

ชื่อวิทยาศาสตร์ของหนอนถั่ว *Sipunculus* sp. เพื่อการเพาะเลี้ยง



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

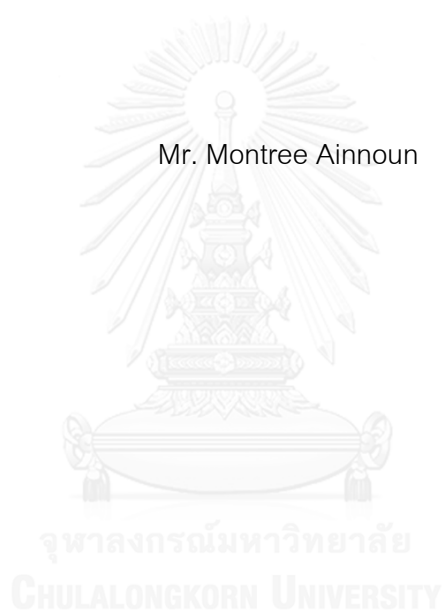
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

BIOLOGICAL STUDY OF PEANUT WORM, *Sipunculus* sp. AND APPLICATION FOR
AQUACULTURE

Mr. Montree Ainnoun



A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy Program in Biotechnology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ชีววิทยาของหนอนถั่ว <i>Sipunculus sp.</i> เพื่อการเพาะเลี้ยง
โดย	นายมนตรี อินทร์นวล
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ดร.พอล่า อรัญยกานนท์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาตรีบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร.พลกฤษณ์ แสงวณิช)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพชรสม)
..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.พอล่า อรัญยกานนท์)
..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒน์นกร)
..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศรินทร์ทิพย์ สุกใส)
..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ สัตยาลัย)

มนตรี อินทรินวล : ชีววิทยาของหนอนถั่ว *Sipunculus sp.* เพื่อการเพาะเลี้ยง
(BIOLOGICAL STUDY OF PEANUT WORM, *Sipunculus sp.* AND APPLICATION
FOR AQUACULTURE) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. ดร.อมร เพชรสม, อ.ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์ร่วม: ดร.พจมา อรัณยกานนท์, 91 หน้า.

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวัฏจักรชีวิตและการพัฒนาเทคนิคเพาะเลี้ยงหนอนถั่ว
เพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง โดยขั้นต้นได้ศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและ
รูปแบบของลำตัว นิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome c oxidase I (COI) และ 16s rRNA จาก
จำนวนหนอนถั่ว 60 ตัวที่พบบริเวณหาดมดตะนอย ตำบลเกาะลิบง อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง
พบว่าเป็นหนอนถั่วสายพันธุ์ *Sipunculus nudus* ซึ่งยังไม่มีการพบในประเทศไทยมาก่อน และเมื่อ
เปรียบเทียบกับ *S. nudus* จาก 11 แหล่งทั่วโลกพบว่า หนอนถั่วจากหาดมดตะนอยมีความ
แตกต่างกับแหล่งอื่นๆจากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการสามารถจำแนก *S. nudus* ได้ 3
ฮาโพลไทป์จากยีน 16s rRNA จากหนอนถั่ว 11 ตัว และ 2 ฮาโพลไทป์จากยีน COI จากหนอนถั่ว
จำนวน 12 ตัวซึ่งมีค่า Haplotype diversity เท่ากับ 0.345 และ 0.167 ตามลำดับและสร้าง
แผนภูมิความสัมพันธ์ทางพันธุกรรมที่ได้จากยีน 16s rRNA รวมกับยีน COI ของหนอนถั่ว พบว่า
หนอนถั่วจากหาดมดตะนอยถูกแยกออกมาจากประเทศจีนและเวียดนามอย่างชัดเจน ต่อมา
ศึกษาการสืบพันธุ์ในรอบปีของหนอนถั่ว *S. nudus* ระหว่างเดือนกันยายน 2555 ถึงเดือนสิงหาคม
2556 โดยเก็บตัวอย่างหนอนถั่วทั้งหมด 752 ตัว ซึ่งมีขนาดและน้ำหนักตัวเปียกอยู่ระหว่าง 10-20
ซม. และ 8-18 กรัม ตามลำดับ ใช้วิธีผ่าพิสูจน์เพื่อติดตามระยะการสืบพันธุ์ พบว่า หนอนถั่วมี
อัตราส่วนเพศ 1:1 พบไข่และสเปิร์มในช่องกลางลำตัวทุกเดือนในระหว่างการศึกษาซึ่งชี้ให้เห็นว่า
หนอนถั่วมีการสืบพันธุ์ต่อเนื่องทุกเดือนตลอดทั้งปีซึ่งแตกต่างจากหนอนถั่วชนิดอื่นๆและทดลอง
เลี้ยงหนอนถั่วจำนวน 30 ตัว ในภาชนะพลาสติกทึบแสง ผลที่ได้คือ ไข่ยังไม่สามารถพัฒนาไปสู่ตัว
อ่อนได้ ยิ่งไปกว่านั้นจากการศึกษาลักษณะภายในตัวของหนอนถั่ว *S. nudus* ยังพบหนอนตัวแบน
(Flatworm) อาศัยอยู่เป็นปรสิต (Parasitism) ซึ่งยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5472884023 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS: PEANUT WORM / REPRODUCTIVE CYCLE / SIPUNCULUS NUDUS / NEW RECORD

MONTREE AINNOUN: BIOLOGICAL STUDY OF PEANUT WORM, *Sipunculus* *sp.* AND APPLICATION FOR AQUACULTURE. ADVISOR: ASSOC. PROF. AMORN PETSOM, Ph.D., CO-ADVISOR: PORCHAM ARANYAKANANDA, Ph.D., 91 pp.

Sixty peanut worms were collected from Modtanoy beach, Trang, Thailand for species identification. Taxonomic study was based on morphology and dichotomous keys of the Sipuncula. The result showed peanut worms were *Sipunculus nudus* species and different from other 11 localities around the world. The phylogenetic analyses using molecular sequence data were conducted from two genes, 16S rRNA and cytochrome c oxidase subunit I. Haplotype diversities for the 16s rRNA and COI genes were 0.345 and 0.167 respectively. The phylogenetic tree showed that Thai specimens were separated from southern Chinese and Vietnamese clade. Moreover, this studied *S. nudus* has never been recorded. Thus this research is the new record of *S. nudus* in Thailand. The second experiment was annual reproductive cycle of peanut worm found at ModTanoy Beach during September 2012 - August 2013 to monitor the annual reproductive cycle that will be used as preliminary information for breeding of peanut worm. 752 peanut worms with the average length and wet body weight ranged from 10-20 cm. and 8-18 grams were collected and dissected for determination of sex and inspection of male and female gamete stages. The result revealed a sex ratio of 1:1. The third experiment was culture peanut worms 30 individuals in a plastic opaque container. The result showed the eggs cannot develop into the embryo. Moreover this studied peanut worm was found parasitic flatworms that live in the contractile vessel of the *S. nudus* which has never been reported before.

Field of Study: Biotechnology

Student's Signature

Academic Year: 2016

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของรองศาสตราจารย์ ดร.อมร เพ็ชรสมรักษาการฯ ผู้อำนวยการสำนักงานวิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้อำนวยการศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้คำปรึกษา คำแนะนำแก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ดร. พอจำ อรัญยกานนท์ อดีตอาจารย์สังกัดสถาบันทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ ที่ให้การดูแลอย่างดี ให้คำแนะนำในการทำวิทยานิพนธ์ แก่ไขงานที่ส่งตีพิมพ์ ด้วยความเอาใจใส่อย่างยิ่ง และได้ให้ความกรุณาในการแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์รองศาสตราจารย์ ดร.นาตยา งามโรจนวณิชย์ ภาควิชาเคมี ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศานิต ปิยพัฒนากรรภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล และผศ. ดร.ศรินทิพ สุกใส สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ พร้อมทั้งให้คำแนะนำในการปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกมหาวิทยาลัย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ สัตยาลัย อดีตอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือแก่ไขงานที่ส่งตีพิมพ์ และให้คำแนะนำ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ดร.ธงชัย งามประเสริฐวงศ์ ที่ให้ความช่วยเหลือในการแก้ไขงานที่ส่งตีพิมพ์ และให้คำแนะนำในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆของงานวิจัยฉบับนี้เป็นอย่างดีตลอดมา

กราบขอบพระคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุนวิจัยและทุนการศึกษาในช่วงปีการศึกษา 2554-2556

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	1
สารบัญรูปภาพ	2
บทที่ 1.....	6
บทนำ.....	6
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	6
1.2 วัตถุประสงค์.....	7
1.3 ขอบเขตงานวิจัย	7
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย	7
บทที่ 2.....	8
ทบทวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	8
2.1 ชีววิทยาของหนอนถั่ว.....	8
2.2 กายวิภาคของหนอนถั่ว <i>S. nudus</i>	10
2.2.1 ลักษณะภายนอกของหนอนถั่ว.....	11
2.2.2 ลักษณะภายในของหนอนถั่ว	12
2.3 หนอนถั่วในประเทศไทย	18
2.4 การสืบพันธุ์ (reproduction).....	19
2.4.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction)	20
2.4.1.1 พารธีโนเจเนซิส (Parthenogenesis).....	21

2.4.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction)	21
2.5 การพัฒนาของตัวอ่อน (Larval Development)	21
2.6 ช่วงเวลาการวางไข่และผสมพันธุ์ของหนอนถั่ว (spawning and breeding periods)	25
บทที่ 3.....	27
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง.....	27
3.1 หนอนถั่ว.....	27
3.2 น้ำทะเล	27
3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับงานวิจัย	27
3.4 ชุดตรวจสอบคุณภาพน้ำ.....	28
3.5 สารเคมีและอาหารเลี้ยงหนอนถั่ว	28
3.6 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย	29
3.7.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เพื่อระบุชนิด (species) ของ หนอนถั่ว	29
3.7.1.1 การเตรียมตัวอย่าง.....	29
3.7.1.2 การศึกษาลักษณะภายนอก.....	29
3.7.1.3 การศึกษาลักษณะภายใน.....	30
3.7.1.4 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกับหนอนถั่ว Sipunculus sp. ในประเทศไทย	30
3.7.1.5 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกับหนอนถั่ว S. nudus จาก หาดมดตะนอยกับ หนอนถั่ว S. nudus จาก 11 พื้นที่ทั่วโลกอ้างอิงตาม (Kawauchi และ Giribet, 2014).....	30
3.7.2 การศึกษาหนอนถั่วโดยวิธีการวิเคราะห์เนื้อเยื่อเชิงโมเลกุล	31
3.7.2.1 การเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อ.....	31

3.7.2.2 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างหนอนถั่ว	31
3.7.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ	31
3.7.3 ศึกษาการสืบพันธุ์ของหนอนถั่ว (<i>S. nudus</i>) ในรอบปี	32
3.7.3.1 ศึกษาพื้นที่เก็บตัวอย่าง	32
3.7.3.2 ศึกษากระบวนการสืบพันธุ์ (reproduction) ของหนอนถั่ว	33
3.7.3.3 ศึกษาอัตราส่วนเพศและตรวจระยะการเจริญพันธุ์ของหนอนถั่ว (<i>S. nudus</i>) ในรอบปี	35
3.7.4 การศึกษาการเพาะเลี้ยงหนอนถั่ว <i>S. nudus</i> เบื้องต้น	35
3.7.4.1 ทดลองผสมพันธุ์หนอนถั่วแบบกลุ่ม	35
3.7.4.2 ทดลองวิธีการผสมเทียม	36
บทที่ 4	37
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	37
4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคเพื่อใช้ในการจำแนกหนอนถั่วทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy) หนอนถั่ว	37
4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological structure) ของหนอนถั่ว <i>S.nudus</i> .	37
4.1.2 ลักษณะทางกายวิภาค (anatomy)	38
4.1.3 การจำแนกทางอนุกรมวิธานเพื่อบ่งบอกชนิดของหนอนถั่ว	39
4.1.4 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนถั่วกับ Sipunculus ในประเทศไทย	41
4.1.5 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนถั่วที่ศึกษากับ <i>S. nudus</i> จาก 11 พื้นที่ทั่วโลก	41
4.2 การวิเคราะห์เนื้อเยื่อของหนอนถั่วเชิงโมเลกุล	43

4.2.1 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI	43
4.2.2 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ	45
4.3 ศึกษาการสืบพันธุ์ของหนอนถั่ว (<i>Sipunculus nudus</i>)	47
4.3.1 แหล่งที่อยู่ (Habitat)	47
4.3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนถั่ว <i>S. nudus</i>	48
4.3.3 สืบพันธุ์ (Reproduction) ของ <i>S. nudus</i>	50
4.3.3.1 กระบวนการสร้างเสปิร์ม (spermatogenesis)	50
4.3.3.2 การสร้างไข่ (oogenesis)	51
4.3.3.3 การตัดพาราฟิน (Paraffin section)	53
4.3.4 วัฏจักรการสืบพันธุ์ของหนอนถั่ว (<i>Sipunculus nudus</i>) ในรอบปี.....	55
4.3.4.1 การระบุเพศหนอนถั่ว	55
4.3.4.2 อัตราส่วนเพศ.....	56
4.3.4.3 การตรวจระยะการเจริญพันธุ์ของหนอนถั่ว <i>S. nudus</i>	56
4.4 การการทดลองผสมพันธุ์หนอนถั่ว <i>S. nudus</i> ในห้องทดลอง.....	58
4.4.1 การทดลองผสมพันธุ์หนอนถั่วแบบกลุ่ม	58
4.4.2 วิธีการผสมเทียม	58
4.5 ผลที่ได้รับเพิ่มเติมจากการศึกษาหนอนถั่ว <i>S. nudus</i>	59
บทที่ 5.....	65
สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง	65
5.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy) เพื่อบ่งบอกชนิดของหนอนถั่ว	65
5.2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนถั่วจากหาดมดตะนอยกับ <i>Sipunculus</i> ชนิดอื่นในประเทศไทยและ 11 พื้นที่ทั่วโลก.....	66
5.3 การวิเคราะห์เนื้อเยื่อเชิงโมเลกุลเพื่อบ่งบอกชนิด (Species) หนอนถั่ว	66

5.4 ศึกษาการสืบพันธุ์ของหนอนถั่ว (<i>S. nudus</i>).....	67
5.4.1 แหล่งที่อยู่อาศัย.....	67
5.4.2 การสืบพันธุ์ในรอบปีของหนอนถั่ว <i>Sipunculus nudus</i>	68
5.5 การทดลองผสมพันธุ์หนอนถั่ว <i>S. nudus</i> จากหาดมดตะนอยในห้องทดลอง.....	70
5.6 ประสิทธิภาพในตัวหนอนถั่ว <i>S. nudus</i>	71
รายการอ้างอิง.....	72
ภาคผนวก.....	76
ภาคผนวก ก	77
ข้อมูลตัวอย่างจากการเก็บข้อมูล	77
ภาคผนวก ข	82
การคำนวณความชันขาด.....	82
วิธีการคำนวณคำนวณความชันขาด.....	82
ภาคผนวก ค	83
สารเคมีและการวิเคราะห์.....	83
ภาคผนวก ง.....	88
ระบบทดลองเลี้ยงหนอนถั่วเพื่อการผสมพันธุ์	88
ภาคผนวก จ	89
การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างหนอนถั่ว	89
ภาคผนวก ฉ ข้อมูลอัตราส่วนเพศผู้และเพศเมียเดือน กันยายน 2555-สิงหาคม 2556	90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	91

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1 ชนิดของหนอนถั่วที่พบในประเทศไทย	18
ตารางที่ 2 รูปแบบของการเจริญของตัวอ่อนในหนอนถั่วสกุล (Genus) ต่างๆ (Cutler, 1994).....	23
ตารางที่ 3 รูปแบบการสืบพันธุ์ (reproductive systems) การเจริญตัวอ่อน (Larval development) ของหนอนถั่วแต่ละชนิด (Boyle and Rice, 2015).....	24
ตารางที่ 4 ตารางช่วงเวลาการผสมพันธุ์ของหนอนถั่วสายพันธุ์ (species) ต่างๆ	25
ตารางที่ 5 ตารางเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อบ่งบอกชนิดของหนอนถั่ว.....	40
ตารางที่ 6 ตารางเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนถั่วสกุล (genus) <i>Sipunculus</i> ที่มีรายงานในประเทศไทย อ้างอิงตาม (Hylleberg, 2013).....	41
ตารางที่ 7 ตารางเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของหนอนถั่ว <i>S. nudus</i> จากประเทศไทยเปรียบเทียบกับสถานที่อื่นๆ 11 แห่ง ทั่วโลก (ที่มา: (Kawauchi และ Giribet, 2014)).....	42
ตารางที่ 8 ตารางเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ของหนอนถั่วสปีชีส์อื่นๆ กับที่จับจากหาดมดตะนอย อ.กันตัง จ.ตรัง	44
ตารางที่ 9 แสดงระยะเวลาการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียของหนอนถั่วตลอดระยะเวลา 12 เดือน เริ่มตั้งแต่ เดือนกันยายน 2555 ถึงเดือนสิงหาคม 2556.....	57
ตารางที่ 10 สรุปลักษณะของไข่หนอนถั่วแต่ละชนิด ที่มา: (M. E. Rice, 1989)	68

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ 1	ลักษณะทางกายวิภาคทั่วไปของหนอนถั่ว (<i>S. nudus</i>)	9
รูปที่ 2	ลักษณะหนอนถั่ว <i>S. nudus</i> ประเทศไทย ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ข) ลักษณะทางกายวิภาคหลังการผ่าตัดตามยาวลำตัวทางด้านท้อง (ventral side).....	10
รูปที่ 3	ลักษณะหนวด (Tentacles) ของหนอนถั่ว ก. ชั้น (Class) Phascolosomatidea	11
รูปที่ 4	ระบบประสาทของหนอนถั่ว ก. <i>S.nudus</i> ข. <i>S. robustus</i> (ที่มา: (Edward Bayler Cutler, 1994)).....	13
รูปที่ 5	ลักษณะผนังลำตัวและกล้ามเนื้อตามยาวของหนอนถั่ว 5 สปีชีส์ C, circular muscle. E, epidermis. L, longitudinal muscle. LC, longitudinal canal. M, minicanal ที่มา: (Cutler, 1994).....	14
รูปที่ 6	ลักษณะของแถบกล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscle) บริเวณส่วนท้าย (Posterior glans region) ของหนอนถั่ว ก. แบบแยกจากกันเรียงตัวต่อเนื่องตลอดทั้งลำตัว ข. แบบติดกันสองส่วน (ที่มา: Cutler, 1994)	14
รูปที่ 7	ลักษณะของ เนฟริเดีย (Nephridia) ของหนอนถั่ว <i>S. nudus</i>	15
รูปที่ 8	ลักษณะของกล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ (retractor muscle) ของหนอนถั่ว	16
รูปที่ 9	กล้ามเนื้อสปินเดิล (spindle muscle) ของหนอนถั่วทั้งสองชนิด (ก.) <i>S. nudus</i> (ข.) <i>S. austrosiphon</i> . SM; กล้ามเนื้อสปินเดิล, A; ทวาร (anus), PEL หลอดอาหารส่วนปลาย (Postesophageal loop) (ที่มา: Cutler, 1994)	17
รูปที่ 10	การกระจายตัวของหนอนถั่ว <i>S.nudus</i> ทั่วโลก	17
รูปที่ 11	การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของหนอนถั่ว <i>A. brocki</i> โดยการแบ่งตัวออกเป็นสองส่วน (a-b) การแบ่งตัวออกเป็นสองส่วน ; Binary fission, (c-d) การแตกหน่อ (budding) (ที่มา: Rice, 1975)	20
รูปที่ 12	รูปแบบการเจริญตัวของหนอนถั่วทั้ง 4 แบบ (ที่มา: Boyleand และ Rice, 2015).....	22

รูปที่ 13	เทคนิคการผสมเทียมหนอนถั่ว <i>S. nudus</i> (ก. – ข.) แสดงเนฟริเดีย ของหนอนถั่วเพศผู้ (ค.) ไช้ในเนฟริเดียของหนอนถั่วเพศเมีย (ง.) ภาพสำหรับการผสมเทียม	36
รูปที่ 14	ลักษณะภายนอกของหนอนถั่วจากหาดมดตะนอย อ.กันตัง จ. ตรัง	37
รูปที่ 15	ลักษณะของอวัยวะที่ยึดหาค่ายคอค (introvert) และ หนวด (Tentacle) ของหนอนถั่วในน้ำทะเล	38
รูปที่ 16	ลักษณะโครงสร้างภายในร่างกายของหนอนถั่วที่ใช้ในการศึกษา (ก.) ลักษณะภายใน ของหนอนถั่ว (ข.) หนวด (Tentacle) (ค.) กล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscle) (ง) รูปร่างของสมอง (จ.) ไช้	39
รูปที่ 17	แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA จากหนอนถั่ว <i>Sipunculus nudus</i> และหนอนถั่วสายพันธุ์อื่นสร้างขึ้นโดยวิธีแมกซิมัไลติจูด (Maximum likelihood) โมเดล General Time Reversible (GTR) ตัวเลขทางด้านบนของแผนผังแสดงค่า bootstrap support ที่มากกว่า 50% การวิเคราะห์ 1000 ครั้ง	46
รูปที่ 18	แหล่งที่อยู่อาศัยของหนอนถั่ว <i>S. nudus</i>	47
รูปที่ 19	กราฟแสดงความลาดชันเฉลี่ยและขนาดของหนอนถั่วที่พบ ณ หาดมดตะนอย อ.กันตัง จ. ตรัง	48
รูปที่ 20	ลักษณะของ <i>S. nudus</i> จากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (ก.) ลักษณะภายนอกของหนอนถั่ว (ข.) ลักษณะภายในของของหนอนถั่ว	49
รูปที่ 21	ลักษณะภายนอกและภายในของหนอนถั่วจากเครื่อง Micro computed tomography scan (ก) ผิวด้านนอกของหนอนถั่วบริเวณด้านท้าย (ข) ลักษณะภายในของหนอนถั่ว (ค) ลักษณะตามแนวขวางของลำตัวแสดงให้เห็นช่องที่เชื่อมระหว่างชั้นได้ผิวหนังกับช่องกลางลำตัว	49
รูปที่ 22	กระบวนการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) ของหนอนถั่ว <i>Sipunculus nudus</i> ทั้ง 3 ระยะ: ก- ข ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสดง ระยะที่ 1 และ ระยะที่ 2 , ค- ง ภาพจากกล้อง Scanning electron microscope (SEM) แสดงระยะ 3	51

- รูปที่ 23** การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Oogenesis) ของหนอนถั่วระยะต่างๆ โโอโอโกเนียม (Oogonia; Og), เยื่อหุ้มไข่ (jelly coat ;JC), เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane; CM), นิวเคลียส (Nucleus ;N), Vitelline membrane; VM 52
- รูปที่ 24** ไชไนเนฟริเดีย (Nephridia) ระยะที่พัฒนาเต็มที่ (mature stage) ขนาด 180-200 ไมครอน ก. ภาพจากกล้องสเตอริโอ ไมโครสโคป (stereoscopic microscope) ข. ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน กำลังขยาย 40 เท่า เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane; CM), นิวเคลียส (Nucleus ;N), (Vitelline membrane; VM) 53
- รูปที่ 25** ภาพจาก paraffin section ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin แสดงกลุ่ม สเปออร์มาโทซัวที่ชั้นใต้ผิวหนัง ที่เซลล์แต่ละเซลล์มีขนาดเล็ก 54
- รูปที่ 26** ภาพจาก paraffin section ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin แสดงกลุ่มเซลล์ไข่ที่ชั้นใต้ผิวหนัง 54
- รูปที่ 27** ลักษณะของหนอนถั่ว *S. nudus* เพศผู้ ก. ภาพจากกล้องสเตอริโอ ไมโครสโคป แสดงลักษณะภายนอกของหนอนถั่ว ข. ของเหลวภายในลำตัวหนอนถั่วจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40x..... 55
- รูปที่ 28** ลักษณะของหนอนถั่ว *S. nudus* เพศเมีย (ก). ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอสามารถก๊อมนกมสีขาวได้จากภายนอก (ข.) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40เท่า เมื่อนำของเหลวในช่องลำตัวของหนอนถั่วเพศเมียมาทำการศึกษา..... 56
- รูปที่ 29** กราฟแสดงอัตราส่วนเพศของหนอนถั่ว *S.nudus* แต่ละเดือนตลอดระยะเวลา 12 เดือน 57
- รูปที่ 30** แสดงการเจริญของไข่และเอ็มบริโอของหนอนถั่ว *S. nudus* ในน้ำทะเลโดยวิธีผสมพันธุ์แบบกลุ่ม ที่ระยะเวลา 3, 6 และ 9 ชม..... 58
- รูปที่ 31** แสดงไข่ของหนอนถั่ว *S. nudus* จากการทดลองผสมเทียม ที่ระยะเวลา 3, 6 และ 9 ชม. 59
- รูปที่ 32** ขั้นตอนการเจริญของไข่หนอนตัวแบนที่เป็นปรสิตในหนอนถั่ว *S. nudus* (ก-ข) ไข่ของปรสิต (หนอนตัวแบน) ที่อยู่ 2 ข้างของหลอดอาหาร (esophagus; ep). (ค) สีของถุงไข่ในระยะแรกของการรวมตัว. (ง) ลักษณะของเอ็มบริโอ (embryo) ของในการเจริญระยะแรก. (จ) สีของถุงไข่เมื่อเมื่อเอ็มบริโอเมื่อมีการเจริญมากขึ้น. (ฉ) ลักษณะของเอ็มบริโอของปรสิตใน

- ระยะสุดท้ายก่อนจะเคลื่อนตัวไปที่ปลายหนวด (Tentacle) (ฉ-ช) ตำแหน่งของไข่และการเรียงตัวเพื่อขึ้นไปสู่หนวด; กล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ (Retractor muscle; Re)..... 61
- รูปที่ 33** ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอแสดงเอ็มบริโอของหนอนตัวแบน (embryo; em) บริเวณปลายหนวด (tentacle; T) รอบปาก 62
- รูปที่ 34** รูปจากกล้องจุลทรรศน์ (ก) แสดงเอ็มบริโอของหนอนตัวแบน (*Macrostomum* sp.) ที่พบบริเวณปลายหนวดของหนอนตัว โดยที่ตัวเอ็มบริโอหนอนตัวแบนยังอยู่ในเปลือกไข่ (embryo; em) (ข-ค) เอ็มบริโอของหนอนตัวแบนที่ถูกแยกออกจากไข่โดยเข็มขนาดเล็ก กำลังขยาย 40x..... 63
- รูปที่ 35** (ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงลักษณะทางสัณฐานหนอนตัวแบน (meiobenthic flat worm) (ข) บริเวณส่วนท้ายของลำตัวหนอนตัวแบนมีลักษณะแบนคล้ายใบพายและพบมีขน (ceria; ce) รอบลำตัวช่วยในการเคลื่อนที่ (ค) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอแสดงหนอนตัวแบนระยะตัวเต็มวัย 64
- รูปที่ 36** เปรียบเทียบลักษณะของหนอนตัว ก. หนอนตัวจากหาดมดตะนอย ข. หนอนตัวสายพันธุ์ *sipunculus nudus* (ที่มา: <https://www.alibaba.com/showroom/sipunculus-nudus.html> #image: ออนไลน์)..... 65
- รูปที่ 37** วัฏจักรการสืบพันธุ์ในรอบปีของหนอนตัว 6 ชนิด ได้แก่ 69

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การศึกษาการสะสมของสารพิษจำพวกโลหะหนักในทะเล เช่น ปรอท ตะกั่ว ทองแดง และ แคดเมียม ภายในห่วงโซ่อาหาร (Biomagnification หรือ Bioaccumulation) นิยมใช้สัตว์ทดลอง ประเภท หอยสองฝา เช่น หอยแครง หอยแมลงภู่ ซึ่งหาได้ง่าย สามารถเพาะเลี้ยงได้ในปริมาณ มาก เพื่อนำมาใช้ศึกษาการสะสมของโลหะหนักในตัวหอย ซึ่งหอยทะเลเหล่านี้ดำรงชีวิตเป็น filter feeder คือกินอาหารโดยการกรองสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่แขวนลอยในน้ำทะเล (Kumblad และ Bradshaw, 2008) ทำให้ค่าการสะสมตัวของโลหะที่ได้จากสัตว์ทดลองประเภท Filter feeder เป็น ค่าการสะสมตัวของโลหะที่ได้จากน้ำทะเล แต่การสะสมตัวของโลหะหนักในทะเลส่วนใหญ่ จะ สะสมในตะกอนดินและทราย ดังนั้นสัตว์ทดลองที่มีการกินอาหารจากตะกอนดินและทรายโดยตรง จะมีความเหมาะสมในการใช้เป็นตัวชี้ (Indicator) ปริมาณของโลหะหนักที่สะสมได้ดีกว่าสัตว์ที่ เป็น filter feeder

สัตว์ทะเลหน้าดิน (Benthos) ที่มีการกินอาหารแบบ Deposit feeding โดยใช้หนวด (tentacle) รอบปากนำตะกอนดินเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร แล้วย่อยสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและ อินทรีย์สารที่สะสมในตะกอนดิน (Sediment) ดังนั้นจะทำให้เกิดการสะสมของโลหะหนักจาก ทะเลได้โดยตรงในเนื้อเยื่อของสัตว์ทะเลหน้าดินจำพวกนี้ (Nfon, Cousins และ Broman, 2008)

สัตว์ทะเลหน้าดินกลุ่มที่เป็น Deposit feeder ได้แก่กลุ่ม Echinoderms เช่น ปลิงทะเล ซึ่งมีมูลค่าเชิงพาณิชย์โดยเป็นอาหารราคาแพง จึงไม่เหมาะสมในการนำมาใช้ในการทดลองที่ จำเป็นต้องใช้สัตว์ทดลองจำนวนมาก แต่ก็ยังมีสัตว์ทะเลอีกกลุ่มหนึ่งที่เหมาะสมที่จะเป็น “สัตว์ทดลอง” เพื่อติดตามคุณภาพสิ่งแวดล้อมทางทะเล นั่นก็คือ หนอนถั่ว (Peanut worm)

หนอนถั่วเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทรายโคลน ซอกหิน รอยแยกของปะการังและขึ้นหา กินที่ผิวของแหล่งอาศัยในช่วงน้ำขึ้น พบได้ในทะเลน้ำตื้น ถึง น้ำลึกด้วยเหตุที่หนอนถั่วมีการกิน อาหารแบบ deposit feeding (Cutler, 1994) ทำให้สามารถพบการสะสมโลหะหนักในเนื้อเยื่อ จากการกินตะกอนดินและทราย จึงเหมาะในการนำมาใช้เป็นตัวทดลองติดตามคุณภาพ สิ่งแวดล้อมทางทะเล

ปัจจุบันประเทศไทยยังไม่มี การเพาะเลี้ยงหนอนถั่วในเชิงพาณิชย์ การใช้หนอนถั่วเพื่อเป็น อาหารหรือเป็นเหยื่อสำหรับการตกปลาในทะเลลึกลงได้มาจากการจับจากแหล่งอาศัยตาม

ธรรมชาติเท่านั้น ซึ่งการจับหนอนถั่วจากธรรมชาติจำนวนมาก อาจส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศน์ ณ แหล่งนั้นๆ ดังนั้นการศึกษาชีววิทยาหนอนถั่วเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงจึงเป็นประโยชน์ต่อการทดลองวิทยาศาสตร์

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชีววิทยาและการสืบพันธุ์ของหนอนถั่ว เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเพาะเลี้ยงหนอนถั่วในระบบการทดลองเพื่อนำมาใช้เป็นสัตว์ทดลองในการติดตามคุณภาพสิ่งแวดล้อมทางทะเล

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 ศึกษาชีววิทยาของหนอนถั่วโดยมุ่งเน้นลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการเจริญพันธุ์

1.2.2 ออกแบบระบบการเพาะเลี้ยงหนอนถั่วในห้องปฏิบัติการสำหรับทุกระยะของเจริญพันธุ์ให้ได้จำนวนตัวที่มากพอสำหรับการทดลองติดตามคุณภาพสิ่งแวดล้อมทางทะเล โดยเฉพาะการสะสมโลหะหนักในเนื้อเยื่อสัตว์ทดลอง

1.3 ขอบเขตงานวิจัย

1.3.1 การศึกษาการเจริญพันธุ์ของหนอนถั่วในรอบปี จากแหล่งที่มีการทำประมงหนอนถั่ว ของอำเภอกันตัง จังหวัดตรัง

1.3.2 ศึกษาาระบบสืบพันธุ์และการสืบพันธุ์ของหนอนถั่ว เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการเพาะเลี้ยงต่อไป

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากงานวิจัย

1.4.1 ช่วยแก้ปัญหาในการดำเนินงานของหน่วยงานที่ทำการวิจัยด้านการติดตามคุณภาพสิ่งแวดล้อมในทะเลโดยเฉพาะด้านที่เกี่ยวกับการสะสมของโลหะหนักในดินตะกอนชายฝั่ง ซึ่งยังไม่มีสัตว์ทดลองมาตรฐานที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการศึกษาดังกล่าว

1.4.2 ได้ทราบถึงชนิดของหนอนถั่วในแหล่งอาศัยที่ทำการวิจัยครั้งนี้ รวมถึงระบบสืบพันธุ์และการสืบพันธุ์ซึ่งเป็นความรู้เบื้องต้นสำหรับการวิจัยเพื่อผลิตหนอนถั่วจำนวนมากสำหรับการวิจัยเพื่อไม่ให้เกิดผลกระทบต่อปริมาณหนอนถั่วในแหล่งอาศัยตามธรรมชาติและนำไปพัฒนาสู่การเพาะเลี้ยงหนอนถั่วเชิงพาณิชย์

บทที่ 2

บททวนเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หนอนถั่ว (common name: peanut worms) จัดอยู่ในไฟลัม Sipuncula เป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเล เท่าที่ศึกษาพบทั่วโลกมีมากกว่า 150 ชนิด (Cutler, 1994) เนื่องจากรูปร่างเมื่อหดตัวจะมีลักษณะคล้ายถั่วลิสงจึงเป็นที่มาของชื่อสามัญว่า หนอนถั่ว (Vargas และ Dean, 2009)

หนอนถั่วเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrate) หนอนถั่วที่ได้ทำการศึกษามาก่อนทั้งหมดเป็นสัตว์หน้าดินอยู่อาศัยบริเวณ เขตชายทะเล (intertidal zone) คือ เป็นเขตชายฝั่งทะเลที่อยู่ระหว่างน้ำทะเลขึ้นสูงสุดและน้ำทะเลลงต่ำสุด เขตนี้ในบางพื้นที่พบมีความกว้าง ในขณะที่บางพื้นที่พบว่าไม่กว้างมาก ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับภูมิประเทศ เช่น ความชันของหาด พืชและสัตว์ที่อยู่อาศัยในเขตชายทะเล จึงต้องมีการปรับตัว (adaptation) ให้เหมาะสมกับการอยู่อาศัยในแต่ละแหล่ง โดยพบสิ่งมีชีวิตในพื้นที่ดังกล่าวนี้ มีคุณสมบัติหรือลักษณะพิเศษ และ/หรือพฤติกรรมในการดำรงชีวิตที่เป็นรูปแบบจำเพาะ เพื่อให้สามารถดำรงชีวิตรอดได้ในสภาพแวดล้อมที่มีการเปลี่ยนแปลงปัจจัยทางกายภาพหลายประการในรอบวัน ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของ อุณหภูมิ ความชื้น ความเค็ม หรือ แรงกระแทกของคลื่นทราย เป็นต้น

แหล่งที่อยู่อาศัยของหนอนถั่วที่มีผู้ได้ทำการศึกษาพบว่า สามารถพบหนอนถั่วได้ทั้งในเขตอบอุ่น (temperate) เขตร้อน (tropical) เขตกึ่งเขตร้อน (subtropical) และ เขตหนาว (Frigid zone) (Boyleand และ Rice, 2015) หนอนถั่วเป็นสิ่งมีชีวิตอาศัยตามทราย โคลน ซอกหิน ปะการัง รวมถึงเปลือกหอยที่ตายแล้ว พบได้ในทะเลระดับน้ำตื้น ถึง น้ำลึก โดยหนอนถั่วอาศัยอยู่ในรูและยื่นบางส่วนออกมาหาอาหารเท่านั้น (Hyman, 1959)

2.1 ชีววิทยาของหนอนถั่ว

อาณาจักร (Kingdom) Animalia

ไฟลัม (Phylum) Sipuncula

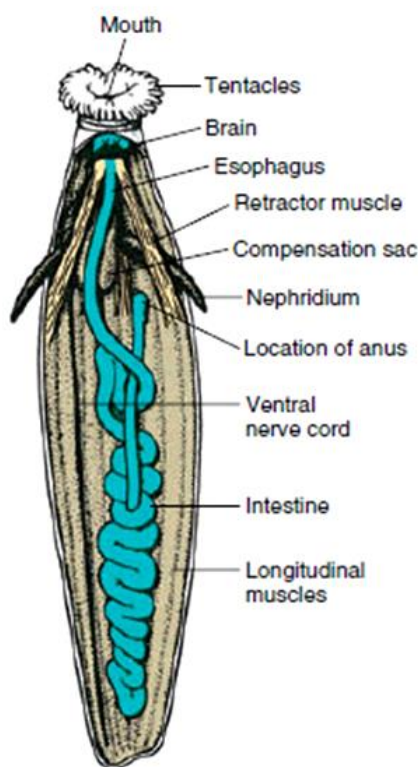
ชั้น (Class) Sipunculidea

อันดับ (Order) Sipunculiformes

ครอบครัว (Family) Sipunculidae

สกุล (Genus) Sipunculus

ชนิด (Species) Sipunculus nudus Linnaeus, 1766



รูปที่ 1 ลักษณะทางกายวิภาคทั่วไปของหนอนตัว (S. nudus)

(ที่มา:<http://sipuncula.myspecies.info/taxonomy/term/64#image>: ออนไลน์)

หนอนตัวส่วนใหญ่เป็นสัตว์ที่ได้รับอาหารจากตะกอนโคลนและทรายหรือดิน (Deposit feeder) โดยหนอนตัวกินสิ่งต่างๆเหล่านี้เข้าไปและย่อย สารอาหารที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ จะถูกย่อยและดูดซึม ส่วนที่ใช้ไม่ได้จะถูกขับออกจากร่างกายทางรูขับถ่าย (anus) (Yan และ Wang, 2002)

Nguyen และคณะ (2007) ได้รายงานว่ หนอนตัว *S. nudus* เป็นอาหารทะเลที่ได้รับ ความนิยมอย่างมากในจังหวัดกว๋างนิงห์ (Quang Ninh) ของเวียดนาม และเป็นที่มาของรายได้ ของประชาชนที่อาศัยในบริเวณนี้ด้วย และผู้วิจัยได้ทำการศึกษาลักษณะทางธรณีสัณฐานแวดล้อม (Geo-environmental characteristics) พบว่า การแพร่กระจายของหนอนตัวขึ้นอยู่กับ ขนาดของ ตะกอนดิน ความเค็ม และ อิทธิพลของน้ำจืด

Nicosia และ Sowinski (1995) ใช้หนอนตัว *S. nudus* เป็นสัตว์ทดลองในการศึกษา รูปแบบของซีรัม อินดิวิจ ซีครีชัน (Serum-induced secretion) โดยศึกษาเซลล์วิทยาของกลุ่มเอ็น เซลล์ (cytology of um cell complex) พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในกลไกการทำงานของภูมิคุ้มกัน (immune defense) ของหนอนตัว

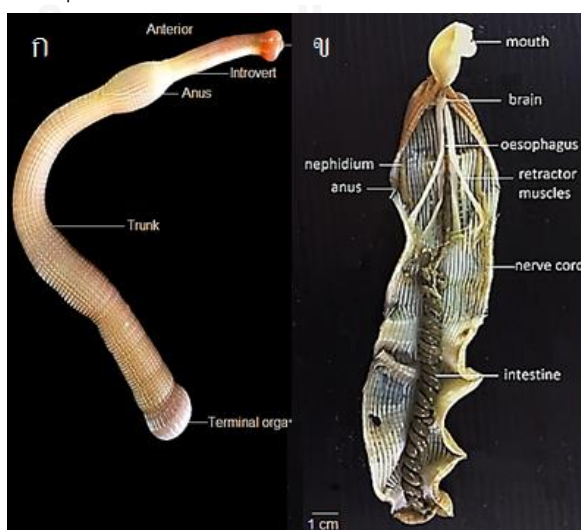
Yan และ Wang (2002) ได้ทดลองวัดการสะสมโลหะหนัก 3 ชนิด ได้แก่ แคดเมียม โครเมียม และ สังกะสี ในหนอนถั่ว โดยการทดลองให้หนอนถั่วได้สัมผัสกับน้ำทะเลและตะกอนดินที่มีโลหะทั้ง 3 ชนิด ปนเปื้อนอยู่ ผลการทดลองพบว่าการสะสม (Bioaccumulation) ของโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด ในน้ำที่สกัดได้จากช่องท้อง (gut juice extracted) ของหนอนถั่วที่ทำการศึกษา และสรุปว่า สะสมของโลหะหนักทั้ง 3 ชนิด เกิดจากการที่หนอนถั่วกินตะกอนดินเข้าไป มากกว่าจะดูดซึมโดยตรงจากน้ำทะเล ดังนั้น ตะกอนดินจึงเป็นต้นเหตุโดยตรงของการสะสมโลหะหนัก (Metal accumulation) ในหนอนถั่ว

Spongberg (2006) ได้ทำการศึกษการสะสมของพีซีบี (PCBs) หรือ โพลีคลอริเนตไบฟีนิล (Polychlorinated biphenyls) ในหนอนถั่ว *S. nudus* ที่จับจากชายฝั่งทะเลแปซิฟิกของประเทศคอสตาริกา พบมีการสะสมของพีซีบี (PCBs) ในเนื้อเยื่อหนอนถั่ว

ปภัสสรฯ แสงธนู และคณะ (2558) ทดลองการใช้แอลคาไลไนโปรติเอสในการผลิตโปรตีนไฮโดรไลเสตที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากหนอนถั่ว พบว่าโปรตีนไฮโดรไลเสตที่ได้จากหนอนถั่ว *S. nudus* โดยใช้เอนไซม์แอลคาไลไนโปรติเอสอาจเป็นแหล่งโปรตีนที่ดี

2.2 กายวิภาคของหนอนถั่ว *S. nudus*

หนอนถั่วมีลักษณะลำตัวกลมยาวไม่มีขา ไม่มีปล้อง มีรูขับถ่าย (anus) อยู่ด้านบนของลำตัว ปลายด้านหน้า (anterior side) มีโครงสร้างที่ยึดหดได้คล้ายคอค (introvert) มีหนวด (tentacle) อยู่ทางด้านหน้าสุดทำหน้าที่จับกินอาหาร



รูปที่ 2 ลักษณะหนอนถั่ว *S. nudus* ประเทศไทย ก) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ข) ลักษณะทางกายวิภาคหลังการผ่าตัดตามยาวลำตัวทางด้านท้อง (ventral side)

2.2.1 ลักษณะภายนอกของหนอนถั่ว

ลำตัว (Body)

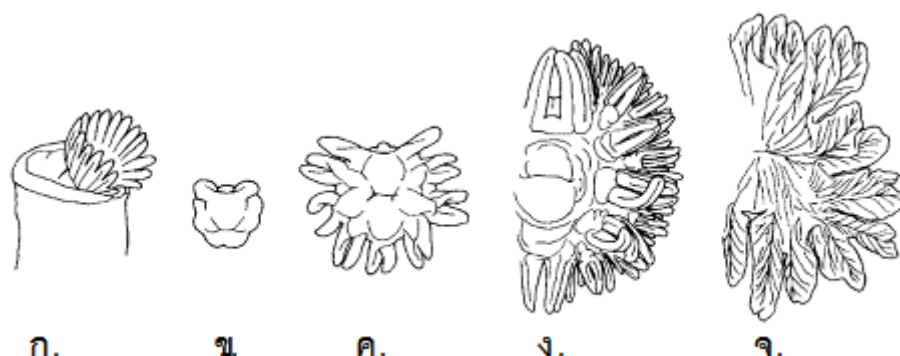
ลำตัวหนอนถั่วประกอบด้วย 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นลำตัว (trunk) ส่วนนี้จะมีพื้นที่มากที่สุด และส่วนที่เป็นคอ (introvert) ลำตัวมีสมมาตรซ้ายขวาหรือสมมาตรแบบครึ่งซีก (bilateral symmetry) ระบายที่ตัดผ่านเส้นกลางลำตัวตามแนวยาวจากบนลงล่างสามารถแบ่งสัตว์ออกเป็นสองซีกที่เหมือนกันทั้งซีกซ้ายและขวา

ทวารหนัก (anus)

เป็นส่วนสุดท้ายของระบบย่อยอาหาร ทำหน้าที่ในการขับถ่ายของเสีย ได้แก่ ทราบ และเปลือกหอยขนาดเล็ก เป็นต้น ในหนอนถั่วสปีชีส์ส่วนใหญ่ทวารหนักจะอยู่บริเวณส่วนหน้า (anterior) ของลำตัว ยกเว้นหนอนถั่วสปีชีส์ *Onchnesoma* และ *Phascolion* จะมีทวารหนักอยู่บริเวณปลายลำตัว

หนวด (Tentacles)

เป็นอวัยวะที่ปลายด้านหน้าสุดของหนอนถั่ว อยู่บริเวณตำแหน่งปลายของคอ(Introvert) ซึ่งลักษณะความแตกต่างของหนวดสามารถใช้ในการแยกชั้น (Class) ของหนอนถั่วได้เป็น 2 ชั้น คือ Sipunculidea และ Phascolosomatidea โดยลักษณะการจัดเรียงหนวดโดยรอบบริเวณปากของชั้น Sipunculidea มีการเรียงตัวของหนวดล้อมรอบปาก ส่วนชั้น Phascolosomatidea การเรียงตัวของหนวดเป็นแนวส่วนโค้ง ซึ่งหนวดของหนอนถั่วทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊สออกซิเจนในน้ำทะเล และจับอาหาร ให้เข้าสู่บริเวณปาก (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ลักษณะหนวด (Tentacles) ของหนอนถั่ว ก. ชั้น (Class) Phascolosomatidea ข.-จ. ชั้น (Class) Sipunculidea (ที่มา: (Edward Bayler Cutler, 1994)

ลำตัวส่วนท้าย (Terminal organ)

ส่วนปลายสุดของหนอนถั่วจะมีรูปร่างต่างกันออกไปตามแต่ละชนิด หน้าที่ของลำตัวส่วนท้าย(Terminal organ) คือช่วยยึดกับพื้นผิวในระยะที่หนอนถั่วเป็นตัวอ่อน (larva) (Cutler, 1994)

คอ (Introvert)

หนอนถั่วมีอวัยวะที่มีลักษณะคล้ายคอ (introvert) อยู่บริเวณด้านหน้าของลำตัว เป็นที่ตั้งของปาก (mouth) คอสามารถยืดหดได้ ทำหน้าที่ในการหาอาหาร บริเวณคอ (introvert) ของหนอนถั่วจะมีอวัยวะลักษณะเป็นตะขอ (hook) หรือบางชนิดมีลักษณะเป็นตุ่ม (papillae) ทำหน้าที่ช่วยในการหาอาหารเพื่อส่งเข้าสู่ปาก

กล้ามเนื้อวงรอบลำตัว (Circular muscle)

เป็นกล้ามเนื้อที่เรียงเป็นวงรอบลำตัวของหนอนถั่ว เมื่อทำงานร่วมกับกล้ามเนื้อตามยาวของลำตัว (longitudinal muscle) ที่อยู่ด้านในทำให้หนอนถั่วเคลื่อนที่ได้

2.2.2 ลักษณะภายในของหนอนถั่ว

หลอดอาหาร (esophagus)

หลอดอาหารเป็นอวัยวะภายในที่อยู่ ด้านหน้าสุดของระบบย่อยอาหาร อยู่ระหว่างปากและลำไส้ ทำหน้าที่เป็นทางผ่านอาหารสู่ลำไส้

ลำไส้ (Intestine)

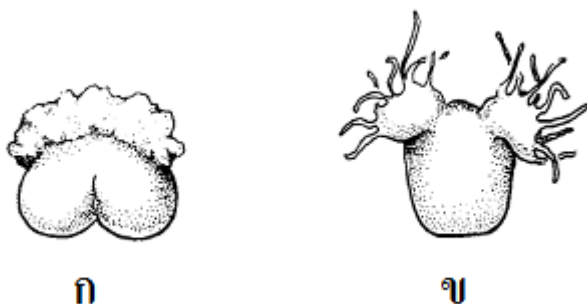
ลำไส้ของหนอนถั่วเป็นส่วนหนึ่งของระบบย่อยอาหารที่อยู่ต่อจากหลอดอาหาร (esophagus) โดยจะแบ่งออกเป็นสองส่วนคือ ส่วนที่เป็นท่อตรง และส่วนที่มีการบิดพันกันเป็นเกลียวคู่ (Double helix) ซึ่งจะเป็นเอกลักษณ์เฉพาะของสัตว์ในไฟลัมนี้

คอนแทร็กไทล์เวสเซล (contractile vessel)

ทำหน้าที่ปั้มน้ำเข้าและออกจากลำตัว ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการหดและยืดตัวของหนอนถั่ว ตำแหน่งของคอนแทร็กไทล์เวสเซลอยู่ติดกับหลอดอาหาร (esophagus) มีจำนวน 2 ข้างทั้งซ้ายและขวา เรียงตัวยาวไปจนเชื่อมต่อกับหนวด (tentacle) นอกจากนี้คอนแทร็กไทล์เวสเซล (contractile vessel) ยังมีหน้าที่เกี่ยวกับระบบแลกเปลี่ยนแก๊สระหว่างภายในตัวหนอนถั่วกับสิ่งแวดล้อมภายนอกอีกด้วย

ระบบประสาท (Brain or Cerebral ganglion)

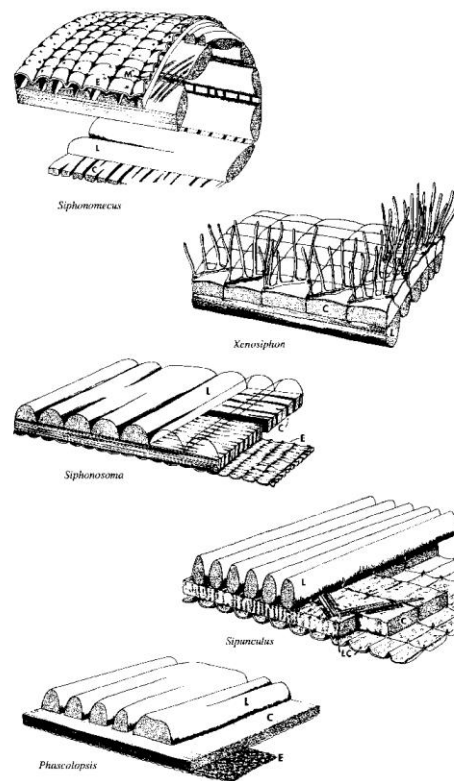
ระบบประสาทของหนอนถั่วประกอบด้วยสมองมีลักษณะเป็นพูที่มีขนาดใหญ่ มี 2 พู (bilobed) อยู่ที่บริเวณด้านหน้าเหนือหลอดอาหาร สมองทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางประสาทสัมผัสรับความรู้สึกต่างๆ ลักษณะความแตกต่างของระบบประสาทของหนอนถั่วสามารถใช้แยกชนิดของหนอนถั่วได้ เช่น *S. nudus* มีระบบประสาทลักษณะคล้ายฟองน้ำ (sponge-like) ซึ่งต่างจาก *S. robustus* ซึ่งมีลักษณะเป็นเส้น (string-like) (รูปที่ 4)



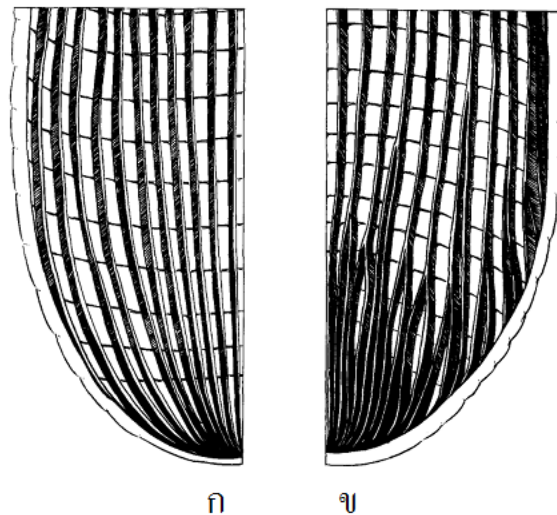
รูปที่ 4 ระบบประสาทของหนอนถั่ว ก. *S.nudus* ข. *S. robustus*
(ที่มา: (Edward Bayler Cutler, 1994))

กล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscle)

การเคลื่อนที่ของหนอนถั่วจะอาศัยกล้ามเนื้อ 2 ชุด ทำงานร่วมกัน แต่การทำงานเป็นลักษณะตรงข้ามกัน (antagonism) คือ ในขณะที่กล้ามเนื้อวง (Circular muscle) หดตัว กล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscle) จะคลายตัว กล้ามเนื้อตามยาวจะพบอยู่ในเฉพาะส่วนลำตัว (trunk) เท่านั้น จะไม่พบที่ส่วนคอ (introvert) นอกจากนั้นจำนวนมัดกล้ามเนื้อและการจัดเรียงตัวของกล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscle) ยังสามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการแยกชนิดของหนอนถั่วได้เช่น *S. indicus* มีจำนวน กล้ามเนื้อตามยาว 37-43 มัด แตกต่างจาก *S. nudus* ที่มีเพียง 24-34 มัด (Cutler, 1994) (รูปที่ 5) โดยจำนวนของกล้ามเนื้อตามยาวจะไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อหนอนถั่วมีการเติบโตเต็มที่ หนอนถั่วบางชนิดการเจริญของกล้ามเนื้อตามยาวที่ยังไม่สมบูรณ์เต็มที่ จึงอาจพบกล้ามเนื้อตามยาวมีลักษณะเป็นแถบติดกัน ในขณะที่หนอนถั่วบางชนิดมีการเจริญของกล้ามเนื้อตามยาวชัดเจนโดยการเรียงตัวเป็นแต่ละมัดแยกออกจากกัน (รูปที่ 6)



รูปที่ 5 ลักษณะผนังลำตัวและกล้ามเนื้อตามยาวของหนอนถั่ว 5 สปีชีส์ C, circular muscle. E, epidermis. L, longitudinal muscle. LC, longitudinal canal. M, minicanal ที่มา:(Cutler, 1994)



รูปที่ 6 ลักษณะของแถบกล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscle) บริเวณส่วนท้าย (Posterior glans region) ของหนอนถั่ว ก. แบบแยกจากกันเรียงตัวต่อเนื่องตลอดทั้งลำตัว ข. แบบติดกันสองส่วน (ที่มา: Cutler, 1994)

เนฟริเดียม (Nephridia)

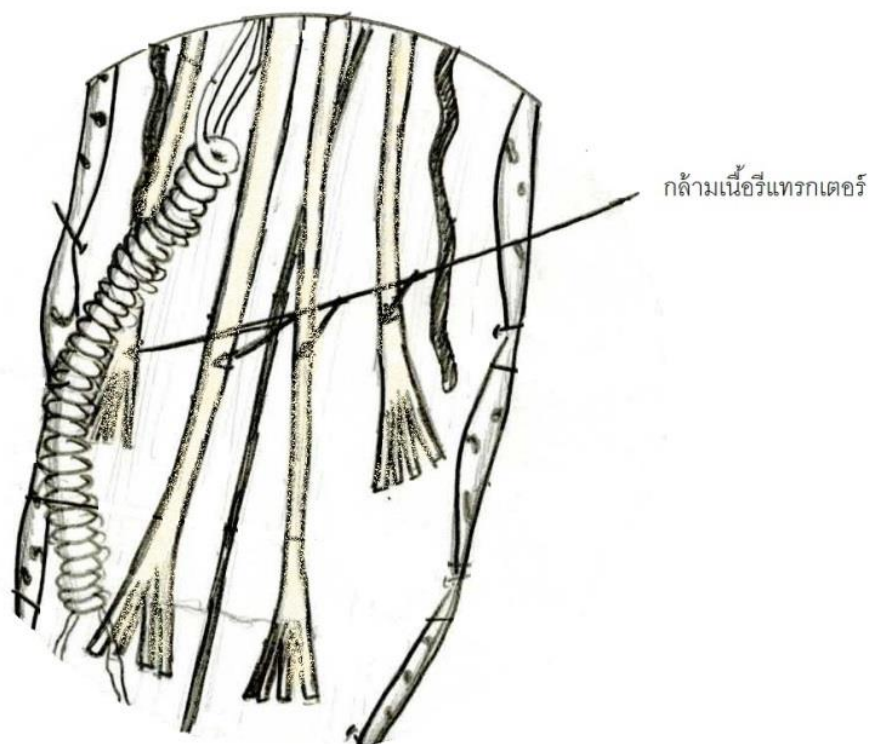
เป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ขับของเสียจากสารอาหารที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ (nitrogenous waste) ต่างๆ จึงทำหน้าที่คล้ายไตในสัตว์ชั้นสูงและยังทำหน้าที่เป็นถุงพักของเซลล์สืบพันธุ์ก่อนปล่อยสู่ทะเล ผ่านช่อง (Nephridiopore) หนอนถั่วส่วนใหญ่มีจำนวน เนฟริเดียม 2 ข้าง ติดกับลำตัว (รูปที่ 7) เนฟริเดียมในหนอนถั่ว บางชนิดล่องลอยอย่างอิสระในช่องกลางลำตัว (coelom) โดยไม่ยึดติดกับผนังลำตัวด้านใน เนฟริเดียมอาจพบได้ 1 ข้าง ในหนอนถั่วบางสกุล (genus) เช่น *Phascolion* และ *Onchnesoma* (Barnes, 1982)



รูปที่ 7 ลักษณะของ เนฟริเดียม (Nephridia) ของหนอนถั่ว *S. nudus*

กล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ (Retractor Muscle)

กล้ามเนื้อภายในลำตัวของหนอนถั่วมีจำนวน 4 เส้น คือ บริเวณด้านท้อง (ventral retractor) จำนวน 2 เส้น และด้านหลัง (dorsal retractor) 2 เส้น เชื่อมต่อระหว่างคอ (introvert) และลำตัว (trunk) บางชนิดมี 2 เส้น (Cutler และ Cutler, 1985) ทำหน้าที่ช่วยในการยืดหดของลำตัวโดยการหดตัวคลายตัวของกล้ามเนื้อทั้ง 4 (รูปที่ 8) จำนวนและตำแหน่งที่ตั้งของ รีแทรกเตอร์ (Retractor Muscle) มีความสำคัญอย่างมากในการแยกชนิดของหนอนถั่ว (Gibbs & Cutler, 1987)



รูปที่ 8 ลักษณะของกล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ (retractor muscle) ของหนอนถั่ว

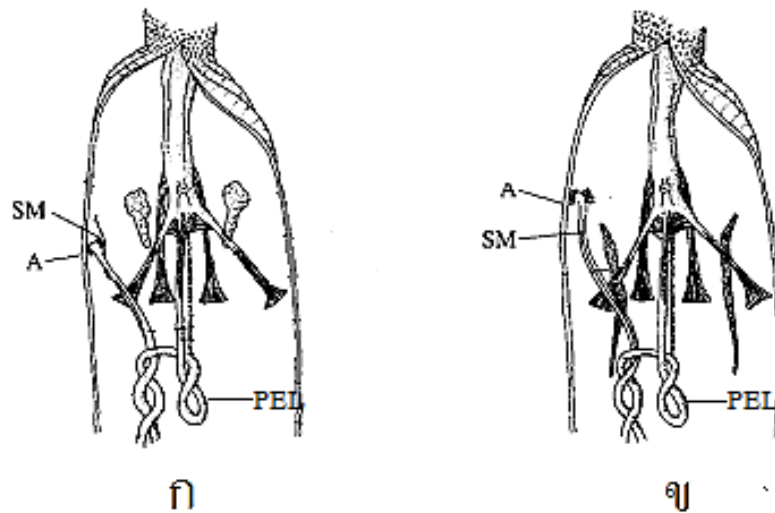
(ที่มา: <https://invertzoology.files.wordpress.com/2013/07/phascolosoma-internal-anatomy.jpg#image>: ออนไลน์)

กล้ามเนื้อสปินเดิล (spindle muscle) วิทยาลัย

หนอนถั่วหลายชนิดมีสปินเดิลมัดเซลล์ หรือเอ็นของกล้ามเนื้อ ในหนอนถั่วหลายชนิดสปินเดิลมัดเซลล์ทำหน้าที่เป็นอวัยวะช่วยพยุงขดลำไส้ (supporting the coils of the intestine) กล้ามเนื้อนี้อยู่ติดกับลำไส้ใกล้กับไส้ตรง (rectum) แต่ในหนอนถั่วบางชนิดกล้ามเนื้อสปินเดิลอยู่ติดกับลำตัวเหนือทวารหนักซึ่งความแตกต่างนี้สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการแยกชนิดหนอนถั่วทางอนุกรมวิธานในระดับครอบครัวและสกุลได้ (รูปที่ 9)

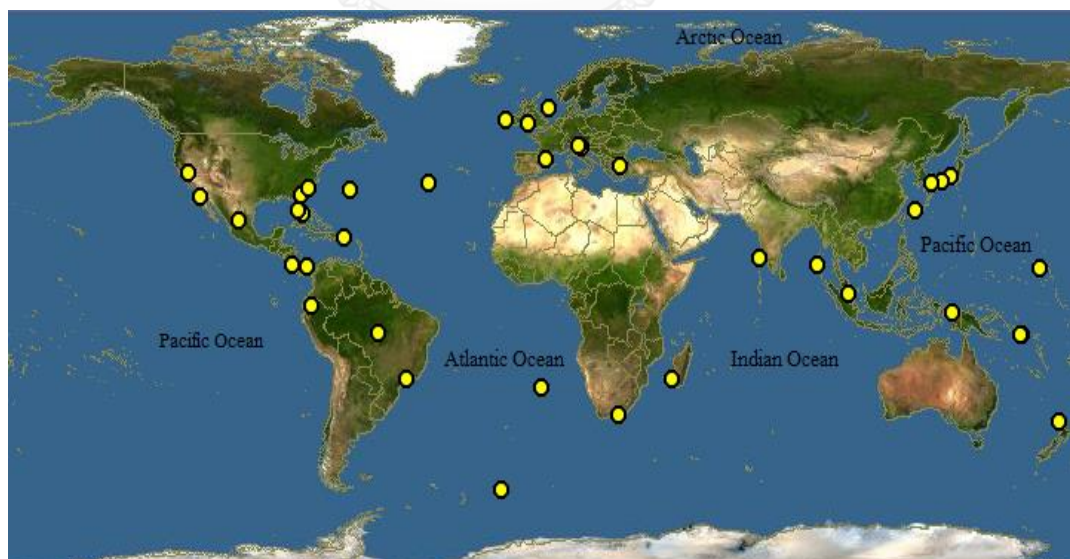
ขดหลอดอาหารส่วนปลาย (Post-esophageal loop)

ลักษณะของหลอดอาหารตรงส่วนปลายที่มีการขดพันกันเป็นเกลียวจะพบได้เฉพาะสกุล (Genus) *Sipunculus* เท่านั้น



รูปที่ 9 กล้ามเนื้อสปินเดิล (spindle muscle) ของหนอนถั่วทั้งสองชนิด (ก.) *S. nudus* (ข.) *S. austrosiphon*. SM; กล้ามเนื้อสปินเดิล, A; ทวาร (anus), PEL หลอดอาหารส่วนปลาย (Postesophageal loop) (ที่มา: Cutler, 1994)

หนอนถั่ว *Sipunculus nudus* เป็นสปีชีส์ที่พบได้ทั่วโลก (cosmopolitan species) พบได้ทั้งในเขตร้อน (tropical) เขตอบอุ่น (temperate) และเขตหนาว (cold) ในทวีปเอเชียมีรายงานพบหนอนถั่ว *S. nudus* ในประเทศ สิงคโปร์ อินโดนีเซีย เวียดนาม จีน ไต้หวัน อินเดีย ญี่ปุ่น และประเทศไทย



รูปที่ 10 การกระจายตัวของหนอนถั่ว *S.nudus* ทั่วโลก

(ที่มา: <http://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Sipunculus+nudus#image>: ออนไลน์)

2.3 หนอนถั่วในประเทศไทย

ประเทศไทยมีรายงานการพบหนอนถั่ว 5 แฟมิลี 10 สกุล และ 24 สปีชีส์ โดยเริ่มมีการศึกษาตั้งแต่ศตวรรษที่ 20 (Frith, Tantanasiwong และ Bhatia, 1976) รายงานการพบหนอนถั่วชนิด *Phascolosoma arcuatum* ที่บริเวณป่าชายเลน ต่อมา (Stephen และ Edmonds, 1972) และ Cutler และ Cutler (1987, 1989) อ้างถึง 8 สปีชีส์ที่พบในประเทศไทย ซึ่งมี 6 สปีชีส์พบในแนวปะการัง และ 2 สปีชีส์พบอยู่พื้นทะเล (Kawauchi และ Giribet, 2014) รายงานพบหนอนถั่ว 8 สปีชีส์ใน ปะการังโขด (*Porites lutea*) และลำสุด (Hylleberg, 2013) พบหนอนถั่ว 2 สปีชีส์ และอีก 8 สปีชีส์ใหม่ที่ยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน

ตารางที่ 1 ชนิดของหนอนถั่วที่พบในประเทศไทย

Class Sipunculidea

Family Sipunculidae

Genus Sipunculus

Sipunculus robustus Keferstein, 1865

Sipunculus thailandicus Hylleberg, 2013

Sipunculus gulfus Hylleberg, 2013

Genus Siphonosoma

Siphonosoma rokense Hylleberg, 2013

Siphonosoma hamuphorum Hylleberg, 2013

Siphonosoma surinense Hylleberg, 2013

Siphonosoma yonense Hylleberg, 2013

Genus Xenosiphon

Xenosiphon andamanense Hylleberg, 2013

Xenosiphon porticus Hylleberg, 2013

Family Themistidae

Genus Themiste

Themiste lageniformis Baird, 1868

Class Phascolosomatidea

Family Aspidosiphonidae

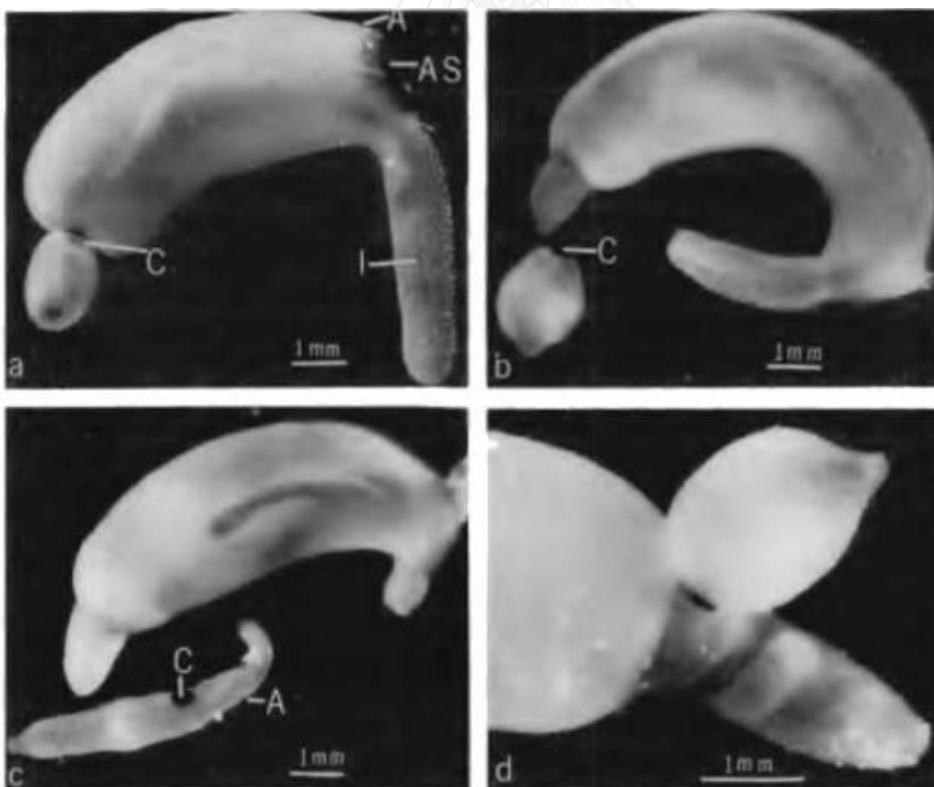
Genus *Aspidosiphon**Aspidosiphon tenuis* Sluiter, 1886 (Sluiter, 1902)*Aspidosiphon steenstrupii* Diesing, 1859*Aspidosiphon elegans* (Chamisso and Eysenhardt, 1821)*Aspidosiphon quadratoides*, Hylleberg, 2013Genus *Golfingia**Golfingia vulgaris herdmani* (Shiple, 1903)Genus *Cloeosiphon**Cloeosiphon aspergillus* (Quatrefages, 1865)Family *Golfingiidae*Genus *Nephasoma**Nephasoma pellucidum* (Keferstein, 1865)Family *Phascolosomatidae*Genus *Phascolosoma**Phascolosoma arcuatum* (Gray, 1828)*Phascolosoma nigrescens* Keferstein, 1865*Phascolosoma agassizii* Keferstein, 1867*Phascolosoma nigrescens* (Keferstein, 1865)*Phascolosoma perlucens* (Baird, 1868)*Phascolosoma scolops* (Selenka, de Man, & Bulow, 1883)Genus *Antillesoma**Antillesoma antillarum* (Grube and Oersted, 1858)

2.4 การสืบพันธุ์ (reproduction)

หนอนถั่วมีการสืบพันธุ์ทั้งแบบอาศัยเพศ (sexual reproduction) และไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction)

2.4.1 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual reproduction)

สามารถพบการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศได้ 2 สปีชีส์คือ *Aspidosiphon brocki* และ *S. robustus* โดย *A. brocki* จะเกิดแบ่งตัวออกเป็นสองส่วน การสืบพันธุ์วิธีนี้หนอนถั่วจะแบ่งตัวจาก 1 ตัว เป็น 2 ตัว โดยส่วนที่แบ่งออกมาต้องมีขนาด 1 ใน 5 ของตัวเดิม (M. Rice, 1975) หนอนถั่วตัวใหม่ที่แบ่งออกมาจากตัวเดิมจะมีการเจริญและสร้างอวัยวะขึ้นมาใหม่จนมีลักษณะเช่นเดียวกับตัวส่วนตัวแม่จะมีการเจริญเพื่อสร้างส่วนที่ขาดออกไปจนกระทั่งมีลักษณะเหมือนตัวดั้งเดิมก่อนจะที่มีการแบ่งเป็น 2 ส่วน (รูปที่ 11) ส่วน *S. robustus* มีรายงานว่าสามารถพบการสืบพันธุ์ได้ทั้งแบบอาศัยเพศและไม่อาศัยเพศโดยการแบ่งตัวตามขวาง (Transverse) และ การแตกหน่อ (Budding) (Rajulu, 1975) สำหรับการแตกหน่อเมื่อหนอนถั่วเติบโตเต็มที่แล้ว จะสังเกตเห็นเนื้อเยื่อถูกสร้างยื่นออกมาจากผิวลำตัวทางด้านข้างจากนั้นจะมีการเจริญเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากก้อนเนื้อเยื่อเป็นหนอนถั่วขนาดเล็กที่มีอวัยวะต่าง ๆ เหมือนตัวแม่ โดยตัวใหม่ที่แตกหน่อออกมาจะมีการสร้างอวัยวะต่างๆขณะที่ยังติดกับตัวแม่ หลังจากติดอยู่กับตัวแม่ระยะหนึ่งก็จะหลุดแยกออกมาดำรงชีวิตเป็นอิสระ



รูปที่ 11 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศของหนอนถั่ว *A. brocki* โดยการแบ่งตัวออกเป็นสองส่วน (a-b) การแบ่งตัวออกเป็นสองส่วน ; Binary fission, (c-d) การแตกหน่อ (budding) (ที่มา: Rice, 1975)

2.4.1.1 พาร์ธีโนเจเนซิส (Parthenogenesis)

เป็นการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ หนอนถั่วสามารถผลิตไข่ที่ฟักเป็นตัวได้โดยไม่ต้องได้รับการปฏิสนธิจากสเปิร์มต่างจากการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยทั่วไป พบได้ใน สปีชีส์ *Themiste lageniformis* หนอนถั่วที่สืบพันธุ์ในลักษณะเช่นนี้จะฟักออกมาเป็นเพศเมียมากกว่าเพศผู้ในอัตราสูงถึง 24 ต่อ 1 (Pilger, 1987) ในสัตว์อื่น ๆ เช่น ในผึ้ง มด ต่อ แตน ก็พบว่ามี การสืบพันธุ์แบบพาร์ธีโนเจเนซิสด้วยเช่นกัน โดยไข่ที่ไม่ได้รับการปฏิสนธิจากสเปิร์มก็สามารถเจริญจนกระทั่งฟักออกมาเป็นตัวอ่อนได้ ซึ่งในกรณีเช่นนี้ไข่จะฟักออกมาเป็นตัวผู้เสมอ

2.4.2 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (sexual reproduction)

หนอนถั่วส่วนใหญ่มีระบบสืบพันธุ์แยกเพศ เป็นเพศผู้ เพศเมีย (bisexual reproduction) หนอนถั่วเพศผู้สร้างสเปิร์มเพื่อไปทำการปฏิสนธิกับไข่ที่หนอนถั่วเพศเมียสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gamete) จะถูกสร้างบริเวณฐานของมัดกล้ามเนื้อด้านท้อง (ventral retractor muscles) ระยะเวลาในการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์แตกต่างกันออกไปในแต่ละ สปีชีส์ เช่น *P. arcuatum* และ *T. lageniformis* เซลล์สืบพันธุ์ใช้เวลาในการเจริญอยู่ในช่องกลางลำตัว 6-7 เดือน (Green, 1975) หลังจากมีการเจริญจนถึงระยะหนึ่งจะหลุดออกมาล่องลอยอยู่ในช่องกลางลำตัวเพื่อเจริญต่อ จนกระทั่งเมื่อไข่และสเปิร์มเจริญเต็มที่พร้อมที่จะเกิดการปฏิสนธิ ไข่และสเปิร์มจะถูกดูดเข้าไปเก็บที่ เนฟริเดีย (Nephridia) ทั้ง 2 ข้างจนถึงระยะหนึ่งก็จะถูกขับออกภายนอกผ่านทางช่องของเนฟริเดีย (Nephridiopore) เพื่อเกิดการปฏิสนธิภายนอกร่างกาย (external fertilization) แต่ก็มีพบหนอนถั่วบางสปีชีส์ เช่น *N. minutum* ที่มีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบกะเทย (Hermaphrodite) หรือพบมีอวัยวะสร้างเซลล์ทั้งสองเพศในตัวเดียวกัน หนอนถั่วจะสร้างทั้งสเปิร์ม และสร้างไข่ได้ในตัวกัน และในเวลาเดียวกัน (simultaneously) (Gibbs และ Cutler, 1987)

2.5 การพัฒนาของตัวอ่อน (Larval Development)

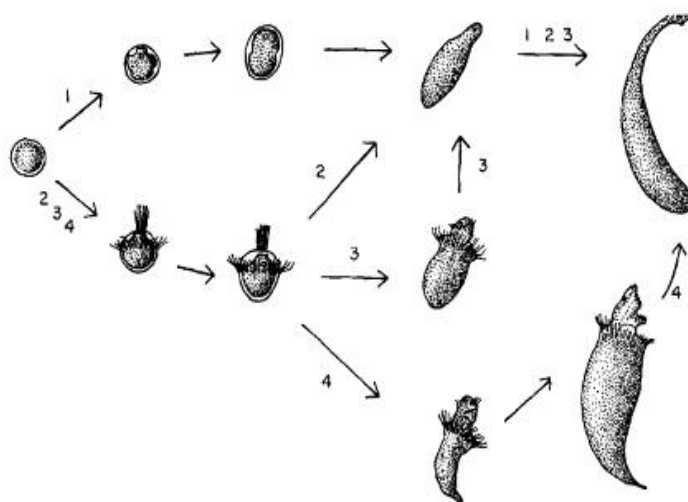
การเจริญของตัวอ่อนหนอนถั่ว หลังจากทีไข่และสเปิร์มปฏิสนธิกันแล้ว จะเกิดการเจริญของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิ (fertilized egg) ไปเป็นเอ็มบริโอและตัวอ่อน (larva) ซึ่งการเจริญของระยะตัวอ่อนไปเป็นตัวเต็มวัยสามารถแบ่งได้เป็นระยะต่างๆ 4 รูปแบบ ดังนี้ (รูปที่ 12)

แบบที่ 1 Direct lecithotrophic development without pelagic larval stages คือ จาก เอ็มบริโอเจริญอยู่ในเยื่อหุ้มไข่ (fertilization membrane) และฟักออกมาเป็นตัว โดยไม่มีระยะ ตัวอ่อนที่ล่องลอยในน้ำทะเล (pelagic larval stage)

แบบที่ 2 Indirect development with one pelagic larva; a lecithotrophic trochophore คือ หลังจากไข่ได้รับการปฏิสนธิแล้ว มีการเจริญระยะเอ็มบริโอ และระยะตัวอ่อน จะถูกปลดปล่อยออกมาในน้ำทะเลอยู่เพียง 1 ระยะ ซึ่งจะมีการเจริญต่อไปเพื่อมีการเปลี่ยนแปลง รูปร่าง (metamorphosis) ไปเป็นตัวเต็มวัย (adult)

แบบที่ 3 Indirect development with two pelagic larval stages (a lecithotrophic trochophore and a lecithotrophic pelagosphaera) จะมีการเจริญตัวอ่อนระยะที่เป็น pelagic larval 2 ระยะจึงจะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นตัวเต็มวัยต่อไป

แบบที่ 4 Indirect development with two pelagic larval stages; a lecithotrophic trochophore and a long-lived planktotrophic pelagosphaera รูปแบบการเจริญแบบนี้หนอน ถั่วจะมีตัวอ่อนระยะแพลงก์ตอนที่ต้องได้รับอาหารในน้ำเพื่อเปลี่ยนแปลงรูปร่างจนเป็นตัว เต็มวัย พวกแพลงโตโทรฟิค (planktotrophic) จะอยู่ในสภาพของแพลงตอน ใช้เวลานานเป็นเดือน ส่วนตัวอ่อนระยะเลซิโทโทรฟิค (lecithotrophic larvae) มักใช้เวลาน้อยอาจจะเป็นชั่วโมงหรือเป็น สัปดาห์ในสภาพของแพลงตอน และพวกที่มีการเจริญโดยตรง (direct developer) จะไม่ได้ใช้เวลา สำหรับการเติบโต (growth) ในสภาพแพลงตอนเลย



รูปที่ 12 รูปแบบการเจริญตัวอ่อนของหนอนถั่วทั้ง 4 แบบ (ที่มา: Boyle and Rice, 2015)

ตารางที่ 2 รูปแบบของการเจริญของตัวอ่อนในหนอนถั่วสกุล (Genus) ต่างๆ (Cutler, 1994)

	รูปแบบของการพัฒนาของตัวอ่อน			
	1	2	3	4
Class Sipunculidea				
Order Sipunculiformes				
Family Sipunculidae				
<i>Sipunculus</i>	-	-	-	x
<i>Siphonosoma</i>	-	-	-	x
<i>Phascolopsis</i>	-	x	-	-
Order Golfingiiformes				
Family Golfingiidae				
<i>Golfingia</i>	-	-	x	-
<i>Nephasoma</i>	x	-	-	x
<i>Thysanocardia</i>	-	-	x	-
Family Phascolionidae				
<i>Phascolion</i>	x	x	x	-
Family Themistidae				
<i>Themiste</i>	x	-	x	-
Class Phascolosomatidea				
Order Phascolosomatiformes				
Family Phascolosomatidae				
<i>Phascolosoma</i>	-	-	-	x
<i>Apionsoma</i>	-	-	-	x
<i>Antillesoma</i>	-	-	-	x
Order Aspidosiphoniformes				
Family Aspidosiphonidae				
<i>Aspidosiphon</i>	-	-	-	x

ตารางที่ 3 รูปแบบการสืบพันธุ์ (reproductive systems) การเจริญตัวอ่อน (Larval development) ของหนอนแก้วแต่ละชนิด (Boyleand และ Rice, 2015)

	Asexual reproduction	Hermaphrodite	Parthenogenesis	sexual reproduction
Budding	<i>A.brocki</i> <i>S.robustus</i> <i>A.elegans</i>			
Pattern I		<i>N. minutum</i>	<i>T. pyroides</i>	<i>P. cryptus</i>
Pattern II				<i>P. strombi</i> <i>P. gouldi</i> <i>P. stromb</i>
Pattern III			<i>T.lageniformis</i> <i>T.alutacea</i>	<i>T. nigra</i> <i>G. vulgaris</i>
Pattern IV				<i>A. antillarum</i> <i>A. misakianum</i> <i>A. spidosiphon</i> <i>A. parvulus</i> <i>N. pellucidum</i> <i>P. perlucens</i> <i>P. agassizii</i> <i>P. antillarum</i> <i>P. varians</i> <i>P. fischeri</i> <i>Siphonosorna sp.</i> <i>S. polymyotus</i> <i>S. cumanense</i> <i>S. nudus</i>

2.6 ช่วงเวลาการวางไข่และผสมพันธุ์ของหนอนถั่ว (spawning and breeding periods)

เซลล์สืบพันธุ์ที่เจริญเต็มที่แล้วจะปล่อยออกมาในช่องกลางลำตัวและถูกดูดมาเก็บไว้ที่เนฟริเดีย (Nephridia) จากนั้นจะถูกขับออกภายนอกผ่านช่องของเนฟริเดีย (Nephridiopore) เพื่อปฏิสนธิภายนอกต่อไป หนอนถั่วแต่ละสปีชีส์ (species) มีระยะเวลาของการวางไข่และปฏิสนธิแตกต่างกัน เช่น *Phascolosoma arcuatum* มีการเจริญของไข่ในช่องกลางลำตัว 2 ปี ก่อนที่จะปล่อยสู่ภายนอก (Green, 1975) สำหรับหนอนถั่วที่มีช่วงความทนทานต่อปัจจัยต่างๆ กว้าง (eurytopic species) เช่น *Apionsoma misakiana* มีช่วงการวางไข่นาน 9 เดือน (Rice, 1981) และ Rice (1975) ศึกษาหนอนถั่ว 9 ชนิด พบว่าหนอนถั่วที่อาศัยอยู่ในเขตอบอุ่น (temperate zone) จะมีช่วงระยะเวลาของการวางไข่และผสมพันธุ์มากกว่าหนอนถั่วที่อาศัยอยู่ในเขตที่อุณหภูมิต่ำซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ (Williams, 1977) ที่ว่าหนอนถั่วที่อยู่ใกล้เส้นศูนย์สูตร (Equator) ฤดูของการผสมพันธุ์จะยาวนานและหนอนถั่วที่อาศัยอยู่ในเขตร้อนอาจจะพบว่าสามารถสืบพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี

ตารางที่ 4 ตารางช่วงเวลาการผสมพันธุ์ของหนอนถั่วสายพันธุ์ (species) ต่างๆ

สปีชีส์ (Species)	ช่วงเวลาการวางไข่และผสมพันธุ์ (เดือน)	References
<i>Golfingia elongate</i>	กรกฎาคม, สิงหาคม	(Åkesson, 1961)
<i>Golfingia minuta</i>	กันยายน - พฤศจิกายน	(Åkesson, 1961)
<i>Golfingia pellucida</i>	กุมภาพันธ์ - พฤษภาคม, สิงหาคม - พฤศจิกายน	(Rice, 1974)
<i>Golfingia vulgaris</i>	มิถุนายน - กันยายน	(Gerould, 1903)
<i>Paraspidosiphon steenstrupi</i>	มิถุนายน	(Rice, 1975)
<i>Paraspidosiphon fischeri</i>	ตุลาคม - ธันวาคม	(Rice, 1975)
<i>Phascolion cryptus</i>	กรกฎาคม - พฤศจิกายน	(Rice, 1975)
<i>Phascolion strombi</i>	กันยายน - พฤศจิกายน	(Åkesson, 1958)
<i>Phascolopsis gouldi</i>	มิถุนายน - สิงหาคม	(Gerould, 1903)
<i>Phascolosoma agassizi</i>	มีนาคม - พฤษภาคม	(Towle และ Giese, 1967)
<i>Phascolosoma antillarum</i>	กรกฎาคม - กันยายน	(Rice, 1975)
<i>Phascolosoma arcualum</i>	ธันวาคม - กุมภาพันธ์	(Green, 1975)

<i>Phascolosoma perlucens</i>	เมษายน	(Rice, 1975)
<i>Themiste alutacea</i>	ตุลาคม-ธันวาคม	(Rice, 1975)
<i>Themiste lageniformis</i>	มิถุนายน	(Lan & Yan, 2001)
<i>Siphonosoma cumancense</i>	มิถุนายน	(Rice, 1975)
<i>Sipunculus nudus</i>	กรกฎาคม	(Rice, 1975)



บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

3.1 หนอนถั่ว

Sipunculus nudus ถูกเก็บมาจากชั้นทรายบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลง ณ หาดมดตะนอย อำเภอกันตัง จ.ตรัง Lat 7.307223' N, Long.99.416662' E ที่ความลึก 40-50 เซนติเมตร

3.2 น้ำทะเล

3.1.1 น้ำทะเลผ่านการกรอง สั่งซื้อจากแหล่งน้ำทะเล จ.ชลบุรี

3.1.2 น้ำทะเลเทียม ผลิตจากสารผสมสำหรับทำน้ำทะเลเทียม(เกลือทะเลเทียมยี่ห้อ Aquaraise)นำมาละลายในน้ำกลั่นปรับให้ได้ค่าความเค็มที่ 30 psu

3.1.3 ทรายเก็บจากบริเวณเดียวกับบริเวณที่เก็บหนอนถั่ว ณ หาดมดตะนอย อำเภอ กันตัง จ.ตรัง

3.3 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้สำหรับงานวิจัย

3.4.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) บริษัท Olympus จำกัด รุ่น CX23 ประเทศญี่ปุ่น

3.4.2 กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereo microscope) บริษัท Olympus จำกัด รุ่น CH20 ประเทศญี่ปุ่น

3.4.3 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราด (Electron scanning microscope) บริษัท JEOL Ltd. รุ่น JSM-5410LV ประเทศญี่ปุ่น

3.4.4 เครื่องชั่งดิจิตอลทศนิยม 2 ตำแหน่ง (analytical balance) บริษัท Metter Toledo รุ่น PG6002-S ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.4.5 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับหลอดไมโครเซ็นทริฟิวจ์ (ependorf centrifuge) บริษัท Beckman coulter รุ่น Allegra 25R ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4.6 ไมโครปิเปตต์ (micropipette) บริษัท Gilson จำกัด (ขนาด 1,5 และ 10 มิลลิลิตร) ประเทศสวิตเซอร์แลนด์

3.4.7 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิตัดลบ 20 องศาเซลเซียสแวนอน (-20°C Freezer) บริษัท Sanyo electric จำกัด ประเทศญี่ปุ่น

3.4.8 ตู้แช่แข็งอุณหภูมิตดลบ 80 องศาเซลเซียสแนวนอน (-80°C Freezer) บริษัท Thermo scientific จำกัด ประเทศสหรัฐอเมริกา

3.4.9 เครื่องวัดความเค็ม (salinity refractometer) บริษัท บริษัท นีโอนิคส์ จำกัด รุ่น HT212ATC ประเทศไทย

3.4.10 ตู้ดูดควัน (fume hood) บริษัท GTech รุ่น GT-240TA ประเทศไทย

3.4.11 เครื่องปั๊มออกซิเจน (oxygen pump) บริษัท ไทย ควอเรียม เซ็นเตอร์ รุ่น yamano ap-10 ประเทศไทย

3.4.12 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) บริษัท Memmert รุ่น UF30 ประเทศเยอรมัน

3.4.13 เครื่องปั่น (blender) บริษัท Panasonic รุ่น MX-GM0501WSN ประเทศญี่ปุ่น

3.4.14 ไม้บรรทัดเวอร์เนีย

3.4.15 ท่อออกซิเจน

3.4.16 ถังไฟเบอร์กลาส ลักษณะก้นแบน ขนาดความจุ 20 ลิตร

3.4.17 ถาดสแตนเลส

3.4.18 กระบอกตวง ขนาด 250 มิลลิลิตร

3.4 ชุดตรวจสอบคุณภาพน้ำ

3.5.1 ชุดตรวจสอบปริมาณไนไตรท์ (Nitrite test kit) บริษัท Vunique ประเทศไทย

3.5.2 ชุดตรวจสอบปริมาณแอมโมเนีย (Ammonium test kit) บริษัท Vunique ประเทศไทย

3.5.3 ชุดตรวจสอบปริมาณอัลคาไลน์ตี้ (Alkalinity test kit) บริษัท Vunique ประเทศไทย

3.5.4 ชุดตรวจสอบค่าความกระด้างของน้ำ (Hardness test kit) บริษัท Vunique ประเทศไทย

3.5 สารเคมีและอาหารเลี้ยงหมอนแก้ว

3.6.1 เอทานอล (ethanol 95% (ปริมาตร/ปริมาตร)) องค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย

3.6.2 เอทานอล (ethanol 99% (ปริมาตร/ปริมาตร)) องค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย

3.6.3 ฟอรัมาลีน (Formaldehyde solution : CH₂O) องค์การเภสัชกรรม ประเทศไทย

3.6.4 โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์ (Potassium Hydroxide : KOH) บริษัท Merck ประเทศไทย
เยอรมนี

3.6.5 เกลือทะเลเทียม (reef salt) บริษัท Aqueraise ประเทศไทย

3.6.6 แพลงค์ตอนพืช (Phytoplankton) บริษัท Bereef aquarium ประเทศไทย

3.6.7 แพลงค์ตอนสัตว์ (Zoonplankton) บริษัท Bereef aquarium ประเทศไทย

3.6.8 อาหารปลาทะเล (Marine fish food) บริษัท White crane ประเทศไทย

3.6 ขั้นตอนและวิธีการดำเนินงานวิจัย

3.7.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) เพื่อระบุชนิด (species) ของ
หนอนถั่ว

3.7.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

จับตัวอย่างหนอนถั่วจากหาดมดตะนอย ตำบลเกาะลิบง อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง โดยการใช้จอบขุดลึกประมาณ 30-60 ซม. บนผิวทราย เก็บตัวอย่างหนอนถั่วจำนวนอย่างน้อย 60 ตัว ในช่วงน้ำลง โดยคัดเลือกให้มีขนาดต่างๆกัน ใส่ลงในถุงพลาสติกขนาด 34 x 60 ซม. เติมน้ำทะเลสะอาดความเค็ม 30 psu จำนวน 1.5 ลิตร แล้วอัดก๊าซออกซิเจน มัดถุงอย่างแน่นหนาและใส่ในกล่องโฟม แล้วส่งทางพัสดุทางอากาศกลับมายังสถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตัวอย่างหนอนถั่วก่อนที่จะนำมาทำการทดลอง จะถูกเลี้ยงไว้ในกระเบะพลาสติก ใส่ทรายสูงจากพื้นประมาณ 10 เซนติเมตร แล้วเติมน้ำทะเลเทียมที่ผสมแล้วลงไปให้มีความสูงจากผิวทราย 10 เซนติเมตร หนอนถั่วจะถูกเลี้ยงโดยการให้อาหารเป็นแพลงค์ตอนพืชและแพลงค์ตอนสัตว์แบบชนิดน้ำโดยการปั่นผสมรวมกัน ให้อาหารวันละครั้งและเปลี่ยนน้ำทำความสะอาดทุกวัน

3.7.1.2 การศึกษาลักษณะภายนอก

ตัวอย่างหนอนถั่วจำนวน 30 ตัว ก่อนที่จะศึกษาจะทำให้หนอนถั่วสลบและคลายกล้ามเนื้อด้วยความเย็นโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียสเป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นทำการศึกษาลักษณะภายนอกของหนอนถั่วภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (Stereo Microscope)

3.7.1.3 การศึกษาลักษณะภายใน

ศึกษาลักษณะภายในรวมไปถึงอวัยวะต่างๆ โดยการผ่าหนอนถั่วตามยาว จากด้านท้ายขึ้นไปสู่ด้านหน้า ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอไมโครสโคป (Stereo Microscope) ทำการศึกษาลักษณะของไข่และก้อนสเปิร์มโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ทั้งลักษณะที่สังเกตได้จากผ่าตัดสด และภายหลังจากการทำให้เนื้อเยื่อคงที่ (fixation) เพื่อนำไปย้อมสีตามกระบวนการเพื่อศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology) และเพื่อการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) บันทึกภาพเพื่อนำมาเปรียบเทียบกับรายงานที่มีมาก่อนหน้า

3.7.1.4 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกับหนอนถั่ว

Sipunculus sp. ในประเทศไทย

เปรียบเทียบจำนวนกล้ามเนื้อตามยาว จำนวนกล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ส่วนท้อง (ventral retractor muscle) และส่วนหลัง (dorsal retractor muscle) ลักษณะ ของหนอนถั่วที่จับจากหาดมดตะนอยกับหนอนถั่วสกุล (Genus) *Sipunculus* ที่มีรายงานในประเทศไทย คือ *Sipunculus gulfus*, *Sipunculus robustus* และ *Sipunculus thailandicus* โดยอ้างอิงตาม (Hylleberg, 2013)

3.7.1.5 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของกับหนอนถั่ว *S. nudus*

จากหาดมดตะนอยกับ หนอนถั่ว *S. nudus* จาก 11 พื้นที่ทั่วโลกอ้างอิงตาม (Kawauchi และ Giribet, 2014)

เปรียบเทียบหนอนถั่ว *S. Nudus* ที่จับจากหาดมดตะนอย เภณท์ที่ใช้เปรียบเทียบได้แก่

3.7.1.5.1 จำนวนกล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscles band: LMBs) นับจากขอบด้านหนึ่งไปอีกด้านหนึ่ง

3.7.1.5.2 ลักษณะของแถบกล้ามเนื้อตามยาวมี 2 ประเภทคือ แบบแยกจากกัน และแบบติดกัน

3.7.1.5.3 ระดับการติดของเนพริเดีย (nepridia) กับ ผังลำตัว (body wall)

3.7.1.5.4 รูปร่างของสมอง (brain)

3.7.1.5.5 รูปร่างของดิจิเทจ โปรเซสเซส (Digitate processes)

3.7.1.5.6 ระยะเวลาของรีแทรกเตอร์ (retractor muscle) แต่ละเส้นทั้งหมด 4 เส้น วัดจากแนวเส้นประสาทกลางลำตัวโดยมัดกล้ามเนื้อที่อยู่ใกล้เส้นประสาทมากที่สุดจะเป็นมัดกล้ามเนื้อส่วนหน้าจะมีด้านซ้ายและด้านขวา ส่วนมัดกล้ามเนื้อที่อยู่ไกลออกไปจะเป็นมัดกล้ามเนื้อส่วนหลังซึ่งจะมีด้านซ้ายและด้านขวาเช่นเดียวกัน

3.7.2 การศึกษาหนอนถั่วโดยวิธีการวิเคราะห์เนื้อเยื่อเชิงโมเลกุล

3.7.2.1 การเก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อ

หลังจากทำการศึกษาหนอนถั่วทางสัณฐานวิทยา และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อทำการศึกษากายวิภาค รวมทั้งการศึกษาเกี่ยวกับไข่และก้อนสเปิร์มแล้ว เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของหนอนถั่วในเอทานอล 95% เพื่อนำไปสกัดสารพันธุกรรม (DNA) สำหรับนำมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อติดตามความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยเปรียบเทียบกับหนอนถั่วที่ได้มีการศึกษามาก่อนหน้า

3.7.2.2 การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างหนอนถั่ว

นำชิ้นเนื้อที่ตัดเก็บไว้ใน 95% เอทานอลมาสกัดดีเอ็นเอด้วยวิธีฟีนอล-คลอโรฟอร์ม(Phenol-chloroform extraction) ตามวิธีของ (Mamiatis, Fritsch, Sambrook และ Engel, 1985) จากนั้นนำดีเอ็นเอที่สกัดได้ ส่งไปทำพีซีอาร์ (PCR) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี โดยวิเคราะห์ 2 ยีนคือ 16S ribosomal RNA (16S rRNA) ตามวิธีของ (Xiadong และคณะ, 2008) และ Cytochrome c oxidase I (COI) ตามวิธีของ (Kawauchi, Sharma และ Giribet, 2012)

3.7.2.3 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์และการหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ

นำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล The National Center for Biotechnology Information (NCBI) เข้าไปที่หน้าเว็บไซต์ <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> เลือกเมนู nucleotide blast ใส่ข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ในช่องที่มีคำว่า Enter accession number(s), gi(s), or FASTA sequence(s) ในหัวข้อ Somewhat similar sequences (blastn) กด blast ระบบจะเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์กับฐานข้อมูลใน NCBI และแสดงรายชื่อสายพันธุ์หนอนถั่วที่มีลำดับนิวคลีโอ

ไทด์ใกล้เคียงกับตัวอย่างนิวคลีโอไทด์ที่ไปเปรียบเทียบ เลือกสายพันธุ์ที่มีค่า identity ใกล้เคียงลำดับกับนิวคลีโอไทด์ที่นำมาวิเคราะห์ครั้งนี้มากที่สุด

สร้างแผนภูมิต้นไม้แสดงความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) โดยทำการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s ribosomal RNA และ COI ของตัวอย่างหนอนถั่วด้วยโปรแกรม ClustalW (Thompson, Higgins และ Gibson, 1994) กับหนอนถั่ว *S. nudus* จากแต่ละแหล่งทั่วโลกจำนวน 48 ตัวอย่าง เพื่อหาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการของลำดับนิวคลีโอไทด์และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์หนอนถั่ว *Themiste pyroides*, *Golfingia elongata* และ *Phascolosis gouldii* เป็นสิ่งมีชีวิตภายนอกกลุ่ม(outgroup)ตามวิธีของ (Kawauchi & Giribet, 2014) การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) ใช้วิธี Construct/Test Maximum Likelihood Tree (ML) รูปแบบ (model) General Time Reversible (GTR) และบูทสเตรป (Bootstrap) ที่ 1,000 ซ้ำ โดยใช้โปรแกรม MEGA version 4.0

3.7.3 ศึกษาการสืบพันธุ์ของหนอนถั่ว (*S. nudus*) ในรอบปี

หลังจากที่ทราบชนิด (species) ของหนอนถั่วจึงได้ทำการติดตามการสืบพันธุ์ในรอบปีของหนอนถั่วที่พบบริเวณหาดมดตะนอย ตำบลเกาะลิบง อำเภอกันตัง จังหวัดตรังเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการเพาะเลี้ยง โดยเก็บข้อมูลดังนี้

3.7.3.1 ศึกษาพื้นที่เก็บตัวอย่าง

โดยการวัดความยาวและความชันหาด (Beach Profile) เพื่อให้ประกอบในการอธิบายลักษณะของหาดมดตะนอย การวัดความยาวและความชันของหาดทำได้ดังนี้

3.7.3.1.1 เลือกบริเวณที่ใกล้แนวน้ำหรือให้สูงกว่าแนวน้ำ 0.25-0.5 เมตร เป็นเขตใกล้แนวน้ำ (low intertidal area) เลือกบริเวณหาดตอนบนโดยให้สูงกว่าระดับน้ำ 1-1.5 เมตร หลังจากการกำหนดระดับล่างระดับบนแล้ว จะกำหนดบริเวณตอนกลางหาดที่จะศึกษา

3.7.3.1.2 กำหนดจุดเพื่อเก็บข้อมูลตามแนวอนจำนวน 15 จุด ห่างกัน 5 เมตร

3.7.3.1.3 การวัดความลาดชันของหาดทำโดยใช้คน 2 คน ยืนห่างกันตามแนวเส้นตรงประมาณตามจุดที่กำหนดไว้ โดยคนแรกจะยืนอยู่ตอนบนของหาดพร้อมกับถือไม้วัดตั้งตรง โดยการประมาณค่าระดับความสูงของไม้เมตรด้วยสายตาโดยเล็งกับแนวขอบฟ้าและน้ำทะเล คนที่สองจะยืนถือไม้วัดเช่นเดียวกันโดยที่เป็นคนเลือนมือขึ้นลงเพื่อให้ได้ระดับสายตาเดียวกันกับ

คนแรกพร้อมอ่านระดับนั้นบนไม้วัด จากนั้นคนแรกจะเดินมาแทนที่ตำแหน่งที่คนที่ 2 ยืนอยู่และคนที่ 2 จะขยับไปจุดที่ 3 ทำแบบนี้เรื่อยๆไปจนหมดแนวเส้น

3.7.3.1.4 คำนวณหาค่าความชัน (slope) ตำแหน่งแต่ละจุด ตั้งแต่น้ำขึ้นสูงสุด ไปจนถึงน้ำลงต่ำสุด

3.7.3.2 ศึกษาาระบบสืบพันธุ์ (reproduction) ของหนอนถั่ว

หนอนถั่วจาก ตำบลเกาะลิบง อำเภอกันตัง จังหวัดตรัง นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการในกระเพาะยที่มีเค็มน้ำ 30 psu สุ่มหนอนถั่วเพื่อนำไปศึกษาาระบบสืบพันธุ์ โดยก่อนทำการศึกษานำหนอนถั่วจากน้ำทะเลจากนั้นนำไปไว้ในห้องที่มีอุณหภูมิ 0°C เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้หนอนถั่วสลบและคลายกล้ามเนื้อมากที่สุด

3.7.3.2.1 ศึกษาลักษณะภายนอกและภายใน

สังเกตลักษณะไข่และสเปิร์มจากภายนอก เนื่องจากลำตัวหนอนถั่ว *S. nudus* มีลักษณะใส เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereoscopic microscope) ทำให้สามารถมองเห็นลักษณะของไข่และสเปิร์มภายใต้ชั้นผิวหนังได้ หลังจากบันทึกภาพที่สังเกตได้แล้วทำการผ่าผนังลำตัวของหนอนถั่วโดยใช้กรรไกรตัดตามแนวยาว (lengthwise) จากบริเวณส่วนท้ายขึ้นมาตลอดลำตัว เมื่อลำตัวเปิดออกแล้ว ศึกษาภายใต้ กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ เก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์ที่พบในช่องลำตัว (coelom) มาศึกษาาระยะการเจริญของไข่ หรือ อสุจิ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope) วัดขนาดและสังเกตรูปร่างของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมีย เปรียบเทียบกับงานวิจัย (Catalan และ Yamamoto, 1994) และ (Lan และ Yan, 2001) เพื่อแยกระยะการเจริญของไข่และสเปิร์มที่อยู่ภายในลำตัวหนอนถั่ว *S. nudus* หนอนถั่วที่ผ่าตัดและบันทึกภาพแล้ว จะนำไปเก็บตัวอย่างของไข่และก้อนสเปิร์ม (sperm plate) เพื่อนำไปทำ paraffin sectioning และย้อมสีเพื่อทำการศึกษาตามเทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา (histology) ต่อไปและทำให้คงสภาพเพื่อนำไปศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด

3.7.3.2.2 การตัดพาราฟิน (Paraffin section)

หลังการผ่าตัดเปิดลำตัวตามยาวและศึกษารายละเอียดต่างๆภายในร่างกายของหนอนถั่วแล้ว-ตัดชิ้นเนื้อกว้าง 2 เซนติเมตร ยาว 4 เซนติเมตรสำหรับนำไปทำ Paraffin sectioning

โดยการตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดเล็กลงเพื่อเหมาะสมต่อกระบวนการ paraffin sectioning ทำให้เนื้อเยื่อในชิ้นเนื้อคงสภาพ (fixation) ด้วยฟอร์มาลีน 10% เป็นเวลา 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นผ่านกระบวนการกำจัดน้ำ (dehydration) เพื่อดึงน้ำยารักษาสภาพและน้ำออกจากชิ้นเนื้อ โดยการแช่ชิ้นเนื้อในเอทานอลที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นตามลำดับ และนำชิ้นเนื้อไปฝัง (embed) ในพาราฟินที่หลอมเหลว เมื่อพาราฟินแข็งตัว ทำการตัดแต่งแท่งพาราฟินที่มีชิ้นเนื้อให้เหมาะสำหรับการตัดให้เป็นชิ้นบางๆ (section) ที่ความหนาประมาณ 5 ไมโครเมตร นำ sections ติดบนแผ่นสไลด์ จากนั้นใช้การย้อมสี-sections โดยใช้เทคนิคย้อมด้วยสี ฮีมาทอกซีลิน และอีโอซิน (Hematoxylin & Eosin staining) เพื่อช่วยให้สามารถศึกษารายละเอียดลักษณะต่างๆจากเนื้อเยื่อนำมาศึกษาและเพิ่มความสามารถในการแยกแยะความแตกต่างของเนื้อเยื่อบันทึกภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 40 เท่า

3.7.3.2.3 การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning electron microscope: SEM)

เนื้อเยื่อที่จะนำมาศึกษา นำมาตัดเป็นชิ้นที่มีขนาดพอเหมาะสำหรับการใช้กับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) ถ้าตัวอย่างมีขนาดเล็กมากจะกรองผ่านกระดาษกรองแล้วตัดกระดาษกรองนำไปทำให้เนื้อเยื่อคงสภาพ (fixation) ในสารผสมของ 2% กลูตารัลดีไฮด์ (2% Glutaraldehyde) กับ 2.5% พาราฟอร์มาลดีไฮด์ (2.5% Paraformaldehyde) ที่ pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง จากนั้นล้าง fixative ออกด้วย สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffer solution; PBS) pH 7.4 2 ครั้ง ย้ายชิ้นเนื้อไปใส่ใน 1% osmic acid นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำผ่านกระบวนการดึงน้ำออกโดยใช้เอทานอล ที่มีเปอร์เซ็นต์สูงขึ้นตามลำดับ แล้วนำชิ้นเนื้อมาผ่านกระบวนการ vacuum freeze-drying และนำเนื้อเยื่อไปวางบนแท่นวางวัตถุสำหรับ SEM เคลือบเนื้อเยื่อที่ต้องการศึกษาด้วย gold particles ใน Polaron SC 502 sputter coater และศึกษาลักษณะรายละเอียดของเนื้อเยื่อด้วย JEOL JSM 6060 scanning electron microscope โดยใช้ accelerating voltage ที่ 10–15 kV. ถ่ายภาพเนื้อเยื่อที่ต้องการด้วยกล้องถ่ายภาพแบบดิจิทัลที่ประกอบมากับกล้อง SEM. (Long, Sheng, Xu, Wang, & Zhu, 2015)

3.7.3.3 ศึกษาอัตราส่วนเพศและตรวาระยะการเจริญพันธุ์ของหนอนถั่ว (*S. nudus*) ในรอบปี

เก็บตัวอย่างหนอนถั่ว *S. nudus* จากหาดมดตะนอย อ.กันตัง จ. ตรัง จำนวนอย่างน้อย 60 ตัว ทุกเดือนเป็นเวลา 12 เดือน โดยคัดเลือกให้มีหนอนถั่วขนาดตัวต่างๆกันข้อมูลจากการสังเกตลักษณะไข่และสเปิร์มจากศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอได้นำมาใช้เป็นข้อมูลสำหรับศึกษาสัดส่วนเพศ (sex ratio) ของหนอนถั่ว *S. nudus*

สุ่มตัวอย่างหนอนถั่วจำนวน 10 ตัว จากตัวอย่างที่ส่งมาในแต่ละเดือน จากนั้นผ่าลำตัวหนอนถั่วตามแนวยาวโดยเก็บข้อมูลดังนี้

- ระยะการเจริญของไข่โดยการวัดขนาดและสังเกตรูปร่างของไข่หนอนถั่ว *S. nudus* ในช่องกลางลำตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 40 เท่า
- ระยะการเจริญของสเปิร์มในก้อนสเปิร์ม (sperm plate) โดยสังเกตและวัดขนาดก้อนสเปิร์ม ในช่องกลางลำตัวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยาย 40 เท่า

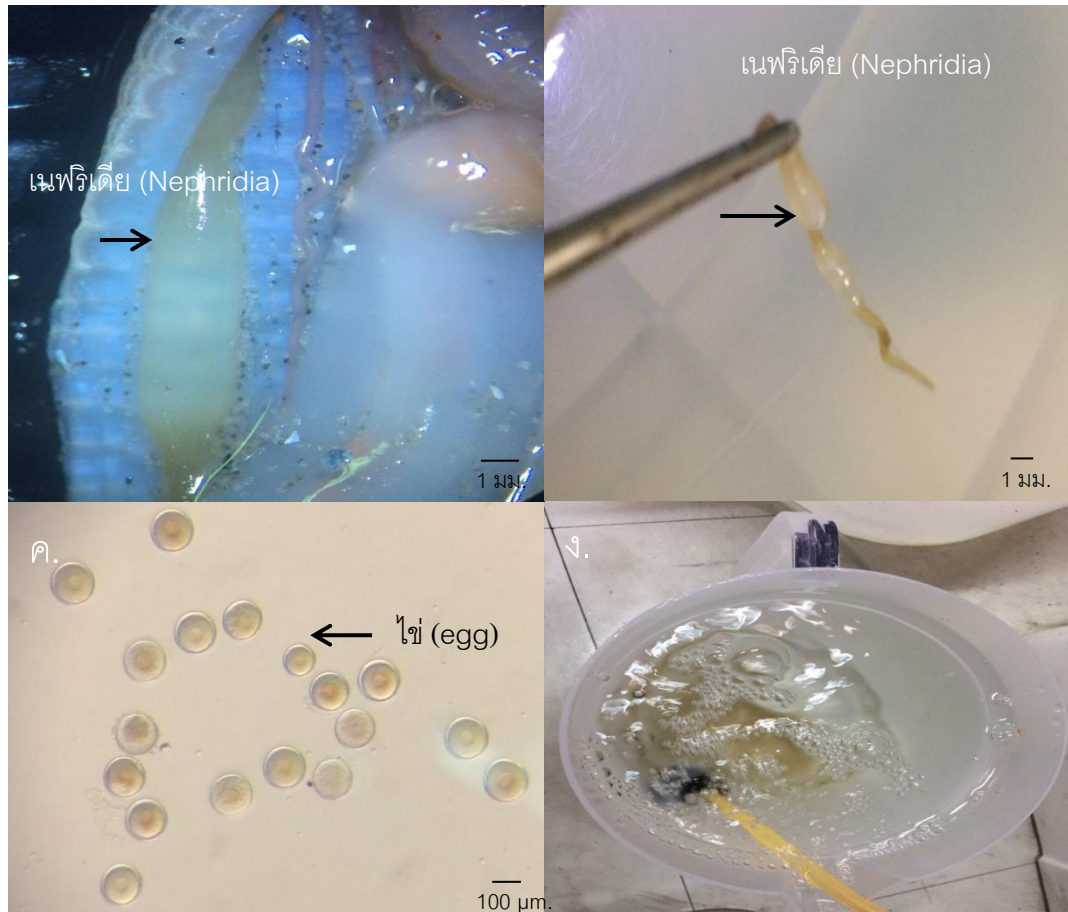
3.7.4 การศึกษาการเพาะเลี้ยงหนอนถั่ว *S. nudus* เบื้องต้น

3.7.4.1 ทดลองผสมพันธุ์หนอนถั่วแบบกลุ่ม

การทดลองทำภายในห้องปฏิบัติการที่ปิดมิดชิดเพื่อควบคุมอุณหภูมิให้คงที่สม่ำเสมอ ระบบทดลองประกอบด้วย กระบะพลาสติกขนาด 40x50x30 ซม. จำนวน 2 ใบ ใส่ทรายสูง 10 ซม. ใส่น้ำทะเล สูงจากผิวน้ำทราย 10 ซม. พร้อมระบบให้อากาศตลอดเวลา กระบะพลาสติกแต่ละใบมีหนอนถั่วขนาดความยาว 10-15 ซม. จำนวน 30 ตัว แบ่งออกเป็นตัวผู้ 15 ตัว ตัวเมีย 15 ตัว วิธีการเลือกคือดูจากลักษณะไข่และสเปิร์มจากภายนอกลำตัวโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอให้อาหารวันละครั้งด้วยแพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ปั่นผสมรวมกัน ควบคุมความเค็มของน้ำให้อยู่ประมาณ 30 psu เก็บข้อมูลเวลา 9.00 ของทุกๆวันตลอดระยะเวลา 30 วัน โดยการใช้ ปิเปตพลาสติก ดูดน้ำบริเวณผิวน้ำทรายและบริเวณกลางน้ำ ใส่ในจานเพาะเลี้ยงเชื้อพลาสติก (plastic petri dish) ขนาด 90 x 15 mm ปริมาณ 1/2 ของความสูงของจาน ทำการสุ่มกระบะละ 5 ซ้ำ ทุกๆ 3 ชม. นำมาศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอเพื่อติดตามการเจริญของไข่และตัวอ่อนของหนอนถั่วที่ถูกขับออกมาภายนอกวางกายสู่น้ำทะเล

3.7.4.2 ทดลองวิธีการผสมเทียม

นำหนอนตัวเพศผู้จำนวน 10 ตัว เพศเมียจำนวน 10 ตัว มาผ่าตัดเปิดกลางลำตัว เพื่อแยกเซลล์สืบพันธุ์ที่อยู่ในเนฟริเดีย (Nephridia) จากนั้นนำมาผสมในภาชนะพลาสติกทรงกระบอก เพื่อศึกษาการเจริญของไข่ (รูปที่ 13 ก-ค)



รูปที่ 13 เทคนิคการผสมเทียมหนอนตัว *S. nudus* (ก. - ข.) แสดงเนฟริเดีย ของหนอนตัวเพศผู้ (ค.) ไข่ในเนฟริเดียของหนอนตัวเพศเมีย (ง.) ภาชนะสำหรับการผสมเทียม

บทที่ 4

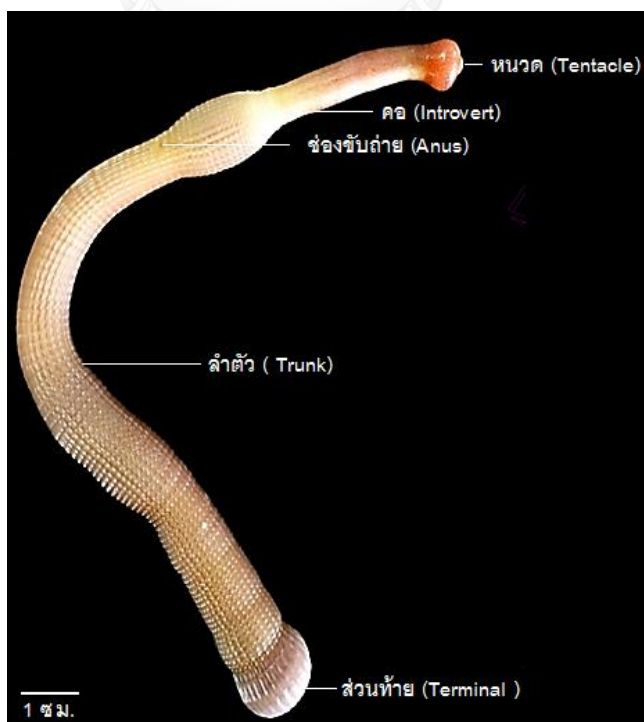
ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคเพื่อใช้ในการจำแนกหนอนถั่วทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy) หนอนถั่ว

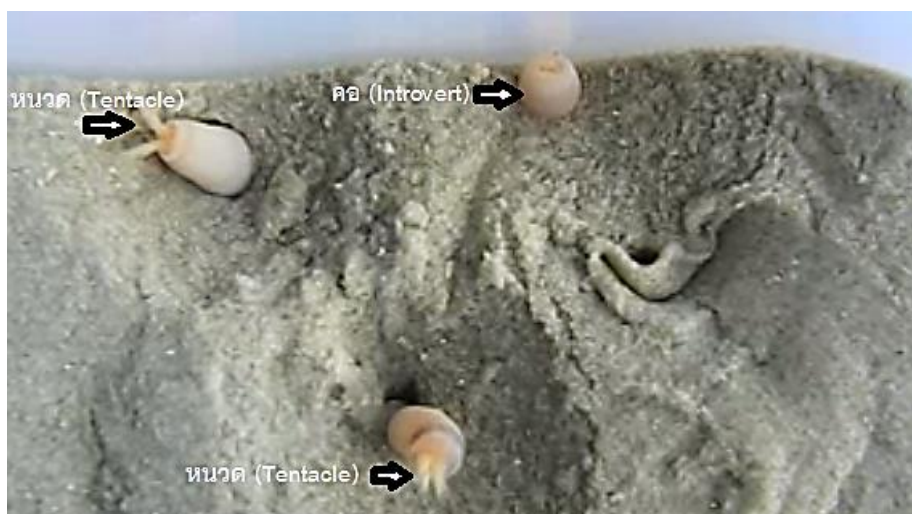
4.1.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphological structure) ของหนอนถั่ว

S.nudus

ลักษณะภายนอกลำตัวของหนอนถั่ว *S.nudus* ศึกษาภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป (stereo microscope) พบว่า หนอนถั่วลักษณะลำตัว (Trunk) กลมยาว ไม่มีปล้อง (unsegment) ผิวด้านนอกไม่เรียบมีร่องตามแนวยาวของลำตัว ปลายด้านหน้า (anterior side) มีโครงสร้างที่หดยื่นเข้าและยืดออกได้ลักษณะคล้ายกับส่วนคอเรียกว่า introvert ด้านหน้าสุดของ ส่วนคอ เป็นที่ตั้งของปาก (mouth) ซึ่งมีหนวด (Tentacle) อยู่โดยรอบ (รูปที่ 15) หนวดทำหน้าที่จับอาหารจากภายนอกนำเข้าสู่หลอดอาหาร (esophagus) และแลกเปลี่ยนแก๊ส ทวาร (anus) เป็นรูที่เปิดออกทางด้านหลัง (dorsal side) ของลำตัวใกล้กับส่วนคอ (รูปที่ 14) นอกจากนั้นมีช่องเปิดออกสู่ภายนอกของ เนฟริเดีย (Nephridiopore) จำนวน 2 ช่องอยู่ระหว่าง ช่องขับถ่ายกับส่วนคอ (รูปที่ 16 ก.) ส่วนท้าย (posterior side) ของลำตัวเรียกว่า Terminal organ (รูปที่ 14)



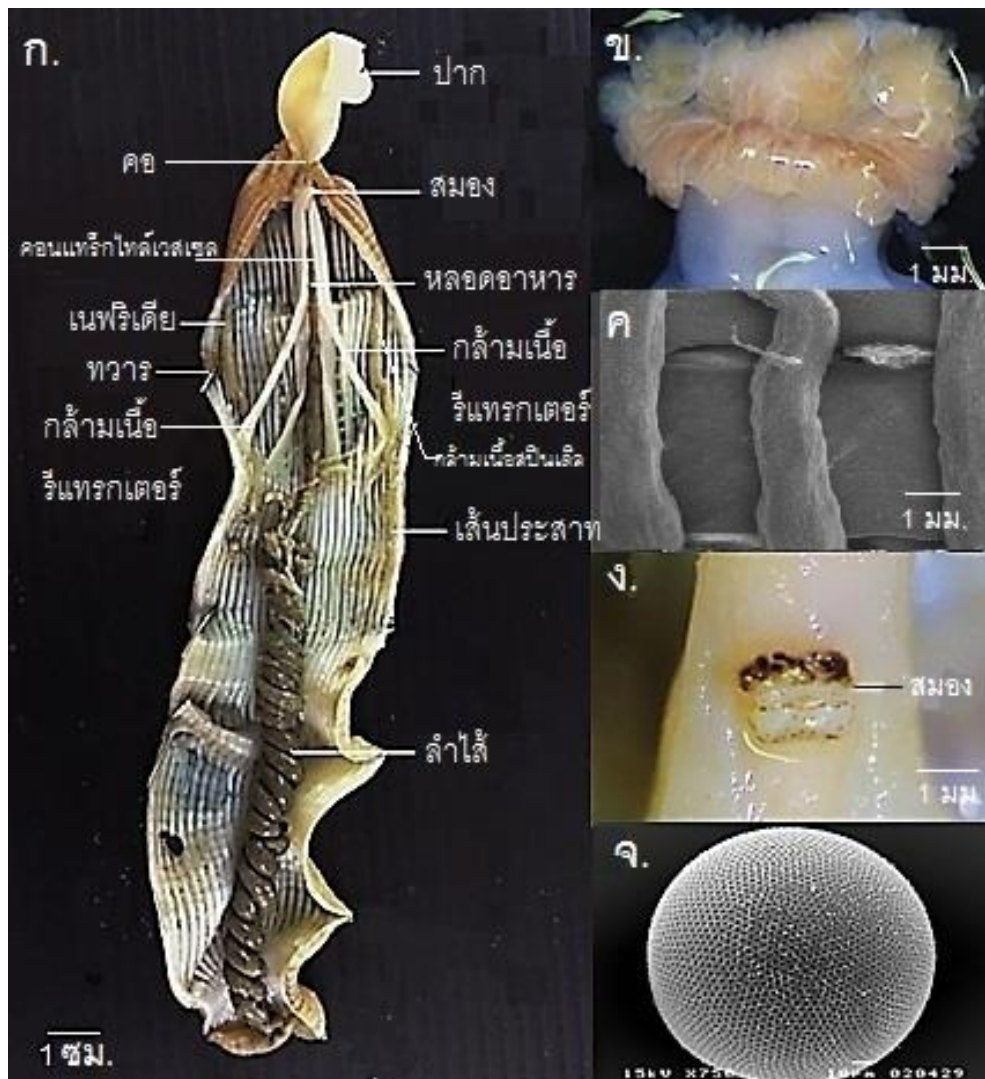
รูปที่ 14 ลักษณะภายนอกของหนอนถั่วจากหาดมดตะนอย อ.กันตัง จ. ตรัง



รูปที่ 15 ลักษณะของอวัยวะที่ยึดหาคลายคอ (introvert) และหนวด (Tentacle) ของหนอนถั่วในน้ำทะเล

4.1.2 ลักษณะทางกายวิภาค (anatomy)

ลักษณะภายในของหนอนถั่วหลังจากผ่าตัดเปิดลำตัวตามยาวทางด้านท้อง (ventral side) พบว่าผนังลำตัวประกอบด้วย กล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscle) จำนวน 26-27 แถบ กล้ามเนื้อวงรอบ (circular muscle) 100-110 วง พบกล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ (Retractor Muscle) จำนวน 4 เส้น เชื่อมผนังลำตัวกับหลอดอาหารและมีบางส่วนเชื่อมติดกับส่วนคอ (introvert) (รูปที่ 16 ก.) พบสมอง อยู่ด้านบนสุดของกล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์มีลักษณะเป็นพู 2 พู (bi-lobed) (รูปที่ 16 ง.) ระบบประสาท (digital process) รูปร่างลักษณะคล้ายฟองน้ำ (sponge-like) หนอนถั่วมีช่องกลางลำตัว (coelom) ขนาดใหญ่เป็นที่ตั้งของลำไส้ที่มีลักษณะพันกันเป็นเกลียวโดยเริ่มตั้งแต่หลอดอาหารเรื่อยลงไปถึงส่วนท้ายของลำตัว กล้ามเนื้อสปินเดิล (spindle muscle) ติดอยู่กับผนังลำตัวอยู่ด้านบนของช่องขับถ่าย (anus) ทำหน้าที่ในการพยุ่งลำไส้ มีเนฟริเดีย (Nephridia) จำนวน 2 ข้าง อยู่ทางด้านบน (dorsal side) ติดผนังลำตัวทั้งซ้ายและขวาทำหน้าที่เป็นทางออกของเซลล์สืบพันธุ์และเป็นอวัยวะขับของเสียออกจากตัวหนอนถั่วด้านข้างของหลอดอาหารทั้ง 2 ข้างเป็นตำแหน่งของคอนแทร็กไทล์เวสเซล (contractile vessel) ลักษณะเป็นเนื้อเยื่อใสแนบติดกันเป็นแนวยาวขึ้นไปสู่บริเวณปาก (รูปที่ 16 ก.) ไช้ของหนอนถั่วมีลักษณะกลม สีขาวขุ่นสามารถสังเกตได้จากภายนอกโดยพบอยู่ใต้เนื้อเยื่อบริเวณลำตัวช่วงที่ใกล้กับส่วนคอ ขนาดของไช้ที่เจริญเต็มที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 180-200 ไมครอน (รูปที่ 16 จ)



รูปที่ 16 ลักษณะโครงสร้างภายในร่างกายของหนอนตัวที่ใช้ในการศึกษา (ก.) ลักษณะภายในของหนอนตัว (ข.) หนวด (Tentacle) (ค.) กล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscle) (ง) รูปร่างของสมอง (จ.) ไข่

4.1.3 การจำแนกทางอนุกรมวิธานเพื่อบ่งบอกชนิดของหนอนตัว

ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของหนอนตัวจากหาดมดตะนอย จังหวัดตรัง นำลักษณะเหล่านี้มาเปรียบเทียบกับไดโคโตมีสคีย์เพื่อวิเคราะห์หาชนิดของหนอนตัวที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้ ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคแล้ว พบว่าหนอนตัวที่จับจากหาดมดตะนอย จังหวัดตรัง มีลักษณะตรงกับลักษณะของหนอนตัวชนิด *Sipunculus nudus* จึงสรุปได้ว่าหนอนตัวจากหาดมดตะนอย อ.กันตัง จ. ตรัง ที่ใช้ในการศึกษาคั้งนี้คือหนอนตัวชนิด *Sipunculus nudus* (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ตารางเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อบ่งบอกชนิดของหนอนถั่ว

1. หนวด (Tentacles) เรียงตัวเป็นแนวโค้งเป็นวงรอบด้านหลังของ nuchal organ ซึ่งตั้งอยู่บริเวณปาก ที่บริเวณคอ (Introvert) อาจจะมีอวัยวะที่มีลักษณะคล้ายตะขอ (hook)..... Class Phascolosomatidea
- ลักษณะหนวดเรียงเป็นวงรอบปาก บริเวณลำคอ (Introvert) อาจจะมีอวัยวะที่มีลักษณะคล้ายตะขอ (hook) หรือมีลักษณะเป็นแผ่น (papillae) Class Sipunculidea, 2
2. ลักษณะของกล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscles) จะติดกันเป็นแถบ..... Family Themistidae
- ลักษณะของกล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscles) เรียงแยกจากกัน ยาวไปตลอดลำตัว ตั้งแต่ปลายท้ายสุด (Terminal organ) ไปถึงปลายหน้าสุดของตัว.....Family Sipunculidae, 3
3. กล้ามเนื้อสปินเดิล (spindle muscle) ยึดติดด้านหลังลำตัว..... Genus Siphonosoma
- กล้ามเนื้อสปินเดิล (spindle muscle) ไม่ยึดติดด้านหลังลำตัว..... 4
4. หลอดอาหารส่วนปลาย (post-esophageal) ก่อนถึงลำไส้ไม่ขดพันกันเป็นเกลียว Genus Xenosiphon
- ปลายของหลอดอาหารมีการขดพันตัวกัน (post-esophageal loop) Genus Sipunculus, 5
5. เนฟริเดีย (Nephridia) ไม่ติดกับผนังลำตัว ระบบประสาทของสมองมีลักษณะเป็นเส้น (stringlike) *S. robustus*
- บางส่วนของ เนฟริเดีย (Nephridia) ติดกับผนังลำตัว สมองมี 2 พู (bi-lobed) ระบบประสาทมีลักษณะคล้ายฟองน้ำ (sponge-like) 6
6. จำนวนแถบกล้ามเนื้อตามยาว (longitudinal muscle bands) ประมาณ 34-39 แถบ มีคอนแทร็กไทล์เวสเซล (contractile vessel) สั้นๆ จำนวน 2 ข้าง *S. thailandicus*
7. จำนวนกล้ามเนื้อตามยาว (longitudinal muscle bands ;LMB) เท่ากับ 24 แถบ มีเส้นใยจำนวน 4 เส้นยึดอยู่บริเวณฐานของกล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ *S.gulfus*
- จำนวนกล้ามเนื้อตามยาว (longitudinal muscle bands) มี 25-26 แถบมีคอนแทร็กไทล์เวสเซล (contractile vessel) 2 ข้างหลอดอาหารยาวไปจนสุดบริเวณหนวด *S. nudus*

4.1.4 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนถั่วกับ *Sipunculus* ในประเทศไทย

เปรียบเทียบลักษณะภายในของหนอนถั่วกับหนอนถั่วสกุล (Genus) *Sipunculus* ที่มีรายงานในประเทศไทย คือ *S. gulfus*, *S. robustus* และ *S. thailandicus* ดังError! Not a valid bookmark self-reference.

หนอนถั่ว *S. nudus* มีจำนวนมัดกล้ามเนื้อตามยาว (longitudinal muscle bands ; LMB) เท่ากับ 26-27 แถบ จำนวนกล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ ส่วนท้อง (ventral retractor muscle) และส่วนหลัง (dorsal retractor muscle) เท่ากับ 1-6 และ 8-12 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 ตารางเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนถั่วสกุล (genus) *Sipunculus* ที่มีรายงานในประเทศไทย อ้างอิงตาม (Hylleberg, 2013)

ชนิด	VR	DR	LMB total
<i>S. gulfus</i>	2-4 หรือ 1-5	8-9	24
<i>S. robustus</i>	3-4 หรือ 2-6	8-12	26
<i>S. thailandicus</i>	1-6	10-14	34-39
<i>S. nudus</i> (ที่ศึกษาในครั้งนี้)	1-6 หรือ 1-7	8-12 หรือ 7-12	26-27

หมายเหตุ: LMBs = มัดกล้ามเนื้อตามยาว; VR = กล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ด้านท้อง; DR = กล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ด้านหลัง

4.1.5 เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนถั่วที่ศึกษากับ *S. nudus* จาก 11 พื้นที่ทั่วโลก

เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนถั่ว *S. nudus* จากหาดมดตะนอย อ. กันตัง จ. ตรังกับ *S. nudus* จาก 11 แหล่งทั่วโลกอ้างอิงตาม (Kawauchi และ Giribet, 2014) (ตารางที่ 7) พบว่า หนอนถั่ว *S. nudus* ที่จับมาจากหาดมดตะนอยมีจำนวนมัดกล้ามเนื้อตามยาวเฉลี่ย (longitudinal muscle bands) เท่ากับ 26 แถบ ลักษณะของแถบกล้ามเนื้อตามยาวเป็นแบบแยกตลอดลำตัว (all split) หนอนถั่วมีบางส่วนของเนฟริเดีย (nephridia) ยึดติดกับผนังลำตัว ประมาณ 43.2% สัดส่วนกล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ด้านท้องข้างซ้ายต่อข้างขวาเฉลี่ยเท่ากับ 1-6/1-6

สัดส่วนกล้ามเนื้อหรือแทรกเตอร์ด้านหลังข้างซ้ายต่อข้างขวาเฉลี่ยเท่ากับ 7-12/7-12 ส่วนในด้านรูปร่างของสมองและระบบประสาทพบว่าหนอนตัวทั้งหมดที่นำมาศึกษาเพื่อการจำแนกทางอนุกรมวิธานจำนวน 30 ตัว ทุกตัวมีสมองรูปร่างเป็นพู 2 พู (bi-lobed) ระบบประสาทแบบกระจุก (solid tuft)

ตารางที่ 7 ตารางเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) ของหนอนตัว *S. nudus* จากประเทศไทยเปรียบเทียบกับสถานที่อื่นๆ 11 แห่งทั่วโลก (ที่มา: (Kawauchi และ Giribet, 2014))

เลขตัวอย่าง	แหล่งที่จับ	DNA Number	LMBs	ลักษณะกล้ามเนื้อตามยาว	การติดของเนพริเดีย	กล้ามเนื้อหรือแทรกเตอร์		สมอง	
						VL/VR	DL/DR	รูปร่าง	ระบบประสาท
130419	Puerto Rico	DNA100234	28	All split	*	*	*	*	*
130420	France	DNA100245-1	31	*	10%	*/1-8	*/8-16	Bilobed	Fringed
		DNA100245-2	31	Not all split	20%	2-6/*	8-14/*	Bilobed	Fringed
		DNA100245-3	31	Not all split	17%	*/1-6	*/9-16	Bilobed	Fringed
130435	Spain	DNA103730-2	31	Not all split	18%	1-7/1-6	*/8-14	*	*
		DNA103730-3	33	Not all split	23%	1-7/1-6	*/9-14	Bilobed	Fringed
130422	Bermuda	DNA100468	23	Not observed	*	*	*	*	*
130423	Panama	DNA100629-1	32	All split	Free	*	*	*	*
		DNA100629-2	32	All split	Free	*	*/8-10	*	*
130424	Belize	DNA100993	28	All split	*	Membrane	Membrane	Bilobed	Solid tuft
130426	Brazil	DNA101882	29	*	41%	*	*	*	*
130430	USA, Florida	DNA103527-1	30	All split	25%	Membrane	Membrane	Bilobed	Solid tuft
		DNA103527-2	30	All split	39%	Membrane	Membrane	Bilobed	Solid tuft
		DNA103527-3	28	All split	15%	Membrane	Membrane	Bilobed	Solid tuft
		DNA103527-4	30	All split	37%	Membrane	Membrane	Bilobed	Solid tuft
		DNA103527-5	30	All split	43%	Membrane	Membrane	Bilobed	Solid tuft
130432	Solomon Islands	DNA103549-1	26	All split	13%	2-5/1-5	*/8-11	Bilobed	Short
		DNA103549-2	26	All split	Free	3-4/3-4	7-9/7-9	Bilobed	Absent
		DNA103549-3	25	All split	Free	3-4/3-4	*/9-10	Bilobed	Absent
		DNA103549-4	28	All split	Free	3-4/3-4	8-10/9-11	Bilobed	Absent
		DNA103549-6	21	All split	14%	1-5/1-5	7-11/7-11	Bilobed	Absent
130433	Solomon Islands	DNA103549-1	25	All split	Free	1-4/2-6	*/7-10	Bilobed	Absent
		DNA103549-5	25	All split	Free	3-4/3-4	9-10/*	Bilobed	*
		DNA103549-7	26	All split	Free	1-4/1-4	6-10/7-10	Bilobed	Short
130421	Vietnam	DNA100246-1	30	Do not split	54%	1-7/1-7	*/7-14	Bilobed	Solid tuft
130440	South Africa	DNA106941	28	All split	Free	Membrane	Membrane	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-1	Thailand	CUMZ(H)1	26	All split	41%	1-6/1-6	9-13/8-13	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-2		CUMZ(H)2	26	All split	71.43	1-5/1-5	6-11/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-3		CUMZ(H)3	26	All split	52.17	1-5/1-5	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-4		CUMZ(H)4	26	All split	66.67	1-6/1-6	7-11/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-5		CUMZ(H)5	26	All split	41.67	1-6/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-6		CUMZ(H)6	27	All split	46.67	1-6/1-6	7-9/7-11	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-7		CUMZ(H)7	26	All split	31.43	1-6/1-5	8-13/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-8		CUMZ(H)8	26	All split	40.00	1-7/1-6	7-13/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-9		CUMZ(H)9	26	All split	50.00	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-10		CUMZ(H)10	26	All split	37.50	1-5/1-5	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-11		CUMZ(H)11	25	All split	44.74	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-12		CUMZ(H)12	27	All split	26.67	1-6/1-6	7-12/7-11	Bilobed	Solid tuft

CUMZ(H)2017.1-13	CUMZ(H)13	26	All split	40.48	1-5/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-14	CUMZ(H)14	26	All split	37.21	1-7/1-6	9-13/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-15	CUMZ(H)15	26	All split	37.50	1-6/1-6	8-13/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-16	CUMZ(H)16	26	All split	53.57	1-6/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-17	CUMZ(H)17	26	All split	39.58	1-6/1-6	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-18	CUMZ(H)18	26	All split	45.00	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-19	CUMZ(H)19	26	All split	40.00	1-6/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-20	CUMZ(H)20	26	All split	37.50	1-6/1-6	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-21	CUMZ(H)21	26	All split	34.29	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-22	CUMZ(H)22	26	All split	30.00	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-23	CUMZ(H)23	26	All split	40.00	1-6/1-6	7-12/7-11	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-24	CUMZ(H)24	26	All split	38.24	1-5/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-25	CUMZ(H)25	27	All split	32.00	1-6/1-6	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-26	CUMZ(H)26	27	All split	43.33	1-7/1-6	7-11/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-27	CUMZ(H)27	26	All split	48.57	1-5/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-28	CUMZ(H)28	25	All split	64.29	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-29	CUMZ(H)29	27	All split	25.00	1-5/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft
CUMZ(H)2017.1-30	CUMZ(H)30	25	All split	42.42	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft

หมายเหตุ: LMBs = มัดก้ามเนื้อตามยาว; VR = ก้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ด้านท้อง; DR = ก้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ด้านหลัง

4.2 การวิเคราะห์เนื้อเยื่อของหนอนตัวเชิงโมเลกุล

4.2.1 การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI

การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome C oxidase I (COI) จากตัวอย่างหนอนตัว 12 ตัวอย่าง และ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16 s ribosomal RNA (16s rRNA) จากหนอนตัวจำนวน 11 ตัวอย่างกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล Gen Bank โดยพิจารณาจากค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% similarity) จากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ 16s rRNA ในฐานข้อมูล Gen Bank พบว่า หนอนตัวที่จับจากหาดมดตะนอย อ.กันตัง จ. ตรัง มีความเหมือนกับหนอนตัว *S. nudus* มากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงอยู่ในช่วง 85-90 เปอร์เซ็นต์ดัง

ตารางที่ 8 ความหลากหลายของดีเอ็นเอ (DNA polymorphism) ของหนอนตัว พบว่า จากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16s rRNA ขนาด 462 คู่เบส มีตำแหน่งคู่เบสที่แตกต่างกันจำนวน 2 ตำแหน่ง สามารถจำแนกฮาปโลไทป์ (haplotypes) ได้ 3 ฮาปโลไทป์ จาก 11 ตัวอย่าง ส่วนลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน Cytochrome c oxidase I (COI) ขนาด 651 คู่เบส มีตำแหน่งคู่เบสที่แตกต่างกันจำนวน 2 ตำแหน่งและจำแนกฮาปโลไทป์ได้ 2 ฮาปโลไทป์ จาก

12 ตัวอย่าง ค่าความหลากหลายของยีน หรือ Haplotype diversity ของยีน 16s rRNA และ COI มีค่าเท่ากับ 0.345 and 0.167 ตามลำดับ

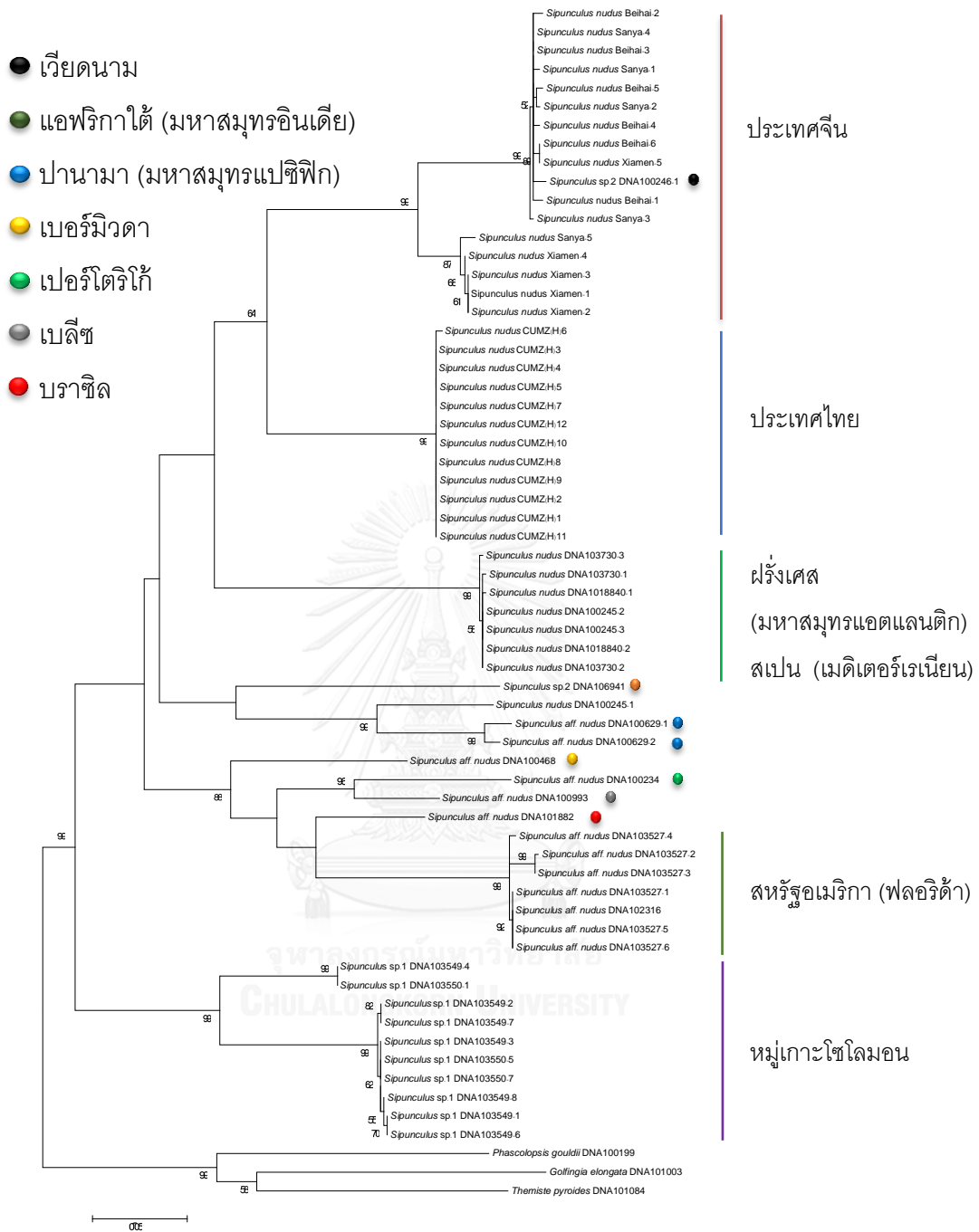
ตารางที่ 8 ตารางเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล NCBI ของหนอนถั่วสปีชีส์อื่น ๆ กับ ที่จับจากหาดมดตะนอย อ.กันตัง จ.ตรัง

ลำดับ นิวคลีโอไทด์ ยีน	เลขตัวอย่าง	ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการที่ใกล้ชิดกับ ฐานข้อมูลใน NCBI	เปอร์เซ็นต์ ความ คล้ายคลึง (%) similarity)	Accession number
COI	CUMZ(H)1	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	86	FJ788918.1
	CUMZ(H)2	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	85	FJ788918.1
	CUMZ(H)3	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	86	FJ788918.1
	CUMZ(H)4	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	85	FJ788918.1
	CUMZ(H)5	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	85	FJ788918.1
	CUMZ(H)6	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	86	FJ788918.1
	CUMZ(H)7	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	85	FJ788918.1
	CUMZ(H)8	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	85	FJ788918.1
	CUMZ(H)9	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	85	FJ788918.1
	CUMZ(H)10	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	85	FJ788918.1
	CUMZ(H)11	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	85	FJ788918.1
	CUMZ(H)12	Sipunculus nudus isolate Xiamen1	85	FJ788918.1
16s rRNA	CUMZ(H)1	Sipunculus nudus haplotype XM8	89	EU260120.1
	CUMZ(H)2	Sipunculus nudus haplotype XM5	89	EU260117.1
	CUMZ(H)3	Sipunculus nudus	89	LC037984.1
	CUMZ(H)4	Sipunculus nudus haplotype XM8	89	EU260120.1
	CUMZ(H)5	Sipunculus nudus	90	LC037984.1
	CUMZ(H)6	Sipunculus nudus haplotype XM8	89	EU260120.1
	CUMZ(H)7	Sipunculus nudus haplotype XM8	89	EU260120.1
	CUMZ(H)8	Sipunculus nudus haplotype XM4	89	EU260116.1
	CUMZ(H)9	Sipunculus nudus	89	LC037984.1
	CUMZ(H)10	Sipunculus nudus	89	EU260120.1
	CUMZ(H)11	Sipunculus nudus	89	EU260120.1

4.2.2 การวิเคราะห์สายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ

การศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ (phylogenetic relationship) ของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ 16s rRNA ของหนอนถั่ว *S. nudus* ที่จับมาจากหาดมดตะนอยกับหนอนถั่ว *S. nudus* จำนวน 48 ชนิดทั่วโลกตามรายงานของ (Kawauchi และ Giribet, 2014) โดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนอนถั่วในสกุล Themistidae , Golfingiidae และ Phascolosomatidae จำนวน 3 ชนิด เป็นสิ่งมีชีวิตภายนอก (outgroup)

จากแผนภูมิแสดงสายสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (รูปที่ 17 Error! Reference source not found.) พบว่าแทกซา (Taxa) ที่เป็นกลุ่มภายนอก (outgroup) และแทกซาที่เป็นกลุ่มภายใน (ingroup) แยกออกจากกันด้วยค่า Bootstap 1,000 ซ้ำ ในกลุ่มแทกซาที่เป็นกลุ่มภายใน (ingroup) จำนวน 48 แทกซา (12 แหล่ง) พบว่าตัวอย่างหนอนถั่วจากหาดมดตะนอยทั้ง 12 ตัวอย่างถูกจัดอยู่ในเคลดเดียวกันโดยแยกออกมาจากประเทศจีนและเวียดนาม จัดตัวแยกเป็นเคลด (clade) ใหม่สำหรับประเทศไทย



รูปที่ 17 แผนภาพต้นไม้วิวัฒนาการจากการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ร่วมกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA จากหนอนถั่ว *Sipunculus nudus* และหนอนถั่วสายพันธุ์อื่นสร้างขึ้นโดยวิธีแมกซิมัมไลคิฮูด (Maximum likelihood) โมเดล General Time Reversible (GTR) ตัวเลขทางด้านบนของแผนผังแสดงค่า bootstrap support ที่มากกว่า 50% การวิเคราะห์ 1000 ครั้ง

4.3 ศึกษาการสืบพันธุ์ของหนอนถั่ว (*Sipunculus nudus*)

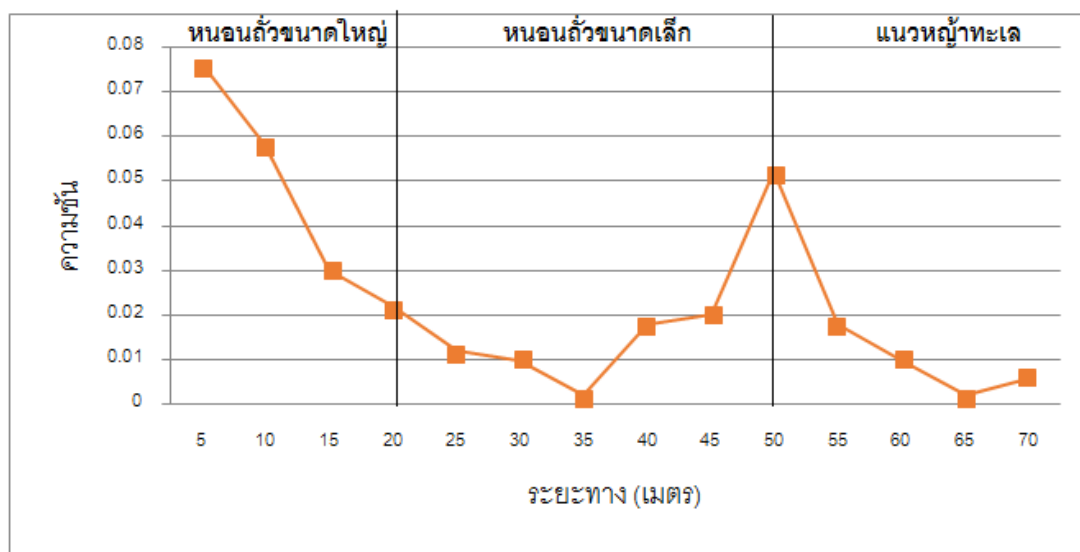
4.3.1 แหล่งที่อยู่ (Habitat)

หนอนถั่วสามารถพบได้ในชั้นทรายละเอียดโดยอาศัยฝังตัวอยู่ภายใต้พื้น บริเวณเขตน้ำขึ้นและน้ำลง (intertidal zone) จัดเป็นพวกที่กินอินทรีย์สารที่อยู่ในทรายเป็นอาหาร (deposit feeders) โดยจะกินเม็ดทรายเข้าไปในตัว และมีระบบการย่อยที่ดูดซึมเฉพาะอินทรีย์สารไว้และขับถ่ายทรายออกมา

ลักษณะแนวชายหาดมดตะนอยจะโค้งเว้ายาวประมาณ 1.3 กิโลเมตร หัวหาดทิศตะวันออกติดกับคลองเจ้าไหม บริเวณหาดล้อมรอบด้วยป่าโกงกาง (mangrove) ทางด้านบนของหาด และหญ้าทะเล (seagrass) ทางด้านล่างของหาด พบหนอนถั่วขนาดใหญ่อยู่บริเวณด้านบนระยะประมาณ 5-20 เมตร และจากข้อมูลการวัดความชันของหาดมดตะนอย (รูปที่ 18) พบว่าหาดมดตะนอยมีความชันของชายหาดไม่สูงมากนักมีค่าอยู่ระหว่าง 0 - 0.08 มีความชันในช่วงบนของหาดประมาณ 0.076 ซึ่งมากกว่าส่วนล่างของหาดมีความลาดชันน้อย เพียงประมาณ 0.006 สามารถพบหนอนถั่วขนาดเล็กได้มากทางส่วนล่างของหาดด้านที่ติดกับแนวหญ้าทะเล (ในแนวประมาณ 20-50 เมตร จากแนวน้ำขึ้นสูงสุด) (รูปที่ 19)



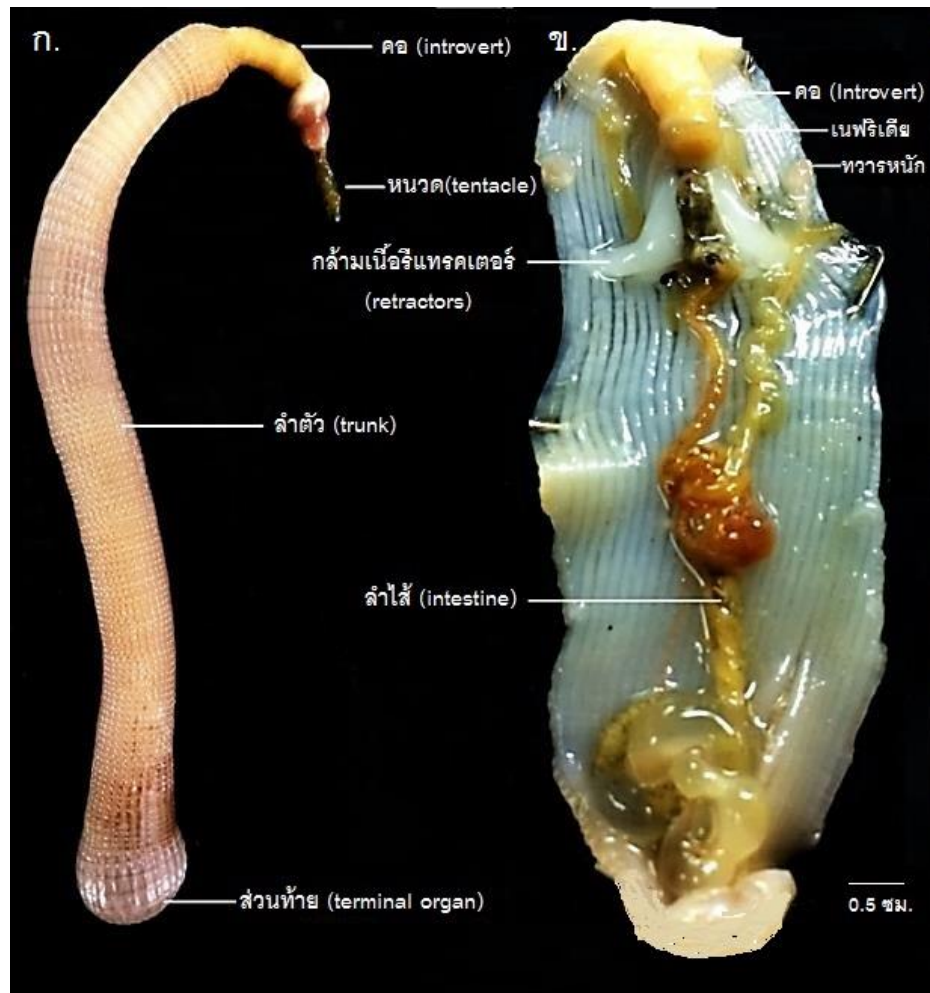
รูปที่ 18 แหล่งที่อยู่อาศัยของหนอนถั่ว *S. nudus*



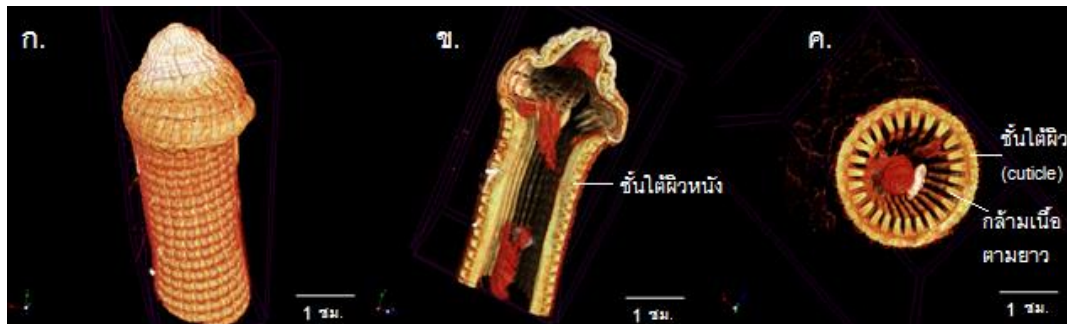
รูปที่ 19 กราฟแสดงความลาดชันเฉลี่ยและขนาดของหนอนตัวที่พบ ณ หาดมดตะนอย อ. กันตัง จ. ตรัง

4.3.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนตัว *S. nudus*

ผลจากการศึกษาลักษณะภายนอกลำตัวของหนอนตัวด้วยกล้องสเตอริโอ (stereoscopic microscope) พบว่า หนอนตัว *S. nudus* ลำตัวแบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ ส่วนลำตัว (trunk) มีลักษณะลำตัวกลมยาว ไม่มีปล้อง (unsegment) ประกอบด้วยกล้ามเนื้อตามยาวและตามขวางและส่วนที่ยึดหดได้คล้ายคอ (introvert) มีหนวด (tentacle) ล้อมรอบบริเวณปากใช้ในการหาอาหาร (Feeding) และแลกเปลี่ยนแก๊ส (gas exchange) ขนาดโตเต็มที่มีความยาวประมาณ 15-20 เซนติเมตร ภายในลำตัวประกอบด้วยของเหลวและอวัยวะต่างๆ ลำไส้ขดพันกันเริ่มตั้งแต่ส่วนบนไปถึงส่วนปลายแล้วจะวกกลับขึ้นมาเป็นทางออกของทวาร (anus) อยู่ด้านข้างของลำตัวด้านบน มีกล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ (retractor muscle) 4 แห่ง ยึดกับลำตัวทำหน้าที่ช่วยในการยึดหดลำตัว (รูปที่ 20 Error! Reference source not found.) ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานและกายวิภาคโดยใช้เครื่อง Micro computed tomography scan (Micro CT Scan) แสดงให้เห็นถึงลักษณะภายนอกและภายในของหนอนตัวที่มีระบบลำไส้แบบเกลียวคู่ (double helix) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ phylum Sipuncula และมีช่องระหว่างชั้นใต้ผิวหนัง (cuticle layer) กับชั้นกล้ามเนื้อ ซึ่งช่องดังกล่าวทำหน้าที่เป็นทางผ่านของเซลล์สืบพันธุ์ของกลางลำตัว (รูปที่ 21)



รูปที่ 20 ลักษณะของ *S. nudus* จากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (ก.) ลักษณะภายนอกของหนอนตัว (ข.) ลักษณะภายในของหนอนตัว



รูปที่ 21 ลักษณะภายนอกและภายในของหนอนตัวจากเครื่อง Micro computed tomography scan (ก) ผิวด้านนอกของหนอนตัวบริเวณด้านท้าย (ข) ลักษณะภายในของหนอนตัว (ค) ลักษณะตามแนวขวางของลำตัวแสดงให้เห็นช่องที่เชื่อมระหว่างชั้นได้ผิวหนังกับช่องกลางลำตัว

ผู้วิจัยจึงมุ่งที่จะสังเกตไขในช่องลำตัวและใน nephridia เนื่องจากรายงานของ (Rice, 1988) กล่าวว่า ไม่สามารถระบุเพศ *S. nudus* จากการสังเกตภายนอกร่างกายได้ จะสามารถระบุเพศเฉพาะในระยะเวลาเจริญพันธุ์เท่านั้น เนื่องจากหนอนตัวมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แล้วปล่อยเข้ามาเก็บไว้ในช่องลำตัวและจะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาภายนอก ผ่านช่องเปิดเนฟริเดียม (nephridiopore) เพื่อเกิดการปฏิสนธิภายนอก (external fertilization)

4.3.3 สืบพันธุ์ (Reproduction) ของ *S. nudus*

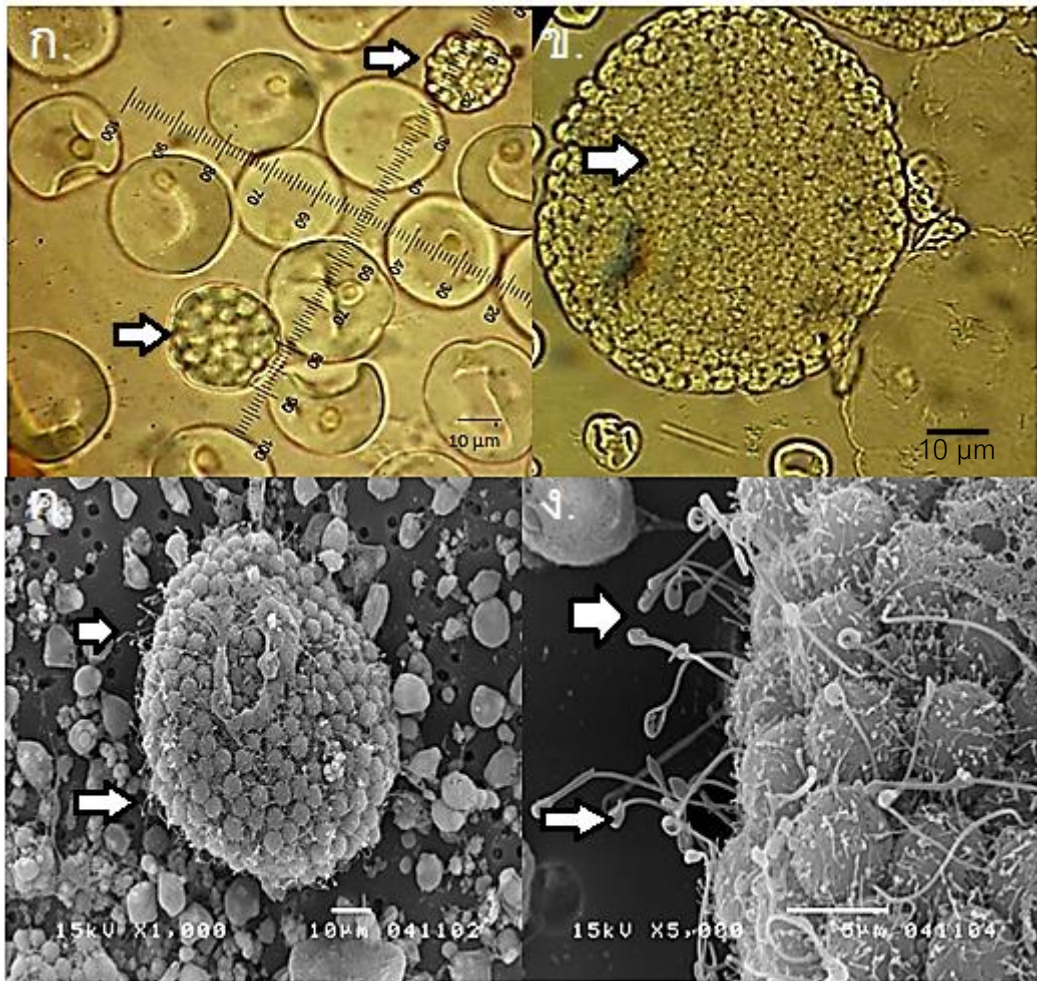
4.3.3.1 กระบวนการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis)

เซลล์ต้นกำเนิดตัวอสุจิ (spermatogonium) ของหนอนตัวถูกสร้างจากบริเวณฐานมัดกล้ามเนื้อส่วนท้อง (ventral retractor muscles) และจะเคลื่อนสู่ช่องลำตัว (trunk coelom) หลังจากนั้น spermatocytes รวมกันเป็นกลุ่มก้อน (clusters) เรียกว่า sperm plate จนมีขนาดใหญ่ขึ้น ระยะของสเปิร์มสามารถแบ่งได้เป็น 3 ระยะโดยอ้างอิงงานวิจัยของ (Catalan และ Yamamoto, 1994)

ระยะที่ 1 สเปิร์มาโทไซต์หลุดออกมาจาก แหล่งสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาอยู่ช่องลำตัวของหนอนตัว จากนั้นก็มีการเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้น และสเปิร์มาโทไซต์จะมารวมตัวกันเป็นกลุ่ม เรียกว่า sperm plate ระยะนี้กลุ่มก้อนของเซลล์สเปิร์มาโทไซต์จะมีขนาดประมาณ 25-30 ไมครอน (รูปที่ 22 ก)

ระยะที่ 2 กลุ่มเซลล์สเปิร์มาโทไซต์ภายใน sperm plate จะเพิ่มจำนวนมากขึ้น ลักษณะของ sperm plate กลมและมีขนาดใหญ่ขึ้นเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 70-80 ไมครอน ดังรูปที่ 22 ข

ระยะที่ 3 สเปออร์มาโทไซต์เจริญโดยการแบ่งเซลล์เปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นสเปออร์มาทิด (spermatid) และสเปออร์มาทิด มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (cell differentiation) เป็นตัวอสุจิหรือ สเปิร์ม (spermatozoa) ที่มีส่วนหัวและหางแต่สเปิร์มยังคงรวมตัวกันอยู่ในรูปของ sperm plate หัวของ spermatozoa จะมีขนาดประมาณ 1-1.5 ไมครอน ส่วนหางยาวประมาณ 80-100 ไมครอน (รูปที่ 22 ค-ง)



รูปที่ 22 กระบวนการสร้างสเปิร์ม (spermatogenesis) ของหนอนถั่ว *Sipunculus nudus* ทั้ง 3 ระยะ: ก- ข ภาพจากกล้องจุลทรรศน์แสงแสดง ระยะที่ 1 และ ระยะที่ 2 , ค- ง ภาพจากกล้อง Scanning electron microscope (SEM) แสดงระยะ 3

4.3.3.2 การสร้างไข่ (oogenesis)

เริ่มจากเซลล์ต้นกำเนิดไข่ (oogonium) สร้างจากบริเวณฐานของกล้ามเนื้อหรือ แทรกเตอร์ตำแหน่งเดียวกับเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogonium) เซลล์ไข่มีลักษณะผิวเรียบ

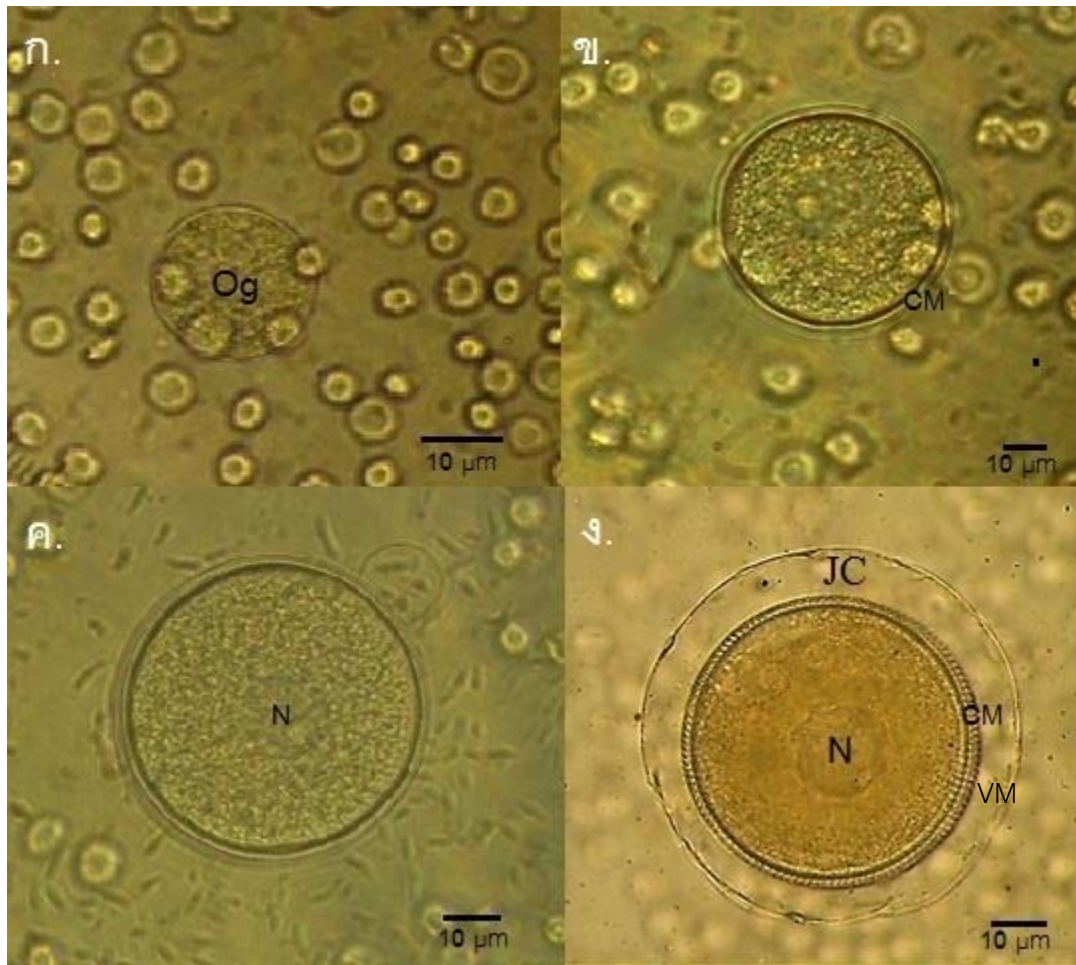
รูปร่างกลม เมื่อเจริญจนสู่ระยะหนึ่งจะเคลื่อนสู่ช่องลำตัว (trunk coelom) สามารถแบ่งระยะการเจริญของไข่โดยเทียบกับงานวิจัยของ (Lan และ Yan, 2001) ได้เป็น 4 ระยะ (รูปที่ 23 ก-ง) คือ

ระยะที่ 1 เป็นระยะที่ไข่มีการสะสมสารในไซโทพลาสซึม ทำให้สามารถแยกออกจากเซลล์ชนิดอื่นๆที่พบในช่องลำตัวได้ระยะนี้ไข่มีขนาด 20-30 ไมครอน(รูปที่ 23 ก)

ระยะที่ 2 โอโอไซต์ (oocyte) มีการสะสมสารในไซโทพลาสซึมมากขึ้น ทำให้ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น ระยะนี้ไข่จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 60-70 ไมครอน (รูปที่ 23 ข)

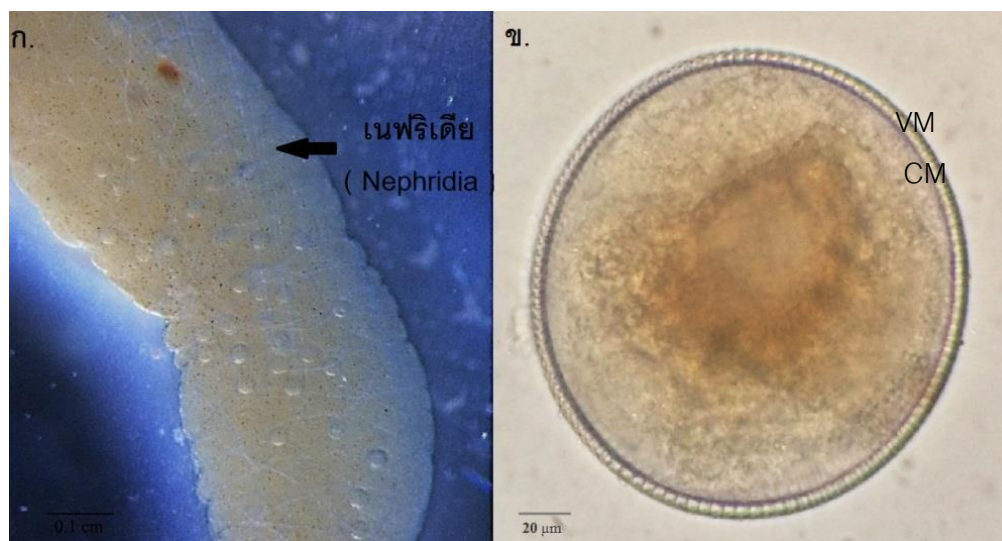
ระยะที่ 3 เซลล์ไข่ รูปร่างทรงกลม เห็นนิวเคลียสชัดเจน ไข่จะมีขนาดใหญ่ 120-150 ไมครอน (รูปที่ 23 ค)

ระยะที่ 4 ในขั้นตอนนี้สามารถสังเกตการสร้างชั้นวุ้นที่หุ้มเซลล์ไข่ (jelly coat) ในระยะนี้สามารถสังเกตเห็นชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane; CM) ที่ติดอยู่กับไซโทพลาสซึม และเยื่อวิทเทิลลิน(vitelline membrane; VM) ปรากฏอยู่ชั้นด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ติดกับชั้นวุ้น และสามารถสังเกตเห็นพันธะที่ยึดเยื่อหุ้มเซลล์และเยื่อวิทเทิลลินไว้ด้วยกันมีลักษณะเป็นซี่ๆ เซลล์ไข่ในระยะนี้มีขนาด 150-180 ไมครอน (รูปที่ 23 ง)



รูปที่ 23 การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (Oogenesis) ของหนอนถ้ำระยะต่างๆ โโอโอโกเนียม (Oogonia; Og), เยื่อหุ้มไข่ (jelly coat ;JC), เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane; CM), นิวเคลียส (Nucleus ;N), Vitelline membrane; VM

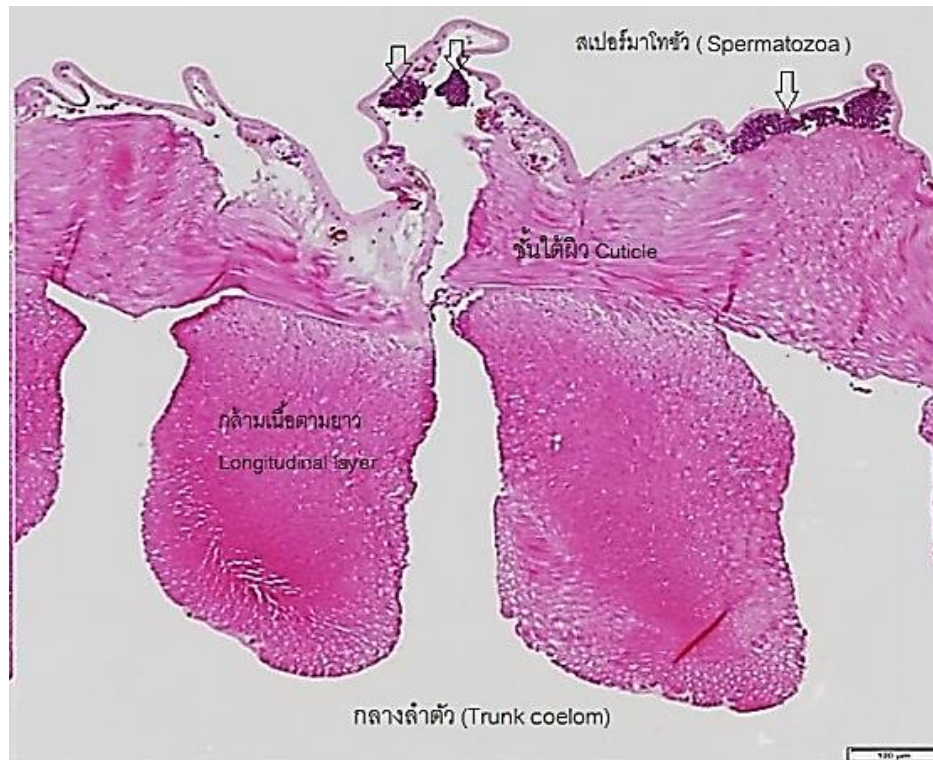
ไข่ (oocyte) ที่เต็มที (mature stage) จะมีขนาดประมาณ 180-200 ไมครอน สีของไข่จะมีลักษณะสีขาวขุ่น เมื่อชั้นหุ้มเซลล์ไข่ (jelly coat) สลาย ไข่จะถูกดูดเข้าไปพักที่ เนฟริเดีย (Nephridia) เซลล์ไข่ระยะนี้ยังมี เยื่อวิทเทลินติดอยู่กับเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นช่วงระยะเวลาหนึ่ง ก่อนที่จะปล่อยออกสู่น้ำทะเลภายนอก ดังรูปที่ 24 ก-ข



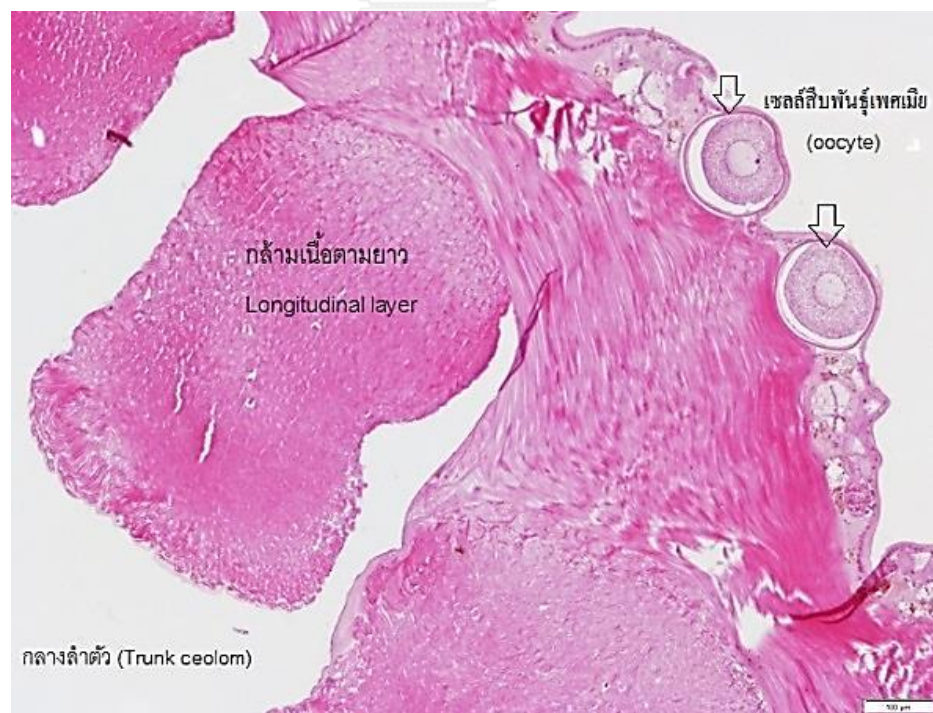
รูปที่ 24 ไช้ในเนฟริเดียม (Nephridia) ระยะที่พัฒนาเต็มที่ (mature stage) ขนาด 180-200 ไมครอน ก. ภาพจากกล้องสเตอริโอ ไมโครสโคป (stereoscopic microscope) ข. ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ อิเล็กตรอน กำลังขยาย 40 เท่า เยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane; CM), นิวเคลียส (Nucleus ;N), (Vitelline membrane; VM)

4.3.3.3 การตัดพาราฟิน (Paraffin section)

พบกลุ่มของสเปอริมาโทโกเนียมและ เซลล์โอโอโกเนียมของไช้ที่ชั้นใต้ผิวหนัง สันนิษฐานว่าเป็นกลุ่มเซลล์ระยะต้นของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เนื่องจากกลุ่มเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ แต่ละเซลล์มีขนาดเล็กมาก และกลุ่มเซลล์ไช้ยังสามารถสังเกตเห็นนิวคลีโอลัสในนิวเคลียสได้ และสัดส่วนระหว่างนิวเคลียสต่อไซโทพลาซึมมีค่าสูงกว่าเซลล์ไช้ที่พบในช่องลำตัว แสดงว่าเซลล์ไช้ในช่องลำตัวมีการสะสมสารในไซโทพลาซึมและมีการเติบโตมากกว่าเซลล์ไช้ที่พบใต้ชั้นผิวหนัง เซลล์ไช้ที่พบใต้ชั้นผิวหนังแต่ละเซลล์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 150 ไมครอน กลุ่มเซลล์ดังกล่าวอาจจะเคลื่อนย้ายจากบริเวณฐานของกล้ามเนื้อหรือแทรกเตอร์มาอยู่ที่ชั้นใต้ผิวหนังเพื่อรับสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเจริญระยะหนึ่ง แล้วจึงจะเคลื่อนที่ผ่านช่องระหว่างกล้ามเนื้อเข้าไปสู่ช่องลำตัว (Trunk coelom) เพื่อเจริญต่อไปในช่องลำตัว โดยในการสร้างสเปิร์มจะมีการรวมตัวของกลุ่มเซลล์สเปอริมาโทไซด์เป็น sperm plate และมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (cell differentiation) เป็นสเปิร์ม ส่วนในการสร้างไช้มีการเติบโตเพิ่มขนาดของไช้และการสะสมไข่แดง (yolk) (รูปที่ 25-รูปที่ 26)



รูปที่ 25 ภาพจาก paraffin section ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin แสดงกลุ่ม สเปอิร์มาโทซัวที่ชั้นได้ผิวหนัง ที่เซลล์แต่ละเซลล์มีขนาดเล็ก



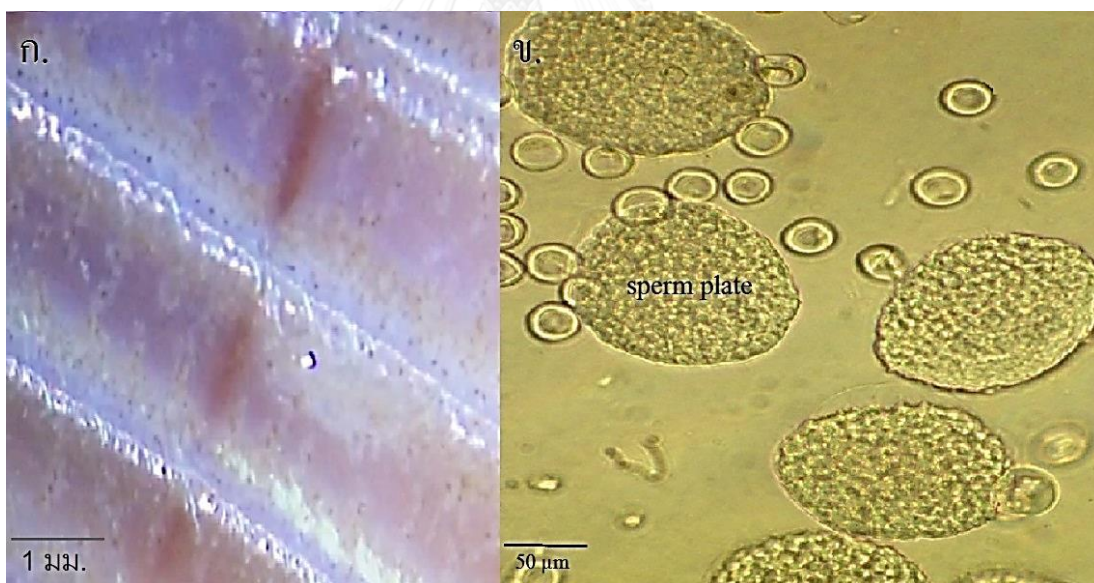
รูปที่ 26 ภาพจาก paraffin section ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin แสดงกลุ่มเซลล์ไข่ที่ชั้นได้ผิวหนัง

4.3.4 วัฏจักรการสืบพันธุ์ของหนอนถั่ว (*Sipunculus nudus*) ในรอบปี

4.3.4.1 การระบุเพศหนอนถั่ว

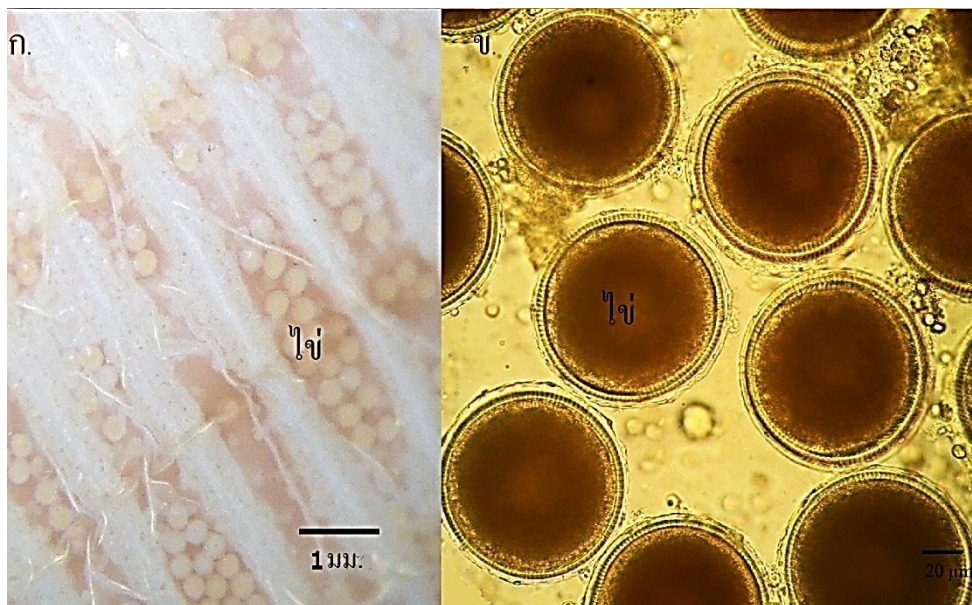
หนอนถั่วจำนวน 60 ตัวความยาวเฉลี่ย 16 เซนติเมตร จำแนกเพศผู้และเพศเมียจากการสังเกตภายนอก โดยการศึกษาคุณลักษณะของกลุ่มเซลล์สืบพันธุ์ที่อยู่ใต้ชั้นผิวหนังโดยใช้จุลทรรศน์สเตอริโอ (stereoscopic microscope) ประกอบกับการผ่าตัดเปิดลำตัวหนอนถั่วและนำของเหลวภายในลำตัวมาศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า เพื่อศึกษากลุ่มเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียในช่องลำตัว

สำหรับหนอนถั่วเพศผู้เมื่อศึกษาจากภายนอกโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอสามารถสังเกตเห็นของเหลวสีขาวเคลือบไปมาตลอดแนวของลำตัว (รูปที่ 27 ก) เมื่อผ่าตัดเปิดลำตัวหนอนถั่วตัวเดียวกันเพื่อยืนยันโดยการศึกษาของเหลวในช่องท้องโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า จะพบกลุ่มก้อนของสเปิร์ม (sperm plate) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 100 ไมครอนไปจนถึง 200 ไมครอน ล่องลอยอิสระอยู่ภายในลำตัวหนอนถั่ว (รูปที่ 27 ข)



รูปที่ 27 ลักษณะของหนอนถั่ว *S. nudus* เพศผู้ ก. ภาพจากกล้องสเตอริโอ ไมโครสโคปแสดงลักษณะภายนอกของหนอนถั่ว ข. ของเหลวภายในลำตัวหนอนถั่วจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40x

ส่วนหนอนถั่วเพศเมียสามารถสังเกตเห็นไข่จากภายนอกได้อย่างชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (รูปที่ 28ก) เมื่อนำของเหลวภายในลำตัวหนอนถั่วมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า พบไข่ระยะต่างๆ ล่องลอยอยู่ภายในลำตัว ดังรูปที่ 28 ข.



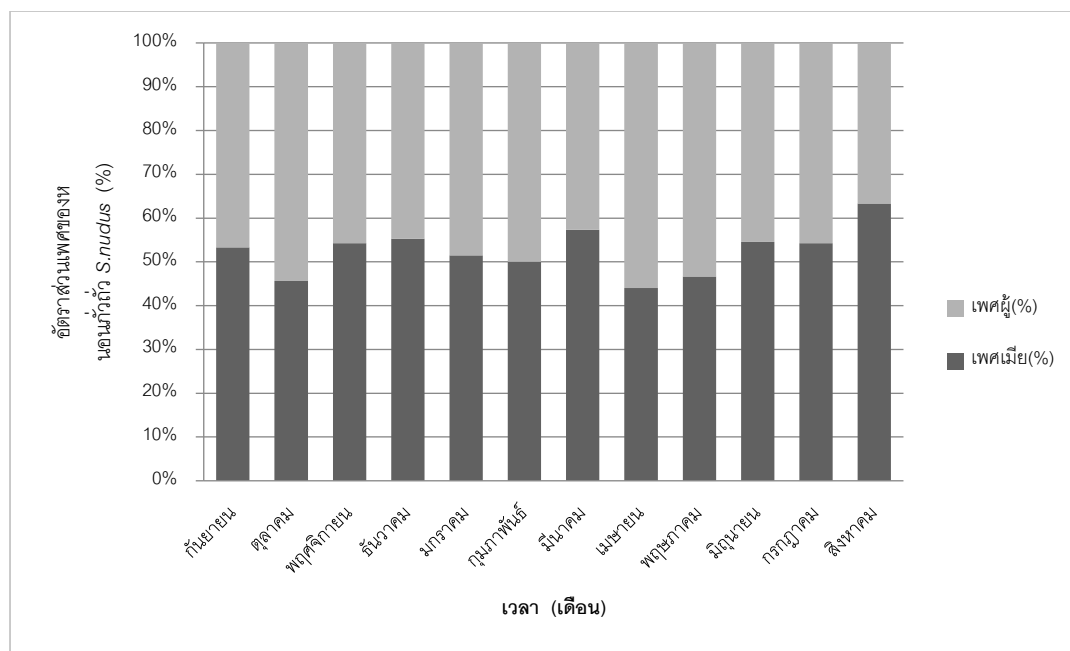
รูปที่ 28 ลักษณะของหนอนถั่ว *S. nudus* เพศเมีย (ก). ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอสามารถ
 ก้อนกลมสีขาวได้จากภายนอก (ข.) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 40 เท่า เมื่อนำของเหลว
 ในช่องลำตัวของหนอนถั่วเพศเมียมาทำการศึกษา

4.3.4.2 อัตราส่วนเพศ

ทำทำการติดตามการสืบพันธุ์ในรอบปีของหนอนถั่วที่พบบริเวณหาดมดตะนอย
 ตำบลเกาะลิบง อำเภอกันตัง จังหวัดตรังโดยเก็บตัวอย่างหนอนถั่วทั้งหมด 752 ตัวซึ่งมีขนาด
 น้ำหนักตัวเปียกอยู่ระหว่าง 8-18 กรัม และใช้วิธีส่องดูจากภายนอกภายใต้กล้องสเตอริโอ ไมโครส
 โคปเพื่อติดตามระยะการเจริญพันธุ์ พบว่าหนอนถั่วมีการเจริญพันธุ์ต่อเนื่องทุกเดือนตลอดทั้งปี มี
 อัตราส่วนระหว่างเพศผู้ต่อเพศเมียประมาณ 1 ต่อ 1 (รูปที่ 29)

4.3.4.3 การตรวจระยะการเจริญพันธุ์ของหนอนถั่ว *S. nudus*

ผลของการดูระยะการเจริญของไข่และสเปิร์มที่แสดงออกในแต่ละเดือนโดยการ
 ผ่าตัดเปิดลำตัวของหนอนถั่ว นำของเหลวภายในลำตัวไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย
 40 เท่า พบว่าในแต่ละเดือนตลอดระยะเวลา 12 เดือนที่ทำการศึกษา หนอนถั่วเพศผู้และเพศเมียมี
 ระยะการเจริญของสเปิร์มและไข่ทุกระยะ (ตารางที่ 9)



รูปที่ 29 กราฟแสดงอัตราส่วนเพศของหนอนตัว *S.nudus* แต่ละเดือนตลอดระยะเวลา 12 เดือน

ตารางที่ 9 แสดงระยะเวลาการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียของหนอนตัวตลอดระยะเวลา 12 เดือน เริ่มตั้งแต่ เดือนกันยายน 2555 ถึงเดือนสิงหาคม 2556

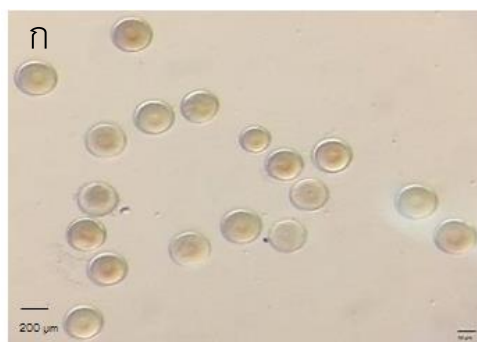
เดือน	ระยะเซลล์สืบพันธุ์	
	เพศผู้ (เสปิร์ม)	เพศเมีย (โอโอไซต์)
กันยายน 2555	1-3	1-4
ตุลาคม	1-3	1-4
พฤศจิกายน	1-3	1-4
ธันวาคม	1-3	1-4
มกราคม 2556	1-3	1-4
กุมภาพันธ์	1-3	1-4
มีนาคม	1-3	1-4
เมษายน	1-3	1-4
พฤษภาคม	1-3	1-4
มิถุนายน	1-3	1-4
กรกฎาคม	1-3	1-4
สิงหาคม	1-3	1-4

หมายเหตุ: 1-3 คือ ระยะการเจริญของสเปิร์ม, 1-4 คือ ระยะการเจริญของไข่

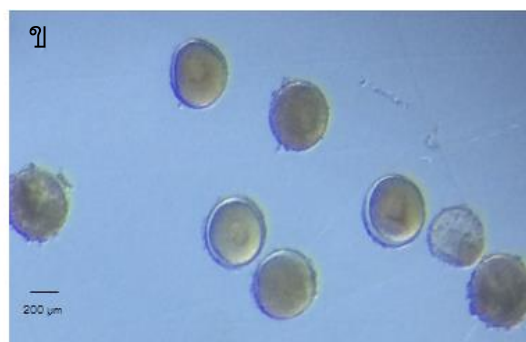
4.4 การการทดลองผสมพันธุ์หอนถั่ว *S. nudus* ในห้องทดลอง

4.4.1 การทดลองผสมพันธุ์หอนถั่วแบบกลุ่ม

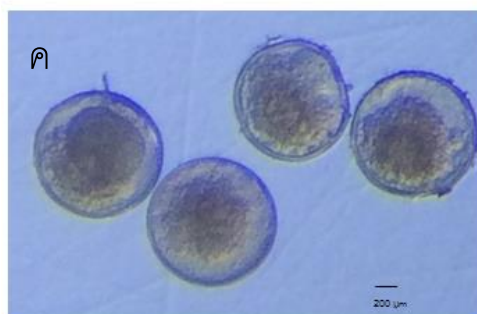
การทดลองการปฏิสนธิของหอนถั่วแบบกลุ่ม โดยการเลี้ยงหอนถั่วเพศผู้และเพศเมีย รวมกันในกระบะทราย แล้วสุ่มตัวอย่างน้ำทะเลในกระบะทรายทุก 3 ชั่วโมง ทำเพื่อติดตามการเจริญของไข่และเอ็มบริโอหอนถั่วทุกๆ 3 ชั่วโมง โดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริ พบว่าหลังจาก 3 ชั่วโมงพบเซลล์ไข่ที่ยังมีชีวิต (รูปที่ 30ก.) หลังจาก 6 ชั่วโมงเซลล์ไข่บางเซลล์เริ่มสลาย (รูปที่ 30ข) ในชั่วโมงที่ 9 พบว่ามีเซลล์บางส่วนมีการเจริญโดยมีการแบ่งเซลล์ได้เอ็มบริโอที่ประกอบด้วยกลุ่มเซลล์เมื่อเข้าสู่ 12 ชม. พบว่า เซลล์ไข่และเอ็มบริโอของหอนถั่วทั้งหมดสลายตัว ดังรูปที่ 30ค



3 ชม.



6 ชม.



9 ชม.

รูปที่ 30 แสดงการเจริญของไข่และเอ็มบริโอของหอนถั่ว *S. nudus* ในน้ำทะเลโดยวิธีผสมพันธุ์แบบกลุ่ม ที่ระยะเวลา 3, 6 และ 9 ชม.

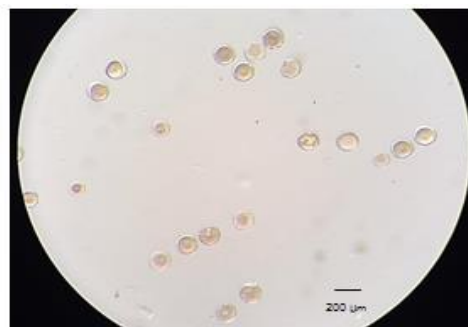
4.4.2 วิธีการผสมเทียม

พัฒนาวิธีการผสมเทียมที่ทำโดย นำเนฟริเดียมีไข่และสเปิร์มที่มาใส่ในภาชนะที่มีน้ำทะเลเพื่อให้ไข่และสเปิร์มเคลื่อนออกมาจากเนฟริเดีย และเกิดการปฏิสนธิขึ้น ติดตามผลการทดลองทุก 3 6 9 และ 12 ชั่วโมงซึ่งผลการทดลองดังกล่าวนี้ยังไม่ประสบผลสำเร็จ เช่นเดียวกับ

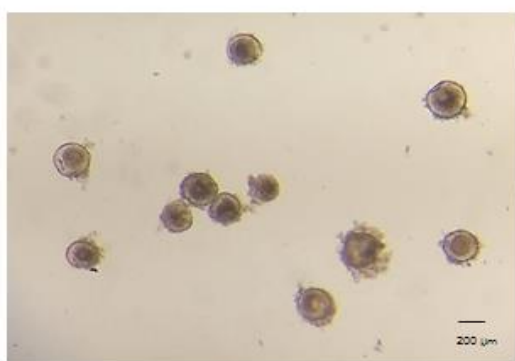
การผสมพันธุ์แบบกลุ่ม แม้จะพบเซลล์ไข่ที่ยังมีชีวิตที่ ระยะ 3 ชั่วโมง แต่หลังจากระยะ 6 ชั่วโมง และ 9 ชั่วโมงไปแล้ว เซลล์ไข่เริ่มสลายตัว (รูปที่ 31)



3 ชม.



6 ชม.



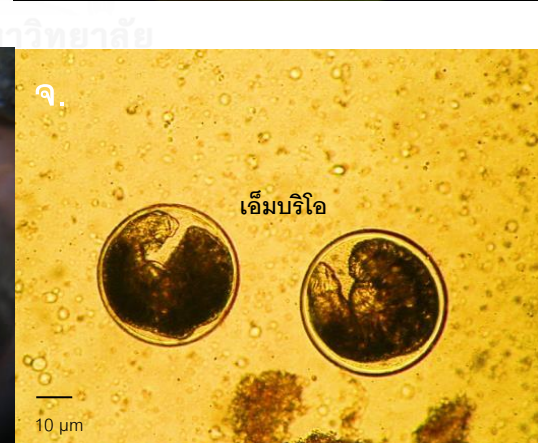
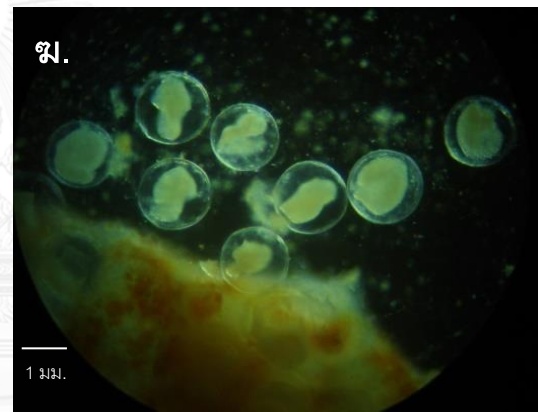
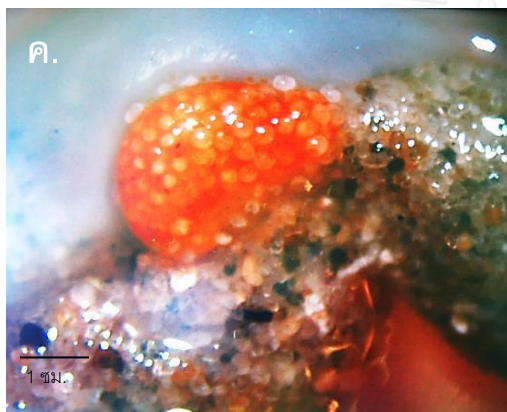
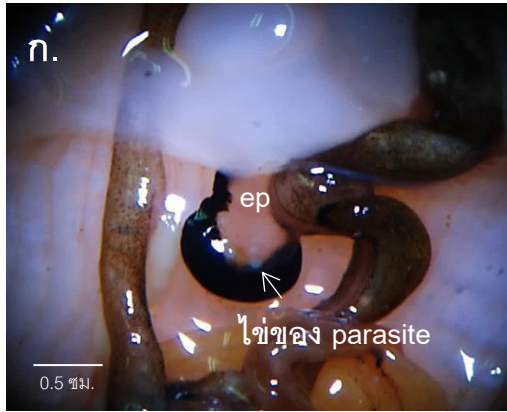
9 ชม.

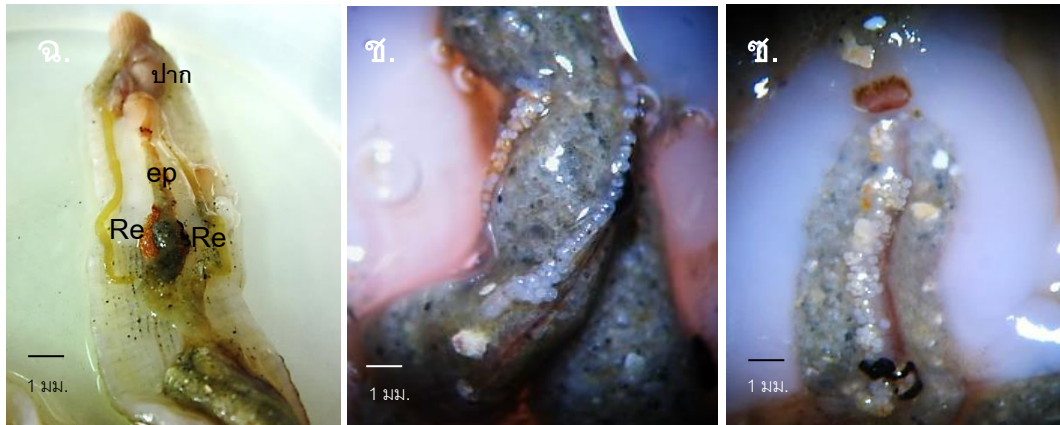
รูปที่ 31 แสดงไข่ของหนอนตัว *S. nudus* จากการทดลองผสมเทียม ที่ระยะเวลา 3, 6 และ 9 ชม.

4.5 ผลที่ได้รับเพิ่มเติมจากการศึกษาหนอนตัว *S. nudus*

จากการศึกษาลักษณะภายในของหนอนตัว *Sipunculus nudus* ที่จับจากหาดมดตะนอย อ.กันตัง จ.ตรัง พบว่า ภายในตัวของหนอนตัวทุกตัวที่บริเวณหลอดอาหาร (esophagus) ใกล้ฐานของกล้ามเนื้อรีแทรคเตอร์ (retractor muscle) จะพบถุงไข่ (brood chamber) ของหนอนตัวแบนสกุล (Genus) *Macrostomum* ที่เป็นปรสิตอยู่ภายใน (รูปที่ 32 ก) จำนวน 2 ข้างทั้งซ้ายและขวาของหลอดอาหาร (รูปที่ 32 ข) ไข่ที่มารวมตัวกันสังเกตเห็นมีสีแดงในระยะแรก (รูปที่ 32ค-ข) และถุงไข่เปลี่ยนเป็นสีขาวเมื่อไข่มีการเจริญมากขึ้นจนเป็นเอ็มบริโอ (รูปที่ 32 ง-จ) ซึ่งในการเจริญระยะเอ็มบริโอช่วงท้ายสามารถสังเกตเห็นการหดและยึดตัวของเอ็มบริโอเนื่องการที่กล้ามเนื้อเริ่มทำงานได้ชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 ต่อมาเมื่อเอ็มบริโอมีการเจริญมากขึ้นจะ

มาจัดเรียงตัวเป็นแถวและเคลื่อนที่ขึ้นไปตามท่อส่งที่เชื่อมระหว่างถุงไข่กับบริเวณปากซึ่งเป็นแหล่งพัก และเอ็มบริโอ มีการเจริญต่อเนืองที่บริเวณหนวด (tentacle) (รูปที่ 32 ฉ-ช)

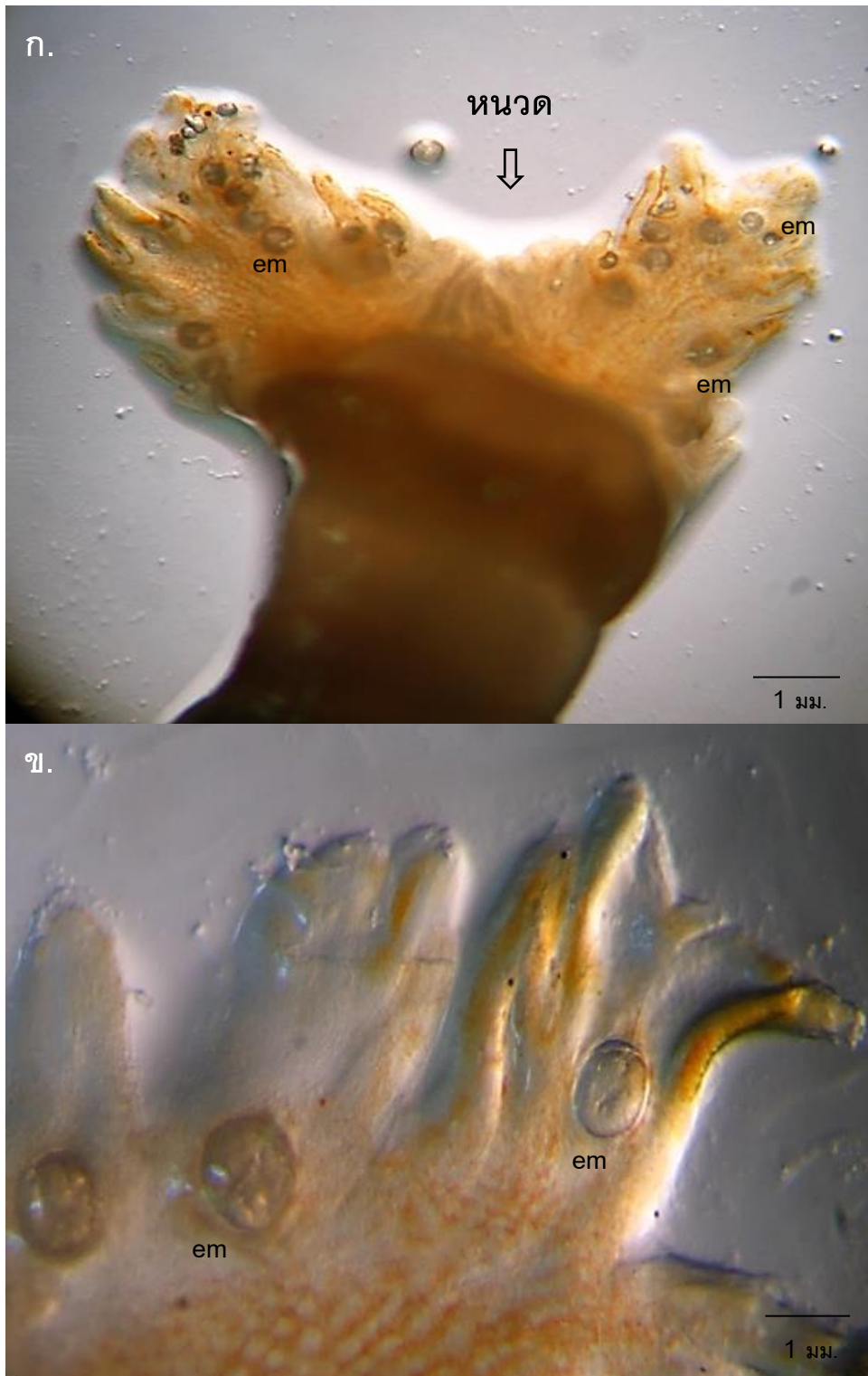




รูปที่ 32 ขั้นตอนการเจริญของไซ่หนอนตัวแบนที่เป็นปรสิตในหนอนถั่ว *S. nudus* (ก-ข) ไซ่ของปรสิต (หนอนตัวแบน) ที่อยู่ 2 ข้างของหลอดอาหาร (esophagus; ep). (ค) สีของถุงไซ่ในระยะแรกของการรวมตัว. (ง) ลักษณะของเอ็มบริโอ (embryo) ของในการเจริญระยะแรก. (จ) สีของถุงไซ่เมื่อเอ็มบริโอเมื่อมีการเจริญมากขึ้น. (ฉ) ลักษณะของเอ็มบริโอของปรสิตในระยะสุดท้ายก่อนจะเคลื่อนตัวไปที่ปลายหนวด (Tentacle) (ง-ข) ตำแหน่งของไซ่และการเรียงตัวเพื่อขึ้นไปสู่หนวด; กล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ (Retractor muscle; Re)

เมื่อเอ็มบริโอของปรสิตเคลื่อนมาอยู่ที่หนวด (tentacle) (รูปที่ 33 ก-ข) จนกระทั่งเอ็มบริโอมีขนาดประมาณ 200-200 μm . จนกระทั่งในระยะสุดท้ายเอ็มบริโอมีรูปร่างคล้ายหนอนตัวแบนขนาดเล็กมาก โดยมีขนาดประมาณ 400-500 μm . (รูปที่ 34ก-ค) หลังจากนั้นเอ็มบริโอ จะเรียงตัวเป็นแนวตั้งพร้อมที่จะฟักออกเป็นตัวสู่น้ำทะเลภายนอก

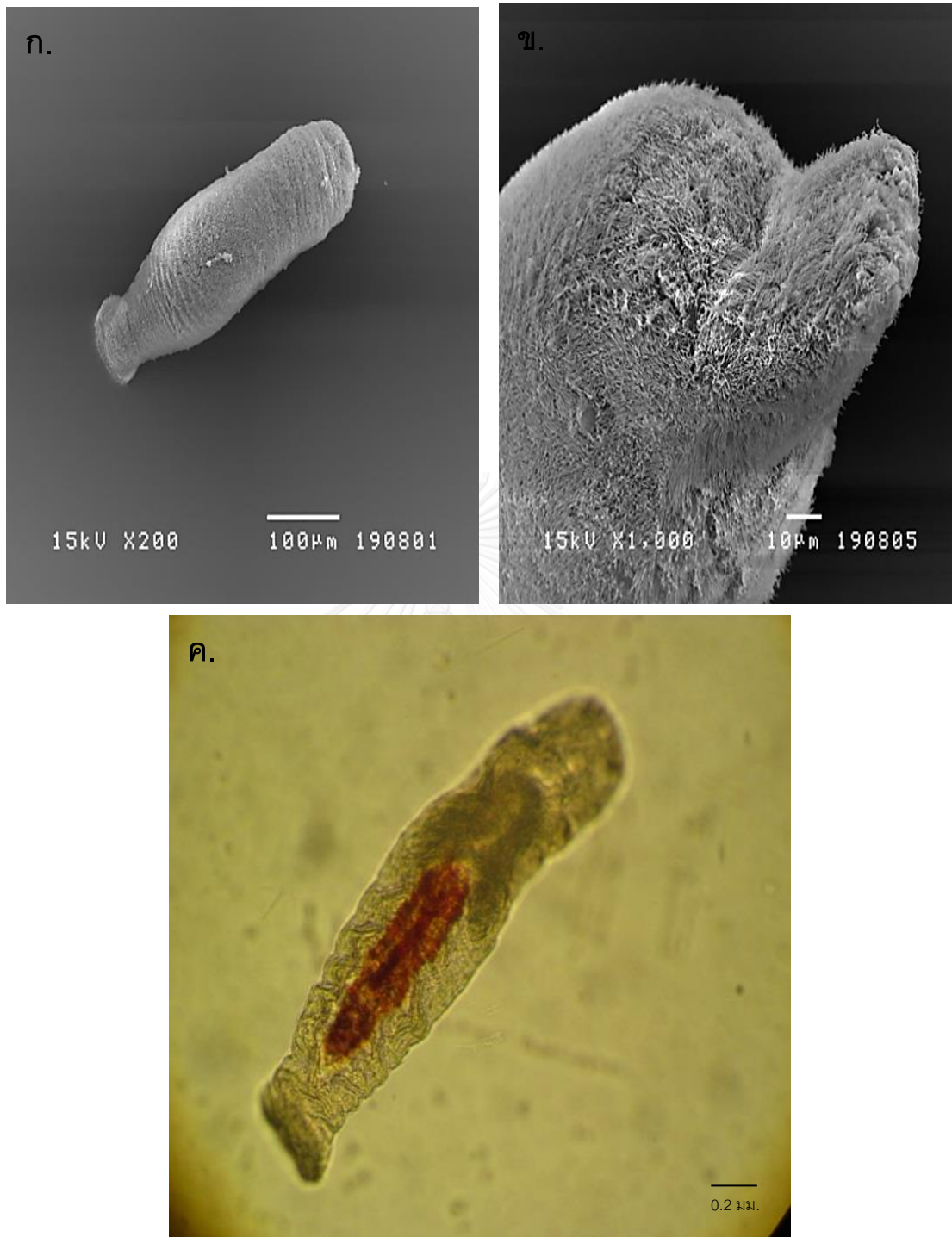
ตัวอ่อนของหนอนตัวแบนที่ฟักออกเป็นตัวสู่น้ำทะเลภายนอกมีขนาดเล็ก สามารถว่ายน้ำได้ด้วยการโบกของขนรอบๆตัว ใช้ชีวิตเป็นอิสระ ว่ายน้ำขึ้นลงและคลานไปตามผิวพื้น (รูปที่ 35 ก-ค)



รูปที่ 33 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอแสดงเอ็มบริโอของหนอนตัวแบน (embryo; em) บริเวณปลายหนวด (tentacle; T) รอบปาก



รูปที่ 34 รูปจากกล้องจุลทรรศน์ (ก) แสดงเอ็มบริโอของหนอนตัวแบน (*Macrostomum* sp.) ที่พบบริเวณปลายหมวดของหนอนถั่ว โดยที่ตัวเอ็มบริโอหนอนตัวแบนยังอยู่ในเปลือกไข่ (embryo; em) (ข-ค) เอ็มบริโอของหนอนตัวแบนที่ถูกเขี่ยแยกออกจากไข่โดยเข็มขนาดเล็ก กำลังขยาย 40x



รูปที่ 35 (ก) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (SEM) แสดงลักษณะทางสัณฐานหนอนตัวแบน (meiobenthic flat worm) (ข) บริเวณส่วนท้ายของลำตัวหนอนตัวแบนมีลักษณะแบนคล้ายใบพายและพมมีขน (ceria; ce) รอบลำตัวช่วยในการเคลื่อนที่ (ค) ภาพจากกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอแสดงหนอนตัวแบนระยะตัวเต็มวัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การจำแนกทางอนุกรมวิธาน (Taxonomy) เพื่อบ่งบอกชนิดของหนอนถั่ว

ผลจากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของหนอนถั่วที่จับจากหาดมด ตะนอย ต.เกาะลิบง อ.กันตัง จ.ตรัง ด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ พบว่า หนอนถั่ว (peanut worm) ที่ทำการศึกษานี้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาและกายวิภาคโดยส่วนใหญ่เป็นแบบเดียวกับ หนอนถั่วชนิด *Sipunculus nudus* (รูปที่ 36 รูปที่ 35) ผลการศึกษาหนอนถั่วโดยใช้จากเครื่อง Micro computed tomography scan (Micro CT Scan) ยืนยันลักษณะสัณฐานวิทยาและกายวิภาคของหนอนถั่วว่ามีระบบลำไส้แบบเกลียวคู่ (double helix) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของสัตว์ ไฟลัมนี้ และการใช้ไดโคโตมัสคีย์เปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาเพื่อบ่งบอกชนิดของ หนอนถั่วพบว่าหนอนถั่วจากหาดมดตะนอยมีรายละเอียดต่างๆ เช่น การจัดเรียงของหนวด ลักษณะของเนฟริเดีย จำนวนกล้ามเนื้อตามยาว และอื่นๆ ตรงกับหนอนถั่วชนิด *S. nudus* แทบทั้งสิ้นจึงสามารถสรุปได้ว่าหนอนถั่วจากหาดมดตะนอยที่นำมาศึกษาครั้งนี้คือหนอนถั่วสายพันธุ์ *S. nudus*



รูปที่ 36 เปรียบเทียบลักษณะของหนอนถั่ว ก. หนอนถั่วจากหาดมดตะนอย ข. หนอนถั่วสายพันธุ์ *sipunculus nudus* (ที่มา: <https://www.alibaba.com/showroom/sipunculus-nudus.html> #image: ออนไลน์)

5.2 การเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนถั่วจากหาดมดตะนอยกับ *Sipunculus* ชนิดอื่นในประเทศไทยและ 11 พื้นที่ทั่วโลก

จากการเปรียบเทียบหนอนถั่ว *S. nudus* ที่จับจากหาดมดตะนอยกับกับหนอนถั่วสกุล (Genus) *Sipunculus* ที่มีรายงานในประเทศไทย คือ *Sipunculus gulfus*, *Sipunculus robustus* และ *Sipunculus thailandicus* โดยใช้จำนวนมัดกล้ามเนื้อตามยาว กล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ด้านท้อง และกล้ามเนื้อรีแทรกเตอร์ด้านหลัง เป็นเกณฑ์ในการเปรียบเทียบ พบว่าหนอนถั่วชนิด *S. nudus* ยังไม่มีรายงานการค้นพบในประเทศไทยมาก่อนและหนอนถั่วที่ศึกษาในครั้งนี้มีลักษณะใกล้เคียงกับหนอนถั่วชนิด *S. robustus* มากที่สุด ซึ่งผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ตรงกับรายงานของ (Edward และ Cutler, 1985) ที่กล่าวว่า *S. nudus* มีลักษณะคล้ายกับ *S. robustus* ลักษณะที่แตกต่างกันอย่างเด่นชัดของหนอนถั่ว 2 ชนิดนี้ คือ *S. robustus* มีระบบประสาทของสมองที่มีลักษณะเป็นเส้น ในขณะที่ *S. nudus* มีระบบประสาทลักษณะคล้ายฟองน้ำ (sponge-like)

เมื่อเปรียบเทียบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของหนอนถั่ว *S. nudus* จากหาดมดตะนอยกับหนอนถั่วชนิดเดียวกันจาก 11 แหล่งทั่วโลก (ตารางที่ 7) พบว่าหนอนถั่วจากหาดมดตะนอยมีจำนวนมัดกล้ามเนื้อตามยาว (Longitudinal muscle) เฉลี่ยเท่ากับ 26 แถบ ซึ่งต่างจากประเทศอื่นๆ อย่างชัดเจน แต่ลักษณะนี้ใกล้เคียงกับ *S. nudus* หมู่เกาะโซโลมอน (Solomon Islands) และเมื่อพิจารณาเกณฑ์ต่างๆ ที่ใช้ในการจัดจำแนก พบว่าของระบบประสาทหนอนถั่วจากหาดมดตะนอยจะมีลักษณะเป็นกระจุก (Solid tuft) แต่หนอนถั่วจากหมู่เกาะโซโลมอนจะไม่พบระบบประสาท (absent) ซึ่งตารางเปรียบเทียบลักษณะดังกล่าวตรงกับรายงานของ (Kawauchi และ Giribet, 2014) ที่กล่าวว่าหนอนถั่ว *S. nudus* เป็นสปีชีส์ที่พบได้ทั่วโลก (cosmopolitan species) และมีความลักษณะในรายละเอียดที่แตกต่างกันในแต่ละแหล่งที่พบ (geographical variations) เนื่องจากพบหนอนถั่วได้ทั้งในเขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาว สำหรับในทวีปเอเชียมีรายงานพบหนอนถั่ว *S. nudus* ในประเทศ สิงคโปร์ อินโดนีเซีย เวียดนาม จีน ไต้หวัน อินเดีย และญี่ปุ่น

5.3 การวิเคราะห์เนื้อเยื่อเชิงโมเลกุลเพื่อบ่งบอกชนิด (Species) หนอนถั่ว

การเปรียบเทียบความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน Cytochrome C oxidase I (COI) และ ยีน 16s ribosomal RNA (16s rRNA) ของหนอนถั่ว *S. nudus* จากหาดมดตะนอยกับสิ่งมีชีวิตต่างๆ ในฐานข้อมูล Gen Bank โดยพิจารณาจากค่า % similarity พบว่า ในฐานข้อมูล

ยังไม่มีรายงานลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และ ยีน 16s rRNA ของหนอนถั่วที่ศึกษาในครั้งนี้ แสดงว่าในปัจจุบันนี้ยังไม่มีการศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนทั้ง 2 ยีนนี้ในหนอนถั่ว *S. nudus* จากหาดมดตะนอย ทำให้สามารถเพิ่มข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16s rRNA ในฐานข้อมูล Gen Bank ได้

นอกจากนี้ผลจากการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI และยีน 16s rRNA ในฐานข้อมูล Gen Bank พบว่าหนอนถั่วที่ศึกษาในครั้งนี้มีความคล้ายคลึงกับหนอนถั่วชนิด *S. nudus* ที่มีผู้ศึกษามาก่อนแล้วมากที่สุด โดยมีค่าความคล้ายคลึงเฉลี่ยเท่ากับ 89 เปอร์เซ็นต์ เท่ากันทั้ง 2 ยีนที่ได้ศึกษา ผลจากการศึกษานี้ เป็นการยืนยันว่าหนอนถั่วจากหาดมดตะนอยเป็นหนอนถั่วชนิด *S. nudus* ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) และกายวิภาค (anatomy) ของหนอนถั่วที่มีลักษณะเหมือนกับหนอนถั่วสายพันธุ์ *S. nudus*

จากการศึกษาความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการโดยการสร้างแผนภูมิต้นไม้ไม่สามารถจำแนก *S. nudus* จากหาดมดตะนอยได้เป็น 3 ฮาโปไทป์จากยีน 16s rRNA จากหนอนถั่ว 11 ตัว และ 2 ฮาโปไทป์จากยีน COI จากหนอนถั่วจำนวน 12 ตัวซึ่งมีค่า Haplotype diversity เท่ากับ 0.345 และ 0.167 ตามลำดับแสดงว่าหนอนถั่วจากหาดมดตะนอยมีความหลากหลายทางพันธุกรรมต่ำ และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน COI ร่วมกับ ยีน 16s rRNA ของหนอนถั่ว *S. nudus* จำนวน 12 ตัวอย่างจากหาดมดตะนอยนำมาสร้าง Phylogenic tree และใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของหนอนถั่วในสกุล Themistidae , Golfingiidae และ Phascolosomatidae เป็นสิ่งมีชีวิตภายนอกกลุ่ม พบว่าหนอนถั่วจากหาดมดตะนอยแยกออกมาจากหนอนถั่วกลุ่มอื่นๆอย่างชัดเจนซึ่งถ้าพิจารณาความสัมพันธ์กันของหนอนถั่วแต่ละกลุ่มพบว่าหนอนถั่ว *S. nudus* จากหาดมดตะนอยมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับกลุ่มหนอนถั่วจากประเทศจีนและเวียดนามมากที่สุดแต่ก็ไม่ได้จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับประเทศจีนและเวียดนาม การสร้างแผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) จึงยืนยันว่าหนอนถั่วจากหาดมดตะนอยมีความแตกต่างกันกับกลุ่มอื่นๆในด้านลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้งสองยีนที่ได้ทำการศึกษา

5.4 ศึกษาการสืบพันธุ์ของหนอนถั่ว (*S. nudus*)

5.4.1 แหล่งที่อยู่อาศัย

หาดมดตะนอยเป็นที่อยู่อาศัยที่เหมาะสมสำหรับหนอนถั่ว *S. nudus* เนื่องจากสภาพแวดล้อมโดยรอบ ด้านบนของหาดมีป่าโกงกาง ทรายเป็นทรายละเอียด ด้านล่างของหาดเป็นแนวหญ้าทะเล ป่าโกงกางจัดได้ว่าเป็นแหล่งอาหารของสัตว์น้ำขนาดเล็ก (Tantanasiriwong

และ Bhatia, 1976) และ (Erftemeijer และคณะ, 1994) รายงานว่า ภูเขาทะเลเป็นแหล่งที่เหมาะสมสำหรับอยู่อาศัยของหนอนถั่ววัยอ่อน ดังนั้นจากการเก็บตัวอย่าง จึงพบหนอนถั่วขนาดใหญ่อยู่บริเวณด้านบนของพื้นที่หาดที่น้ำท่วมถึงและจะพบหนอนถั่วขนาดเล็กอยู่ถัดลงมาทางด้านล่างของหาดลงจนถึงแนวภูเขาทะเลที่ระยะ 70 เมตรจากจุดน้ำขึ้นสูงสุด

5.4.2 การสืบพันธุ์ในรอบปีของหนอนถั่ว *Sipunculus nudus*

S. nudus เป็นสายพันธุ์หนอนถั่วที่มีความหลากหลาย (Kawauchi และ Giribet, 2014) และเป็นชนิดที่สามารถพบได้ทั่วโลก อย่างไรก็ตามการศึกษาการสืบพันธุ์ในรอบปีครั้งนี้เป็นการศึกษาคั้งแรกใน *S. nudus* ซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษาด้านนี้มาก่อน ขนาดและความยาวของหนอนถั่วแต่ละชนิดพบที่มีความแตกต่างกันในขณะทีลักษณะรูปร่างและขนาดไข่ของหนอนถั่วแต่ละสปีชีส์ไม่แตกต่างกันมาก สำหรับสีของไข่หนอนถั่วที่ศึกษาในครั้งนี้พบว่า ไข่ที่เจริญเต็มที่มีสีขาวขุ่นสามารถสังเกตเห็นได้เมื่อศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ ซึ่งลักษณะดังกล่าวแตกต่างกับสีของไข่หนอนถั่วทั้งที่เป็นชนิดเดียวกันและต่างชนิดกันที่มาจากแหล่งที่พบที่แตกต่างกัน สันนิษฐานว่าสภาพแวดล้อมของแหล่งที่อยู่อาศัยที่แตกต่างกัน รวมถึงปัจจัยในด้านอาหารที่แตกต่างกัน มีผลต่อสีของไข่ของหนอนถั่วได้ ดังแสดงใน Error! Reference source not found.

ตารางที่ 10 สรุปลักษณะของไข่หนอนถั่วแต่ละชนิด ที่มา: (M. E. Rice, 1989)

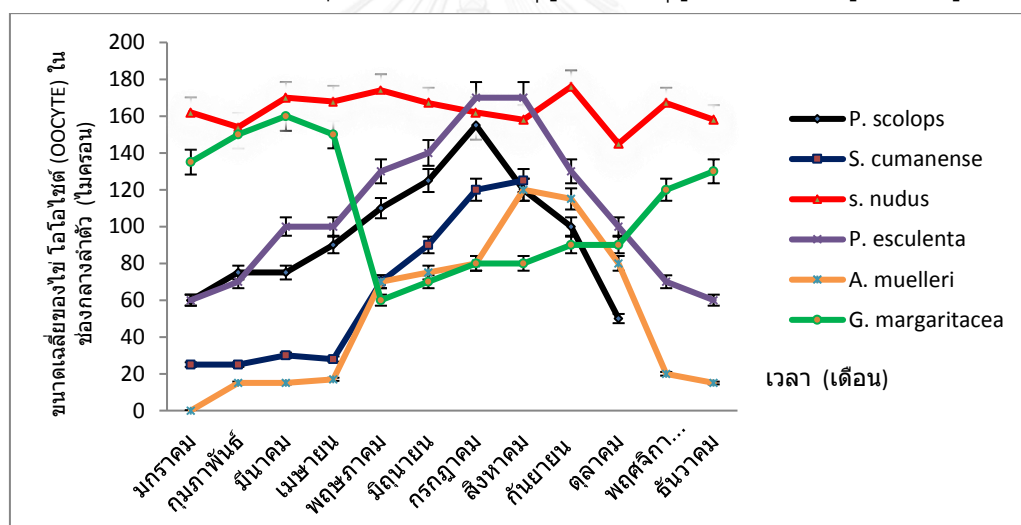
Family	Species	Size of adult ,length mm	Size of egg µm	Type of deve- lop- ment	Shape	Color	locality
Sipunculidae	<i>Phascolopsis gouldi</i>	165	150- 180	L	Spherical	Reddish- brown	Newport, Rhode Island
	<i>Siphonoma cumanense</i>	200	122	P	Spherical	clear	Puerto Rico
	<i>Sipunculus nudus</i>	200	178	P	Spherical	clear	Puerto Rico, Florida (west coast)
	<i>Sipunculus nudus</i> (This study)	200	180	P	Spherical	White,opaque	Trang, Thailand
Themistidae	<i>Themiste pyroides</i>	180	190	D	Spherical	White,opaque	Vancouver island. British Columbia
Golfingiidae	<i>Golfingia vulgamis</i>	155	177	L	Spherical	Pale brown	Roscoff,France

หมายเหตุ: P ; planktotrophic คือ พัฒนาโดยการกินอาหารจากภายนอก; I ; lecithotrophic คือการพัฒนาโดยมีอาหารจากไข่; D ; direct คือพัฒนาโดยไม่มีระยะ larval

หนอนถั่ว *S. nudus* จากหาดมดตะนอยมีสัดส่วนเพศ 1:1 ซึ่งตรงกับรายงานของ (Rice, 1989) ที่กล่าวว่าหนอนถั่วโดยทั่วไปแล้วจะมีสัดส่วนเพศประมาณ 1:1 อย่างไรก็ตามมีรายงานว่า

หนอนถั่วชนิด *Phascolosoma turnerae* พบว่าประชากรมีเพศเมียถึง 74% (Rice และคณะ 2012) นอกจากนี้ (Pilger, 1987) ยังพบว่า หนอนถั่วชนิด *T. lageniformis* พบเพศเมีย 96% และเพศผู้ 4%

เปรียบเทียบการสืบพันธุ์ของหนอนถั่ว 6 ชนิด โดยพิจารณาจากขนาดเฉลี่ยของไข่ในช่องลำตัว ดังรูปที่ 37 พบว่า หนอนถั่วชนิด *Golfingia margaritacea* มีไข่ขนาดเล็กลอยในช่องลำตัวตลอดทั้งปีและไข่เริ่มมีขนาดใหญ่ขึ้นจากขนาดเล็กไปจนถึงขนาดกลางและขนาดใหญ่ในช่วงฤดูร้อนและจะวางไข่ปลายเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน ขณะที่ปีสี่อื่นอีก 4 ชนิด ได้แก่ *Phascolosoma scolops*, *Siphonosoma cumanense*, *Phascolosoma esculenta* และ *Aspidosiphon muelleri* จะวางไข่ในฤดูร้อน ประมาณเดือน กรกฎาคม-สิงหาคม ซึ่งจากข้อมูลดังที่กล่าวมาแสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของการวางไข่กับช่วงเวลาของอุณหภูมิน้ำทะเลที่สูงที่สุดในฤดูกลาง (Cutler, 1994) ซึ่งตรงกับที่-Ying และคณะ, 2009 รายงานว่า สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะมีระยะเวลาของการผสมพันธุ์ 2-3 เดือนในช่วงฤดูร้อนและฤดูใบไม้ร่วงขึ้นอยู่กับละติจูดที่อยู่



รูปที่ 37 วัฏจักรการสืบพันธุ์ในรอบปีของหนอนถั่ว 6 ชนิด ได้แก่

Sipunculus nudus จากหาดมดตะนอย

Phascolosoma Esculenta จาก มณฑลเจ้อเจียง (Zhejiang) ประเทศจีน

Phascolosoma scolops จากเกาะคุโรชิม่า (Kuroshima) ประเทศญี่ปุ่น

Siphonosoma cumanense จากหาดนชิวากิ (Nishiwaki) ประเทศญี่ปุ่น

Aspidosiphon muelleri จากทะเลทางตะวันออกเฉียงใต้ของสเปน

Golfingia Margaritacea จากอ่าว Golondrina ประเทศอาเจนตินา

5.5 การทดลองผสมพันธุ์หนอนถั่ว *S. nudus* จากหอดมดตะนอยในห้องทดลอง

จากการทดลองผสมพันธุ์หนอนถั่วแบบกลุ่มจำนวน 30 ตัว จำนวน 2 ซ้ำพบว่า ไข่ของหนอนถั่วไม่สามารถเจริญจนเป็นตัวอ่อน (Larva) ได้ ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากปัจจัยต่างๆเช่น

1. ไข่ของหนอนถั่วไม่ได้รับการผสมจากสเปิร์ม เนื่องจากระยะของไข่และสเปิร์มอาจจะยังไม่พร้อมหรือยังไม่เจริญเต็มที่ เพราะจากการทดลองผู้ทดลองได้สุ่มตัวอย่างในน้ำพบแต่ไข่ของเพศเมียเท่านั้น ไม่พบสเปิร์มในน้ำทะเล ดังนั้นหากทำการศึกษาคัดกรองจะศึกษาช่วงระยะเวลาของการสร้างและมีการเจริญเต็มที่ของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียเพื่อที่จะสามารถกำหนดระยะเวลาของการผสมพันธุ์ได้

2. สภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด เบส ของน้ำทะเลอาจจะไม่เหมาะสมสำหรับการปฏิสนธิ ดังนั้นอาจใช้น้ำทะเลเทียมที่ปรับสภาพให้เหมาะสมกับการ-ปฏิสนธิควรมีการทดลองเทคนิคอื่นๆ เช่น การชักนำให้เกิดการปฏิสนธิโดยอาศัยรอบของพระจันทร์ (lunar cycle) เพื่อเลียนแบบสภาพการดำรงชีวิตในธรรมชาติของหนอนถั่ว เพื่อกระตุ้นให้หนอนถั่วมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาภายนอกและการปฏิสนธิได้

3. สภาพของที่อยู่อาศัยไม่เหมาะสม ทำให้หนอนถั่วมีความเครียดเมื่อถูกจับมาอยู่ในกระเพาะทดลอง ดังนั้นควรออกแบบระบบการเลี้ยงที่ทำให้หนอนถั่วอยู่ในสภาพใกล้เคียงกับสภาพในธรรมชาติมากที่สุดเพื่อลดความเครียด เพื่อชักนำให้หนอนถั่วมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาในน้ำทะเลเพื่อเกิดการปฏิสนธิภายนอกตามปกติ

4. อาหารที่ไม่เหมาะสม เมื่อนำหนอนถั่วมาเลี้ยงในระบบทดลองพบว่าหนอนถั่วมีการกินอาหารลดลง ดังนั้นพลังงานที่ใช้ในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์อาจจะลดน้อยลงไปด้วย ทำให้ความสามารถในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ลดลง หรือ เซลล์สืบพันธุ์ที่สร้างไม่แข็งแรงเนื่องจากอาหารไม่เหมาะสม ดังนั้นควรศึกษาโภชนาการการกินอาหารของหนอนถั่วเพื่อหาสูตรอาหารสำหรับเลี้ยงหนอนถั่วในห้องปฏิบัติการ

จากข้อมูลดังกล่าวอาจจะออกแบบการทดลองเพื่อนำไปสู่การผสมพันธุ์ของหนอนถั่ว คือ การเลียนแบบธรรมชาติน้ำขึ้นและน้ำลงโดยนำหนอนถั่วเพศผู้ 5 ตัว เพศเมีย 5 ตัวที่มีไข่และสเปิร์มเห็นได้ชัดเจนจากภายนอก นำมาเลี้ยงรวมกันในถังพลาสติกขนาด 30x60x50 เซนติเมตร ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ใส่ทรายสูงประมาณ 30 เซนติเมตร จากนั้นเริ่มทดลองตั้งแต่ แรม 1 ค่ำไปถึงแรม 15 ค่ำ และขึ้น 1 ค่ำ ถึงขึ้น 15 ค่ำ โดยมีการเพิ่มระดับน้ำให้สูงขึ้น 10 เซนติเมตร ทุกๆ 7 วัน เริ่มตั้งแต่ แรม 1 ค่ำและขึ้น 1 ค่ำ ระบบ เปลี่ยนน้ำทุกวันตอนเช้า ดังนั้นวันที่ตรงกับแรม 15 ค่ำ และขึ้น 15 ค่ำ ในกระเพาะทดลองจะมีระดับน้ำสูงที่สุด แต่จะวันจะการสุ่มตัวอย่าง โดยการดูดตัวอย่างน้ำในถัง

พลาสติก ถึงละ 5 ซ้ำ เพื่อดูการผสมพันธุ์ของหนอนถั่วที่เกิดขึ้น โดยที่ผู้ทำการทดลองคาดว่า วันที่ตรงกับขึ้น 15 ค่ำและแรม 15 ค่ำจะมีการผสมพันธุ์กันของหนอนถั่วเกิดขึ้นเนื่องจากถังพลาสติกมีระดับน้ำสูงสุด

การทดลองการผสมเทียมโดยการแยกไข่และสเปิร์มจากเนฟริเดียออกมาผสมกันภายนอกซึ่งการทดลองดังกล่าวนี้ยังไม่ประสบผลสำเร็จ เช่นเดียวกับการผสมพันธุ์แบบกลุ่ม อาจเป็นเพราะไข่และสเปิร์มที่ถูกแยกออกมานั้นยังไม่พร้อมสำหรับการปฏิสนธิเนื่องจากจากรายงานของ (Green, 1975) กล่าวว่าหนอนถั่วแต่ละสปีชีส์ (species) มีระยะเวลาของการวางไข่และปฏิสนธิแตกต่างกัน เช่น *Phascolosoma arcuatum* มีการเจริญของไข่ในช่องลำตัว 2 ปี และเซลล์สืบพันธุ์จะพักอยู่ในเนฟริเดียอีกระยะเวลาหนึ่งก่อนที่จะปล่อยสู่ภายนอก ดังนั้นควรทำการศึกษาระยะเวลาของแต่ละขั้นของการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผสมเทียมต่อไป หรืออาจจะทดลองการปฏิสนธิในภาชนะขนาดเล็กให้ประสบความสำเร็จก่อนจะขยายไปสู่การปฏิสนธิในภาชนะขนาดใหญ่ต่อไป

5.6 ประวัติในตัวหนอนถั่ว *S. nudus*

การพบประวัติที่เป็นหนอนตัวแบนในการศึกษาระยะแรกทำให้เกิดความเข้าใจผิด เกี่ยวกับการสืบพันธุ์และการเจริญของหนอนถั่ว จนกระทั่งได้นำข้อมูลไปปรึกษาผู้เชี่ยวชาญด้านหนอนถั่วจากต่างประเทศ ทำให้ทราบว่าเป็นการเจริญของหนอนตัวแบนที่เป็นประวัติในหนอนถั่วทุกตัวที่จับจากหอดมดตะนอยที่ได้ทำการศึกษา ซึ่งเรื่องดังกล่าวเป็นที่น่าสนใจที่จะทำการศึกษาต่อไป ในด้านความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งสองชนิด

รายการอ้างอิง

- Akesson, B. (1958). A study of the nervous system of the Sipunculoidea.
Undersokningar over Oresund, Lund, 38.
- Åkesson, B. (1961). The development of *Golfingia elongata* Keferstein (Sipunculidea) with some remarks on the development of neurosecretory cells in sipunculids.
Ark. Zool, 13, 511-531.
- Baird, W. (1868). *Monograph of the species of worms belonging to the subclass Gephyrea; with a notice of such species as are contained in the collection of the British Museum.* Paper presented at the Proc Zool Soc Lond.
- Barnes, R. D. (1982). *Invertebrate Zoology. Philadelphia, PA: Holt-Saunders International.* Retrieved from
- Boyleand, M. J., & Rice, M. E. (2015). Sipuncula: an emerging model of spiralian development and evolution. *International Journal of Developmental Biology, 58(6-7-8), 485-499.*
- Catalan, M. A. B., & Yamamoto, M. (1994). Annual Reproductive Cycle of Two Japanese Species of Sipunculans: *Siphonosoma cumanense* (Sipunculidae) and *Phascolosoma scolops* (Phascolosomatidae).
- Cutler, E. B. (1994). *The Sipuncula: their systematics, biology, and evolution:* Cornell University Press.
- Cutler, E. B., & Cutler, N. J. (1985). A revision of the genera *Sipunculus* and *Xenosiphon* (Sipuncula). *Zoological journal of the Linnean Society, 85(3), 219-246.*
- Frith, D. W., Tantanasiriwong, R., & Bhatia, O. (1976). *Zonation of macrofauna on a mangrove shore, Phuket Island:* Phuket Marine Biological Center.
- Gerould, J. H. (1903). *Studies on the embryology of the Sipunculidae. I. The embryonal envelope and its homologue* (Vol. 1): H. Holt.
- Gibbs, P. E., & Cutler, E. B. (1987). *A classification of the phylum Sipuncula:* British Museum (Natural History).

- Gray, J. E. (1828). *Spicilegia zoologica: original figures and short systematic descriptions of new and unfigured animals* (Vol. 1): Treüttel, Würtz.
- Green, W. (1975). *The annual reproductive cycle of Phascolosoma lurco (Sipuncula)*. Paper presented at the Rice ME, Todorovic M. Proc Intern Symp Biol Sipuncula and Echiura.
- Hylleberg, J. (2013). Classification and identification of sipunculans from Thailand, with description of new species and a new subgenus. *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, 32, 53-82.
- Hyman, L. H. (1959). The invertebrates: smaller coelomate groups, Chaetognatha, Hemi-chordata, Pogonophora, Phoronida, Ectoprocta, Brachipoda, Sipunculida, the coelomate Bilateria. Volume V. *The invertebrates: smaller coelomate groups, Chaetognatha, Hemi-chordata, Pogonophora, Phoronida, Ectoprocta, Brachipoda, Sipunculida, the coelomate Bilateria. Volume V*.
- Kawauchi, G. Y., & Giribet, G. (2014). *Sipunculus nudus* Linnaeus, 1766 (Sipuncula): cosmopolitan or a group of pseudo-cryptic species? An integrated molecular and morphological approach. *Marine Ecology*, 35(4), 478-491.
- Kawauchi, G. Y., Sharma, P. P., & Giribet, G. (2012). Sipunculan phylogeny based on six genes, with a new classification and the descriptions of two new families. *Zoologica Scripta*, 41(2), 186-210.
- Kumblad, L., & Bradshaw, C. (2008). *Element composition of biota, water and sediment in the Forsmark area, Baltic Sea. Concentrations, bioconcentration factors and partitioning coefficients (K_d) of 48 elements*. Retrieved from
- Lan, G., & Yan, B. (2001). The reproductive biology of peanut worm, *Sipunculus nudus*. *Shuichan xuebao*, 26(6), 503-509.
- Long, L., Sheng, Z., Xu, S., Wang, W., & Zhu, J. (2015). The cytological changes of sperm and oocyte nuclei during fertilization in *Phascolosoma esculenta* (Sipuncula: Phascolosomatidea). *Italian Journal of Zoology*, 82(3), 327-337.

- Mamiatis, T., Fritsch, E., Sambrook, J., & Engel, J. (1985). *Molecular cloning—A laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 1982, 545 S., 42\$: Wiley Online Library.
- Nfon, E., Cousins, I. T., & Broman, D. (2008). Biomagnification of organic pollutants in benthic and pelagic marine food chains from the Baltic Sea. *Science of the total environment*, 397(1), 190-204.
- Nguyen, T. T. H., Nguyen, T. N., Mai, T. N., & Huynh, T. D. (2007). The distribution of peanut-worm (*Sipunculus nudus*) in relation with geo-environmental characteristics.
- Nicosia, S. V., & Sowinski, J. M. (1995). Cytological analysis of the urn cell complex of *Sipunculus nudus* before and after serum-induced secretion. *The Biological Bulletin*, 188(3), 267-280.
- Pilger, J. F. (1987). Reproductive biology and development of *Themiste lageniformis*, a parthenogenic sipunculan. *Bulletin of marine science*, 41(1), 59-67.
- Quatrefages, A., & de Bréau, A. d. Q. (1865). *Histoire naturelle des annélés marins et d'eau douce...: pts 1-2. Annélides et géphyriens* (Vol. 1): Librairie encyclopédique de Roret.
- Rajulu, G. (1975). Asexual reproduction by budding in the Sipuncula. *Biology of the Sipuncula*, 1, 177-182.
- Rice, M. (1974). Gametogenesis in three species of Sipuncula: *Phascolosoma agassizii*, *Golfingia pugettensis*, and *Themiste pyroides*. *Cellule*, 70(2), 295-313.
- Rice, M. (1975). *Observations on the development of six species of Caribbean Sipuncula with a review of development in the phylum*. Paper presented at the Proceedings of the international symposium on the biology of the Sipuncula and Echiura.
- Rice, M. E. (1981). Larvae adrift: patterns and problems in life histories of sipunculans. *American Zoologist*, 21(3), 605-619.
- Selenka, E., de Man, G., & Bulow, C. (1883). Die Sipunculiden. Reisen im Archipel Philippinen von Dr. C. Semper. *Leipzig und Wiesbaden*, 4(1), 1-133.

- Sluiter, C. P. (1902). *Die sipunculiden und echiuriden der Siboga-expedition: nebst zusammenstellung der ueberdies aus dem Indischen archipel bekannten arten* (Vol. 25): EJ Brill.
- Spongberg, A. L. (2006). PCB concentrations in intertidal sipunculan (Phylum Sipuncula) marine worms from the Pacific coast of Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*, 54(1).
- Stephen, A. C., & Edmonds, S. J. (1972). phyla Sipuncula and Echiura.
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., & Gibson, T. J. (1994). CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic acids research*, 22(22), 4673-4680.
- Towle, A., & Giese, A. C. (1967). The annual reproductive cycle of the sipunculid *Phascolosoma agassizii*. *Physiological zoology*, 40(3), 229-237.
- Vargas, J. A., & Dean, H. K. (2009). Sipunculans *Marine Biodiversity of Costa Rica, Central America* (pp. 175-180): Springer.
- Williams, J. A. (1977). *Functional development in four species of the sipuncula*.
- Xiadong, D., Zian, C., Yuewen, D., Qingheng, W., & Ronglian, H. (2008). Genetic diversity and population structure of the peanut worm (*Sipunculus nudus*) in Southern China as inferred from mitochondrial 16S rRNA sequences.
- Yan, Q.-L., & Wang, W.-X. (2002). Metal exposure and bioavailability to a marine deposit-feeding sipuncula, *Sipunculus nudus*. *Environmental science & technology*, 36(1), 40-47.



ภาคผนวก ก
ข้อมูลตัวอย่างจากการเก็บข้อมูล

ตารางภาคผนวก ก 1 ข้อมูลตัวอย่างชุดที่ 1

ตัวอย่างที่	ความยาว ลำตัว(ซม.)	ความยาว กว้างลำตัว (ซม.)	สี	ความยาว ทวาร(ซม.)	ความยาว เนฟริเดียม (ซม.)	ระยะห่าง เนฟริเดียม และผนัง ลำตัว(ซม.)	ร้อยละ การติด ของเนฟริเดียมกับ ผนังลำตัว	VLR	DLDR	รูปร่าง สมอง	ลักษณะ ระบบ ประสาท	จำนวน แถบ กล้ามเนื้อ ตามยาว	เพศ	ลักษณะ แถบ กล้ามเนื้อ
1	18.5	1	น้ำตาลแดง	3	1.7	1	58.82	1-6/1-6	9-13/8-13	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
2	19	0.9	น้ำตาลแดง	2.7	2.1	1.5	71.43	1-5/1-5	6-11/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
3	16.5	0.8	น้ำตาลแดง	2.3	2.3	1.2	52.17	1-5/1-5	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
4	20	0.8	น้ำตาลแดง	2.5	3	2	66.67	1-6/1-6	7-11/7-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
5	20.5	1	น้ำตาลแดง	3	2.4	1	41.67	1-6/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
6	22	1	น้ำตาลแดง	3.2	3	1.4	46.67	1-6/1-6	7-9/7-11	Bilobed	Solid tuft	27	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
7	16.2	0.9	น้ำตาลแดง	1.9	3.5	1.1	31.43	1-6/1-5	8-13/7-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
8	13.5	0.7	น้ำตาลแดง	1.9	2	0.8	40	1-7/1-6	7-13/7-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
9	16	1	น้ำตาลแดง	2.7	3	1.5	50	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
10	15.5	0.8	น้ำตาลแดง	2.7	4	1.5	37.5	1-5/1-5	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
11	15	0.8	น้ำตาลแดง	2.3	3.8	1.7	44.74	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	25	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
12	14.5	0.9	น้ำตาลแดง	2.8	4.5	1.2	26.67	1-6/1-6	7-12/7-11	Bilobed	Solid tuft	27	เพศผู้	แยกทั้งหมด
13	14.8	0.9	น้ำตาลแดง	3	4.2	1.7	40.48	1-5/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด

ตารางภาคผนวก ก 1 ข้อมูลตัวอย่างชุดที่ 1 (ต่อ)

14	13.5	0.8	น้ำตาลแดง	2.7	4.3	1.6	37.21	1-7/1-6	9-13/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
15	17	0.8	น้ำตาลแดง	3.2	4	1.5	37.5	1-6/1-6	8-13/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
16	14.3	0.8	น้ำตาลแดง	2.5	2.8	1.5	53.57	1-6/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
17	15.5	0.9	น้ำตาลแดง	3	4.8	1.9	39.58	1-6/1-6	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
18	18	1	น้ำตาลแดง	3	4	1.8	45	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
19	14.5	0.9	น้ำตาลแดง	2.7	4	1.6	40	1-6/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
20	15.5	0.9	น้ำตาลแดง	2.9	4	1.5	37.5	1-6/1-6	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
21	14.5	0.8	น้ำตาลแดง	3	3.5	1.2	34.29	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
22	17.5	0.9	น้ำตาลแดง	3	4	1.2	30	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
23	17	0.8	น้ำตาลแดง	3	3.5	1.4	40	1-6/1-6	7-12/7-11	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
24	18	0.8	น้ำตาลแดง	3.3	3.4	1.3	38.24	1-5/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
25	17	0.7	น้ำตาลแดง	1.8	2.5	0.8	32	1-6/1-6	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	27	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
26	15	0.7	น้ำตาลแดง	3.2	3	1.3	43.33	1-7/1-6	7-11/7-12	Bilobed	Solid tuft	27	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
27	14.5	0.8	น้ำตาลแดง	2.9	3.5	1.7	48.57	1-5/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
28	14.8	1	น้ำตาลแดง	3	2.8	1.8	64.29	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	25	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
29	15	0.8	น้ำตาลแดง	2.5	4	1	25	1-5/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	27	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
30	14	0.5	น้ำตาลแดง	1.5	3.3	1.4	42.42	1-6/1-6	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	25	เพชฌัญญู	แยกทั้งหมด
AVG	16.3	0.85		2.7	3.4	1.4	43.22					26.07		
MAX	22	1		3.3	4.8	2	71.43					27		
MIN	13.5	0.5		1.5	1.7	0.8	25					25		
STDEV	2.15	0.11		0.45	0.79	0.31	11.22					0.52		



ตารางภาคผนวก ก 2 ข้อมูลตัวอย่างชุดที่ 2

ตัวอย่างที่	ความยาว ลำตัว(ซม.)	ความ กว้างลำตัว (ซม.)	สี	ความยาว ทวาร(ซม.)	ความยาว เนฟริเดียม (ซม.)	ระยะห่าง เนฟริเดียม และผนัง ลำตัว(ซม.)	ร้อยละการ ติดของเนฟ ริเดียมกับ ผนังลำตัว	VLAR	DL/DR	รูปร่าง สมอง	ลักษณะ ระบบ ประสาท	จำนวน แถบ กล้ามเนื้อ ตามยาว	เพศ	ลักษณะ แถบ กล้ามเนื้อ
1	10	1	น้ำตาลแดง	3.5	3	1.6	53.33	1-5/1-5	7-12/6-12	Bilobed	Solid tuft	27	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
2	17	0.8	น้ำตาลแดง	2	2.8	1.4	50	1-5/1-6	8-13/8-12	Bilobed	Solid tuft	27	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
3	20	1.1	น้ำตาลแดง	3.2	4.2	1.8	42.86	1-5/1-6	7-11/8-13	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
4	15.8	1.2	น้ำตาลแดง	3.5	3.3	1.9	57.58	1-5/1-7	8-13/8-13	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
5	17.5	1	น้ำตาลแดง	3.7	3	1.5	50	1-5/2-5	9-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	28	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
6	19.5	0.8	น้ำตาลแดง	3.5	3.5	1.5	42.86	1-6/1-5	8-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	25	เพศผู้	แยกทั้งหมด
7	19	1.1	น้ำตาลแดง	3	1.9	1.3	68.42	1-6/1-5	7-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	27	เพศผู้	แยกทั้งหมด
8	16.5	0.7	น้ำตาลแดง	3.4	3	1.4	46.67	1-6/1-5	9-11/9-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
9	17.5	1	น้ำตาลแดง	2.7	2.8	1.2	42.86	1-5/1-6	8-13/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
10	23	0.8	น้ำตาลแดง	3.4	2.8	1.6	57.14	1-6/1-5	8-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	25	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
11	20.5	1	น้ำตาลแดง	2.7	2	1	50	1-6/1-7	7-12/8-13	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
12	13.5	0.9	น้ำตาลแดง	2.5	3	0.8	26.67	1-6/1-5	8-12/8-13	Bilobed	Solid tuft	25	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
13	17	1	น้ำตาลแดง	2.3	2.5	1	40	1-6/1-6	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
14	19.5	1	น้ำตาลแดง	2.5	2	1.3	65	1-6/1-5	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	27	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
15	15.3	0.7	น้ำตาลแดง	2	2.3	1	43.48	1-5/1-5	8-13/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
16	18	1.2	น้ำตาลแดง	1.8	2.4	1.1	45.83	1-7/1-6	8-13/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด

ตารางภาคผนวก ก 2 ข้อมูลตัวอย่างชุดที่ 2

17	21	1	น้ำตาแดง	3.6	4.5	1.5	33.33	1-6/1-7	8-13/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
18	16.5	1.3	น้ำตาแดง	2	2.8	1.1	39.29	1-6/1-6	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
19	22	1	น้ำตาแดง	3	5.5	1.6	29.09	1-7/1-6	8-12/7-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
20	21.5	0.9	น้ำตาแดง	2.5	2.3	1.2	52.17	1-6/1-6	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	25	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
21	18.5	0.8	น้ำตาแดง	2.3	2.5	1	40	1-6/1-6	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
22	16.5	1	น้ำตาแดง	3.2	4.2	1.8	42.86	1-6/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
23	12.2	0.8	น้ำตาแดง	1.5	2.5	0.8	32	1-6/1-7	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
24	13.2	0.9	น้ำตาแดง	1.6	3.2	1.2	37.5	1-5/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
25	17.5	1	น้ำตาแดง	2	4.2	1.4	33.33	1-6/1-6	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
26	13.5	0.7	น้ำตาแดง	2.5	2.5	1.1	44	1-6/1-7	7-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
27	15.5	0.7	น้ำตาแดง	2.2	2.7	1.1	40.74	1-6/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
28	12.5	0.5	น้ำตาแดง	2	2.5	0.9	36	1-6/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศผู้	แยกทั้งหมด
29	15	0.7	น้ำตาแดง	2.5	2	0.9	45	1-7/1-7	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
30	10.5	0.6	น้ำตาแดง	1.3	1.7	0.6	35.29	1-6/1-6	8-12/8-12	Bilobed	Solid tuft	26	เพศเมีย	แยกทั้งหมด
AVG	16.9	0.91		2.6	2.9	1.3	44.11					26.07		
MAX	23	1.3		3.7	5.5	1.9	68.42					28		
MIN	10	0.5		1.3	1.7	0.6	26.67					25		
STDEV	3.34	0.19		0.69	0.87	0.33	9.85					0.64		

ภาคผนวก ข
การคำนวณความชื้นหาค

วิธีการคำนวณค่าแฉกความชื้นหาค

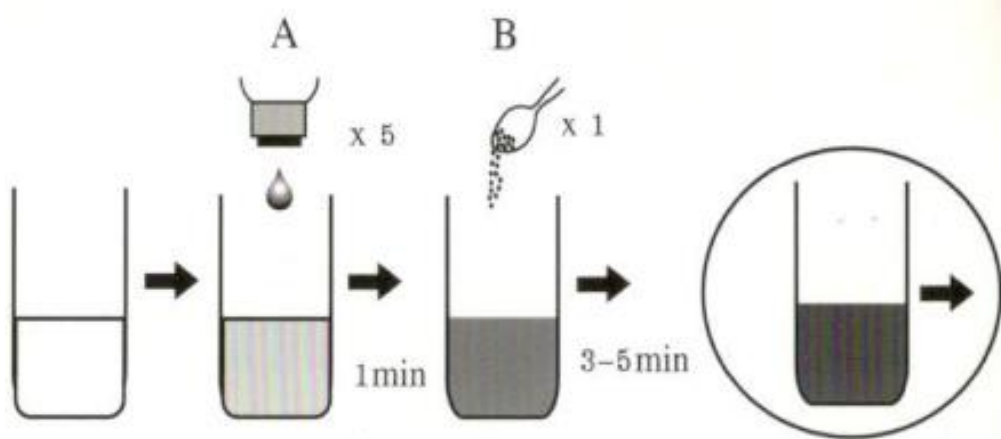
$$\text{ความชื้น (m)} = \frac{\Delta y}{\Delta x} / \text{ความยาว } (\Delta x)$$

ตารางภาคผนวก ข 1 ข้อมูลจากการวัดความชื้นและความยาวของหาค

ระยะความสูงของไม้เมตรที่ 2 (เมตร)	ระยะความสูงไม้เมตรที่ 1 (เมตร)	ระยะทางระหว่างไม้เมตรที่ 1 กับ 2 (เมตร)	ระยะทางระยะสัมผัส (เมตร)	ระยะความสูงจากไม้เมตร 1 ถึงไม้เมตร 2 (เมตร)	ความชื้น	%O.M	%sand	%silt	%clay	soil texture
0	0	0	0	0	0	0.1	99	0	1	Fine sand
0.38	0	5	5	0.38	0.076	0.11	99	0	1	Fine sand
0.67	0.38	5	10	0.29	0.058	0.12	99	0	1	Fine sand
0.82	0.67	5	15	0.15	0.03	0.12	97	0	3	Fine sand
0.93	0.82	5	20	0.11	0.022	0.2	97	0	3	Fine sand
0.99	0.93	5	25	0.06	0.012	0.22	97	0	3	Fine sand
1.04	0.99	5	30	0.05	0.01	0.21	97	0	3	Fine sand
1.05	1.04	5	35	0.01	0.002	0.24	97	0	3	Fine sand
1.14	1.05	5	40	0.09	0.018	0.24	97	0	3	Fine sand
1.24	1.14	5	45	0.1	0.02	0.3	97	0	3	Fine sand
1.5	1.24	5	50	0.26	0.052	0.34	95	2	3	Fine sand
1.59	1.5	5	55	0.09	0.018	0.4	95	2	3	Fine sand
1.64	1.59	5	60	0.05	0.01	0.37	95	2	3	Fine sand
1.65	1.64	5	65	0.01	0.002	0.35	95	2	3	Fine sand
1.68	1.65	5	70	0.03	0.006	0.36	95	2	3	Fine sand

ภาคผนวก ค
สารเคมีและการวิเคราะห์

1. การตรวจสอบปริมาณไนไตรท์โดยใช้ชุดตรวจสอบปริมาณไนไตรท์ บริษัท AQUA-VBC ประเทศไทย ดังรูปที่ 1.1 และ 1.2
 - 1.1. ล้างภาชนะตัวอย่างด้วยน้ำที่จะวัดหลายๆครั้ง แล้วตวงมา 5 มิลลิลิตร
 - 1.2. หยดสารละลาย A 5 หยด เขย่าให้เข้ากันแล้วทิ้งไว้อย่างน้อย 1 นาที
 - 1.3. เติมผง Powder 1 ช้อน เขย่าให้ละลาย
 - 1.4. เปรียบเทียบสีที่เกิดขึ้นกับสีมาตรฐาน หลังจากทิ้งไว้ 3-5 นาที
 - 1.5. ล้างภาชนะด้วยน้ำสะอาดก่อนทิ้งไว้ให้แห้งและเก็บเข้ากล่องทดสอบ



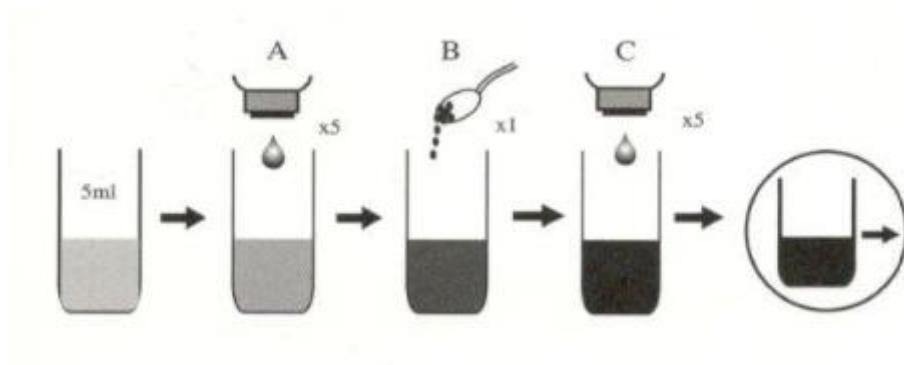
รูปที่ ค.1 วิธีการตรวจสอบปริมาณไนไตรท์โดยใช้ชุดตรวจสอบปริมาณแอมโมเนียบริษัท AQUA-VBC ประเทศไทย



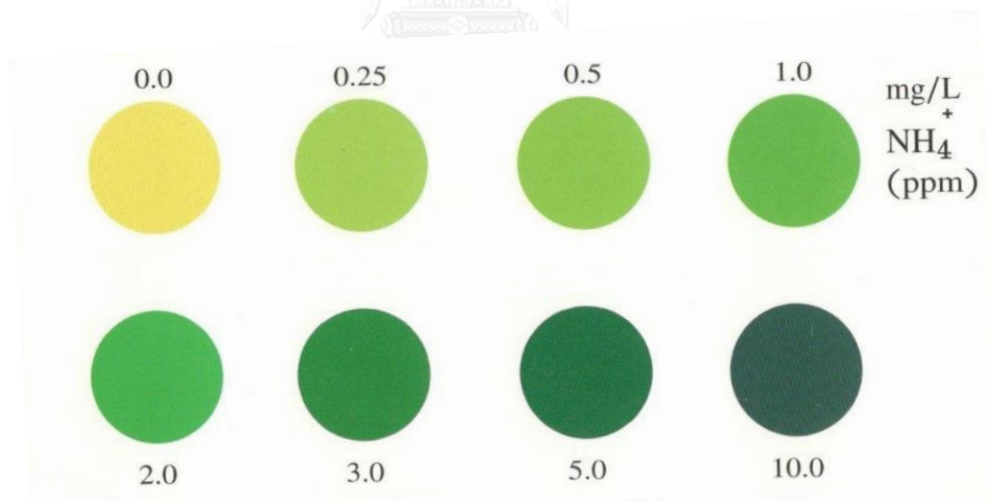
รูปที่ ค.2 สีมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณไนไตรท์ใช้ชุดตรวจสอบปริมาณไนไตรท์บริษัท AQUA-VBC ประเทศไทย

2. การตรวจสอบปริมาณแอมโมเนียโดยใช้ชุดตรวจสอบปริมาณแอมโมเนีย (Ammonium test kit) บริษัท AQUA-VBC ประเทศไทย ดังรูปที่ 2.1 2.2 และ 2.3

- 2.1. ล้างหลอดใส่น้ำตัวอย่างด้วยน้ำที่จะวัด และเติมจนถึงขีด 5 มิลลิลิตร
- 2.2. เติม Solution A 5 หยด เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 1 นาที
- 2.3. เติม Powder B 1 ช้อน (โดยตักให้เต็มช้อนแล้วปาดกับคอบชวด)และเขย่าให้ละลาย
- 2.4. เติม Solution C 5 หยด เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 5-10 นาที แล้วเปรียบเทียบกับแผ่นสีมาตรฐานความเข้มข้นแอมโมเนียม (NH_4^+) คิดเป็นหน่วย ppm



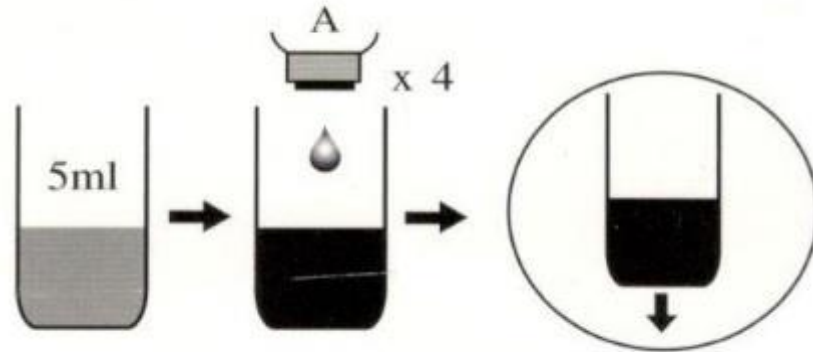
รูปที่ ค.3 วิธีการตรวจสอบปริมาณแอมโมเนียโดยใช้ชุดตรวจสอบปริมาณแอมโมเนีย AQUA-VBC ประเทศไทย



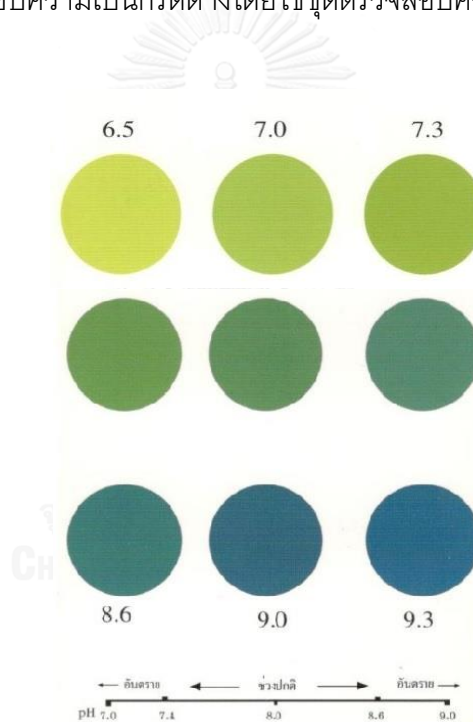
รูปที่ ค.4 สีมาตรฐานสำหรับวัดปริมาณแอมโมเนียของชุดตรวจสอบปริมาณแอมโมเนียบริษัท AQUA-VBC

3. การตรวจสอบความเป็นกรดต่างโดยใช้ชุดตรวจสอบความเป็นกรดต่าง (pH test kit) บริษัท บริษัท AQUA- VBC ประเทศไทย ดังรูปที่ 3.1 และ 3.2
 - 3.1. ล้างหลอดทดสอบด้วยน้ำตัวอย่างที่จะแล้วเติมจนถึงขีด 5 มิลลิลิตร
 - 3.2. หยดน้ำยาจากขวด Solution A 4 หยด แล้วเขย่าให้ผสมกัน

3.3. เปรียบเทียบสีในหลอดกับแผ่นสีมาตรฐานเพื่ออ่านค่า pH



รูปที่ ค.5 วิธีการตรวจสอบความเป็นกรดต่างโดยใช้ชุดตรวจสอบความเป็นกรดต่างAQUA-VBC ประเทศไทย

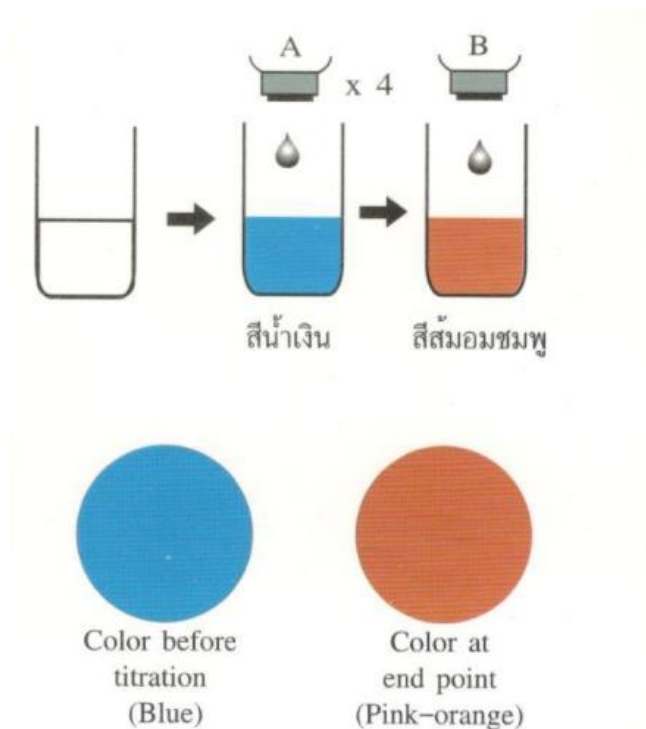


รูปที่ ค.6 สีมาตรฐานสำหรับวัดความเป็นกรดต่างของชุดตรวจสอบความเป็นกรดต่างบริษัท AQUA-VBC

4. การตรวจสอบปริมาณอัลคาไลน์ดีโดยใช้ชุดตรวจสอบปริมาณอัลคาไลน์ดี(Alkalinity test kit) บริษัท AQUA-VBC ประเทศไทย ดังรูปที่ 4.1

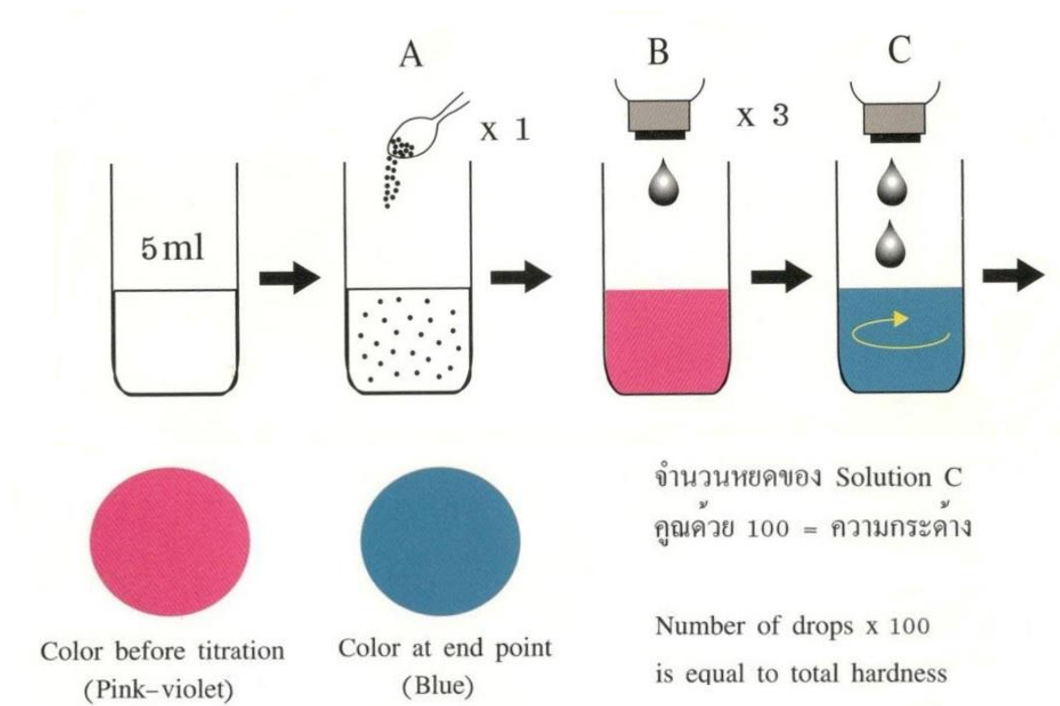
- 4.1. ล้างหลอดทดสอบด้วยน้ำตัวอย่างแล้วเติมจนถึงขีด 5 มิลลิลิตร
- 4.2. หยดน้ำยา Solution A 2 หยด แล้วเขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีน้ำเงิน
- 4.3. หยด Solution B ทีละหยดโดยให้ขวดหยุดตั้งในแนวตั้งนับหยดและเขย่าเบาๆ ให้สารละลายผสมกัน หยดหยุดเมื่อสารละลายเป็นสีส้มอมชมพูพอดี

4.4. จำนวนหยดที่ใช้คุณด้วย 10 คือค่าความเป็นด่างคิดเป็น ppm ของ CaCO_3



รูปที่ ค.7 วิธีการตรวจสอบปริมาณอัลคาไลน์ดีโดยใช้ชุดตรวจสอบปริมาณอัลคาไลน์ดี บริษัท AQUA-VBC ประเทศไทย

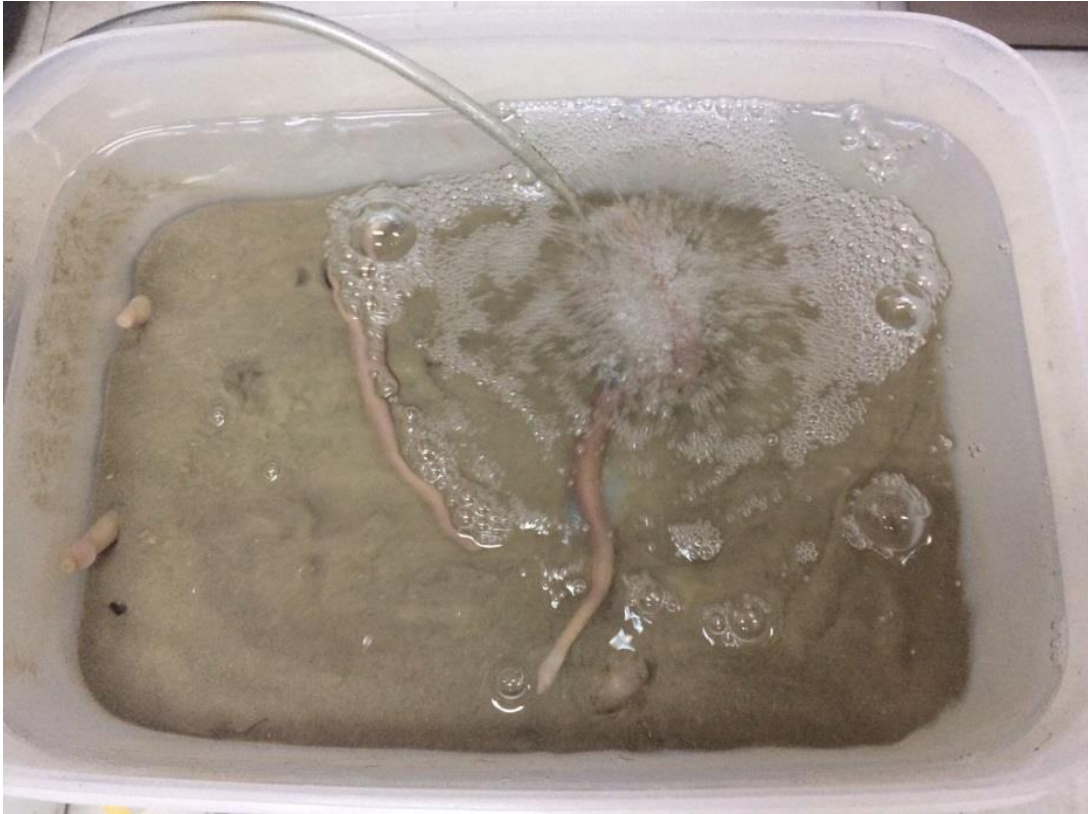
5. การตรวจสอบปริมาณค่าความกระด้างของน้ำโดยใช้ชุดตรวจสอบค่าความกระด้างของน้ำ (Hardness test kit) บริษัท AQUA- VBC ประเทศไทย
 - 5.1. ล้างหลอดทดสอบด้วยน้ำตัวอย่าง แล้วเติมถึงขีด 5 มิลลิตร
 - 5.2. เติม Powder A 1 ซ้อน แล้วเขย่าให้เข้ากัน
 - 5.3. หยด Solution B 3 หยด เขย่าให้เข้ากันจะได้สารละลายสีชมพูอมม่วง
 - 5.4. หยด Solution C m ละหยด โดยตั้งขวดในแนวตั้ง นับหนดและเขย่าเบาๆ ให้สารละลายผสมกัน หยดสุดท้าย สารละลายเป็นสีน้ำเงินพอดี
 - 5.5. จำนวนหยดที่ใช้คุณด้วย 100 คือค่าความกระด้างของน้ำคิดเป็น ppm. CaCO_3



Remark : For the sample that hardness is more than 2,000 ppm, the sample should be diluted 3 times before use by diluting 5 ml of the sample water with 10 ml of distilled water. Multiply the results by 3 to obtain the total hardness of the undiluted sample.

รูปที่ ค.8 วิธีการตรวจสอบปริมาณค่าความกระด้างของน้ำโดยใช้ชุดตรวจสอบปริมาณค่าความกระด้างของน้ำ บริษัท AQUA-VBC ประเทศไทย

ภาคผนวก ง
ระบบทดลองเลี้ยงหนอนถั่วเพื่อการผสมพันธุ์



รูปที่ ง.1 ภาพสำหรับเลี้ยงหนอนถั่วเพื่อศึกษาการผสมพันธุ์ของหนอนถั่ว

ภาคผนวก จ

การสกัดสารพันธุกรรม (DNA) จากตัวอย่างหนอนถั่ว

1. ตัดตัวอย่างหนอนให้เป็นชิ้นเล็กๆ ใส่ตัวอย่างน้ำหนักประมาณ 1 กรัม ลงในหลอดขนาด 50 ml
2. เติม extraction buffer ปริมาตร 7 ml และ Proteinase K (20 mg/ml) 35 ul ลงในหลอดที่มีตัวอย่างอยู่ ผสมให้เข้ากันดี ทำการบดตัวอย่างด้วยแท่งพลาสติกสำหรับบดตัวอย่าง บดให้ละเอียด นำหลอดตัวอย่างไป incubate ที่อุณหภูมิ 65°C พร้อมเขย่าเบาๆ นาน 1-2 ชั่วโมง
3. เมื่อครบเวลา นำหลอดตัวอย่างออกจากตู้ incubate และปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 15 นาที ดึงส่วนใสใส่หลอด 50 ml หลอดใหม่ (จะได้ส่วนใส ประมาณ 7 ml)
4. เติม 5 M NaCl ปริมาตร 300 ul ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆ
5. เติม 95 % ethanol ที่แช่เย็น ปริมาตร 2 เท่าของส่วนใส ผสมให้เข้ากันอย่างเบาๆ นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง จะเห็นตะกอนดีเอ็นเออยู่ที่ก้นหลอด
6. เติม 70 % ethanol ปริมาตร 7 ml ลงในหลอด แกว่งหลอดอย่างเบาๆ ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ระวังอย่าให้ตะกอนดีเอ็นเอหลุด เปิดฝาทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง หรือ incubate ที่ 65 oC จนกว่าตะกอนจะแห้ง
7. เติม dH₂O ปริมาตร 1 ml นำไป incubate ที่อุณหภูมิ 65 °C นาน 1 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm นาน 10 นาที
8. ดึงส่วนใสใส่หลอด 1.5 ml หลอดใหม่
9. ตรวจสอบคุณภาพและปริมาณของดีเอ็นเอที่สกัดได้ ด้วยเครื่อง Spectrophotometer และโดย Agarose Gel Electrophoresis โดยใช้ 1% agarose Gel และย้อมแผ่นเจลด้วยสารละลาย ethidium bromide ตรวจดูแถบดีเอ็นเอบนแผ่น agarose gel โดยส่องด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ต บันทึกผลด้วยการถ่ายภาพ

ภาคผนวก จ

ข้อมูลอัตราส่วนเพศผู้และเพศเมียเดือน กันยายน 2555-สิงหาคม 2556

ตารางที่ จ1 ข้อมูลอัตราส่วนเพศผู้และเพศเมียเดือน กันยายน 2555-สิงหาคม 2556

ระยะเวลา (เดือน)	เพศเมีย(ตัว)	เพศผู้(ตัว)	รวม	เพศเมีย(%)	เพศเมีย(%)
กันยายน 2555	32	28	60	53.3	46.7
ตุลาคม	26	31	57	45.6	54.4
พฤศจิกายน	38	32	70	54.3	45.7
ธันวาคม	47	38	85	55.3	44.7
มกราคม	35	33	68	51.5	48.5
กุมภาพันธ์	30	30	60	50.0	50.0
มีนาคม	39	29	68	57.4	42.6
เมษายน	22	28	50	44.0	56.0
พฤษภาคม	28	32	60	46.7	53.3
มิถุนายน	30	25	55	54.5	45.5
กรกฎาคม	32	27	59	54.2	45.8
สิงหาคม 2556	38	22	60	63.3	36.7
รวม	752	397	355		

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายมนตรี อินทร์นวล เกิดวันที่ 6 เมษายน พ.ศ.2526 ที่จังหวัดนครปฐม สำเร็จ การศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาผลิตภัณฑ์ประมง จาก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน ในปีการศึกษา.2548 และระดับปริญญาโทวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพจากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2553 ผลงานตีพิมพ์อยู่ระหว่างนำเสนอเพื่อตีพิมพ์ 2 หัวข้อคือ

1. New Record of Peanut Worm *Sipunculus nudus* from Thailand
2. Annual Reproductive Cycle of Peanut Worm, *Sipunculus Nudus* from Thailand

