

โครงสร้างเซลล์ภายในของทางเดินอาหารลูกปลากะรังเสือ อายุ 36 และ 42 วัน ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

Ultrastructure of digestive tract of tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (Perciformes: Serranidae) during larval stages at 36 and 42 days after hatching with the use of transmission electron microscopy (TEM)

กรณรวี เอี่ยมสมบุญ^{1*}

Kornrawee Aiemsomboon^{1*}

บทคัดย่อ: โครงสร้างเซลล์ภายในทางเดินอาหารลูกปลากะรังเสือ *Epinephelus fuscoguttatus* (Perciformes: Serranidae) อายุ 36 และ 42 วัน วิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ตรวจพบ gastric gland ในกระเพาะอาหารและในไส้ติ่ง (pyloric caeca) ในลูกปลาทั้งสองระยะ พบ microvilli ในลำไส้ลูกปลาอายุ 36 วัน และมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในลูกปลาอายุ 42 วัน แสดงถึงประสิทธิภาพการดูดซึมสารอาหารได้ดีตามอายุของลูกปลา ทั้งนี้พบ lipid droplets ในเซลล์ตับ hepatocytes มีความสัมพันธ์กับการสะสมไขมันและการสะสมไกลโคเจนด้วย จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าสามารถให้อาหารสำเร็จรูปเป็นอาหารกับลูกปลากะรังเสือในระยะก่อนอายุ 36 วันได้ และจะได้มีการวิเคราะห์ปริมาณเอ็นไซม์ในทางเดินอาหารลูกปลากะรังเสือต่อไป

คำสำคัญ: โครงสร้างเซลล์ภายใน, กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน, *Epinephelus fuscoguttatus*, ปลากะรังเสือ

ABSTRACT: Ultrastructure of the digestive tract of tiger grouper *Epinephelus fuscoguttatus* (Perciformes: Serranidae) during larval stages at 36 and 42 days after hatching (DAH) was investigated using transmission microscopy (TEM). Gastric glands and pyloric caeca were observed in both larval stages. Microvilli were detected in intestine of larvae aged at 36 DAH and they became more abundant at 42 DAH indicating a progress in developing the digestive tract to absorb more nutrients as the larvae grew. Lipid droplets were observed in hepatocytes correlated well with a presence of lipid accumulation and glycogen storage. Taken together, these data indicate that the tiger grouper is ready for the first weaning as early as 36 DAH. Enzymatic activity is currently under investigation in order to reveal which development stages when the gastric glands of larvae are fully functional.

Keywords: ultrastructure, electron microscope, *Epinephelus fuscoguttatus*, tiger grouper

บทนำ

ปลากะรังเสือ *Epinephelus fuscoguttatus* (Perciformes: Serranidae) เป็นปลาทะเลที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีการเพาะพันธุ์และเลี้ยงในกระชังอย่าง

แพร่หลาย (Sugama *et al.*, 2012) การอนุบาลปลากะรังเสือยังมีปัญหาเรื่องอัตราการตายต่ำในช่วงแรกของการอนุบาลที่ลูกปลาจะเริ่มกินอาหารมีชีวิต และในช่วงที่ลูกปลาเริ่มเปลี่ยนจากการกินอาหารมีชีวิตมาเป็นอาหารสังเคราะห์ (Cahu and Infante, 2001) โดย

¹ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Department of Aquaculture, Faculty of Fisheries, Kasetsart University

* Corresponding author: kornrawee.a@gmail.com

ทางศุนยวิชัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่ สามารถเพาะขยายพันธุ์ปลากะรังเลี้ยงได้แล้ว ซึ่งในการอนุบาลลูกปลากะรังเลี้ยงอายุ 35 วันขึ้นไป จะให้อาหารสำเร็จรูป (formulated diet) ผสมกับปลาสดเป็นอาหาร (อาคม และคณะ, 2546) ลูกปลากะรังเลี้ยงในระยะกินอาหารสำเร็จรูปจำเป็นต้องมีการพัฒนาอวัยวะการย่อยอาหารที่สัมพันธ์กับการเจริญเติบโต ซึ่งจะส่งผลต่ออัตราการรอดตายของลูกปลากะรังเลี้ยงในระยะนี้ (Yufera and Darias, 2007)

การศึกษาการเจริญของทางเดินอาหารปลากะรังด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงประเภท light microscope (LM) (Kato *et al.*, 2004; Quinitio *et al.*, 2004; Qu *et al.*, 2012) จะสามารถตรวจสอบโครงสร้างเซลล์ได้ในระดับหนึ่ง แต่ไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างของลักษณะโครงสร้างเซลล์ภายในได้ ลักษณะเซลล์โครงสร้างภายในนี้ต้องตรวจวิเคราะห์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, TEM) ทั้งนี้การศึกษาโครงสร้างเซลล์ภายในของทางเดินอาหารของกลุ่มปลากะรังด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน มีรายงานว่าในปลากะรังจุดฟ้า *Plectropomus leopardus* ที่อายุ 54 วัน พบเซลล์ enterocytes บริเวณลำไส้ และ hepatocytes บริเวณตับ แสดงถึงการสะสมไขมัน และ glycogen ในตับ (Qu *et al.*, 2012) โดยการศึกษาโครงสร้างเซลล์ภายในของทางเดินอาหารลูกปลาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ช่วยทำให้เข้าใจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของทางเดินอาหารปลา และการทำงานของเซลล์เยื่อบุทางเดินอาหาร และสามารถตรวจสอบความผิดปกติที่เกิดขึ้นในทางเดินอาหารปลาซึ่งอาจเกิดจากโรค (Carrasson *et al.*, 2006) การศึกษาในครั้งนี้จะตรวจสอบโครงสร้างภายในของเซลล์ทางเดินอาหารของลูกปลากะรังเลี้ยงซึ่งยังไม่มีรายงานการศึกษามาก่อน โดยข้อมูลที่ได้จะทำให้มีความเข้าใจเกี่ยวกับการพัฒนาของเซลล์ต่างๆ ในทางเดินอาหารโดยเฉพาะระยะที่เพาะอาหาร

พัฒนาสมบูรณ์แล้วและความสัมพันธ์กับอาหารที่ลูกปลากิน เพื่อเป็นประโยชน์ในการวางแผนจัดหาอาหารให้เหมาะสมกับความต้องการของลูกปลากะรังเลี้ยง เพื่อลูกปลากะรังเลี้ยงจะได้รับสารอาหารที่นำไปใช้ให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุดเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของลูกปลากะรังเลี้ยงในระยะการอนุบาล

วิธีการศึกษา

เก็บตัวอย่างลูกปลากะรังเลี้ยง *E. fuscoguttatus* (Perciformes: Serranidae) อายุ 36 และ 42 วัน ที่มีการพัฒนาเพาะอาหารสมบูรณ์แล้วและให้อาหารสำเร็จรูปเป็นอาหารในช่วงอายุนี้นี้ ซึ่งลูกปลากะรังเลี้ยงได้จากการเพาะพันธุ์ของศุนยวิชัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่ เป็นลูกปลาที่อนุบาลด้วยอาหารสำเร็จรูป (formulated diet) ผสมกับอาหารสด เก็บตัวอย่างลูกปลาในช่วงเช้าก่อนให้อาหาร นำตัวอย่างลูกปลามาตัดเอาทางเดินอาหารแล้วคงสภาพเนื้อเยื่อด้วย 5% glutaraldehyde และ 2% osmium tetroxide (OsO_4) ดึงน้ำออกด้วย acetone series แล้วแทนที่ด้วย Spurr's Resin (Spurr, 1969) และนำไปอบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วตัดตัวอย่างด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อ (Ultramicrotome: Leica รุ่น UTC) ให้มีความหนา 1.5 ไมโครเมตร (thick section) นำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง เพื่อตรวจสอบชิ้นเนื้อเยื่อที่ต้องการและกำหนดตำแหน่งเพื่อใช้ในการเตรียมและตัดบาง (ultrathin section) โดยตัดบางให้มีความหนาเพียง 60-90 นาโนเมตร แล้วย้อมสีด้วย 5% uranyl acetate และ lead citrate (Reynolds, 1963) หลังจากนั้นนำตัวอย่างที่เตรียมได้ไปศึกษาโครงสร้างทางเดินอาหารของลูกปลากะรังเลี้ยงภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Transmission electron microscopy (TEM) (HITACHI: HT7700) และบันทึกภาพ

ผลการศึกษา

ลูกปลากะรังสีเอ อายุ 36 วัน พบ gastric glands ในกระเพาะอาหารส่วน cardiac และ fundic แต่ไม่พบในกระเพาะอาหารส่วน pyloric และพบ gastric glands ในไส้ติ่ง (pyloric caeca) การศึกษาโครงสร้างเซลล์ภายในของลำไส้ลูกปลากะรังสีเอ อายุ 36 วัน และ 42 วัน พบว่าลำไส้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อชนิด columnar epithelium ประกอบด้วยเซลล์รูปทรงกระบอกเรียงตัวกันเป็นแนวชั้นเดียว ซึ่งเป็นเซลล์มีคุณสมบัติในการดูดซึมอาหารได้ดี (epithelium absorptive cells) ที่เรียกว่าเซลล์ enterocytes (Figure 1A) บริเวณลำไส้ลูกปลากะรังสีเออายุ 36 วัน ภายในเซลล์ enterocytes พบ nucleus รูปทรงรี (oval) อยู่ค่อนข้างด้านล่างของเซลล์ (basal region) ยังพบ goblet cells ในส่วน columnar epithelium (Figure 1C) โดยภายใน goblet cells มี mucus droplets ซึ่ง goblet cells จะถูกสร้างจากส่วนฐานของเซลล์แล้วเคลื่อนออกมาที่ผิวของเซลล์ และมี microvilli จำนวนมาก ลำไส้บริเวณลำไส้ลูกปลากะรังสีเออายุ 42 วัน ภายในเซลล์ enterocytes (Figure 1B) พบ nucleus และ mitochondria จำนวนมากกระจายทั่วไปใน cytoplasm พบ lysosomes ที่มีขนาดแตกต่างกัน, rough endoplasmic reticulum และ free ribosomes จะมีความยาวและจำนวนของ microvilli มากกว่าลำไส้ลูกปลาอายุ 36 วัน ในบริเวณใกล้กับ microvilli จะพบ vesicles กระจายตัวอยู่ และเซลล์ enterocytes บางเซลล์จะรวมติดกับอีกเซลล์หนึ่งโดย junction complexes ทั้งนี้พบ goblet cells ภายในมี mucus droplets (Figure 1D) ชัดเจน และพบก้อนไขมัน lipid droplets จำนวนมากกระจายอยู่ใน cytoplasm

โครงสร้างเซลล์ภายในของตับของลูกปลากะรังสีเอ อายุ 36 วัน พบเซลล์ hepatocytes (Figure 2) มีนิวเคลียสเป็นทรงกลม (spherical nuclei) และมี nucleoli ชัดเจน ในแต่ละเซลล์จะพบชั้นของ karyolemma 2 ชั้นที่มีช่อง (pores) อยู่ และพบ

mitochondria รูปร่างทรงยาว (tubular) มีชั้น cristae อยู่ภายใน ในบริเวณ cytoplasm, รอบๆ นิวเคลียสพบ mitochondria ขนาดเล็กมีรูปร่างเรียวยาวและทรงกลม ยังพบ endoplasmic reticulum, Golgi complexes, lipid droplets และกลุ่มของ free ribosomes ขนาดเล็กกระจายอยู่ใน cytoplasm

สรุปและวิจารณ์

ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ ลูกปลากะรังสีเอ อายุ 36 และ 42 วัน พบว่ามีการพัฒนาของกระเพาะอาหารสมบูรณ์แล้ว โดยพบ gastric glands จำนวนมากในกระเพาะอาหารและในไส้ติ่ง เช่นเดียวกับที่พบลูกปลากะรัง *Eipinephelus bruneus* (Kato *et al.*, 2004) และ *E. coidides* (Quinitio *et al.*, 2004A) ซึ่งแสดงว่ากระเพาะอาหารจะหลั่งน้ำย่อยที่เป็นกรดและเอนไซม์ย่อยโปรตีน โดยการที่ลูกปลาจะยอมรับอาหารที่กินนั้น จะสัมพันธ์กับการพัฒนา gastric gland ในกระเพาะอาหารและในไส้ติ่ง เนื่องจากการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนแล้ว (Chen *et al.*, 2006) สอดคล้องกับปริมาณเอนไซม์ในทางเดินอาหารลูกปลากะรัง *E. coidides* พบเอนไซม์ acid protease (pepsin) มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตั้งแต่ลูกปลามีอายุ 12 วัน ซึ่งกระเพาะอาหารเริ่มพัฒนา และเอนไซม์ trypsin และ chymotrypsin มีปริมาณเพิ่มขึ้นตั้งแต่ลูกปลาอายุ 8 วันเป็นต้นมา (Eusebio *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับ มีการสร้างเอนไซม์ trypsin เป็นปริมาณมากบริเวณกระเพาะอาหารลูกปลา *E. coidides* ตั้งแต่ลูกปลามีอายุ 35 วันเป็นต้นมา (Quinitio *et al.*, 2004B)

โครงสร้างเซลล์ภายในลำไส้ลูกปลากะรังสีเอ พบเซลล์ enterocytes ในบริเวณลำไส้ (Figure 1A, 1B) แสดงถึงการดูดซึมไขมันบริเวณลำไส้ (Qu *et al.*, 2012) และพบ microvilli ในลำไส้ลูกปลาอายุ 42 วัน (Figure 1D) มีความยาวและจำนวนมากกว่าในลูกปลาอายุ 36 วัน (Figure 1C) นั่นคือลำไส้ลูกปลาอายุ 42 วันมีการพัฒนาเซลล์ของลำไส้ดีกว่า

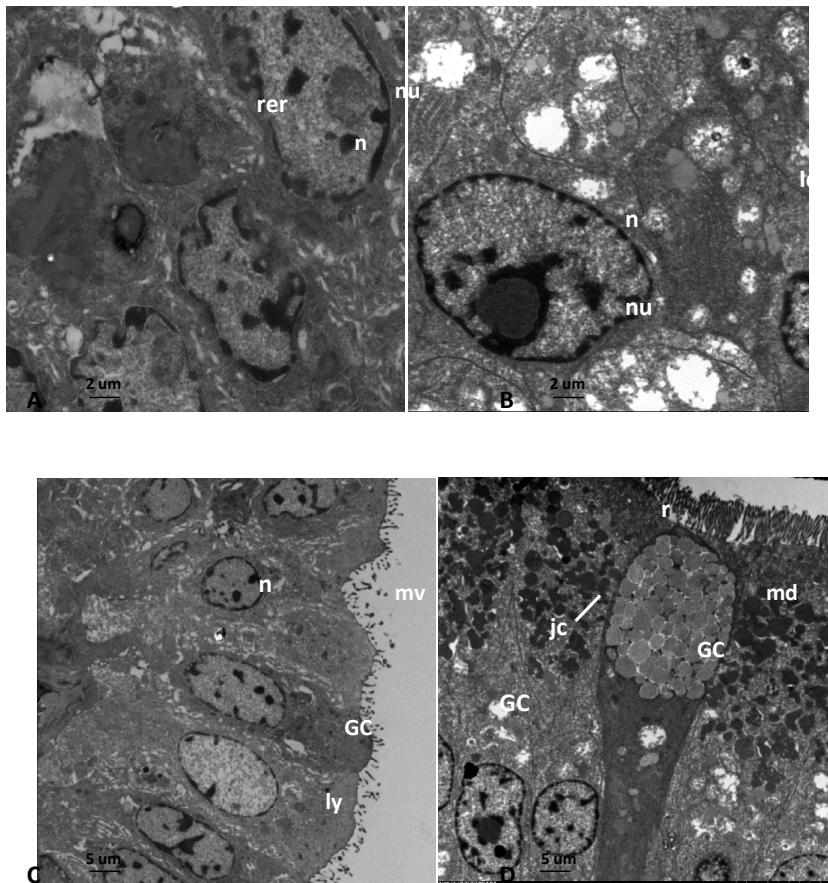


Figure 1 Ultrastructure of the intestine of *E. fuscoguttatus* larvae

- A) Ultrastructure of the enterocytes at 36 DAH larvae
- B) Ultrastructure of the enterocytes at 42 DAH larvae
- C) Ultrastructure of the goblet cell at 36 DAH larvae
- D) Ultrastructure of the goblet cell at 42 DAH larvae

Abbreviations: GC = goblet cell, jc = junction complexes, ld = lipid droplets, ly = lysosomes, m = mitochondria, md = mucus droplets, mv = microvilli, n = nucleus, nu = nucleolus, r = ribosome, rer = rough endoplasmic reticulum, tw = terminal web, v = vesicles

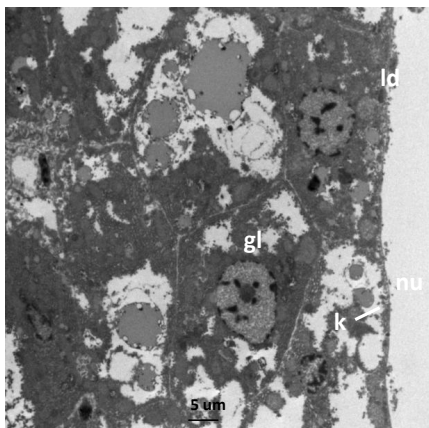


Figure 2 Ultrastructure of hepatocyte of *E. fuscoguttatus* larvae at 36 DAH larvae

Abbreviations: gl = glycogen, k = karyolemma, ld = lipid droplets, m = mitochondria, n = nucleus, nu = nucleolus, r = ribosome, rer = rough endoplasmic reticulum

โดยบริเวณลำไส้ที่มี microvilli ลักษณะยาวและเป็นจำนวนมากจะมีประสิทธิภาพในการดูดซึมไขมันได้ดี (El-Bakary and El-Gammal, 2010) สอดคล้องกับปริมาณเอนไซม์ lipase ในทางเดินอาหารลูกปลากะรัง *E. coidides* มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามอายุลูกปลา ยังมีความสัมพันธ์กับการพัฒนาของไส้ติ่งและลำไส้ซึ่งลูกปลาอายุ 30 วัน จะมีการพัฒนาสมบูรณ์ของไส้ติ่งและลำไส้สมบูรณ์แล้ว (Eusebio *et al.*, 2004) เช่นเดียวกับพบการสร้างเอนไซม์ lipase ปริมาณมากบริเวณลำไส้และไส้ติ่งของลูกปลา *E. coidides* อายุ 25 วันเป็นต้นมา (Quinitio *et al.*, 2004B)

นอกจากนี้โครงการเซลล์ภายในตับลูกปลากะรังเสือ พบเซลล์ hepatocytes ในบริเวณตับ (Figure 2) พบ lipid droplets ขนาดใหญ่กระจายอยู่ในบริเวณเซลล์ตับแสดงถึงการสะสมไขมัน และพบการสะสมไกลโคเจนด้วย สอดคล้องกับปลากะรังจุดฟ้า *P. leopardus* ที่อายุ 54 วัน จะพบเซลล์ hepatocytes ในตับ มีการสะสมไขมันและไกลโคเจนบริเวณนี้ (Qu *et al.*, 2012) ทั้งนี้เซลล์ hepatocytes จะทำหน้าที่สะสมไขมันในปลาระยะวัยรุ่น (juvenile stage) (Gisbert *et al.*, 2008) ดังนั้นการศึกษาโครงสร้างเซลล์ภายในของทางเดินอาหารลูกปลากะรังเสือ พบ

กระเพาะอาหารพัฒนาสมบูรณ์ก่อนอายุ 36 วัน ซึ่งสามารถจะให้อาหารสำเร็จรูปเป็นอาหารกับลูกปลากะรังเสือในระยะก่อนอายุ 36 วันได้ ซึ่งจะเป็นข้อมูลในการจัดหาอาหารให้ในการอนุบาลลูกปลากะรังเสือเพื่อให้มีการเจริญเติบโตที่ดีขึ้น ทั้งนี้ได้มีการวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ในทางเดินอาหารลูกปลากะรังเสือร่วมกับการศึกษาในครั้งนี้ด้วย แต่อยู่ในระหว่างดำเนินการวิเคราะห์

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา ของสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา ขอขอบคุณ ผอ.ไพฑูรย์ บุญลิปตานนท์ ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งกระบี่ ที่เอื้อเฟื้อตัวอย่างลูกปลากะรังเสือ และคุณพัชร อารุง ฝ่ายเครื่องมือและวิจัยวิทยาศาสตร์ สถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่แนะนำวิธีการศึกษาโครงสร้างเซลล์ภายในเนื้อเยื่อสัตว์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเลคตรอนแบบส่องผ่าน

เอกสารอ้างอิง

- อาคม สิงหนุญ, ไพบุลย์ บุญลิปตานนท์ และสามารณ เดชสถิตย์. 2546. พัฒนาการคัพพะและลูกปลาวัยอ่อนของปลาเก๋า เลื้อ *Epinephelus fuscoguttatus* (Forsskal, 1775). เอกสารวิชาการ ฉบับที่ 28/2546. ศูนย์วิจัยและพัฒนา ประมงชายฝั่งกระบี่, กรมประมง.
- Cahu, C. and J.Z. Infante. 2001. Substitution of live food by formulated diets in marine fish larvae. *Aquaculture* 200: 161-180.
- Carrasón, M., A. Grau, L.R. Dopazo and S. Crespo. 2006. A histological, histochemical and ultrastructural study of the digestive tract of *Dentex dentex* (Pisces, Sparidae). *Histology and Histopathology* 21: 579-593.
- Chen, B.N., J.G. Qin, M.S. Kumar, W. Hutchinson and S. Clarke. 2006. Ontogenetic development of the digestive system in yellowtail kingfish *Seriola lalandi* larvae. *Aquaculture* 256: 489-501.
- El-Bakary, N.E.R. and H.L. El-Gammal. 2010. Comparative histological, histochemical and ultrastructural studies on the proximal intestine of flathead grey mullet (*Mugil cephalus*) and sea bream (*Sparus aurata*). *World Applied Sciences Journal* 8(4): 477-485.
- Eusebio, P.S., J.D. Toledo, R.E.P. Mamauay and M.J.G. Bernas. 2004. Digestive enzymes activity in development grouper (*Epinephelus coioides*) larvae. M.A. Rimmer, S. McBride and K.C. Williams (Eds.), *Advances in grouper aquaculture: Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra*, pp. 35-40.
- Gisbert, E., J.B. Ortiz-Delgado, and C. Sarasquete. 2008. Nutritional cellular biomarkers in early life stages of fish. *Histology and Histopathology* 23: 1525-1539.
- Kato, K., K. Ishimaru, Y. Sawada, J. Mutsuro, S. Miyashita, O. Murata and H. Kumai. 2004. Ontogeny of digestive and immune system organs of larval and juvenile kelp grouper *Epinephelus bruneus* reared in the laboratory. *Fisheries Science* 70: 1061-1069.
- Qu, M., S. Ding, X. Xu, M. Shen, Y. You and Y. Su. 2012. Ontogenetic development of the digestive system and growth in coral trout (*Plectropomus leopardus*). *Aquaculture* 334-337: 132-141.
- Quinitio, G.F., A.C. Sa-an, J.D. Toledo and J.D. Tan-Fermin. 2004A. Changes in the gastrointestinal tract and associated organs during early development of the grouper (*Epinephelus coioides*). M.A. Rimmer, S. McBride and K.C. Williams (Eds.), *Advances in grouper aquaculture: Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra*, pp. 26-29.
- Quinitio, G.F., A.C. Sa-an, J.D. Toledo and J.D. Tan-Fermin. 2004B. Localisation of enzymes in the digestive system during early development of the grouper (*Epinephelus coioides*). M.A. Rimmer, S. McBride and K.C. Williams (Eds.), *Advances in grouper aquaculture: Australian Centre for International Agricultural Research, Canberra*, pp. 30-34.
- Raynolds, E.S. 1963. The use of lead-citrate at high pH as electron-opaque stain in electron microscopy. *J Cell Bio* 17: 208-212.
- Spurr, A.R. 1969. A low viscosity epoxy resin embedding medium for electron microscopy. *Journal of Ultrastructure Research* 26: 31-43.
- Sugama, K., M.A. Rimmer, S. Ismi, I. Koesharyani, K. Suwira, N.A. Giri and V.R. Alava. 2012. Hatchery management of tiger grouper (*Epinephelus fuscoguttatus*): a best-practice manual. ACIAR Monograph No. 149. Australian Centre for International Agricultural Research: Canberra, 66 pp.
- Yufera, M., and M.J. Darias. 2007. The onset of exogenous feeding in marine fish larvae. *Aquaculture* 268: 53-63.