ชีววิทยาของเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 เพื่อการเพาะเลี้ยง

ปิยะ โกยสิน[1], สุชนา ชวนิชย์[1], วรณพ วิยกาญจน์[1], สมเกียรติ ปิยะธีรธิติวรกุล[1], เปี่ยมศักดิ์ เมนะเศวต[1] และ คณิต สุวรรณบริรักษ์[2]

[1]ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

[2]ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

Abstract: Biology of the Tunicate, *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 for Aquaculture

Piya Koeysin[1], Suchana Chavanich[1], Voranop Viyakarn[1], Somkiat Piyateeratitivorakul[1], Pemsak Maynasavate[1] and Kanit Suwanborirux[2]

[1]Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330, [2]Department of Pharmacognocy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Pathumwan, Bangkok 10330

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

Key words: *Ecteinascidia thurstoni*, tunicate, metamorphosed, culture

บทนำ

ทะเลเป็นระบบนิเวศขนาดใหญ่ ประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตหลากหลายชนิด มนุษย์ได้รู้จักนำทรัพยากรธรรมชาติเหล่านั้นมาใช้ประโยชน์ตั้งแต่อดีตจนปัจจุบัน และมีการวิจัยในหลายสาขาเกี่ยวกับทะเลเพื่อให้ได้ผลการวิจัยที่เป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ ดังนั้นทรัพยากรธรรมชาติทางทะเลจึงมีความสำคัญต่อมนุษย์ในหลายด้าน อาทิ แหล่งอาหาร แหล่งท่องเที่ยว โดยเฉพาะในปัจจุบันที่เป็นแหล่งยาที่มีความสำคัญต่อไปในอนาคต

ยารักษาโรคที่ใช้อยู่ในปัจจุบันได้มาจากการค้นพบและพัฒนาจากสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติ โดยแรกเริ่มได้จากสมุนไพรบนบกเป็นส่วนใหญ่และในทะเลเป็นส่วนน้อย อย่างไรก็ตาม หากเปรียบเทียบสัดส่วนพื้นที่ระหว่างบกกับทะเลแล้ว พื้นที่บนบกมีเพียงร้อยละ 30 ของพื้นที่ผิวโลก ในขณะที่ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 70 เป็นทะเลหรือมหาสมุทร จึงส่งผลต่อจำนวนชนิด และความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตที่มากกว่า จากเหตุผลดังกล่าว นักวิทยาศาสตร์จึงเริ่มให้ความสนใจในการแสวงหายาบำบัดโรคจากสิ่งมีชีวิตในทะเล โดยเฉพาะกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เนื่องจากเป็นสัตว์กลุ่มใหญ่ที่สุดในทะเล หรือประมาณร้อยละ 95 ของสัตว์ทะเลทั้งหมด ได้แก่ ฟองน้ำทะเล (Sponges), ซีเลนเทอเรท (Coelenterates), เอ็คไคโนเดิร์ม (Echinoderms), ไบรโอซัว (Bryozoans) และเพรียงหัวหอม (Tunicates, Ascidians

และ Sea squirt) ปัจจุบันพบว่า สัตว์ทะเลเหล่านี้สามารถสร้างสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติทางทะเล (marine natural products) ที่มีโครงสร้างทางเคมีชนิดใหม่ที่ไม่มีการค้นพบมาก่อน สารเคมีเหล่านี้หลายชนิดมีฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีความน่าสนใจในการนำไปพัฒนาเป็นยาบำบัดโรคชนิดใหม่โดยตรง หรือสามารถนำไปใช้เป็นสารต้นแบบ (Lead compounds หรือ Prototypes) ในการพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ได้

ในประเทศไทย พบเพรียงหัวหอม *Ecteinascidia thurstoni* Herdman, 1891 บริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน จังหวัดภูเก็ต เพรียงหัวหอมชนิดนี้ให้สาร Ecteinascidins (Et) 770 และ 786 ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่ใกล้เคียงกับสาร Et 743 ที่ปัจจุบันมีการพัฒนาเป็นยาบำบัดมะเร็งได้สำเร็จและได้ทดลองใช้กับผู้ป่วยในโรงพยาบาล ทำให้สาร Et 770 และ 786 มีความเป็นไปได้ในการพัฒนาเป็นยาบำบัดมะเร็งต่อไป อย่างไรก็ตาม การพัฒนาสารดังกล่าวให้เป็นยาบำบัดมะเร็งได้สำเร็จนั้น มีความจำเป็นต้องใช้สารที่จะนำไปใช้เป็นยาในปริมาณมาก การผลิตสารในเชิงอุตสาหกรรมให้ได้ปริมาณที่เพียงพอต่อความต้องการจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นการนำสารดังกล่าวจากธรรมชาติเพียงอย่างเดียวมาใช้จึงเป็นไปได้ยาก อนึ่ง ถึงแม้ว่าการสังเคราะห์สารทางเคมีเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่สามารถกระทำได้ แต่โครงสร้างที่ซับซ้อนของสารดังกล่าวทำให้ยากต่อการสังเคราะห์และมีต้นทุนสูงในการผลิต การวิจัยด้านการเพาะเลี้ยงเชิงอุตสาหกรรมของ *E. thurstoni* จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง ดังนั้นการศึกษาด้านชีววิทยาของ *E. thurstoni* เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานจึงมีความสำคัญในการนำไปสู่ความสำเร็จด้านการเพาะเลี้ยงเชิงอุตสาหกรรมให้เป็นแหล่งวัตถุดิบที่สำคัญและเพียงพอต่อการพัฒนาและผลิตยาบำบัดมะเร็งต่อไป

วิธีการ

1. การศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน

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

1) ทุก 3 ชั่วโมง ในระยะ 2 วันแรกหลังการลงเกาะ

2) ทุก 6 ชั่วโมง ในระยะ 3–7 วันหลังการลงเกาะ

3) ทุก 1 สัปดาห์ ตั้งแต่สัปดาห์ที่สองหลังการลงเกาะ จนตัวอ่อนพัฒนาเข้าสู่ระยะวัยรุ่น

2. การศึกษาพฤติกรรมการลงเกาะของตัวอ่อน

รวบรวมตัวอ่อน *E. thurstoni* ด้วยวิธีเดียวกับการศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน หลังจากนั้นนำตัวอ่อนมาศึกษาพฤติกรรมการลงเกาะบน petridish ซึ่งแบ่งพื้นที่ออกเป็นสองส่วนเท่ากัน ด้านหนึ่งทำให้มืดโดยใช้สีดำย้อมภายนอก และอีกด้านเป็นด้านสว่างตามปกติ แบ่งการทดลองเป็นสองชุดดังนี้

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

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

ทั้งนี้ ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการชีววิทยาทางทะเล สวพ. ภูเก็ต ควบคุมปริมาณแสงโดยใช้หลอดไฟส่องสว่างแบบ fiber optic bifurcated Olympus model LGPS เป็นแหล่งกำเนิดแสงในการทดลอง ปล่อยทิ้งไว้จน

ตัวอ่อนลงเกาะสำเร็จ บันทึกข้อมูลการลงเกาะโดยเปรียบเทียบจำนวนตัวอ่อนที่ลงเกาะในพื้นผิวส่วนมืดและพื้นผิวส่วนสว่างในแต่ละหน่วยการทดลอง

3. การศึกษาการเติบโตของตัวอ่อนในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล

รวบรวมตัวอ่อน *E. thurstoni* และทำการกระตุ้นให้ลงเกาะบน petridish ด้วยวิธีเดียวกับการศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน หลังจากนั้นจึงทำการแยกตัวอ่อน (zooid) มาทดลองเลี้ยงเปรียบเทียบในระบบเลี้ยงที่โรงเพาะเลี้ยงและในทะเลธรรมชาติของ สวพ ภูเก็ต โดยใช้ตัวอ่อนสถานที่ละ 20 ตัว ทำการเก็บข้อมูลทุก 1 สัปดาห์ โดยการนับจำนวนตัวอ่อน พร้อมสุ่มวัดขนาดและบันทึกภาพ

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการเปรียบเทียบอัตรารอดและขนาดของตัวอ่อนในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล บันทึกอุณหภูมิและความเค็มของน้ำทะเลบริเวณที่ทำการศึกษา

4. การศึกษาช่วงชีวิตหลังการลงเกาะในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล

ทำการสุ่มโคโลนีที่สมบูรณ์ของ *E. thurstoni* จากธรรมชาติบริเวณท่าเรือ สวพ. ภูเก็ต โดยนำโคโลนีมาติดกับแผ่นกระเบื้องดินเผาด้วยสายรัดพลาสติกหรือกาวสำหรับใช้ในน้ำทะเล แล้วจึงนำไปเลี้ยงในถังเลี้ยงระบบเปิดที่โรงเพาะเลี้ยง เปรียบเทียบกับในทะเลธรรมชาติบริเวณท่าเรือที่ระดับความลึก 3 เมตรจากผิวน้ำทะเลของ สวพ. ภูเก็ต โดยใช้จำนวนโคโลนีสถานที่ละ 15 โคโลนี

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

5. การศึกษาองค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหาร และองค์ประกอบชนิดของแพลงก์ตอนพืชบริเวณแหล่งธรรมชาติ

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

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

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

สำหรับการเตรียมตัวอย่างตะกอนเพื่อศึกษาองค์ประกอบของสารอินทรีย์ที่พบแขวนลอยในน้ำทะเลบริเวณที่อยู่อาศัยในธรรมชาตินั้น ทำการโดยติดตั้งแท่นดักตะกอนที่ระดับความลึก 3 เมตรจากผิวน้ำ แล้วจึงเก็บตะกอนในช่วงเวลาเดียวกันกับการเก็บรวบรวมเพรียงหัวหอมเพื่อนำไปแยกอาหารในทางเดินอาหาร ทั้งนี้แยกตะกอนที่เก็บได้เป็นสองส่วน คือ ส่วนที่นำตะกอนมาล้างด้วยน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เพื่อขจัดเกลือออกจากตะกอนก่อนนำไปใช้ กับส่วนที่เป็นตะกอนไม่ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นจึงนำทั้งสองส่วนไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 50–60 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์อัตราส่วน คาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน

ทำการเปรียบเทียบอัตราส่วน คาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ที่พบในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอมกับสารอินทรีย์แขวนลอยในธรรมชาติ

ผลการวิจัย

1. การศึกษาพัฒนาการของตัวอ่อน

จากการศึกษาพบว่า ตัวอ่อน *E. thurstoni* มีการพัฒนาทั้งหมด 3 ระยะ คือ 1) ระยะตัวอ่อนว่ายน้ำอิสระ (tadpole larva) 2) ระยะตัวอ่อนหลังลงเกาะ และ 3) ตัวอ่อนระยะวัยรุ่น (juvenile) (ภาพที่ 1)

1.1 ระยะตัวอ่อนว่ายน้ำอิสระ (tadpole larva stage)

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

อวัยวะที่สำคัญในระยะนี้มีสองส่วนคือ otolith (gravity sensor) ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้ตอบสนองต่อแรงโน้มถ่วง และ photolith (light receptor) ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้ตอบสนองต่อแสงสว่าง โดยอวัยวะทั้งสองพบอยู่ในบริเวณส่วนหัวของตัวอ่อน ทั้งนี้เนื่องจากตัวอ่อนถูกห่อหุ้มด้วยเนื้อเยื่อบางๆ ที่เรียกว่า tunic จึงทำให้ตัวอ่อนไม่กินอาหารในระยะนี้

1.2 ระยะตัวอ่อนหลังการลงเกาะ (settlement stage)

1) 5 นาที หลังการลงเกาะ

หลังจากตัวอ่อน *E. thurstoni* ลงเกาะบนพื้นผิว 5 นาที พบว่าตัวอ่อนยึดติดกับพื้นผิวด้วยอวัยวะสำหรับยึดเกาะ (attachment process) ทั้ง 3 อัน ตัวอ่อนไม่มีการเคลื่อนที่ มีการกระตุกแบบถี่ในส่วนหาง เป็นครั้งคราว เมื่อลดแสงสว่างในขณะทดลองอย่างรวดเร็ว พบว่าตัวอ่อนมีการกระตุกแบบถี่เช่นเดียวกัน และในระยะนี้ตัวอ่อนยังคงห่อหุ้มด้วย tunic และยังไม่มีการกินอาหาร

2) 10 นาที หลังการลงเกาะ

ตัวอ่อนเริ่มพัฒนา stolon เพื่อใช้ช่วยยึดเกาะและเพื่อขยายเจริญเป็นโคโลนีต่อไป notochord ในส่วนหางเริ่มหดสั้นลงเล็กน้อย

3) 15 นาที หลังการลงเกาะ

ตัวอ่อนพัฒนา stolon ยาวขึ้น notochord ที่อยู่ในส่วนหางเริ่มหดกลับเข้ามาในส่วนหัวของตัวอ่อน

4) 30 นาที หลังการลงเกาะ

ในระยะนี้ notochord หดสั้นลงมากขึ้น ในส่วนอื่นจากการสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อย

5) 3 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

ตัวอ่อนมีพัฒนาการเพิ่มขึ้นมากโดย stolon มีขนาดใหญ่ขึ้น เจริญปกคลุมอวัยวะสำหรับยึดเกาะ รูปร่างของส่วนหัวเปลี่ยนแปลงโดยมีลักษณะรูปร่างเป็น barrel shape ซึ่งแสดงลักษณะเข้าสู่รูปร่างของตัวอ่อนระยะวัยรุ่น (Juvenile) ตัวอ่อนเริ่มมีการแยกส่วนระหว่างทางน้ำเข้าและทางน้ำออก (branchail aperture และ atrial aperture) ในขณะเดียวกัน notochord หดกลับเข้าไปในส่วนหัวได้มากกว่าครึ่งหนึ่งของความยาว notochord เริ่มต้น ระยะนี้ตัวอ่อนยังคงถูกปกคลุมด้วย tunic ทั้งหมด และยังไม่กินอาหาร

6) 6 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

การเปลี่ยนแปลงที่สำคัญ คือ notochord หดกลับเข้ามาอยู่ส่วนหัวทั้งหมด โดยจะพัฒนาเป็นปมประสาท (nerve ganglion) เนื้อเยื่อบริเวณจุดเชื่อมต่อระหว่างส่วนหัวและส่วนหางเริ่มขอดเข้าหากัน

7) 9 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

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

8) 12 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

nerve cord ที่ทอดยาวใต้ notochord หดกลับเข้ามากลายปีนปมประสาท และพัฒนาอยู่ภายในส่วนหัวของตัวอ่อนทั้งหมด เนื้อเยื่อบริเวณจุดเชื่อมต่อระหว่างส่วนหัวและส่วนหางขอดเข้าหากันจนปิดสนิท คงเหลือส่วนหางที่เป็นโครงสร้าง tunic และไม่มี notochord อยู่ภายใน ซึ่งส่วนหางได้หมดหน้าที่ลงในระยะนี้ ทางน้ำเข้าและทางน้ำออกขยายขนาดชัดเจนขึ้น

9) 15 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

ตัวอ่อนมีขนาดเพิ่มขึ้น ส่วนที่เป็น tunic บริเวณทางน้ำเข้าและทางน้ำออกบางลง และมีรูปทรงแบบ barrel shape ชัดเจนขึ้น

10) 18 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

ตัวอ่อนมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงเวลา 15 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

11) 21 ชั่วโมงหลังการลงเกาะ

ทางน้ำเข้าและทางน้ำออก ของตัวอ่อนในระยะนี้ขยายใหญ่ขึ้น tunic บางลงมาก

1.3 ระยะวัยรุ่น (juvenile stage)

เป็นระยะที่สำคัญมาก สังเกตจาก branchail aperture ซึ่งเป็นทางน้ำเข้าและ atrial aperture หรือทางน้ำออกเปิดสู่ภายนอก ทำให้ร่างกายมีการแลกเปลี่ยนน้ำ และเริ่มกินอาหาร

1) 24 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

พบว่าตัวอ่อนได้พัฒนาเข้าสู่ระยะวัยรุ่นอย่างสมบูรณ์ โดยจะเห็นได้จากทางน้ำเข้าและทางน้ำออกเปิดสู่ภายนอกอย่างชัดเจน มีการแลกเปลี่ยนน้ำและเริ่มกินอาหาร และพบว่ามีสิ่งขับถ่ายเกิดขึ้นในลำไส้ ซึ่งจะนำออกภายนอกร่างกายทางช่องน้ำออก

2) 27 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

ตัวอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น ระบบการแลกเปลี่ยนน้ำ การกินอาหาร และการขับถ่ายมีการทำงานต่อเนื่อง nerve ganglion ยังคงปรากฏอยู่ในตัวอ่อน ในขณะเดียวกัน stolon แผ่ขยายยาวออกไปและแตกแขนง

3) 33 ชั่วโมง หลังการลงเกาะ

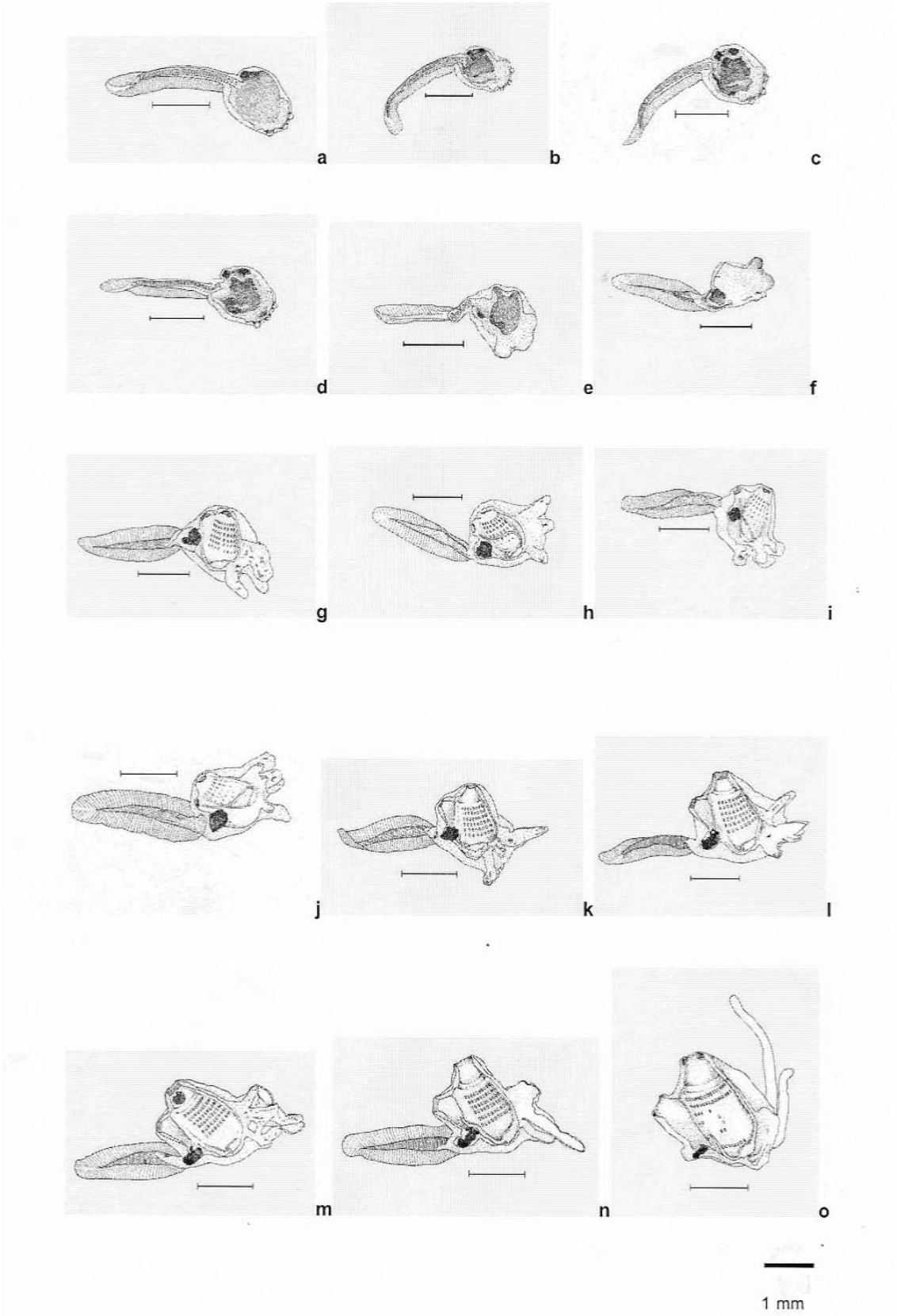
ตัวอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น ทางน้ำเข้าและทางน้ำออกขยายใหญ่ขึ้นอย่างชัดเจน nerve ganglion มีขนาดลดลงและมีรูปทรงเปลี่ยนไป ส่วนหางที่เหลือเฉพาะโครงสร้างที่เป็น tunic ยังคงปรากฏอยู่

4) 72 ชั่วโมงหลังการลงเกาะ

พบว่า nerve ganglion มีขนาดลดลงมาก ตัวอ่อนมีขนาดใหญ่ขึ้น stolon ขยายยาวออกไปมากกว่าช่วงที่ผ่านมา

2. การศึกษาพฤติกรรมการลงเกาะของตัวอ่อน

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



ภาพที่ 1. พัฒนาการของตัวอ่อนแพรียงหัวหอม *E. thurstoni* ใน 15 ระยะ : (a) ระยะหลังการลงเกาะ 5 นาที, (b) ระยะหลังการลงเกาะ 10 นาที, (c) ระยะหลังการลงเกาะ 15 นาที, (d) ระยะหลังการลงเกาะ 30 นาที, (e) ระยะหลังการลงเกาะ 3 ชั่วโมง, (f) ระยะหลังการลงเกาะ 6 ชั่วโมง, (g) ระยะหลังการลงเกาะ 9 ชั่วโมง, (h) ระยะหลังการลงเกาะ 12 ชั่วโมง, (i) ระยะหลังการลงเกาะ 15 ชั่วโมง, (j) ระยะหลังการลงเกาะ 18 ชั่วโมง, (k) ระยะหลังการลงเกาะ 21 ชั่วโมง, (l) ระยะหลังการลงเกาะ 24 ชั่วโมง, (m) ระยะหลังการลงเกาะ 27 ชั่วโมง, (n) ระยะหลังการลงเกาะ 33 ชั่วโมง, (o) ระยะหลังการลงเกาะ 72 ชั่วโมง

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

3. การศึกษาการเติบโตของตัวอ่อนในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล

การเติบโตของตัวอ่อน *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง พบว่า ตัวอ่อนมีจำนวนคงที่จนถึงช่วงอายุ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวนตัวอ่อนค่อยๆ ลดลงอย่างต่อเนื่อง ในขณะเดียวกัน ขนาดของตัวอ่อนเพิ่มขึ้นสูงที่สุดที่ช่วงอายุ 14 วัน โดยมีขนาดเฉลี่ย 0.27 เซนติเมตร หลังจากนั้นจำนวนตัวอ่อนได้ลดลงจนตายทั้งหมดในที่สุดที่ช่วงอายุ 21 วันหลังการลงเกาะ

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

4. การศึกษาช่วงชีวิตหลังการลงเกาะ

4.1 ช่วงชีวิตหลังการลงเกาะในโรงเพาะเลี้ยง

จากการเก็บข้อมูลต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 18 ธันวาคม 2547 ถึงวันที่ 4 เมษายน 2548 ใน 15 หน่วยทดลอง เป็นเวลา 57 วัน พบว่า *E. thurstoni* มีอายุเฉลี่ย 26 วัน และพบการเติบโต 2 วัฏจักร โดยในระยะเริ่มต้นการทดลอง พื้นที่ปกคลุมตัวซึ่งเป็นโคโลนีสมบูรณ์มีจำนวนโดยเฉลี่ยร้อยละ 20.87 หลังจากนั้นจำนวนตัวของ *E. thurstoni* ลดลงเมื่อการทดลองผ่านไป 19 วัน มีพื้นที่ปกคลุมตัวโดยเฉลี่ยเพียงร้อยละ 4.62 เท่านั้น ถึงแม้ว่าพื้นที่ปกคลุมตัวจะแสดงแนวโน้มเพิ่มขึ้นหลังจากนั้นเป็นร้อยละ 5.43 แต่ยังคงลดลงอย่างต่อเนื่องและมีค่าต่ำสุดเมื่อการทดลองผ่านไป 48 วัน เฉลี่ยร้อยละ 0.49 ซึ่งทั้งหมดจัดเป็นวัฏจักรแรกของการเติบโต ต่อมาจำนวนพื้นที่ปกคลุมตัวมีการเพิ่มขึ้นอีกครั้ง โดยมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 0.99 ก่อนที่จะไม่พบการเติบโตอีกในทุกหน่วยทดลอง ซึ่งเป็นวัฏจักรที่สองของการเติบโต

4.2 ช่วงชีวิตหลังการลงเกาะในทะเล

จากการเก็บข้อมูลต่อเนื่องตั้งแต่วันที่ 9 มิถุนายน 2548 ถึงวันที่ 17 สิงหาคม 2548 เป็นเวลาตลอดการทดลอง 70 วัน พบว่า *E. thurstoni* มีอายุตามธรรมชาติประมาณ 60 วัน ขณะเริ่มการทดลอง โดยพื้นที่ปกคลุมตัวโดยเฉลี่ยมีจำนวนร้อยละ 52.78 เมื่อดำเนินการทดลองผ่านไป 8 วัน พื้นที่ปกคลุมตัวโดยเฉลี่ยลดลงเหลือร้อยละ 27.38 หลังจากนั้นจึงเพิ่มขึ้นและมีค่าสูงสุดอีกครั้งที่ร้อยละ 38.09 เมื่อผ่านไป 30 วัน จากนั้นจึงเริ่มลดจำนวนลงและมีค่าต่ำที่สุดที่ร้อยละ 18.94 ในระยะ 70 วันตั้งแต่เริ่มทำการทดลอง

5. การศึกษาองค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหารและองค์ประกอบชนิดของแพลงก์ตอนพืชบริเวณแหล่งธรรมชาติ

5.1 องค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหารและองค์ประกอบชนิดแพลงก์ตอนพืชบริเวณท่าเรือ สวพ. ภูเก็ต

จากการศึกษาชนิดแพลงก์ตอนพืชตลอดทั้งปีบริเวณท่าเรือ สวพ. ภูเก็ต โดยกลุ่มประเมินสภาวะทรัพยากรและผลผลิตชีวภาพทางทะเลและชายฝั่ง สวพ. ภูเก็ต พบจำนวนแพลงก์ตอนพืชบริเวณนั้น 42 ชนิด สำหรับการศึกษาครั้งนี้เฉพาะในช่วงที่ *E. thurstoni* ในธรรมชาติบริเวณดังกล่าวมีการเติบโตเต็มที่ระหว่างเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคมพบว่า องค์ประกอบของชนิดแพลงก์ตอนพืชมีจำนวน 16 ชนิด ในขณะที่พบเพียง 5 ชนิดในทางเดินอาหารของ

E. thurstoni ทั้งนี้ สภาพของเซลล์แพลงก์ตอนพืชที่พบในทางเดินอาหารส่วนมากมีลักษณะที่ไม่สมบูรณ์ ยกเว้น *Gyrosigma* sp. และ *Pleurosigma* sp. อย่างไรก็ตาม สิ่งที่พบส่วนใหญ่ในทางเดินอาหารมีลักษณะเป็นอนุภาคอินทรีย์ขนาดเล็ก ไม่สามารถจำแนกชนิดได้

5.2 อัตราส่วน คาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจน (CHN ratio) ของอาหารในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอม และสารอินทรีย์แขวนลอยในทะเลบริเวณที่ศึกษา

พบว่าในทุกตัวอย่างอาหารจาก *E. thurstoni* ในธรรมชาติที่นำมาวิเคราะห์ซึ่งผ่านการขจัดเกลือและไม่ขจัดเกลือ มีอัตราส่วนของคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจนที่ต่ำ เช่นเดียวกับอัตราส่วนของคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจนของสารอินทรีย์แขวนลอยในทะเลบริเวณศึกษาที่พบว่า ทุกตัวอย่างทั้งที่ผ่านการขจัดเกลือและไม่ขจัดเกลือ มีอัตราส่วนของคาร์บอน ไฮโดรเจน ไนโตรเจนที่ต่ำเช่นกัน

บทสรุป

1. พัฒนาการของตัวอ่อน

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

ต่อมาเมื่อตัวอ่อน *E. thurstoni* มีอายุถึง 6 ชั่วโมง notochord ได้มีการหดกลับเข้าไปในส่วนหัว ซึ่งโดยทั่วไปการหดกลับของ notochord จะเกิดขึ้นพร้อมกับการหดกลับของแกนประสาท (nerve chord) ซึ่งพบอยู่ในโพรงของระบบประสาทที่ทอดตัวยาวขนานกับ notochord นั้น (Berrill, 1975; Sherrard and LaBarbera, 2005) ทั้งนี้ เมื่อ notochord และเส้นประสาทหดกลับเข้ามาในส่วนหัวแล้วจะพัฒนาเป็นปมประสาท (nerve ganglion) ต่อไป ซึ่งระบบประสาทส่วนใหญ่ของตัวอ่อนจะพัฒนาภายในลำตัวบริเวณส่วนหลังปมประสาท (Monniot et al., 1991) และปมประสาทจะหายไปในที่สุดเมื่อตัวอ่อนเจริญเป็นตัวเต็มวัย (Thorson, 1964)

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

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

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

ทั้งนี้ พัฒนาการระยะเริ่มต้นหลังการลงเกาะของ *E. thurstoni* สอดคล้องพัฒนาการของเพรียงหัวหอมทั่วไปที่พบโดยทั่วไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเมื่อตัวอ่อนอายุเพิ่มขึ้น พัฒนาการต่างๆ เช่น ทางน้ำเข้าและทางน้ำออก รวมถึง

อวัยวะภายใน ได้แก่ ลำไส้ กระเพาะอาหาร และ branchial basket มีพัฒนาการเป็นไปอย่างต่อเนื่อง รวมถึง stolon ของตัวอ่อนมีขนาดและความยาวเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม tunic ที่ห่อหุ้มลำตัวจะบางลง (Monniot et al., 1991; Ruppert and Barnes, 1994; Campbell et al., 1999) นอกจากนั้น พัฒนาการของ *E. thurstoni* ตั้งแต่เริ่มต้นจนเป็นตัวเต็มวัย (adult) มีความใกล้เคียงกับการศึกษาพัฒนาการของ *E. turbinata* เช่นกัน (Bingham and Young, 1991; Mendola, 2000)

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

2. พฤติกรรมการลงเกาะของตัวอ่อน

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

ความมืดและความสว่างของพื้นผิวในสถานที่ที่มีแสงสว่างคงที่เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่ออัตราการลงเกาะโดย *E. thurstoni* มีการลงเกาะบนพื้นผิวส่วนที่มืดมากกว่าส่วนที่สว่าง สอดคล้องกับการศึกษาในเพรียงหัวหอมหลายชนิด รวมถึง *E. turbinata* (Young, 1986; Bingham and Young, 1991) ทั้งนี้ ไม่พบว่าปัจจัยดังกล่าวมีความสำคัญหากมีการเหนี่ยวนำโดยการกระตุ้นด้วยน้ำจืดเพื่อให้ตัวอ่อน *E. thurstoni* ลงเกาะ ซึ่งแสดงให้เห็นถึงผลของน้ำจืดที่มีต่อประสิทธิภาพของอวัยวะที่ตอบสนองต่อแสง อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นด้วยน้ำจืดมีผลต่อการตอบสนองในระยะเวลาที่ใช้ในการลงเกาะของตัวอ่อน *E. thurstoni* ที่สั้นลงเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอ่อนที่ไม่ถูกการกระตุ้น ซึ่งเป็นข้อดีในการศึกษาพัฒนาการหลังการลงเกาะที่สามารถกำหนดและทราบจำนวนที่แน่นอนของตัวอ่อนในการลงเกาะแต่ละครั้ง ทั้งนี้ ระยะเวลาที่ใช้ในการลงเกาะตามธรรมชาติของ *E. thurstoni* และ *E. turbinata* อาจใช้เวลาในการลงเกาะโดยอิสระไม่แตกต่างกัน (Bingham and Young, 1991; Mendola, 2000)

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

3. การเติบโตของตัวอ่อนในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล

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

การที่ตัวอ่อน *E. thurstoni* ในโรงเพาะเลี้ยง มีเพียงพัฒนาการสู่ระยะวัยรุ่น แต่ไม่สามารถพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยและไม่สามารถเพิ่มจำนวนตัวโดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้นั้น อาจเนื่องมาจากปัจจัยเรื่องอาหารที่จำกัดในระบบเลี้ยง เนื่องจากในการศึกษาครั้งนี้ ไม่มีการเสริมอาหารให้แก่ตัวอ่อนที่เลี้ยงในระบบเลี้ยง อาหารที่ได้รับจึงเป็นอาหารธรรมชาติที่ผ่านระบบกรองด้วยทรายเข้ามากับน้ำเท่านั้น ซึ่งคาดว่าไม่เพียงพอต่อความต้องการ ปัจจัยเรื่องอาหารนั้นมีความสำคัญต่อการเติบโตของเพรียงหัวหอมมากเช่นกัน ดังเช่นการทดลองเลี้ยง *E. turbinata* ในระบบเลี้ยงที่พบว่า การให้อาหารจำพวกแพลงก์ตอนพืชต่างชนิดกันและในปริมาณที่ต่างกัน ทำให้ *E. turbinata* มีการเติบโตที่แตกต่างกัน (Duckworth et al., 2004)

สำหรับ ตัวอ่อน *E. thurstoni* ที่แยกนำไปเลี้ยงในทะเลสามารถพัฒนาได้ทั้งขนาดและจำนวนที่มากกว่า ทั้งนี้เป็นการเพิ่มจำนวนตัวโดยการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศด้วยการแตกหน่อ (Nakauchi, 1982; Watanabe, 1988) อีกประการหนึ่ง การที่เพรียงหัวหอมในทะเลมีขนาดใหญ่กว่าในระบบเลี้ยงในโรงเพาะเลี้ยงนั้น เนื่องจากในทะเลมีอาหารตามธรรมชาติที่ต้องการและมีความสมบูรณ์มากกว่าในระบบเลี้ยงของโรงเพาะเลี้ยง (Bingham and Walters, 1989; Duckworth et al., 2004) มีรายงานว่า การเพาะเลี้ยงเพรียงหัวหอม Botryllid ในประเทศญี่ปุ่น เป็นการเลี้ยงในทะเลภายหลังจากที่ได้ตัวอ่อนจากการเตรียมในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เพื่อลดปัจจัยเรื่องอาหารและเพิ่มความสมบูรณ์ของโคโลนี (Saito and Okuyama, 2003)

4. ช่วงชีวิตหลังการลงเกาะในโรงเพาะเลี้ยงและในทะเล

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

5. องค์ประกอบของอาหารในทางเดินอาหาร

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

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

ดังนั้น องค์ประกอบหลักในทางเดินอาหารที่พบใน *E. thurstoni* ซึ่งได้แก่สารอินทรีย์ที่แขวนลอยในมวลน้ำนั้นจึงอาจเป็นอาหารหลัก เช่นเดียวกับเพรียงหัวหอมทั่วไปที่กินอาหารโดยการกรองกินแพลงก์ตอนขนาดเล็ก รวมถึงสารอาหารแขวนลอยในมวลน้ำ (Satoh, 1994) อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการวิเคราะห์และเปรียบเทียบอัตราส่วนของ

คาร์บอน ไฮโดรเจน และไนโตรเจน ของอนุภาคอินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอมในธรรมชาติกับสารอินทรีย์แขวนลอยในน้ำ ถึงแม้ว่าจะพบในอัตราส่วนที่ต่ำแต่ไม่มีความแตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าอนุภาคอินทรีย์ที่พบในทางเดินอาหารของเพรียงหัวหอมมาจากการนำสารอินทรีย์ที่แขวนลอยในน้ำเข้าสู่ร่างกาย

กิตติกรรมประกาศ

ผลงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพแห่งประเทศไทย ซึ่งร่วมจัดตั้งโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ รหัสโครงการ BRT T_347008

เอกสารอ้างอิง

Berrill, N.J. 1975. Chordata: tunicate. *In* Giese, A.C. and J.S. Pearse (eds.), Reproduction of Marine Invertebrates, pp. 241-282. Academic Press, New York.

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

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

Campbell, N.A., J.B. Reece and L.G. Mitchell. 1999. Biology. 5th ed. Addison-Wesley, USA.

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

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

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

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

Mendola, D. 2000. Aquacultural production of bryostatin 1 and ecteinascidin 743. *In* Fusetani, N. (ed.), Drugs From the Sea, pp 120-133. Karger, Basel.

Millar, R.H. 1971. The biology of ascidians. *Adv. Mar. Biol*. 9: 1-100.

Monniot, C., F. Monniot and P. Laboute. 1991. Coral Reef Ascidians of New Caledonia. OSTROM, Paris.

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

Ruppert. E.E. and R.D. Barnes. 1994. Invertebrate Zoology. 6th ed. Saunders College Publishing, USA.

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

Satoh, N. 1994. Developmental Biology of Ascidians. Cambridge University Press, USA.

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

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

Watanabe, H. 1988. Colonial ascidians. *Development of Invertebrates* 2: 490-539.

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