้แบ่งพัฒนาการของปลาออกเป็น egg, prolarva, yolk-sac larva, postlarva, juvenile และ adult โดยไม่กล่าวถึงระยะเวลาแต่อย่างไร ในขณะที่ Balon (1975) ได้แบ่งช่วงพัฒนาการของปลาออกเป็น 5 periods ดังนี้

1. Embryonic period เริ่มตั้งแต่ไข่ได้รับการปฏิสนธิ มีการแบ่งตัวของเซลล์ เกิดการเปลี่ยนแปลงและพัฒนาภายในเนื้อเยื่อของไข่จนกระทั่งเริ่มเกิดการสร้างอวัยวะและอวัยวะต่างๆ เริ่มมีการพัฒนาจนถึงตัวอ่อนฟักออกจากไข่อย่างสมบูรณ์กลายเป็นลูกปลาวัยอ่อน
2. Larval period เริ่มตั้งแต่ลูกปลาวัยอ่อนเริ่มหาอาหารกินเองจากภายนอกจนกระทั่งมีการเจริญของเซลล์กระดูก มีการเปลี่ยนแปลงของการเกิดครีบอย่างสมบูรณ์
3. Juvenile period ระยะนี้อวัยวะต่างๆพัฒนาและทำงานได้อย่างสมบูรณ์ และระยะนี้สิ้นสุดเมื่อมีการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ให้สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้
4. Adult period เริ่มตั้งแต่ระยะที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และเริ่มมีการวางไข่
5. Senescent period เป็นระยะที่ปลาเข้าสู่วัยชรา มีอายุมาก อัตราการเจริญเติบโตลดลง ไม่มีการสืบพันธุ์ ระยะนี้กินเวลานานหลายปีจนกว่าจะตาย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การปฏิสนธิ (fertilization) หมายถึง การรวมกันของนิวเคลียสของไข่และตัวอสุจิ เกิดเมื่อปลามีการผสมพันธุ์วางไข่ การปฏิสนธิเป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาของไข่ปลา ตัวอสุจิจะเข้าสู่ไข่ทางช่องไมโครไพล์ และขบวนการปฏิสนธิจะเริ่มเกิดขึ้นเมื่อเชื้อตัวผู้แตะผิวของไข่ในส่วนที่ใกล้กับนิวเคลียส ส่วนของไซโตพลาสมและเปลือกไข่จะแยกจากกันในขณะที่ไข่เกิดปฏิกริยาโดยเชื้อตัวผู้ หลังจากนั้นช่องไมโครไพล์ก็จะปิดอย่างรวดเร็ว เพื่อป้องกันตัวอสุจิเข้าผสมหลายตัว จากนั้นไข่ปลาจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส พร้อมกับมีการดูดน้ำเข้าไปแทรกระหว่างผนังเปลือกไข่ และทำให้เกิดช่องว่างที่เรียกว่า perivitelline space การดูดน้ำเข้าไปที่ช่องทำให้ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น และทำให้ไข่สามารถหมุนรอบตัวเองได้ กระบวนการที่ไข่ดูดน้ำเข้าไปนี้เรียกว่า water hardening ไข่ปลาในระยะ ripe จะดูดน้ำได้ดีกว่าไข่ในระยะ over ripe การปฏิสนธิมีผลให้ไข่ปลาที่เคยหยุดการพัฒนาของไข่ในระยะเมตาเฟส II (metaphase II) ถูกกระตุ้นให้มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส II (meiosis II) ต่อไป มีผลทำให้เซลล์ขั้ว(polar cell) หลุดออกจากไข่ปลาภายใน2-3 นาที ฉะนั้นนิวเคลียสของไข่ ก็สามารถรวมกับนิวเคลียสของตัวอสุจิ ได้เป็น zygote มีโครโมโซม 2 ชุด (2n) และพร้อมที่จะแบ่งเซลล์ต่อไป อย่างไรก็ตามพบว่าไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิจากตัวอสุจิ ก็มีการแบ่งเซลล์ได้ช่วงหนึ่ง แต่แตกต่างกับไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิกล่าวคือเมื่อพัฒนาถึงระยะ blastopore ปิด ไข่มีลักษณะขาวขุ่นขัดเจนซึ่งบ่งบอกถึงไข่ไม่สามารถพัฒนาต่อไปได้อีก ในขณะที่ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิจะกลมและสีสดใสเป็นปกติซึ่งเป็นลักษณะของไข่ที่มีการพัฒนาไปเป็นตัวอ่อนต่อไป ไข่ปลาเมื่อพัฒนาถึงระยะ blastopore ปิด สามารถบอกความแตกต่างของไข่ดีและไข่เสียได้ชัดเจน(วีระพงศ์, 2536) โดยทั่วไปการแบ่งเซลล์ของไซโกตนั้น ปริมาณของไข่แดงเป็นตัวกำหนดพัฒนาการของไซโกต ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็น 3 ชนิด (วิมล, 2536)

1. Oligolecithal egg หรือ homolecithal egg เป็นชนิดไข่แดงน้อยหรือไม่มีไข่แดงเลย การแบ่งเซลล์ในระยะแรกจะเป็นการแบ่งเซลล์ไข่ตลอดทั้งใบ เรียกว่าเป็นการแบ่งแบบholoblastic

2. Mesolecithal egg เป็นชนิดไข่แดงปานกลาง การแบ่งเซลล์ในระยะแรกก็จะเป็นแบบ holoblastic เช่นกัน

3. Polylecithal egg เป็นชนิดไข่แดงมาก การแบ่งเซลล์จะแบ่งเฉพาะบางส่วนเรียกว่าการแบ่งแบบ meroblastic โดยแบ่งทางด้าน animal pole เท่านั้น ส่วนทางด้าน vegetal pole ซึ่งมีไข่แดงอยู่มากจะไม่มีการแบ่งเซลล์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ขั้นตอนการเจริญพัฒนาของคัพภะในปลาทั่วไป อุทัยรัตน์(2538) จัดแบ่งเป็น

1. ระยะ cleavage ไซโกตแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ทำให้เซลล์เพิ่มจำนวนจาก 1 เป็น 2, 4, 8, 16 ตามลำดับ cleavage ของสัตว์มีกระดูกสันหลังมี 2 แบบ คือแบบ holoblastic และ meroblastic ในปลากระดูกแข็งจะเป็นการแบ่งแบบ meroblastic เนื่องจากไข่ปลาส่วนใหญ่มีปริมาณไข่แดงมาก การแบ่งเซลล์ระยะนี้ทำให้ได้เซลล์เป็นจำนวนมากที่มีขนาดเล็กกว่าเดิม เรียกแต่ละเซลล์ว่า blastomeres กลุ่มของเซลล์ blastomeres เรียกว่า blastoderm หรือ blastodisc เนื่องจากกลุ่มเซลล์นี้มีลักษณะคล้ายจาน ตอนปลายของระยะนี้เรียกว่า ระยะ morula

2. ระยะ blastula ระยะนี้จะเกิดช่องว่าง blastocoel ขึ้นระหว่างกลุ่ม blastoderm ชั้นบน ซึ่งเป็นส่วนที่เจริญเป็นคัพภะกับชั้นบางๆของ blastodermที่อยู่ชิดกับไข่แดง เรียกว่าชั้น periblast หรือ trophoblast ชั้น periblast ทำหน้าที่ส่งอาหารจากไข่แดงไปให้คัพภะใช้ในการเจริญเติบโต ในระยะ late blastula ชั้นของblastodermเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นส่วนต่างๆของอวัยวะ เรียกว่า presumptive organ forming area ประกอบไปด้วยชั้น endoderm ซึ่งเป็นแนวกึ่งกลางของชั้น blastoderm จะเจริญเป็นส่วนของprechordal plate ชั้นโนโตคอร์ด(notochord) ชั้น neural ectoderm และ ชั้น epidermal-ectodermตามลำดับ ส่วนที่เป็นชั้น mesoderm จะอยู่สองข้างของชั้นendoderm ชั้นblastoderm ของส่วนต่างๆจะมีขนาดต่างกันตามชนิดของปลา

3. ระยะ gastrula ระยะนี้มีการเปลี่ยนแปลงของคัพภะเกิดขึ้น 2 ลักษณะคือ การม้วนตัวของ ชั้น blastoderm เข้าด้านใน (emboly) และการขยายตัวลงมาคลุมไข่แดง (epiboly) ของชั้น blastoderm

3.1 Emboly เมื่อเริ่มระยะ gastrula ขอบของ blastodisc จะหนาขึ้นทำให้เกิดลักษณะคล้ายวงแหวนล้อมรอบไข่แดง เรียกว่า germ ring ส่วนของ germ ring บริเวณที่เจริญเป็นหางมีเซลล์มารวมกันหนาแน่นมากทำให้เกิดมีลักษณะเหมือนรูปไข่เล็กๆยื่นเข้าไปข้างใน ส่วนของ blastoderm ตรงจุดนี้คือต้นกำเนิดของคัพภะเรียกว่า embryonic shield เมื่อขบวนการ gastrulation เริ่มขึ้น ส่วนของชั้น endodermจะเคลื่อนที่เข้าไปภายใน blastocoel ทำให้เกิดเป็นช่องเปิดรูปพระจันทร์เสี้ยวขึ้นเรียกช่องนี้ว่า dorsal lip of blastopore หลังจากการม้วนตัวเข้าของ

ชั้น endodermแล้ว prechordal plate และ notochord ก็จะเคลื่อนตามเข้าไปอยู่ในแนวแกนกลางลำตัว และชั้น mesoderm จะเคลื่อนที่เข้าไปอยู่ในตำแหน่ง 2 ข้างของ notochord โดยแทรกระหว่างชั้น endoderm กับชั้น ectoderm ในระยะต้นของการเกิด gastrula ชั้นต่างๆที่ม้วนเข้าไปยังไม่แยกจากกันชัดเจน แต่ในระยะหลังของ gastrula เนื้อเยื่อชั้น mesoderm, notochord และ endoderm จึงจะแยกชั้น (delamination) โดยnotochordมีลักษณะเป็นแท่งกลมบริเวณกึ่งกลาง มีชั้น mesoderm อยู่ 2 ข้าง ด้านล่างสุดคือชั้น endoderm

3.2 Epiboly ในขณะที่มีการม้วนตัวเข้าด้านใน ส่วนของชั้น ectoderm และ periblast ขยายตัวลงมาด้านล่างและคลุมไข่แดงทีละน้อยจนไข่แดงถูกหุ้มเกือบหมด คงเหลือเพียงบริเวณแคบๆเล็กๆที่มองเห็นไข่แดงได้เรียกว่า yolk plug พร้อมกันนั้นเซลล์ในส่วนของชั้น neural ectoderm ซึ่งไม่ได้ม้วนเข้าด้านในจะเคลื่อนตัวเข้าสู่แกนกลางลำตัวตามแนวแกนของคัพภะทำให้เกิดสันเป็นแนวยาวตามแนวตั้งฉากกับ germ ring และจมลงในแนว notochord ที่อยู่ด้านล่างของ neural plate และเมื่อสิ้นสุดระยะ gastrulation ไข่แดงจะถูกหุ้มเรียกระยะ blastopore ปิดและชั้น mesoderm จะเริ่มจัดตัวมองเห็นลักษณะเป็นปล้องที่เรียกว่า somite

4. ระยะ tubulation ระยะนี้เนื้อเยื่อทั้ง 3 ชั้น ได้แก่ ectoderm, mesoderm และ endoderm จัดเรียงตัวเป็นท่อ 5 ท่อและเจริญเป็นอวัยวะต่างๆดังนี้ neural tube, epidermal tube, endodermal tube และมี mesodermal tube 2 ท่อ การเกิดท่อเหล่านี้ซับซ้อนมาก

4.1 การเกิด neural tube เกิดจาก neural ectoderm ที่หนาตัวขึ้นตามแนวสันหลังของคัพภะจะขยายตัวและจมลงด้านล่างของ epidermal ectoderm ต่อมาเกิดเป็นช่องว่างตลอดความยาวของ neural tube โดย neural tube ส่วนหน้าเจริญไปเป็นสมอง ส่วนที่เหลือเจริญไปเป็นไขสันหลัง

4.2 การเกิด epidermal tube พบว่าลักษณะลำตัวของคัพภะจะแบนราบเมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้คัพภะยกตัวสูงขึ้นจากชั้น blastoderm อย่างชัดเจน โดยเริ่มจาก ectoderm บริเวณหัวของคัพภะจะยกตัวสูงขึ้นต่อมา endoderm และ neural tube ก็ยกตัวตามไปด้วย จากนั้น ectoderm, mesoderm และ endoderm ก็เจริญขึ้นด้านบนในลักษณะเดียวกันทำให้ลำตัวของคัพภะนูนขึ้นจากผิวไข่ ส่วนหางก็ยื่นยาวออกทำให้แยกจากผิวไข่ได้ชัดเจนขึ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.3 การเกิดท่อทางเดินอาหาร(gut tube) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของชั้น endoderm โดยชั้น endoderm ในระยะ gastrula จะเจริญโค้งขึ้นด้านบนและเชื่อมกันเป็นท่อ แบ่งออกได้ 3 บริเวณคือ ท่อทางเดินอาหารส่วนหน้า, ส่วนกลางและส่วนท้าย

4.4 การเกิด mesodermal tube ในระยะนี้ชั้น mesodermal ซึ่งทอดตัวอยู่ 2 ข้าง ของnotochord เกิดการเปลี่ยนแปลง โดยเซลล์ด้านบน (epimere)จัดเรียงตัวเป็นปล้องที่เรียกว่า somite และเซลล์บริเวณถัดลงมา mesomere ก็จัดเรียงตัวเป็นปล้องเช่นกัน โดยเซลล์เหล่านี้ เจริญเป็นอวัยวะบางส่วนในระบบขับถ่าย และระบบสืบพันธุ์ ส่วนเซลล์ mesoderm ด้านล่าง (hypomere)ไม่เกิดปล้อง

5. ระยะพัฒนาการของอวัยวะและลักษณะรูปร่าง (organogenesis and body form development) ในระยะนี้ชั้นเนื้อเยื่อที่จะเจริญเป็นอวัยวะต่างๆ (primitive organ forming tube) ทั้ง 5 ได้แก่ ชั้นectoderm ชั้นmesoderm ชั้นendoderm และ neural tube รวมทั้งnotochord จะเกิดการเปลี่ยนแปลงไปเป็นอวัยวะเบื้องต้นของระบบต่างๆของร่างกายต่อไป ได้แก่ ectodermal tube เจริญเป็นเยื่อบุผิว ฟันชั้นนอก ผนังของหู เลนส์ของตาและหูชั้นใน mesodermal tube จะแบ่งได้เป็น 3 ส่วน ส่วนบนเกิดจากการสร้าง somite เจริญเป็นโครงกระดูก กล้ามเนื้อลำตัว กระดูกและกล้ามเนื้อระยางค์ เกล็ดและเนื้อเยื่อของชั้นdermis ส่วนกลางเจริญเป็นไตและ บางส่วนของรังไข่หรืออัณฑะและท่อของอวัยวะดังกล่าว mesodermal tube ส่วนข้างเจริญเป็น เยื่อหุ้มหัวใจและช่องท้อง หัวใจและเลือด endodermal tube เจริญเป็นสมองและไขสันหลัง และ ตาส่วนที่เหลือรวมถึงเรตินาและประสาทตา เซลล์สารสี(pigment cell) กลุ่มเซลล์ mesenchyme ในส่วนหัวเจริญเป็นตาชั้นนอก กระดูกส่วนหัว ฟันชั้นใน

Allen (1991) รายงานว่าหลังการปฏิสนธิ ปลาการ์ตูนฟักเป็นตัวในช่วงเย็นของวันที่ 6 หรือ วันที่ 7 และไข่ปลาการ์ตูนมีลักษณะเป็นแคปซูลเรียวยาว เป็นไข่จมติดวัสดุโดยมีสารเหนียว บริเวณเปลือกไข่ แต่ Ross (1978) พบว่าปลาการ์ตูน Red and Black Anemonefish, *A. melanopus* Bleeker (1852) ใช้เวลาในการฟักโดยเฉลี่ยประมาณ 7.5-8.5 วัน Bell (1976 ) พบว่าปลาการ์ตูนลายปล้อง Clark's Anemonefish, *A. clakii* Bennett (1830) ใช้เวลาในการฟัก ขึ้นกับอุณหภูมิของน้ำเช่น ใช้เวลาเพียง 6.5 วันในการฟักออกเป็นตัวที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส

แต่จะใช้เวลาในการฟักนานถึง 13.5 วัน ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส และไข่ปลาจะฟักเป็นตัวภายหลังแสงอาทิตย์ลับขอบฟ้าไปแล้ว 1-2 ชั่วโมงเสมอ

อุ่นจิต (2537) แบ่งพัฒนาการของไข่ปลาการ์ตูนส้มขาวภายหลังการปฏิสนธิเป็นดังนี้

- 2 ชั่วโมง 29 นาที ระยะ 1 เซลล์ ลักษณะเซลล์โค้งตามฟองไข่
- 2 ชั่วโมง 37 นาที แบ่งเป็น 2 เซลล์
- 3 ชั่วโมง 11 นาที แบ่งเป็น 4 เซลล์
- 3 ชั่วโมง 30 นาที แบ่งเป็น 8 เซลล์
- 4 ชั่วโมง แบ่งเป็น 16 เซลล์
- 4 ชั่วโมง 45 นาที แบ่งเป็น 32 เซลล์
- 5 ชั่วโมง 09 นาที แบ่งเป็น 64 เซลล์
- 12 ชั่วโมง เข้าสู่ระยะ blastula
- 20 ชั่วโมง ระยะ gastrula
- 24 ชั่วโมง เริ่มสร้างตัวอ่อนโดยส่วนหัวอยู่ด้านเดียวกับเซลล์ขั้วไข่
- 27 ชั่วโมง เริ่มเห็น somite และ กระบอกตา (optic cup)
- 34 ชั่วโมง เห็นเซลล์สารสีที่ไข่แดงและตัวอ่อน
- 36 ชั่วโมง ตัวอ่อนเคลื่อนมาสุดขอบไข่แดง ส่วนหัวเคลื่อนลงด้านตรงข้ามกับขั้วไข่
- 42 ชั่วโมง เห็นการเต้นของหัวใจ 92 ครั้ง/นาที มีการไหลเวียนของของเหลว
- 48 ชั่วโมง ลูกตาชัดเจน,ไข่แดงน้อย, เซลล์สารสีมีมากขึ้น, somite สมบูรณ์
- 65 ชั่วโมง มีโลหิตไหลเวียน,ลูกตาเป็นรูปวงแหวนสีดำแต่ส่วนปลายไม่เชื่อมกัน
- 72 ชั่วโมง นับการเต้นของหัวใจได้ 125 ครั้ง/นาที, พบเซลล์สารสีกระจายทั่วไข่
- 4 วัน เห็นครีบอกและครีบก้นและปาก, ไข่แดงเล็กมาก, ตาเริ่มมีสีเงินวาว
- 5 วัน ปากเจริญมากขึ้น, ตัวอ่อนมีสีขุ่นและเจริญเต็มกระเปาะ, หัวโตมาก
- 6 วัน ลูกตาดำสนิทและมีสีเงินวาวตรงกลาง, ปากสมบูรณ์, หัวใจเต้น 157 ครั้ง/นาที
- 7 วัน ตัวอ่อนสมบูรณ์เต็มที่พร้อมที่จะฟักออกจากแคปซูล

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Sunobe and Nakazono (1989) รายงานว่าปลาทะเล Gobiid fish, *Priolepsis naraharac* ซึ่งเป็นไข่จมติดวัสดุและไข่มีขนาดใกล้เคียงกับไข่ปลาการ์ตูน แต่มีรูปร่างแตกต่างกัน เล็กน้อยคือปลาชนิดนี้ไข่เป็นรูปรีหรือรูปไข่ ป่องตรงกลาง และใช้เวลาเพียง 98 ชั่วโมงตัวอ่อนจึงฟักออกเป็นตัว Long and Ballard (2001) ไข่ในปลา Longnose gar,*Lepisosteus osseus* ซึ่งเป็นปลาโบราณที่กำลังจะสูญพันธุ์ ไข่ปลามีลักษณะเป็นรูปกลมคล้ายผลส้มเป็นไข่จมแบบไม่เกาะติดวัสดุและมีระยะเวลาฟักใกล้เคียงปลาการ์ตูนคือ 7 วัน แต่มีช่วงเวลาในพัฒนาการแตกต่างกัน จากรายงานไม่สามารถบอกช่วงเวลาที่แน่นอนได้ เพียงแต่กำหนดเป็นระยะเท่านั้น Kimmel *et al.* (1995) รายงานว่าพัฒนาการของไข่ปลา Zebrafish โดยแบ่งออกเป็น 7 period 33 stages และใช้เวลาในการฟัก 72 ชั่วโมง ดังนี้ระยะ zygote เริ่มตั้งแต่การปฏิสนธิได้ 1 เซลล์ ระยะ cleavage เริ่มตั้งแต่ 2 - 64 เซลล์ ระยะ blastula เริ่มตั้งแต่ 128 เซลล์ ถึงเริ่มเกิด epiboly ได้ 30 เปอร์เซ็นต์ ระยะ gastrula เริ่มตั้งแต่เกิด epiboly ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ถึงเริ่มเกิดปุ่มหาง ระยะ segmentation เริ่มตั้งแต่ 1- 26 somite ในระยะนี้มีการสร้างเนื้อเยื่อชั้นต่างๆและอวัยวะบางส่วน ระยะ pharyngula เริ่มตั้งแต่การเกิดสีที่ผิวและเรตินา ถึงการมีอวัยวะภายในครบและบางส่วนของอวัยวะเริ่มทำงานได้และ hatching ระยะฟักออกจากไข่

## การเจริญของลูกปลาวัยอ่อนภายหลังการฟัก

ลูกปลาจะออกจากไข่ต่อเมื่ออวัยวะที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต เช่น หัวใจ เจริญดีแล้ว ขบวนการฟักจะเริ่มจาก hatching gland ลูกปลาสร้างน้ำย่อยออกมาย่อยเปลือกไข่ให้อ่อนตัวลง พร้อมกับแรงกระแทกที่ลูกปลาสะบัดหางก็จะช่วยให้เปลือกไข่แตกออกได้ วิธีการฟักออกจากไข่ของปลาแต่ละชนิดจะไม่เหมือนกัน ขึ้นกับชนิดของเอนไซม์ที่ไข่ปลาแต่ละชนิดสร้างขึ้นมา ลูกปลาที่ฟักออกจากไข่ใหม่ๆจะมีถุงไข่แดงติดท้องมาด้วย เรียกลูกปลาระยะนี้ว่าearly larva ซึ่งกำหนดให้เป็นระยะย่อยในระยะลูกปลาวัยอ่อน จากนั้นอวัยวะในระบบต่างๆที่ยังไม่เจริญเต็มที่ก็จะทำหน้าที่ได้เหมือนพ่อแม่ในที่สุด อวัยวะที่เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนคือ ระบบทางเดินอาหาร โดยจะมีการเจริญของท่อทางเดินอาหาร ปากเริ่มเจริญและจะเจริญสมบูรณ์เมื่อปลาเริ่มกินอาหาร ทวารหนักก็จะเปิดติดต่อกับภายนอก ครีบต่างๆเริ่มมีก้านครีบและเคลื่อนไหวได้ กระเพาะลมเจริญเต็มที่ มีผลให้ลูกปลาระยะหลังว่ายน้ำได้เหมือนพ่อและแม่ นอกจากนี้การเกิดเซลล์สารสีต่างๆก็เจริญไปตามชนิดของปลา ลูกปลาระยะเริ่มกินอาหารเรียกว่า feeding larva ซึ่งลูกปลาเหล่านี้จะเจริญเป็นปลานิ้ว (fingerling) ต่อไป อย่างไรก็ตามลูกปลาต่างชนิดกันก็มีการเจริญพัฒนาที่ต่างกัน ในการแบ่งระยะการพัฒนาการของลูกปลาวัยอ่อนมีหลักเกณฑ์ไม่แน่นอน เช่นเดียวกับการ

จัดแบ่งช่วงพัฒนาการของคัพภะ ดังนั้นกฎเกณฑ์ที่ใช้จึงขึ้นกับนักชีววิทยาและนักวิจัยแต่ละบุคคล (วิมล, 2536; อุทัยรัตน์, 2538; วิมล, 2540)

อุ่นจิต (2537) ในปลาการ์ตูนส้มขาวพบลูกปลาที่ฟักได้ 12 วันจะมีรูปร่างเหมือนแม่ปลาทุกประการคือครีบต่างๆจะสมบูรณ์และทำหน้าที่ได้ เมื่ออายุ 23 วันแสดงสีและแถบชัดเจนมากขึ้น Delsman (1930) รายงานว่าเมื่อลูกปลาการ์ตูน Clown Anemonefish, *A. percula* Lacepede (1802) ฟักออกจากไข่ ลูกปลามีความยาว 4 มิลลิเมตร พบถุงไข่แดงและ oil globule ที่ดูดซึมไปไม่หมด ปลายหางมีการเคลื่อนไหว บริเวณลำตัวมี vertebrae 11-15 อัน และจำนวนของ trunk vertebrae สัมพันธ์กับจำนวน trunk myotomes ตำแหน่งของทวารหนัก ยังคงอยู่ที่เดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง พบเซลล์สารสีดำ black pigment cells ที่หัว, ด้านข้างของส่วนหางและส่วนของกระเพาะลม บริเวณรอบๆอวัยวะดังกล่าวพบจุดของเซลล์สารสีเหลือง (yellow pigment cells spots) ดวงตามีสีเทา หลังจากนั้นจึงเกิดแถบสีส้มและสีขาว โดยเริ่มจากลำตัวส่วนหน้าไปยังส่วนท้าย ในปลาการ์ตูน *A.ephippium* พบแถบสีขาวพาดผ่านลำตัวเมื่ออยู่ในระยะที่เป็นลูกปลาเท่านั้นและหายไปเมื่อเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัย ลักษณะของการพัฒนาการที่พบในปลาการ์ตูน *A. ephippium* และ *Premnas biaculeatus* คล้ายกับ *A. percula*

Meyer-Pochow (1972) รายงานว่าเมื่อลูกปลาจวด *Johnius hololepidotus* ฟักออกจากไข่พบหยดไขมันในถุงไข่แดงในตำแหน่งใกล้กับท่อเปิดของทวารหนัก เมื่อถุงไข่แดงมีขนาดเล็กลงหยดไขมันจะเคลื่อนตัวมาอยู่ใต้ปุ่มครีบอกและสลายเมื่อไข่แดงถูกใช้หมด ไข่แดงถูกใช้อย่างรวดเร็วเมื่ออายุ 2 วันและใช้จนหมดเมื่ออายุ 3 วัน บริเวณลำตัวพบเซลล์สารสีกระจายทั่วไป ตาและผิวไข่แดงยังไม่มีสี ลูกปลาว่ายน้ำทันทีที่ที่ฟักออกจากไข่ วิมล (2536) เมื่อลูกปลาใช้ไข่แดงหมดจึงเริ่มหาอาหารกินเอง ระยะนี้ลูกปลามีอัตราการตายสูงเนื่องจากขาดแคลนอาหารและหาอาหารได้ไม่เหมาะสมกับขนาดช่องปาก ในระยะนี้อวัยวะต่างๆที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีพจะเจริญและพัฒนาจนใช้งานได้ดี Sunobe and Nakazono (1989) รายงานว่าทันทีที่ลูกปลาGobiid fish, *Priolepsis naraharac* ฟักออกจากแคปซูลพบ 8+17 myomeres ในขณะโตเต็มวัยพบ 10+16 myomeres ปากเปิดและพบการบีบตัวแบบ peristalsis ของระบบทางเดินอาหาร ลูกปลาวัยอ่อนตอบสนองต่อการเคลื่อนที่เข้าหาแสง พบ melanophores ที่ส่วนหลังของลำตัว, ด้านหลังของส่วนท้อง, ด้านหน้าของลำตัวและที่กระเพาะลม Akagawa *et al.* (1995) ในปลา Filefish, *Brachaluteres ulvarum* เป็นปลาที่วางไข่ในช่อง osculum ของฟองน้ำ Calcareous

sponge, *Grantessa mitsukurii* เมื่อลูกปลาฟักออกจากไข่มีความยาวของโนโตคอร์ด 20 myomeres ถุงไข่แดงเป็นรูปไข่และพบหยดไขมันขนาดใหญ่ภายในถุงไข่แดง ไข่แดงถูกดูดซึมจนหมดในเวลา 4-5 วันหลังจากฟัก เมื่อลูกปลาฟักปากและทวารหนักไม่เปิดเนื่องจากท่อทางเดินอาหารคดงอและไม่สมบูรณ์ และสมบูรณ์เมื่อลูกปลาอายุ 3-4 วัน ตำแหน่งของทวารหนักจะอยู่กลางลำตัว พบmelanophores ครั้งแรกที่ส่วนหัวและช่องท้องเมื่อไข่มีอายุได้เพียง 70 ชั่วโมง หลังจากลูกปลาฟัก melanophores เพิ่มมากขึ้นและกระจายไปที่จะงอยปาก(snout), ต้นคอและช่องท้อง และจะเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุมากขึ้น เมื่อลูกปลามีอายุ 1 วันพบ melanophores ที่ดวงตา ลูกปลาอายุ 4 วันพบช่องท้องมีสีดำอย่างสมบูรณ์ Long and Ballard (2001) พบพัฒนาการของลูกปลา Longnose gar, *Lepisosteus osseus* ดังนี้ ระยะเมื่อลูกปลาฟักออกจากไข่ ระยะพบถุงไข่แดงขนาดใหญ่และจะเล็กลงเมื่อใกล้ปลายหาง พบปุ่มครีบหลังมีลักษณะกร่อนเหมือนถูกกัดบริเวณกลางลำตัว ครีบหูขนาดใหญ่เป็นรูปพระจันทร์เสี้ยวและเป็นปีกยื่นออกมา แผ่นปิดเหงือก(operculum)มีสองแผ่นขนาดเท่ากับลูกตา พบ gill filaments จำนวนสามอันที่ branchial arch ระยะ somitesมีรูปร่างเหมือนบั้งหรือก้างปลา (chevron shaped) เห็นได้ชัดเจนที่บริเวณครีบหาง ครีบหูลักษณะเหมือนปีกและมีขนาดกว้างขึ้น ขอบของแผ่นปิดเหงือกด้านนอกยื่นยาวติดกับครีบหู พบช่องจมูก(nasal pit) 1 ช่องเป็นรูกลมชัดเจนขึ้น ช่องจมูกพบเห็นครั้งแรกก่อนที่เอมบริโอฟักออกเป็นตัวเพียงแต่มีขนาดเล็กมากทำให้มองเห็นไม่ชัดเจนนัก ระยะถุงไข่แดงเล็กลงเท่ากับ ครีบท้องเป็นปุ่มนูนชัดเจน พบช่องจมูก1 ช่องมีลักษณะยาวขึ้น จะงอยปากเริ่มปรากฏขึ้นเป็นแนวยาว ขากรรไกรล่างเคลื่อนไหวเป็นจังหวะและพบฟันที่ขากรรไกร แผ่นปิดเหงือกเริ่มเปิด ครีบหูเป็นสันหนาขึ้นเพื่อช่วยว่ายน้ำ ระยะที่ครีบก้นและครีบหางหดสั้นลง ในขณะที่แผ่นครีบระหว่างครีบหลังกับครีบหางหดสั้นและขาดออกจากกัน ทำให้ครีบหลังแยกออกจากครีบหางได้อย่างสมบูรณ์ การมีแผ่นครีบทำให้ครีบมีความยืดหยุ่นได้ดีในการว่ายน้ำ ช่องจมูกในระยะนี้ทำหน้าที่เป็นช่องเปิดสำหรับน้ำเข้าและออก ระยะที่ถุงไข่แดงถูกดูดซึมไปหมด ครีบท้องเป็นรูปพระจันทร์เสี้ยว ส่วนปลายเป็นปีกยื่นออกมา ที่ขากรรไกรพบฟันที่แหลมคมและแข็งแรงขึ้น การศึกษาในลูกปลา Longnose gar, *Lepisosteus osseus* ไม่ได้รายงานวันเวลาในการเกิดการเปลี่ยนแปลง

Long and Ballard (1976) ในลูกปลาวัยอ่อนWhite Sucker,*Catostomus commersoni* ไข่มีลักษณะกลมและใช้เวลาในการฟักประมาณ 17-19 วัน โดยแบ่งพัฒนาการตามอายุของลูกปลา เช่นเดียวกับปลา *Oreochromis niloticus* (Morrison *et al.*, 2001) Eda *et al.* (1994a) ลูกปลาวัยอ่อนในปลา Dragonets 2 ชนิดคือ *Repomucenus richardsonii* และ *R. valenciennei* และ Eda *et al.* (1994b) ได้ศึกษาปลา Dragonets เพิ่มอีก 1 สปีชีส์ คือ *R. beniteguri* พบว่ามีพัฒนาการของอวัยวะต่างๆ การเกิดครีบและการสร้างเซลล์สารสีตามลำตัวคล้ายคลึงกัน โดยจัดแบ่งพัฒนาการตามอายุที่สัมพันธ์กับขนาดลำตัวปลาในช่วงต้น ในช่วงปลายใช้ขนาดความยาวของลำตัวปลาเป็นหลัก Wamatsu (1994) ปลา Medaka, *Oryzias latipes* และแบ่งระยะการพัฒนาภายหลังจากฟักดังนี้ ระยะ fry stage I เริ่มจากไข่ได้รับการฟักจนถึงการเกิดแผ่นครีบหางและครีบหู ระยะ fry stage II มีการเชื่อมของแผ่นครีบที่ครีบท้องและพบแผ่นครีบหลังและครีบก้น ระยะ fry stage III เกิดแผ่นครีบที่ด้านท้อง และพบเกล็ดที่ครีบหลังและครีบก้น ระยะ young fry stage I เป็นระยะที่เริ่มพบเซลล์สืบพันธุ์ และพบลักษณะภายนอกที่ใช้ในการแยกเพศ เช่นครีบหางที่มีปลายเรียวแหลมในเพศผู้และครีบหางที่มีลักษณะสั้นกลมในเพศเมีย ระยะ young fry stage II วิมล (2536) ลูกปลาวัยอ่อนจะมีเซลล์สารสีเป็นลักษณะสำคัญที่ใช้ในการจำแนกชนิดของลูกปลา เซลล์สารสีมีหลายชนิดเช่นสีดำหรือสีน้ำตาล เรียกว่า melanophore เป็นสีที่มีความสำคัญและพบเห็นมากที่สุด สีเหลืองเรียกว่า xanthophore สีแดงเรียกว่า erythrophore นอกจากนี้อาจพบสีเงินเรียกว่า iridophore บ้างเล็กน้อย ในระยะที่เป็นลูกปลา สารสีต่างๆเหล่านี้จะอยู่ในตำแหน่งที่แน่นอนและเด่นชัด ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการใช้จำแนกชนิดของลูกปลา เซลล์สารสีในสัตว์มีกระดูกสันหลังมีจุดกำเนิดมาจาก neural crest ของตัวอ่อนและชั้น ectoderm. (Russell, 1976)

**<u>การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์(gonadal development) และการเปลี่ยนเพศ(sex inversion) ของลูกปลา</u>**

วิมล (2536), Hoar (1969) และ Strüssmann *et al.* (1996) รายงานว่าพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์เกิดขึ้นภายหลังจากที่ลูกปลามีลักษณะรูปร่างและอวัยวะต่างๆครบสมบูรณ์เหมือนพ่อแม่ทุกประการ และลูกปลาจะเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยก็ต่อเมื่ออวัยวะสืบพันธุ์สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์และพร้อมที่จะสืบพันธุ์ได้ Strüssmann *et al.* (1996) พบเพศจะถูกกำหนดขึ้นโดยยีนภายหลังการปฏิสนธิ แต่การแสดงลักษณะของเพศจะเกิดขึ้นภายหลัง และฮอร์โมนก็เป็นส่วนสำคัญในการกระตุ้นให้เกิดพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ด้วยเช่นกัน(Hoar,1969) ในปลา

Grouper, *Epinephelus tauvina* (Forskal) พบว่าความเค็มและอุณหภูมิของน้ำมีผลต่อพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ (Abu-Hakima,1987) วิมล (2536) และ Hoar (1969) พัฒนาการต่างๆของอวัยวะสืบพันธุ์มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับพัฒนาการของท่อในระบบขับถ่าย Hoar (1969) รายงานว่าอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาทั้งเพศผู้และเพศเมียมีต้นกำเนิดในตำแหน่งที่แตกต่างกัน พบว่าตำแหน่งด้านข้างที่เป็นส่วนของเปลือก(cortex) มีการแบ่งเซลล์เป็นจำนวนมาก จึงทำให้เกิดเป็นสันนูนตามความยาวของผนังช่องท้องซึ่งจะเจริญไปเป็นส่วนของรังไข่ ตำแหน่งด้านในส่วนที่เป็นเนื้อ(medulla) ซึ่งอยู่ตรงกลางเมื่อเกิดการแบ่งเซลล์เป็นจำนวนมากจะเจริญไปเป็นอัณฑะ ในปลาแต่ละตัวจะมีส่วนใดส่วนหนึ่งของในสองส่วนนี้ที่พบมีการพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็วตั้งแต่ระยะแรกเริ่มของการพัฒนาตัวอ่อน เพื่อกำหนดเพศของปลา จึงทำให้ปลาแต่ละตัวแสดงเพียงเพศใดเพศหนึ่งเท่านั้น ในปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่มีเพศแยกกัน(gonochorism) แต่มีปลาบางชนิดมักพบในกลุ่มปลาทะเลที่มีลักษณะเพศเป็นแบบกะเทย (hermaphroditism) และการแสดงออกของเพศใดเพศหนึ่งที่จะเกิดขึ้นก่อนหรือหลังนั้นขึ้นกับชนิดของปลานั้นๆ ถึงแม้ว่าโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ทางกายวิภาคจะมีความแตกต่างกัน แต่ลักษณะโครงสร้างทางมิญชวิทยาของ germ cell และเซลล์อื่นๆที่ประกอบเป็นเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์จะคล้ายคลึงกัน (วิมล, 2536; สุภาพร, 2542)

ในปลา Pejerrey, *Odontesthes bonariensis* และปลา Southern flounder, *Paralichthys lethostigma* เมื่อลูกปลาฟักออกจากไข่ อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาวัยอ่อนเรียกว่า primordial gonad และเมื่อเกิดกระบวนการ gonadogenesis ภายใน primordial gonad จะพบ primordial germ cellsแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อประสานในตำแหน่งระหว่างท่อไตเชื่อมกับกระเพาะอาหาร เมื่อเข้าสู่ระยะลูกปลาจึงพบว่าอวัยวะสืบพันธุ์มี 2 ข้างและมีลักษณะเป็นแผ่นบางๆคล้ายริบบิ้นอยู่ในตำแหน่งที่ต่ำกว่าตำแหน่งของไตลงมาทางด้านล่าง ลักษณะของ primordial germ cells ที่พบเป็นเซลล์รูปร่างกลมขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสใหญ่เต็มเซลล์ ไซโทพลาซึมใสและพบน้อยมากบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ เซลล์กระจัดกระจายทั่วไปแต่พบบางส่วนมีการรวมกลุ่มกันเป็น sex cordลักษณะดังกล่าวแสดงว่า อวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่แสดงลักษณะของเพศใดเพศหนึ่งเด่นชัด เรียกเป็น undifferentiated gonad ( Strüssmann *et al.*,1996; Luckenbach *et al*, 2003) ในปลา *Salaria pava* เมื่อลูกปลามีอายุ 5 วันหลังจากฟักและมีความยาวเพียง 5 มิลลิเมตร พบกลุ่มเซลล์ primordial germ cells แทรกอยู่กับsomatic cells ใน peritoneal cavity และไม่พบหลอดเลือด

ในระยะนี้primordial germ cells มีขนาดประมาณ 8 ไมโครเมตร มีรูปร่างไม่แน่นอน นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ถึง 5 ไมโครเมตร (Patzner and Kaurin, 1997)

Foyle (1993) รายงานว่าลูกปลา Coho Salmon, *Oncorhynchus kisutch* ทันที่ที่ฟักจนถึงลูกปลามีอายุ 1000 วัน เมื่อลูกปลาฟักออกจากไข่จะพบอวัยวะสืบพันธุ์ทันที โดยที่เริ่มแรกภายในมี primordial germ cells เพียง 2 เซลล์แทรกใน peritoneal บริเวณที่เชื่อมต่อกับท่อไต และเมื่อลูกปลามีอายุ 100 วัน หลังลูกปลาฟักอวัยวะสืบพันธุ์มีลักษณะเป็นสันนูนบางๆรูปร่างไม่แน่นอน เมื่อลูกปลามีอายุ 170 วัน primordial germ cells อยู่ใน sex cord เมื่อลูกปลามีอายุ 240วัน sex cord มีขนาดใ หญ่ขึ้น และเมื่อนำอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลาที่อายุ 310 วันมาตัดตามขวางพบ primordial germ cells 7 เซลล์กำลังแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสระยะprophase และเมื่อลูกปลามีอายุ 380วันหลังจากฟักจึงเกิด sex differentiation นั้นคือสามารถพบเซลล์สืบพันธุ์ทั้ง 2 เพศในอวัยวะสืบพันธุ์อันเดียวกัน Nakahuma *et al.* (1974) รายงานว่าปลา Musa salmons เกิด sex differentiation เมื่อลูกปลามีอายุเพียง 210 วันหลังฟัก ปลาChum salmons ใช้เวลาประมาณ 330 วันหลังฟัก (Robertson, 1953) ในขณะที่ปลา Atlantic salmons ใช้เวลานานถึง 600 วันหลังฟักจึงเกิด sex differentiation (Laired *et al.*, 1978) Foyle (1993) รายงานว่าลูกปลา Coho Salmon อายุ 450วันหลังฟัก primordial germ cells มีการเพิ่มจำนวนขึ้นมากและทุกเซลล์จะอยู่ในระยะการแบ่งเซลล์แบบไมโอซีสทั้งสิ้น ส่วนใหญ่พบกำลังแบ่งเซลล์ในระยะprophase แต่ก็พบในระยะmetaphase และ anaphase บ้างแต่ไม่มากนัก บางครั้งพบการเกิด crossing over ร่วมด้วย ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเด่นที่พบว่า primordial germ cells มีการเจริญพัฒนาไปเป็นoogonia และเมื่อปลามีอายุ 660วัน oocytes มีการพัฒนาเข้าสู่ระยะ early perinucleous stage พบ follicle cell รอบๆ oocytes และเมื่อลูกปลามีอายุ 800 วันพบ basophilic granules ในไซโทพลาซึม เมื่อลูกปลาอายุ 1000วัน oocytes มีขนาดใหญ่ขึ้นมากถึง 120 ไมโครเมตร ส่วนเซลล์สืบพันธุ์ที่มีการพัฒนาไปเป็น spermatogoniaไม่มีความแตกต่างจากเซลล์ปกติมากนัก แต่พบโครมาตินในเซลล์บางเซลล์มีการรวมกันเป็นกลุ่มหนาทำให้เห็นเซลล์ชัดขึ้น และมีการรวมกลุ่มของเซลล์เป็นกลุ่มใหญ่มากขึ้นไม่กระจัดกระจาย และเมื่อปลามีอายุ 520 วัน spermatogonia มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นแต่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างแตกต่างไปจากเดิม Hiroi and Yamamoto (1970) กล่าวว่าภายในรังไข่มักพบการแบ่งเซลล์ของเซลล์ไข่ในระยะต่างๆ ตลอดเวลา ในขณะที่พบการแบ่งเซลล์ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เมื่อใกล้ฤดูวางไข่เท่านั้น

Strüssmann *et al.* (1996) รายงานว่าในลูกปลา Pejerrey, *Odontesthes bonariensis* ที่มีอายุประมาณ 49 วัน จึงเกิด sex differentiation ของเพศเมียเด่นชัดขึ้น โดยพบว่าครึ่งหนึ่งของเซลล์สืบพันธุ์ภายในรังไข่จะมีการแบ่งเซลล์ และร่วมกลุ่มกันเป็น germ cell cyst หลายกลุ่ม ในขณะเดียวกัน somatic cell บริเวณนั้นก็มีการแบ่งเซลล์และเคลื่อนที่ไปยังขอบด้าน dorsal edge และ ventral edge เพื่อที่จะเพิ่มจำนวนและขยายขนาดและเชื่อมกันเป็น ovarian cavity และเซลล์สืบพันธุ์เหล่านั้นเรียกชื่อใหม่เป็น oocytes ในระยะต่างๆกัน การแบ่งเซลล์ oocytes ยังคงมีอยู่และเมื่อแบ่งแล้วจะเกิดเป็น ovigerous fold ยื่นเข้าไปใน ovarian cavity จนเต็ม เมื่อปลามีอายุ 140 วันพบ oocytes หลายๆระยะใน ovary พร้อมที่จะเข้าสู่ฤดูกาลการวางไข่ต่อไป ส่วนเพศผู้เมื่อลูกปลามีอายุได้ 70 วันจึงเกิด sex differentiation ของเพศผู้ขึ้น ลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ที่จะพัฒนาไปเป็น เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มีขนาดเล็กกว่าเพศเมียและมีรูปร่างเป็นรูปลูกแพร์ เซลล์เหล่านี้มีการแบ่งเซลล์กระจายทั่วไป จากนั้นเกิด encapsulation ของ germinal elements ใน basement membrane และ somatic cell ทำให้เกิดเป็นแคปซูลหุ้มเป็นอัณฑะ และเมื่อเซลล์มีการแบ่งเซลล์มากขึ้นอัณฑะก็ขยายขนาดโตขึ้นเรื่อยๆ เมื่อปลาเพศผู้มีอายุประมาณ 98 วัน จะพบ germ cell cyst บริเวณขอบของอัณฑะเกิดขึ้นก่อน และเซลล์สืบพันธุ์ที่พบภายใน cyst มีขนาดเล็กมองเห็นเป็นจุดดำๆของนิวเคลียสเท่านั้น และเมื่อปลาอายุ 119 วัน เกิดการสร้างอสุจิ (spermatogenesis) ภายใน cyst จึงเรียก germ cell cyst เป็น spermatocyst แทน ในปลาอายุ 120 วันพบ spermatid และ spermatozoa จึงกล่าวได้ว่าปลา Pejerrey อายุ 120 วัน เป็นปลาในระยะโตเต็มวันสามารถ ผสมพันธุ์ได้

ในปลา *Salaria pava* อายุ 28วัน ลำตัวมีความยาว 14 มิลลิเมตร เริ่มเกิดพัฒนาการของรังไข่ พบมีการสร้างovarian tissue ล้อมรอบ primordial germ cells ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงเป็น oogonia คือจากเซลล์ที่รูปร่างไม่แน่นอนกระจัดกระจายอยู่ทั่วไปใน peritoneal กลายเป็นเซลล์ที่มีลักษณะกลมหรือเป็นเซลล์รูปไข่และมีการจัดวางที่เป็นระเบียบมากขึ้น ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเด่นที่ใช้ในการจำแนก primordial germ cells ออกจาก oogonia เมื่อลูกปลามีอายุ 31 วันมีความยาว 17 มิลลิเมตร เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ perinucleolus stage เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ไซโทพลาซึมติดสีเข้มมากขึ้นและพบnucleoli ขนาดใหญ่เรียงตัวที่ขอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส เมื่อลูกปลามีอายุ 33 วัน มีความยาว 20 มิลลิเมตรเกิด ovarian follicle รอบเซลล์ไข่และเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ในการพัฒนาของการเกิดอัณฑะพบเกิดล่าช้ากว่าการเกิดรังไข่ พบ primordial germ cells มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นspermatogonia เมื่อลูกปลามีอายุ 30-31 วัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



และมีขนาดความยาว 16-17 มิลลิเมตร พบว่า spermatogonia รวมกลุ่มเป็นกลุ่มขนาดเล็กแทรกใน testicular tissue เซลล์เป็นรูปกลมหรือรูปไข่ ภายในพบchromatin มีลักษณะเหมือนแกรนูล nucleoli มีการจัดเรียงตัวไม่เป็นระเบียบอยู่ภายในนิวเคลียส บริเวณไซโทพลาซึมรอบๆนิวเคลียสพบ mitochondria จำนวนมาก พบ blood capillaries แทรกอยู่ใน testicular tissue (Patzner and Kaurin, 1997)

ในขณะที่ ลูกปลาไหล European eel, *Anguilla anguilla* เกิด sex differentiation ของเพศเมียเมื่อลูกปลามีความยาว 22-30 เซ็นติเมตรและพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เมื่อลูกปลามีความยาวมากกว่า 35 เซนติเมตร ในการศึกษา sex differentiation ของปลาไหลดังกล่าวทำการศึกษาโดยใช้ขนาดความยาวเป็นตัวกำหนด โดยไม่ทราบอายุที่แท้จริงของปลา (Colombo and Grandi, 1996) ในปลากระดูกแข็งการเกิด sex differentiation ในปลาเพศผู้ล่าช้ากว่าเพศเมียเสมอ (Patiño and Takashima, 1994)

**<u>การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาระยะโตเต็มวัย</u>**

ลักษณะเด่นของระยะตัวเต็มวัยเริ่มตั้งแต่ปลาสามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์และพร้อมที่จะผสมพันธุ์ได้ ในปลากระดูกแข็งลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์อาจจะแตกต่างกัน แต่ลักษณะโครงสร้างทางมิญชวิทยาของเซลล์สืบพันธุ์อื่นๆที่ประกอบกันเป็นเนื้อเยื่อในอวัยวะสืบพันธุ์นั้นมีความคล้ายคลึงกัน ฤดูกาลของการสืบพันธุ์ในปลาแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างเช่น ปลาแซลมอนและปลาไหลเมื่อเจริญเต็มวัยมีการสืบพันธุ์เพียงครั้งเดียวก็ตายไป บางชนิดมีการสืบพันธุ์ 2-3 ปีต่อครั้ง แต่ส่วนใหญ่มีการสืบพันธุ์ปีละครั้งหรือหลายๆครั้งต่อปี ปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่มีเพศแยกกัน(gonochorism) แต่มีปลาบางชนิดที่มีลักษณะเพศเป็นแบบกะเทย (hermaphroditism) (Takashima and Hibiya, 1995)

**<u>อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และการสร้างอสุจิ</u>**

Andrew and Hickman (1974) รายงานว่าอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ของปลากระดูกแข็งเพศผู้ ส่วนมากมีอัณฑะ 1 คู่ ยกเว้นปลาบางชนิดมีอัณฑะเพียง 1 อัน เช่น ปลา Elephant snout, *Mormyrus kannune* (Scott, 1974) อัณฑะวางแนบกับไต มีเยื่อยึดติดกับผนังช่องท้อง รูปร่างของอัณฑะมักเป็นท่อยาวหรือเป็นพู อัณฑะทั้งสองข้างจะเชื่อมต่อกันในตอนท้าย

เป็นท่อเดียวตรงกลางไปเปิดระหว่างทวารหนักกับช่องเปิดของท่อปัสสาวะ ซึ่งท่อนี้เป็นทางผ่านของอสุจิ (male genital duct) และท่อนี้ไม่เชื่อมต่อกับส่วนของไตและท่อไต (Andrew and Hickman, 1974) Takashima and Hibiya (1995) แบ่งโครงสร้างอัณฑะในปลาออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ แบบ lobular พบในปลากระดูกแข็งส่วนใหญ่ พูทั้ง 2 ของอัณฑะยึดติดกันด้วยเนื้อเยื่อประสานชั้นบาง อัณฑะแบบนี้จะมีช่องว่าง (lumen) อยู่ตรงกลางของท่อเป็น hollow lumen แบบที่สองเป็นแบบ tublular อัณฑะแบบนี้ไม่มีช่องว่างอยู่กลางท่อเป็น solid lobules ภายในอัณฑะสร้างน้ำเชื้อตัวผู้หรืออสุจิ(sperm)ส่งเข้ามายังท่อนำน้ำเชื้อตอนต้นหรือ vasa efferentia ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อขนาดเล็กขดอยู่รวมกัน ท่อนำน้ำเชื้อตอนปลายเรียกว่า vas deferens หรือ sperm duct น้ำเชื้อจะผ่านท่อนำน้ำเชื้อมายังถุงพักอสุจิหรือ seminal vesicle แล้วออกจาก seminal vesicle ไปยังท่อ urogenital sinus ซึ่งเป็นท่อทางออกร่วมกับท่อปัสสาวะ (สุภาพร, 2542)

การสร้างอสุจิ (spermatogenesis) เกิดขึ้นภายในอัณฑะ โดยเจริญมาจากเซลล์สืบพันธุ์ที่อยู่ภายใน spermatocyst เริ่มจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของ spermatogoniaได้ primary spermatocyte และเมื่อ primary spermatocyte แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส I ทำให้ได้เซลล์ลูกคือ secondary spermatocyte 2 เซลล์ และเมื่อแบ่งไมโอซิส II secondary spermatocyte 1 เซลล์ ได้ spermatid 2 เซลล์ ซึ่งมีจำนวนโครโมโซมเพียงชุดเดียว จากนั้นเข้าสู่กระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ที่เรียกว่า spermiogenesis กลายเป็นอสุจิ (Nagahama, 1983) Takashima and Hibiya (1995) กล่าวว่าspermatogoniaมักพบอยู่ที่ฐานของspermatocyst และมีเซลล์ 2 ชนิดด้วยกันคือ primary spermatogoniaและ secondary spermatogonia สำหรับ primary spermatogoniaโดยทั่วไปเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด ส่วน primary spermatocytes พบว่าเชื่อมต่อกันด้วย intercellular bridges ภายในนิวเคลียสมีโครมาทินที่หนาแน่นจำนวนมาก ส่วน secondary spermatocytes ไม่ค่อยพบในsection ของอัณฑะ เนื่องจากเป็นระยะที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วเพื่อแบ่งตัวกลายเป็นspermatids ขนาดของ secondary spermatocytesจะเล็กกว่า primary spermatocytesและใหญ่กว่าspermatids การเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ spermatidไปเป็นอสุจิประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียส และไซโทพลาซึมพร้อมทั้งจะมีการเจริญของ แฟลเจลลัมในตอนท้ายของการเปลี่ยนแปลง

เซลล์สืบพันธุ์ในกระบวนการสร้างอสุจิแบ่งได้เป็น 5 ชนิด โดย Moe (1969) พบในปลา *Epinephelus morio* และ Abu-Hakima (1984; 1987) พบปลา *Acanthopagrus latus* และ *Acanthopagrus cuvieri* ดังนี้

1. Spermatogonia เป็นเซลล์ที่พบเดี่ยวๆหรือพบเป็นกลุ่มขนาดเล็กประมาณ 8-15 เซลล์ พบได้ทุกระยะของการเจริญพันธุ์ของอัณฑะ เซลล์มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 8-12.5 ไมโครเมตร ไซโทพลาซึมติดสีจาง นิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ เส้นผ่าศูนย์กลางของนิวเคลียสประมาณ 5-7.5 ไมโครเมตร เห็นนิวคลีโอลัสชัดเจนตรงกลางนิวเคลียส พบเส้นใยโครมาตินแผ่ออกจากนิวคลีโอลัสไปยังเยื่อหุ้มนิวเคลียส Nagahama (1983) มักพบเซลล์ชนิดนี้บริเวณฐานของ spermatocyst โดยมีเยื่อบางๆเชื่อมกับ basement membrane และพบ sertoli cell ซึ่งทำหน้าที่ให้อาหารแก่ตัวอสุจิแทรกกระจายทั่วไปในอัณฑะ

2. Primary spermatocyte เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของ spermatogonia เซลล์มีขนาดเล็กกว่า spermatogonia มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 5-7.5 ไมโครเมตร นิวเคลียสอยู่ตรงกลางเซลล์ เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-2.5 ไมโครเมตร ติดสีย้อมเข้มกว่านิวเคลียสของ spermatogonia เส้นใยโครมาตินติดสีย้อมไม่สม่ำเสมอ

3. Secondary spermatocyte เกิดจากขบวนการแบ่งเซลล์ primary spermatocyte เซลล์มีขนาดเล็กลง มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4-5 ไมโครเมตร เซลล์รวมกันเป็นกลุ่ม นิวเคลียสขนาดเล็ก ติดสีย้อมสม่ำเสมอเป็นเนื้อเดียวกัน มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 2-2.5 ไมโครเมต และโครมาตินติดสีย้อมเข้มและทึบกว่า primary spermatocyte. Nagahama (1983) กล่าวว่าภายใน section ของอัณฑะมักไม่พบเซลล์นี้เนื่องจากมีช่วงชีวิตสั้น ไม่นานก็จะแบ่งตัวเป็น spermatid

4. Spermatid เกิดจากการแบ่งเซลล์ของ secondary spermatocyte ทำให้มีขนาดเล็กลง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง1.5-2 ไมโครเมตร นิวเคลียสขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์และติดสีย้อมเข้มมาก ทำให้มองไม่เห็นส่วนของไซโทพลาซึม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. Spermatozoa หรืออสุจิ เกิดจากกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ spermatid เป็น spermatozoa ประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสและไซโทพลาซึม พร้อมกับมีการเจริญของแฟลเจลลัม(flagellum) มักพบ spermatozoaใน lumen ประกอบด้วยนิวเคลียสเป็นส่วนหัว เส้นผ่าศูนย์กลาง 1-2 ไมโครเมตร ส่วนหางมองเห็นไม่ชัด เมื่อส่วนหางอยู่รวมกันเป็นกลุ่มมีลักษณะเหมือนร่มชูชีพ (parachute) อสุจิเมื่อเจริญเต็มที่จะเคลื่อนเข้าสู่ท่อนำอสุจิ

รูปร่างของอสุจิแบ่งออกเป็นส่วนหัว (head) ส่วนกลาง (middle piece) และส่วนหาง (tail) อสุจิของปลากระดูกแข็งไม่มี acrosome ซึ่งแตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังพวกอื่นๆ ลักษณะดังกล่าวจะสัมพันธ์กับไข่ของปลากระดูกแข็งซึ่งมีช่องไมโครไพล์ ส่วนหัวของอสุจิโดยทั่วไปมีรูปร่างกลมหรือรี แต่ก็พบรูปเคียวหรือรูปเสี้ยวพระจันทร์ในปลาบางชนิด (Andrew and Hickman, 1974) Bern and Avtalion (1990) ลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลาหมอเทศสกุล*Tilapia* ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) พบว่า ตัวอสุจิประกอบด้วยส่วนหัว ส่วนกลางและส่วนหาง วัดขนาดความยาวได้ 1.8, 0.8 และ18 ไมโครเมตรตามลำดับ ไม่มีโครงสร้างของ acrosome ที่ปลายสุดของส่วนหัว แต่พบ dense nucleus ซึ่งแบ่งเป็น 2 พูอยู่ในช่องว่างทั้งหมดของส่วนหัว ระหว่างพูทั้งสองสังเกตเห็น centriole ในส่วน middle piece พบ ไมโทคอนเดรีย 4-6 อัน ซึ่งประกอบด้วย dense matrix และหุ้มด้วย cytoplasmatic capsule มี cytoplasmic tubule เล็กๆอยู่รอบส่วนต้นของหาง โครงสร้างของส่วนหางประกอบด้วยไมโครทูบูลเรียงเป็นวง 9 ชุดและมีอีก 1 คู่อยู่ตรงกลาง Jaspers *et al.* (1976) ลักษณะของ spermatozoa ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านและแบบส่องกราดในปลา Channel catfish, *Ictalurus punctatus* พบโครงสร้างของอสุจิส่วนหัว ประกอบด้วยนิวเคลียสค่อนข้างกลม ส่วนหัวยาวประมาณ 2.3 ไมโครเมตร กว้างประมาณ 2.4 ไมโครเมตร เมื่อตัดตามยาวไม่พบโครงสร้าง acrosome หุ้มเหมือนปลากระดูกแข็งทั่วไป โครงสร้างของอสุจิส่วนหัว มีลักษณะแตกต่างกันตามชนิดของปลา บางชนิดมีลักษณะเป็นรูปไข่ เป็นเส้นหยักๆหรือเป็นแท่งรี ภายในส่วนหัวเป็นที่เก็บของสารพันธุกรรมซึ่งเป็นลักษณะของการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์ ส่วนกลางของอสุจิอยู่ติดกับส่วนหัว เมื่อตัดตามขวางพบว่ามีแกนกลาง (axial filament) ประกอบด้วยไมโครทูบูลตรงกลาง 1 คู่และล้อมรอบแกนกลางอีก 9 ชุด (9+2) ส่วนนี้เป็นส่วนของอสุจิที่มีขนาดเล็กมาก เป็นที่เชื่อมต่อระหว่างส่วนหัวและส่วนหาง บริเวณนี้เป็นแหล่งสร้างฮอร์โมน ถัดออกมารอบนอกเป็นส่วนหางที่เรียกว่า mitochondrial sheath มีไมโตคอนเดรียบรรจุอยู่ 6 อันและถูกห่อหุ้มด้วย cytoplasmic capsule วัดเส้นผ่าศูนย์กลางตามขวางของ

ส่วนกลางได้ประมาณ 3.1 ไมโครเมตร และวัดตามยาวได้ประมาณ 1.6 ไมโครเมตร ส่วนท้ายของอสุจิมีโครงสร้างเหมือนกับซีเลียและแฟคเจลลา เมื่อตัดตามขวางพบว่ามีการจัดเรียงตัวของไมโครทูบูลเป็นแบบ 9+2 และบริเวณด้านข้างของหางตลอดความยาวมีส่วนที่ยื่นออกมาคล้ายครีบทั้งสองข้าง ส่วนหางยาวประมาณ 94.9 ไมโครเมตร หน้าที่ของส่วนหางคือการพัดโบกอสุจิให้เกิดการเคลื่อนไหวหรือเคลื่อนที่ไปข้างหน้า ตัวอสุจิตั้งแต่ปลายส่วนหัวถึงปลายหางมีความยาวทั้งสิ้น 98.8 ไมโครเมตร นอกจากนี้ Billard (1969) รายงานความกว้างและความยาวของส่วนหัวของอสุจิในปลาชนิดอื่น ดังนี้ ปลาไน *Cyprinus carpio* มีความกว้างของส่วนหัวอสุจิ 2.5 ไมโครเมตร และยาว 3.3 ไมโครเมตร ปลา Northern pike, *Esox lucius* กว้าง 1.8 ไมโครเมตรและยาว 2 ไมโครเมตร ปลา Guppy, *Poecilia reticulata* กว้าง 1 ไมโครเมตรและยาว 3 ไมโครเมตร และปลา Rainbow trout, *Salmo gairdneri* กับปลา Brown trout, *Salmo truttafario* กว้าง 1.5-2 ไมโครเมตรและยาว 2.5 ไมโครเมตร

Scott (1974) แบ่งการเจริญของอัณฑะในปลา Elephant snout, *Mormyrus kannune* ออกเป็น 3 ระยะคือ ระยะที่ 1 คือระยะก่อนเจริญพันธุ์ (immature) เป็นระยะที่ยังไม่เจริญเต็มที่ซึ่งภายใน seminiferous tubules พบเพียง spermatogonia แต่เมื่อถึงระยะที่ 2 คือระยะเจริญพันธุ์ (mature) ระยะที่เจริญเติบโตเต็มที่พบ spermatogenic cells ระยะต่างๆมีการเจริญต่อเนื่องกัน และระยะที่ 3 คือระยะวางไข่ (spawning season) ระยะนี้พบตัวอสุจิเป็นจำนวนมาก ไม่พบ spermatogenic cells ระยะอื่นๆ

**<u>อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียและการสร้างไข่</u>**

ระบบสืบพันธุ์ปลาเพศเมีย ประกอบด้วยรังไข่ 1 คู่ ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นฝักยาว ยกเว้นปลาบางชนิดมีรังไข่เพียงฝักเดียว เช่น ปลา Perch, *Perca fluviatilis* (Tresurer and Holliday, 1981) รังไข่มี fibrous connective tissue หุ้ม สุภาพร (2542) รายงานว่าฝักไข่ที่มีลักษณะกลมยาวของปลากระดูกแข็งโดยทั่วไปมักมีสีเหลืองหรือสีชมพูภายในมีไข่ เมื่อถึงฤดูสืบพันธุ์รังไข่ขยายใหญ่มาก รังไข่ยึดติดผนังช่องท้องด้วยเยื่อ mesovarium จากรังไข่จะมี funnel หรือ ostium tube ทำหน้าที่รับไข่ที่ตกมาจากรังไข่ แล้วเคลื่อนที่ผ่านท่อนำไข่(oviduct) และออกทาง urogenital papillae บริเวณ cloaca Arocha, (2001); Yoneda *et al.* (1998); Mayer *et al.* (1990); Forberg (1982) และWallace and Selman (1981) แบ่งรังไข่เป็น 3 แบบตามพัฒนาการของไข่ภายในรังไข่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แบบที่ 1 เรียกว่า synchronous oocyte development รังไข่แบบนี้จะมีการพัฒนาของไข่เกิดขึ้นพร้อมกัน เซลล์ไข่มีขนาดเท่าๆกัน และมีไข่สุกเพียงระยะเดียวในเวลาเดียวกัน มีการวางไข่เพียง 1 ครั้งต่อ 1 ฤดูกาลวางไข่ พบรังไข่แบบนี้ในปลาปู่ *Tridentiger obscurus* ซึ่งภายในรังไข่แบ่งระยะการเจริญและพัฒนาการของไข่ออกเป็น 4 ระยะเท่านั้นคือ 1.Resting period เซลล์ไข่เจริญอยู่ใน early perinucleolus stage ซึ่งเป็นระยะแรกของพัฒนาการในรังไข่ พบนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ ไซโทพลาซึมมีจำนวนน้อย 2.Yolk vesicle stage พบเซลล์ไข่เจริญอยู่ใน late perinucleolus stage นิวเคลียสมีขนาดเล็กลง เซลล์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 80-130 ไมโครเมตร 3. Yolk globule stage เซลล์ไข่เริ่มมีการสะสมของไข่แดง ทำให้เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 120-160 ไมโครเมตร 4. Maturation stage เซลล์มีขนาดใหญ่มีเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่า 400 ไมโครเมตร มีปริมาณของไข่แดงเพิ่มมากขึ้นและพร้อมที่จะเข้าสู่ขบวนการตกไข่ในฤดูกาลนั้น (Kaneko and Hanyu, 1985)

แบบที่ 2 เรียกว่า group synchronus oocyte development รังไข่แบบนี้จะมีการพัฒนาของไข่เกิดขึ้นไม่พร้อมกัน เซลล์ไข่มีขนาดไม่เท่ากัน มีพัฒนาการของรังไข่แบบไข่พัฒนาเป็นกลุ่มๆ และสามารถแยกระยะต่างๆของกลุ่มไข่ออกจากกันได้ชัดเจน ทำให้ทราบวงจรการสืบพันธุ์เป็นรอบๆได้และคาดเดาเวลาในการวางไข่ได้ รังไข่แบบนี้พบว่ามีการวางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้งต่อ 1 ฤดูกาล เช่น Mayer *et al.* (1988)ในปลากระพง *Dicentrachus labax* หรือ Yoneda *et al.* (1998) ในปลา *Lophiomus setigerus* ซึ่งต่างก็แบ่งระยะพัฒนาการของไข่ออกเป็น 7 ระยะที่แตกต่างกัน

แบบที่ 3 เรียกว่า asynchronous oocyte development รังไข่แบบนี้คล้ายกับ group synchronus oocyte development คือ มีการพัฒนาของไข่เกิดขึ้นไม่พร้อมกัน เซลล์ไข่มีขนาดไม่เท่ากัน แต่รังไข่ทั้ง 2 แบบนี้แตกต่างกันที่ไม่สามารถแยกระยะการเจริญของไข่ที่แตกต่างกันออกจากกัน เนื่องจากมีการสร้างขึ้นทดแทนตลอดเวลา ทำให้ไม่ทราบวงจรการสืบพันธุ์แน่นอนได้ ดังนั้นปลาจึงวางไข่ได้ตลอดทั้งปีโดยไม่มีฤดูกาลในการวางไข่ พบในปลา *Xiphias gladius* (Arocha, 2001), ปลา*Pomatoschistus marmoratus* และ ปลา *Silhouettea aegyptia* (Fouda *et al.*, 1993), *Tridentiger obscurus* (Kaneko and Hanyu, 1985), *Chasmichthys dolichognathus* (Kaneko *et al.*, 1984) ปลาในตระกูลนี้สามารถปรับตัวและทนต่อสภาพอากาศที่แปรปรวนได้ดี อาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำเขตร้อนและเขตอบอุ่นรวมทั้งน้ำจืดและน้ำเค็ม (Fouda *et*

*al.*, 1993 ) การแบ่งพัฒนาการของรังไข่เป็น 3 แบบ สามารถบอกให้ทราบถึงฤดูกาลวางไข่ของปลาแต่ละชนิด เพราะทำให้ทราบลักษณะของเซลล์ไข่ในแต่ละระยะและพัฒนาการของรังไข่ได้เป็นอย่างดี (Aocha, 2001; Yoneda *et al*, 1998; Mayer, Shackley and Ryland, 1990; Forberg, 1982)

ลักษณะโครงสร้างของรังไข่ในปลากระดูกแข็งประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ovarian cavity (ovarian lumen หรือ ovocoele) และ ovarian lamellae (หรือ ovigerous fold) จำนวนมาก ซึ่งเป็นบริเวณที่มีการสร้างไข่ (oogenesis) เกิดขึ้น ประกอบด้วย follicle ที่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ ovarian cavity จะต่อกับท่อนำไข่ซึ่งเปิดเข้า genital pore รังไข่ที่มีโครงสร้างแบบนี้เรียกว่า cystovarian type หลังจากที่ไข่เจริญเต็มที่ ไข่จะถูกปล่อยออกจากฟอลลิเคิลที่อยู่ใน ovarian lamellae เข้าสู่ ovarian cavity แล้วผ่านท่อนำไข่และ genital pore รังไข่ของปลาบางชนิดเช่น ปลาแซลมอนและปลาเทร้ามีโครงสร้างคล้ายกระเป๋า ซึ่งเปิดเข้าสู่ช่องว่างลำตัว และมีร่องรูปกรวยทำหน้าที่แทนท่อนำไข่ที่เสื่อมไปและนำไข่สู่ genital pore รังไข่แบบนี้เรียกว่า semicystovarian type ส่วนโครงสร้างรังไข่ปลาไหลเป็นแบบง่าย รังไข่แขวนไว้คล้ายม่าน ไข่ที่ตกจะปล่อยเข้าสู่ช่องว่างลำตัว แล้วปล่อยออกไปนอกตัว รังไข่แบบนี้เรียกว่า gymovarian type ซึ่งเป็นลักษณะรังไข่ของสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ (Takashima and Hibiya, 1995)

Andrew and Hickman (1974) พบว่า ovarian follicle ของปลากระดูกแข็งทุกชนิดมีโครงสร้างคล้ายกัน คือ โอโอไซท์อยู่ตรงกลาง ล้อมรอบด้วย zona radiata หรือ vitelline membrane ซึ่งเป็นชั้นที่ไม่มีเซลล์อยู่ ถัดมาเป็น granulosa cell หรือ follicle cell และชั้นนอกสุดเป็น theca cell ระหว่าง granulosa cell และ theca cell มี basement membrane กั้น Grizzle and Rogers (1976) ในปลา Channel catfish, *Ictalurus punctatus* พบ รังไข่ถูกหุ้มด้วย tunica albuginea ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อประสานแทรกด้วยกล้ามเนื้อเรียบ ในลูกปลาเนื้อเยื่อส่วนนี้เป็นชั้นบางๆ มี ovigerous lamellae อยู่ภายใน lumen ซึ่งต่อไปยังท่อนำไข่ขนาดสั้น ภายใน lamellae พบ primary follicle ล้อมรอบด้วย simple squamous cellsไซโทพลาซึมของโอโอไซท์ติดสีน้ำเงินเข้ม นิวเคลียสติดสีชมพูอ่อน พบ primary follicle ในปลาขนาดเล็กและตัวเต็มวัยทุกฤดูกาล ไข่ที่เจริญเต็มที่แล้วมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1 มิลลิเมตรก่อนฤดูกาลวางไข่ และชั้นของ follicular cell จะแยกออกจาก zona radiata เมื่อใกล้ฤดูวางไข่ Takashima and Hibiya (1995) ในชั้น granulosa ยังมีเซลล์ไมโครไพล์ (micropyle cell) ที่มีส่วนในการสร้างช่องไมโครไพล์ ซึ่งเป็นทาง

เปิดของ vitelline membrane ของไข่ที่ตกและสำหรับให้อสุจิเข้ามาในระหว่างปฏิสนธิ ลักษณะของเซลล์ไมโครไพล์ ต่างจากgranulosa cell คือเป็นเซลล์รูปสามเหลี่ยมขนาดใหญ่และฝังอยู่ในช่องไมโครไพล์เชื่อว่าเซลล์เหล่านี้ไม่เพียงแต่อุดช่องไมโครไพล์เท่านั้น แต่ยังสร้างสารหลั่งอีกด้วย พบกลุ่มของอสุจิอยู่บริเวณนี้ในระยะเริ่มต้นของการปฏิสนธิ สำหรับ zona radiata ที่อยู่ระหว่างชั้น granulosa กับ โอโอไซท์เมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะมีลาย(striation) และเมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าลายนี้เกิดจากการแทรกเข้ามาของไมโครวิลไล และแขนงของเซลล์ทั้งโอโอไซท์และ follicle cell จากการตรวจสอบทางมิญชเคมีพบว่าประกอบด้วย คาร์โบไฮเดรตและโปรตีน

Bern and Avtalion (1990) ในปลาหมอเทศสกุล *Tilapia* เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ไข่มีขนาดค่อนข้างใหญ่ประมาณ 2x3 มิลลิเมตร มีเปลือกหนาเป็นโครงสร้างที่มีรูพรุน ขั้วไข่ด้าน animal pole มีช่องไมโครไพล์ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6 ไมโครเมตร บริเวณนี้ถูกปกคลุมด้วย microfilament เมื่อเอาชั้น chorion ออก พบว่าระดับของ plasma membrane อยู่ต่ำกว่าระดับไมโครไพล์ซึ่งเป็นรูปกรวย และครอบคลุมด้วย microvilli สั้นๆเป็นจำนวนมาก นอกจากนี้พบว่าในการเจริญขั้นสุดท้ายของoocytes จะมีการสลายตัวของนิวเคลียสเกิดขึ้น ก่อนการสลายตัว oocytes จะมีการสร้างสเตียรอยด์ฮอร์โมนซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศ ที่ทำให้เซลล์ไข่สุกและพร้อมตกไข่ เซลล์ที่ทำหน้าที่ในสร้างสเตียรอยด์ฮอร์โมนในปลากระดูกแข็งคือ ovarian follicle ซึ่งอาจจะเป็นชั้น theca cells หรือ granulose cells ขึ้นอยู่กับชนิดของปลา มีการศึกษาในปลา *Seriola quinqueradiata* พบว่าชั้น theca cells ในระยะ preovulatory follicle เซลล์มีลักษณะคล้ายเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างสเตียรอยด์ฮอร์โมน นั้นคือพบsmooth endoplasmic reticulum และ mitochondria เป็นจำนวนมาก แต่ในชั้น granulosa cells มีเซลล์ลักษณะคล้ายเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นสารคัดหลั่งเท่านั้น(protein-secreting cells) คือมีการเพิ่มจำนวนขึ้นของrough endoplasmic recticulum (RER) และ Golgi complex เป็นจำนวนมาก (Kagawa,1991) เช่นเดียวกับที่พบในปลา *Clarias lazera* (Hurk and Richter,1980) และ *Ictalurus nebulosus* (Rosenblum *et al.*, 1987) ซึ่งแตกต่างจากปลา *Clarias gariepnus* (Hurk and Peute, 1985) ที่พบชั้น granulosa cells คือเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างสเตียรอยด์ฮอร์โมน ในการศึกษาเนื้อเยื่อรังไข่ของปลาบู่ทราย *Oxyeleotis marmoratus* (Bleeker, 1852) พบว่าเซลล์ไข่จะประกอบด้วยเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือ ชั้นนอกเป็น theca layer ชั้นในเป็นชั้น Ganulosa layer ระหว่างชั้น theca layer และชั้น

Ganulosa layer จะถูกกั้นด้วย brasment membrane และระหว่างชั้น Ganulosa layer กับไซโตพลาซึมของเซลล์ไข่จะมีแขนง (pocess) ที่มีลักษณะคล้าย microvilli ยื่นออกมา และพบว่าเกือบทุกระยะของเซลล์ไข่ทั้ง perinucleolus stage, yolk vesicle stage, yolk granule stage จะมีmitochondria กระจายอยู่ทั่วไปภายในไซโตพลาซึม เซลล์ไข่ระยะyolk vesicle พบชั้น granulosa stage มีการหนาตัวขึ้นทำให้มองเห็นชั้น zona radiate มีหลายชั้น และพบว่า mitochondria มีจำนวนมากขึ้นทั้งใน granulosa layer และในไซโตพลาซึม นอกจากนี้ยังพบหยดไขมันจำนวนมากในชั้น granulosa layer ด้วย (ปิยากร, 2546)

การสร้างไข่ (oogenesis) รังไข่ของปลากระดูกแข็ง แตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆคือ oogonia ทั้งหมดไม่ได้เจริญพัฒนาจนถึงขั้นแบ่งตัวแบบไมโอซิส ในระหว่างการเจริญในระยะแรก(early development) จึงพบ oogonia แทรกอยู่ระหว่าง ovarian follicle ขนาดใหญ่ในรังไข่ของปลาที่โตเต็มวัยแล้ว ช่วงระยะเวลาของการแบ่งตัวของ oogonia ขึ้นกับวงจรสืบพันธุ์ของปลาแต่ละชนิด การสร้างไข่เริ่มจาก oogonia มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิส และกลายเป็น primary oocytes การเพิ่มขนาดของโอโอไซท์เกิดจากการสะสมของไข่แดง ในระหว่างที่มีการเจริญเติบโตนั้นโอโอไซท์มีการเปลี่ยนแปลงทั้งนิวเคลียสและไซโทพลาซึม สามารถแบ่งระยะการเจริญได้ดังนี้ (Takashima and Hibiya,1995)

1. Chromatin-nucleolus phase ระยะนี้เริ่มตั้งแต่ leptotene ถึง pachytene ของ prophase I oocytes ระยะ leptotene จะแยกจาก oogonia ได้ยาก เมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เห็นโครโมโซมเป็นเส้นด้ายบางๆกระจายอยู่ในนิวเคลียสและเห็นนิวคลิโอลัส ส่วนโอโอไซท์ระยะ zygotene เห็นการเรียงตัวของโครโมโซมเป็นช่อดอกไม้ (bouquet) อยู่ทางด้านหนึ่งของนิวเคลียส และนิวคลีโอลัสขนาดใหญ่อยู่ด้านตรงข้าม ส่วนระยะ pachytene เริ่มปรากฏโครงสร้างที่เรียกว่า balbiani vitelline body ในไซโทพลาซึม เห็น oocytes ล้อมรอบด้วยชั้นของ granulosa cell บางส่วนและมี basement membrane

2. Perinucleolar phase ระยะนี้ตรงกับ early diptotene ของไมโอซิส I เห็นนิวคลีโอลัสหลายอันบริเวณของ nucleoplasm นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น เรียกว่า germinal vesicle การแบ่งไมโอซีสจะหยุดในระยะนี้ แต่โอโอไซท์และผนังของ follicle ยังคงมีการพัฒนาต่อไป โดยพบ

follicle cell ล้อมรอบโอโอไซท์ ในปลาหลายชนิดยังคงเห็น balbiani vitelline body ชัดเจนและอยู่ใกล้กับนิวเคลียส

3. Cortical alveoli phase มี cortical alveoli เป็น vacuole ใสๆกระจายอยู่ทั่วไปในไซโทพลาซึม อาจพบหยดไขมันอยู่รอบๆ germinal vesicle ได้ในปลาบางชนิด เมื่อดูจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะเห็นไมโครวิลไลและ vitelline membrane ชัดเจน

4. Vitellogenic phase พบว่ามีไข่แดงสะสมในไซโทพลาซึม พบ yolk globules (yolk granules) เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ และโอโอไซท์มีขนาดใหญ่ขึ้น

5. Maturation phase พบ germinal vesicle เคลื่อนที่จากตรงกลางไปอยู่ที่ animal pole และในที่สุดจะสลายไป ในปลาบางชนิดพบว่าหยดไขมันรวมกันมีขนาดใหญ่ขึ้น โอโอไซท์สิ้นสุดไมโอซิส I อย่างสมบูรณ์ และได้เซลล์ขั้วระยะที่หนึ่ง (first polar body) หลังจากนี้จะมีไมโอซิส II เกิดขึ้นแต่จะหยุดที่เมทาเฟส II โอโอไซท์ที่เจริญเต็มที่เรียกว่าไข่(mature ovum) และไมโอซิส II จะสมบูรณ์เมื่อไข่ที่ตกได้รับการปฏิสนธิ

6. การตกไข่ (ovulation) หมายถึงการที่ไข่ถูกขับออกจากฟอลลิเคิล ไข่ที่ตกยังคงมี vitelline membrane แต่ไม่มี follicle cell หลังจากการตกไข่แล้ว ภายในรังไข่พบ postovulatory follicles, oogonia และโอโอไซท์ที่เจริญอยู่ในระยะต่างๆขึ้นกับชนิดของปลา

Grizzle and Rogers (1976) ปลา Channel catfish, *Ictalurus punctatus* และ Groman (1982) ปลา Striped bass ได้แบ่งพัฒนาการของไข่ออกเป็น 6 ระยะ ตามลักษณะของนิวเคลียสและองค์ประกอบในไซโทพลาซึม ดังนี้

ระยะที่ 1 ไข่มีขนาดเล็กมาก ไซโทพลาซึมติดสีชมพูจางๆของ eosin นิวเคลียสกลมอยู่ตรงกลางเซลล์ และไข่มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม มีเนื้อเยื่อประสานล้อมรอบ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ระยะที่2 ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้นและเมื่อย้อมด้วยสี Harris hematoxylin and eosin (H&E) ไซโทพลาซึมติดสีน้ำเงินเข้ม นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นและติดสีย้อมจางกว่าไซโทพลาซึม ไม่พบ follicular cells ในระยะนี้

ระยะที่ 3 ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น นิวเคลียสชิดไปอยู่ด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ รอบๆเซลล์ไข่พบชั้น follicular cells ไซโทพลาซึมของเซลล์ไข่ยังติดสีน้ำเงินเข้มของ H&E ภายในนิวเคลียสเริ่มเห็น provitelline nucleoli กระจายทั่วไป

ระยะที่ 4 ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้นอีก provitelline nucleoli เคลื่อนที่ไปอยู่ขอบของนิวเคลียส ไซโทพลาซึมติดสีน้ำเงินจางลง เริ่มเห็น yolk granules และ fat vacuoles

ระยะที่ 5 ระยะนี้มี yolk granules และ fat vacuoles เพิ่มขึ้นมากในไซโทพลาซึม โดยเริ่มจากด้านนอกก่อน ไซโทพลาซึมติดสีน้ำเงินจางลง นิวเคลียสติดสีชมพูอ่อนของ eosin พบชั้น zona radiata และชั้น follicular cells

ระยะที่ 6 ไซโทพลาซึมมี yolk granules ขนาดใหญ่ขึ้นและติดสีแดงเข้มกระจายเต็มไปหมดfat vacuoles ก็มากขึ้น นิวเคลียสขนาดเล็กสีชมพูเมื่อย้อมด้วย H&E เห็นชั้น zona radiata, follicular cell และ theca layer ชัดเจน

Abu-Hakima (1987) ปลา Grouper, *Epinephelus tauvina* Smith (1965)ปลากลุ่ม Serranids และ Abu-Hakima (1984) ปลาในสกุล *Acanthopagrus* ได้จำแนกระยะการเจริญของไข่ออกเป็น 5 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 Oogonia เป็นเซลล์ที่พบอยู่เป็นกลุ่มใกล้กับผนังของ lamellae มีเส้นผ่าศูนย์กลางของเซลล์ประมาณ 5-15 ไมโครเมตร นิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ มีนิวคลีโอลัส 1 อัน มีเส้นใยโครมาติน ไซโทพลาซึมติดสีย้อมจางๆ เซลล์ไข่ระยะนี้พบในรังไข่ที่ยังไม่เจริญเต็มที่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ระยะที่ 2 Primary growth phase ไข่ระยะนี้มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 15-40ไ มโครเมตร นิวเคลียสใหญ่ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 10-30 ไมโครเมตร มีนิวคลีโอลัส 1 อัน ไซโทพลาซึม ติดสีน้ำเงินจาง ต่อมาไข่มีขนาดเพิ่มขึ้นจนถึง 60 ไมโครเมตร นิวเคลียสประกอบด้วยนิวคลีโอลัส จำนวนมาก พบไข่ระยะนี้ทุกระยะการพัฒนาของรังไข่

ระยะที่ 3 Early vitellogenesis ไข่มีขนาดเพิ่มขึ้น เส้นผ่าศูนย์กลาง 60-200 ไมโครเมตร ไซโทพลาซึมมี yolk vesicle และพบชั้นของ follicular cells นิวเคลียสมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 30-60 ไมโครเมตร นิวคลีโอลัสหลายอัน และพบโครโมโซมที่มีรูปร่างคล้ายแปรงล้างขวด (lampbrush chromosome)

ระยะที่ 4 Mid-vitellogenesis ไข่ระยะนี้มีการสร้าง yolk granule หนาแน่นที่สุด zona radiata เป็นแถบหนาขึ้น ตอนท้ายของระยะนี้พบว่านิวเคลียสหรือ germinal vesicle เคลื่อนที่ไปอยู่ที่ขอบของไซโทพลาซึม yolk เริ่มเชื่อมติดกัน ไข่มีการเพิ่มขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางจนถึงประมาณ 375-450 ไมโครเมตร นิวเคลียสมีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40-70 ไมโครเมตร และพบนิวคลีโอลัสขนาดเล็กหลายอัน

ระยะที่ 5 Maturation egg stage ระยะนี้ yolk เชื่อมติดกันอย่างสมบูรณ์ ไซโทพลาซึมของไข่มีลักษณะใส (hyaline) ไข่มีการเพิ่มขนาดจนมีเส้นผ่าศูนย์กลางถึง 550-600 ไมโครเมตร

ปิยากร (2546) ในปลาบู่ทราย Sand goby, *Oxyeleotris marmoratus* ได้จำแนกการเจริญของไข่ออกเป็น 6 ระยะดังนี้

1. Oogonia stage เป็นเซลล์ลักษณะกลมรีขนาดเล็กประมาณ 5-10 ไมโครเมตร เมื่อย้อมสี H&E ติดสีน้ำเงินไม่ชัด และพบเห็นจำนวนน้อยกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อประสานภายใน ovogerus fold

2. Chromatin-nucleolus stage พบไซโทพลาซึมติดสีน้ำเงินเข้มเป็น basophillic cell นิวเคลียสไม่ติดสี แต่พบภายในนิวเคลียสจะมีนิวคลีโอลัส 1 อันที่ติดสีน้ำเงินเข้ม เซลล์มีขนาด 10-70 ไมโครเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. Perinucleolus stage พบไซโทพลาซึมติดสีน้ำเงินน้อยกว่า chromatin nucleolus stage พบนิวคลีโอลัส เพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2-13 อัน เซลล์มีขนาด50-130 ไมโครเมตร ในระยะนี้พบ ovarian follicle แต่ไม่ชัดเจนนัก เซลล์ในระยะนี้แบ่งออกเป็น 2 ระยะย่อย คือ early perinucleolus stage และ late perinucleolus stage เซลล์ทั้งสอง มีลักษณะที่คล้ายกันแต่ต่างกันที่เซลล์ early perinucleolus stage พบนิวคลีโอลัสมีขนาดไม่เท่ากันและเรียงตัวกระจัดกระจายอยู่ภายในนิวเคลียส แต่ late perinucleolus stage นิวคลีโอลัสมีขนาดใกล้เคียงกันและเรียงตัวชิดขอบด้านในของนิวเคลียส

4. Yolk vesicle stage เซลล์มีขนาด 80-310 ไมโครเมตร ภายในนิวเคลียสมีนิวคลีโอลัส 3-15 อันที่มีขนาดใกล้เคียงกัน เซลล์ไข่ในระยะนี้พบ ovarian follicle ชัดเจน ไซโทพลาซึมติดสีน้ำเงินของฮีมาท็อกไซลีนและอีโอซินไม่สม่ำเสมอ เพราะเซลล์ไข่เริ่มมีการสร้าง yolk vesicle

5. Yolk granule stage เซลล์มีขนาดใหญ่มากขึ้นถึง 150-500 ไมโครเมตร เซลล์มีการสะสม yolk มากขึ้น yolk granule มีขนาด 5-17.5 ไมโครเมตรกระจายเต็มเซลล์ไข่

6. Postovulatory follicle stage เซลล์มีขนาดและรูปร่างไม่แน่นอน ของเขตของเซลล์ไม่ชัดเจนเนื่องจากเซลล์ได้หลุดลอกไป

**พัฒนาการของรังไข่**

Mayer et al. (1988) พบพัฒนาการของรังไข่ปลา Bass, *Dicentrachus labrax* และจำแนกระยะการเจริญของไข่เป็น 7 ระยะ ดังนี้

1. Immature ovary รังไข่มีลักษณะคล้ายเส้นด้ายเล็กสีชมพูแดง ภายในมีช่องว่างมาก มี ovigerous fold ยื่นจากผนังรังไข่เข้าไปใจกลางรังไข่ รังไข่ประกอบด้วย oogonia ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 8-16 ไมโครเมตร โดยทั่วไปพบ oogonia อยู่เป็นกลุ่ม 4-8 เซลล์ใน stroma ของ folding และพบ primary oocyte ทั้ง chromatin nucleolus stage ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 20-35 ไมโครเมตร และ perinucleolus stage เส้นผ่าศูนย์กลาง 30-120 ไมโครเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. Developing virgin หรือ recovering spent ovary รังไข่มีความยาว 1 ใน 3 ของ ventral cavity และมีสีส้มแดง ภายในรังไข่มี oogonia ทั้งที่เป็นเซลล์เดี่ยวและอยู่เป็นกลุ่ม มีช่องว่างระหว่าง ovigerous fold พบ primary oocyte ทุกระยะ โดยเฉพาะ late perinucleolus stage ขนาดของ oocytes มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 60-120 ไมโครเมตร พบ atretic follicle ด้วย

3. Early developing ovary รังไข่มีความยาวเป็นครึ่งหนึ่งของ ventral cavity มีสีส้มแดง มี ovigerous fold อยู่เต็มช่องว่างในรังไข่ ไข่ที่พบส่วนใหญ่เป็นระยะ primary oocytes ที่อยู่ใน late perinucleolus stage นอกจากนี้ยังพบ primary oocytes ที่มีขนาดใหญ่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 110-160 ไมโครเมตร และเริ่มเปลี่ยนแปลงสู่ secondary growth phase และพบ lipid vesicles ขนาดเล็กอยู่ในไซโทพลาซึม นิวเคลียสเริ่มไม่กลมแต่มีลักษณะบิดเบี้ยว

4. Late developing ovary รังไข่ระยะนี้เห็นไข่ชัดเจน ไข่อยู่ในระยะ primary yolk granules มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 260-440 ไมโครเมตร ภายในไข่มี protein yolk granules สะสมอยู่ที่ชั้นนอกของ cortex เห็น zona radiata ชัดเจน ในระยะนี้นิวเคลียสบิดเบี้ยวมากขึ้น

5. Gravid ovary ระยะนี้รังไข่ใหญ่ขึ้น มีความยาว 2 ใน 3 ของ ventral cavity มีสีเหลืองส้มจางๆ ไข่ทึบแสงพบอยู่ในระยะ tertiary yolk granules ขนาด 530-800 ไมโครเมตร พบ protein yolk granules กระจายทั่วไปในชั้น cortex และพบ lipid vesicle ขนาดใหญ่ 10-100 ไมโครเมตร เชื่อมติดกันและเคลื่อนเข้าหาศูนย์กลาง เห็น zona radiata ได้ และชั้น granulosa cell เป็น cuboidal cells หรือ columnar cells

6. Running ovary รังไข่บวมมาก มีทั้งไข่ที่ทึบแสงและใส ขนาดใหญ่มองเห็นได้ชัดเจนภายใต้ผนังรังไข่ที่บางและใส ไข่มีทั้งระยะ tertiary yolk granules ขนาด 530-800 ไมโครเมตร และไข่ระยะใสขนาด 1,100-1,150 ไมโครเมตร

7. Spent ovary รังไข่หลวมมีที่ว่างมากแต่ไม่ถึงกับว่างเปล่า มีสีแดงเข้ม ผนังรังไข่หนามาก ภายในมี ovigerous fold คดงอไม่เป็นระเบียบ พบ atretic follicles ขนาดใหญ่ และ primary oocyte ซึ่งมีทั้ง chromatin nucleolus stage ขนาด 20-35 ไมโครเมตร และ perinucleolus stage ขนาด 30-120 ไมโครเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปิยากร (2546) พบรังไข่ปลาบู่ทราย Sand goby, *Oxyeleotris marmoratus* เป็นแบบ group synchronus oocyte development ภายในรังไข่มีเซลล์ไข่ในระยะต่างๆหลายระยะและมีขนาดไม่เท่ากันทำให้ไข่สุกไม่พร้อมกัน จึงจัดเป็นกลุ่มปลาที่วางไข่ได้มากกว่า 1 ครั้งต่อปี สามารถแบ่งระยะการเจริญและพัฒนาของรังไข่ได้เป็น 5 ระยะ ดังนี้

1. Immature stage รังไข่ในระยะนี้จะพบเซลล์ไข่ในระยะoogonia และ chromatin-nucleolus stage ภายในรังไข่พบ ovogerus fold ยื่นออกจากผนังรังไข่เข้าไปใน lumen แต่ไม่พบการกิ่งก้านของ ovogerus fold ทำให้เห็น lumen เป็นช่องกว้าง ผนังรังไข่ค่อนข้างบางมีความหนาประมาณ 70-200 ไมโครเมตร

2. Early developing stage รังไข่ในระยะนี้พบเซลล์ไข่ใน early perinucleolus stage และ late perinucleolus stageเป็นจำนวนมาก แต่ก็ยังพบเซลล์ไข่ในระยะoogonia และ chromatin-nucleolus stage บ้าง ยังไม่พบกิ่งก้านของovogerus fold ผนังรังไข่หนา 90-200 ไมโครเมตร

3. Late developing stage พบเซลล์ไข่ใน yolk vesicle stage เด่นชัด ผนังรังไข่มีความหนามากขึ้นประมาณ 160-340 ไมโครเมตร ในระยะนี้ ovogerus fold มองเห็นไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากเซลล์ไข่จำนวนมากและมีการขยายขนาดค่อนข้างมาก ยังพบเซลล์ไข่ในระยะ oogonia, chromatin-nucleolus stage, early perinucleous stage และ late perinucleolus stage เจริญรวมอยู่ภายในรังไข่

5. Garvid stage ในระยะนี้พบเซลล์ไข่ใน yolk granule stage เด่นชัด รังไข่ในระยะนี้มองไม่เห็นผนังของ ovogerous fold เนื่องจากเซลล์ไข่มีขนาดใหญ่มากและพร้อมที่จะวางไข่ ผนังของรังไข่มีความหนาถึง 200-340 ไมโครเมตร

6. Spent stage เป็นระยะภายหลังจากปลาวางไข่ จึงพบเซลล์ไข่ในระยะหลังวางไข่เด่นชัดที่สุด และพบเซลล์ไข่ใน chromatin-nucleolus stage และ perinucleolus stage ร่วมด้วย ผนังรังไข่มีความหนาเพียง 140-200 ไมโครเมตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# อุปกรณ์และวิธีการ

**วิธีการ**

1. การเก็บตัวอย่างพ่อแม่ปลาการ์ตูนอานม้าจากธรรมชาติที่พบว่าโตเต็มวัยมีขนาดโดยเฉลี่ย 10 เซนติเมตรขึ้นไป จำนวน 60 ตัว จากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกบริเวณหมู่เกาะแสมสารจังหวัดชลบุรี หมู่เกาะมันและเกาะทะลุจังหวัดระยอง เกาะง่ามและเกาะหมากจังหวัดตราด นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการการเพาะเลี้ยงที่สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา โดยมีการจัดสิ่งแวดล้อมในตู้เลี้ยงให้มีเหมือนกับธรรมชาติมากที่สุด อุณหภูมิในการเลี้ยงที่ 25-28 องศาเซลเซียส ความเค็มที่ 30-32 ppt. ควบคุมค่าแอมโมเนียที่ 0.02 ppm. ค่าไนไตรท์ที่ 0.01 ppm. ค่าไนเตรทที่ 10 ppm. ตู้เลี้ยงขนาด 30x60x40 ลิตร พื้นตู้ปูด้วยพื้นทรายผสมกับหินเกล็ดละเอียดและซากปะการังที่หักพัง และจัดวางแผ่นกระเบื้องปูพื้น เปลือกหอยมือเสือ ท่อพีวีซี เพื่อให้แม่ปลาใช้ในการวางไข่ ใส่ดอกไม้ทะเล *Heteractis crispa* Ehrenberg(1983) หรือดอกไม้ทะเล *Stichodactyle haddon* Saville-kent (1893) ชนิดใดชนิดหนึ่ง เพื่อให้ภายในตู้มีสิ่งแวดล้อมเหมือนกับธรรมชาติมากที่สุด ทำการเลี้ยงเพื่อให้ปลามีการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ และสามารถสืบพันธุ์ในที่กักขังได้

2. เฝ้าสังเกตและติดตามพฤติกรรมการอยู่ร่วมกัน การจับคู่ของพ่อแม่พันธุ์ การจัดเตรียมรังเพื่อวางไข่ พฤติกรรมการวางไข่ การดูแลไข่จนกระทั่งฟัก โดยใช้การเฝ้าสังเกตและจดบันทึก

3. การเพาะเลี้ยงและการอนุบาลลูกปลาการ์ตูนอานม้า เมื่อลูกปลาฟักออกจากไข่ต้องแยกพ่อแม่ออกทันที เพื่อป้องกันแม่ปลากินลูกปลา อาหารที่ใช้เลี้ยงลูกปลาวัยอ่อน ในช่วงแรกจะใช้อาหารที่มีชีวิต ได้แก่ โรติเฟอร์และอาร์ทีเมีย เมื่อลูกปลามีขนาดใหญ่ขึ้นจะปรับเปลี่ยนจากอาหารที่มีชีวิตไปเป็นอาหารที่ไม่มีชีวิตได้แก่ไข่ตุ๋น เนื้อหอยลายหรือเนื้อกุ้งสับละเอียด การเปลี่ยนอาหารจะพิจารณาจากขนาดของปากลูกปลาเป็นหลัก ใน 1 วันให้อาหาร 2 ครั้ง คือเช้าและเย็น และต้องกำจัดเศษอาหารที่เหลือในตู้เลี้ยงทุกครั้ง ลูกปลาตั้งแต่ฟักจนกระทั่งมีอายุ 2 เดือนจะเลี้ยงในระบบเปิด คือต้องมีการเปลี่ยนน้ำในตู้เลี้ยง 10-25 เปอร์เซ็นต์ทุกวันขึ้นกับความหนาแน่นและขนาดของลูกปลา สำหรับลูกปลาที่มีอายุตั้งแต่ 2 เดือนขึ้นไปจะเลี้ยงในระบบปิด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ที่มีการหมุนเวียนน้ำผ่านระบบกรองภายในตู้ โดยเปลี่ยนน้ำทุกเดือนและเปลี่ยนทั้งระบบพร้อมทั้งทำความสะอาดระบบกรองทุกครั้ง

4. ศึกษาการเจริญและพัฒนาการของไข่ปลา ตัวอย่างที่ใช้ศึกษาคือไข่ปลาการ์ตูนอานม้าภายหลังจากปฏิสนธิจนกระทั่งฟักออกเป็นลูกปลาวัยอ่อน เก็บตัวอย่างทุกระยะที่พบการเปลี่ยนแปลง โดยนำตัวอย่างที่ต้องการศึกษาทำให้คงสภาพในน้ำยาคงสภาพ 10% neutral buffered formalin solution 30 นาที จึงเปลี่ยนเป็น 70% ethyl alcohol นำตัวอย่างที่ได้ไปศึกษาการเจริญและพัฒนาการด้วยกล้องสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา บันทึกผลและถ่ายภาพ

5. ศึกษาการเจริญและพัฒนาการของลูกปลาวัยอ่อน โดยเก็บตัวอย่างลูกปลาวัยอ่อนทันทีที่ฟักออกจากไข่และลูกปลาที่มีอายุ1-30 วัน โดยเก็บตัวอย่างทุกวัน นำตัวอย่างที่ต้องการศึกษาทำให้คงสภาพในน้ำยาคงสภาพ 10% neutral buffered formalin solution 1-24 ชั่วโมง เวลาที่ใช้ขึ้นกับขนาดของตัวอย่าง จึงเปลี่ยนเป็น 70% ethyl alcohol นำตัวอย่างที่ได้ไปศึกษาการเจริญและพัฒนาการด้วยกล้องสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา บันทึกผลและถ่ายภาพ

6. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยวิธีการดองใส (อุทัยวรรณ 2536 ; Taylor, 1976) นำลูกปลาวัยอ่อนทันทีที่ฟักออกจากไข่จนกระทั่งพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงจากกระดูกอ่อนไปเป็นกระดูก โดยนำตัวอย่างที่ต้องการศึกษาทำให้คงสภาพในน้ำยาคงสภาพ 10% neutral buffered formalin ระยะเวลาที่ใช้ขึ้นกับขนาดของตัวอย่าง ล้างด้วยน้ำประปาหลายๆครั้ง แล้วนำไปฟอกสีให้ขาวและย่อยกล้ามเนื้อออกด้วย 3% hydrogen peroxideในอัตรา 9 ส่วนต่อ 2% potassium hydroxide 1 ส่วน จนกระทั่งตัวอย่างขาวใสเห็นกระดูกสันหลังชัดเจน จากนั้นนำไปย้อมสีกระดูกอ่อน ด้วย alcian blue และย้อมสีกระดูกด้วย alizarin red S เวลาที่ใช้ขึ้นกับอายุและขนาดของตัวอย่าง สังเกตได้จากการติดสีของกระดูกสันหลัง และแช่ใน glycerine เพื่อให้ตัวใส โดย Glycerine จะเข้าไปแทนที่กล้ามเนื้อที่ถูกย่อยสลายไป ในขั้นตอนนี้ แช่ใน 0.5% potassium hydroxide ต่อ glycerine ในอัตราส่วน 3:1, 1:1, 1:3 และแช่ pure glycerine ครั้งละ 1-2 วันจนตัวอย่างใส จากนั้นเก็บตัวอย่างโดยแช่ใน pure glycerine ใส่ thymol 1-2 เกล็ดเพื่อป้องกันเชื้อราและแบคทีเรีย ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระดูกด้วยกล้องสเตอริโอและกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา บันทึกผลและถ่ายภาพ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

7. ศึกษาลักษณะทางมิญชวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ ด้วยวิธีการทางพาราฟินเทคนิค เนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ของลูกปลาที่เลี้ยงได้จากห้องปฏิบัติการ ตั้งแต่อายุ 1 เดือนจนกระทั่งโตเต็มวัยสามารถวางไข่ได้ วิธีการตัดเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ในปลาที่มีขนาดเล็กกว่า 4 เซนติเมตรจะใช้ปลาทั้งตัวแช่ในน้ำยาคงสภาพ Bouin's solution นาน 24-48 ชั่วโมงจึงนำไปกำจัดแคลเซี่ยมด้วย formic acid-sodium citrate method ในปลาที่มีขนาดใหญ่สามารถเห็นเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ชัด ให้ตัดเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ขนาด 0.5 เซนติเมตรและนำไปแช่ในน้ำยาคงสภาพ Bouin's solution นาน 24-48 ชั่วโมง จากนั้นล้างตัวอย่างด้วย 70% ethyl alcohol หลายๆครั้งจนกระทั่งไม่มีสี แล้วนำไปผ่านขั้นตอนทางพาราฟินเทคนิค ตัด serial sections ด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome) หนา 5-6 ไมโครเมตร นำไปติดบนสไลด์ที่ทาด้วย egg-albumin ย้อมสี Harris hematoxylin and eosin และ Masson's trichrome (Aniline blue) (Luna, 1960) ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา บันทึกผลและถ่ายภาพ

8. ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope)(TEM) ตัดเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้าโตเต็มวัยจากธรรมชาติและจากที่เลี้ยงในห้องปฏิบัติการ เก็บรักษาไว้ในน้ำยาคงสภาพขั้นที่1(primary fixation) คือ 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4 นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปล้างด้วย 01. M cacodylate buffer 3 ครั้งๆละ 15 นาที และแช่ในน้ำยาคงสภาพขั้นที่2 (secondary fixation) คือ 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M cacodylate buffer นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย cacodylate buffer 3 ครั้งๆละ 15 นาที จากนั้น นำไปผ่านกระบวนการขจัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อ กระบวนการ infiltrationและกระบวนการ embedding (Bozzola and Russell, 1992) นำชิ้นตัวอย่างฝังใน embedding mold ที่มี pure Epon 812 mixture แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60-70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1-3 วัน เมื่อพลาสติกแข็งตัวเก็บรักษาใน desiccator เพื่อป้องกันความชื้น นำ plastic block ที่ได้ไปทำ rough trimming แล้วตัด semithin section หนา0.5-1 ไมโครเมตร ด้วย ultramicrotome นำ section ที่ได้ติดบนสไลด์ย้อมด้วยสี toluidene blue นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเพื่อหาบริเวณที่ต้องการ จากนั้นนำ plastic block ไปทำ fine trimming แล้วตัด ultrathin section และนำ section ที่ตัดได้วางบน copper grid แล้วย้อมด้วย uranyl acetate และ lead citrate ตามลำดับ ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน บันทึกผลและถ่ายภาพ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

## สถานที่และระยะเวลาในการทำวิจัย

### สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงและอนุบาลลูกปลาวัยอ่อน ห้องปฏิบัติการทางมิญชวิทยาและสรีระวิทยา สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จังหวัดชลบุรี

ห้องปฏิบัติการทางมิญชเคมี ภาควิชาสัตววิทยาและศูนย์ปฏิบัติการวิจัยกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน กรุงเทพมหานคร

### ระยะเวลาที่ทำการวิจัย

ตั้งแต่ เดือนมกราคม พ.ศ. 2545 ถึง เดือน ธันวาคม พ.ศ. 2547

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# ผลการทดลอง

จากผลการสำรวจการแพร่กระจายของปลาการ์ตูนอานม้าหรือปลาการ์ตูนดำแดงหลังอาน โดยการเก็บตัวอย่างปลาบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก พบปลาการ์ตูนอานม้าที่จับได้ส่วนมากมาจากบริเวณหมู่เกาะแสมสารจังหวัดชลบุรี หมู่เกาะมันและเกาะทะลุจังหวัดระยอง เกาะง่ามและเกาะหมากจังหวัดตราด ลักษณะทั่วไปของปลาการ์ตูนอานม้าที่พบในประเทศไทย ลำตัวมีสีน้ำตาลอมดำหรือดำ ส่วนหัว ส่วนอกและครีบอกมีสีส้มอมเหลือง มีแถบขาว 2 แถบ แถบแรกพาดบนบริเวณส่วนหัวหลังดวงตา อีกแถบพาดบริเวณส่วนหลังของลำตัวเป็นแถบโค้งพาดเฉียงขึ้นไปถึงครีบหลัง ครีบหางมีสีดำและตัดขอบด้วยสีขาว ส่วนที่เป็นแถบสีดำจะเรียวเล็กลงไปจนถึงขอบของปลายหาง สีของลำตัวสามารถปรับให้เข้มหรือจางได้ตามสิ่งแวดล้อมที่อาศัย ปลาการ์ตูนอานม้าชอบอาศัยอยู่ตามพื้นทรายใกล้ๆแนวปะการัง และอาศัยร่วมกับดอกไม้ทะเล *Heteractis crispa* และ *Stichodactyla haddon* ในระดับความลึก 2-30 เมตรหรือ 6.6-100 ฟุต อุณหภูมิ 25-28 องศาเซลเซียส พ่อแม่ปลาที่ได้จากธรรมชาติที่โตเต็มวัยมีขนาดโดยเฉลี่ย 10 เซนติเมตรขึ้นไป

## พฤติกรรมการสืบพันธุ์และวางไข่

การศึกษาพัฒนาการของเอมบริโอในปลาการ์ตูนอานม้า จำเป็นต้องติดตามพฤติกรรมร่วมกับการวางไข่ด้วยเพื่อให้ได้ตัวอย่างของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิทันที จากการศึกษาพฤติกรรมการวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้าในห้องปฏิบัติการ (ภาพที่ 1-6) พบว่าเมื่อแม่ปลาพร้อมวางไข่บริเวณท้องจะเป่งนูนใหญ่กว่าปกติและมี urogenital papilla รูปกรวยสีแดงจางๆยื่นออกจากช่องเพศยาว 4-5 มิลลิเมตร ส่วนในปลาเพศผู้จะมี urogenital duct สีขาวขนาดเล็กยื่นออกจากช่องเพศยาว 2 มิลลิเมตร ขณะวางไข่ตัวเมียจะว่ายชิดกับวัสดุที่จะวางไข่เพื่อให้ urogenital papilla สัมผัสกับวัสดุวางไข่ เมื่อไข่ถูกปล่อยออกมาขั้วด้านล่างของไข่จะมีเยื่อเหนียวใส (stalk) ยึดติดกับวัสดุอย่างเหนียวแน่นทันที (ภาพที่ 3) เมื่อตัวเมียปล่อยไข่ได้จำนวนหนึ่ง ตัวผู้ซึ่งว่ายตามติดตัวเมียตลอดเวลาก็จะปล่อยน้ำเชื้อผสมทันที (ภาพที่ 4) ทำเช่นนี้สลับไปมาจนกระทั่งสิ้นสุดการวางไข่ (ภาพที่ 5) ในการวางไข่ใช้เวลาประมาณ 40-120 นาที จำนวนไข่ที่วางประมาณ 400-1,800 ฟองขึ้นอยู่กับอายุ ขนาดและความสมบูรณ์ของพ่อและแม่ปลา ปลาการ์ตูนอานม้าวางไข่ในช่วงเวลา 13.00-17.00 นาฬิกา และใช้เวลา 6-7 วันจึงฟักออกมา ไข่ปลาฟักในช่วงเวลา

19.00-21.00 นาฬิกาเสมอ ปลาการ์ตูนอานม้าวางไข่สม่ำเสมอตลอดทั้งปีถ้าหากไม่มีสิ่งเร้าภายนอกรบกวนหรือทำให้เกิดความเครียด พ่อปลาและแม่ปลามีพฤติกรรมในการเฝ้าดูแลเอมบริโอจนกระทั่งฟัก (ภาพที่ 6-7)

**ลักษณะไข่ปลาการ์ตูนอานม้า**

ไข่ปลาการ์ตูนอานม้าเป็นไข่ประเภทไข่จมติดกับวัสดุที่ใช้วางไข่ (adhesive egg) รูปร่างรีปลายมนทั้งสองข้าง มีแคปซูลใสหุ้ม ขั้วด้านหนึ่งของแคปซูลมีเยื่อเหนียวใสใช้ยึดติดกับวัสดุ ไข่มีขนาดความยาวประมาณ 2.1 มิลลิเมตร กว้าง 0.9 มิลลิเมตร (ภาพที่ 10) ไข่ที่วางใหม่ๆมีสีส้มอ่อนและสีเข้มขึ้นเมื่ออายุของไข่มากขึ้น ภายหลังการปฏิสนธิมีการสร้างเมือกเหนียวห่อหุ้มไข่และเกาะติดกับก้อนกรวดหรือก้อนหิน สารเหนียวที่ใช้หุ้มไข่นั้นมีความเหนียวมากทำให้ไม่สามารถเคลื่อนย้ายไข่หรือขูดไข่ออกได้ เพราะจะทำให้ไข่แตกได้ง่าย

**การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ**

ลำดับขั้นการเจริญและพัฒนาของไข่ปลาการ์ตูนอานม้าที่ทำการศึกษาครั้งนี้แบ่งออกเป็น 26 ระยะ ดังนี้

1. ระยะ 1 เซลล์ ที่ 0 ชั่วโมง (ภาพที่ 10 ) เริ่มปฏิสนธิ (just fertilization egg or zygote) ในระยะนี้ยังไม่มีการแบ่งเซลล์ ขั้วไข่ด้านล่างที่มีเยื่อเหนียวยึดติดกับวัสดุที่วางไข่คือด้าน animal pole ซึ่งเป็นด้านที่จะมีการแบ่งเซลล์และมีลักษณะเป็นรูปครึ่งวงกลม ไซโทพลาซึมของไข่ที่เริ่มปฏิสนธิจะใส ด้าน vegetal poleพบไข่แดงจำนวนมากและพบหยดไขมัน หลายขนาดกระจายทั่วไปในไข่แดง

2. ระยะ 2 เซลล์ ที่ 1 ชั่วโมง (ภาพที่ 11) ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสครั้งที่ 1 เป็นการแบ่งแบบ meroblastic เนื่องจากไข่ปลามีไข่แดงมาก (polylecithal egg) จึงมีการแบ่งเซลล์เฉพาะด้าน animal pole เท่านั้น ในระยะนี้ได้ 2 เซลล์รูปครึ่งวงกลมขนาดเท่ากัน แต่ละเซลล์เรียกว่า blastomere ซึ่งมีขนาดเล็กลงเป็นครึ่งหนึ่งของระยะ1เซลล์ เซลล์มีไซโทพลาซึม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ใส ส่วนของไข่แดงยังคงพบหยดไขมันจำนวนมากกระจายอยู่และบางส่วนเคลื่อนที่ไปอยู่ด้าน vegetal pole

3. ระยะ 4 เซลล์ ที่ 1 ชั่วโมง 40 นาที (ภาพที่ 12) เอมบริโอแบ่งตัวครั้งที่ 2 โดยแบ่งในแนวตั้งฉากกับการแบ่งครั้งแรก ทำให้ได้ blastomeres 4 เซลล์ขนาดเท่ากันและขนาดของเซลล์เล็กลงเป็นครึ่งหนึ่งของระยะ 2 เซลล์ ยังคงพบหยดไขมันขนาดเล็กกระจายอยู่ในส่วนของไข่แดง

4. ระยะ 8 เซลล์ ที่ 2 ชั่วโมง (ภาพที่ 13) เอมบริโอแบ่งตัวครั้งที่ 3 ตามยาว ทำให้ได้ blastomeres 8 เซลล์ขนาดเท่าๆกัน ทำให้เซลล์ที่ได้มีรูปร่างยาว

5. ระยะ 16 เซลล์ ที่ 4 ชั่วโมง (ภาพที่ 14) เอมบริโอแบ่งตัวครั้งที่ 4 ตามยาว ได้ blastomeres เพิ่มเป็น 16 เซลล์ขนาดเท่าๆกัน

6. ระยะ 32 เซลล์ ที่ 4 ชั่วโมง 30 นาที (ภาพที่ 15) เอมบริโอแบ่งตัวครั้งที่ 5 ทำให้ได้ blastomeres เพิ่มเป็น 32 เซลล์ขนาดเท่าๆกันและเห็นเซลล์เรียงซ้อนกันชัดเจน

7. ระยะ 64 เซลล์ ที่ 5 ชั่วโมง (ภาพที่ 16) เอมบริโอแบ่งตัวครั้งที่ 6 ทำให้ได้ blastomeres เพิ่มเป็น 64 เซลล์ขนาดเท่าๆกัน เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้น กลุ่มเซลล์ที่แบ่งก็แผ่ขยายออกด้านข้างมากขึ้น ทำให้มองเห็นมีลักษณะเหมือนจาน จึงเรียกกลุ่มเซลล์เหล่านี้ว่า blastoderm หรือ blastodisc

8. ระยะ 128 เซลล์ ที่ 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 17) เอมบริโอแบ่งตัวครั้งที่ 8 ทำให้ได้ blastomeres เพิ่มเป็น 128 เซลล์ขนาดเท่าๆกัน ขนาดของเซลล์มีขนาดเล็กลงมาก

9. ระยะ 256 เซลล์ ที่ 8 ชั่วโมง (ภาพที่ 18) เอมบริโอแบ่งตัวครั้งที่ 9 ทำให้ได้เซลล์ blastomeres เพิ่มเป็น 256 เซลล์ขนาดเท่าๆกันเซลล์ที่พบมีขนาดเล็กมาก ไม่สามารถนับจำนวนได้ชัดเจน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

10. ระยะ morula ที่ 9 ชั่วโมง (ภาพที่ 19) เอมบริโอแบ่งตัวหลายครั้ง ทำให้ blastomeres เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมากและเซลล์มีขนาดเล็กมาก อยู่รวมกันคล้ายผลน้อยหน่า เรียกระยะนี้ว่า morula ซึ่งเป็นตอนปลายของระยะ cleavage

11. ระยะ blastula ที่ 18 ชั่วโมง 34 นาที (ภาพที่ 20) พบ blastoderm หรือ blastodisc ยกตัวสูงขึ้นทำให้เกิดช่องว่างเรียกว่า blastocoel แยก blastomeres ออกจากส่วนของไข่แดงอย่างชัดเจน

12. ระยะ gastrula ที่ 21 ชั่วโมง 4 นาที (ภาพที่ 21) กลุ่ม blastomeres มีการขยายตัวลงมาปกคลุมบางส่วนของไข่แดง ลักษณะเช่นนี้เรียกว่าการเกิด epiboly และมีการม้วนตัวของ blastomeres เข้าด้านใน ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อชั้นต่างๆขึ้น

13. ระยะ early neurula ที่ 27 ชั่วโมง 30 นาที (ภาพที่ 22) ระยะนี้พบ nerve cord ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อชั้นนอกสุดที่ยกตัวสูงขึ้น เนื่องจากการม้วนตัวของ blastomeres เข้าด้านในและดันให้เนื้อเยื่อชั้นนอกสุดเกิดการยกตัว มีลักษณะเป็นสันนูนยาววางขนานและติดกับส่วนของไข่แดงตามความยาวของแคปซูล

14. ระยะ late neurula ที่ 30 ชั่วโมง (ภาพที่ 23) พบ neural tube ซึ่งมีลักษณะเป็นท่อขนาดใหญ่ยาววางขนานและติดกับส่วนของไข่แดง neural tube ต่อไปจะพัฒนาไปเป็นส่วนสมองและไขสันหลัง แต่ไม่สามารถแยกส่วนหัวกับส่วนลำตัวได้ชัดเจน ในระยะนี้พบ vacuoles ในเอมบริโอ

15. ระยะที่ 34 ชั่วโมง (ภาพที่ 24) ระยะนี้สามารถแยกส่วนหัวกับลำตัวออกจากกันได้อย่างชัดเจนโดยส่วนหัวจะสังเกตได้จากการเกิดปุ่มนูน 2 ข้างที่พัฒนาไปเป็นตา และด้านหน้าของส่วนหัวพบช่องปาก ส่วนที่เป็นลำตัวมีลักษณะใส ไม่พบกล้ามเนื้อ

16. ระยะที่ 42 ชั่วโมง (ภาพที่ 25) เกิดการหมุนตัวกลับของเอมบริโอ ทำให้ส่วนหัวซึ่งอยู่ด้าน animal pole หมุนกลับไปด้าน vegetal pole และพบว่าเอมบริโอมีการพัฒนาและขยายขนาดมากขึ้น แต่ลำตัวยังคงติดกับส่วนของไข่แดง เริ่มพบเลนส์ตา ปุ่มหางและเซลล์สารสี

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

(pigment cell) จำนวนเล็กน้อยที่บริเวณส่วนหัวและบางส่วนของผิวไข่แดง เซลล์สารสีที่พบไม่สามารถจำแนกชนิดได้

17. ระยะที่ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 26) เอมบริโอมีการหมุนตัวกลับอย่างสมบูรณ์ ลำตัวใสมีขนาดใหญ่และยาวขึ้น ส่วนของลำตัวยังคงติดกับไข่แดงแต่ปลายหางแยกออก ลักษณะเด่นในระยะนี้คือเริ่มพบการเต้นของหัวใจและพบกล้ามเนื้อตามลำตัว ส่วนหัวพบเซลล์สารสีมากขึ้น

18. ระยะที่ 55 ชั่วโมง (ภาพที่ 27) พบก้อนหินปูนในกระดูกหูส่วนใน (otolith) มีขนาดเล็ก พบครีบอ่อนยาวต่อเนื่องกันและขนานไปกับลำตัว บริเวณปลายหางเริ่มเคลื่อนไหว

19. ระยะที่ 64 ชั่วโมง (ภาพที่ 28 ) เอมบริโอมีขนาดใหญ่ขึ้น ไข่แดงมีขนาดเล็กลง ส่วนหัวและส่วนลำตัวแยกจากกันอย่างชัดเจน บริเวณส่วนหัวพบลูกตามีขนาดใหญ่และมีสีน้ำตาลเข้ม แยกเบ้าตากับเลนส์ตาได้ชัดเจน สมองแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่ forebrain, midbrain และhindbrain พบเซลล์สารสีเพิ่มมากขึ้นที่บริเวณส่วนหัวและส่วนหางเริ่มพบเซลล์สารสีเพียงเล็กน้อย บริเวณลำตัวมองเห็นแนวกระดูกสันหลังไม่ชัดเจนนักแต่พบเซลล์เม็ดเลือดอยู่ภายในแสดงว่าเมื่อหัวใจเต้นมีการสูบฉีดเลือดไปเลี้ยงร่างกาย

20. ระยะที่ 75 ชั่วโมง 30 นาที (ภาพที่ 29) เอมบริโอเจริญเติบโตมากขึ้น ทำให้ส่วนหัวและลำตัวมีขนาดใหญ่ มองเห็นสมองแบ่งเป็น 3 ส่วนชัดเจนขึ้น พบหัวใจ และotolith ชัดขึ้น และเกิดปุ่มนูนซึ่งจะพัฒนาไปเป็นครีบหู นอกจากนี้ยังพบพบเซลล์เม็ดเลือดและกล้ามเนื้อส่วนลำตัวชัดเจนขึ้น ลูกตาขยายใหญ่และมีสีเข้มมากขึ้น เห็นครีบอ่อนซึ่งยาวต่อเนื่องกันและขนานไปกับลำตัวชัดเจนมากขึ้น ผนังช่องท้องขยายปกคลุมส่วนของไข่แดงมากขึ้น

21. ระยะที่ 93 ชั่วโมง (ภาพที่ 30) ส่วนหัวมีขนาดใหญ่ ดวงตาใหญ่และมีสีน้ำตาลเข้ม สมองทั้ง 3 ส่วนเชื่อมต่อกัน พบเซลล์สารสีกระจายตลอดทั่วลำตัวเป็นจำนวนมาก

22. ระยะที่ 97 ชั่วโมง (ภาพที่ 31) เอมบริโอมีขนาดใหญ่ขยายจนเต็มแคปซูล ครีบหูมีขนาดใหญ่ขึ้น และพบว่ามีการหมุนและขยับตัวไปมาบ่อยครั้งขึ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

23. ระยะที่ 109 ชั่วโมง (ภาพที่ 32) เป็นระยะใกล้ฟัก พบว่าส่วนหัวและลำตัวของเอมบริโอขยายเต็มแคปซูล ส่วนของไข่แดงมีขนาดเล็กลง เซลล์สารสีที่พบตลอดทั่วลำตัวมีสีเข้มและมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น พบผนังช่องท้องปกคลุมส่วนของไข่แดงจนหมด

24. ระยะที่ 119 ชั่วโมง (ภาพที่ 33) ระยะนี้ส่วนของไข่แดงลดขนาดลงมาก ขนาดของส่วนหัวมีขนาดเป็นหนึ่งในสามของแคปซูล สังเกตได้ว่าภายในแคปซูลหนาแน่นมากเนื่องจากเอมบริโอมีขนาดใหญ่จนเต็มแคปซูลและเอมบริโอก็มีการเคลื่อนไหวโดยการหมุนตัวไปมามากขึ้น

25. ระยะที่ 127 ชั่วโมง (ภาพที่ 34A, 34B) เป็นระยะเริ่มฟักออกจากแคปซูล โดยเอมบริโอพยายามบิดและโยกลำตัวไปมาเพื่อให้แคปซูลขยายและแตกออกพร้อมกับดันตัวออกมา ในปลาการ์ตูนอานม้าการฉีกขาดของแคปซูลมักพบบริเวณครึ่งท้ายของแคปซูลด้านที่มีเยื่อเหนียวที่ใช้ยึดไข่กับวัสดุที่วางไข่เนื่องจากบริเวณนี้เป็นตำแหน่งของส่วนลำตัวและส่วนหางซึ่งมีแรงดันที่ทำให้แคปซูลฉีกขาดได้ง่าย

26. ระยะที่ 148 ชั่วโมง (ภาพที่ 35) ทันทีที่หลุดออกจากแคปซูล ลูกปลาวัยอ่อนสามารถอ้าและขยับปากได้ และพบส่วนของครีบหลัง ครีบหาง ครีบก้นเชื่อมต่อกันเป็นแนวยาว นอกจากนี้ยังพบครีบหูแต่ไม่พบครีบท้อง ส่วนของไข่แดงมีขนาดเล็กลงมาก พบช่องเปิดของระบบขับถ่าย

**<u>การเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อนภายหลังการฟัก</u>**

ลำดับขั้นการเจริญและพัฒนาของลูกปลาการ์ตูนอานม้าภายหลังการฟักแบ่งการเปลี่ยนแปลงได้ดังนี้

1. ระยะลูกปลาวัยอ่อนฟักออกจากไข่ (ภาพที่ 35) ลูกปลามีขนาด 3.80 มิลลิเมตร เป็นระยะที่ต่อเนื่องจากลูกปลาหลุดออกจากแคปซูลของไข่ได้หมดทุกฟอง โดยเฉลี่ยจะใช้เวลาฟักทั้งหมดประมาณ 3-4 ชั่วโมง จากการเฝ้าสังเกตการฟักออกจากไข่ของลูกปลาการ์ตูนอานม้า พบว่าเริ่มฟักในช่วงเวลาโดยเฉลี่ยประมาณ 18.00 นาฬิกาและเสร็จสิ้นประมาณ 22.00 นาฬิกา ลูกปลาการ์ตูนอานม้าทันทีที่ฟักช่องปากสามารถขยับเปิดปิดได้ และในระยะนี้พบ fin ray ของ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แผงครีบหลัง ครีบหาง ครีบก้นเชื่อมต่อกันเป็นแนวยาว พบปุ่มครีบหูแต่ไม่พบครีบท้อง พบแกนกระดูกสันหลังชัดเจน ผนังลำตัวบริเวณช่องท้องกับถุงไข่แดงแยกออกจากกันได้ไม่ชัดเจนนัก พบท่อเปิดทวารเป็นท่อขนาดใหญ่ยื่นออกนอกร่างกาย พบ otocystic ซึ่งภายในพบ otolith ชัดเจน เซลล์สารสีตามร่างกายมีจำนวนน้อยและไม่ชัดเจนนัก การศึกษาการสร้างกระดูกของลูกปลาระยะนี้ ไม่พบการติดสีฟ้าของ alcian bule และติดสีแดงของ alizarin red S

2. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 1 วัน (ภาพที่ 36) ลูกปลามีขนาด 3.92 มิลลิเมตร ช่องปากเปิดกว้างและขยับได้ดีและบ่อยมากขึ้น ระยะนี้จึงเริ่มให้อาหารแก่ลูกปลาเป็นครั้งแรก เพราะถุงไข่แดงมีขนาดเล็กลง อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงลูกปลาครั้งแรกใช้โรติเฟอร์เพียงอย่างเดียว จากนั้นต้องปรับเปลี่ยนอาหารโดยใช้โรติเฟอร์ผสมกับอาร์ทีเมียเมื่อลูกปลามีขนาดโตขึ้นและในท้ายที่สุดฝึกให้กินอาหารตายจำพวกเนื้อหอยสับผสมวิตามิน การปรับเปลี่ยนอาหารจะเลือกใช้อาหารที่มีขนาดพอเหมาะกับช่องปากของลูกปลา ในระยะนี้เมื่อสามารถแยกผนังช่องท้องแยกออกจากถุงไข่แดงได้ชัดเจนและภายในถุงไข่แดงพบหยดไขมันในตำแหน่งใกล้กับท่อเปิดทวารหนักแต่ไม่ชัดเจนนัก ท่อเปิดทวารหนักยังคงเป็นท่อเปิดขนาด ส่วนของครีบหลัง,ครีบหางและครีบก้นมีแผ่นครีบ(fin ray) เชื่อมต่อกัน บริเวณครีบหูพบก้านครีบชัดเจนแต่ไม่พบแผ่นครีบ ลูกปลาระยะนี้ไม่ว่ายน้ำแต่จะนอนจมที่พื้นตู้หรือเคลื่อนที่ตามแรงพ่นของออกซิเจนของน้ำภายในตู้ บริเวณoccipital พบเซลล์สารสี 2-3 เซลล์ บริเวณ antorbital และแนวแกนกระดูกสันหลังตลอดแนวลำตัวพบเซลล์สารสี 2-3 เซลล์เช่นกันและพบเป็นจำนวนมากที่ผนังช่องท้องด้านใน(internal peritoneal) การสร้างกระดูกเมื่อลูกปลามีอายุ 1 วันพบว่าบริเวณขอบของกะโหลกศีรษะและกระดูกขากรรไกรบนและล่างเท่านั้นที่มีการติดสีฟ้าของ alcian blue แสดงว่ามีการสร้างกระดูกอ่อนขึ้น และพบบริเวณกระดูกริมฝีปาก เพดานปากด้านบนและล่างมีการย้อมติดสีแดงของalizarin red S แสดงว่ามีกระดูกเกิดขึ้น

3. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 2 วัน (ภาพที่ 37) ลูกปลามีขนาด 4.0 มิลลิเมตร ขนาดของส่วนหัวและลำตัวของลูกปลามีความสัมพันธ์กันมากขึ้น เพราะหัวและถุงไข่แดงมีขนาดเล็กลง พบหยดไขมันขนาดใหญ่ขึ้นใกล้ท่อเปิดทวารหนัก แผ่นครีบของครีบหลัง, ครีบหางและครีบก้นยังคงเชื่อมต่อกันเป็นแผงยาวแต่เริ่มพบรอยคอดเพื่อแยกส่วนของครีบทั้งสาม บริเวณด้านหลังในตำแหน่งระหว่างครีบหลังกับครีบหางและบริเวณด้านท้องที่ตำแหน่งครีบก้นกับครีบหาง ครีบหู พบก้านครีบและแผ่นครีบกว้างขนาดใหญ่ชัดเจนขึ้นและทำงานโดยการพัดโปกเพื่อให้ลำตัว

เคลื่อนที่ไปข้างหน้า พบปุ่มของครีบท้อง พบแกนของกระดูกสันหลังยาวไปถึง mediolateral และพบว่าด้านท้ายของแกนกระดูกสันหลังมีลักษณะเป็นปลายแหลมตรง การเกิดกระดูกอ่อนพบมากขึ้นที่บริเวณกะโหลกและที่บริเวณกระดูกซีโครง เนื่องจากมีการติดสีฟ้าของalcial blueเพิ่มขึ้น ที่แผ่นปิดเหงือกและกระดูกขากรรไกรบนและล่างมีมีการติดสีฟ้าลดน้อยลงและเพิ่มการติดสีแดงของ alizarin red S ได้มากขึ้น

4. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 3 วัน (ภาพที่ 38) ลูกปลามีขนาด 4.0 มิลลิเมตร ปริมาณไข่แดงลดลงมากทำให้เห็นเป็นถุงไข่แดงขนาดเล็กวางใกล้กับช่องทวารหนัก จึงทำให้เห็นกระเพาะอาหารได้ชัดเจนขึ้น รอยคอดระหว่างครีบหลังกับครีบหางและครีบก้นกับครีบหางชัดเจนขึ้น ทำให้สามารถแยกส่วนของครีบทั้งสามออกจากกันได้ แต่แผ่นครีบยังคงเชื่อมต่อเป็นแผ่นเดียวกัน เริ่มพบกระดูกก้านครีบหลัง, ครีบก้นและครีบหาง ที่ครีบหูพบก้านครีบแข็งปลายแหลม เห็นซี่ฟันชัดเจนขึ้น ที่บริเวณแกนกระดูกสันหลังพบกระดูกซีโครงชัดเจนขึ้น พบเซลล์สารสีค่อนข้างหนาแน่นบริเวณ occipital, posterbitalและผนังช่องท้องด้านใน ที่บริเวณabdominalและและทวารหนักพบเซลล์สารสีกระจายอยู่ทั่วไป ที่บริเวณกระดูกขากรรไกรบนและล่าง, แผ่นปิดเหงือก, แกนกระดูกสันหลังและกระดูกซีโครงส่วนต้นที่ติดกับแกนกระดูกสันหลังมีการติดสีแดงของ alizarin red S แสดงว่ามีการจับตัวของแคลเซียมเพิ่มมากขึ้นที่บริเวณนี้ ส่วนปลายของกระดูกซี่โครงและแกนกระดูกสันหลังบริเวณปลายหางยังคงติดสีฟ้าของ alcian blue

5. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 4 วัน (ภาพที่ 39) ลูกปลามีขนาด 4.60 มิลลิเมตร ในช่วงนี้ลูกปลาเติบโตอย่างรวดเร็ว พบกล้ามเนื้อลำตัวมีมากขึ้นทำให้มองเห็น otocystic ไม่ชัดเจนนัก พบส่วนของจะงอยปากแยกออกส่วนหัวได้ชัดเจน ท่อเปิดทวารหนักมีขนาดที่เล็กลงแต่ยังคงยื่นออกจากลำตัวปลา ที่mediolateral ของ แกนกระดูกสันหลังยังคงเป็นปลายแหลมแต่ไม่เป็นแนวตรงแต่จะทำมุม 45 องศาขึ้นไปด้าน epural

6. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 5 วัน (ภาพที่ 40) ลูกปลามีขนาด 4.82 มิลลิเมตร ครีบหลังและครีบก้นมีขนาดเล็กลงและมีสัดส่วนสัมพันธ์กับลูกปลามากขึ้น รอยคอดระหว่างครีบหลังกับครีบหางและครีบก้นกับครีบหางสามารถใช้แบ่งแผงครีบทั้งสามออกจากกันได้ชัดเจน ที่แผงครีบหางพบก้านครีบมีลักษณะเป็นแกนยาวชัดเจนแต่ยังไม่พบว่ามีการแบ่งออกเป็นข้อหรือปล้อง ท่อเปิดทวารหนักไม่ยื่นออกจากลำตัวปลาทำให้ด้านท้องดูเรียบขึ้น แผ่นปิดเหงือกและครีบหู

ทำงานสัมพันธ์กันได้ดี พบปุ่มครีบท้องยืดยาวทำให้เห็นเป็นก้านครีบชัดเจนมากขึ้นแต่ไม่สามารถใช้งานได้ ลูกปลาจึงลอยตัวในน้ำได้ไม่ดีนัก ลูกปลายังคงว่ายน้ำโดยไม่สามารถกำหนดทิศทางในการว่ายได้ จึงว่ายน้ำในลักษณะกระตุกและพุ่งตรงไปด้านหน้าเท่านั้น และพบว่ามีการหยุดพักที่ขอบตู้เป็นเวลานานกว่าจะเคลื่อนที่ต่อไปอีกครั้ง พบเซลล์สารสีจำนวนมากบริเวณ occipital, antorbital และบริเวณช่องท้อง ทำให้เกิดเป็นลายจุดตามลำตัวของลูกปลา

7. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 6 วัน (ภาพที่ 41) ลูกปลามีขนาด 5.40 มิลลิเมตร เริ่มพบก้านครีบหลังและครีบก้นแต่ไม่พบส่วนของก้านครีบแข็งปลายแหลม กระดูกก้านครีบหางถูกแบ่งออกเป็นสามข้อ เริ่มพบแผ่นกระดูกขนาดใหญ่สองแผ่นบริเวณ mediolateral ส่วนhypural เท่านั้นแต่พบพบที่ epural

8. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 7 วัน (ภาพที่ 42) ลูกปลามีขนาด 5.6 มิลลิเมตร ที่บริเวณ mediolateral ส่วน hypurals พบแผ่นกระดูกชิ้นเล็กเกิดขึ้นแทรกระหว่างแผ่นกระดูกชิ้นใหญ่สองชิ้นแรกจึงมองเห็นเป็นแผ่นกระดูกสามชิ้นเรียงกัน ส่วน epural เริ่มพบแผ่นกระดูกเพียงแผ่นเดียวเท่านั้น เซลล์สารสีตามลำตัวมีจำนวนมากและพบกระจายอยู่ทั่วไปขึ้นจึงทำให้ลูกปลามีสีเข้มขึ้น พบเส้นกลางตัวชัดเจน ลูกปลาการ์ตูนอานม้าในระยะนี้มีการสร้างกระดูกที่สมบูรณ์ขึ้น โดยพบว่ากระดูกกะโหลก, กระดูกก้านครีบ, กระดูกปลายหางและแกนกระดูกสันหลังมีแคลเซียมมาจับทำให้ย้อมติดสีแดงของalizarin red S ได้ดี บริเวณส่วนที่เป็นกระดูกข้อต้อต่างๆติดสีฟ้าของalcian blue

9. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 8 วัน (ภาพที่ 43) ลูกปลามีขนาด 5.6 มิลลิเมตร พบก้านครีบแข็งปลายแหลมขนาดเล็กที่ครีบหลัง ก้านครีบในทุกครีบจะมีขนาดเพิ่มขึ้น, แข็งแรงขึ้นและพบเห็นได้ชัดเจนขึ้นเมื่อลูกปลามีขนาดใหญ่ขึ้น

10. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 9 วัน (ภาพที่ 44) ลูกปลามีขนาด 6.15 มิลลิเมตร ลำตัวลูกปลายาวขึ้นมาก สังเกตจากครีบหางที่ยาวขึ้น ก้านครีบของกระดูกครีบหางมีจำนวนข้อเพิ่มเป็นสี่ข้อและแบ่งเป็นปล้องได้ประมาณ 5 ปล้องจึงทำให้ปลายหางยาวขึ้นมาก หัวปลามีขนาดเล็กลงและได้สัดส่วนเหมือนกับพ่อแม่มากขึ้น ส่วนครีบท้องยังคงพบเฉพาะก้านครีบที่เด่นชัดส่วนแผ่นครีบยังไม่ชัดเจนนัก เซลล์สารสีที่ส่วนหัวและลำตัวชัดมากขึ้นเรื่อยๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

11. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 10 วัน (ภาพที่ 45) ลูกปลามีขนาด 6.40 มิลลิเมตร ก้านครีบแข็งปลายแหลมที่ครีบหลังยืดยาวชัดเจนขึ้น ก้านครีบของกระดูกหางถูกแบ่งเป็นข้อปล้องมากขึ้น แผงครีบหางแผ่ขยายได้กว้างมาก พบก้านครีบและแผ่นครีบของครีบท้องครบสมบูรณ์แต่ยังทำหน้าที่ได้ไม่ดีนัก สังเกตได้จากการว่ายน้ำและการควบคุมทิศทางในการว่ายได้ไม่ดีนัก เซลล์สารสีกระจายทั่วตัวและมีจำนวนมากมากขึ้น

12. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 13 วัน (ภาพที่ 46 ) ลูกปลามีขนาด 6.75 มิลลิเมตร ครีบท้องสมบูรณ์และทำงานได้ดี ลูกปลาควบคุมทิศทางในการว่ายน้ำได้ดีขึ้น ในระยะนี้กล่าวได้ว่าลูกปลามีรูปร่างเหมือนกับพ่อแม่ทุกประการ ครีบทุกครีบครบสมบูรณ์และทำหน้าที่สัมพันธ์กันเป็นอย่างดี จึงสิ้นสุดระยะลูกปลาวัยอ่อน

13. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 15 วัน (ภาพที่ 47) ลูกปลามีขนาด 7.42 มิลลิเมตร เริ่มพบแถบสีขาวที่บริเวณหลังดวงตาแต่ยังไม่เด่นชัดนัก

14. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 20 วัน (ภาพที่ 48 ) ลูกปลามีขนาด 9.26 มิลลิเมตร แถบสีขาวหลังดวงตาชัดเจนมากขึ้นและพบว่ามีขนาดความกว้างประมาณ 0.6 มิลลิเมตร บริเวณด้านท้ายของครีบหลัง เริ่มพบแถบสีขาวจางๆ

15. ลูกปลาวัยอ่อนอายุ 24- 26 วัน (ภาพที่ 49) ลูกปลามีขนาด 9.50 มิลลิเมตร แถบสีขาวบริเวณด้านท้ายของครีบหลังชัดเจนขึ้น กล่าวได้ว่าลูกปลาในระยะนี้มีแถบสีตามลำตัวชัดเจนเหมือนแถบสีพ่อแม่ปลาทุกประการ

**<u>การเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonadal development) และการเปลี่ยนเพศ (sex inversion) ในลูกปลาการ์ตูนอานม้า</u>**

เมื่อลูกปลาการ์ตูนอานม้าเข้าสู่ระยะ young หรือ juvenile ลูกปลามีรูปร่างเหมือนพ่อแม่และมีการพัฒนาอวัยวะต่างๆให้ทำงานได้ครบสมบูรณ์รวมถึงอวัยวะสืบพันธุ์ ตัวอย่างที่ได้จากการทดลองชุดนี้มี 2 กลุ่มคือ กลุ่มที่ปลามีการจับคู่กันเองก่อนและกลุ่มที่จับคู่ให้ จึงทำการแยกเลี้ยง ในกลุ่มที่มีการจับคู่กันเองพบว่า ลูกปลาที่มีขนาดใหญ่เริ่มแยกตัวออกจากฝูงและจับคู่

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กันเองเมื่ออายุประมาณ 5-6 เดือน มีความยาวโดยเฉลี่ย 42.2 มิลลิเมตร แต่จะทำการแยกเลี้ยงเป็นคู่ๆเมื่อปลามีอายุประมาณ 8 เดือนความยาว 54.3 มิลลิเมตร จากผลการทดลองพบว่าปลาการ์ตูนอานม้าเริ่มวางไข่เป็นครั้งแรกเมื่ออายุ 12 เดือน มีความยาวเฉลี่ย 60.2 มิลลิเมตร ไข่ที่ได้ชุดแรกไม่สมบูรณ์ สังเกตได้จากที่พ่อแม่ปลากัดกินไข่จนหมดภายใน 2-3 วัน หลังวางไข่เสร็จสิ้น หลังจากนั้นแม่ปลาไม่มีการวางไข่อีกเลยจนกระทั่งพ่อแม่ปลามีอายุประมาณ 14 เดือน มีขนาดความยาวเฉลี่ย 66.4 มิลลิเมตร แม่ปลาจึงวางไข่อีกครั้ง การวางไข่ในรอบนี้พบว่าไข่ที่ได้มีความสมบูรณ์มากขึ้น สามารถเจริญเติบโตจนกระทั่งฟักได้ถึง 50 เปอร์เซ็นต์ และการวางไข่ในรอบต่อๆไปของแม่ปลาชุดนี้พบว่ามีอัตราการฟักเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งฟักได้ถึง100 เปอร์เซ็นต์และมีอัตราการรอดเพิ่มขึ้นเช่นกัน

ในกลุ่มปลาที่จับคู่ให้ ทำการแยกเมื่อปลาการ์ตูนอานม้ามีอายุได้ 4 เดือนซึ่งปลายังไม่มีพฤติกรรมในการแยกตัวออกจากฝูงหรือจับคู่ โดยคัดเลือกปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกัน 3 ตัวใส่ลงในตู้เลี้ยงขนาด 30x60x40 ลิตร พบว่าหลังจากการแยกเลี้ยง 1-3 วันปลามีพฤติกรรมไม่ยอมรับกันโดยแยกกันอยู่ตามมุมตู้บ้างหรือบางตัวมีพฤติกรรมก้าวร้าวมีการกัดกันเอง จากนั้น1-2 สัปดาห์ปลามีอายุเฉลี่ย 4 เดือนครึ่งถึง 5 เดือน เริ่มมีพฤติกรรมยอมรับกันมากขึ้น สังเกตจากการว่ายรวมกลุ่มกันและไม่กัดกัน เมื่อปลามีอายุประมาณ 8 เดือนมีขนาดโดยเฉลี่ย 65.7 มิลลิเมตร มีการจับคู่กันอย่างชัดเจนโดยมีพฤติกรรมในการว่ายตามกัน และมีอัตราการเจริญเติบโตค่อนข้างเร็ว เมื่อปลามีอายุประมาณ 14 เดือนมีขนาดเฉลี่ย 88.0 มิลลิเมตร จึงวางไข่เป็นครั้งแรก การวางไข่ของแม่ปลาวัยสาว พบว่าในครอกแรกแม่ปลามักจะกินไข่ของตัวเองประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ไข่อีก 50 เปอร์เซ็นต์ที่เหลือมีความสมบูรณ์และมีอัตราการฟัก 95-100 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นพ่อแม่ปลาจะมีพฤติกรรมในการวางไข่ทุกๆ 14-21 วัน มีอัตราการฟักเพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งฟักได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์และมีอัตราการรอดและการเจริญเติบโตได้ดีเพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน

**<u>การเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาการ์ตูนอานม้า</u>**

ปลาการ์ตูนอานม้าเป็นปลาที่เป็นแบบกะเทยชนิด protandrous hermaphrodite ในระยะแรกของการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ เมื่อลูกปลาการ์ตูนอานม้าอายุ 1 เดือน เริ่มพบ primordial germ cells (ภาพที่ 51 ) อยู่รวมกันเป็นกลุ่มประมาณ 8-15 เซลล์ พบจำนวน 3-4 กลุ่มอยู่ใกล้ๆกัน แต่ละกลุ่มจะมีเนื้อเยื่อประสานบางๆห่อหุ้มและยึดติดกับผนังด้านบนของ

abdominal cavity ทั้ง 2 ข้าง (ภาพที่ 50) primordial germ cells ที่พบเป็นเซลล์รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ มีขนาดประมาณ 6.1 ไมโครเมตร ไซโทพลาซึมใสและมีจำนวนน้อย อวัยวะสืบพันธุ์ในระยะนี้ยังไม่สามารถแยกเพศว่าเป็นเพศผู้หรือเพศเมียได้จึงจัดอยู่ในระยะ indifferent gonads

เมื่อลูกปลามีอายุประมาณ 2-3 เดือน อวัยวะสืบพันธุ์ทั้ง 2 ข้างมีลักษณะเป็นสายยาวคล้ายริบบิ้น เรียกว่า ribbon-like gonads หรือ gonadal lamellae พบที่บริเวณช่องว่างภายในลำตัว(coelomic cavity) และวางขนานไปกับส่วนของลำไส้เล็ก (ภาพที่ 52, 54 ) ภายในอวัยวะสืบพันธุ์พบเซลล์สืบพันธุ์หลายๆระยะทั้งของเพศผู้และของเพศเมีย ได้แก่ spermatogonia, oogonia, primary spermatocytes และ primary oocytes ในระยะ chromatin-nucleolus stage oocyte (ภาพที่ 53, 55 ) spermatogonia เป็นเซลล์รูปร่างกลม มีขนาดประมาณ 6.4 ไมโครเมตร นิวเคลียสกลม เห็นไซโทพลาซึมชัดเจน spermatogonia จะถูกล้อมรอบด้วย somatic cells หรือsupporting cells สำหรับprimary spermatocytes มีขนาดประมาณ 5.6 ไมโครเมตร พบเป็นจำนวนมากและพบว่าเซลล์อยู่ในระยะ prophase I ของการแบ่งเซลล์ เซลล์สืบพันธุ์จำนวนมากเหล่านี้มีการรวมกลุ่มกันเป็น spermatocyst แทรกกระจายอยู่ใน stromal tissue เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียพบ oogonia มีขนาดประมาณ 10.7 ไมโครเมตร เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ เห็น nucleoli สำหรับprimary oocytes แยกความแตกต่างจาก oogonia ได้เนื่องจากเซลล์มีขนาดใหญ่และไซโทพลาซึมติดสีย้อมชัด ปริมาณของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีจำนวนใกล้เคียงกัน

กระบวนการ spermatogenesis เริ่มพบครั้งแรกเมื่อลูกปลามีอายุประมาณ 4 เดือน (ภาพที่ 56-57 ) พื้นที่ของอวัยวะสืบพันธุ์ในส่วนที่เป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้พบ spermatogenic cells ทุกระยะ ได้แก่spermatogonia, primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatids และ spermatozoa. พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ใน spermatocyst เป็นชนิด group synchronous ในปลาการ์ตูนอายุ 4 เดือน พื้นที่ของ female germ cells ประกอบไปด้วย oogonia, primary oocytes ในระยะ chromatin-nucleolus stage oocyte และ perinucleolus stage oocyte แต่ไม่พบช่องว่างภายในรังไข่ (ovarian cavity)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

พบ ovarian cavity ครั้งแรกในลูกปลาที่มีอายุ 5 เดือน(ภาพที่ 58) พบ testicular tissue อยู่บริเวณขอบหรือริมด้านนอกของ ovotestis ในขณะที่เนื้อเยื่อของเพศเมียอยู่ด้านในและบริเวณตรงกลางเป็นส่วนใหญ่ (ภาพที่ 59 ) ไม่พบว่ามีเนื้อเยื่อประสานแทรกระหว่างส่วนของ ovarian tissue และ testicular tissue จึงทำให้เนื้อเยื่อทั้งสองส่วนแยกจากกันไม่ชัดเจน ชนิดของ germ cells ที่พบในลูกปลาการ์ตูนอานม้าอายุ 5 เดือนมีลักษณะเหมือนกับที่พบในลูกปลาอายุ 4 เดือน

Ovotestis ของลูกปลาการ์ตูนอานม้าอายุ 6-11 เดือน (ภาพที่ 60-61) มีลักษณะคล้ายกับลูกปลาในระยะ 5เดือน แต่อวัยวะสืบพันธุ์มีขนาดใหญ่ขึ้นตามอายุของปลาที่มากขึ้น male zone มีขนาดใหญ่ขึ้นและมี male germ cells เพิ่มจำนวนมากขึ้นและสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจน ส่วนที่เป็น ovarian tissue หรือ female zone พบ female germ cells มีจำนวนใกล้เคียงกับที่พบในลูกปลาอายุ 5 เดือน เพียงแต่พบว่ามีเซลล์ในระยะ perinucleolar stage oocytes มีจำนวนเพิ่มขึ้นตามอายุปลาที่มากขึ้น แต่ไม่พบ vitellogenic stage oocytes

<u>การเปลี่ยนเพศของปลาการ์ตูนอานม้า</u>

จากการทดลองพบการเปลี่ยนเพศของปลาการ์ตูนอานม้าเริ่มเกิดขึ้นเมื่อปลามีอายุประมาณ 12-14 เดือน การเปลี่ยนเพศเกิดขึ้นในปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้ ลักษณะเด่นของการเปลี่ยนเพศ พบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มีจำนวนลดน้อยลง ในขณะที่เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น (ภาพที่ 62-63) จากการสังเกตพบว่าการเสื่อมสลายของ male germ cellsใน spermatocysts เริ่มเกิดขึ้นเมื่อพบ pyknotic nuclei จำนวนมากใน spermatocysts และในระยะท้ายของการเสื่อมสลายของ spermatocyst จะปรากฏสารสีเหลืองปนน้ำตาล (yellowish pigment) เกิดขึ้นเป็นจำนวนมากบริเวณขอบๆของอวัยวะสืบพันธุ์ (ภาพที่ 64-65 ) ในเวลาเดียวกันในส่วนของ female germ cells พบไข่มีการพัฒนาขึ้นเป็นระยะ vitellogenic stage oocytes ที่มี yolk granules จำนวนมากเป็นองค์ประกอบ(ภาพที่ 66-67) อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในปลาอายุ 12-14 เดือนไม่พบ vitellogenic stage oocytes ในระยะท้าย และในปลาบางตัวอวัยวะสืบพันธุ์ยังคงประกอบไปด้วย male germ cells และ female germ cells ในจำนวนใกล้เคียงกันแต่ยังคงพบสารสีเหลืองอมน้ำตาลจำนวนเล็กน้อยอยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์ด้วย ในปลาที่มีอายุ 14 เดือนส่วนมากมีการจับคู่ผสมพันธุ์และแม่ปลามีพฤติกรรมในการวางไข่ กล่าวได้ว่าแม่ปลาการ์ตูนอานม้าโตเต็มวัยและผสมพันธุ์ครั้งแรกเมื่ออายุ 14 เดือน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**ลักษณะทางกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาการ์ตูนอานม้าในระยะโตเต็มวัยจากธรรมชาติ**

เมื่อศึกษาลักษณะทางกายวิภาคพบว่าอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้าระยะเต็มวัยที่ได้จากธรรมชาติ มีรูปร่างไม่แน่นอน และมีขนาดแตกต่างกันชัดเจนระหว่างเพศเมียและเพศผู้ จากการศึกษาพบว่าอวัยวะสืบพันธุ์ที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างกลมหรือรูปไข่ มี 2 พู ปลายด้าน posteriorเชื่อมต่อกัน พูด้านซ้ายมีขนาดใหญ่กว่าด้านขวา มีแคปซูลหุ้มซึ่งประกอบไปด้วย fibrous connective tissue ภายในอวัยวะสืบพันธุ์พบเม็ดไข่มีสีส้มแดง, ส้มอ่อนหรือส้มอมเหลือง จะเป็นอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้าเพศเมีย (ภาพที่ 9) ปลาการ์ตูนอานม้าเพศเมียมีน้ำหนักประมาณ 179.50 กรัม มีลำตัวยาวประมาณ 90.6 มิลลิเมตร มีน้ำหนักของอวัยวะสืบพันธุ์ประมาณ 0.248 กรัม ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนที่มีขนาดเล็ก รูปร่างไม่แน่นอนมักมีลักษณะเป็นแผ่นบาง หรือเป็นรูปรี มี 2 พูและปลายด้านposteriorเชื่อมต่อกัน พูด้านซ้ายมีขนาดใหญ่กว่าด้านขวาเช่นเดียวกับที่พบในปลาการ์ตูนเพศเมีย มีแคปซูลหุ้มเป็นเยื่อใสๆบางๆประกอบไปด้วย fibrous connective tissue มีสีขาวหรือสีขาวนวล ภายในอวัยวะสืบพันธุ์ไม่พบเม็ดไข่ จะเป็นปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้(ภาพที่ 8) ปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้มีน้ำหนักประมาณ 145.0 กรัม มีลำตัวยาวประมาณ 81.6 มิลลิเมตร และมีน้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์ประมาณ 0.070 กรัม

**ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้โตเต็มวัยจากธรรมชาติศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน**

ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้เป็น ovotestis (ภาพที่ 68-71) พบ male และ female zone อยู่รวมกันโดยส่วนของ male zone อยู่บริเวณขอบรอบนอกของอวัยวะสืบพันธุ์ ในขณะที่ส่วน female zone พบบริเวณตรงกลางรอบๆ lumen ทั้ง 2 ส่วนแยกจากกันไม่ชัดเจน เนื่องจากไม่มีเนื้อเยื่อประสานห่อหุ้ม ส่วนที่เป็น testicular tissue ประกอบด้วย spermatocysts (ภาพที่ 72-73, 76, 79) ซึ่งภายในพบ male germ cells เป็นจำนวนมากซึ่งประกอบไปด้วยเซลล์ระยะต่างๆของกระบวนการสร้างอสุจิ(spermatogenesis) spermatocyst มีเนื้อเยื่อประสานหุ้ม ผนังของ spermatocyst ยังพบ Sertoli cell หรือ supporting cells ซึ่งเป็นมีรูปร่างไม่แน่นอน อาจจะเป็นเซลล์รูปกระสวยหรือรูปไข่ มีนิวเคลียสรูปไข่หรือรูปสามเหลี่ยม เห็นนิวคลีโอลัสชัด (ภาพที่ 75-76, 98, 109) แทรกกระจายอยู่ทั่วไป ในส่วนที่เป็น ovarian tissue พบ female germ

cells ประกอบไปด้วย oogonia, primary oocytes ในระยะ chromatin-nucleolus stage oocyte และ perinucleolus stage oocyte เท่านั้น(ภาพที่ 70-71) ลักษณะของเซลล์ระยะต่างๆที่พบในกระบวนการสร้างอสุจิประกอบด้วย

1. Spermatogonia (ภาพที่ 75, 77, 92-92 ) พบอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ลักษณะเซลล์มีรูปร่างกลมหรือรี มีขนาดประมาณ 6.4 ไมโครเมตร ไซโทพลาซึมมีจำนวนน้อยติดสีชมพูจาง นิวเคลียสกลมขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ บางเซลล์เห็นนิวคลิโอลัสชัดเจน(ภาพที่ 93) บางเซลล์อาจไม่ชัดเจนนัก และมักพบ Sertoli cells หรือ supporting cells ซึ่งทำหน้าที่เป็นแหล่งอาหารของตัวอสุจิอยู่บริเวณฐานของ spematocysts เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าเยื่อหุ้มนิวเคลียสไม่เรียบ (irregular outline) ภายในนิวเคลียสพบเส้นใยโครมาตินรวมกันเป็นกลุ่ม ภายในไซโทพลาซึมพบ mitochondria มีรูปร่างกลมและยาวปนกัน ภายใน mitochondria ที่มีรูปร่างยาวเห็น lamellar cristae ชัดเจน พบ electron- dense granular material หรือ nuage กระจายทั่วไป พบ ribosome อิสระอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

2. Primary spermatocytes (ภาพที่ 72, 74, 76-79, 94-96) เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของ spermatogonia ทำให้เซลล์ที่ได้มีขนาดเล็กลง เซลล์มีขนาดประมาณ 5.6 ไมโครเมตร พบเซลล์ในระยะนี้เป็นจำนวนมากและนิวเคลียสมักอยู่ในระยะใดระยะหนึ่งของ prophase I ไซโทพลาซึมยังคงมีจำนวนน้อยติดสีชมพูจาง นิวเคลียสกลมขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ มักติดสีเข้มกว่านิวเคลียสของ spermatogonia จาก semithin section พบ primary spermatocytes หลายเซลล์อยู่ในระยะ metaphase (ภาพที่ 77) เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ภายในนิวเคลียสพบ synaptonemal complex มีลักษณะเป็นแถบยาว 2 แถบวางคู่กัน (ภาพที่ 95) ภายในไซโทพลาซึมมีพบ mitochondria มีรูปร่างกลมหรือรูปรีขนาดเล็ก ภายในเห็น lamellar cristae นอกจากนี้ยังพบ Golgi complex และพบ electron-dense granular material กระจายอยู่ทั่วไป

3. Secondary spermatocytes (ภาพที่ 78, 96-97) เกิดจากการแบ่งเซลล์ของ primary spermatocyte เซลล์ที่ได้มีขนาดเล็กกว่า primary spermatocyte ครึ่งหนึ่ง นิวเคลียสย้อมติดสีพวกด่างเข้มขึ้น จากการสังเกตมักไม่ค่อยพบsecondary spermatocyteเนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีช่วงชีวิตสั้น เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบ

เส้นใยโครมาตินชัด พบ mitochondria มีรูปร่างกลมหลายขนาด ซึ่งภายในเห็น lamellar cristae ชัด ซึ่งพบ Golgi complex และ electron-dense granular material

4. Spermatid (ภาพที่ 75, 79, 96, 98-99) เป็นเซลล์ที่พบมากที่สุดและกระจายทั่วไปใน ovotestis เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็น spermatozoa นิวเคลียสของเซลล์จึงใช้เวลามากในการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ทำให้พบเห็นเซลล์ชนิดนี้ค่อนข้างมาก โดยพบว่าขนาดของเซลล์จะมีขนาดเล็กลงเป็นครึ่งหนึ่งของ secondary spermatocyte นิวเคลียสติดสีพวกด่างเข้ม มีไซโทพลาซึมน้อย เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบนิวเคลียสมีโครมาตินอัดกันแน่น มีไซโทพลาซึมอยู่รอบๆเซลล์ พบmitochondia รูปกลมกระจายทั่วไป spermatid จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของนิวเคลียสและสูญเสียบางส่วนของไซโทพลาซึม( spermiogenesis) ไปเป็นตัวอสุจิ

5. Spermatozoa (ภาพที่ 72-79, 100-102) เกิดจากกระบวนการ spermiogenesis ของ spermatid ซึ่งประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงนิวเคลียสและไซโทพลาซึมพร้อมๆกับมีการเจริญของ flagellum มักพบอสุจิรวมกันเป็นกลุ่มจำนวนมากอยู่ใน spermatocysts และเมื่ออสุจิมีความสมบูรณ์จะเคลื่อนเข้าสู่ lumen ของอวัยวะสืบพันธุ์ รูปร่างของอสุจิแบ่งออกเป็นส่วนหัว (head) ส่วนกลาง (midpiece)และส่วนท้าย(tail) เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของอสุจิด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบว่าส่วนหัวของอสุจิมีนิวเคลียสรูปร่างกลม ไม่มี acrosome ไซโทพลาซึมมีจำนวนน้อยอยู่รอบนิวเคลียสเป็นชั้นบางๆ ส่วน midpiece เป็นรูปทรงกระบอกสั้น พบ mitochondia รูปร่างกลม ขนาดใหญ่ภายในพบlamellar cristae และ electron lucent matrix พบ proximal centriole และ distal centriole (basal body) ซึ่งเป็นแหล่งกำเนิดของส่วนหาง ส่วนหางเป็น monoflagellate แกนของส่วนหางเป็น axoneme เมื่อตัดตามขวางพบว่าประกอบด้วย microtubule เรียงกันเป็นวง 9 ชุดและตรงกลางอีก 1ชุด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาการ์ตูนอานม้าเพศเมียโตเต็มวัยจากธรรมชาติ ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน**

ภายในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้าเพศเมีย พบเฉพาะส่วนที่เป็น ovarian tissue เท่านั้น เนื่องจากในระหว่างที่มีการเปลี่ยนแปลงจากกะเทยไปเป็นเพศเมียนั้น ส่วนที่เป็น testicular tissue เกิดการเสื่อมสลายโดยพบ pyknotic nuclei จำนวนมากอยู่บริเวณริมหรือขอบรอบนอกของอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งเป็นตำแหน่งของ testicular tissue (ภาพที่ 62-65 ) และในระยะท้ายของการเสื่อมสลายพบสารสีเหลืองอมน้ำตาลในตำแหน่งดังกล่าว ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้าเพศเมีย ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ovarian cavity (ovarian lumen หรือ ovocoele ) ซึ่งอยู่บริเวณตรงกลางของอวัยวะสืบพันธุ์ และ ovarian lamellae (ovigerous fold ) ซึ่งเป็นบริเวณที่เกิดกระบวนการ oogenesis ประกอบด้วย ovarian follicle ที่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ ovarian follicle ของปลาการ์ตูนโดยทั่วไปมี oocyteอยู่ตรงกลาง ล้อมรอบด้วย zona radiata หรือ vitelline membrane ซึ่งเป็นชั้นที่ไม่มีเซลล์อยู่ ถัดมาเป็นชั้นของ granulosa cell หรือ follicle cell และชั้นนอกสุดเป็น theca cell ระหว่าง granulosa cell และ theca cell มี basement membrane กั้น เมื่อปลาเข้าสู่ระยะตัวเต็มวัยและพร้อมที่จะวางไข่ ภายในอวัยวะสืบพันธุ์พบกระบวนการสร้างไข่ซึ่งประกอบไปด้วยไข่ในระยะต่างๆ และได้จำแนกระยะการเจริญของไข่ออกเป็น 7 ระยะ ดังนี้

1. Oogonia (ภาพที่ 75, 80, 86-88, 104-106) มีรูปร่างค่อนข้างกลม เป็นเซลล์ที่อยู่เดี่ยว หรือเป็นกลุ่ม แทรกปนกับ primary oocytes และพบกระจายทั่วไปในรังไข่ นิวเคลียสขนาดใหญ่อยู่กลางเซลล์ รูปร่างกลมหรือรี ภายในพบนิวคลีโอลัสขนาดใหญ่ 1 อันและพบเส้นใยโครมาตินบางๆกระจายอยู่ทั่วไป ไซโทพลาซึมใสและบางทำให้ย้อมติดสีชมพูจางๆ เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบไซโทพลาซึมมีน้อย พบ electron-dense granule กระจายอยู่ทั่วไปในนิวเคลียส ผนังที่หุ้มเซลล์เป็นชั้นบางไม่สามารถจำแนกออกเป็นชั้น follicular cells หรือ basement membrane ได้ชัด ในไซโทพลาซึมพบ electron-dense granular material และ mitochondria รูปร่างกลมเป็นจำนวนมาก

2. Chromatin- nucleolus stage oocyte (ภาพที่ 80, 87, 107-109) เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่และมักพบว่านิวเคลียสมีการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะ prophase I นิวเคลียสมีลักษณะใสติดสีย้อมจางๆไม่ชัดเจนนัก ภายในนิวเคลียสเห็นเส้นใยโครมาตินเป็นเส้นบางๆกระจายทั่วไป พบนิวคลีโอลัส 1-2 อันติดสีน้ำเงินเข้ม ไซโทพลาซึมมีมากและติดสี basic เข้ม เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบชั้นgranulosa cells หรือ follicular cells (ภาพที่ 106, 109) ค่อนข้างสมบูรณ์และสามารถแยกเห็น basement membrane ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อประสานบางๆหุ้ม พบเยื่อหุ้มนิวเคลียสและ nuclear pores ชัดเจนและพบเส้นใยโครมาตินบางๆกระจายอยู่รอบๆเยื่อหุ้มนิวเคลียส ภายในนิวเคลียสพบ granule และ ไรโบโซมอิสระรวมกันเป็นกลุ่มเล็กๆกระจายอยู่ภายในนิวเคลียส ในไซโทพลาซึมพบ mitochondria รูปร่างกลมอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆและพบ vacuole ขนาดเล็กๆ

3. Perinucleolar stage oocyte (ภาพที่ 81-82, 86-89, 110-113) เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่กว่า chromatin-nucleolus stage oocyte และพบกระจายอยู่ทั่วไปในอวัยวะสืบพันธุ์ นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้นมากและมีลักษณะใสติดสีย้อมจางๆ ภายในนิวเคลียสพบนิวคลีโอลัสมากกว่า 2 อันและติดสีพวกด่างเข้ม ไซโทพลาซึมยังคงมีมากแต่ติดสีน้ำเงินน้อยกว่าเซลล์ในระยะ Chromatin-nucleolus stage oocytes ในระยะนี้เซลล์ไข่ถูกล้อมรอบด้วยชั้นของ granulosa cells หรือ follicle cells ชัดเจนมากขึ้น เซลล์ในระยะนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระยะย่อยได้แก่ ระยะ early perinucleolar stage oocyte และระยะ late perinucleolar stage oocytes เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบระยะ early perinucleolar stage oocytes เซลล์จะมีขนาดเล็กกว่าและพบ granulosa cells เป็นรูปกระสวยเรียงตัวเพียงชั้นเดียว ถัดไปเป็นชั้น basement membrane และชั้น theca cell ซึ่งเป็นชั้นบางๆเท่านั้น และพบนิวคลีโอลัสมีหลากหลายขนาดกระจายอยู่ทั่วไปในนิวเคลียส อีกระยะคือ late perinucleolar phase เซลล์มีขนาดใหญ่มากขึ้น และเริ่มพบ microvilli (ภาพที่ 112) ขนาดสั้นๆเกิดขึ้น ซึ่งเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาไม่พบ แต่พบได้เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ลักษณะของmicrovillar process ที่ยื่นออกจากไซโทพลาซึมของ oocyte มีขนาดเล็กและบางในขณะที่ microvillar process ของ follicular cell มีขนาดใหญ่และหนากว่า พบนิวคลีโอลัสมีขนาดใกล้เคียงกันและเรียงตัวอยู่บริเวณขอบของ nucleoplasm ในไซโทพลาซึมพบ electron-danse granular material จำนวนมากกระจายอยู่ใกล้กับเยื่อหุ้มนิวเคลียส (ภาพที่ 111)

4. Cortical alveoli stage oocytes (ภาพที่ 82, 114-115) ระยะนี้ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้นมากนิวเคลียสยังคงมีขนาดใหญ่จึงเรียกนิวเคลียสที่มีขนาดใหญ่ว่าเป็น germinal vesicle ยังคงพบนิวคลีโอลัสจำนวนมากและมีขนาดใกล้เคียงกันเรียงตัวอยู่บริเวณขอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียส ในระยะนี้พบหยดไขมัน (oil droplet หรือ lipid granules)(ภาพที่ 89, 91, 114-115) อยู่รอบๆ germinal vesicle พบvacuole ใสๆกระจายทั่วไปในไซโทพลาซึมทำให้การติดสีน้ำเงินของ hematoxylin ไม่สม่ำเสมอ ในระยะนี้เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบชั้นต่างๆที่หุ้มล้อมรอบเซลล์ไข่มีลักษณะคล้ายกับระยะ late perinucleolar stage oocytes (ภาพที่ 113)

5. Vitellogenic stage oocyte (ภาพที่ 83, 116-118) ลักษณะเด่นของไข่ในระยะนี้คือ เริ่มพบyolk granules ( บางรายงานใช้ yolk globules หรือ yolk platelets ) จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วไปที่บริเวณตรงกลางและค่อยๆเพิ่มจำนวนขยายออกไปยังขอบของไข่ และ yolk granules ที่พบจะมีขนาดใหญ่ขึ้นตามขนาดของเซลล์ไข่ ในขณะเดียวกัน oil droplet ก็จะมีจำนวนและขนาดเพิ่มมากขึ้นด้วยเช่นกัน ดังนั้นจึงพบ yolk granule และ oil droplet ปะปนกันในเซลล์ไข่ เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบชั้น zona radiata ประกอบไปด้วย 2 ชั้นย่อย ซึ่งมีลักษณะแตกต่างกันตามความหนาของชั้นคือ internal layer of zona radiata หรือ zona interna เป็นชั้นที่มีความหนามากและประกอบไปด้วย canal เป็นจำนวนมาก ชั้น external layer of zona radiate หรือ zona externa เป็นชั้นบางกว่าแต่เป็นชั้นที่มีการเรียงตัวจับกันแน่นและพบ canal แทรกอยู่บ้างเช่นกันแต่มีจำนวนน้อยกว่า (ภาพที่ 118) ชั้น granulosa cell เป็นเซลล์รูปลูกบาศก์ขนาดเล็กเรียงตัวเพียงชั้นเดียว นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ภายในพบมีการรวมกลุ่มของ chromatin กระจายอยู่ที่เยื่อหุ้มนิวเคลียส ถัดไปเป็นชั้น basement membrane และชั้น theca cell ถูกแบ่งออกเป็น 2 ชั้นย่อยคือ ชั้น theca interna และ ชั้น theca externa ซึ่งเป็นเซลล์ลักษณะแบนบางแต่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ (ภาพที่ 117)

6. Maturation stage oocyte (ภาพที่ 84, 119-121) ลักษณะคล้ายกับ vitellogenic stage oocyte แต่พบ yolk granules มีจำนวนมากกว่าและกระจายอย่างหนาแน่นจนเต็มไซโทพลาซึม พบ oil droplet มีขนาดและจำนวนลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งหมดไปเมื่อไข่มีความสมบูรณ์มากขึ้น เมื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน พบชั้น theca cell แบ่งออกเป็น 2 ชั้น เซลล์เป็นรูปกระสวยเรียงตัวเพียงชั้นเดียว ชั้น theca externa

(ภาพที่ 121) พบเซลล์มีขนาดใหญ่กว่าชั้น theca interna ( ภาพที่ 121) ถัดมาพบชั้น basement membrane ชัดเจน ชั้น granulosa cell ประกอบด้วยเซลล์รูปลูกบาศก์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นและชั้น zona radiata แบ่งออกเป็น 2 ชั้นย่อยแต่มีลักษณะแตกต่างจากชั้น zona radiata ใน vitellogenic stage oocyte คือ zona interna เป็นชั้นที่ประกอบไปด้วย pore ที่มีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและมีความหนาน้อยกว่าชั้น zona externa ภายในประกอบด้วย collagen fiber เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 120)

7. Postovulatory stage oocyte (ภาพที่ 85 ) พบภายหลังการตกไข่ พบ atretic follicles จำนวนมากมีรูปร่างไม่แน่นอน ขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจนเนื่องจากเซลล์มีการลอกหลุดไป บางครั้งพบว่ามี stromal tissue ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อประสานแทรกอยู่ภายใน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# วิจารณ์ผลการทดลอง

## พฤติกรรมการสืบพันธุ์และวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้า

พฤติกรรมการสืบพันธุ์และการวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้าคล้ายกับปลาการ์ตูนส้มขาว (อุ่นจิต, 2537) และปลาการ์ตูนชนิดอื่นๆ (Allen, 1980) ปลาการ์ตูนอานม้าและปลาการ์ตูนส้มขาว (อุ่นจิต, 2537) สามารถวางไข่กับวัสดุวางไข่ได้หลายชนิด ซึ่งไม่พบรายงานว่าปลาการ์ตูนชนิดอื่นๆมีการวางไข่กับวัสดุวางไข่ชนิดอื่นนอกจากเปลือกหอย จากลักษณะดังกล่าวอาจเกิดจากการที่ปลาการ์ตูนอานม้าสามารถปรับตัวให้ดำรงชีวิตในแนวปะการังที่หักพังหรือถูกทำลายได้ เนื่องจากพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกส่วนใหญ่มีแนวปะการังที่ไม่สมบูรณ์ ปลาการ์ตูนอานม้าวางไข่ในช่วงบ่ายเสมอคล้ายกับที่พบในปลาการ์ตูนส้มขาว(อุ่นจิต, 2537) ปลาการ์ตูน*A. fernatus* (Henningsen, 1989) แต่ต่างจากปลาการ์ตูน *A. percula* ที่วางไข่ในช่วงเวลา 10.00-14.00 นาฬิกาเท่านั้น (Garnaud, 1951) ปลาการ์ตูนอานม้าวางไข่ได้ตลอดปีโดยไม่พบช่วงเวลาพักที่ชัดเจน แต่จากการทดลองพบวงจรการสืบพันธุ์มีการเปลี่ยนแปลงจากทุกๆ 14 วันเป็น 20-21 วันบ้างเท่านั้น และปลาหยุดวางไข่หรือพักการวางไข่เมื่อเกิดโรค, มีอาการตกใจหรือมีตัวใดตัวหนึ่งตายไปและต้องปรับตัวใหม่ในการจับคู่อีกครั้ง ซึ่งแตกต่างจากปลาการ์ตูน *A. percula* ที่พบว่ามีการพักวางไข่ 2 เดือนแต่ไม่สามารถกำหนดช่วงเวลาในการพักได้แน่นอน (Verwey, 1930) และในปลาการ์ตูนลายปล้อง *A. clakii* ที่พบทางตอนใต้ของประเทศญี่ปุ่นที่หยุดวางไข่ในฤดูหนาว (Allen, 1972; Bell, 1976)

## ลักษณะไข่ปลาการ์ตูนอานม้า

ไข่ปลาการ์ตูนอานม้าเป็นไข่ประเภทไข่จมที่มีเยื่อเหนียวยึดติดกับวัสดุ รูปร่างรีปลายมนทั้งสองข้าง มีแคปซูลใสหุ้มคล้ายกับปลาการ์ตูนชนิดอื่นๆ (อุ่นจิต, 2537; Allen, 1980) แต่แตกต่างปลาชนิดอื่นๆซึ่ง ขนิษฐาและรังสรรค์(2543); วิมล (2540) และวีระพงศ์ (2536) รายงานว่าไข่ปลาแต่ละชนิดมีลักษณะและรูปร่างที่แตกต่างกันและส่วนใหญ่มีลักษณะกลม เช่นไข่ปลา Paddlefish, *Polyodon spathula* (Walbaum) เป็นไข่ติดลักษณะกลม มีการสร้างเมือกเหนียวห่อหุ้มไข่เพื่อเกาะติดก้อนกรวดหรือก้อนหิน (Purkett,1961) ไข่ปลา Longnose gar, *Lepisosteus osseus* มีลักษณะเป็นรูปกลมคล้ายผลส้มเป็นไข่จมแบบไม่เกาะติดวัสดุ (Long and Ballard

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

,2001) ไข่ปลาการ์ตูนอานม้ามีขนาดความยาวประมาณ 2.1 มิลลิเมตร กว้าง 0.9 มิลลิเมตรมีขนาดใกล้เคียงกับปลาการ์ตูน *A. percula* (Delsman, 1930) แต่มีขนาดเล็กกว่าปลาการ์ตูนส้มขาวเล็กน้อย(อุ่นจิต, 2537)

**<u>การเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ</u>**

ลำดับขั้นในการพัฒนาของไข่และเอมบริโอในปลาการ์ตูนอานม้ามีลักษณะคล้ายคลึงกับปลาชนิดอื่นที่พบโดยทั่วไป แต่มีความแตกต่างกันที่ระยะเวลาของการพัฒนา ปลาบางชนิดใช้เวลาตั้งแต่ไข่ได้รับการปฏิสนธิจนกระทั่งฟักเพียง 11 ชั่วโมง เช่นปลา*Callionymus calliste* (Takita, 1983) บางชนิดใช้เวลาถึง 19 วัน เช่นปลา *Catostomus commersoni* (Long and Ballard, 1976) แม้แต่ปลาชนิดเดียวกันอุณหภูมิและความเข้มของแสงมีผลต่อระยะเวลาของการพัฒนา จากการศึกษาในปลาการ์ตูนอานม้าพบว่าโดยเฉลี่ยจะใช้เวลาฟัก 7 วัน แต่บางชุดใช้เวลาฟักเพียง 6 วันเท่านั้นถ้าหากในช่วงเวลานั้นอากาศร้อน มีอุณหภูมิสูงขึ้นและมีความเข้มของแสงมาก อย่างไรก็ตามอัตราการฟักยังสูงถึง 100 เปอร์เซ็นต์และลูกปลาวัยอ่อนมีความสมบูรณ์และแข็งแรงดี Bell (1976 )ศึกษาในปลาการ์ตูนลายปล้อง Clark's Anemonefish, *A. clakii* Bennett (1830) รายงานว่าระยะเวลาในการฟักจะขึ้นกับอุณหภูมิของน้ำเช่น ใช้เวลาเพียง 6.5 วันในการฟักออกเป็นตัวที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส แต่จะใช้เวลาในการฟักนานถึง 13.5 วัน ในน้ำที่มีอุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงทำให้พัฒนาการที่เกิดขึ้นไม่สามารถเปรียบเทียบกันได้ชัดเจน

เมื่อไข่ปลาการ์ตูนอานม้าได้รับการปฏิสนธิจะมีขนาดใหญ่ขึ้น, มีไซโทพลาซึมใสและไซโกตมีการหมุนตัว ตรงกับรายงานของวีระพงศ์ (2536) ซึ่งพบว่าในระหว่างการแบ่งเซลล์ครั้งแรกไข่จะเกิดกระบวนการwater hardening มีการดูดน้ำเข้าไปแทรกใน perivitelline space ซึ่งอยู่ระหว่างผนังเปลือกไข่ ทำให้ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น, มีไซโทพลาซึมใสและไข่สามารถหมุนรอบตัวเองได้ ลักษณะนี้ใช้ในการตรวจเช็คความสมบูรณ์ของไข่ก่อนทำการผสมเทียมได้ด้วย ไข่ปลาเกือบทุกชนิดเป็น polylecithal egg มี cleavage pattern เป็นแบบ meroblastic โดยแบ่งทางด้าน animal pole เท่านั้น (วิมล, 2536; วีระพงศ์, 2536; อุทัยรัตน์, 2538; Iwamatsu, 1994; Kimmel *et al*, 1995) ในกระบวนการแบ่งเซลล์ เซลล์ที่ได้จากกระบวนการแบ่งเซลล์จะมีขนาดเล็กลงเป็นครึ่งหนึ่งของเซลล์ก่อนการแบ่งเสมอ และเซลล์มีการจัดเรียงตัวได้อย่างเหมาะสมเพื่อจะพัฒนาไป

เป็นเนื้อเยื่อต่างๆ จากการศึกษาของ Long and Ballard (2001) ในปลา Longnose gar, *Lepisosteus osseus* และ Kimmel *et al.* (1995) ในปลา Zebrafish, *Danio* (*Brachydanio*) *rerio* พบรอยย่นจำนวนมากบริเวณที่มีการแบ่งเซลล์ เพื่อช่วยเพิ่มพื้นที่ผิวให้กับเซลล์ในการแบ่งครั้งต่อไป ในการแบ่งตัวของเอมบริโอปลาการ์ตูนอานม้า จาก 16 เซลล์เป็น 32 เซลล์เป็นระยะที่เริ่มเห็นเซลล์เรียงซ้อนกันเป็น 2 ชั้น และเมื่อมีการแบ่งต่อๆไปไม่สามารถนับชั้นได้ แต่ Iwamatsu (1994) และ Yamamota (1975) ซึ่งศึกษาในปลาMedaka พบว่าการแบ่งจาก 16 เซลล์เป็น 32 เซลล์จะแบ่ง 2 ครั้งต่อเนื่องกัน โดยครั้งที่ 1 จะมีการแบ่งของเซลล์ที่อยู่รอบนอก 12 เซลล์ก่อนจึงแบ่งครั้งที่ 2 ที่ 4 เซลล์ด้านในต่อเนื่องกันทำให้เซลล์ที่ได้จะมีการจัดเรียงตัวเป็นเนื้อเยื่อ 2 ชั้น และเมื่อมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 64 เซลล์มีการเรียงตัวเป็นเนื้อเยื่อ 3-4 ชั้นและมีเนื้อเยื่อเป็น 4-5 ชั้นเมื่อมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 256 เซลล์ ในปลาการ์ตูนอานม้าที่มีอายุ 42 ชั่วโมงพบการเกิดเซลล์สารสีเป็นครั้งแรกที่ส่วนหัวและบางส่วนของผิวไข่แดงในขณะที่ปลาการ์ตูนส้มขาวพบเมื่อเอมบริโอมีอายุเพียง 36 ชั่วโมงเท่านั้น Kawase and Nagazona (1994) รายงานว่าความแตกต่างของตำแหน่งที่เกิดเซลล์สารสีครั้งแรกสามารถใช้ในการจำแนกชนิดของปลาได้ ซึ่ง takita (1980) ใช้ตำแหน่งของการเกิดเซลล์สารสีในการจำแนกลูกปลา Dragonets 3 ชนิดออกจากกัน เมื่อเอมบริโอลูกปลาการ์ตูนอานม้าพร้อมที่จะฟักออกจากไข่ เอมบริโอมีการหมุนตัวมากขึ้นและพยายามโยกตัวไปมาเพื่อให้แคปซูลซึ่งมีความเหนียวขยายและแตกออก รวมถึงการที่แคปซูลมีเยื่อเหนียวที่ใช้ยึดไข่กับวัสดุที่วางไข่ก็ช่วยทำให้เอมบริโอหลุดออกจากแคปซูลได้ง่ายขึ้น (Purkett,1961)

**<u>การเจริญและพัฒนาของลูกปลาภายหลังการฟัก</u>**

ลำดับขั้นของการเจริญและพัฒนาการของลูกปลาการ์ตูนอานม้าที่ฟักออกจากไข่มีลักษณะคล้ายคลึงกับปลาชนิดอื่น ในการจัดแบ่งลำดับขั้นการเจริญและพัฒนาการของลูกปลาในแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันขึ้นกับนักชีววิทยาหรือนักวิจัยที่ทำการศึกษาว่าต้องการจัดแบ่งอย่างไร ในปลาการ์ตูนอานม้าใช้ระยะเวลาหรืออายุของลูกปลาเป็นหลักในการจัดลำดับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เช่นเดียวกับปลาการ์ตูนส้มขาว(อุ่นจิต, 2537) และปลา White Sucker, *Catostomus commersoni* (Long and Ballard,1976) แต่ในปลา Dragonets ใช้อายุลูกปลา, ความยาวของลำตัว (total length) และ notochord length เป็นหลัก (Takita ,1980)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ช่วงเวลาในการฟักออกจากไข่ของปลาการ์ตูนอานม้าอยู่ในระหว่าง 18.00-22.00 นาฬิกา ซึ่ง อุ่นจิต (2526); Delsman (1930); Bell (1978); Ross (1976) ได้รายงานตรงกันว่าไข่ของปลาการ์ตูนมักฟักภายหลังจากพระอาทิตย์ตกดินแล้วเสมอ ลูกปลาการ์ตูนอานม้าทันทีที่ฟักออกจากไข่สามารถขยับปากไปมาและกินอาหารได้ทันที เมื่อลูกปลาอายุ 1 วันจึงเริ่มให้อาหารแก่ลูกปลาเป็นครั้งแรกเพราะปริมาณไข่แดงภายในถุงไข่แดงลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งคล้ายกับการศึกษาของ Delsman (1930) ที่รายงานว่าทันทีที่ลูกปลาการ์ตูน Clown Anemonefish, *A. percula* Lacepède (1802) ฟักออกจากไข่ ถุงไข่แดงและ oil globuleจะถูกดูดซึมไปจนหมด ลูกปลาจึงต้องกินอาหารทันที ซึ่งลักษณะดังกล่าวแตกต่างจากลูกปลาชนิดอื่นๆที่พบว่าเมื่อลูกปลาฟักออกจากไข่ ปากจะปิดสนิทและใช้ไข่แดงเป็นแหล่งอาหารก่อนในช่วงแรก จนกระทั่งเมื่อปริมาณไข่แดงลดลงหรือหมดไป จึงเริ่มมีการให้อาหาร ซึ่งโดยเฉลี่ยจะใช้เวลา 2-3 วันปริมาณไข่แดงจึงลดลงหรือหมดไปขึ้นกับชนิดของปลา (วีรพงศ์, 2536; Takita , 1983 ; Russell, 1976) เช่นในปลา Filefish, *Brachaluteres ulvarum* พบว่าไข่แดงถูกดูดซึมจนหมดใช้เวลา 4-5 วัน จึงเริ่มมีการให้อาหารเป็นครั้งแรก (Akagawa *et al.*,1995) ในปลาจวด *Johnius hololepidotus* ไข่แดงถูกใช้หมดเมื่อลูกปลามีอายุ 3 วัน จึงเริ่มให้อาหารเป็นครั้งแรกเช่นกัน (Meyer-Pochow, 1972)

การเกิดครีบของปลาการ์ตูนอานม้าในระยะแรกแผ่นครีบของแผงครีบหลัง ครีบหางและครีบก้นเชื่อมต่อกันเป็นแนวยาวก่อน จากนั้นจึงเกิดเป็นรอยคอดและแยกครีบทั้งสามออกจากกันอย่างชัดเจน ในกระบวนการเกิดครีบมีความสัมพันธ์กับการว่ายน้ำของลูกปลาวัยอ่อน สังเกตจากเมื่อลูกปลาฟักออกจากไข่ มักพบเพียงปุ่มครีบหูกับก้านครีบที่เป็นหนามแหลมเท่านั้นไม่พบแผ่นครีบและไม่พบครีบท้อง จึงทำให้ลูกปลาในระยะแรกนี้ไม่ว่ายน้ำแต่จะนอนจมที่พื้นตู้หรือเคลื่อนที่ตามแรงพ่นของออกซิเจนของน้ำภายในตู้ คล้ายกับปลาDragonet, *Repomucenus richardsonii* (Eda *et al.*,1994a) และปลา White Sucker, *Catostomus commersoni* ที่ใช้การบิดตัวไปมาเพื่อให้ลำตัวเกิดการเคลื่อนไหวเท่านั้น (Long and Ballard ,1976) เมื่อครีบหูของปลาการ์ตูนอานม้ามีความสมบูรณ์ขึ้น มีก้านครีบที่แข็งแรงและมีแผงครีบที่แผ่กว้างขนาดใหญ่ ครีบหูจะทำหน้าที่พัดโบกเพื่อให้ลำตัวเคลื่อนที่ไปข้างหน้าและการทำงานของครีบหูจะสัมพันธ์กับการทำงานของ operculum ซึ่งแตกต่างจากปลา White Sucker, *Catostomus commersoni* โดยการทำงานของครีบหูในช่วงแรกเป็นการหมุนควงเป็นวงกลมมากกว่าจะเกิดการเคลื่อนที่ไปข้างหน้า(Long and Ballard, 1976) และครีบท้องเป็นครีบที่เกิดหลังสุด เมื่อเกิดครีบท้องที่สมบูรณ์เราพบว่าลูกปลาวัยอ่อนสามารถลอยตัวและควบคุมทิศทางในการว่ายน้ำได้

การพัฒนาของลูกปลาการ์ตูนอานม้าใช้เวลา 13 วัน จึงมีรูปร่างและครีบครบสมบูรณ์และเมื่อลูกปลามีอายุ 24 วัน พบแถบสีตามลำตัวชัดเจนเหมือนกับพ่อแม่ปลาทุกประการ ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาในปลาการ์ตูนส้มขาว (อุ่นจิต, 2537) ในการแบ่งระยะของการศึกษาลูกปลาการ์ตูนอานม้าในผลการทดลองนี้ จัดแบ่งเป็นระยะลูกปลาวัยอ่อน(larvae)โดยเริ่มตั้งแต่ลูกปลาฟักออกจากไข่จนกระทั่งมีรูปร่างและแถบสีเหมือนพ่อแม่ใช้เวลาประมาณ 24 วัน แล้วเข้าสู่ระยะลูกปลา (youngหรือ juvenile ) เริ่มจากลูกปลามีรูปร่าง และแถบสีเหมือนพ่อแม่ปลาทุกประการ (24-26 วัน) จนกระทั่งถึงระยะก่อนเกิดกระบวนการสร้างอสุจิ (ประมาณ 4 เดือน) และจะเข้าสู่ระยะโตเต็มวัยเมื่ออวัยวะสืบพันธุ์มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เกิดขึ้น การจัดแบ่งดังกล่าวคล้ายกับที่พบในปลาทั่วไป (วิมล, 2536, 2540)

**การเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonadal development) และการเปลี่ยนเพศ(sex inversion)**

การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในปลาการ์ตูนอานม้า มีความสัมพันธ์กับอายุของปลา ซึ่งแตกต่างจากปลาไหล European eel ที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับขนาดของลำตัวมากกว่าอายุ (Colombo *et al.*, 1984; Colombo and Grandi, 1996) การปรากฏของเซลล์สืบพันธุ์ เป็นขั้นเริ่มต้นของการเกิดอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งตรงกับปลาการ์ตูนอานม้าอายุ 2-3 เดือน โดยการเกิดเพศครั้งแรกในปลาการ์ตูนเป็นกะเทย โดยพบทั้ง oogonia และ spermatogonia อยู่ด้วยกัน ในขณะที่ปลาไหล European eel เริ่มจากการเป็นเพศเมียก่อน (Grand and Colombo, 1997) ดังนั้นการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้ามีการพัฒนาไปกะเทยก่อนหลังจากนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างออกเป็น 2 ทาง ทางแรกมีกระบวนการสร้างอสุจิ(spermatogenesis) เกิดขึ้นที่บริเวณ testicular zone ของ ovotestis เมื่ออายุ 4 เดือน แสดงให้เห็นว่ามีการทำหน้าที่เป็นเพศผู้เกิดขึ้นก่อน ในอีกทางหนึ่งเมื่อปลาการ์ตูนอานม้ามีอายุ12-14 เดือน ovotestis จะมีการเปลี่ยนแปลงจากกะเทยไปเป็นเพศเมีย

ในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้า พบส่วน male zone อยู่บริเวณขอบรอบนอกของ ovotestis ในขณะที่ส่วน female zone มักพบอยู่บริเวณตรงกลางของ ovotestis และไม่พบเนื้อเยื่อประสานกั้นอยู่ระหว่างส่วนของรังไข่ (ovary) และส่วนของอัณฑะ(testis) ทำให้เนื้อเยื่อทั้งสองส่วนปะปนกันซึ่งลักษณะดังกล่าวคล้ายกับที่พบในปลาการ์ตูน *A. frenatus* และปลาการ์ตูน

ชนิดอื่น (Brusle-Sicard and Reinboth, 1990) แต่จะแตกต่างจากที่พบในปลากระดูกแข็งพวก protandrous hermaphrodite อื่น ซึ่งพบว่าส่วนของรังไข่และส่วนของอัณฑะ จะมีเนื้อเยื่อประสานแยกทั้งสองส่วนออกจากกันได้อย่างชัดเจน( Reinboth, 1962, 1970; Pollock, 1985; Micale and Perdichizzi, 1994) นอกจากนั้นอวัยวะสืบพันธุ์ของปลา sparid ยังพบว่าประกอบไปด้วยส่วนของรังไข่อยู่ทางด้านหลัง (dorsal) และส่วนของอัณฑะอยู่ทางด้านท้อง (ventral) ( Pollock, 1985; Micale and Perdichizzi, 1994)

เมื่อลูกปลามีอายุ 1 เดือน ภายในอวัยวะสืบพันธุ์ประกอบด้วย primordial germ cells แต่ไม่พบว่ามีการพัฒนาของ spermatogenia และ oogonia จึงกล่าวได้ว่ายังอยู่ในระยะ indifferent gonad เมื่อลูกปลามีอายุ 2-3 เดือน พบว่า gonad มีการพัฒนาขึ้นเป็นกะเทย (hermaphrodite) อยู่ในระยะ immature gonad ในระยะนี้ประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรก (early stages germ cells) ของทั้งเพศผู้และเพศเมีย จากการศึกษานี้จึงกล่าวได้ว่าการแยกเพศ (sex differentiation) เริ่มเกิดขึ้นเมื่อลูกปลามีอายุ 2-3 เดือน เพศที่พบครั้งแรกของปลาการ์ตูนเป็นกะเทย โดยมีทั้งสองเพศในอวัยวะสืบพันธุ์ ในขณะที่ปลาไหล European eel เริ่มจากการเป็นเพศเมียก่อน (Grand and Colombo, 1997) การพัฒนาของ male germ cells ใน cyst พบว่าเป็นแบบ synchronous ซึ่งเหมือนกับปลาปลาการ์ตูน *A. frenatus* (Brusle-Sicard and Reinboth, 1990)

เมื่อลูกปลาการ์ตูนอานม้ามีอายุประมาณ 4 เดือน ภายในอวัยวะสืบพันธุ์ พบกระบวนการสร้างอสุจิ แต่ไม่พบ oogenic activity จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าในอวัยวะสืบพันธุ์ที่เป็นกะเทยจะทำหน้าที่เป็นเพศผู้ (functional male) การพัฒนาของรังไข่พบ oocytes มีการพัฒนาไม่เกินperinucleolar stage oocyte ซึ่งคล้ายกับที่พบใน protandric *A. frenatus* ( Brusle-Sicard and Reinboth, 1990) การเปลี่ยนเพศเริ่มต้นเมื่อปลามีอายุ 14 เดือน อย่างไรก็ตามถ้าสิ่งแวดล้อมและองค์ประกอบอื่นที่เกี่ยวข้องกับการเลี้ยงมีความเหมาะสม เช่นความหนาแน่นของปลาที่เลี้ยงอยู่ในภาชนะ อุณหภูมิ หรือการเอาปลาเพศเมียออกจาก colony เป็นต้น ปลาการ์ตูนสามารถเปลี่ยนเพศเป็นเพศเมียได้เมื่ออายุ 6-12 เดือนคล้ายที่พบในปลาการ์ตูนชนิดอื่นๆ (Fricke, 1979, 1983; Ochi and Yanagisawa, 1987; Ochi, 1989; Hattori and Yanagisawa, 1991; Brusle Sicard *et al.*, 1994) นอกจากนี้ยังรายงานว่าอุณหภูมิและ สเตอรอยด์ฮอร์โมนมีผลทำให้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เกิดการเหนี่ยวนำหรือการยับยั้งการผลิต H-Y antigen ซึ่งส่งผลต่อการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในช่วงต้นๆ ( D' Ancona, 1959)

ในระหว่างที่มีการเปลี่ยนเพศในปลาการ์ตูนอานม้าพบว่ามีการเสื่อมสลายของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ พบสารสีเหลืองอมน้ำตาล (yellowish pigment) และพบ vitellogenic stage oocytes เกิดขึ้นคล้ายกับที่พบใน *Diplodus sargus* (Micale and Perdichizzi, 1994) สารสีเหลืองอมน้ำตาลที่พบมักอยู่บริเวณขอบของอวัยวะสืบพันธุ์ ซึ่งเป็นบริเวณตำแหน่งของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ อย่างไรก็ตามอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้าบางตัวที่มีอายุมากกว่า 12 เดือนที่ไม่มีการเปลี่ยนเพศเกิดขึ้น ยังคงพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เป็นจำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าปลาการ์ตูนนั้นทำหน้าที่เป็นเพศผู้

**<u>ลักษณะโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์ปลาการ์ตูนอานม้าโตเต็มวัยจากธรรมชาติ ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน</u>**

อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้าที่โตเต็มวัยซึ่งทำหน้าที่เป็นเพศผู้เป็น ovotestis แตกต่างจากปลาในตระกูล Serranus ที่เป็นกะเทยและทำหน้าที่ทั้งสองเพศในเวลาเดียวกัน อย่างไรก็ตามจะไม่ผสมพันธุ์ในตัวเดียวกัน ( Fisher and Peterson, 1987; Fishelson, 1970; Febvre *et al.*, 1975; Garcia-Diaz *et al.*, 2002) ลักษณะของเซลล์ระยะต่างๆทั้งที่ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาและกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่านที่พบในกระบวนการสร้างอสุจิและกระบวนการ oogenesis ในปลาการ์ตูนอานม้ามีลักษณะคล้ายคลึงกับปลากระดูกแข็งชนิดอื่นๆ ( Abu-Hakima, 1984.; 1987.; Takashima and Hibiya, 1995.; Wallace and Selman, 1981; Selman *et al.*,1986; 1993; Selman and Wallace, 1989.)

Sertoli cell ของปลาการ์ตูนอานม้าพบที่เนื้อเยื่อประสานที่หุ้มผนังของ spermatocyst ในขณะที่ Huang *et al.* (2002) ในปลา *Acanthopogrus schlegeli* พบ Sertoli cell เรียงตัวอยู่รอบ ovarian lumen เมื่อยังไม่เข้าสู่ฤดูวางไข่ แต่จะพบ Sertoli cell ที่เนื้อเยื่อประสานรอบ lumen ของ cyst และพบ Leydig cell และหลอดเลือด (blood vessel) ที่ interlobular area เมื่อเริ่มเข้าสู่ฤดูกาลวางไข่ แต่ละ spermatocysts ของปลาการ์ตูนอานม้า มี spermatogenic cells ระยะเดียวกันเท่านั้นคล้ายกับที่พบในปลา*Diplomystes mesembrinus* ( Grassiotto *et al.*, 2001)

แต่จะแตกต่างจากปลาบางชนิด เช่นปลา *Serranus atricauda* ที่พบว่า spermatogenic cell จะมีการพัฒนาอยู่ใน seminiferous lobule ซึ่งมีลักษณะเป็นรูปทรงยาว โดยพบspermatogonia อยู่ที่ปลายตันของ seminiferous lobule และ spermatogenic cells ระยะอื่นๆอยู่ในตำแหน่งถัดเข้ามาด้านในของ lumen เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าลักษณะของ spermatogenic cells ของปลาการ์ตูนอานม้าไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มปลากระดูกแข็งชนิดอื่น รวมทั้งลักษณะรูปร่างหรือจำนวนของ mitochondria ในระหว่างที่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเกิดกระบวนการสร้างอสุจิเหมือนที่มีพบโดยละเอียดในปลา *Serranus atricauda* (Garcia-Diaz *et al.*, 2002)

ลักษณะโครงสร้างของ spermatogonia ในปลาการ์ตูนอานม้า มีขนาดใหญ่กว่า Sertoli cell ค่อนข้างมากและมีรูปร่างกลมหรือรี และพัฒนาอยู่ภายใน spermatocyst ในขณะที่ Garcia-Diaz *et al.* (2002) พบ Sertoli cell ของปลา *Serranus aticauda* จะมีขนาดใหญ่กว่า spermatogonia. ลักษณะโครงสร้าง spermatogonia ของปลาการ์ตูนอานม้า ที่ไซโทพลาซึมพบ mitochondria ภายในมี lamellar cristae คล้ายกับปลา *Synbranchus marmoratus* (Lo-Nostro *et al.*, 2003) และปลาการ์ตูน *A. frenatus* ซึ่งพบทั้ง lamellar cristae และ tubular cristae อยู่ภายใน mitochondria (Brusle- Sicard and Reinboth, 1990) secondary spermatocyte ของปลาการ์ตูนอานม้า ที่ไซโทพลาซึมพบ mitochondria รูปร่างกลมหรือรีขนาดเล็กกระจายอยู่ แตกต่างจากปลา *Serranus aticauda* และปลา sea bream, *Diplodus sargus* ซึ่งพบว่า mitochondria มีรูปร่างยาว (Garcia-Diaz *et al.*, 2002)

ส่วนหัวของอสุจิในปลาการ์ตูนอานม้าพบนิวเคลียสเป็นรูปกลม คล้ายกับปลาในตระกูล Cryinidae และ Esocidae (Lahnsteiner *et al.*, 1995) แตกต่างจากปลา *Serranus aticauda* และปลา sea bream, *Diplodus sargus* (Garcia-Diaz *et al.*, 2002) และปลา ocean pout, *Macrozoarces americanus* (Yao *et al.*, 1995) ซึ่งมีนิวเคลียสเป็นรูปไข่ ในปลาการ์ตูนอานม้าพบว่าอสุจิไม่มี acrosome หุ้ม ซึ่งเป็นลักษณะทั่วไปของปลากระดูกแข็งและลักษณะดังกล่าวจะสัมพันธ์กับลักษณะของไข่ที่มีช่อง micropyle เพื่อให้อสุจิเคลื่อนที่เข้าไปปฏิสนธิกับไข่ได้ (Mattei, 1970) mitochondria ในตำแหน่งของ midpiece ของอสุจิในปลาการ์ตูนอานม้า พบมีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับ spermatogenic cell ระยะอื่นๆ เนื่องจากอสุจิของปลาจะต้องใช้พลังงานจำนวนมากในการเคลื่อนที่เข้าหาไข่ ในปลาที่มีการปฏิสนธิภายนอก(external fertilization)

(Baccetti and Afzelius, 1976) พบส่วน midpiece ของอสุจิสั้นกว่าในปลาที่มีการปฏิสนธิภายใน (internal fertilization ) (Mattei,1991) Lahnsteiner and Patzner (1995; 1996) และ Yae *et al.* ( 1995) ศึกษาลักษณะโครงสร้างของส่วนหัวอสุจิ พบว่าการหดตัวของโครมาตินในนิวเคลียส จำนวนของ mitochondria หรือการเคลื่อนที่ปรับเปลี่ยนตำแหน่งของ mitochondia จะมีความแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด ซึ่งสามารถใช้ในการจำแนกลักษณะทางอนุกรมวิธานได้ ความแตกต่างของรูปร่างอสุจิ และลักษณะการจัดเรียงตัวของ centriole และ flagella ribbons เหล่านี้มีผลต่อพฤติกรรมการว่ายน้ำและความเร็วในการว่ายน้ำของอสุจิทั้งสิ้น และในปลาแต่ละชนิดก็มีความแตกต่างกัน(Lahnsteiner and Patzner,1995) ในส่วนหางของอสุจิในปลาการ์ตูนอานม้าพบเป็นmonoflagellate ทั้งหมด แต่ในปลา *Apogun imberbis* พบอสุจิชนิด monoflagellate 80 เปอร์เซ็นต์ และเป็น biflagellate 20 เปอร์เซ็นต์ Lahnsteiner, 2003)

ในปลาการ์ตูนอานม้าที่แสดงเพศเป็นเพศผู้ ส่วน ovarian tissue ของอวัยวะสืบพันธุ์พบเพียง oogonia, chromatin-nucleolus stage oocyte และ perinucleolar stage oocyte เท่านั้น ซึ่งคล้ายกับที่ Brusle-Sicard and Reinboth (1990 ) พบในปลาการ์ตูน *A. frenatus* และรายงานว่าในเนื้อเยื่อรังไข่และเนื้อเยื่ออัณฑะที่มี functional male เกิดขึ้น พบเพียง primary oocyte ที่กำลังแบ่งเซลล์และพบ previtellogenic oocyte จำนวนมากร่วมอยู่ด้วย และเมื่อมี oogenic activity มากขึ้น จะไปแทนที่ส่วนของเนื้อเยื่ออัณฑะ การเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้เมื่อเกิด oogenic activity ของปลาการ์ตูน *A. frenatus* พบว่า previtellogenic oocyte ซึ่งมีการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะ prophase พบ mitochondria ที่บริเวณไซโทพลาซึมบางส่วนหายไป และพบ nucleoli มีขนาดเล็กลงเนื่องจากจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ RNA ( Brusle-Sicard and Reinboth, 1990 ) ในการแบ่งการเจริญของไข่ในปลาการ์ตูนอานม้าออกเป็น 7 ระยะ ตามการศึกษาของ Takashima and Hibiya (1995) ซึ่งในระยะ chromatin- nucleolus stage oocyte และระยะ perinucleolar stage oocyte ของปลาการ์ตูนอานม้าเหมือนกับระยะ primary growth phase ส่วนระยะ cortical alveoli phase ของปลาการ์ตูนอานม้า เหมือนกับระยะ yolk vesicle formation stage ของปลา *Serranus aticauda* (Garcia-Diaz *et al.*, 2002) และปลา killifish, *Fundulus heteoclitus* (Selman *et al.*, 1988)

ภายในอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้าเพศเมียพบ oogonia ขนาดใหญ่และมีรูปร่างค่อนข้างกลม นิวเคลียสกลมหรือรีคล้ายกับปลา *Synbranchus marmoratus* ( Ravaglia and Maggese, 2003) oogonia ของปลาการ์ตูนอานม้าพบตลอดทั้งปี เช่นเดียวกับที่ Mayer *et al.* (1988) พบในปลา bass, *Dicentrarchus labrax* และรายงานว่า oogonia เป็นเซลล์ที่สามารถพบได้ตลอดทั้งปีและมีการแบ่งเซลล์ทันทีภายหลังจากที่ปลาวางไข่ oogonia ของปลาการ์ตูนอานม้าพบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นกลุ่มขนาดเล็กๆกระจายทั่วไปในอวัยวะสืบพันธุ์ ในขณะที่ปลา *Serranus atricauda* มักพบที่ขอบของ ovarian lamella โดยพบเป็นเซลล์เดี่ยวหรือรวมกลุ่มกันเป็น cysts (Garcia-Diaz *et al.*, 2002) ในระยะ chromatin-nucleolus stage oocyte ของปลาการ์ตูนอานม้าพบ granulosa cells ชัดเจน มีรูปกระสวยเรียงตัวเพียงชั้นเดียวบางๆ พบ basement membrane ในระยะ perinucleolar stage oocyte พบชั้น theca cell, basement membrane ถัดเข้ามาเป็น granulosa cell และชั้น zona radiata ซึ่งประกอบด้วย microvilli ขนาดเล็กเกิดขึ้น ชั้น zona radiata ใน perinucleolar stage oocyte ในปลาการ์ตูนอานม้าเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดายังไม่ปรากฏให้เห็น แต่เมื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเริ่มปรากฏให้เห็นโดยมีลักษณะเป็น microvilli ขนาดเล็กเกิดขึ้น ชั้น zona radiata ในปลาการ์ตูนอานม้า พบว่าเกิดจาก microvillar process ขนาดเล็กและบาง ที่ยื่นออกจากไซโทพลาซึมของ oocyte และ microvillar process ขนาดใหญ่และหนาจากชั้น follicular cell ซึ่งตรงกับที่ Ravaglia and Maggese (2003) พบในปลา *Synbranchus marmoratus* และเรียกชั้น vitelline envelope เกิดขึ้นครั้งแรกในระยะ perinucleolar stage แต่แตกต่างจากปลา *Orizias latipes* (Tesoriero, 1977) และปลา *Fundulus heteroclitus* (Dumont and Brummet, 1985) ที่พบว่าเกิดจาก oocyte เท่านั้น ลักษณะไข่อาจรวมระยะ chromatin-nucleolus phase และระยะ perinucleolar phase เป็นระยะเดียวกัน ( Mayer *et a.*,1988) Garcia-Diaz *et al.* (2002) รายงานผลในปลา *Serranus atricauda* และ Salman *et al.* (1988) พบในปลา *Fundulus heteroclitus* และรวม oogonia, chromatin-nucleolus phase, early perinucleolar phase และ late perinucleolar phase เป็นระยะ primary growth phase หรือเป็น young oocyte (Guraya, 1978) follicular epithelium ของปลาการ์ตูนอานม้าเหมือนกับปลากระดูกแข็งทั่วไปคือเป็น squamous epithelium เรียวตัวชั้นเดียว แต่ในปลา *Tilapia thollori*, *Arius thalassinus* และ dogfish, *Scoliodon sarrakowah* พบ follicular epithelium เป็นชนิด pseudostratified follicular epithelium (Guraya, 1978; 1986) ระยะ cortical alveoli phase ในปลาการ์ตูนอานม้าพบ lipid granule เกิดบริเวณตรงกลางของไข่ก่อนจึงขยายออกไปยังขอบ

เซลล์ คล้ายกับที่ Carrasson and Bau (2003) พบปลา *Aidablennius sphinx* และรายงานว่า การเกิด lipid granule และmitochondria เกิดที่รอบๆนิวเคลียสก่อนจากนั้นจึงเคลื่อนย้ายไปที่ ขอบของไข่

vitellogenic stage oocytes และ maturation stage oocyte ของปลาการ์ตูนอานม้า พบชั้น follicular cell ประกอบด้วยชั้นต่างๆเรียงตามลำดับจากชั้นนอกเข้าด้านใน ได้แก่ชั้น theca externa, theca interna, basement membrane, granulosa cell, zona externa และ zona interna เหมือนกับปลากระดูกแข็งทั่วไป (Guraya, 1995) ชั้น zona radiata ในปลาแต่ละชนิดเรียกไม่เหมือนกัน ในปลาการ์ตูนอานม้าเรียกชั้น zona radiata ตาม Nagahama (1983) ในขณะที่ปลาชนิดอื่นชั้น zona radiata อาจจะเรียกเป็นชั้น chroion (Wallace and Selman, 1981), ชั้น zona pellucida (Guraya, 1965), vitelline membrane (Droller and Roth, 1966) หรือ vitelline envelope (Selman and Wallace, 1989) vitellogenic stage oocyte ของปลาการ์ตูนอานม้าพบชั้น zona radiata เป็นชั้นที่ไม่มีเซลล์ ประกอบด้วยชั้นย่อย 2 ชั้นคือ zona interna และ zona externa ซึ่งแตกต่างจากปลา pipefish *Syngnathus scovelli* ที่พบว่าชั้น vitelline envelope ประกอบด้วยชั้นย่อย 3 ชั้น( Z1, Z2 และ Z3) (Begovac and Wallace, 1988) ในปลาการ์ตูนอานม้าพบ zona interna เป็นชั้นที่มีความหนามากและประกอบไปด้วย canal เป็นจำนวนมาก ชั้น zona externa เป็นชั้นบางกว่าแต่มีการเรียงตัวกันแน่นและพบcanal เช่นกันแต่มีจำนวนน้อยกว่า Ravaglia and Maggese (2003) ศึกษาในปลา *Synbranchus marmoratus* รายงานว่าชั้น zona interna มีความหนามากและประกอบด้วยสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่เรียงตัวเป็นชั้นบางๆถึง 36 ชั้น ในปลา *Brachydario rerio* มี17-18 ชั้น ( Hart and Donovan, 1983) ส่วนชั้น zona externa เป็นชั้นที่บางกว่า zona interna และมีการจัดเรียงตัวของสารประกอบค่อนข้างแน่น ไข่ของปลาการ์ตูนอานม้ามีชั้น zona radiate ค่อนข้างหนา เนื่องจากเป็นไข่จมและมีเยื่อเหนียวยึดติดวัสดุวางไข่ ซึ่งมีรายงานว่ามักจะมีชั้น vitelline envelope หนากว่าปลาที่มีไข่ลอย (Graham, 1981; Ravaglia and Maggese, 2003) สำหรับ maturation stage oocyte ในปลาการ์ตูนอานม้าพบ zona interna เป็นชั้นที่ประกอบไปด้วย pore ที่มีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและเป็นชั้นที่มีความหนาน้อยกว่าชั้น zona externa ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบจำพวกคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่มี collagen fiber แทรกเป็นจำนวนมาก ซึ่งชั้นนี้น่าจะเกี่ยวข้องการการสร้างแคปซูลเนื่องจากโครงสร้างของแคปซูลจะประกอบไปด้วย collagen fiber ซึ่งลักษณะดังกล่าวที่พบในปลาการ์ตูนอานม้ายังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# สรุป

ปลาการ์ตูนอานม้าทั้งเพศผู้และเพศเมียมีพฤติกรรมในการจัดเตรียมรังโดยการทำความสะอาดวัสดุวางไข่ และมีการเฝ้าดูแลไข่จนกระทั่งฟัก มีการวางไข่ครั้งละ 400-1800 ฟอง ลักษณะของไข่เป็นรูปแคปซูลที่มีเยื่อยึดติดกับวัสดุวางไข่ ปลาการ์ตูนอานม้าสามารถวางไข่ได้ตลอดทั้งปี โดยมีวงจรการสืบพันธุ์ทุกๆ 14-21 วัน พัฒนาการของไข่ ตั้งแต่ไข่ได้รับการปฏิสนธิจนกระทั่งฟักเป็นตัวใช้เวลาทั้งสิ้น 148±8 ชั่วโมงและจำแนกได้เป็น 26 ระยะ พัฒนาการของลูกปลาภายหลังการฟักพบว่าลูกปลาสามารถกินอาหารได้ทันที และลูกปลามีรูปร่างเหมือนพ่อแม่เมื่ออายุ 13 วัน เมื่ออายุ 24-26วันมีสีสันและแถบสีของลำตัวชัดเจนเหมือนพ่อแม่ทุกประการ

ปลาการ์ตูนอานม้าสามารถแยกเพศเป็นกะเทยเมื่อลูกปลามีอายุ 2-3 เดือน โดยพบเซลล์สืบพันธุ์ เหล่านี้ได้แก่ spermatogonia, primary spermatocytes, oogonia, primay oocytesในระยะchromatin-nucleolus stage oocyte เมื่อลูกปลามีอายุ 4 เดือน พบกระบวนการสร้างอสุจิเกิดขึ้น โดยเนื้อเยื่ออัณฑะประกอบด้วยเซลล์ทุกระยะของกระบวนการสร้างอสุจิ ในขณะที่เนื้อเยื่อรังไข่ประกอบด้วย oogonia และoocytes ใน chromatin nucleolus stage oocyte และ perinucleolar stage oocyte เท่านั้น เมื่อปลามีอายุ 12 เดือนจึงพบการเปลี่ยนเพศจากกะเทยเป็นเพศเมีย ในระยะนี้พบการเสื่อมสลายของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ การสะสมของสารสีเหลืองอมน้ำตาล และมี vitellogenic oocytes เกิดขึ้น ในปลาการ์ตูนอานม้าที่มีอายุมากกว่า 12 เดือน ที่ไม่เกิดการเปลี่ยนเพศยังคงแสดงเพศเป็นเพศผู้ ปลาการ์ตูนอานม้าโตเต็มวัยเมื่ออายุ 14 เดือน แสดงเพศเมียจึงจับคู่ผสมพันธุ์และวางไข่ อวัยวะสืบพันธุ์ของปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้ที่โตเต็มวัยเป็น ovotestis ซึ่งประกอบเนื้อเยื่ออัณฑะและเนื้อเยื่อรังไข่อยู่ร่วมกัน ในขณะที่ปลาการ์ตูนอานม้าเพศเมียที่โตเต็มวัยพบเนื้อเยื่อรังไข่เพียงอย่างเดียว

ภาพที่ 1 แสดงพฤติกรรมการทำความสะอาดรังของพ่อแม่ปลาการ์ตูนอานม้า ก่อนการวางไข่ โดยพ่อแม่ปลาช่วยกันกัดแทะวัสดุวางไข่

ภาพที่ 2 แสดงพฤติกรรมการว่ายวนรอบๆวัสดุวางไข่ของปลาการ์ตูนอานม้าทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยเพศผู้ว่ายน้ำตามเพศเมียตลอดเวลา

ภาพที่ 3 แสดงพฤติกรรมการว่ายวนชิดกับวัสดุวางไข่ เพื่อให้ urogenital papilla ของเพศเมียสัมผัสกับวัสดุวางไข่ เมื่อไข่ถูกปล่อยออกมาขั้วด้านล่างของไข่มีเยื่อเมือกใสยึดติดกับวัสดุ

ภาพที่ 4 แสดงการปล่อยน้ำเชื้อของปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้เพื่อเข้าผสมกับไข่ทันทีที่ไข่ถูกวาง

ภาพที่ 5 แสดงการว่ายสลับไปมาของเพศเมียและเพศผู้ เพื่อวางไข่และปล่อยน้ำเชื้อ

ภาพที่ 6 แสดงพฤติกรรมการเฝ้าดูแลไข่ โดยการพ่นน้ำหรือใช้ครีบพัดโบกไข่เพื่อให้ไข่มีการเคลื่อนไหว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1

2

3

4

5

6

มหาวิทยาลัยมหิดล Mahidol University

ภาพที่ 7 ภาพภายหลังการปฏิสนธิแล้ว พ่อแม่ปลาการ์ตูนอานม้ายังคงเฝ้าดูแลไข่ตลอดเวลา จนกระทั่งฟัก

ภาพที่ 8 แสดงตำแหน่งอวัยวะต่างๆรวมทั้งลักษณะของ ovotestisของปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้ L, liver; I,intestines; T, testis.

ภาพที่ 9 แสดงตำแหน่งของอวัยวะต่างๆรวมทั้งลักษณะของ ovary ในปลาการ์ตูนอานม้าเพศเมีย L, liver; O, ovary.

ภาพที่10 แสดงไข่ที่เพิ่งได้รับการปฏิสนธิ (ที่ 0 ชั่วโมง) พบว่ายังไม่มีการแบ่งเซลล์

ภาพที่11 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 1 ชั่วโมง) ระยะ 2 เซลล์

ภาพที่12 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 1 ชั่วโมง 40 นาที) ระยะ 4 เซลล์

ภาพที่13 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 2 ชั่วโมง) ระยะ 8 เซลล์

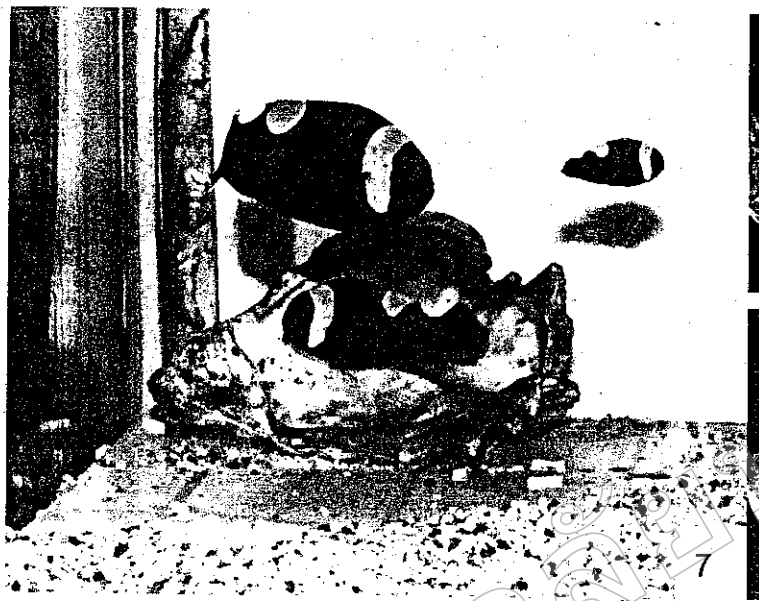
ภาพที่14 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 4 ชั่วโมง) ระยะ 16 เซลล์

ภาพที่15 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 4 ชั่วโมง 30 นาที) ระยะ 32 เซลล์

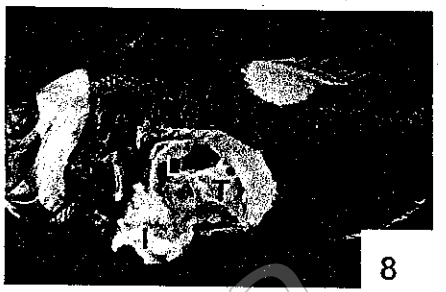
ภาพที่16 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 5 ชั่วโมง) ระยะ 64 เซลล์

ภาพที่17 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 6 ชั่วโมง) ระยะ 128 เซลล์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

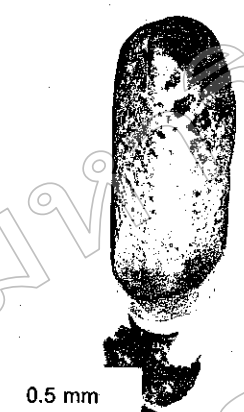


7



8

9



0.5 mm

10

At 0 h

11

At 1 h

12

At 1 h 40 min

13

At 2 h

14

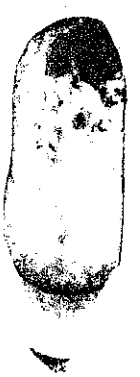
At 4 h

15

At 4 h 30 min

16

At 5 h



17

At 6 h

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 18 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 8 ชั่วโมง) ระยะ 256 เซลล์

ภาพที่ 19 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 9 ชั่วโมง) ระยะ morula

ภาพที่ 20 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่18 ชั่วโมง 34 นาที) ระยะblastula

ภาพที่ 21 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 21ชั่วโมง4นาที) ระยะ gastrula

ภาพที่ 22 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 27ชั่วโมง 30 นาที) ระยะ early neurula

ภาพที่ 23 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 30 ชั่วโมง) ระยะlate neurula

ภาพที่ 24 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 34 ชั่วโมง) ระยะที่ส่วนหัวและลำตัว แยกจากกันอย่างชัดเจน เริ่มพบช่องปาก

ภาพที่ 25 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 42 ชั่วโมง) ระยะที่พบเลนส์ตาและ ปุ่มหางชัดเจน

ภาพที่ 26 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 48 ชั่วโมง) พบตัวอ่อนมีการหมุนตัวกลับ อย่างสมบูรณ์ มีการเต้นของหัวใจ

ภาพที่ 27 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 55 ชั่วโมง) พบotolith ในกระดูกหูชั้นใน ที่บริเวณปลายหางมีการเคลื่อนไหว

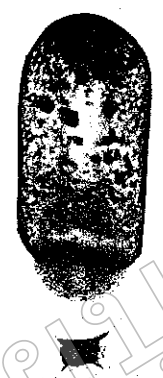
ภาพที่ 28 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 64 ชั่วโมง) พบสมองถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วนอย่างชัดเจน มี forebrain, midbrain และ hindbrain

ภาพที่ 29 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 75 ชั่วโมง 30 นาที) เอมบริโอเจริญเติบโต ขึ้นมาก ทำให้อวัยวะต่างๆมีขนาดขยายใหญ่ขึ้น

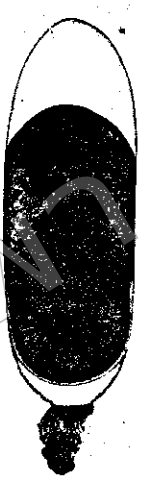
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

18 At 8 h

19 At 9 h



20 At 18 h 34 min



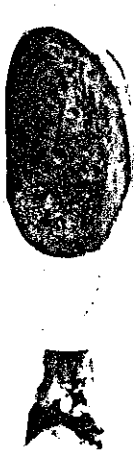
21 At 21 h 4 min

22 At 27 h 30 min

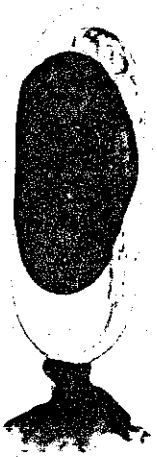
23 At 30 h

24 At 34 h

25 At 42 h



26 At 48 h



27 At 55 h

28 At 64 h

29 At 75 h 30 min

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 30 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 93 ชั่วโมง) พบส่วนหัวมีขนาดใหญ่ ดวงตาใหญ่และมีสีน้ำตาลเข้ม

ภาพที่ 31 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 97 ชั่วโมง) เอมบริโอมีขนาดใหญ่และขยายจนเต็มแคปซูล

ภาพที่ 32 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 109 ชั่วโมง) ระยะไข่แดงเริ่มมีขนาดเล็กลง

ภาพที่ 33 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 119 ชั่วโมง) ระยะที่เอมบริโอมีขนาดใหญ่ขึ้นและเอมบริโอมีการเคลื่อนไหวมากขึ้น

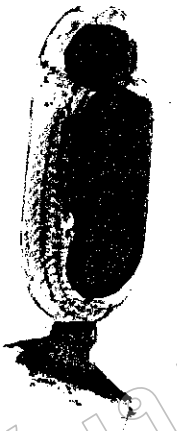
ภาพที่ 34 แสดงการเจริญและพัฒนาของเอมบริโอ (ที่ 127 ชั่วโมง) ในระยะนี้แบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ 34 A, ระยะก่อนการฟัก; 34 B, ระยะฟักออกจากฝักไข่

ภาพที่ 35 แสดงลูกปลาวัยอ่อนที่เพิ่งฟักออกจากแคปซูล (ที่ 148 ชั่วโมง)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

30

31



32

33

0.5 mm

At 93 h

At 97 h

At 109 h

At 119 h

34A

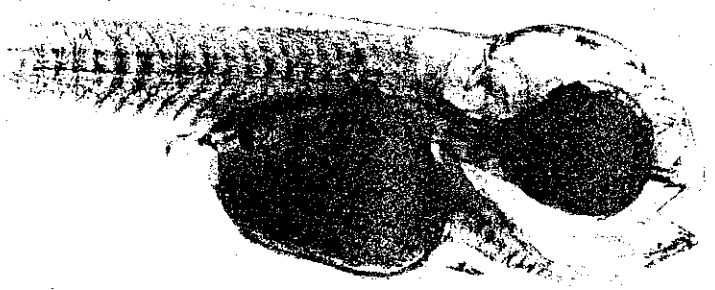
0.5 mm

At 127 h

34B

0.5 mm

At 127 h



35

0.5 mm

At 148 h

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

<u>ภาพที่ 36</u> แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 1 วัน เป็นระยะที่ลูกปลาเริ่มกินอาหาร, ลูกปลาไม่ว่ายน้ำแต่เคลื่อนที่ไปตามแรงพ่นของออกซิเจนในน้ำ

<u>ภาพที่ 37</u> แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 2 วัน ระยะนี้พบส่วนหัวและลำตัวมีความสัมพันธ์กัน, ถุงไข่แดงมีขนาดเล็กลง

<u>ภาพที่ 38</u> แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 3 วัน พบกระเพาะอาหาร, ครีบหลัง, ครีบหางและครีบก้นแยกกันอย่างชัดเจน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

0.5 mm

36

1 day

0.5 mm

37

2 days

0.5 mm

38

3 days

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 39 แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 4 วัน พบจะงอยปาก, ลูกปลาเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว

ภาพที่ 40 แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 5 วัน แผ่นปิดเหงือกและครีบหู ทำงานสัมพันธ์กัน, ลูกปลาว่ายน้ำแต่ไม่สามารถควบคุมทิศทางการว่ายได้เนื่องจาก ครีบต่างๆยังไม่ สมบูรณ์

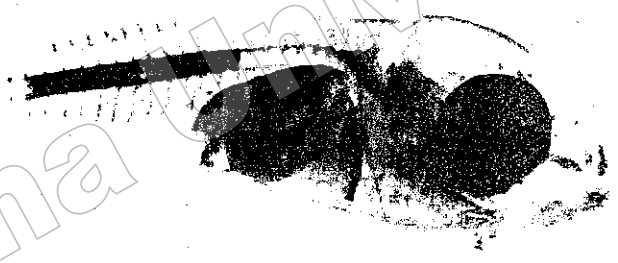
ภาพที่ 41 แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 6 วัน พบการเกิดก้านครีบหลัง และครีบก้นแต่ไม่พบก้านครีบแข็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

0.5 mm

39

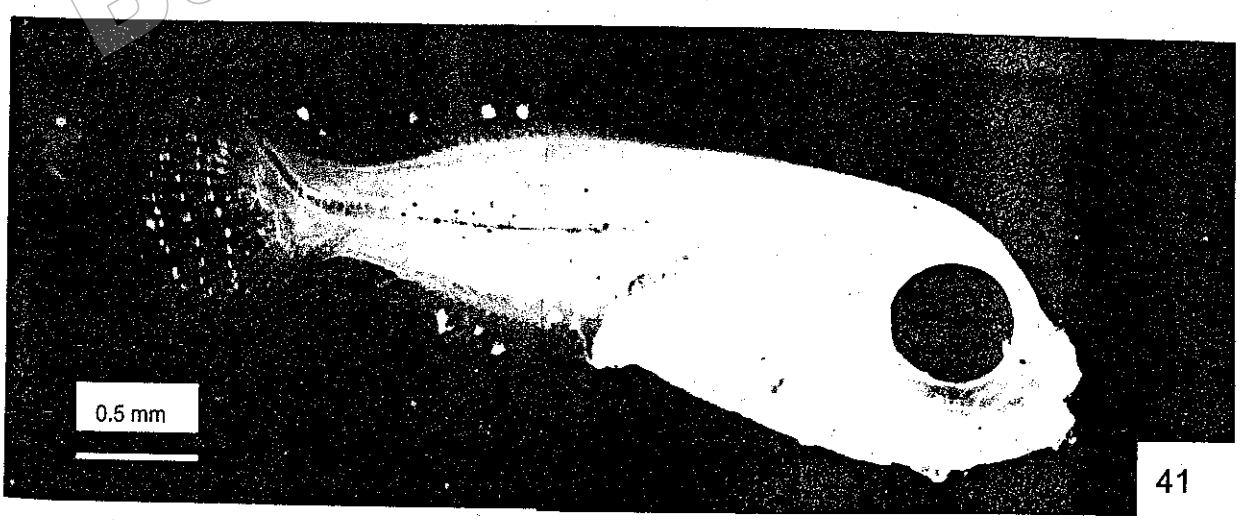
4 days



0.5 mm

40

5 days




41

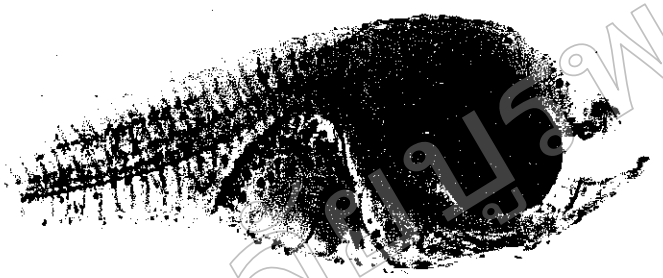
6 days

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

<u>ภาพที่ 42</u> แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 7 วัน พบกระดูกกระโหลก, กระดูกก้านครีบ, กระดูกปลายหางและแกนกระดูกสันหลังมีแคลเซียมมาจับทำให้ย้อมติดสีแดงของ alizarin red S ชัดเจน (Alcial bule & Alizarin red S)

<u>ภาพที่ 43</u> แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 8 วัน ลูกปลามีขนาดใหญ่ก้านครีบทุกครีบมีขนาดเพิ่มขึ้น

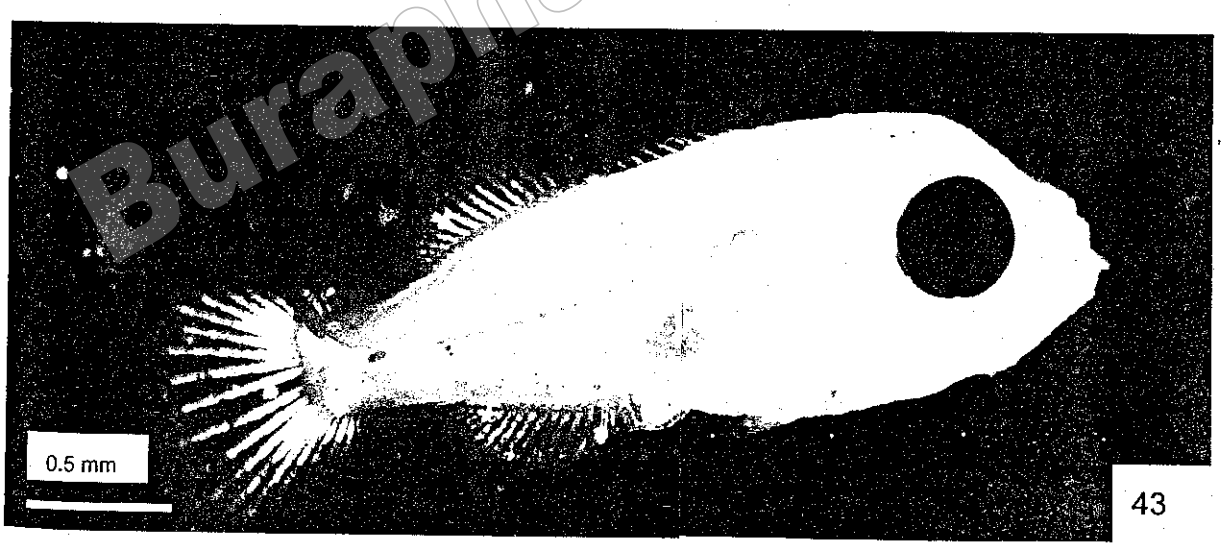
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



0.5 mm

42

7 days




43

8 days

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

<u>ภาพที่ 44</u> แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 9 วัน ก้านครีบของกระดูกครีบหาง มีจำนวนข้อปล้องเพิ่มขึ้น ทำให้ปลายหางยาวขึ้น

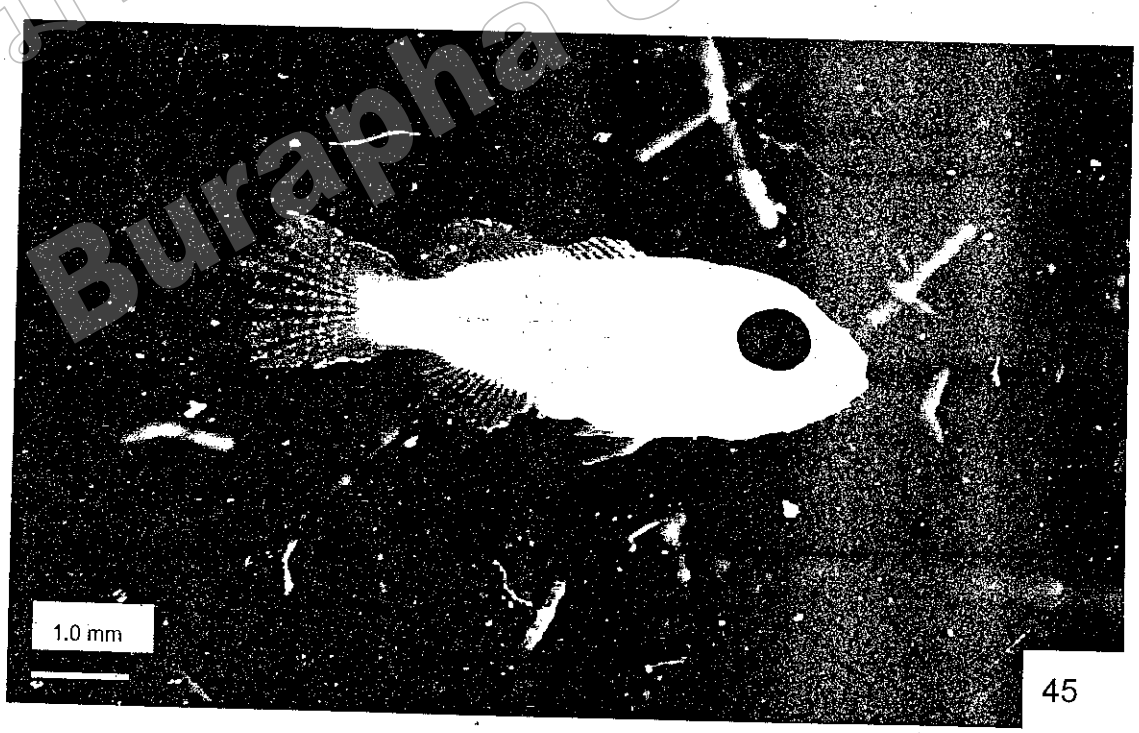
<u>ภาพที่ 45</u> แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 10 วัน ก้านครีบและแผ่นครีบของครีบท้องค่อนข้างสมบูรณ์ พบเซลล์สารสีจำนวนมากกระจายทั่วตัว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

0.5 mm

44

9 days




45

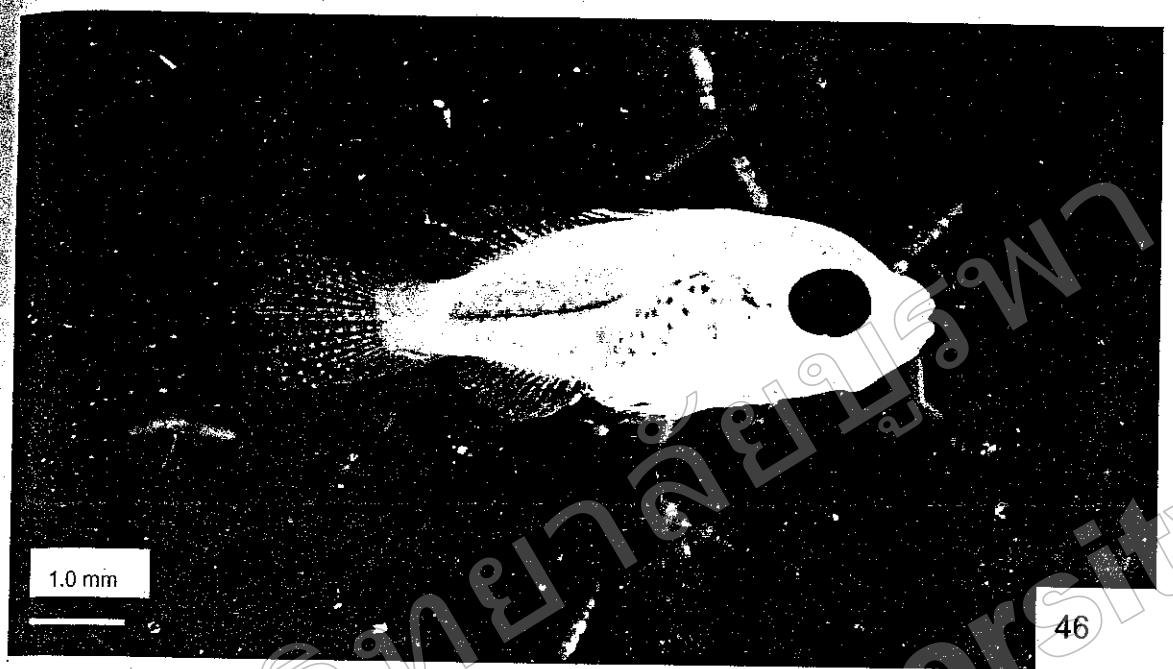
10 days

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

<u>ภาพที่ 46</u> แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 13 วัน ลูกปลามีรูปร่างเหมือนพ่อแม่ปลาทุกประการ ครีบทุกครีบครบสมบูรณ์และทำหน้าที่สัมพันธ์กัน

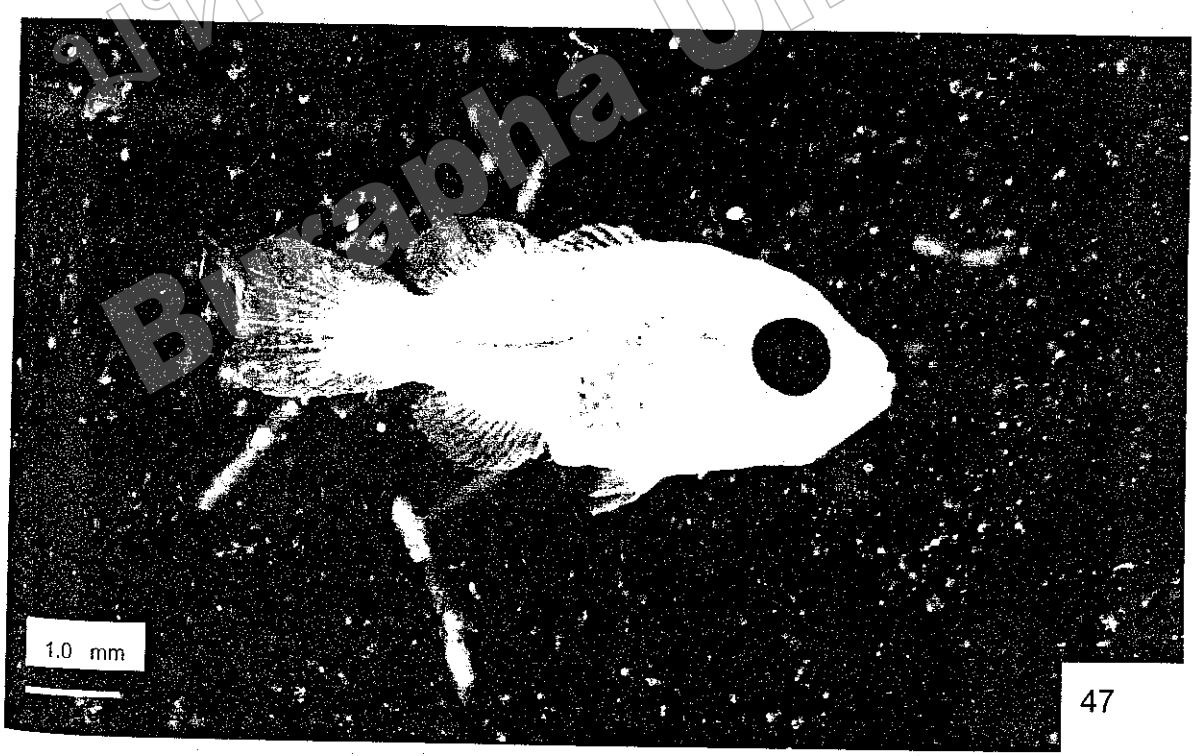
<u>ภาพที่ 47</u> แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 15 วัน พบแถบสีขาวที่บริเวณหลังดวงตาแต่ไม่เด่นชัด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




46

13 days




47

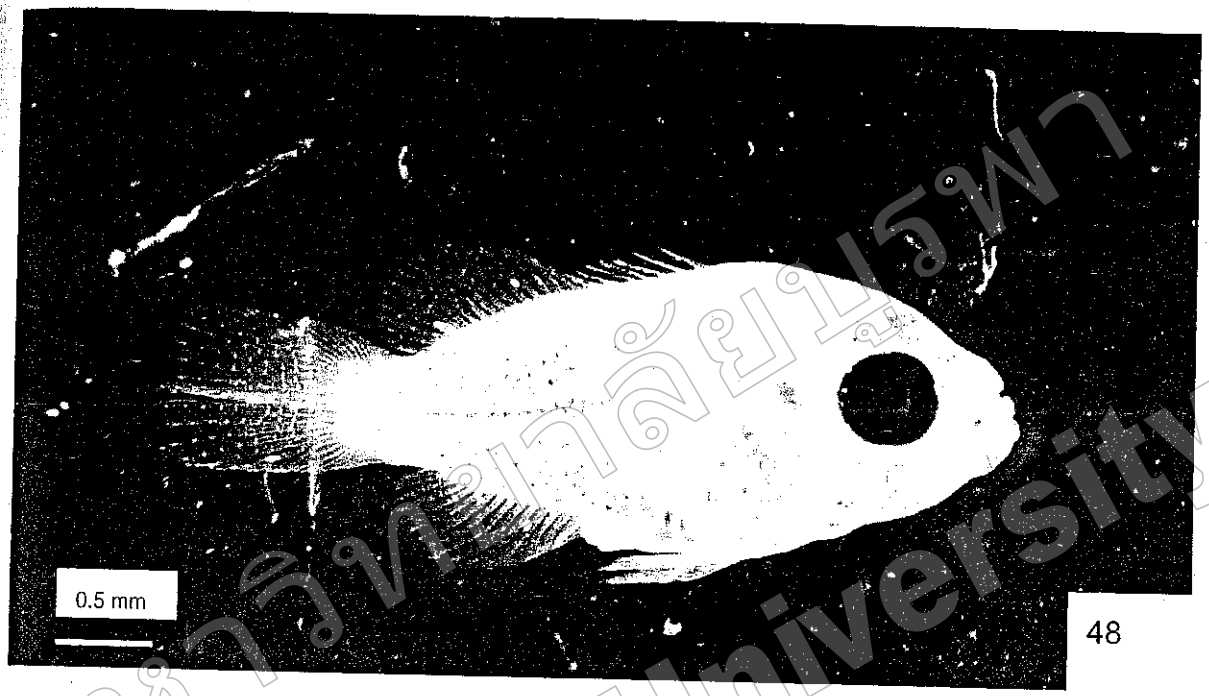
15 days

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 48 แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 20 วัน แถบสีขาวหลังดวงตาชัดเจน, ครีบหลังส่วนท้ายพบแถบสีขาวจางๆ

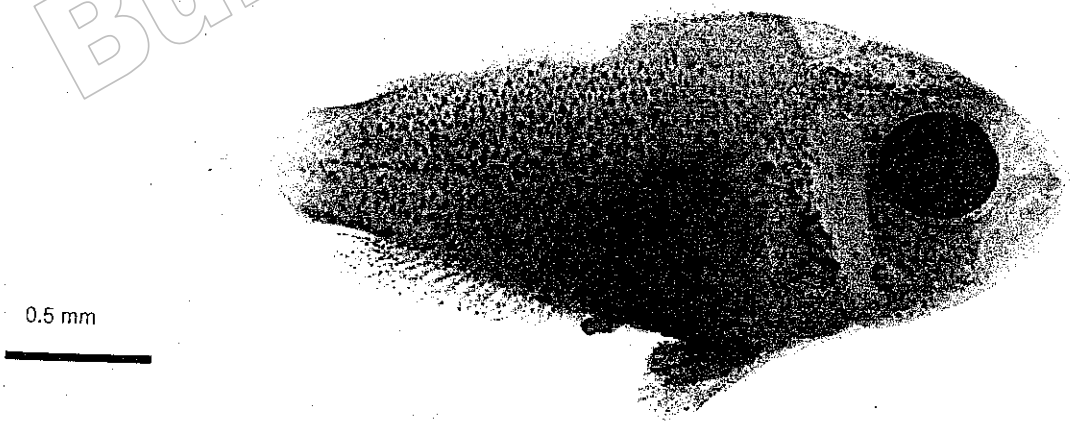
ภาพที่ 49 แสดงการเจริญและพัฒนาของลูกปลาวัยอ่อน อายุ 24-26 วัน แถบสีตามลำตัวชัดเจนเหมือนพ่อแม่ทุกประการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




48

20 days




49

24-26 days

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**ภาพที่ 50** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงตำแหน่งของ primordial germ cell ที่มีเนื้อเยื่อประสานห่อหุ้มและยึดติดกับผนังด้านบนของ abdominal cavity ทั้งสองข้างของ mesentery (H&E)

**ภาพที่ 51** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะและตำแหน่งของ primordial germ cell ที่รวมกันเป็นกลุ่ม K, kidney; PGC, primordial germ cell (H&E)

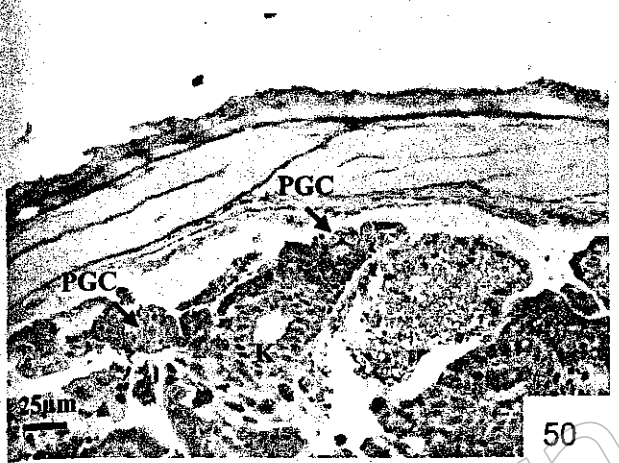
**ภาพที่ 52** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลาการ์ตูนอานม้า อายุ 2 เดือน ลักษณะเป็นสายยาวคล้ายริบบิ้น พบอยู่บริเวณช่องว่างภายในลำตัวและวางขนานลำไส้เล็ก Og, oogonia; Sc, spermatocytes; Sg, spermatogonia (H&E)

**ภาพที่ 53** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลาการ์ตูนอานม้า อายุ 2 เดือน แสดง spermatocyst ซึ่งภายในพบ spermatogonia หลายเซลล์ พบ oogonia เป็นเซลล์เดี่ยว Og, oogonia; Sg, spermatogonia (Masson's trichrom)

**ภาพที่ 54** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลาการ์ตูนอานม้า อายุ 3 เดือน ลักษณะเป็นสายยาวคล้ายริบบิ้นและมีขนาดใหญ่ขึ้น Oc, oocyte; Og, oogonia; Sc, spermatocytes; Sg, spermatogonia (H&E)

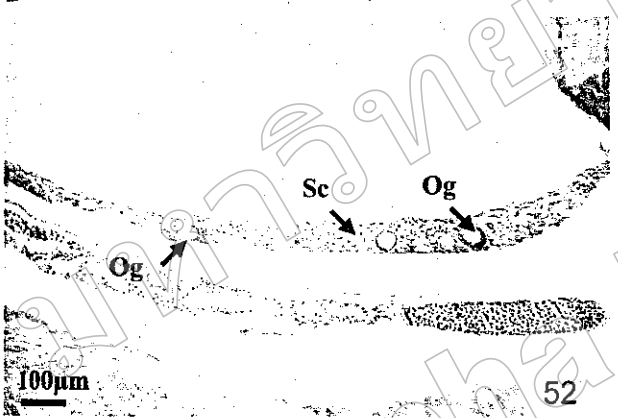
**ภาพที่ 55** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลาการ์ตูนอานม้า อายุ 3 เดือน แสดงลักษณะของ spermatogonia และ oogonia Og, oogonia; Sg, spermatogonia (H&E)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



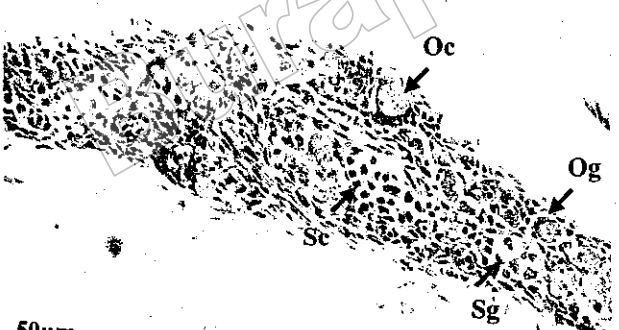

50

51

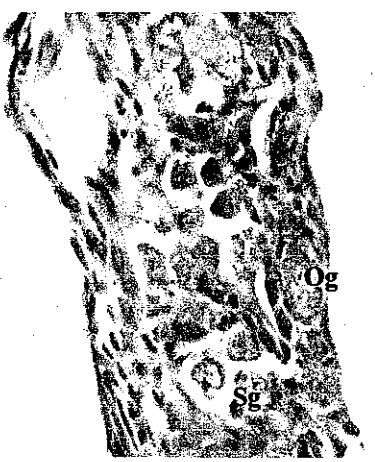



52

53




54




55

**ภาพที่ 56** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลาการ์ตูนอานม้า อายุ 4 เดือน ตัดตามยาว พบอวัยวะสืบพันธุ์เป็น ovotestis (H&E)

**ภาพที่ 57** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลาการ์ตูนอานม้า อายุ 4 เดือน ตัดตามขวาง พบอวัยวะสืบพันธุ์เป็น ovotestis โดยพบ spermatogenic cell ทุกระยะ และพบ oogonia, primary oocytes ใน chromatin-nucleolus stage และ perinucleolar stage
OT, ovarian tissue; TT, testicular tissue (H&E)

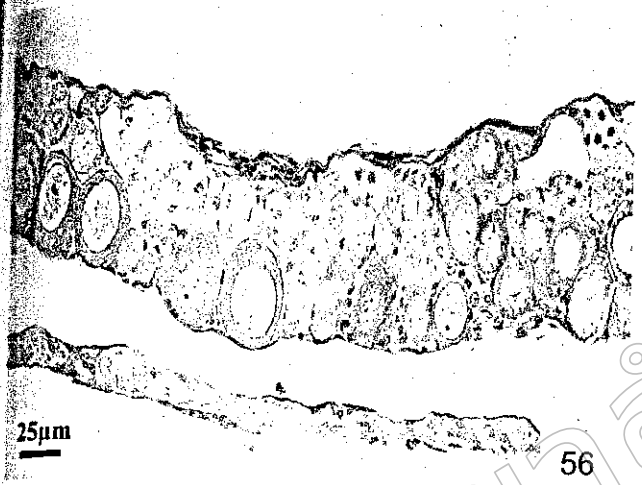
**ภาพที่ 58** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลาการ์ตูนอานม้า อายุ 5 เดือน เริ่มพบ ovarian cavity ขนาดเล็กๆ
OC, ovarian cavity; OT, ovarian tissue (H&E)

**ภาพที่ 59** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลาการ์ตูนอานม้า อายุ 5 เดือน พบ spermatogenic cell ทุกระยะ
OC, ovarian cavity; Og, oogonia; OT, ovarian tissue; Sc, spermatocytes; Sz, spermatozoa; TT, testicular tissue (H&E)

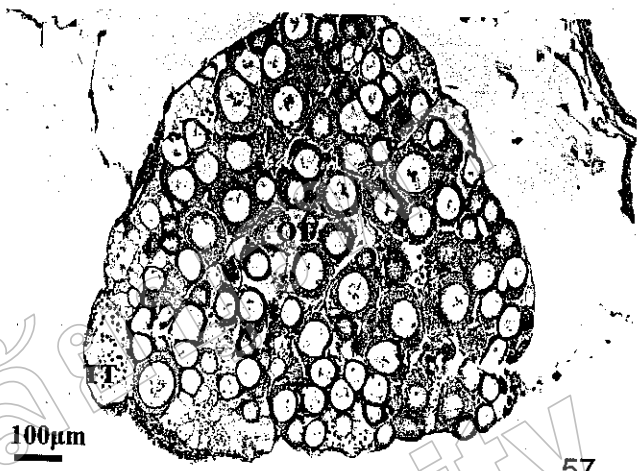
**ภาพที่ 60** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลาการ์ตูนอานม้า อายุ 6 เดือน พบ ovarian cavity มีขนาดใหญ่และมองเห็นได้อย่างชัดเจน OC, ovarian cavity; OT, ovarian tissue; TT, testicular tissue (H&E)

**ภาพที่ 60** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเจริญและพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในลูกปลาการ์ตูนอานม้า อายุ 6 เดือน ส่วน male zone พบที่ริมหรือขอบของ ovotestis ในขณะที่ female zone อยู่ด้านในใกล้ ovarian cavity
OC, ovarian cavity; OT, ovarian tissue;TT, testicular tissue (H&E)

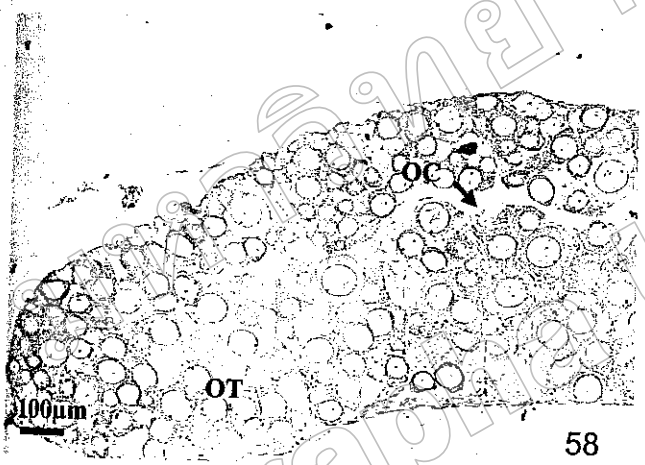
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



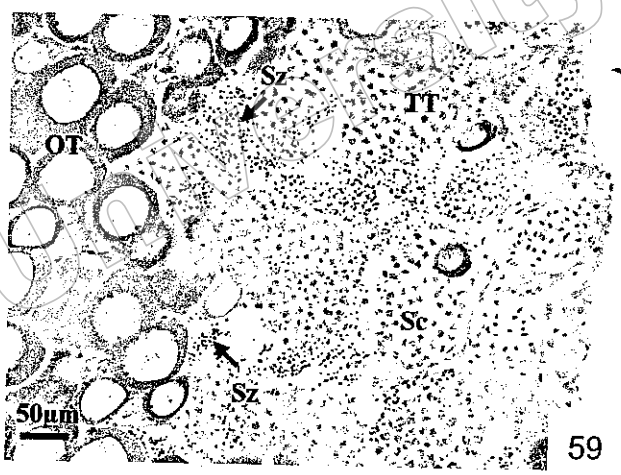

56



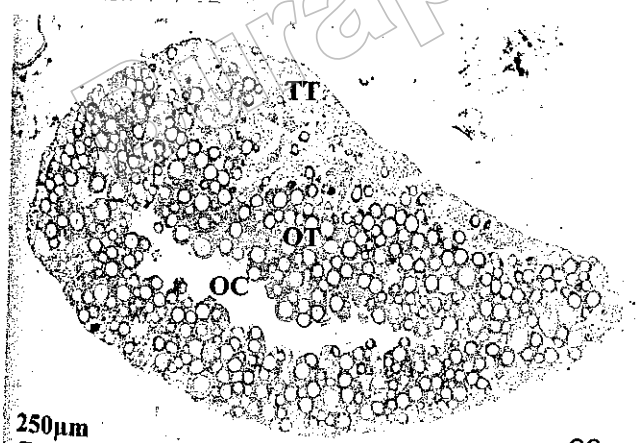

57



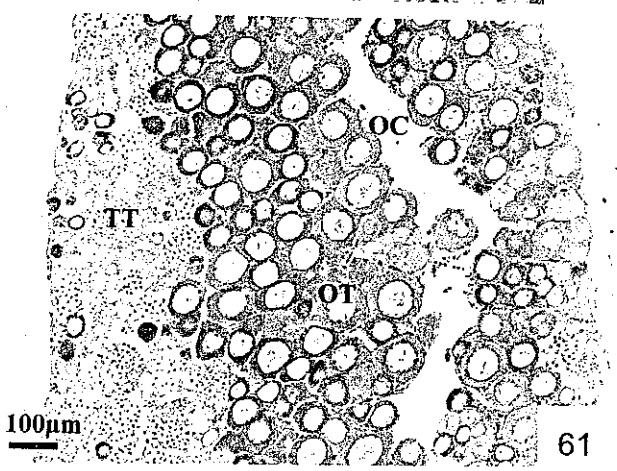

58




59




60




61

**ภาพที่ 62** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะการเปลี่ยนเพศของปลาการ์ตูนอานม้า พบการเสื่อมสลายของ testicular tissue D, degeneration; TT, testicular tissue (H&E)

**ภาพที่ 63** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเพิ่มขยายของ ovarian tissue เมื่อมีการเปลี่ยนเพศ และพบการเสื่อมสลายของ testicular tissue. D, degeneration; OT, ovarian tissue; TT, testicular tissue (H&E)

**ภาพที่ 64** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเพิ่มขยายของ ovarian tissue และพบการเสื่อมสลายของ testicular tissue. D, degeneration; OT, ovarian tissue; TT, testicular tissue (H&E)

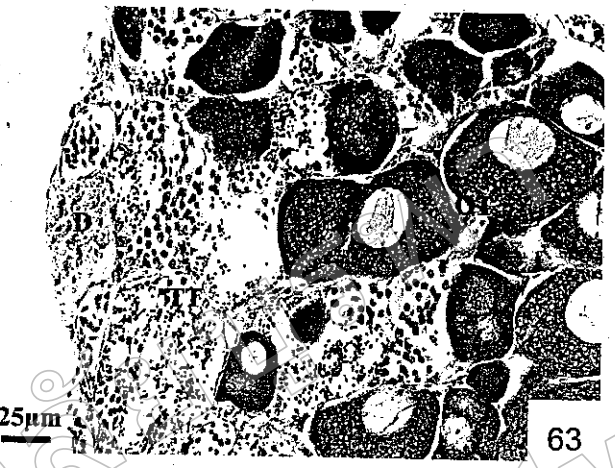
**ภาพที่ 65** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเกิด pyknotic nuclei และ yellowish-brown pigment. P, pigment; PN, pyknotic nuclei; TT, testicular tissue (H&E)

**ภาพที่ 66** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงการเจริญและพัฒนาของรังไข่ในระยะ vitellogenic oocytes D, degeneration; VOc, vitellogenic oocytes (H&E)

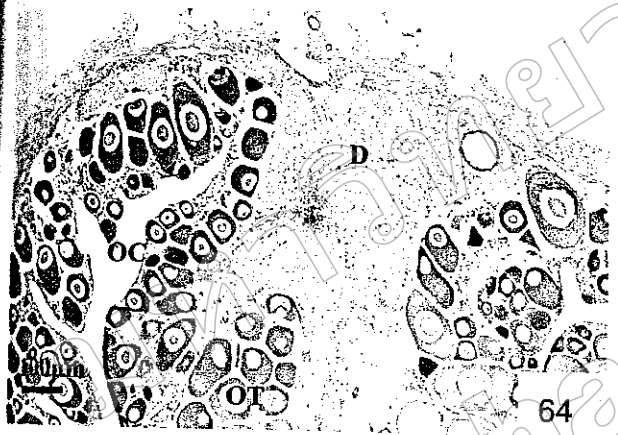
**ภาพที่ 67** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะไข่ในระยะ vitellogenic oocytes D, degeneration; VOc, vitellogenic oocytes; YG, yolk granules (H&E)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

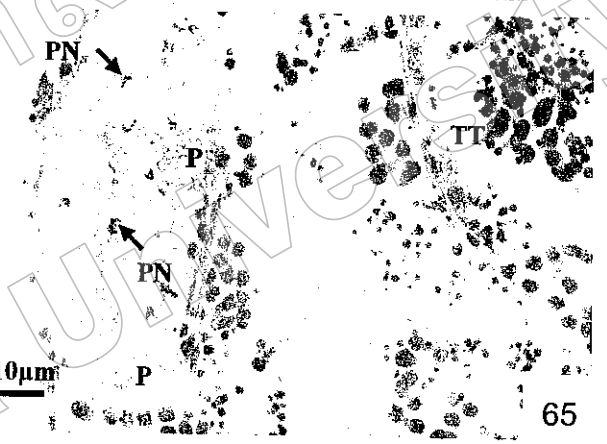
62




63

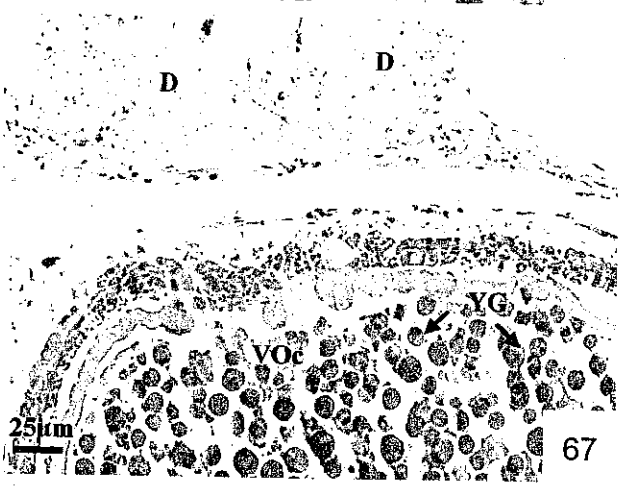



64




65

66




67

**ภาพที่ 68** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะของ ovotestis ในปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้จากธรรมชาติ OC, ovarian cavity; OT, ovarian tissue; TT, testicular tissue (H&E)

**ภาพที่ 69** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะของ ovotestis ในปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้จากธรรมชาติ พบ testicular tissue อยู่บริเวณขอบรอบนอกของอวัยวะสืบพันธุ์มีขนาดใกล้เคียงกับovarian tissue OC, ovarian cavity; OT, ovarian tissue; TT, testicular tissue (H&E)

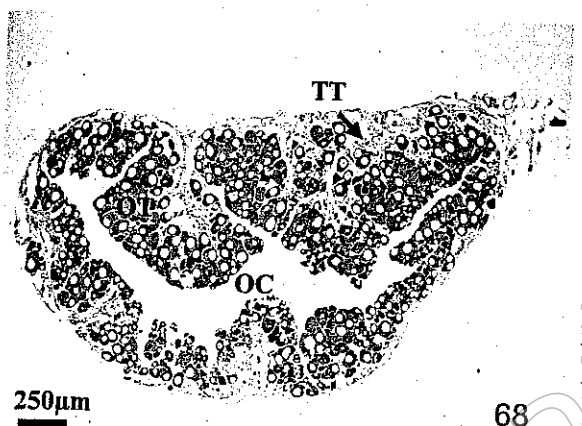
**ภาพที่ 70** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะของ ovotestis ในปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้จากธรรมชาติ พบ testicular tissue มีขนาดเพิ่มมากขึ้น ส่วนของ ovarian tissue มีขนาดลดลง OC, ovarian cavity; OT, ovarian tissue; TT, testicular tissue (H&E)

**ภาพที่ 71** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะของ ovotestis ในปลาการ์ตูนอานม้าเพศผู้จากธรรมชาติ พบ testicular tissue อยู่ที่บริเวณขอบรอบนอกของอวัยวะสืบพันธุ์ ส่วนของ ovarian tissue อยู่บริเวณตรงกลางใกล้กับ ovarian cavity OC, ovarian cavity; OT, ovarian tissue; TT, testicular tissue (H&E)

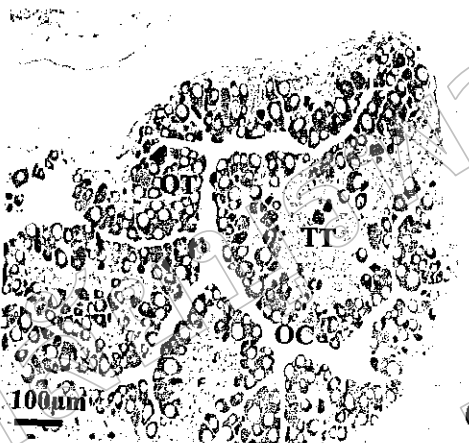
**ภาพที่ 72** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงส่วนประกอบของ testicular tissue PSc, primary spermatocyte; SC, Sertoli cell; Sy, spermatocyst; Sz, spermatozoa (H&E)

**ภาพที่ 73** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดง spermatogenic cell ใน testicular tissue PSc, primary spermatocyte; SC, Sertoli cell; Sy, spermatocyst; Sz, spermatozoa (H&E)

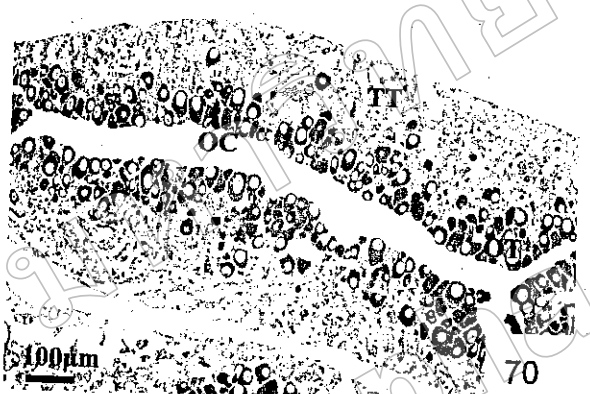
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



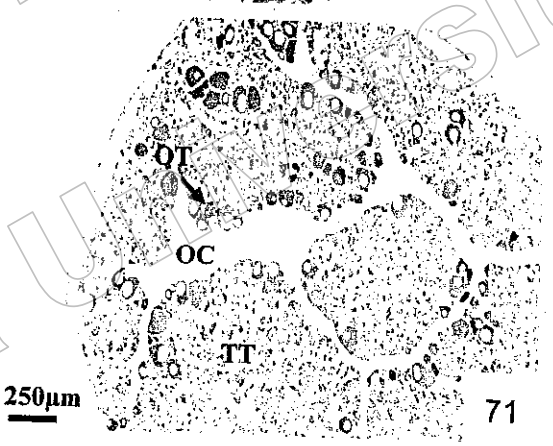

68




69

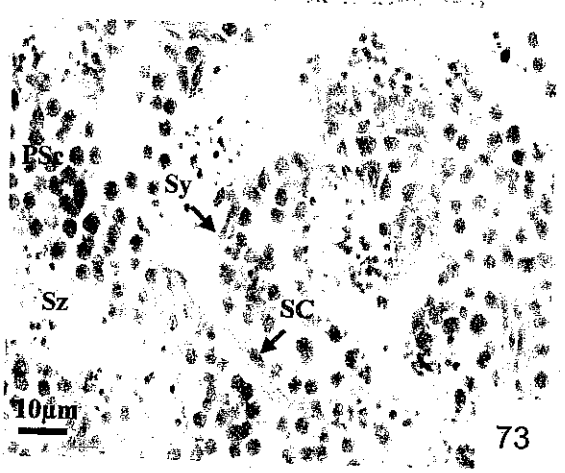



70




71

72




73

**ภาพที่ 74** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาตัด semithin section แสดงโครงสร้างของ ovotestis PSc, primary spermatocyte; Sg, spermatogonia; St, spermatid; Sy, spermatocyst; Sz, spermatozoa (Toluidene blue)

**ภาพที่ 75** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาตัด semithin section แสดง spermatogenic cell ระยะ primary spermatocyte, secondary spermatocyte, spermatid และ spermatozoa Og, oogonia; PSc, primary spermatocyte; SC, Sertoli cell; Sg, spermatogonia; St, spermatid (Toluidene blue)

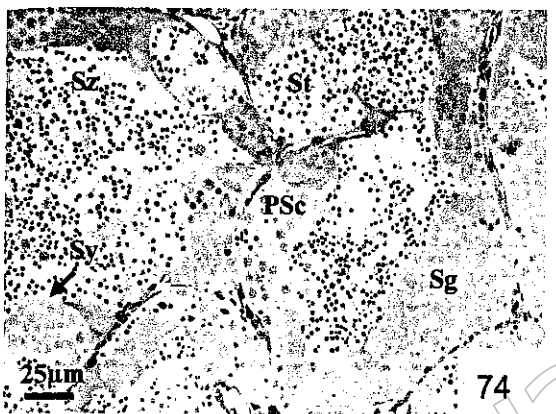
**ภาพที่ 76** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ตัด semithin section แสดงลักษณะของ Sertoli cell พบอยู่ที่ฐานของ spermatocyst Og, oogonia; PSc, primary spermatocyte; SC, Sertoli cell; Sy, spermatocyst; Sz, spermatozoa (Toluidene blue)

**ภาพที่ 77** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ตัด semithin section แสดงลักษณะของ primary spermatocyte ซึ่งกำลังแบ่งเซลล์อยู่ในระยะ metaphase Og, oogonia; PSc, primary spermatocyte; Sg, spermatogonia; Sz,spermatozoa (Toluidene blue)

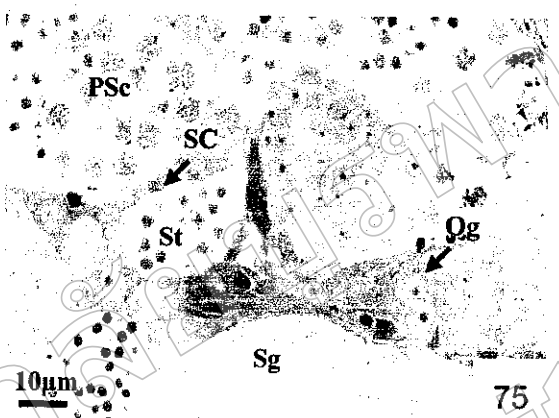
**ภาพที่ 78** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ตัด semithin section แสดงลักษณะของ secondary spermatocyte ซึ่งมีขนาดเล็กเป็นครึ่งหนึ่งของ primary spermatocytes PSc, primary spermatocyte; SSc, secondary spermatocyte; Sz,spermatozoa (Toluidene blue)

**ภาพที่ 79** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ตัด semithin section แสดงลักษณะของ spermatocyst PSc, primary spermatocyte; Sg, spermatogonia; St, spermatid; Sy, spermatocyst; Sz, spermatozoa (Toluidene blue)

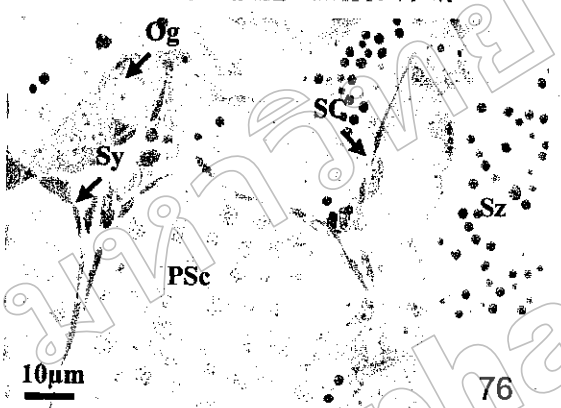
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



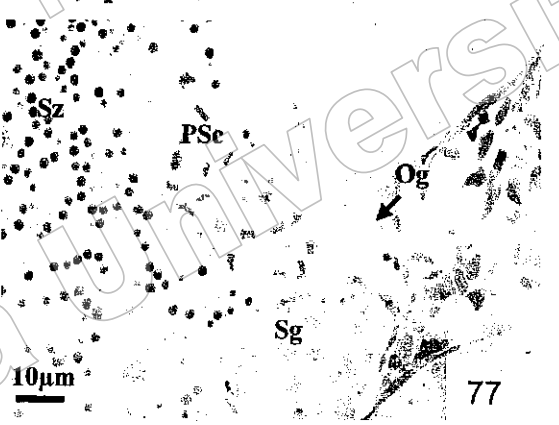

74



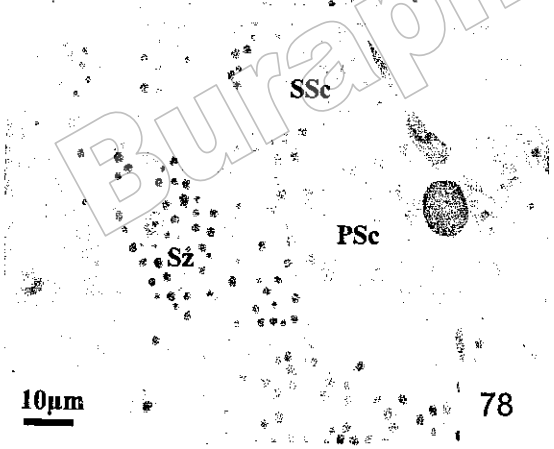

75



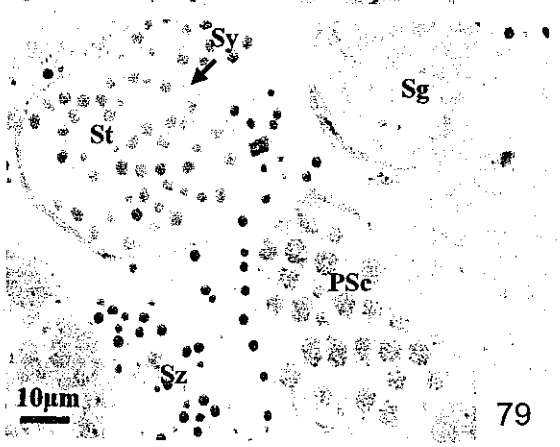

76




77




78




79

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**ภาพที่ 80** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะไข่ในระยะ oogonia และ chromatin-nucleolus stage CNo, chromatin-nucleous stage; OC, ovarian cavity; Og, oogonia; TT, testicular tissue (H&E)

**ภาพที่ 81** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะไข่ใน perinucleolar stage D, degeneration of testicular tissue; PNo, perinucleolar stage (H&E)

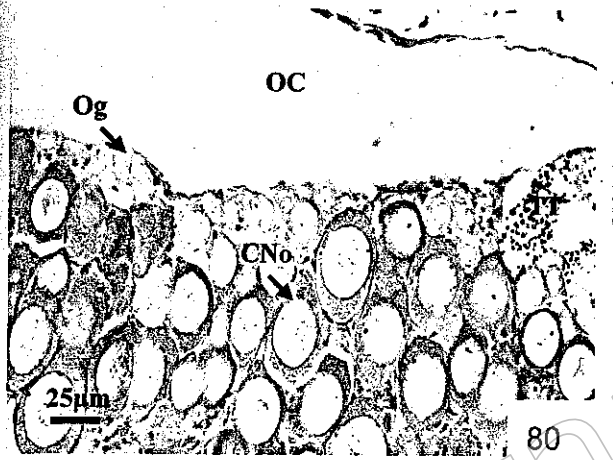
**ภาพที่ 82** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะไข่ใน cortical alveoli stage. CA, cortical alveoli stage; PNo, perinucleolar stage (H&E)

**ภาพที่ 83** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะไข่ใน vitellogenic stage OC, ovarian cavity; Vt, vitellogenic phase; YG, yolk granule (H&E)

**ภาพที่ 84** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะไข่ใน maturation stage Ma, maturation stage;YG, yolk granule; Zo, zona radiate (H&E)

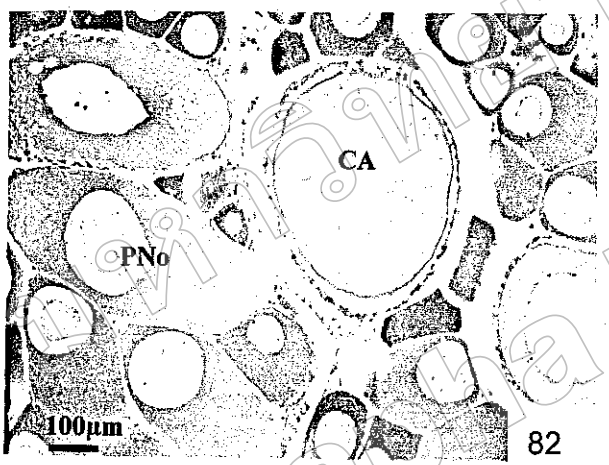
**ภาพที่ 85** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา แสดงลักษณะไข่ใน postovulatory stage. AF, artetic follicle (H&E)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

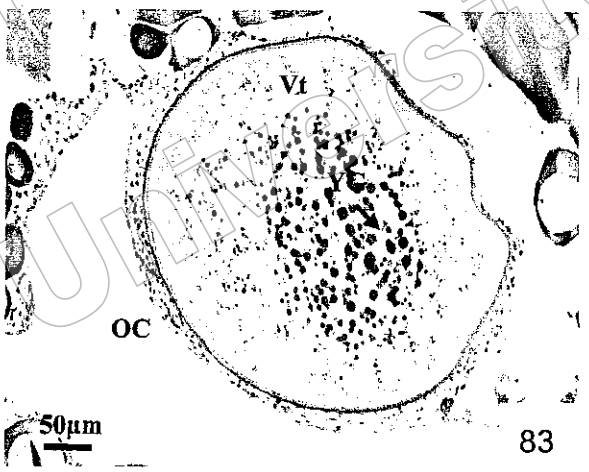



80

81

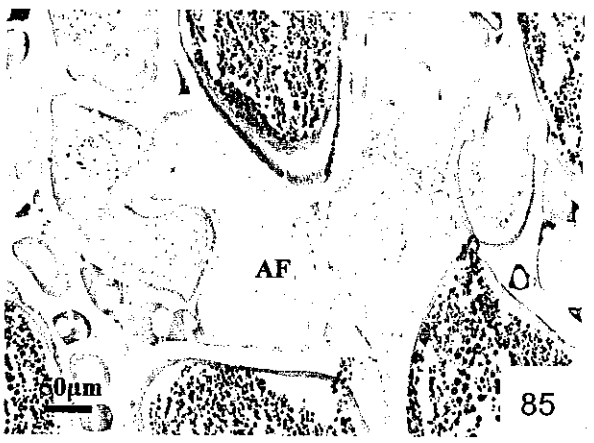



82




83

84




85

**ภาพที่ 86** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ตัด semithin section พบ male zone และ female zone อยู่ปนกัน Og, oogonia; PNo, perinucleolar stage; TT,testicular tissue (Toluidene blue)

**ภาพที่ 87** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ตัด semithin section แสดงลักษณะไข่ในระยะ oogonia และ perinucleolar stage CNo, chromatin-nucleolus stage; Og, oogonia; PNo, perinucleolar stage (Toluidene blue)

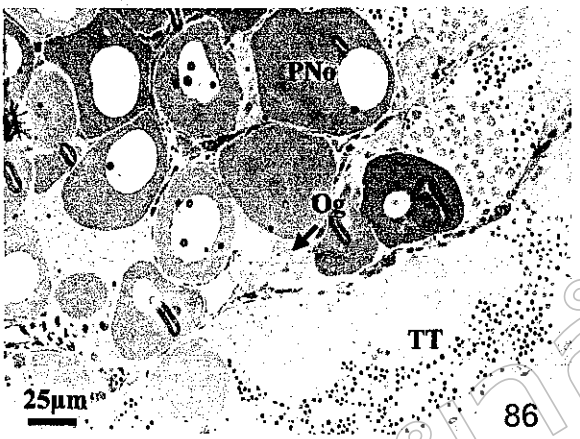
**ภาพที่ 88** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ตัด semithin section แสดงลักษณะไข่ใน perinucleolar stage Og, oogonia; PNo, perinucleolar stage (Toluidene blue)

**ภาพที่ 89** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ตัด semithin section แสดงลักษณะไข่ใน cortical alveoli stage GC, granulosa cell; OD, oil droplet; PNo, perinucleolar stage (Toluidene blue)

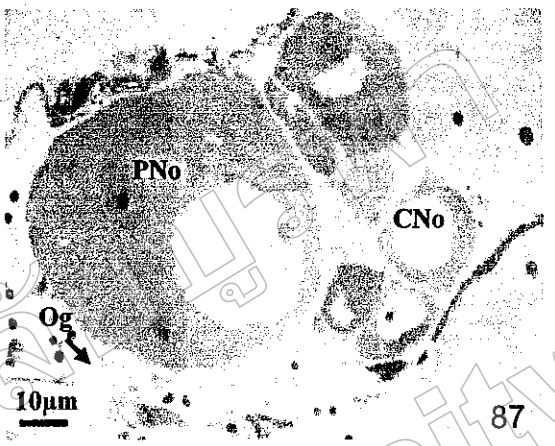
**ภาพที่ 90** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ตัด semithin section แสดงลักษณะไข่ใน vitellogenic stage YG, yolk granule (Toluidene blue)

**ภาพที่ 91** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา ตัด semithin section แสดงโครงสร้างของไข่ใน vitellogenic stage ZE, zona externa; ZI, zona interna; OD, oil droplet; TE, theca externa; TI, theca interna; YG, yolk granule (Toluidene blue)

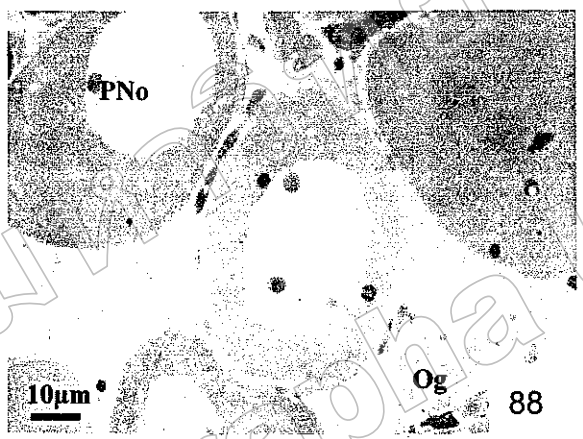
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



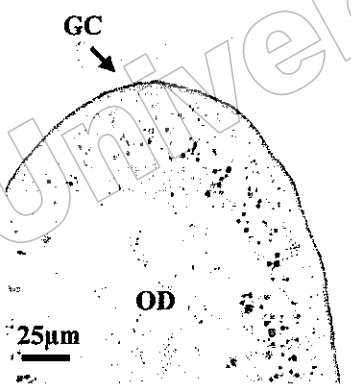

86



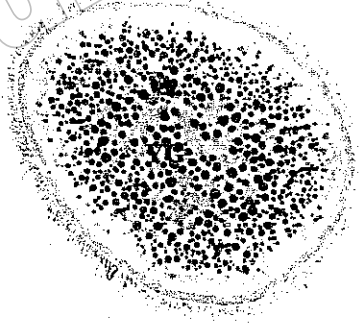

87



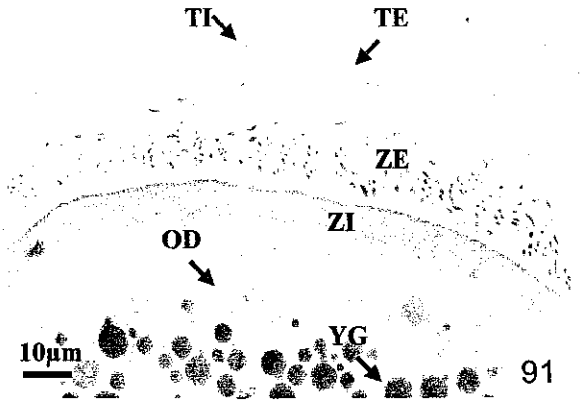

88




89




90




91

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

**ภาพที่ 92** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของ Sertoli cell ซึ่งพบบริเวณฐาน spermatocyst Sg, spermatogonia; SC, Sertoli cell; Sy, spermatocyst (Uranyl acetate & Lead citrate)

**ภาพที่ 93** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของ spermatogonia M, mitochondria; Sg, spermatogonia; No, nucleous (Uranyl acetate & Lead citrate)

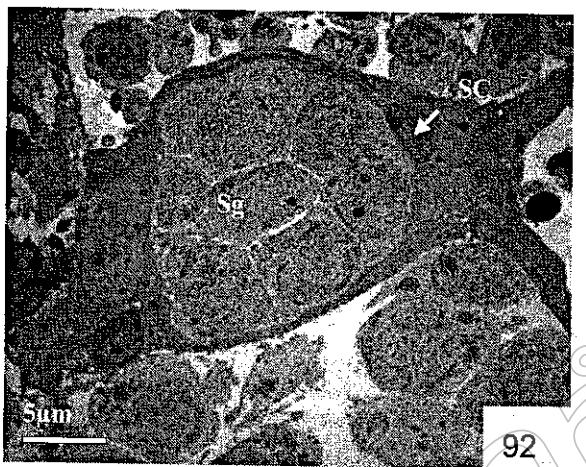
**ภาพที่ 94** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของ primary spematocyte M, mitochondria; NM, nuclear membrane; PSc, primary spematocyte (Uranyl acetate & Lead citrate)

**ภาพที่ 95** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดง synaptonemal complex ใน primary spermatocyte M, mitochondria; PSc, primary spematocyte; SnC, synaptonemal complex; (Uranyl acetate & Lead citrate)

**ภาพที่ 96** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของ secondary spermatocyte เปรียบเทียบกับ primary spematocyte และ spermatid PSc, primary spematocyte; SSc, secondary spermatocyte; St, spermatid (Uranyl acetate & Lead citrate)

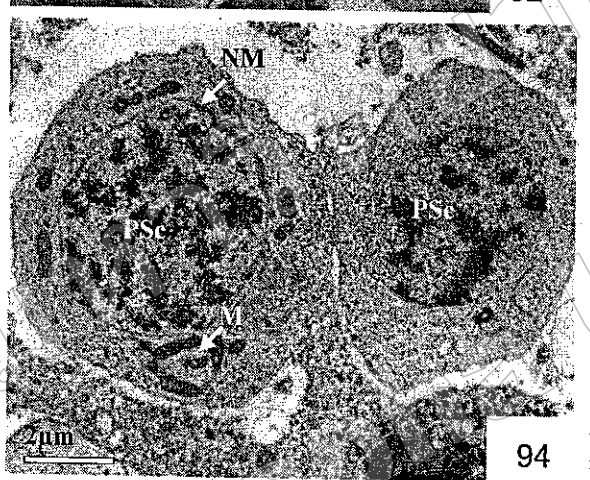
**ภาพที่ 97** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของ secondary spermatocyte Cy, cytoplasm; M, mitochondria; SSc, secondary spermatocyte (Uranyl acetate & Lead citrate)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

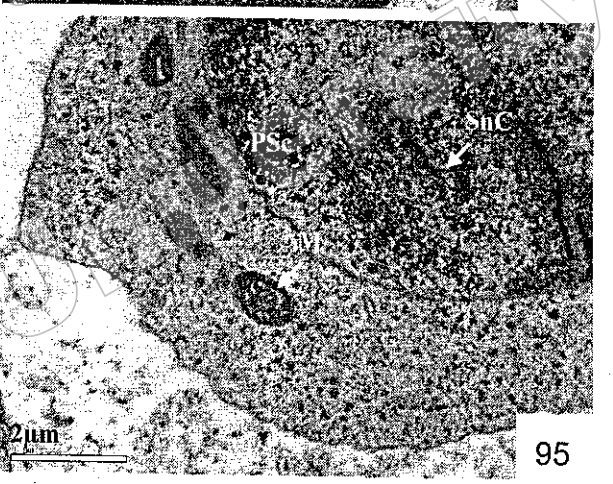



92

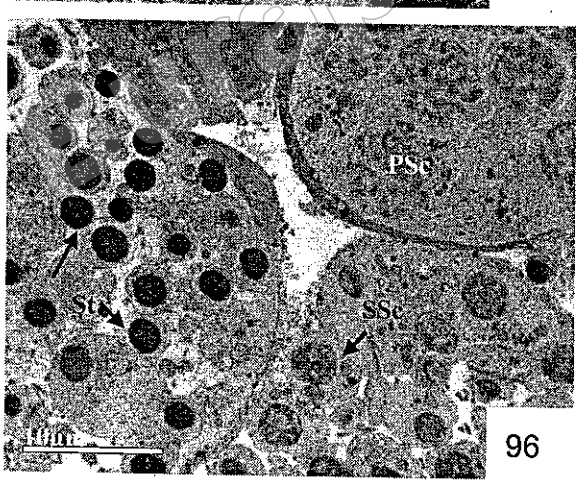
93




94




95




96

97

ภาพที่ 98 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของ spermatid ซึ่งเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็น spermatozoa Cy, cytoplasm; St, spermatid; Sz, spermatozoa

(Uranyl acetate & Lead citrate)

ภาพที่ 99 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงโครมาตินในนิวเคลียสของ spermatid มีการอัดกันแน่น Cy, cytoplasm; M, mitochondria; N, nucleus (Uranyl acetate & Lead citrate)

ภาพที่ 100 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของ spermatozoa BB, basal body; Cy, cytoplasm; M, mitochondria; N, nucleus; F, flagellum (Uranyl acetate & Lead citrate)

ภาพที่ 101 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงโครงสร้างของ flagellum ตัดตามขวาง Ax, axoneme

(Uranyl acetate & Lead citrate)

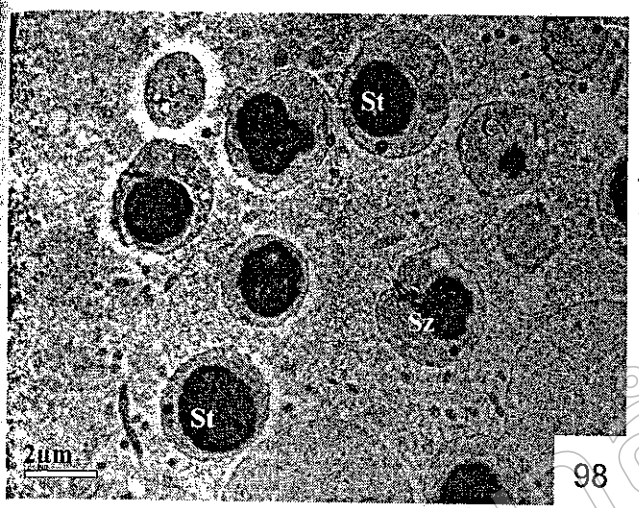
ภาพที่ 102 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของ sperm flagellum ตัดตามยาว Ax, axoneme

(Uranyl acetate & Lead citrate)

ภาพที่ 103 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของ Sertoli cell SC, Sertoli cell; St, spermatid; Sz, spermatozoa

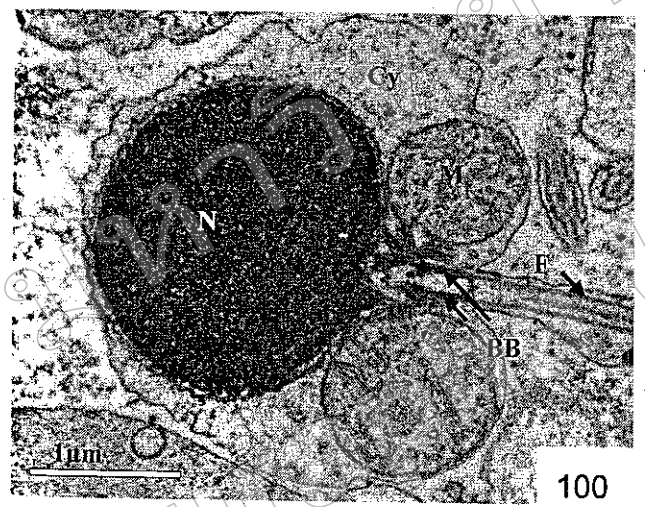
(Uranyl acetate & Lead citrate)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

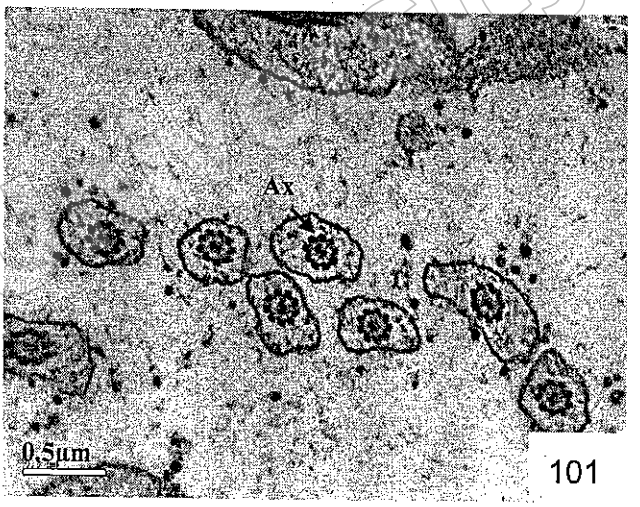



98

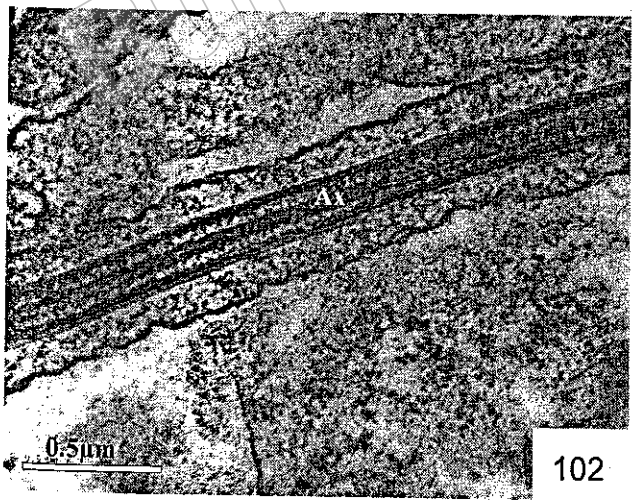
99



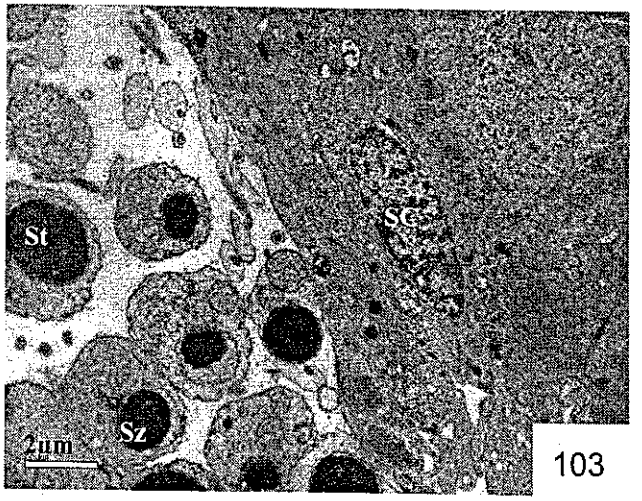

100




101




102




103

ภาพที่ 104 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงแสดงลักษณะของ oogonia N, nucleus; NM, nucleus membrane; No, nucleolus; Og, oogonia (Uranyl acetate & Lead citrate)

ภาพที่ 105 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงโครงสร้างของ oogonia Cy, cytoplasm; N, nucleus; No, nucleolus; R, ribosome (Uranyl acetate & Lead citrate)

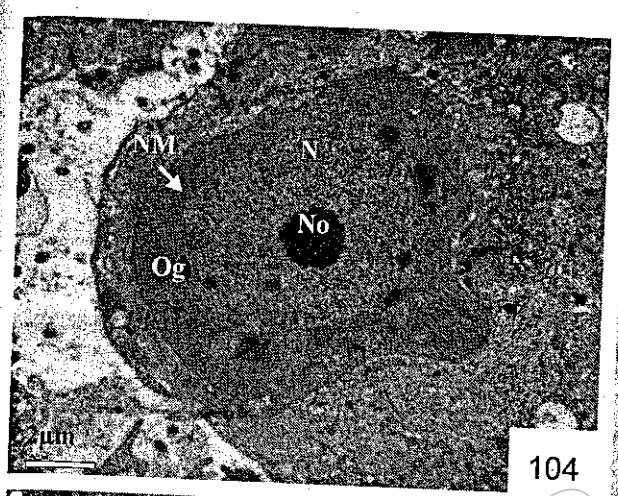
ภาพที่ 105 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงโครงสร้างของ oogonia M, mitochondria; N, nucleus; No, nucleolus; R, ribosome (Uranyl acetate & Lead citrate)

ภาพที่ 107 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะไข่ chromatin-nucleolus stage Cy, cytoplasm; FC, follicular cell; N, nucleus (Uranyl acetate & Lead citrate)

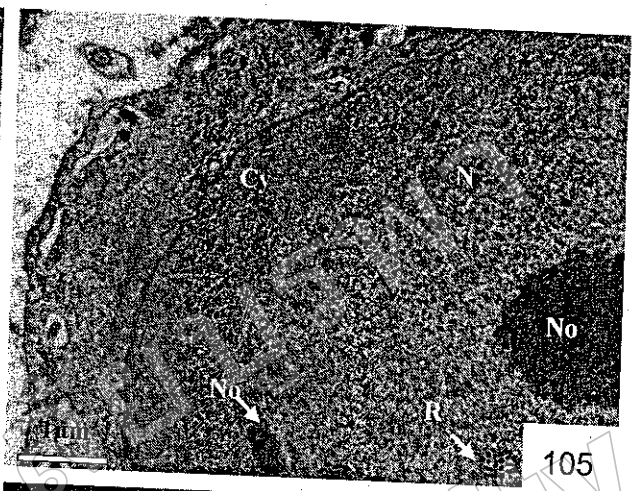
ภาพที่ 108 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงชั้น follicular cell Cy, cytoplasm; FC, follicular cell (Uranyl acetate & Lead citrate)

ภาพที่ 109 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงโครงสร้างไข่ chromatin-nucleolus stage Cy, cytoplasm; M, mitochondria; No, nucleolus; (Uranyl acetate & Lead citrate)

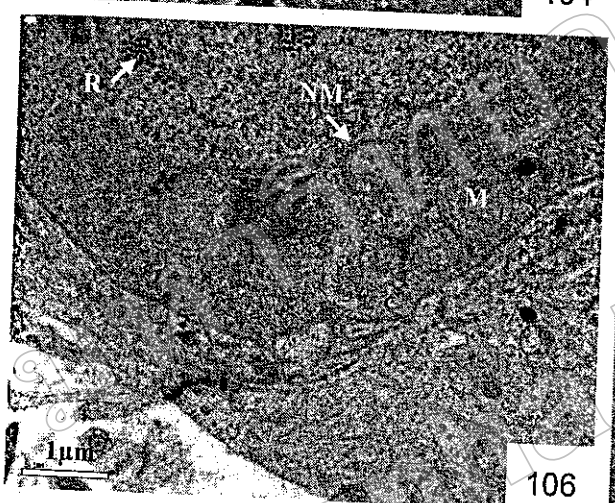
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



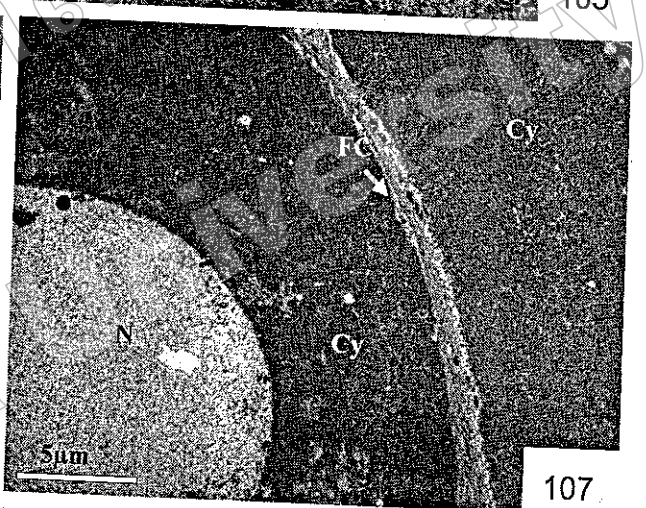

104



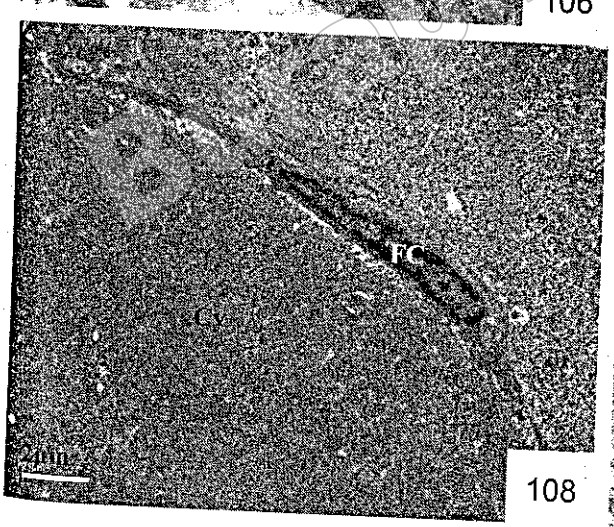

105



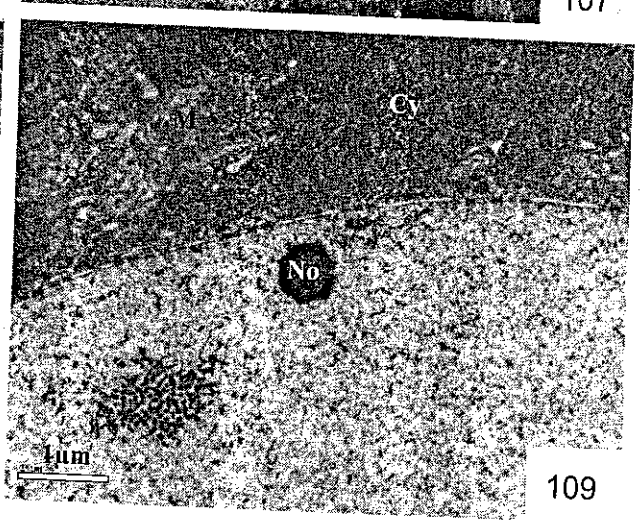

106




107




108




109

**ภาพที่ 110** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะไข่ perinucleolar stage Cy, cytoplasm; N, nucleus; No, nucleolus; R, ribosome (Uranyl acetate & Lead citrate)

**ภาพที่ 111** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดง Nucleopore ของไข่ perinucleolar stage Cy, cytoplasm; N, nucleus; NP, nucleopore; No, nucleolus (Uranyl acetate & Lead citrate)

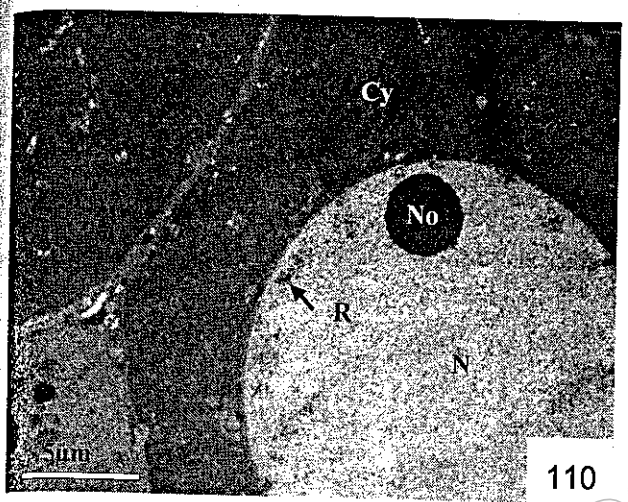
**ภาพที่ 112** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดง microvilli ในชั้น zona radiata FC, follicular cell; Cy, cytoplasm; Mv, micovilli (Uranyl acetate & Lead citrate)

**ภาพที่ 113** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดง microvilli ในชั้น zona radiata ของไข่ perinucleolar stage BM, basement membrane; Mv, micovilli; TC, theca cell (Uranyl acetate & Lead citrate)

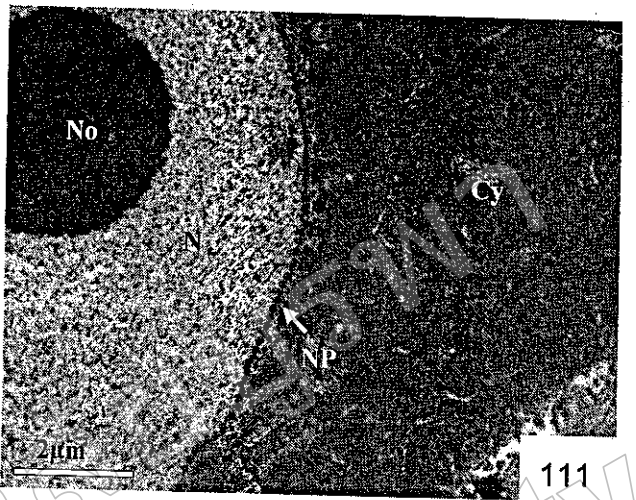
**ภาพที่ 114** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงโครงสร้างของไข่ cortical alveoli stage Cy, cytoplasm; N, nucleus; NM, nuclear membrane; OD, oil droplet (Uranyl acetate & Lead citrate)

**ภาพที่ 115** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะ oil droplet ในไข่ cortical alveoli stage Cy, cytoplasm; OD, oil droplet (Uranyl acetate & Lead citrate)

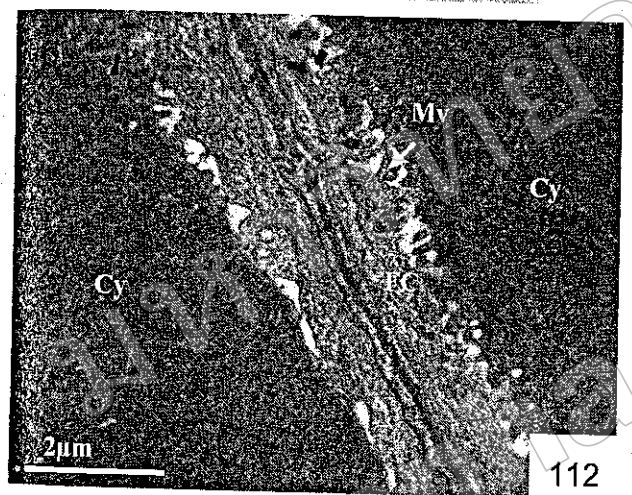
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



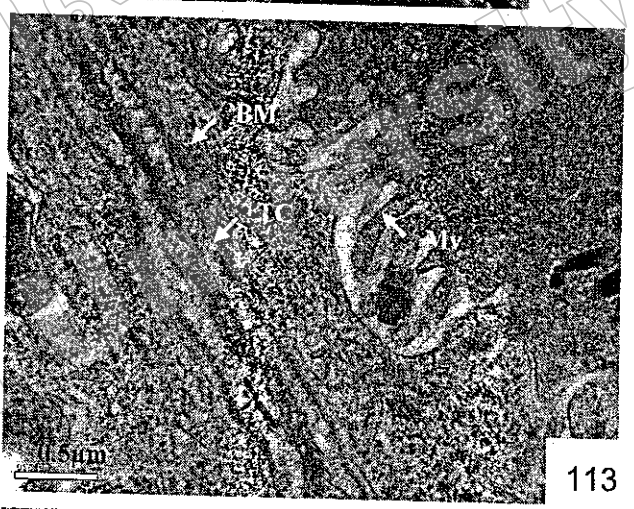

110



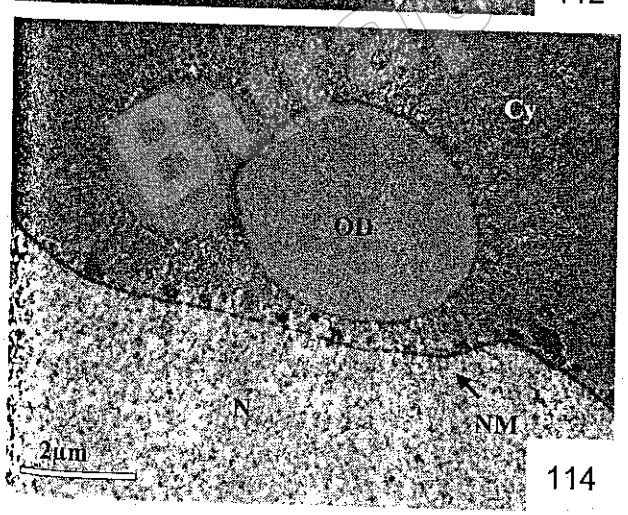

111



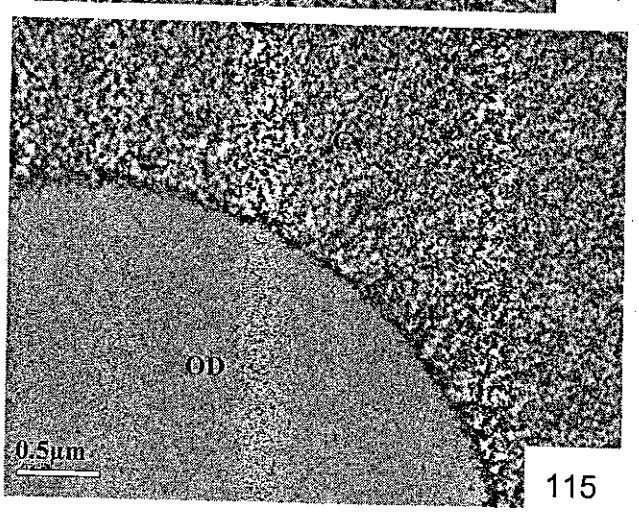

112




113




114




115

**ภาพที่ 116** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section ของไข่ vitellogenic stage แสดงลักษณะ oil droplet และ yolk granule OD, oil droplet; YG, yolk granule (Uranyl acetate & Lead citrate)

**ภาพที่ 117** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของชั้น follicular cell ในไข่ vitellogenic stage BM, basement membrane; GC, granulosa cell; TE, theca externa; TI, Theca interna; YG, yolk granule; ZR, zona radiata (Uranyl acetate & Lead citrate)

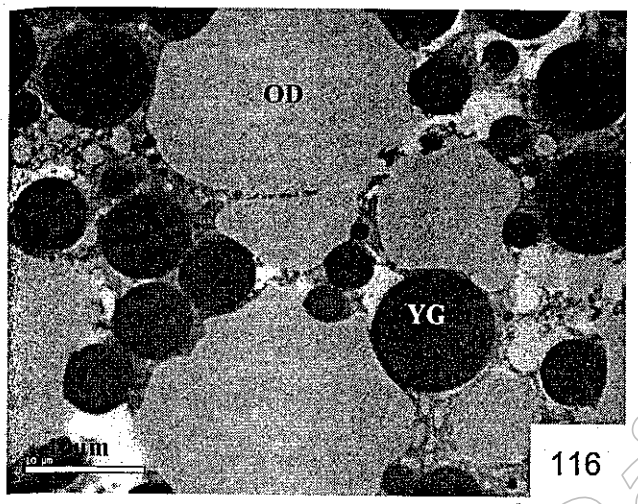
**ภาพที่ 118** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของ zona externa และ zona interna ในไข่ vitellogenic stage ZE, zona externa; ZI, zona interna (Uranyl acetate & Lead citrate)

**ภาพที่ 119** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะไข่ maturation stage OD, oil droplet; YG, yolk granule (Uranyl acetate & Lead citrate)

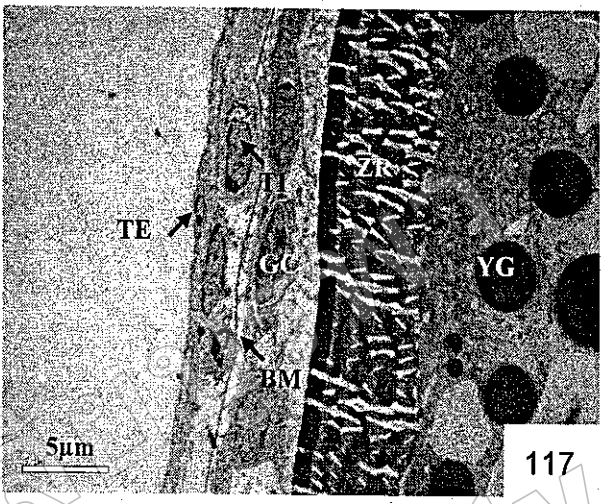
**ภาพที่ 120** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของไข่ใน maturation stage GC, granulosa cell; ZE, zona externa; ZI, zona interna (Uranyl acetate & Lead citrate)

**ภาพที่ 121** ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ตัด ultrathin section แสดงลักษณะของไข่ใน maturation stage BM, basement membrane; ZE, zona externa; GC, granulosa cell; TE, theca externa; TI, Theca interna (Uranyl acetate & Lead citrate)

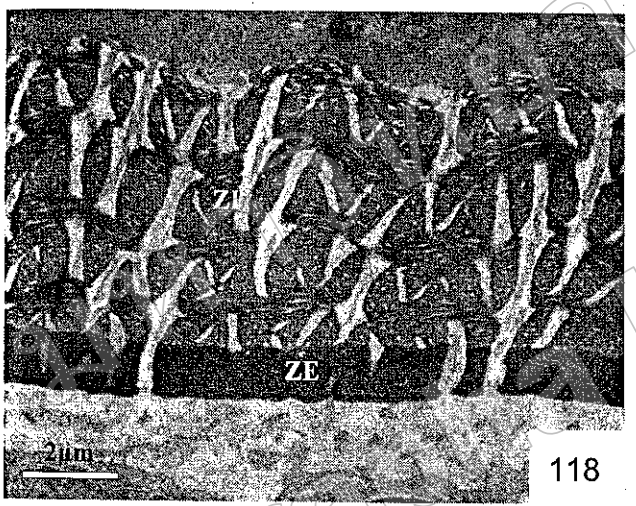
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



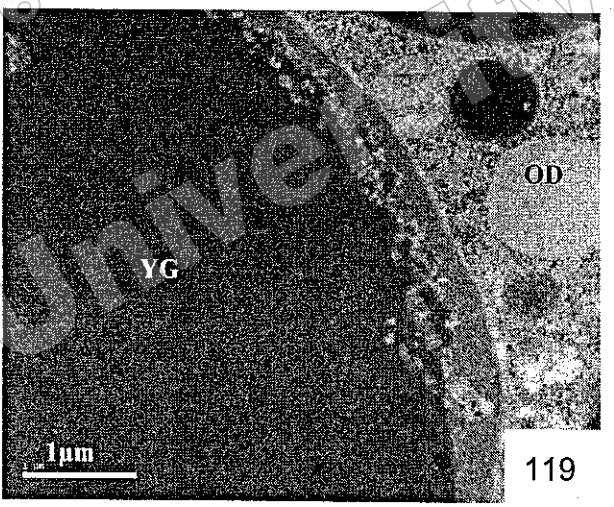

116



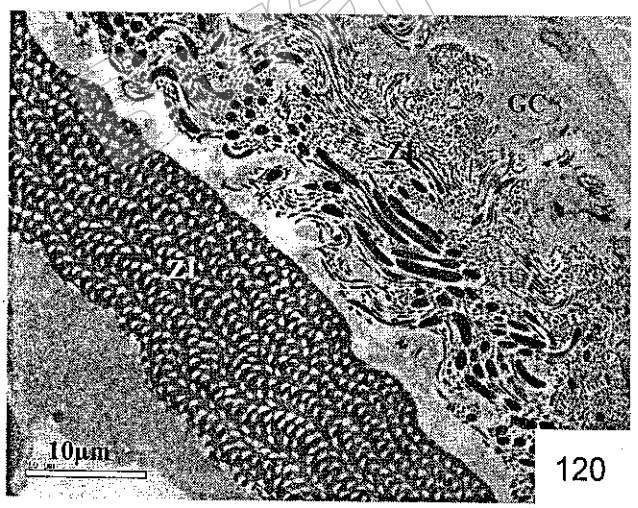

117



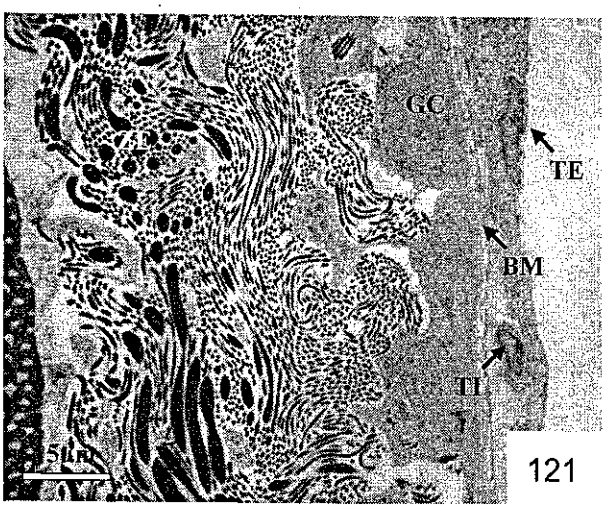

118




119




120




121

# เอกสารและสิ่งอ้างอิง

ชนิษฐา ทรรพนันทน์ และ รังสรรค์ ฉายากุล. 2543. ชีววิทยาประชากร 1: การศึกษาชีวประวัติสัตว์น้ำ, น. 7-14. ใน ชนิษฐา ทรรพนันทน์, บรรณาธิการ. **ชีววิทยาประมง.** สำนักพิมพ์รั้วเขียว, กรุงเทพฯ. 146 น.

ปิยากร บุญยัง. 2546. **วงจรการสืบพันธุ์และโครงสร้างเนื้อเยื่อรังไข่ของปลาบู่ทราย.** วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิมล เหมะจันทร์. 2536. **ปลาวัยอ่อน : ความรู้เบื้องต้น.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 242 น.

วิมล เหมะจันทร. 2540. **ชีววิทยาปลา.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ. 318 น.

วีระพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. 2536. **การเพาะขยายพันธุ์ปลา.** สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ. 194 น.

สุภาพร สุกสีเหลือง. 2542. **มีนวิทยา.** สำนักพิมพ์พิมพ์ดีจำกัด, กรุงเทพฯ. 568 น.

อุทัยรัตน์ ณ นคร. 2538. **การเพาะขยายพันธุ์ปลา.** สำนักพิมพ์รั้วเขียว มหาวิทยาเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 231 น.

อุทัยวรรณ โกวิทวที. 2536. **เอกสารประกอบการสอนวิชาการเก็บรักษาตัวอย่างสัตว์.** ภาควิชาสัตววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 254 น.

อุ่นจิต ปาติยเสวี. 2537. การศึกษาพฤติกรรมการวางไข่และการเจริญเติบโตของปลาการ์ตูนส้มขาว False Clown Anemonefish, *Amphiprion ocellaris* (Covier 1830), 393-412. ใน **รายงานการสัมนาวิชาการปี** 2537. กรมประมง, กรุงเทพฯ.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Abu-Hakima, R. 1984. Some aspects of the reproductive biology of *Acanthopagrus* spp. (Family: Sparidae). **J. Fish Biol.** 25: 515-526.

_____ 1987. Aspect of the reproductive biology of the grouper, *Epinephelus tauvina* (Forskäl) in Kuwaiti waters. **J. Fish Biol.** 30: 213-222.

Akagawa, I., Y. Tsukamoto and M. Okiyama. 1995. Sexual dimorphism and pair spawning into a spong by the filefish, *Brachaluters ulvarum*, with a description of the eggs and larvae. **Jpn. J. Ichthyol.** 41 (4) : 397-407.

Allen, G. R. 1972. **The Anemonefishes: Their Classification and Biology.** T.F.H. Publications, Inc., Neptune City, New Jersey. 288 p.

_____ 1980. **Anemonefishes of the World: Species, Care, and Breeding.** Aquarium Systems. Mentor, Ohio. 104 p.

_____ 1991. **Demselfishes of the World.** MERGUS Publishers Hans A. Baensch. Melle. 271 p.

Andrew, W. and C. P. Hickman. 1974. **Histology of the Vertebrates.** The C.V. Mosby Company, St. Louis. 439 p.

Anonymous. 1999. **Courtship, spawning and incubation: Breeding.** Available Source: http://www.uoguelph.ca/~laurelma/breeding.htm, July 14, 2002.

_____ 2002. **Anemonefishes-damselfishes (Amphiprioninae).** Available Source: http://www.starfish.ch/reef/anemonefish.html, July 12, 2002.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

——— n.d. **Anemonefishes and their host sea anemones.** Available Source: http://www.biodiversity.uno.edu/ebooks/ch1.html, July 16, 2002.

Arai, H. 1994. Spawning behavior and early ontogeny of a Pomacanthid Fish, *Chaetodontoplus duboulayi*, in an aquarium. **Jpn. J. Ichthyol.** 41(2): 181-187.

Arocha, F. 2001. Oocytes development and maturity classification of swordfish from the north-western Atlantic. **J. Fish Biol.** 60: 13-27.

Arvedlund, M. 2002. **A study of possible imprinting in anemonefishes (Family: Pomacentridae).** Available Source: http://www.aslo.org/dialog/200004-4.htm. July 20, 2002.

Balon, E. K. 1975. Terminology of intervals in fish development. **J. Fish Res. Board. Can.** 32 : 1663-1667.

Baccetti, B. and B. A. Afzelius. 1976. The biology of the sperm cell. **Monogr. Dev. Biol.** 10: 1-25.

Begovac, P. and R. Wallace. 1988. Stage of oocyte development in the pipefish *Syngnathus scovelly* **J. Morphol.** 197: 353-369.

Bell, L. J. 1976. Note on the nestirig success and fecundity of the anemonefish *Amphiprion clarkii* at Miyake-Jima. **Jpn. J. Ichthyol.** 22 (4) : 207-211.

Bern, O. and R. R. Avtalion. 1990. Some morphological aspects of fertilization in Tilapias. **J. Fish Biol.** 36: 375-381.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Billard, R. 1969. Ultrastructure comparee de spermatozoides de quelques poissons Teleosteens, pp. 71-79. In B. Bacetti. ed. **Comparative Spermatology.** Academic Press, London.

Bozzola, J. J. and L. D. Russell. 1992. **Electron Microscopy: Principles and Techniques for Biologists.** Jones and Bartlett Publishers. Boston. 542 p.

Brusle-Sicard, S. and R. Reinboth. 1990. Protandric hermaphrodite peculiarities in *Amphiprion fenatus* Brevoort ( Teleostei, Pomacentridae). **J. Fish Biol.** 36: 383-390.

———, ——— and B. Foucault. 1990. Germinal potentialities during sexual stage changes in a protandric hermaphrodite *Amphiprion fenatus* Brevoort (Teleostei, Pomacentridae). **J. Fish Biol.** 45: 597-611.

Carrasson, M. and M. Bau. 2003. Reproduction and gonad histology of *Aidablennius sphinx* (Pisces: Blenniidae) of the Catalan Sea (northwestern Mediterranean). Sci. Mar. 67(4): 461-469.

Colombo, G., G. Grandi and R. Rossi. 1984. Gonad differentiation and body growth in *Anguilla anguilla*. **J. Fish Biol.** 24: 215-22

——— and ———. 1996. Histological study of the development and sex differentiation of the gonad in the European eel. **J. Fish Biol.** 48: 493-512.

Conn, D. B. 1991. **Atlas Invertebrate Reproduction and Development.** Wiley-Liss, Inc., New York. 252 p.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Cyrus, D. P. and S. J. Blaber. 1984. The reproductive biology of *Gerres* in Natal estuaries. J. Fish Biol. 24: 491-504.

D' Ancona, U. 1945. Sexual differentiation of the gonad and sexualization of the germ cells in teleosts. **Nature Biol.** 156: 603-605.

_____ 1957. Nuove ricerche sulla determinazion sessuale dell'anguilla. II. Le influenze ambientail sul differenziamento della gonade. **Arch. Oceano. Limnol.** 11: 69-111.

_____ 1959. Distribution of the sexes and environmental influence in the European eel. **Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.** 48: 61-70.

Delsman, H.C. 1930. Fish eggs and larvae from the Java Sea. Treubia 12 (3-4) : 367-370.

Droller, M. J. and T. F. Roth. 1966. An electron microscope study of yolk formation during oogenesis in *Lebistes retculatus*. Guppyi. **J. Cell Biol.** 28: 209-232.

Dumont, J. E. and A. R. Brummet. 1985. Egg envelope in vertebrates, pp. 235-288. In. L. Browder, eds. **Development Biology: A Comprehensive Synthesis, Vol. 1**. Plenum Press, New york.

Eda, H., T. Takita and Y. Uno. 1995a. Larval and juvenile development of dragonets, *Repomucenus richardsonii* and *R. valenciennei*, reared in a laboratory. **Jpn. J. Ichthyol.** 41(2): 149-158.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

———, T. Fujiwara and T. Takita. 1995b. Embryonic larval and juvenile development in laboratory-reared dragonets, *Repomucenus beniteguri*. **Jpn. J. Ichthyol.** 40(4): 465-473.

Febvre, M., M. Michele and M. Lafaurie. 1975. Comparaison de la sequence ovogenetique chez des teleosteens ovipares gonochoriques et hermaphrodites *Mullus Serranus*, *Boops*. **Pubbl. Staz. Zool. Napoli.** 39: 140-152.

Fishelson, L. 1965. Observation and experiments on the Red Sea anemones and their symbiotic fish *Amphiprion bicinctus*. **Bull. Sea Fish, Red Stat. Haifa.** 39 : 1-14.

——— 1970. Protogynous sex reversal in the fish *Anthias squamipinnis* regulated by the presence or absence of a male fish. **Nature Biol.** 227: 90-91.

Forberg, K. G. 1982. A histological study of development of oocyte in Copelin, *Mallotus villosus* (Muller). **J. Fish Biol.** 20: 143-154.

Fouda, M. M., M. Y. Hanna and F. M. Fouda. 1993. Reproductive biology of a red sea goby, *Silnouettea aegypttea*, and a mediteranean goby, *Potaoschistus marmoratus*, in Lake Timsah, Suez Canal. **J. Fish Biol.** 43: 139-151.

Foyle, T. P. 1993. A histological description of gonadal development and sex differentiation in the coho salmon, *Oncorhynchus kisutch*. for both untreated and oestradial immersed fry. **J. Fish Biol.** 42: 699-712.

Fricke, H. W. 1979. Mating system resource defense and sex change in anemonefish *Amphiprion akallopisos*. **Z. Tierpsychol.** 50: 313-326.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

——— and S. Fricke. 1977. Monogamy and sex change by aggressive dominance in coral reef fish. **Nature, Lond.** 226: 830-832.

——— 1983. Social control of sex: field experiments with the anemonefish *Amphiprion bicinctus*. **Z. Tierpsychol.** 61: 71-77.

Garnaud, J. 1951. Nouvelles donnees sur l'Ethologie d'un Pomacentride : *Amphiprion percula* Lacepede. **Bull. Inst. Oceanogr (Monaco)** 998: 1-12. Cited by G. R. Allen. 1972. **The Anemonefishes: Their Classification and Biology**. T.F.H. Publications, Inc., Neptune City. New Jersey.

Garratt, P. A. 1986. Protogynous hermaprhoditism in the slinger, *Chrysoblephus Puniceus* (Gilchrist & Thompson, 1908) ( Teleostei: Sparidae). **J. Fish Biol.** 42: 699-712.

Grandi, G. and G. Columbo. 1997. Development and early differentiation of gonad in the European eel, *Anguilla anguilla* [L.] Anguilliformes, Teleostei: A cytological and ultrastruetural study. **J. Fish Morphol.** 231: 195-216.

Grassiotto, Q., C. Oliveira and A. E. Gosztonyi. 2001. The ultrastructure of spermiogenesis and spermatozoa in *Diplomystes mesembrinus*. **J. Fish Biol.** 58: 1623-1632.

Grizzle, J. M. and W. A. Rogers. 1976. **Anatomy and Histology of the Channel Catfish**. Auburn, Alabama. 94 p.

Groman, D. B. 1982. **Histology of the Striped Bass**. American Fisheries Society, Bethesda, Maryland. 119 p.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Guraya, S. S. 1965. A comparative histochemical study of fish *Channa maruleus.* and amphibian *Bufo stomaticus*. Oogenesis. **Zool. Zellforsch.** 65: 662-700.

——— 1978. Maturation of the follicular wall of non mammalian vertebrates, pp. 261-329. In R. Jones, eds. **The Vertebrate Ovary.** Plenum Press., New York.

——— 1986. The cell and molecular biology of fish oogenesis. **Mongr. Dev. Biol.** 18: 1-22.

——— 1995. Recent advances in the functional morphology of follicular wall, egg-surface components, and micropyle in the fish ovary, pp. 111-145. *In* J. S. D. Munshi. and H. M. Dutta, eds. **Fish Morphology.** Baba Barkha Nath, New Delhi.

Hamaguchi, S. 1992. Sex differentiation of germ cells and their supporting cell in *Oryzias latipes*. **Fish Biol. J. Medaka.** 4 : 11-18.

Hattori, A. 1991. Socially controlled growth and size- dependent sex change in the anemonefish Amphiprion frenatus in Okinawa, Japan. **Jpn. J. Ichthyol.** 38: 165-177.

——— and Y. Yanagisawa. 1991. Sex change of the anemonefish *Amphiprion Clarkia* in a habitat of high host density: a removal study. **Jpn. J. Ecol.** 41: 1-8.

Henningsen, A.D. 1989. An introduction to breeding clownfishes. **Trop. Fish Hobbyist.** 1989 : 97-99.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Hibiya, T. 1982. **An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features.** Kodansha. Ltd., Toyko. 138 p.

Hiroi, O. and K. Yamamoto. 1970. Studies on the maturation of salmonid fishes. II. changes in the testes of Musa salmon *Oncorhynchus masou*, during anadromous migration. **Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.** 20 : 252-264

Hoar, W. S. 1969. Reproduction, pp. 1-72. *In* W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson, eds. **Fish Physiology, Vol. III.** Academic Press, New York.

Hurk, R. and C. J. J. Richter. 1980. Histochemical evidence for granulosa steroids in follicle maturation in the African catfish. *Clarias lazera*. **Cell Tissue Res.** 211: 345-348.

Huang, J. D., M. F. Lee and C. F. Chang. 2002. The morphology of gonadal tissue and male germ cells in the protandrous black porge, *Acanthopagrus schlegeli*. **Zool. Studies** 41(2): 216-227.

Iwamatsu, T. 1994. Stages of normal development in the Medaka, *Oryzias latipes*. **Zool. Sci.** 11 : 825-839.

Jaspers, E. J., J. W. Avault, Jr. and J. D. Raussel. 1976. Spermatozoal Morphology and ultrastructure of channel catfish. *Icatalurus punctatus*. **Trans. Am. Fish Soc.** 105: 475-480.

Kagawa, H. 1991. Ultrastructural observations on the ovarian follicles of the yellowtail, *Seriola quiqueradiata*. during oocyte maturation and ovulation. **Aquaculture** 19: 1-10.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Kaneko, T. and I. Hanyu. 1985. Annual reproductive cycle of the chichibu-Goby, Tridentiger obscurus. **Bull. Jpn. Soc. Scient. Fish.** 51(10): 1645-1650.

———, ——— and K. Hirose. 1984. Annual reproductive cycle of the Tidepool-living goby, *Chasmichthys dolichonathus*. **Bull. Jpn. Soc. Scient. Fish.** 50(9): 1535-1540.

Kawase, H., N. Mochioka and A. Nakazono. 1993. Otolith increment formation and planktonic larval duration of a temperate damselfish, *Chromis notatus notatus*. **Jpn. J. Ichthyol.** 40 : 377-380.

——— and A. Nakazono. 1994. Embryonic and pre-larval development and Otolith increments in two filefishes, *Rudarius ercodes* and *Paramonacanthus japonicus* (Monacanthidae). **Jpn. J. Ichthyol.** 41 (1) : 57-63.

Kimmel, C. B., W. W. Ballard, S. R. Kimmel, B. Ullmann and T. F. Schilling. 1995. Stages of embryonic development of the Zebrafish. **Dev. Dyn.** 203: 253-310.

Lagler, K. F. 1969. **Freshwater Fishery Biology.** W.M. C. Brown Company Publishers, Dubugue, Iowa. 412 p.

Lahnsteiner, F. and R. A. Patzner. 1995. Fine structure of spermatozoa of two marine teleost fishes, the red mullet, *Mullus barbatus* (Mullidae) and the white sea bream, *Diplodus sargus* (Sparidae). **J. Submicrosc. Cytol. Pathol.** 28: 259-266.

———, B. Berger, T. Weismann and R. A. Patzner. 1997. Sperm structure and motility of the freshwater teleost *Cottus gobio*. **J. Fish Biol.** 50: 564-574.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Laird, L., M. Ellis, A. R. Wilson and F. G. T. Holliday. 1978. The development of the gonadal and immune systems in the Atlantic salmon *Salmo salar* and a consideration of the possibility of induced autoimmune destruction of the testis. **Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys.** 15 : 19-28.

Long, W. L. and W. W. Ballard. 2001. Normal embryonic stages of the longnose gar, *Lepisosteus osseus*. **Dev. Biol.** 1(1): 1-16.

——— and ——— 1976. Normal embryonic stages of the White sucker, *Catostomus commersoni*. **Copeia** 1976: 342-351.

Lo-Nostro, F. L., H. Grier, F. J. Meijide and G. A. Guerrero. 2003. Ultrastructure of the testis in *Synbranchus marmoratus* (Teleostei, Synbranchidae): the germinal compartment. **Tissue Cell** 35(2): 121-132.

Luckenbach, J. A., J. G. Godwin, H. V. Daniels and R. J. Borski. 2003. Gonadal differentiation and effects of temperature on sex determination in Sounthern flounder, *Paralichjthys Lethostigma*. **Aquaculture** 216: 315-327.

Luna, L. G. 1960. **Manual of Histological Staining Method of the Armed Forces Institute of Pathology.** 3d ed. McGraw-Hill, Co., New York. 258 p.

Mattei, X. 1970. Spermiogenese comaree des poisons, pp.57-69. *In* B. Baccetti, eds. **Comparative Spermatology.** Academic Press, New York.

——— 1991. Spermatozoon ultrastructure and its systematic implications in fishes. **Can. J. Zool.** 69: 3038-3055.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Mayer, I., S. E. Shackley and J. S. Ryland. 1988. Aspect of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. I. Histological and histochemical study of oocyte development. **J. Fish Biol.** 33: 609-622.

———, ——— and Witthames. 1990. Aspect of the reproductive biology of the bass, *Dicentrarchus labrax* L. II. Fecundity and pattern of oocyte development. **J. Fish Biol.** 36: 141-148.

Mayer, J. T. and A. Nakazona. 1978. Protandrous hermaphroditism in sex species of anemonefish genus *Amphiprion* in Japan. **Jpn. J. Ichthyol.** 20: 85-93.

———, and R.C. Steene. 1979. Nesting behavior of the anemonefish *Amphiprion polymnus*. **Jpn. J. Ichthyol.** 26 (2) : 209-214.

Micale, V. and F. Perdichizzi. 1994. Further studies on the sexuality of the hermaphroditic teleost *Diplodus sargus*, with particular reference to protandrous sex inversion. **J. Fish Biol.** 45: 661-670.

Moe, M. A., Jr. 1969. Biology of the red grouper, *Epinephelus morio* (Valenciennes) from Eastern Gulf of Mexico. **Florida Dept. Natur. Resources Marine Res. Lab.** Professional Papers Series No. 10. 151 p.

Morrison, C. M., T. Miyaki and J. R. Wright, Jr. 2001. Histological study of the development of the embryo and early larvae of *Orechromis niloticus* (Pisces: Cichlidae). **J. Morphol.** 247: 172-195.

Munoz, M., M. Sabat, S. Mallo and M. Casadevall. 2002. Gonadal structure and ametogenesis of *Trigly lyra* (Pisces: Triglidae). **Zool. Studies** 41(4): 412-420.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Nagahama, Y. 1983 The functional morphology of teleost gonads, pp. 223-275. *In* W. S. Hoar, D. J. Randall and E. M. Donaldson, eds. **Fish Physiology, Vol. IX.** Academic Press, New York.

Nakamura, M., H. Takahashi and O. Hiroi. 1974. Sex differentiation of the gonad of the Musa salmon *Oncorhynchus masou*. **Scient. Rept. Hokkaido Fish Hatchery** 28 : 1-8.

Ochi, H. 1989. Mating behavior and sex change of the anemonefish *Amphiprion clarkia* in temperate waters of southern Japan. **Env. Biol. Fish.** 26: 257-275.

——— and Y. Yanagisawa. 1987. Sex Change and Social Structure in Anemonefish in Temperature Water., pp. 239-241. *In* Y. Ito, J. L. Brown and J. Kikkawa, eds. **Animal Societies: Theories and Facts,** Japan Scientific Societies Press Ltd., Tokyo.

Patiño, R. and F. Takashima. 1994. IX. Gonads, pp. 128-153. *In* F. Takashima and T. Hibiya, eds. **An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features.** Kodansha, Ltd., Tokyo.

Patzner, R. A. and G. Kaurin. 1997. Sexual differentiation in *Sararia pava*. **J. Fish Biol.** 50: 887-894.

Pollock, B. R. 1985. The reproductive cycle of yellowfin bream, *Acanthopagrus australis* (Günther), with particular reference to protandrous sex inversion. **J. Fish Biol.** 26: 301-311.

Purkett, C. A. 1961. Reproduction and early development of the Paddlefish. **Trans. Am. Fish. Soc.** 90(2) : 125 -129.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Ravaglia, M. A. and M. C. Maggese. 2003. Ovarian follicle ultrastructure in the teleost *Synbranchus marmoratus* (Bloch, 1795), with special reference to the vitelline envelope development. **Tissue Cell** 35 (1): 9-17.

Reinboth, R. 1962. Morphologische und fuktionelle zweigeschlechtlichkeit bei marinen teleostiern ( Serranidae, Sparidae, Centracanthidae, Labridae). **Zool. Jahrb. Abt. Allg. Zool. Physiol.** 69: 405-480.

Reinboth, R. 1970. Intersexuality in fishes. **Mem. Soc. Endocrinol.** 18: 515-543.

Richards, W. J. and V. P. Saksena. 1980. Description of larvae and early juvenile of laboratory-reared Gray snapper, *Lutjianus griseus* (lLinnaeus) (Pisces, Lutjanaidae). **Bull. Marine Sci.** 30(2): 515-522.

Robertson, J. G. 1953. Sex differentiation in the Pacific salmon. *Oncorhynchus keta* (Walbaum). **Can. J. Zool.** 31 : 73-79.

Ross, R. M. 1978a. Reproductive behavior of the anemonefish *Amphiprion melanopus* on Guam. **Copeia** 1978: 103-107.

——— 1978b. Territorial behavior and ecology of the anemonefish *Amphiprion melanopus* on Guam. **Z. Tierpsychol.** 46: 71-83.

Russell, F. S. 1976. **The Egg and Planktonic Stage of Britis Marine Fishes.** Academic Press Inc. Ltd., London. 524 p.

Scott, D. B. C. 1974. The reproductive cycle of *Mormyrus kannume* Forsk. Osteoglassomorpha, Mormyriformes in lake Victoria Uganda. **J. Fish Biol.** 6: 447-454.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Selman, K. and R. A. Wallace. 1989. Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. **Zool. Sci.** 6: 211-231.

_____, _____ and V. Barr. 1986. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. IV. Yolk vesicle formation. **J. Exp. Zool.** 239: 277-288.

_____, _____ and _____ 1988. Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. V. The relationship of yolk-vesicle and corticlal alveoli. **J. Exp. Zool.** 246: 42-56.

_____, _____, A. Sarka and X. Qi. 1993. Stage of oocyte development in the zebrafish, *Brachydanio rerio*. **J. Morphol.** 228: 203-224.

Sharpiro, D. Y. 1992. Plasticity of gonadal development and protandry in fish. **J. Exp. Zool.** 261: 194-203.

Smith, C. H. 1965. The patterns of sexuality and the classification of serranid fishes. **Am. Mus. Novitates.** 2207: 1-20.

Strüssmann, C. A., F. Takashima and K. Toda. 1996. Sex differentiation and hormonal feminization in pejerrey, *Odontesthes bonariensis*. **Aquaculture** 139: 31-45.

Sunobe, T. and A. Nakazono. 1989. Embryonic development and pre-larva of a gobiid fish *Priolepsis naraharac*. **Jpn. J. Ichthyol.** 35(4): 484-487.

Takashima, F. and T. Hibiya. 1995. **An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features.** 2nd ed. Kodansha, Ltd., Tokyo. 195 p.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Takita, T. 1980. Embryonic development and larvae of three Dragonets. **Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.** 40(1) : 1-7.

——— 1983. Embryonic and larval development of the Callionymid fish, *Callionymus calliste*. **Jpn. J. Ichthyol.** 20(4): 441-445.

Taylor, W. R. 1967. Outline of method of clearing tissue with pancreatic enzyme and staining bones of small vertebrates. **Turtox News** 45 (12): 308-309.

Tesoriero, J. V. 1977. Formation of the chorion (zona pellucida) in the teleost, *Oryzias latioes*. **J. Utrastruct. Res.** 59: 282-291.

Treasurer, J. W. and F. G. T. Holliday. 1981. Some aspects of reproductive biology of perch, *Perca fluviatilis* I. A histological description of the reproductive cycle. **J. Fish Biol.** 18: 359-376.

Tsukamoto, Y. and S. Kimura. 1993. Development of laboratory-reared eggs, larvae and juveniles of the Atherinid Fish, *Hypoatherina tsurugae*, and comparison with related species. **Jpn. J. Ichthyol.** 40(2): 261-267.

Verway, J. 1930. Coral reef studies. I. The symbiosis between damselfishes and sea anemones in Batavia Bay. **Treubia** 12 : 305-366.

Wallace, R. A. and K. Selman. 1981. Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. **Am. Zool.** 21: 325-343.

Wamatsu, T. 1994. Stage of normal development in the medaka, *Oryzias latipes*. **Zool. Sci.** 11: 825-839.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Warner, R. R. 1984. Mating behavior and hermaphroditism in coral reef fishes. Am. Sci. 72: 128-136.

Yamamoto, T. 1975. **Stage in the development.** Available Source: http://www.biol1.bio.nagoya-u.ac.jp:8000/Stages.html, July 21, 2002.

Yao, Z., C. J. Emerson and L. W. Crim. 1995. Ultrastructure of the spermatozoa and eggs of the ocean pout, *Macrozoarces americanus* L. an internally fertilizing marine fish. Mol. Reprod. Dev. 42: 58-64.

Yoneda, M., M. Tokimura, H. Fujita, N. Takashita, K. M. Matuyama and S. Matsura. 1998. Ovariant structure and batch fecundity in *Lophiomus setigerus*. J. Fish Biol. 52 : 94-106.

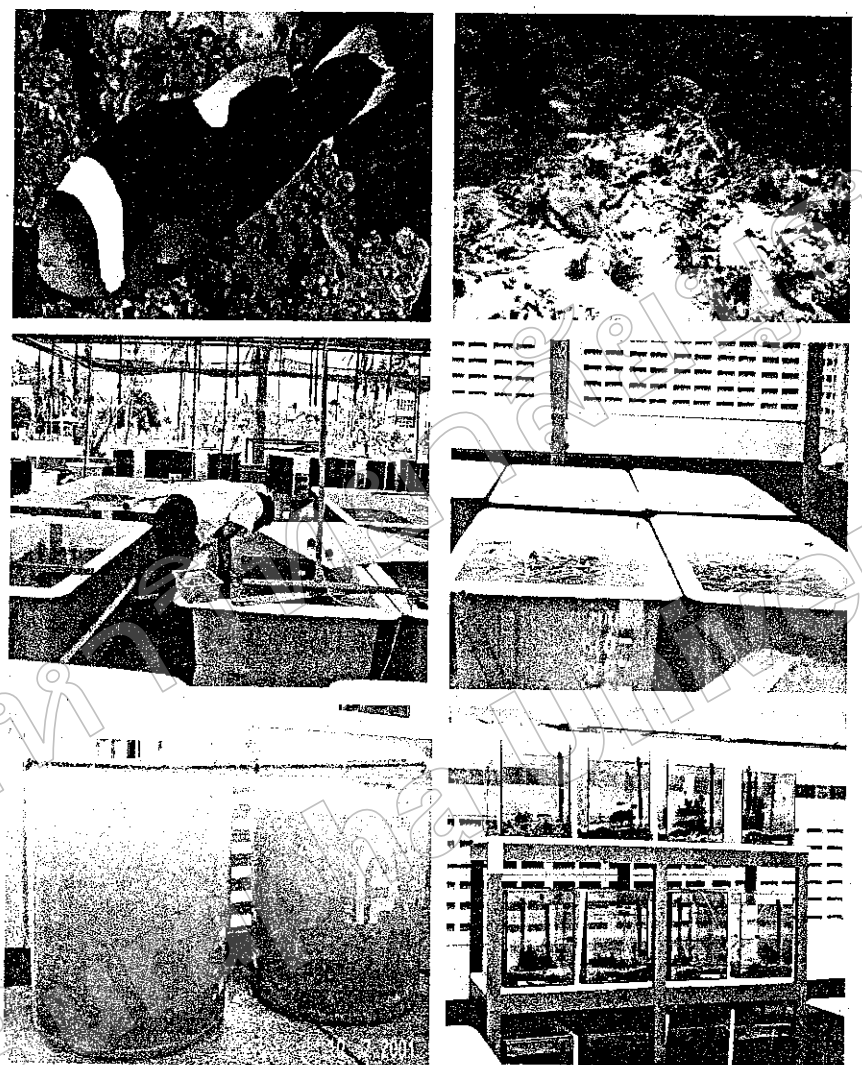
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

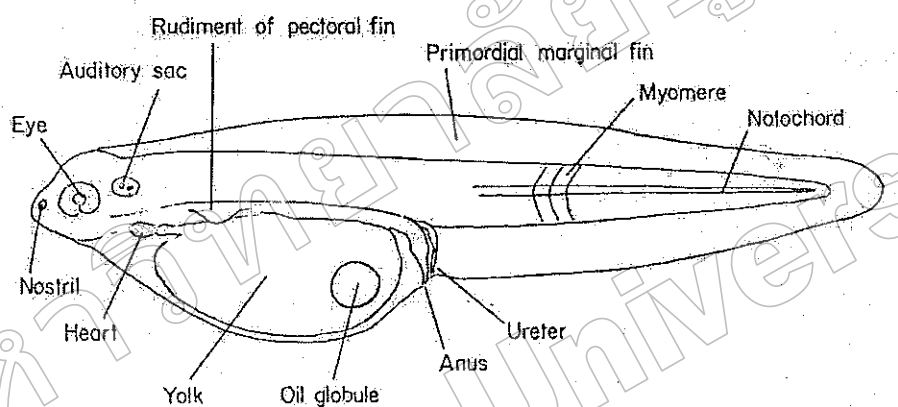
# ภาคผนวก ก
## ( ภาพประกอบ )

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University



**ภาพผนวก ก 1** ภาพแสดงลักษณะของปลาการ์ตูนและแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติ และโรงเพาะเลี้ยงและอนุบาลลูกปลาวัยอ่อน พร้อมทั้งลักษณะของตู้ที่ใช้เลี้ยงพ่อแม่พันธุ์จากธรรมชาติ

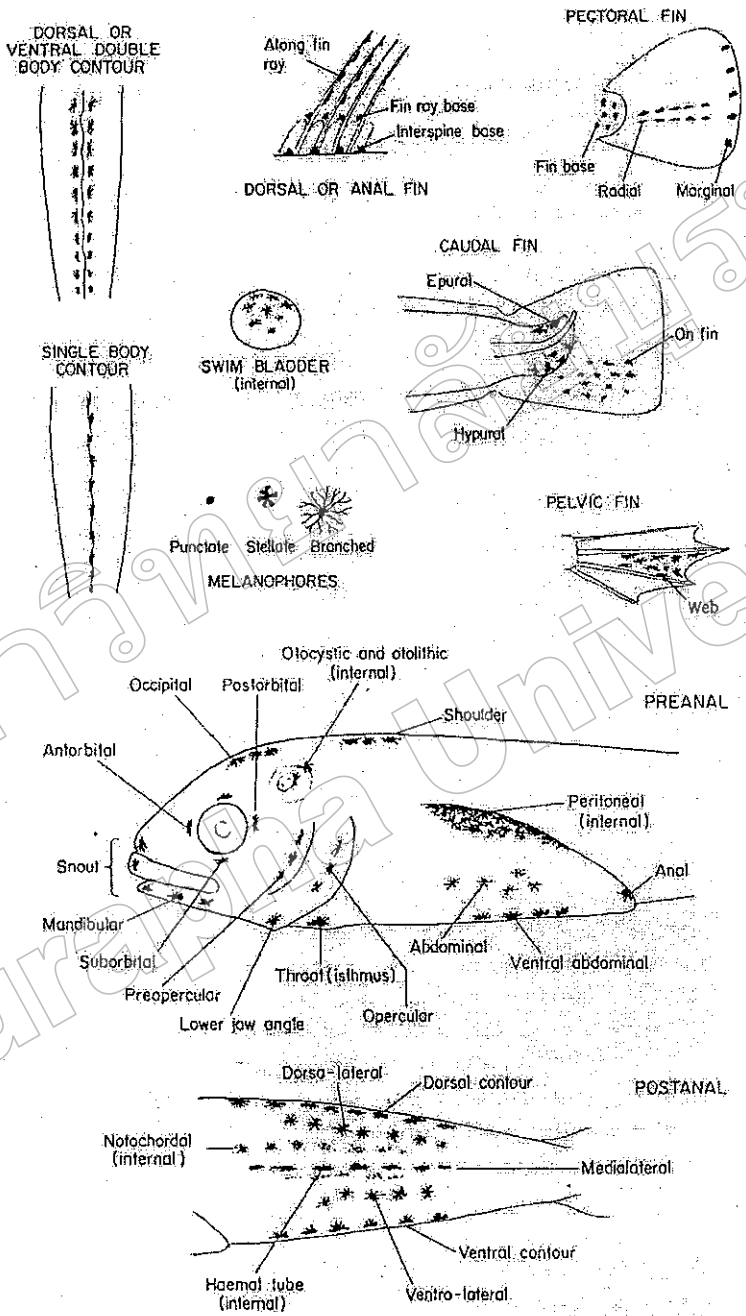
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




<u>ภาพผนวก ก 2</u> แสดงตำแหน่งของอวัยวะต่างๆในตัวอ่อนของลูกปลา

ที่มา: Russell (1976)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University




**ภาพผนวก ก 3** แสดงตำแหน่งของการเกิดเซลล์สารสีของตัวอ่อนลูกปลา

ที่มา: Russell (1976)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# ภาคผนวก ข
## ( การเตรียมสารเคมีและสีย้อม )

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

# การเตรียมสารเคมีและสีย้อม

สารเคมีและสีย้อมในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระดูกโดยวิธีการดองใส

1. น้ำยาคงสภาพ 10% Formalin solution

| | |
|---|---|
| 37-40% formalin | 100.0 ml |
| Water | 900.0 ml |

2. สีย้อมกระดูกอ่อน Alcian blue solution

| | |
|---|---|
| Alcian blue | 10.0 ml |
| Ethyl alcohol | 80.0 ml |
| Glacial acetic acid | 20.0 ml |

ละลายสี alcian blue ใน ethyl alcohol ให้หมดก่อนจึงค่อยเติม glacian acetic acid คนให้เข้ากัน

3. สีย้อมกระดูกแข็ง Alizarin red s solution

3.1 Stock solution

| | |
|---|---|
| Alizarin red s, saturated in 50%acetic acid | 5.0 ml |
| Choral hydrate 1% | 60.0 ml |
| Glycerine | 10.0 ml |

stock solution ควรเก็บไว้ในขวดสีชาและไว้ในตู้ที่เย็น

3.2 Working solution

| | |
|---|---|
| Stock solution | 15.0 ml |
| Potassium hydroxide 2% | 1,000.0 ml |

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. Potassium hydroxide 2%

| | |
|---|---|
| Potassium hydroxide | 2 gm |
| Water | 100.0 ml |

5. Choral hydrate 1%

| | |
|---|---|
| Choral hydrate | 1 gm |
| Water | 100.0 ml |

สารเคมีและสีย้อมในการศึกษาลักษณะทางมิญชวิทยา

1. Bouin's solution

| | |
|---|---|
| 37-40% formalin | 250.0 ml |
| Picric acid,saturated aqueous solution | 750.0 ml |
| Glacial acetic acid | 50.0 ml |

2. น้ำยาคงสภาพ 10% Neutral buffered formalin solution

| | |
|---|---|
| 37-40% formalin | 100.0 ml |
| Distilled water | 900.0 ml |
| Sodium phosphate monobasic | 4.0 gm |
| Sodium phosphate dibasic (anhydrous) | 6.5 gm |

2. Formic acid-sodium citrate method (decalcification )

3.1 Solution A

| | |
|---|---|
| Sodium citrate | 50.0 gm |
| Distilled water | 250.0 ml |

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2 Solution B

| | |
|---|---|
| 90% formic acid | 125.0 ml |
| Distilled water | 125.0 ml |

3.3 Working solution

| | |
|---|---|
| Solution A | 250.0 ml |
| Solution B | 250.0 ml |

4. Mayer's egg albumin

| | |
|---|---|
| Egg white | 50.0 ml |
| Glycerine | 50.0 ml |

ผสม ไข่ขาวและ glycerine ตีให้เข้ากันและนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง จากนั้นเติม thymal ลงไป 1-2 เกล็ดเพื่อกันเชื้อราและแบคทีเรีย ควรเก็บไว้ในตู้เย็นเสมอ

5. Harris' hematoxylin

| | |
|---|---|
| Hematoxylin crystals | 50.0 gm |
| Ammonium or potassium alum | 100.0 gm |
| Mercuric oxide (red) | 2.5 gm |
| Absolute alcohol | 50.0 ml |
| Distilled water | 1000.0 ml |

ละลาย hematoxylin crystals ใน absolute alcohol และละลาย ammonium or potassium alum ในน้ำร้อน นำสารละลายทั้งสองผสมและคนให้เข้ากัน จากนั้นนำไปต้มให้เดือดอย่างรวดเร็วภายในเวลา 1 นาที แล้วเอาออกจากความร้อน เติม mercuric oxide คนช้าๆ และให้ความร้อนอีกครั้งจนเป็นสีม่วง นำไปแช่ในน้ำเย็น ( ก่อนใช้เติม glacial acetic acid 2-4 ml / 100 ml สารละลาย )

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. Eosin- phloxine solution

6.1 Stock eosin

| | |
|---|---|
| Eosin Y | 1.0 gm |
| Distilled water | 100.0 ml |

6.2 Stock phloxine

| | |
|---|---|
| Phloxine B | 1.0 gm |
| Distilled water | 100.0 ml |

6.3 Working solution

| | |
|---|---|
| Stock eosin | 100.0 ml |
| Stock phloxine | 10.0 ml |
| Ethyl alcohol | 780.0 ml |
| Glacial acetic acid | 4.0 ml |

7. 1% acid alcohol

| | |
|---|---|
| 70% alcohol | 1,000.0 ml |
| Hydrochloric acid | 10.0 ml |

8. Ammonium water solution

| | |
|---|---|
| Tap water | 1,000.0 ml |
| Ammonium hydroxide 28% | 2-3 ml |

9. Weigert's trichrom method

9.1 Solution A

| | |
|---|---|
| Hematoxylin crystal | 1.0 gm. |
| Alcohol, 95% | 100.0 ml. |

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

9.2 Soultion B

| | |
|---|---|
| Ferric chloride | 4.0 ml |
| Distilled water | 95 ml. |
| Hydrochloic acid (conc.) | 1.0 ml |

ผสม solution A และ B ในอัตราส่วน 1:1

10. Biebrich scarlet acid fuchion solution

| | |
|---|---|
| Biebrich scarlet, (1% aqu.) | 90.0 ml. |
| Acid fuchion solution, (1% aqu) | 10.0 ml |
| Glacial acetic acid | 1.0 ml |

นำทุกอย่างผสมเข้าด้วยกัน

11. Phoshotungstic acid solution, 5%

| | |
|---|---|
| Phoshotungstic acid | 5.0 gm. |
| Distilled water | 100.0 ml. |

ละลายสาร phoshotungstic acid ลงในน้ำกลั่น

12. Aniline blue solution

| | |
|---|---|
| Aniline blue | 2.50 gm. |
| Distilled water | 100.0 ml. |
| Glacial acetic acid | 2.0 ml. |

ใส่ glacial acetic acid และ aniline blue ลงในน้ำกลั่น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการย้อมสี Harris hematoxylin และ Eosin

1. นำ paraffin section ไป deparaffinized และ dehydration จนถึงน้ำกลั่น
2. แช่ใน harris hematoxylin นาน 5-8 นาที
3. จุ่มใน 1% acid alcohol 3 ครั้ง
4. แช่ในน้ำประปาที่ไหลนาน 5-10 นาที
5. แช่ใน eosin solution 1-2 นาที
6. นำสไลด์ไป dehydration และ clearing
7. ปิดด้วย permount

ผล: - นิวเคลียสติดสีน้ำเงินม่วง

- ไซโทพลาซึมติดสีชมพูถึงสีแดง

วิธีย้อมสี Masson's trichrome (Aniline blue)

1. นำ paraffin section ไป deparaffinized และ dehydration จนถึงน้ำกลั่น
2. แช่ใน Weigert's iron hematoxylin solution นาน 10 นาที
3. แช่ในน้ำประปาที่ไหลนาน 10 นาที
4. จุ่มในน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง
5. แช่ใน Biebich scarlet acid fuchsin solution 10 นาที
6. จุ่มในน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง
7. แช่ใน 5% phosphotungstic acid 15 นาที
8. แช่ใน 2% aniline blue 6 นาที
9. จุ่มในน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง
10. จุ่มใน glacial acetic acid solution 2-3 ครั้ง
11. นำสไลด์ไป dehydration และ clearing
12. ปิดด้วย permount

ผล: - ไซโทพลาซึม, มัดกล้ามเนื้อ, และ intercellular fibers ติดสีแดงของ biebrich-scarlet acid fuchsin

- Collagen fiber ติดสีน้ำเงินของ aniline blue

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารเคมีและสีย้อมในการศึกษาตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด(SEM) (scanning electron microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน(TEM) ( transmission electron microscope)

1. Stock A solution: 0.2 M cacodylate buffer

| | |
|---|---|
| Cacodylic acid sodium salt | 21.0 gm |
| Distilled water | 500.0 ml |

2. Stock solution B: 0.1 M hydrochloric acid

| | |
|---|---|
| Hydrochloric acid concertrated | 1.7 ml |
| Distilled water | 98.3 ml |

3. Working solution: 0.2 M cacodylate buffer pH 7.4

| | |
|---|---|
| Stock solution A | 50.0 ml |
| Stock solution B | 2.7 ml |

4. Working solution: 0.1 M cacodylate buffer pH 7.4

| | |
|---|---|
| 0.2 M cacodylate buffer pH 7.4 | 50.0 ml |
| Distilled water | 50.0 ml |

5. 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.4

| | |
|---|---|
| 2.5% glutaraldehyde ( EM grade) | 10.0 ml |
| 0.2 M cacodylate buffer pH 7.4 | 50.0 ml |
| Distilled water | 40.0 ml |

6. 2% osmium tetroxide

| | |
|---|---|
| Osmium tetroxide | 1.0 gm |
| Distilled water | 50.0 ml |

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

197498



7. 1% osmium tetroxide in 0.1 M cacodylate buffer pH 7.4

| | |
|---|---|
| 2% osmium tetroxide | 1.0 ml |
| 0.2 M cacodylate buffer pH 7.4 | 1.0 ml |

8. 5% uranyl acetate

| | |
|---|---|
| Uranyl acetate | 2.0 gm |
| น้ำกลั่นต้มและกรอง | 40.0 ml |

ผสมให้เข้ากันแล้วกรองอีกครั้ง เก็บไว้ในขวดสีชา

9. Lead citrate

| | |
|---|---|
| Lead citrate | 0.5 gm |
| น้ำกลั่นต้มและกรอง | 100.0 ml |
| Sodium hydroxide | 2.0 ml |

ละลาย sodium hydroxide ในน้ำ เติม lead citrate คนให้เข้ากันแล้วกรองอีกครั้ง ควรเก็บในขวดแก้วและปิดจุกให้แน่น

10. 0.02 N sodium hydroide

| | |
|---|---|
| Sodium hydroide | 0.8 ml |
| น้ำกลั่นต้มและกรอง | 1,000.0 ml |

11. Mixture of epon 812

| | |
|---|---|
| Epon 812 | 9.1 ml |
| DDSA (dodecenyl succinic anhydride) | 6.2 ml |
| NMA (nadic methyl anhydride) | 4.6 ml |
| DMP-30 (2,4,6-tridimethylamino methyl phenol) | 0.3 ml |

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University