

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระยะเริ่มต้นของหอยนางรมปากจีบ

*Saccostrea cucullata* (Born, 1778)

รัตนาชาติ คีวสกุลกาญจน์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา


คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กรกฎาคม 2560

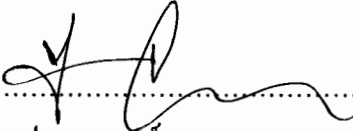
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

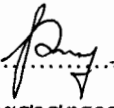
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณา  
วิทยานิพนธ์ของ รัตนชาติ กิ่งสกุลกาญจน์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

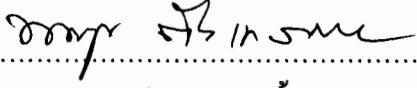
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

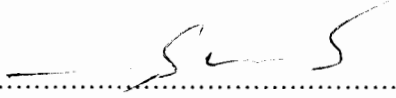
  
.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

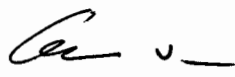
  
.....ประธาน  
(ดร.ปฐมพล วงศ์ตระกูลเกต)

  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง)

  
.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช ตั้งเกริก โอฟาร)

  
.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาคภูมิ พระประเสริฐ)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศาสตร์ของมหาวิทยาลัยบูรพา

  
.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 28 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2561

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความช่วยเหลือจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง อาจารย์ที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร.ปฐมพล วงศ์ตระกูลเกตุ รองศาสตราจารย์ ดร.นงนุช ตั้งเกริกโอฬาร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ภาควงศ์มณี พระประเสริฐ และที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ตรวจสอบแก้ไข และวิจารณ์ผลงาน ทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และอาจารย์ทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาและให้ความช่วยเหลือด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ คุณจันทนีย์ บุญงามิพูล นักวิทยาศาสตร์ ศูนย์กล้องจุลทรรศน์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกเป็นอย่างดีในการใช้เครื่องตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ขอขอบคุณ คุณสุภัททา เนื้อย่น้ำ คุณกุลนิษฐ์ ถนอมจิตร คุณชนพพล กลิ่นกลบ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจด้วยดีเสมอมา

เนื่องจากการวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จึงขอขอบพระคุณ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสมหวัง คุณแม่ชนวรรณ คีวสกุลกาญจน์ และสมาชิกในครอบครัวทุกคนที่ให้กำลังใจและสนับสนุนผู้วิจัยเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่ บพการี บุรพาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบนานเท่านานนี้

รัตนชาติ คีวสกุลกาญจน์

55990031: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)

คำสำคัญ: หอยนางรม/ การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้/ เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์  
 รัตนชาติ คิวสกุลกาญจน์: การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระยะเริ่มต้นของหอยนางรม  
 ปากจیب *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) (EARLY STAGES OF SPERMATOGENESIS IN  
 THE HOODED OYSTER, *Saccostrea cucullata* (Born, 1778)) คณะกรรมการควบคุม  
 วิทยานิพนธ์: สุทิน กิ่งทอง, ปร.ด. 70 หน้า, ปี พ.ศ. 2560.

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาเกี่ยวกับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระยะเริ่มต้นของหอย  
 นางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) โดยใช้หอยนางรมตัวเต็มวัยที่เก็บจากพื้นที่เพาะเลี้ยง นำมา  
 เตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและ  
 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ผลการศึกษาพบว่าอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจیب  
 จะแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณระหว่างเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิลกับต่อมสร้างน้ำย่อย อวัยวะ  
 สืบพันธุ์ประกอบด้วยท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งมีเซลล์ vesicular connective tissue (VCT) อยู่  
 ล้อมรอบ การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะเริ่มจากที่บริเวณผนังท่อไปสู่ลูเมน โดยภายในท่อพบเซลล์  
 สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ ได้แก่ สเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่ง สเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่สอง  
 สเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก สเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง สเปอร์มาทิด และสเปอร์มาโทซัว  
 นอกจากนี้ยังพบเซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (intra-gonadal somatic cells; ISCs)  
 แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่ง (intra-gonadal  
 somatic cell type I; ISC type I) และเซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่สอง  
 (intra-gonadal somatic cell type II; ISC type II) ซึ่งยังไม่สามารถอธิบายหน้าที่ของเซลล์ดังกล่าวได้  
 อย่างชัดเจน โดยการรายงานก่อนหน้านี้นี้และงานวิจัยครั้งนี้คาดว่าเซลล์ ISC type I ทำหน้าที่คล้ายกับ  
 เซลล์เซอโทไลของสัตว์มีกระดูกสันหลัง โดยช่วยกำจัดส่วนที่เหลือจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และ  
 เซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่สมบูรณ์ ส่วนเซลล์ ISC type II ทำหน้าที่คล้ายกับเซลล์สะสมอาหารที่อยู่ภายใน  
 ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เนื่องจากพบว่ามีแกรนูลคล้ายกับเม็ดไลโคเจนกระจายอยู่ในไซโทพลาซึม  
 ของเซลล์

55990031: MAJOR: BIOLOGY EDUCATION; M.Sc. (BIOLOGY EDUCATION)

KEYWORDS: OYSTER/ SPERMATOGENESIS/ INTRAGONADAL SOMATIC CELL

RATTANACHAT KHIUSAKUNKAN: EARLY STAGES OF SPERMATOGENESIS  
IN THE HOODED OYSTER, *Saccostrea cucullata* (Born, 1778). ADVISORY COMMITTEE:  
SUTIN KINGTONG, Ph.D. 70 P. 2017.

In this work, early stages of spermatogenesis in the Hooded oyster *Saccostrea cucullata* was investigated. Adult oysters were collected from oyster farming area for preparing gonadal tissues for observing under both light microscope (LM) and transmission electron microscope (TEM). The results showed that the gonad was distributed in connective tissue which located between digestive glands and mantle. The gonad was composed of gonadal tubules which covered by vesicular connective tissue cells (VCT). Spermatogenesis occurred within the gonadal tubules where different stages of germ cells and intragonadal somatic cells (ISCs) were observed. Two types of spermatogonia (spg type I and spg type II) were found at the gonadal tubule walls. Primary and secondary spermatocytes, spermatid and spermatozoa were found toward the lumen, respectively. Specific characteristics of each germ cell will be discussed. Additionally, two types of intragonadal somatic cells were also found within the gonadal tubules. These included ISC type I and ISC type II. The roles of these cells in oyster are not clearly understood. Current evidences and previously reports indicate that ISC type I may play an important role as Sertoli cell in vertebrates which nourish developing sperm cell and consume the residual cytoplasm of developing sperm. For ISC type II, this cell may play a role as a food storage cell within gonadal tubules because plenty of glycogen-like granules were found in its cytoplasm.

## สารบัญ

|  | หน้า |
|--|------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....   | ง    |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....  | จ    |
| สารบัญ.....  | ฉ    |
| สารบัญตาราง.....   | ช    |
| สารบัญภาพ.....   | ฌ    |
| บทที่  |      |
| 1 บทนำ.....  | 1    |
| ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....  | 1    |
| วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....   | 2    |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย.....   | 2    |
| ขอบเขตของการวิจัย.....   | 3    |
| 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....  | 4    |
| ลักษณะทั่วไปของหอยนางรมปากจีบ.....   | 4    |
| การกระจายของหอยนางรม.....  | 7    |
| ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของหอยนางรม.....   | 8    |
| การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรม.....   | 9    |
| ฤดูปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรม.....   | 16   |
| การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม.....   | 19   |
| 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....  | 24   |
| อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี.....   | 24   |
| วิธีการ.....   | 26   |
| 4 ผลการวิจัย.....  | 34   |
| การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ.....   | 34   |
| ลักษณะเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบเมื่อเชื่อมด้วย<br>สีฮีมาทอกซิดินและอีไอซิน..... | 35   |

## สารบัญ (ต่อ)

| บทที่  | หน้า |
|--|------|
| ลักษณะเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบเมื่อข้อมด้วย<br>สีเมทิลีนบลู..... | 38   |
| โครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ.....                        | 41   |
| 5 อภิปรายและสรุปผล.....  | 53   |
| อภิปรายผล.....   | 53   |
| สรุปผลการวิจัย.....  | 59   |
| ข้อเสนอแนะ.....  | 61   |
| บรรณานุกรม.....  | 62   |
| ภาคผนวก.....   | 68   |
| ประวัติย่อของผู้วิจัย.....   | 70   |

## สารบัญตาราง

| ตารางที่  | หน้า |
|---|------|
| 2-1 การแบ่งระยะการพัฒนาระยะของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรม.....             | 16   |
| 2-2 ฤดูปล่อยเซลล์สืบพันธุ์และช่วงการเกิดลูกหอยของหอยนางรมในประเทศไทย..... | 18   |
| 4-1 ระยะการพัฒนาระยะของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ.....        | 34   |



## สารบัญภาพ

| ภาพที่   | หน้า |
|--|------|
| 2-1 ลักษณะภายในของเปลือกด้านซ้าย.....  | 5    |
| 2-2 ลักษณะภายนอกของเปลือกด้านขวา.....  | 5    |
| 2-3 โครงสร้างภายในของหอยนางรม.....   | 7    |
| 2-4 การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรม <i>Crassostrea gasar</i> .....   | 10   |
| 2-5 การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม <i>Crassostrea corteziensis</i> .....  | 13   |
| 2-6 การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม <i>Crassostrea gigas</i> .....   | 14   |
| 2-7 การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม<br><i>Crassostrea gigas</i> .....                 | 15   |
| 2-8 การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม <i>Crassostrea virginica</i> .....  | 20   |
| 4-1 ตำแหน่งของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้.....   | 35   |
| 4-2 เนื้อเยื่อภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เมื่อเชื่อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน.....                                    | 36   |
| 4-3 เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้.....   | 37   |
| 4-4 เซลล์สร้างเมือกที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้.....   | 38   |
| 4-5 เนื้อเยื่อภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เมื่อเชื่อมด้วยสีเมทิลีนบลู.....  | 40   |
| 4-6 สเปออร์มาโทโกเนียม (spermatogonium).....   | 42   |
| 4-7 สเปออร์มาโทไซตฺร์ระยะแรก (primary spermatocyte).....   | 43   |
| 4-8 สเปออร์มาโทไซตฺร์ระยะที่สอง (secondary spermatocyte).....  | 44   |
| 4-9 สเปออร์มาทิด (spermatid).....  | 45   |
| 4-10 สเปออร์มาโทซัว (spermatozoa).....   | 46   |
| 4-11 เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่ง.....  | 48   |
| 4-12 องค์ประกอบภายในไซโทพลาซึมของเซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์<br>ชนิดที่หนึ่ง.....                            | 49   |
| 4-13 เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่งที่บริเวณกลางท่อและ<br>spermiogenesis ระยะ maturation phase..... | 50   |
| 4-14 การเชื่อมติดกันของเซลล์ระหว่างเซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์<br>ชนิดที่หนึ่งกับเซลล์สืบพันธุ์.....         | 51   |
| 4-15 เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่สอง.....  | 52   |

# บทที่ 1

## บทนำ

### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

หอยนางรมเป็นหอยสองฝาชนิดหนึ่งที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นอาหารที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการสูง แนวโน้มทางการตลาดของหอยนางรมมีโอกาสขยายตัวได้อีกมาก เพราะในปัจจุบันผลผลิตหอยนางรมที่ได้จากการเก็บตามแหล่งน้ำธรรมชาติและจากแหล่งเพาะเลี้ยงยังไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ ทำให้หอยนางรมมีราคาสูงเมื่อเทียบกับหอยชนิดอื่น ๆ สำหรับการเลี้ยงหอยนางรมในประเทศไทยในเชิงพาณิชย์เป็นการอาศัยลูกหอยจากธรรมชาติเป็นหลัก ซึ่งในปัจจุบันพบว่าแหล่งเพาะเลี้ยงบางแห่งเริ่มประสบปัญหาการขาดแคลนลูกหอย เนื่องจากปริมาณลูกหอยในธรรมชาติมีจำนวนลดลงโดยมีสาเหตุมาจากสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป ส่งผลให้หอยนางรมมีอัตราการตายสูง นอกจากนี้ลูกหอยที่ได้จากการเพาะพันธุ์ยังมีปริมาณไม่เพียงพอ การคัดเลือกหรือปรับปรุงพันธุ์หอยนางรมจึงเป็นสิ่งจำเป็นและเป็นแนวทางหนึ่งที่จะช่วยในการผลิตลูกหอยนางรมเพื่อแก้ปัญหาการขาดแคลนพันธุ์หอยได้

หอยนางรมเป็นสัตว์ที่มีเพศผู้และเพศเมียแยกกันและมีการปฏิสนธิภายนอก โดยช่วงที่มีการผสมพันธุ์หอยเพศเมียจะปล่อยไข่และหอยเพศผู้จะปล่อยอสุจิออกมาผสมกันในน้ำ อวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) จะอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิล (mantle) กับต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) โดยอวัยวะสืบพันธุ์จะแผ่ล้อมรอบต่อมสร้างน้ำย่อย (Galtsoff, 1964) เมื่อสังเกตสีของแมนเทิลจะพบว่าหอยเพศผู้และเพศเมียมีสีขาวครีมเหมือนกัน จึงไม่สามารถแยกเพศของหอยนางรมได้โดยการสังเกตสี ดังนั้นการศึกษาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา (คเชนทร เถลิวัฒน์, 2544) และส่วนใหญ่เป็นการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การศึกษาในหอยนางรม *Crassostrea gigas* พบว่าไม่มีอวัยวะสืบพันธุ์ที่ชัดเจนในช่วงแรกของชีวิต เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จึงจะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) เกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ซึ่งอยู่ระหว่างแมนเทิลกับต่อมสร้างน้ำย่อย การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เกิดขึ้นภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal tubule) โดยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogenesis) เริ่มจากสเปอร์มาโทโกเนียม (spermatogonium) แบ่งตัวแบบไมโทซิส (mitosis) เพื่อเพิ่มจำนวนได้สเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก (primary spermatocyte) และแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่หนึ่ง (meiosis I) ได้สเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง

(secondary spermatocyte) และแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่สอง (meiosis II) ได้สเปออร์มาทิด (spermatid) และพัฒนาเป็นสเปออร์มาโทซัว (spermatozoa) ต่อไป (Franco, Berthelin, Goux, Sourdain, & Mathieu, 2008) นอกจากนี้ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยสองฝาหลายชนิดยังพบเซลล์ที่มีนิวเคลียสไม่กลมซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ร่างกาย (somatic cell) การศึกษาระดับจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม *C. gigas* พบเซลล์ที่เรียกว่า intragonadal somatic cells (ISCs) ที่เนื้อเยื่อบุผิว (germinal epithelium) ของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดย ISCs ที่พบในหอยนางรมชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการกำจัดของเสียที่เหลือจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Franco, Kellner, Goux, Mathieu, & Berthelin, 2011)

หอยนางรมพันธุ์เล็กหรือหอยนางรมปากจیبเป็นหอยที่พบในธรรมชาติและมีการเพาะเลี้ยงตามแถบชายฝั่งทะเลทางภาคตะวันออกของประเทศไทย เนื่องจากหอยนางรมปากจیبเป็นหอยที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ จึงมีการศึกษาทางด้านชีววิทยาของหอยชนิดนี้กันมาก แต่พบว่าข้อมูลระดับจุลกายวิภาคที่อธิบายการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระยะเริ่มต้นของหอยนางรมปากจیبยังมีน้อยมาก ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาลักษณะและโครงสร้างของเซลล์ที่พบในโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้นของหอยนางรมปากจیب โดยใช้เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการอธิบายกลไกการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยสองฝา นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการคัดเลือกพ่อพันธุ์สำหรับการผสมเทียมเพื่อผลิตลูกหอยนางรมปากจیبในระบบเพาะเลี้ยงต่อไป

### วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ที่พบในโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้นของหอยนางรมปากจیب โดยใช้เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา
2. เพื่อศึกษาโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจیب

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการอธิบายกลไกการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยสองฝา

2. เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อประยุกต์ใช้ในการพัฒนาวิธีการคัดเลือกพ่อพันธุ์หอยนางรม สำหรับการผสมเทียมเพื่อผลิตลูกหอยในระบบเพาะเลี้ยง

### **ขอบเขตของการวิจัย**

การศึกษานี้จะศึกษาในตัวอย่างหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัยที่มีขนาด 5-7 เซนติเมตร ที่เก็บจากพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรม ตำบลบางทราย อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี ในระหว่างเดือน สิงหาคมถึงตุลาคม ศึกษาลักษณะของเซลล์ที่พบในโครงสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้นของหอยนางรมปากจีบ โดยใช้เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา และศึกษา โครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ หอยนางรมปากจีบ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หอยนางรมเป็นหอยสองฝาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นอาหารทะเลที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง สารอาหารที่พบในหอยนางรม ได้แก่ โปรตีน ไกลโคเจน ไขมัน แร่ธาตุ และน้ำ เนื้อมีรสชาติอร่อย สามารถนำมารับประทานสด ๆ หรือนำไปประกอบอาหารได้หลายชนิด จึงทำให้เป็นที่นิยมบริโภคกันโดยทั่วไป หอยนางรมอาศัยอยู่ในน้ำกร่อยและในทะเล พบมากบริเวณที่มีน้ำขึ้นน้ำลงอยู่เป็นประจำ เช่น บริเวณปากแม่น้ำ ชายเกาะหรือชายฝั่งที่มีกระแสน้ำหมุนเวียนถ่ายเทตลอด หอยนางรมส่วนมากมีลักษณะภายนอกหรือลักษณะเปลือกที่แตกต่างกันไปตามสภาพแวดล้อมของแหล่งกำเนิดและวัสดุที่หอยนางรมเกาะ ดังนั้นหอยนางรมชนิดเดียวกันอาจมีรูปร่างแตกต่างกันเนื่องจากสภาพพื้นที่ที่อาศัย

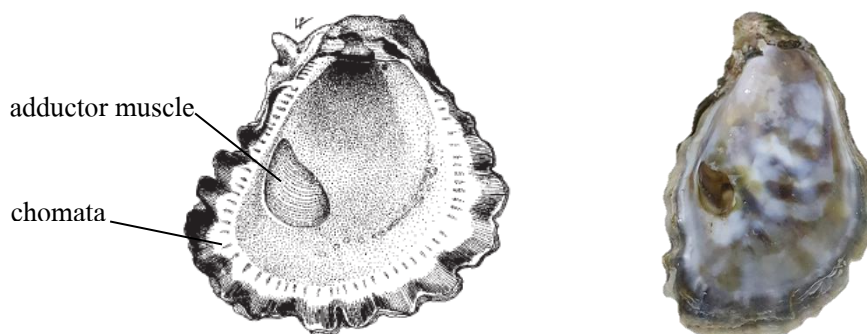
### ลักษณะทั่วไปของหอยนางรมปากจیب

หอยนางรมปากจیبมีชื่อสามัญภาษาอังกฤษว่า Hooded oyster หรือ Rock oyster และมีชื่อสามัญภาษาไทยที่เรียกแตกต่างกันไปตามแต่ละท้องถิ่น เช่น หอยนางรมเล็ก หอยเจาะ หอยอีรม หอยจ้อ หอยทีบ หอยตีเตบ หรือหอยเตล็ด (Nabhitabhata, 2009) โดยมีการจัดลำดับทางอนุกรมวิธานดังนี้

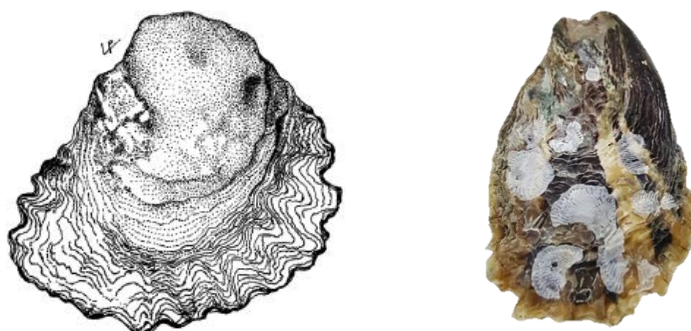
|                 |  |
|-----------------|--|
| Phylum          | Mollusca                                 |
| Class           | Bivalvia                                 |
| Subclass        | Pteriomorphia                            |
| Order           | Ostreoida                                |
| Superfamily     | Ostreoidea                               |
| Family          | Ostreidae                                |
| Subfamily       | Saccostreinae                            |
| Genus           | <i>Saccostrea</i>                        |
| Scientific Name | <i>Saccostrea cucullata</i> (Born, 1778) |

### 1. ลักษณะเปลือกของหอยนางรมปากจیب

หอยนางรมปากจیبเป็นหอยสองฝา มีเปลือกหนา และเปลือกทั้งสองด้านมีขนาดไม่เท่ากัน โดยเปลือกด้านซ้ายเป็นเปลือกที่อยู่ด้านล่างจะเว้าลึกเป็นที่รองรับลำตัวของหอย ส่วนเปลือกด้านขวาเป็นเปลือกที่อยู่ด้านบนจะมีลักษณะค่อนข้างแบนและเรียบ เปลือกสองข้างถูกยึดติดกันด้วย hinge ligament ทำให้มีลักษณะคล้ายบานพับ ส่วนยอดสุดจะโค้งมนเรียกว่า umbo ขอบเปลือกมีรอยหยักไม่สม่ำเสมอ ทำให้ขอบเปลือกมีลักษณะเป็นจีบ เปลือกอาจมีลักษณะแตกต่างกันไปเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับอิทธิพลของพื้นที่ที่หอยยึดเกาะ ความแรงและทิศทางของคลื่นที่กระทบหาดหิน และปริมาณอาหารและแร่ธาตุในน้ำทะเล รอยกล้ามเนื้อยึดเปลือก (adductor muscle) เป็นรูปไตและมีสีเข้มอยู่ก่อนไปทางด้านท้ายของเปลือก มี chomata เรียงเป็นแถวใกล้กับขอบเปลือกด้านใน เปลือกด้านในมีสีขาวครีม (ภาพที่ 2-1) เปลือกด้านนอกมีสีชาวล้ำถึงน้ำตาลอมเทาหรืออาจมีสีม่วงตามขอบเปลือกมีสีม่วงเข้ม (ภาพที่ 2-2) มีแหล่งที่อยู่อาศัยโดยเกาะตามวัสดุที่แข็ง พบทั้งเขตน้ำขึ้นน้ำลงในทะเล น้ำกร่อย และบริเวณป่าชายเลน (Poutiers, 1998)



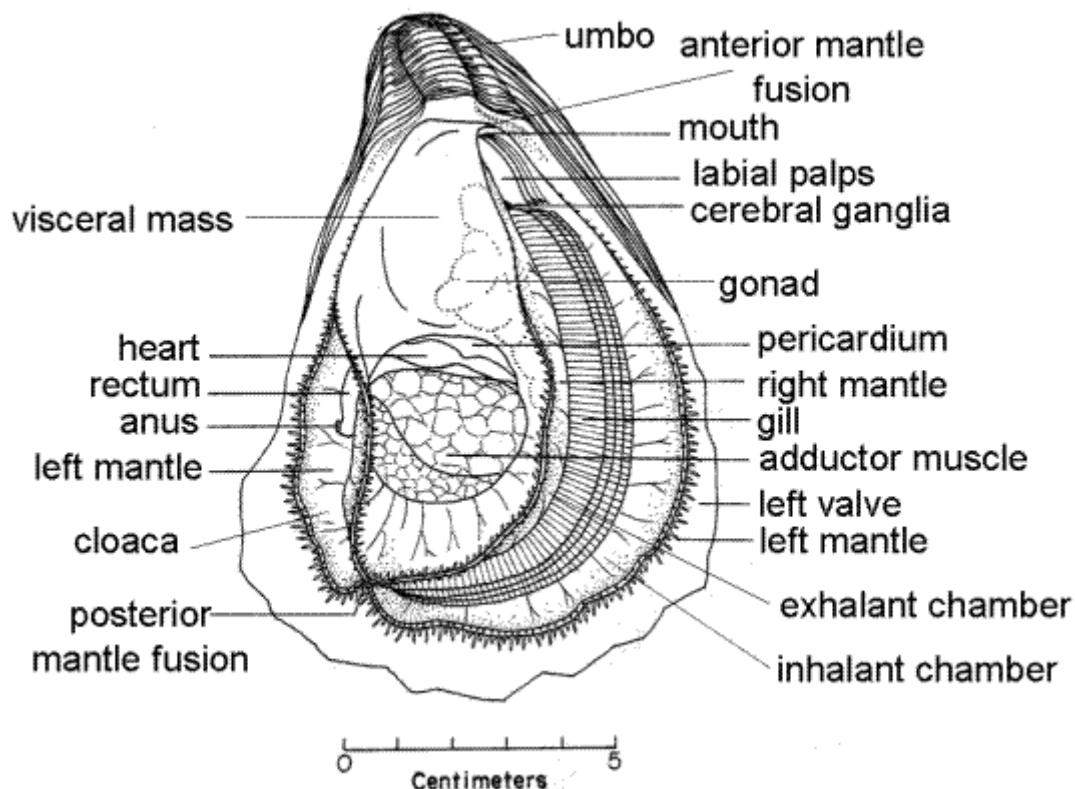
ภาพที่ 2-1 ลักษณะภายในของเปลือกด้านซ้าย



ภาพที่ 2-2 ลักษณะภายนอกของเปลือกด้านขวา

## 2. ลักษณะลำตัวของหอยนางรมปากจิบ

ภายในเปลือกประกอบด้วยลำตัวของหอย (ภาพที่ 2-3) มีชั้นแมนเทิลเป็นเนื้อเยื่อบาง ๆ ห่อหุ้มตัวทั้งสองข้างปกคลุมถึงช่องปาก (mouth) และแผ่นปาก (labial palp) ถัดจากชั้นแมนเทิลจะพบเหงือก (gill) ซึ่งเป็นอวัยวะที่ใช้กรองอาหารและหายใจมี 2 คู่ หรือ 4 แถว หอยนางรมจะกินอาหารโดยการกรองอาหารจากน้ำ โดยน้ำจะไหลเข้ามาทางช่องแมนเทิล ผ่านเหงือก และไหลออกทางช่องน้ำออก (exhalent chamber) ซึ่งเป็นบริเวณที่อยู่ถัดจากกล้ามเนื้อยึดเปลือก อาหารที่พัดพามากับน้ำจะติดอยู่บนซี่เหงือกและมีขนเส้นเล็ก ๆ (cilia) คอยโบกพัดให้อนุภาคอาหารขนาดเล็กเข้าสู่ทางเดินอาหาร ส่วนอาหารที่มีขนาดใหญ่เกินไปจะตกลงไปในช่องแมนเทิลตอนล่างและถูกขับออกทางช่องน้ำออก อนุภาคของอาหารจะถูกส่งต่อไปยังส่วนที่เรียกว่าแผ่นปาก มี 4 แผ่น ทำหน้าที่โบกพัดอาหารเข้าสู่ช่องปาก ผ่านหลอดอาหาร (oesophagus) ไปยังกระเพาะอาหาร (stomach) ซึ่งมีท่อเชื่อมต่อกับส่วนสร้างน้ำย่อย (digestive diverticular) หรือตับ (liver) ถัดมาจะเป็นส่วนของลำไส้ (intestine) มีลักษณะเป็นท่อยึดรอบกระเพาะอาหาร ส่วนปลายสุดของท่อจะเป็นทวารหนัก (anus) บริเวณลำไส้ตอนต้นจะมี crystalline style sac ซึ่งมี crystalline style อยู่ภายในทำหน้าที่ช่วยย่อยอาหาร นอกจากเหงือกจะมีหน้าที่กรองอาหารจากน้ำแล้ว ยังทำหน้าที่ในการหายใจและช่วยในการขับถ่ายของเสียออกจากร่างกายด้วย บริเวณกลางลำตัวมีกล้ามเนื้อยึดเปลือกซึ่งทำหน้าที่ปิดเปิดเปลือก ใกล้กับกล้ามเนื้อยึดเปลือกจะเป็นหัวใจซึ่งอยู่ในช่องที่เรียกว่า pericardial cavity โดยหัวใจประกอบด้วยหัวใจห้องล่าง (ventricle) 1 ห้อง และหัวใจห้องบน (auricle) 2 ห้อง เลือดที่มีออกซิเจนสูงจากเหงือกจะถูกส่งเข้าสู่หัวใจแล้วส่งต่อไปยังหลอดเลือดแดงและหลอดเลือดฝอยทั่วร่างกาย ส่วนเลือดที่มีออกซิเจนต่ำจะกลับเข้าสู่หลอดเลือดดำแล้วถูกส่งต่อไปยังเหงือกหรือไต (kidney) เพื่อปล่อยออกทางช่องน้ำออก นอกจากนี้ยังมีส่วนของระบบประสาท โดยหอยนางรมตัวเต็มวัยจะมีปมประสาทเพียง 2 คู่ อยู่ที่บริเวณช่องปากและบริเวณตำแหน่งรวมอวัยวะภายใน (visceral) ส่วนระบบสืบพันธุ์ของหอยนางรมจะเห็นเป็นเนื้อสีขาวปกคลุมกระเพาะอาหาร ประกอบด้วยอวัยวะสืบพันธุ์มีลักษณะเป็นท่อแตกแขนงแล้วรวมกันเป็นท่อเดียว เรียกว่า ช่องทางออกของเซลล์สืบพันธุ์ (promyal passage) ในฤดูผสมพันธุ์ลำตัวส่วนใหญ่ของหอยจะประกอบด้วยเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์และอาจเห็นเป็นท่อแตกแขนงบนลำตัวของหอย ส่วนนอกฤดูผสมพันธุ์เนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์จะถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่ออื่นซึ่งเรียกว่า leydig tissue ประกอบด้วยไกลโคเจน (glycogen) เป็นส่วนใหญ่ อวัยวะสืบพันธุ์จะมีขนาดเล็กและไม่สามารถตรวจสอบเพศของหอยนางรมได้ (Quayle & Newkirk, 1989) หอยนางรมปากจิบจะมีช่องทางออกของเซลล์สืบพันธุ์สู่ภายนอกลำตัว ดังนั้นจึงมีการปฏิสนธิภายนอก โดยหอยเพศผู้จะปล่อยอสุจิและหอยเพศเมียจะปล่อยไข่ แล้วเกิดการผสมพันธุ์กันใต้น้ำทะเล



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างภายในของหอยนางรม (Galtsoff, 1964)

### การกระจายของหอยนางรม

องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ (Food and Agriculture Organization of the United Nations หรือ FAO) โดย Poutiers (1998) ได้รายงานชนิดของหอยนางรมที่มีการกระจายอยู่ในเขต Western Central Pacific ดังนี้ *Alectryonella plicatula* (Gmelin, 1791) พบในเขตตะวันตกของอินโด-แปซิฟิก ตั้งแต่แอฟริกาตะวันออก ได้แก่ อ่าวเปอร์เซียถึงฟิลิปปินส์ ญี่ปุ่น ตอนใต้ของอินโดนีเซีย ตอนใต้ของเวียดนาม และมีการเพาะเลี้ยงกันมากในจีน *Crassostrea iredalei* (Faustino, 1932) เป็นสายพันธุ์ที่มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการพาณิชย์ของฟิลิปปินส์จึงพบมากที่หมู่เกาะฟิลิปปินส์ *Dendostrea folium* (Linnaeus, 1758) พบในเขตตะวันตกของอินโด-แปซิฟิก ตั้งแต่แอฟริกาตะวันออก ได้แก่ ทะเลแดงถึงเมลานีเซีย ตอนเหนือของญี่ปุ่น ตอนใต้ของรัฐควีนส์แลนด์ และมีการเพาะเลี้ยงกันมากในมาเลเซีย *Lopha cristagalli* (Linnaeus, 1758) พบในเขตตะวันตกของอินโด-แปซิฟิก ตั้งแต่แอฟริกาตะวันออก ได้แก่ มาดากัสการ์ ทะเลแดง และอ่าวเปอร์เซียถึงไมโครนีเซีย ตอนเหนือของญี่ปุ่น และตอนใต้ของอินโดนีเซีย *Planostrea pestigris* (Hanley, 1846) พบในเขตตะวันตกของอินโด-แปซิฟิก ตั้งแต่อินเดียและเกาะมอริเชียสถึงฟิลิปปินส์ ตอนเหนือของ



ทะเลเหลือง ตอนใต้ของอินโดนีเซีย และมีการเพาะเลี้ยงกันมากทางตอนใต้ของจีน *S. cucullata* (Born, 1778) เป็นสายพันธุ์ที่สำคัญเชิงพาณิชย์ของหลายประเทศในเขตมหาสมุทรแปซิฟิกตะวันตก โดยพบในเขตตะวันตกของอินโด-แปซิฟิก ทางภาคตะวันออกและภาคใต้ของแอฟริกา ได้แก่ มาดากัสการ์ ทะเลแดง และอ่าวเปอร์เซียถึงโปลินีเซียตะวันออก ตอนเหนือของญี่ปุ่น ตอนใต้ของ รัฐนิวเซาท์เวลส์และนิวซีแลนด์ นอกจากนี้ยังพบในเขตตะวันออกของมหาสมุทรแอตแลนติก ตั้งแต่แคเมอรูนถึงแองโกลา และมีการเพาะเลี้ยงในทะเลเมดิเตอร์เรเนียน

สำหรับในประเทศไทยมีการศึกษาทางสัตววิทยาของเปลือกหอยและลักษณะของตัวหอย พบหอยนางรมจำนวน 9 ชนิด กระจายอยู่ทั่วไปในเขตน้ำขึ้นน้ำลงและบริเวณที่น้ำทะเลท่วมถึงทั้งฝั่งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ได้แก่ หอยมือหมี (*Hyotissa hyotis*) พบมากทางภาคใต้ที่จังหวัดชุมพร ระนอง ภูเก็ต และกระบี่ *Parahyotissa imbricata* พบที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์และชลบุรี หอยตะไกรกรมขาว (*Crassostrea belcheri*) ส่วนมากพบทางภาคใต้ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี สงขลา ระนอง พังงา กระบี่ ตรัง หอยตะไกรกรมดำ (*C. iredalei*) พบทางภาคตะวันออกที่จังหวัดจันทบุรีและตราด ทางภาคใต้พบที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สงขลา นครศรีธรรมราช ระนอง และพังงา หอยนางรมปากจیب 3 ชนิด คือ *S. cucullata* พบในภาคตะวันออกที่จังหวัดจันทบุรีและตราด ทางภาคใต้ที่จังหวัดชุมพร ระนอง และภูเก็ต *Saccostrea forskali* ในภาคตะวันออกพบที่จังหวัดชลบุรี จันทบุรี และตราด ส่วนในภาคใต้พบที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช สงขลา ระนอง กระบี่ พังงา ตรัง และสตูล *Striostrea mytiloides* พบที่จังหวัดจันทบุรี ทางภาคใต้พบได้ที่ประจวบคีรีขันธ์ นครศรีธรรมราช ระนอง ภูเก็ต พังงา และตรัง หอยเล็บเหยี่ยว (*L. cristagalli*) ส่วนใหญ่พบทางภาคใต้ที่จังหวัดภูเก็ต กระบี่ และชุมพร หอยนางรมลอย (*D. folium*) ส่วนมากพบในภาคตะวันออกที่จังหวัดจันทบุรีและชลบุรี ส่วนหอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของไทย มีการเพาะเลี้ยงเพื่อการบริโภคกันอย่างแพร่หลาย มีอยู่ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มหอยตะไกรม ได้แก่ หอยตะไกรกรมขาว (*C. belcheri*) และหอยตะไกรกรมดำ (*C. iredalei*) และกลุ่มหอยนางรมปากจیب (*S. cucullata* และ *S. forskali*) (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546; Yoosukh & Duangdee, 1999)

### ชีววิทยาการสืบพันธุ์ของหอยนางรม

โดยทั่วไปหอยนางรมจะมีเพศแยกกัน อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเพศเมียจะทำหน้าที่ผลิตเซลล์ไข่ และอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้จะทำหน้าที่ผลิตเซลล์อสุจิ ยกเว้นบางกรณีที่พบหอยที่มีทั้งสองเพศอยู่ในตัวเดียวกัน คือ มีทั้งไข่และอสุจิหรือมีการเปลี่ยนแปลงสลับเพศไปมา ซึ่งจะขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม โดยถ้ามีอาหารอุดมสมบูรณ์พบว่าหอยเพศผู้จะเปลี่ยนเป็นเพศเมีย นอกจากนี้

อุณหภูมิก็มีส่วนในการเปลี่ยนแปลงสลับเพศของหอยนางรมด้วย การจำแนกเพศของหอยนางรมอาศัยการสังเกตจากลักษณะภายนอกไม่ได้ เนื่องจากบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์หอยเพศผู้และเพศเมียที่มีความสมบูรณ์เพศจะเห็นเป็นสีขาวครีมเหมือนกัน ดังนั้นการจำแนกเพศจึงต้องทำการเปิดเปลือกหอยออกแล้วสังเกตดูจากอวัยวะสืบพันธุ์ที่ปกคลุมอยู่รอบต่อมสร้างน้ำย่อย จากนั้นใช้วิธีการ stripping method นำเซลล์สืบพันธุ์มาตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์จึงจะระบุได้ว่าเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย ตามธรรมชาติจะพบว่าหอยนางรมมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ตลอดทั้งปี แต่จะมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ที่เห็นเด่นชัดเป็น 2 ช่วง ได้แก่ ช่วงฤดูร้อนและช่วงฤดูฝน ซึ่งในสองฤดูนี้จะพบว่าการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิและความเค็มอย่างชัดเจน โดยหอยนางรมในสกุล *Crassostrea* และ *Saccostrea* เมื่อเซลล์สืบพันธุ์พัฒนาสมบูรณ์แล้วจะถูกปล่อยออกมาสู่ภายนอกผ่านทางช่องเปิดของอวัยวะสืบพันธุ์ (genital pore) เพื่อให้มีการปฏิสนธิเกิดขึ้นในน้ำ ส่วนหอยนางรมในสกุล *Ostrea* หอยเพศเมียจะปล่อยไข่ผ่านช่องเปิดของเหงือก (gill pore) เข้าสู่ช่องน้ำเข้า (inhalant chamber) อนุจิจากหอยเพศผู้จะไหลเข้ามาทับน้ำ แล้วเกิดการปฏิสนธิขึ้น เมื่อไข่ฟักเป็นตัวอ่อนแล้วจึงปล่อยออกมาสู่ภายนอก

### การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรม

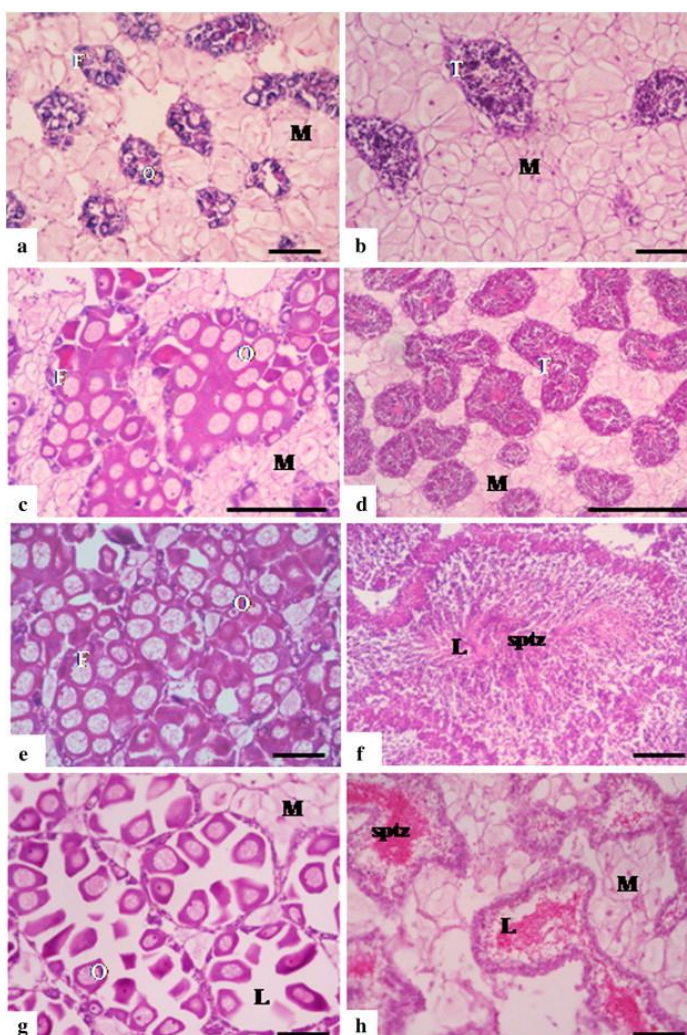
การแบ่งระยะการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมนั้น โดยทั่วไปมีหลักการเดียวกันคือ เมื่อหอยนางรมเจริญเข้าสู่ช่วงตัวเต็มวัย จะเริ่มมีการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขึ้นมาระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณแมนเทิลและต่อมสร้างน้ำย่อย โดยมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรกที่บริเวณผนังของฟอลลิเคิล (follicle) จากนั้นจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้น ตามด้วยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส 2 ครั้ง เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ และพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์เคลื่อนเข้าสู่ศูนย์กลางของฟอลลิเคิลแล้วเริ่มปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมา โดยเซลล์สืบพันธุ์อาจถูกปล่อยจนหมดหรือสลายไปหรือยังค้างอยู่ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จนถึงฤดูปล่อยเซลล์สืบพันธุ์อีกครั้งเพื่อดึงกลับมาใช้ใหม่ (คเชนทร เจริญวัฒน์ และวรรณภา กสิฤกษ์, 2540)

โดยการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมอาจแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

1. ระยะที่ 1 ระยะหลังการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์หรือระยะพัก (spent stage) เป็นช่วงหลังจากการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ อวัยวะสืบพันธุ์จะว่าง เซลล์สืบพันธุ์ที่ปล่อยออกไปไม่หมดจะถูกเซลล์เม็ดเลือดขาวทำลายหรือถูกดูดกลับกลับไปใช้ประโยชน์
2. ระยะที่ 2 ระยะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (active stage) เป็นช่วงที่เซลล์สืบพันธุ์กำลังพัฒนาขึ้นมาใหม่อีกครั้ง หลังจากมีการสะสมอาหารและพลังงาน

3. ระยะที่ 3 ระยะเซลล์สืบพันธุ์พัฒนาสมบูรณ์ (ripe stage) เป็นช่วงที่อวัยวะสืบพันธุ์เต็มไปด้วยเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาเต็มที่ แต่ยังไม่พร้อมที่จะปล่อยออกสู่ภายนอกเพื่อผสมพันธุ์

4. ระยะที่ 4 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawn stage) เป็นระยะที่เซลล์สืบพันธุ์พร้อมที่จะถูกปล่อยออกสู่ภายนอกเมื่อได้รับสิ่งเร้า เช่น การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิหรือความเค็ม (สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546)



ภาพที่ 2-4 การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรม *Crassostrea gasar*

a, c, e และ g = female gonad; b, d, f และ h = male gonad; a และ b = immature stage;

c และ d = maturation stage; e และ f = mature stage; g และ h = spawned stage;

M = mantle; F = follicles; T = spermatid tubules; L = lumen; O = oocytes;

Sptz = sperm; bar a, b, e, f, g และ h = 5  $\mu$ m; bar c และ d = 10  $\mu$ m (Paixão et al., 2013)

เช่นเดียวกับ Paixão, Ferreira, Nunes, Sizo, and Rocha (2013) ที่ศึกษาหอยนางรม *Crassostrea gasar* โดยแบ่งการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ออกเป็น 4 ระยะ (ภาพที่ 2-4) ดังนี้

1. ระยะเซลล์สืบพันธุ์ยังไม่เจริญ (immature stage)
2. ระยะเซลล์สืบพันธุ์กำลังเจริญ (maturation stage)
3. ระยะเซลล์สืบพันธุ์เจริญเต็มที่ (mature stage)
4. ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawned stage)

งานวิจัยบางงานมีแบ่งการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมออกเป็น 5 ระยะ เช่น Bertazzi and Domínguez (2005) ที่ทำการศึกษาในหอยนางรม *H. hyotis* เช่นเดียวกับ Li, Liu, Shirasu, Chen, and Jiang (2006) ที่ศึกษาหอยนางรม *Crassostrea plicatula* และ Cárdenas, Aranda, Sevilla, and Espinosa (2007) ที่ศึกษาหอยนางรม *Crassostrea virginica* โดยแบ่งระยะดังนี้

1. ระยะที่ 1 ระยะพัก (rest)
2. ระยะที่ 2 ระยะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis)
3. ระยะที่ 3 ระยะเซลล์สืบพันธุ์สุก (mature)
4. ระยะที่ 4 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawn)
5. ระยะที่ 5 ระยะหลังปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (post-spawn)

นอกจากนี้การศึกษาของ Quayle and Newkirk (1989); Ren, Marsden, Ross, and Schiel (2003) และ Díaz, Pouvreau, Villalba, and Penneç (2009) ที่ได้ศึกษาในหอยนางรม *C. gigas* เช่นเดียวกับ Jaramillo et al. (2008) ที่ศึกษาหอยนางรม *Crassostrea corteziensis* (ภาพที่ 2-5) และ Gomes, Silva, Lopes, and Melo (2014) ที่ศึกษาหอยนางรม *C. gasar* ก็แบ่งออกเป็น 5 ระยะ ดังนี้

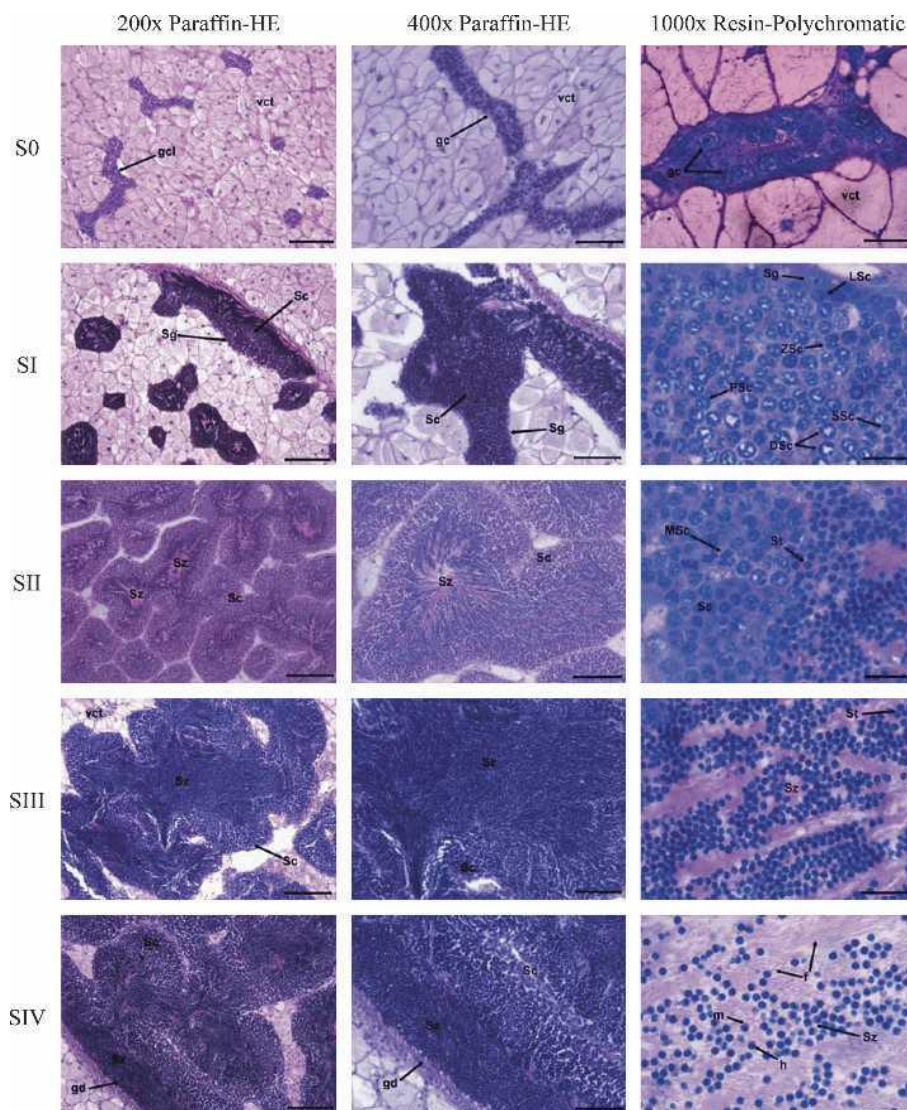
1. ระยะที่ 0 ระยะพักตัวของอวัยวะสืบพันธุ์ (undifferentiated) เป็นระยะที่ไม่สามารถระบุเพศได้ พบเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน แต่ไม่พบฟอลลิเคิล
2. ระยะที่ 1 ระยะเริ่มพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ (early gametogenesis) เป็นระยะเริ่มต้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ พบเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรกบริเวณผนังฟอลลิเคิล
3. ระยะที่ 2 ระยะพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ตอนปลาย (late gametogenesis) เป็นระยะที่ฟอลลิเคิลมีขนาดใหญ่ขึ้น พบเซลล์สืบพันธุ์ที่ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์และพัฒนาสมบูรณ์แล้วบางส่วน
4. ระยะที่ 3 ระยะเซลล์สืบพันธุ์พัฒนาสมบูรณ์ (mature) เป็นระยะที่เซลล์สืบพันธุ์เจริญเต็มที่พร้อมที่จะผสมพันธุ์
5. ระยะที่ 4 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์และการดูดกลับ (spawned) เป็นระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ฟอลลิเคิลจะมีขนาดเล็กลง แต่บางครั้งอาจมีเซลล์สืบพันธุ์เหลืออยู่ภายในฟอลลิเคิล ซึ่งเซลล์สืบพันธุ์ดังกล่าวจะกลับเข้าสู่ระยะพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์อีกครั้ง

ส่วนบางงานวิจัยก็แบ่งออกเป็น 6 ระยะ เช่น Ngo, Kang, and Choi (2002); Choi (2008); Mondol, Kim, Kim, Kang, and Choi (2012) ศึกษาหอยนางรม *C. gigas* พบว่าการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์มี 6 ระยะ (ภาพที่ 2-6) ดังนี้

1. ระยะที่ 1 ระยะที่ไม่สามารถระบุเพศได้ (sexually undifferentiated stage)
2. ระยะที่ 2 ระยะพัฒนาการตอนต้น (early development stage)
3. ระยะที่ 3 ระยะพัฒนาการตอนปลาย (late development stage)
4. ระยะที่ 4 ระยะเซลล์สืบพันธุ์สุก (ripe stage)
5. ระยะที่ 5 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawned stage)
6. ระยะที่ 6 ระยะที่อวัยวะสืบพันธุ์มีขนาดเล็กลง (gonadal tissue atrophy)

สอดคล้องกับงานวิจัยของ Dangwatanakul (1992) ที่ได้ศึกษาการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรม *C. belcheri* และการศึกษาในหอยนางรม *Striostrea prismatica* โดย Looor and Sonnenholzner (2014) เช่นเดียวกับธีรยา ช่วยสุรินทร์, ณัฐพงศ์ ต้นสาถิ และศิเว ธนาพล (2549) ศึกษาการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยตะ โกรม พบว่ามี 6 ระยะ ดังนี้

1. ระยะที่ 1 ระยะก่อนพัฒนาการ (prefollicular development) เป็นระยะเริ่มต้นภายในอวัยวะสืบพันธุ์ พบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมีลักษณะสานกัน มีเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรกจำนวนมากแทรกอยู่ และฟอลลิเคิลมีขนาดเล็ก แต่ยังไม่สามารถแยกเพศได้
2. ระยะที่ 2 ระยะเริ่มพัฒนาการ (initial development) เป็นระยะที่เซลล์สืบพันธุ์ระยะแรกมีการแบ่งเซลล์ได้เซลล์สืบพันธุ์จำนวนมาก ผนังของฟอลลิเคิลขยายกว้างขึ้น และสามารถแยกเพศได้อย่างชัดเจน
3. ระยะที่ 3 ระยะกำลังพัฒนาการ (developing) พบเซลล์สืบพันธุ์มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น
4. ระยะที่ 4 ระยะเซลล์สืบพันธุ์สุก (mature stage) เป็นระยะที่เซลล์สืบพันธุ์อยู่ในช่วงที่พร้อมจะผสมพันธุ์ ฟอลลิเคิลมีขนาดใหญ่
5. ระยะที่ 5 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์บางส่วน (partially spawned) เซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วในแต่ละฟอลลิเคิลจะถูกปล่อยออกสู่ภายนอก ส่วนเซลล์สืบพันธุ์ที่ยังเจริญไม่เต็มที่ จะมีการพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ต่อไป
6. ระยะที่ 6 ระยะหลังการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์หรือระยะพัก (spent) เป็นระยะที่เซลล์สืบพันธุ์ถูกปล่อยออกไปจากฟอลลิเคิลจนหมด ทำให้ฟอลลิเคิลว่างเปล่า หรืออาจหลงเหลือเซลล์สืบพันธุ์ 1-2 เซลล์ อยู่ในฟอลลิเคิล ผนังฟอลลิเคิลเริ่มแคบลง และมีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันขึ้นมาใหม่



ภาพที่ 2-5 การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม *Crassostrea corteziensis*

S0 = undifferentiated; SI = early gametogenesis; SII = late gametogenesis;

SIII = mature; SIV = spawned; Paraffin sections (200 X scale bar = 100  $\mu$ m และ

400 X scale bar = 50  $\mu$ m); Resin sections (1000 X scale bar = 10  $\mu$ m); DSc = primary

spermatocyte in diplotene; f = flagellum; gc = gonial cell; gcl = gonial cell layer;

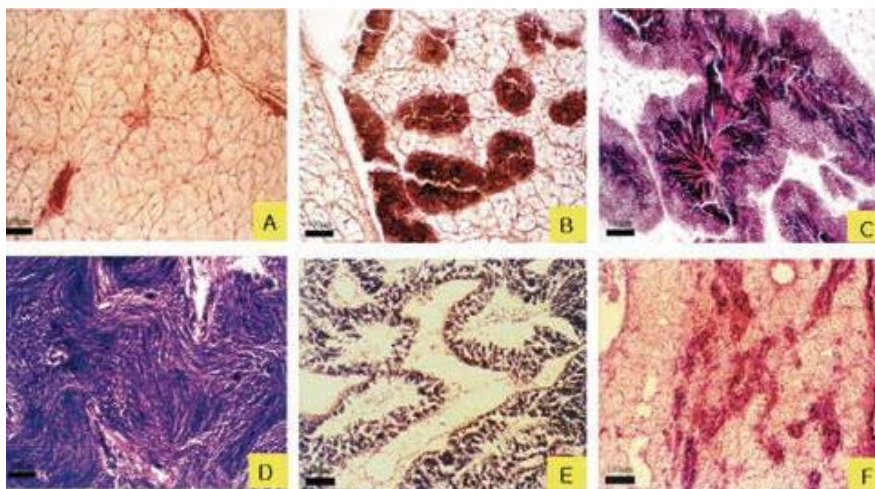
gd = gonoducts; h = head; LSc = primary spermatocyte in leptotene; m = mitochondria;

MSc = spermatocyte in metaphase; PSc = primary spermatocyte in pachytene;

Sg = spermatogonia; SSc = secondary spermatocyte; St = spermatids;

Sz = spermatozoa; vct = vesicular connective tissue; ZSc = primary spermatocyte in

zygotene (Jaramillo et al., 2008)



ภาพที่ 2-6 การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม *Crassostrea gigas*

(A) = sexually undifferentiated stage; (B) = early development stage;

(C) = late development stage; (D) = ripe stage; (E) = spawned stage;

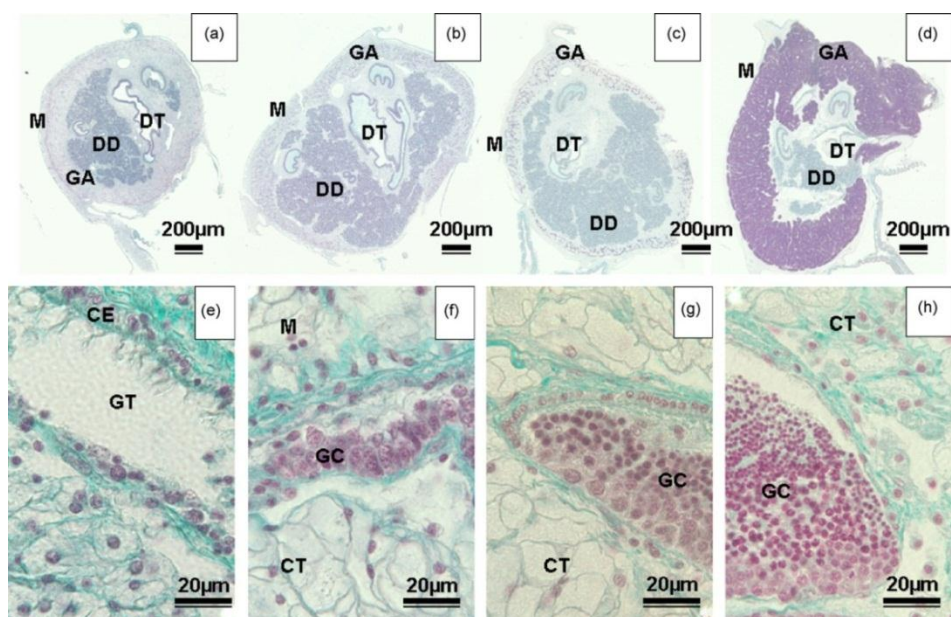
(F) = gonadal tissue atrophy (Ngo et al., 2002)

นอกจากนี้ Powell, Ormond, and Choi (1993) ได้ศึกษาการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรม *C. virginica* และการศึกษาของ Kang, Choi, Bulgakov, Kim, and Kim (2003) ในหอยนางรม *C. gigas* พบว่าแบ่งเป็น 7 ระยะ ดังนี้

1. ระยะที่ 1 ระยะที่ไม่สามารถระบุเพศได้ (undifferentiated) เนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ยังไม่พัฒนา
2. ระยะที่ 2 ระยะพัฒนาการตอนต้น (early development) เริ่มมีการสร้างฟอลลิเคิล
3. ระยะที่ 3 ระยะพัฒนาการตอนกลาง (mid-development) ฟอลลิเคิลขยายใหญ่ขึ้น เซลล์สืบพันธุ์ยังไม่เจริญเต็มที่
4. ระยะที่ 4 ระยะพัฒนาการตอนปลาย (late development) เซลล์สืบพันธุ์บางส่วนเจริญเต็มที่
5. ระยะที่ 5 ระยะพัฒนาอย่างสมบูรณ์ (fully developed) เซลล์สืบพันธุ์ส่วนใหญ่เจริญเต็มที่
6. ระยะที่ 6 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawning) เซลล์สืบพันธุ์อยู่ในท่อปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (gonoducts)
7. ระยะที่ 7 ระยะหลังปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spent) เซลล์สืบพันธุ์ในฟอลลิเคิลลดลง เหลือเซลล์สืบพันธุ์บางส่วนที่จะกลับเข้าสู่การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ครั้งต่อไป

นอกจากนี้การศึกษาของ Franco et al. (2008) ได้แบ่งการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ ในระยะเริ่มต้นของหอยนางรม *C. gigas* ออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

1. ระยะที่ 0 เป็นระยะพักตัวของอวัยวะสืบพันธุ์ เซลล์สืบพันธุ์ระยะแรกภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังไม่มีการพัฒนา จึงไม่สามารถแยกเพศของหอยนางรมได้
2. ระยะที่ 1 เป็นระยะเริ่มพัฒนาการ เซลล์สืบพันธุ์มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ทำให้พบเซลล์สืบพันธุ์จำนวนมากบริเวณขอบด้านในของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์
3. ระยะที่ 2 เป็นระยะที่ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์จำนวนมาก
4. ระยะที่ 3 เป็นระยะสุดท้ายของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ก่อนเข้าสู่ระยะเซลล์สืบพันธุ์สุก จะพบเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาเกือบสมบูรณ์และพัฒนาสมบูรณ์แล้วภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (ภาพที่ 2-7)



ภาพที่ 2-7 การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ระหว่างการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม

*Crassostrea gigas* (a)-(d) = ภาพตัดขวางของตัวหอย; (e)-(f) = ภาพเนื้อเยื่อของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง; (a) และ (e) = ระยะที่ 0;

(b) และ (f) = ระยะที่ 1; (c) และ (g) = ระยะที่ 2; (d) และ (h) = ระยะที่ 3;

M = mantle; GA = gonadal area; CT = connective tissue; DD = digestive diverticulae;

DT = digestive tract; GT = gonadal tubule; CE = ciliated epithelium; GC = germ cells

(Franco et al., 2008)



ตารางที่ 2-1 การแบ่งระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรม

| 4 ระยะ  | 5 ระยะ  | 6 ระยะ  | 7 ระยะ                                       |
|---|---|---|--|
| 1. ระยะหลังปล่อย<br>เซลล์สืบพันธุ์หรือ<br>ระยะพัก | 1. ระยะพักตัวของ<br>อวัยวะสืบพันธุ์                   | 1. ระยะก่อน<br>พัฒนาการ                           | 1. ระยะที่ไม่สามารถ<br>ระบุเพศได้            |
| 2. ระยะสร้างเซลล์<br>สืบพันธุ์                    | 2. ระยะเริ่มพัฒนา<br>เซลล์สืบพันธุ์                   | 2. ระยะเริ่มพัฒนาการ                              | 2. ระยะพัฒนาการ<br>ตอนต้น                    |
| 3. ระยะเซลล์สืบพันธุ์<br>พัฒนาสมบูรณ์             | 3. ระยะพัฒนาเซลล์<br>สืบพันธุ์ตอนปลาย                 | 3. ระยะกำลัง<br>พัฒนาการ                          | 3. ระยะพัฒนาการ<br>ตอนกลาง                   |
| 4. ระยะปล่อยเซลล์<br>สืบพันธุ์                    | 4. ระยะเซลล์สืบพันธุ์<br>พัฒนาสมบูรณ์                 | 4. ระยะเซลล์สืบพันธุ์<br>สุก                      | 4. ระยะพัฒนาการ<br>ตอนปลาย                   |
|   | 5. ระยะปล่อยเซลล์<br>สืบพันธุ์                        | 5. ระยะปล่อยเซลล์<br>สืบพันธุ์บางส่วน             | 5. ระยะพัฒนาอย่าง<br>สมบูรณ์                 |
|   |   | 6. ระยะหลังปล่อย<br>เซลล์สืบพันธุ์หรือ<br>ระยะพัก | 6. ระยะปล่อยเซลล์<br>สืบพันธุ์               |
|   |   |   | 7. ระยะหลังปล่อย<br>เซลล์สืบพันธุ์           |
| <i>C. gasar</i><br>(Paixão et al., 2013)          | <i>C. corteziensis</i><br>(Jaramillo et al.,<br>2008) | <i>C. gigas</i><br>(Ngo et al., 2002)             | <i>C. virginica</i><br>(Powell et al., 1993) |

### ฤดูปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรม

การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพ ได้แก่ อุณหภูมิ และความเค็มของน้ำ ส่วนปัจจัยทางเคมี ได้แก่ ปริมาณแพลงก์ตอนพืช และฮอร์โมน (Lorio & Malone, 1994) นอกจากนี้ช่วงเวลาในการพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ยังแตกต่างกันออกไปตามถิ่นที่อยู่อาศัยและชนิดของหอยนางรม เช่น หอยนางรม *C. gigas* ที่ชายฝั่งทางตอนใต้ของประเทศเกาหลีเริ่มมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเดือนกุมภาพันธ์ เซลล์สืบพันธุ์พัฒนาสมบูรณ์ประมาณปลายเดือนพฤษภาคมถึงต้นเดือนมิถุนายน และเริ่มมีการปล่อย

เซลล์สืบพันธุ์ครั้งแรกประมาณปลายเดือนมิถุนายนถึงต้นเดือนกรกฎาคม และครั้งที่สองประมาณ ปลายเดือนสิงหาคมถึงปลายเดือนตุลาคม และมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในเดือนกันยายน (Ngo et al., 2002; Kang et al., 2003; Mondol et al., 2012) ในขณะที่หอยนางรม *C. gigas* ที่ประเทศ ฝรั่งเศสเริ่มมีพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ตอนต้นประมาณปลายเดือนมีนาคม จากนั้นจะเข้าสู่ ระยะพัฒนาการตอนปลายในเดือนกรกฎาคม เซลล์สืบพันธุ์จะมีการพัฒนาสมบูรณ์ในเดือน สิงหาคม และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่เดือนสิงหาคมถึงปลายเดือนพฤศจิกายน (Díaz et al., 2009) ส่วนหอยนางรม *C. virginica* ทางตอนเหนือของอ่าวเม็กซิโกมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ปลาย เดือนเมษายนถึงเดือนธันวาคม และมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในเดือนกันยายนถึงตุลาคม (Hayes & Menzel, 1981) แต่หอยนางรม *C. virginica* ที่บริเวณชายฝั่งของจอร์เจียเริ่มมีการสร้าง เซลล์สืบพันธุ์ในเดือนมกราคม เซลล์สืบพันธุ์สุกในเดือนเมษายน และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ เดือนเมษายนถึงตุลาคม (Bliss & Walker, 2012) นอกจากนี้การศึกษาของ Cárdenas et al. (2007) ยัง แสดงให้เห็นว่าในเขตทะเลเดียวกันแต่ตำแหน่งที่อยู่อาศัยต่างกันก็ส่งผลต่อช่วงเวลาในการปล่อย เซลล์สืบพันธุ์ด้วย โดยที่สถานี Malagana หอยนางรม *C. virginica* มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดใน เดือนมิถุนายนถึงตุลาคม ส่วนที่สถานี Matacuay มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในเดือน กรกฎาคมถึงสิงหาคม เช่นเดียวกับการศึกษาของ Loor and Sonnenholzner (2014) ในหอยนางรม *S. prismatica* ที่ชายฝั่งตอนใต้ของประเทศเอกวาดอร์เริ่มสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในเดือนกันยายน เซลล์ สืบพันธุ์จะสุกประมาณเดือนธันวาคมถึงมกราคม และเริ่มปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในเดือนกุมภาพันธ์ จนถึงเดือนกันยายน แต่พบว่าหอยนางรมจาก 2 สถานี มีช่วงเวลาในการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุด ต่างกัน โดยที่สถานี General Villamil มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดในเดือนเมษายน ในขณะที่ สถานี Ayangué จะสูงสุดในเดือนมิถุนายน

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาช่วงเวลาในการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมชนิดอื่น ๆ ได้แก่ การศึกษาของ Dinamani (1973) พบว่าหอยนางรม *Crassostrea glomerata* บริเวณอ่าวใน ไอซ์แลนด์จะเริ่มสร้างเซลล์สืบพันธุ์ประมาณเดือนกรกฎาคมหรือเดือนสิงหาคม เซลล์สืบพันธุ์สุก ประมาณเดือนตุลาคมถึงพฤศจิกายน และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในเดือนธันวาคมถึงมีนาคม สูงสุด ประมาณเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ หอยนางรม *S. cucullata* ที่ประเทศอินเดียเริ่มมีการพัฒนา เซลล์สืบพันธุ์ระยะแรกระหว่างเดือนมกราคมถึงกุมภาพันธ์ เซลล์สืบพันธุ์สุกในเดือนพฤษภาคม และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่เดือนมิถุนายนถึงธันวาคม โดยมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สูงสุดสอง ครั้ง ครั้งแรกช่วงปลายเดือนมิถุนายนถึงต้นเดือนกันยายน และครั้งที่สองช่วงเดือนพฤศจิกายนถึง ธันวาคม (Sukumar & Joseph, 1988) หอยนางรม *H. hyotis* ที่อ่าวแคลิฟอร์เนียปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ประมาณเดือนกรกฎาคมถึงสิงหาคม (Bertazzi & Domínguez, 2005) หอยนางรม *C. plicatula* ที่

ชายฝั่งทางตะวันออกของประเทศจีน อวัยวะสืบพันธุ์เริ่มมีการพัฒนาในเดือนมีนาคม เซลล์สืบพันธุ์สุกตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงสิงหาคม และมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ประมาณเดือนกรกฎาคมถึงกันยายน จากนั้นจะเข้าสู่ระยะพักตัวของอวัยวะสืบพันธุ์ในเดือนพฤศจิกายนถึงกุมภาพันธ์ (Li et al., 2006) หอยนางรม *C. gasar* บริเวณอ่าวทางตอนเหนือของประเทศบราซิลมีการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ตอนต้นในเดือนสิงหาคม จากนั้นจึงเข้าสู่ระยะพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ตอนปลายในเดือนตุลาคม จนกระทั่งเซลล์สืบพันธุ์พัฒนาสมบูรณ์ประมาณเดือนพฤศจิกายนถึงธันวาคม และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในเดือนมกราคม (Gomes et al., 2014)

สำหรับฤดูปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมและช่วงการเกิดลูกหอยในประเทศไทยสรุปได้ดังตารางที่ 2-2 ซึ่งจะสังเกตเห็นว่าฤดูปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมในประเทศไทยจะแตกต่างกันตามแหล่งที่อยู่อาศัยและแตกต่างกันไปในแต่ละปี ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม โดยเฉพาะความเค็มของน้ำ

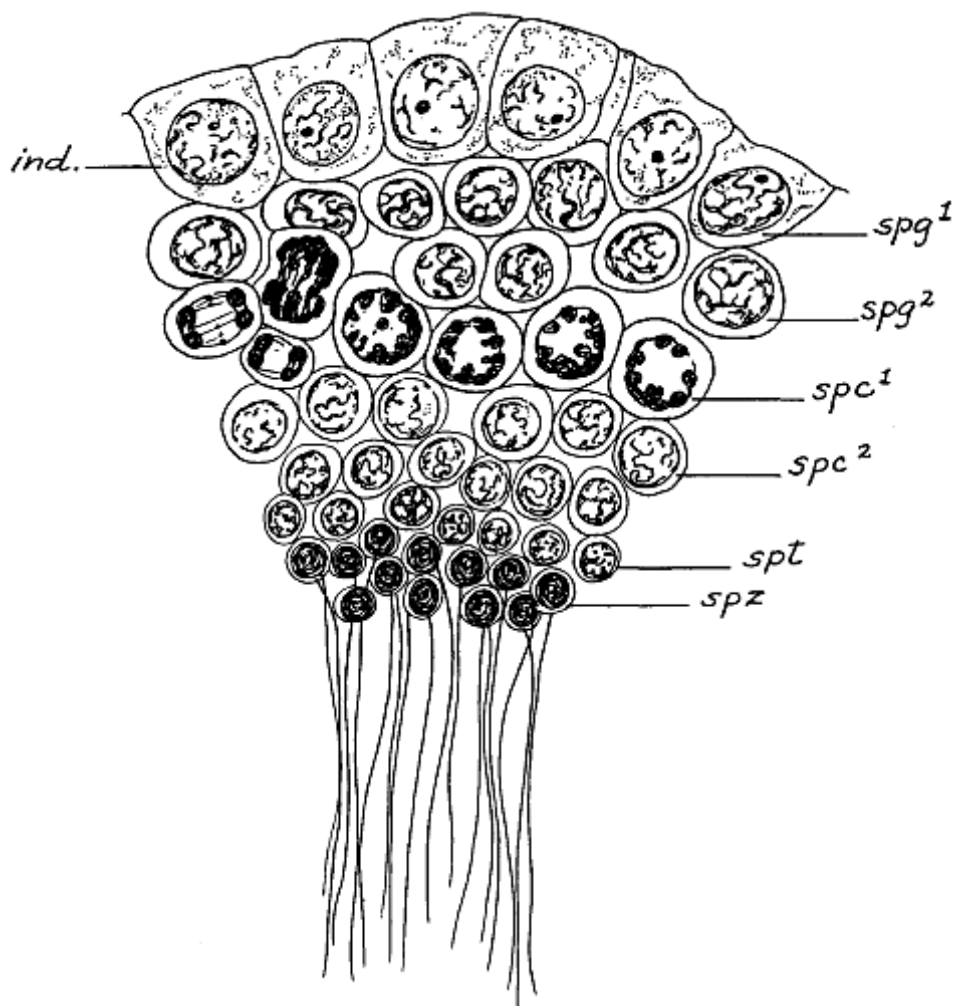
ตารางที่ 2-2 ฤดูปล่อยเซลล์สืบพันธุ์และช่วงการเกิดลูกหอยของหอยนางรมในประเทศไทย  
(สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546)

| ชนิดของหอยนางรม | ฤดูปล่อยเซลล์สืบพันธุ์และช่วงการเกิดลูกหอย   |
|-----------------|--|
| หอยนางรมปากจีบ  | ชลบุรี - มีตลอดทั้งปีแต่พบมาก 2 ช่วง คือ เมษายน-มิถุนายน และกันยายน-พฤศจิกายน<br>จันทบุรี - พบมากในช่วงสิงหาคม-พฤศจิกายน<br>ประจวบคีรีขันธ์ - พบมากที่สุดในช่วงเดือนพฤศจิกายน-ธันวาคม<br>ตรัง - พบมากในช่วงเดือนมิถุนายน-ตุลาคม<br>สตูล - พบมากในช่วงเดือนมิถุนายน-กันยายน |
| หอยตะไกร        | อ่าวไทย (สุราษฎร์ธานี จันทบุรี และตราด) พบมาก 2 ช่วง คือ เดือนกุมภาพันธ์-มีนาคม และเดือนกันยายน-ตุลาคม<br>อ่าวไทย (สงขลา) พบมากในช่วงเดือนมกราคม-เมษายน<br>ทะเลอันดามัน (ระนอง พังงา และกระบี่) พบมาก 2 ช่วง คือ เดือนพฤษภาคม-มิถุนายน และ เดือนธันวาคม-มกราคม             |

## การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยสองฝาส่วนใหญ่จะมีรูปแบบที่ไม่แตกต่างกัน โดยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะเริ่มจากการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสของเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด (primary germ cell) ที่อยู่ติดกับผนังของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้สเปอร์มาโทโกเนียมระยะแรก (primary spermatogonium) แล้วสเปอร์มาโทโกเนียมระยะแรกมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเป็นสเปอร์มาโทโกเนียมระยะที่สอง (secondary spermatogonium) จากนั้นสเปอร์มาโทโกเนียมระยะที่สองจะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้เป็นสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก ซึ่งจะแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่หนึ่งต่อไปเป็นสเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง หลังจากนั้นจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่สองไปเป็นสเปอร์มาทิด แล้วสเปอร์มาทิดจะเปลี่ยนแปลงเป็นสเปอร์มาโทซัวจนเต็มลูเมน (lumen) โดยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจากผนังของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เข้าสู่ศูนย์กลางของลูเมน จากการศึกษาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยตลับ *Meretrix meretrix* โดยกเชนทร เกลิมวัฒน์ และวรรณภา กสิฤกษ์ (2540) พบเซลล์สืบพันธุ์ 4 ระยะ ได้แก่ สเปอร์มาโทโกเนียม มีรูปร่างกลม ขนาดเล็กประมาณ  $3.44 \pm 0.73$  ไมโครเมตร อยู่รอบผนังพอลลิเคิล โครมาทิน (chromatin) กระจายอยู่ในนิวเคลียส ถัดมาเป็นสเปอร์มาโทไซต์ มีรูปร่างกลม ขนาดเล็กประมาณ  $3.17 \pm 0.59$  ไมโครเมตร ภายในนิวเคลียสมีโครมาทินอยู่อย่างหนาแน่น ถัดมาเป็นสเปอร์มาทิด มีขนาดเล็กประมาณ  $2.67 \pm 0.66$  ไมโครเมตร โครมาทินรวมกันอย่างหนาแน่นในนิวเคลียส และด้านในสุดเป็นสเปอร์มาโทซัว มีขนาดเล็กประมาณ  $1.39 \pm 0.35$  ไมโครเมตร ส่วนหัวเป็นนิวเคลียสมีโครมาทินอยู่รวมกันหนาแน่น ส่วนหางหันเข้าสู่ศูนย์กลางของพอลลิเคิล เช่นเดียวกับชุดินันท์ ศรีสัมพันธ์ (2544) พบว่าอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยแครง (*Anadara granosa* L.) อยู่ล้อมรอบทางเดินอาหาร ภายในพอลลิเคิลพบสเปอร์มาโทโกเนียม มีรูปร่างกลมขนาดเล็ก ติดกันเป็นสเปอร์มาโทไซต์ มีขนาดเล็ก นิวเคลียสมีสีเข้ม ถัดมาเป็นสเปอร์มาทิด มีขนาดเล็กและนิวเคลียสมีสีเข้ม และด้านในสุดมีสเปอร์มาโทซัวจำนวนมากอยู่ตรงกลางพอลลิเคิล สอดคล้องกับสุขใจ รัตนบุตร และพวงพกา บำรุงราษฎร์ (2551) ที่ศึกษาพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยเสียบ *Donax faba* (Gmelin, 1971) พบว่าแบ่งออกเป็น 4 ระยะ ได้แก่ สเปอร์มาโทโกเนียม พบมากบริเวณผนังพอลลิเคิล มีรูปร่างกลม ขนาด  $3.25 \pm 0.50$  ไมโครเมตร มีโครมาทินกระจายอยู่ในนิวเคลียส สเปอร์มาโทไซต์พบถัดจากสเปอร์มาโทโกเนียมเข้ามาด้านในพอลลิเคิล มีรูปร่างกลม ขนาด  $3.02 \pm 0.40$  ไมโครเมตร โครมาทินรวมเป็นกลุ่มหนาแน่น สเปอร์มาทิดอยู่ถัดจากสเปอร์มาโทไซต์ มีขนาดเล็กประมาณ  $1.79 \pm 0.5$  ไมโครเมตร เส้นใยโครมาทินรวมกันหนาแน่นมาก และสเปอร์มาโทซัวอยู่กลางพอลลิเคิลใกล้กับลูเมน มีขนาดเล็ก และมีแฟลเจลลา (flagella) นอกจากนี้สิริธร กิ่งเส็ง และชัชวาล หมั่นโพธิ์ (2555) ได้ศึกษาอวัยวะ

สืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ *Perna viridis* (Linnaeus, 1758) พบว่าในช่วงที่อวัยวะสืบพันธุ์กำลังพัฒนา จะพบสเปิร์มาโทไซค์ระยะแรกและระยะที่สอง และในช่วงที่อวัยวะสืบพันธุ์เจริญเต็มที่ จะพบสเปิร์มาโทซัวจำนวนมาก



ภาพที่ 2-8 การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม *Crassostrea virginica*

ind= indifferent cells; spg<sup>1</sup> = primary spermatogonia; spg<sup>2</sup> = secondary spermatogonia; spc<sup>1</sup> = primary spermatocytes; spc<sup>2</sup> = secondary spermatocytes; spt = spermatids; spz = mature spermatozoa (Galtsoff, 1964)

สำหรับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมนั้น ในช่วงต้นชีวิตของหอยนางรมจะไม่มี การพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์ จนกระทั่งเข้าสู่ช่วงเจริญพันธุ์จึงมีอวัยวะสืบพันธุ์เกิดขึ้นที่บริเวณ

ระหว่างเมมเทิลกับต่อมสร้างน้ำย่อย โดยเมื่อเริ่มมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดจะไม่สามารถระบุเพศได้ ในเพศผู้เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิดที่บริเวณผนังของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะแบ่งตัวแบบไมโทซิสได้สเปอร์มาโทโกเนียมระยะแรกและแบ่งตัวแบบไมโทซิสต่อไปเป็นสเปอร์มาโทโกเนียมระยะที่สอง แล้วแบ่งตัวแบบไมโทซิสได้สเปอร์มาโทไซค์ระยะแรก จากนั้นจะมีการแบ่งตัวแบบไมโอซิสขั้นแรกเป็นสเปอร์มาโทไซค์ระยะที่สอง แล้วแบ่งตัวแบบไมโอซิสขั้นสุดท้ายได้สเปอร์มาทิด และพัฒนาไปเป็นสเปอร์มาโทซัว ซึ่งมีแฟลเจลลาหันเข้าสู่ด้านลูเมน (ภาพที่ 2-8) (Coe, 1931; Galtsoff, 1964)

มีงานวิจัยจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ เช่น การศึกษาของ Dinamani (1973) พบว่าการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม *C. glomerata* เริ่มจากบริเวณผนังพอลลิเคิลพบสเปอร์มาโทโกเนียม มีขนาด 5 ไมโครเมตร ภายในนิวเคลียสมีโครมาทินและนิวคลีโอลัส (nucleolus) ถัดไปเป็นสเปอร์มาโทไซค์ระยะแรก มีรูปร่างกลมขนาด 3-4 ไมโครเมตร โครมาทินกระจายอยู่ในนิวเคลียสและไม่พบนิวคลีโอลัส ถัดมาเป็นสเปอร์มาโทไซค์ระยะที่สอง มีขนาดเล็กกว่า 3 ไมโครเมตร นิวเคลียสมีสีเข้ม ถัดเข้ามาเป็นสเปอร์มาทิด นิวเคลียสหนาแน่นขึ้น มีขนาดประมาณ 1 ไมโครเมตร บริเวณกลางพอลลิเคิลจะเป็นสเปอร์มาโทซัว ผนังด้านที่มีแฟลเจลลาเข้าสู่ลูเมน ส่วนหัวมีขนาด 1 ไมโครเมตร ส่วนหางยาว 30-40 ไมโครเมตร และพบอะโครโซม (acrosome) ที่ส่วนหัว ส่วนงานวิจัยของ Panasophonkul (2000) พบว่าการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม *S. forskali* สามารถแบ่งระยะโดยอาศัยความแตกต่างของโครมาทินและขนาดของนิวเคลียสและเซลล์ออกเป็น 15 ระยะ คือ สเปอร์มาโทโกเนียม 2 ระยะ สเปอร์มาโทไซค์ระยะแรก 6 ระยะ ได้แก่ เลปโททีน (leptotene) ไชโกทีน (zygotene) แพคทีน (pachytene) ดิพลอทีน (diplotene) ไดอะไคเนซิส (diakinesis) และเมทาเฟส (metaphase) สเปอร์มาโทไซค์ระยะที่สอง สเปอร์มาทิด 4 ระยะ ได้แก่ สเปอร์มาทิดระยะที่หนึ่ง (spermatid I), สเปอร์มาทิดระยะที่สอง (spermatid II), สเปอร์มาทิดระยะที่สาม (spermatid III) และสเปอร์มาทิดระยะที่สี่ (spermatid IV) และสเปอร์มาโทซัว 2 ระยะ ได้แก่ สเปอร์มาโทซัวที่ยังไม่สมบูรณ์ (immature spermatozoa) และสเปอร์มาโทซัวที่สมบูรณ์แล้ว (mature spermatozoa) ส่วนรายงานของธีรยา ช่วยสุรินทร์ และคณะ (2549) ที่ศึกษาหอยตะโกรม กล่าวว่าในระยะกำลังพัฒนาการจะพบเซลล์สืบพันธุ์ระยะสเปอร์มาโทไซค์ สเปอร์มาทิด และสเปอร์มาโทซัว ภายในอวัยวะสืบพันธุ์ เมื่อถึงระยะเซลล์สืบพันธุ์สุก จะพบสเปอร์มาโทซัวจำนวนมากมารวมกันตรงกลางพอลลิเคิล สอดคล้องกับการศึกษาในหอยนางรม *C. gasar* โดย Paixão et al. (2013)

นอกจากนี้ Franco et al. (2008) ได้ศึกษาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระยะเริ่มต้นของหอยนางรม *C. gigas* พบว่าเซลล์สืบพันธุ์มีการพัฒนา 4 ระยะ คือ ระยะที่ 0 เซลล์สืบพันธุ์ต้นกำเนิด

ยังไม่มีการพัฒนา จึงไม่สามารถแยกเพศได้ จากนั้นจะเข้าสู่ระยะที่ 1 สเปออร์มาโทโกเนียมจะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ที่บริเวณขอบด้านในของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ สเปออร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่ง (spermatogonium type I) นิวเคลียสค่อนข้างจางมีขนาด  $5.5 \pm 0.5$  ไมโครเมตร และสเปออร์มาโทโกเนียมชนิดที่สอง (spermatogonium type II) นิวเคลียสสีเข้มมีขนาด  $4.3 \pm 0.3$  ไมโครเมตร ต่อมาเป็นระยะที่ 2 สเปออร์มาโทไซต์ระยะแรกแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสได้สเปออร์มาโทไซต์ระยะที่สอง พบสเปออร์มาโทไซต์ 2 ระยะ ได้แก่ แพลทิน นิวเคลียสมีขนาด  $3.6 \pm 0.3$  ไมโครเมตร และดิโพลทิน นิวเคลียสมีขนาด  $3.4 \pm 0.3$  ไมโครเมตร และระยะที่ 3 เป็นช่วงสุดท้ายของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้นก่อนเข้าสู่ระยะเซลล์สืบพันธุ์สุก จะพบสเปออร์มาทิดมีนิวเคลียสรวมตัวกันหนาแน่น ขนาด  $1.6 \pm 0.2$  ไมโครเมตร และพบสเปออร์มาโทซัวที่สมบูรณ์แล้วจำนวนน้อยในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และเมื่อศึกษาโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้พบว่าท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นเดียว มีเซลล์กล้ามเนื้อลักษณะแบน ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์นอกจากจะพบเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต่าง ๆ แล้วยังพบเซลล์ที่เรียกว่า intragonadal somatic cells (ISCs) แทรกอยู่ด้วย ซึ่งเซลล์นี้มีลักษณะแตกต่างจากเซลล์สืบพันธุ์เนื่องจากมีนิวเคลียสที่ไม่กลมและเป็นลักษณะของเซลล์ร่างกายจากการศึกษาโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของ ISCs พบว่าในไซโทพลาซึม (cytoplasm) ของ ISCs ประกอบด้วยฟาโกไลโซโซม (phagolysosome) จำนวนมาก นอกจากนั้นยังพบหยดน้ำมัน (lipid droplet) และไมโทคอนเดรีย (mitochondria) อีกด้วย แสดงให้เห็นว่า ISCs มีบทบาทในการกำจัดส่วนที่เหลือจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Franco et al., 2011) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังจะมีเซลล์ร่างกายที่พบในอวัยวะของสัตว์เพศผู้ ได้แก่ เซลล์เซอโทไล (Sertoli cell) มีนิวเคลียสและนิวคลีโอลัส ส่วนในไซโทพลาซึมประกอบด้วยเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบเรียบ (smooth endoplasmic reticulum; SER) เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ (rough endoplasmic reticulum; RER) กอลจิก คอมเพล็กซ์ (Golgi complex) ไมโทคอนเดรีย และไลโซโซม (lysosome) โดยเซลล์เซอโทไลทำหน้าที่กำจัดของเสีย ปกป้องเซลล์สืบพันธุ์ หลังของเหลวที่ช่วยในการเคลื่อนที่ของอสุจิ และย่อยสลายส่วนที่เหลือจากการสร้างอสุจิ และเซลล์เลย์ดีค (Leydig cell) มีนิวเคลียสและนิวคลีโอลัส ส่วนในไซโทพลาซึมประกอบด้วยเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบเรียบ กอลจิก คอมเพล็กซ์ ไมโทคอนเดรีย และหยดน้ำมันเล็ก ๆ โดยเซลล์เลย์ดีคทำหน้าที่สร้างฮอร์โมน เทสโทสเตอโรน (กนกธร ปิยธำรงรัตน์, 2546; วณิดา ไตรพาณิชย์กุล, 2550) ในสัตว์ชนิดอื่น ๆ ก็มีการศึกษาเซลล์ร่างกายที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เช่น Chung (2008) ได้ทำการศึกษาโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลาตีน *Boleophthalmus pectinirostris* พบว่าเซลล์เซอโทไลส่วนใหญ่ประกอบด้วยไกลโคเจนหรือไขมันหยดเล็ก ๆ มีหน้าที่กำจัดสเปออร์มาทิดที่ไม่

สามารถพัฒนาไปเป็นสเปิร์มาโทซัวได้ ส่วนเซลล์เลย์ดิกประกอบด้วยนิวเคลียส ไมโทคอนเดรีย และเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบเรียบ แสดงว่าเซลล์เลย์ดิกทำหน้าที่สังเคราะห์ฮอร์โมนเพศผู้ นอกจากนี้ Riesgo, Maldonado, and Durfort (2008) ได้ทำการศึกษาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของ ฟองน้ำ (demosponge) 2 ชนิด ได้แก่ *Raspaciona aculeata* และ *Petrosia ficiformis* พบว่ามีเซลล์ร่างกายใน spermatic cyst โดยใน *R. aculeata* พบ amoeboid somatic cell ที่มีขนาดใหญ่ใน สเปิร์มาโทไซตฺ์ระยะที่สอง มีหน้าที่ทำลายเซลล์สืบพันธุ์ที่ผิดปกติ ควบคุมสเปิร์มาโทไซตฺ์ให้มี จำนวนที่เหมาะสม และจัดหาพลังงานสำรองในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยการ กำจัดสเปิร์มาโทไซตฺ์ ส่วนใน *P. ficiformis* พบเซลล์ร่างกายที่มีลักษณะกลม ทำหน้าที่ทำลายเซลล์ สืบพันธุ์ที่เหลือใน spermatic cyst หลังจากการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ส่วนในหอยสองฝาที่มีงานวิจัย เกี่ยวกับเซลล์เซอโทไลด์ ได้แก่ Erkan and Sousa (2002) ได้ทำการศึกษาเปรียบเทียบการสร้างเซลล์ สืบพันธุ์ในระดับจุลกายวิภาคของหอยสองฝาในวงศ์ Veneridae ได้แก่ *Pitar rudis* และ *Chamelea gallina* พบว่าในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยสองฝาทั้งสองชนิดมีเซลล์เซอโทไลด์ประกอบด้วย ไกลโคเจน หยดน้ำมัน และฟาโกไลโซโซม



## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### อุปกรณ์ เครื่องมือ และสารเคมี

##### 1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ

- 1.1 มีดสำหรับเปิดเปลือกหอยนางรม
- 1.2 เข็มเย็บเข็ญ
- 1.3 มีดผ่าตัด
- 1.4 กรรไกรผ่าตัด
- 1.5 ปากคีบ
- 1.6 ภาชนะผ่าตัด
- 1.7 ขวดเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ
- 1.8 ฉลากสำหรับเขียนปิดที่ขวดเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ
- 1.9 กาน้ำร้อน
- 1.10 บีกเกอร์
- 1.11 ทรายสำหรับทำกระทง (embedding mold)
- 1.12 ตะเกียงแอลกอฮอล์
- 1.13 อ่างใส่น้ำเย็น
- 1.14 ถุงซิปล็อก (zip lock bag)
- 1.15 มีดคัตเตอร์
- 1.16 มีดโกน
- 1.17 พู่กัน
- 1.18 กระจกสไลด์
- 1.19 กระจกปิดสไลด์
- 1.20 หลอดหยด
- 1.21 ภาชนะย้อมสี (coplin jar)
- 1.22 กล่องสไลด์
- 1.23 ตู้เย็น
- 1.24 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

- 1.25 ตู้ดูดไอสารเคมี (hood)
  - 1.26 เครื่องให้ความร้อน (hot plate)
  - 1.27 เครื่องไมโครโทม (microtome)
  - 1.28 เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)
  - 1.29 เครื่องอัลตราไมโครโทม (ultramicrotome)
- 2. สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อ**
- 2.1 น้ำกลั่น
  - 2.2 สารละลายบูแองส์ (Bouin's fluid)
  - 2.3 เอทานอล 70% (70% ethanol)
  - 2.4 เอทานอล 80% (80% ethanol)
  - 2.5 เอทานอล 90% (90% ethanol)
  - 2.6 เอทานอล 95% (95% ethanol)
  - 2.7 เอทานอล 100% (absolute ethanol)
  - 2.8 ไดออกเซน (dioxane)
  - 2.9 ไซลีน (xylene)
  - 2.10 พาราพลาสติก (paraplast)
  - 2.11 เจลาติน (gelatin)
  - 2.12 2.5% glutaraldehyde
  - 2.13 0.1 M phosphate buffered saline
  - 2.14 1% osmium tetroxide
  - 2.15 propylene oxide
  - 2.16 araldite 502 resin
  - 2.17 saturated uranyl acetate
  - 2.18 เมทานอล 70% (70% methanol)
  - 2.19 0.1% lead citrate
  - 2.20 สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (hematoxylin)
  - 2.21 สีย้อมอีโอซิน (eosin)
  - 2.22 สีย้อมเมทิลีนบลู (methylene blue)
  - 2.23 บิวทานอล (butanol)
  - 2.24 Permount

2.25 นำยาทาเล็บแบบใส

### 3. เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อ

3.1 กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.2 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

3.3 กล้อง Optikam B3 และ โปรแกรม Optika Vision Lite

## วิธีการ

### 1. การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ

สุ่มเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจับตัวเต็มวัยที่มีขนาด 5-7 เซนติเมตร จำนวน 30 ตัว จากพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรม ตำบลบางทราย อำเภอมือง จังหวัดชลบุรี ในระหว่างเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม ทำการเปิดเปลือก แล้วตรวจเพศหอยนางรมด้วยวิธี stripping method โดยใช้เข็มเย็บที่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ นำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อโดยตัดส่วนของอวัยวะสืบพันธุ์ แบ่งเนื้อเยื่อออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่หนึ่งเพื่อเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน และกลุ่มที่สองเพื่อเตรียมตัวอย่างในบล็อกพลาสติก

### 2. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน

**2.1 การคงสภาพเนื้อเยื่อ (fixation)** นำเนื้อเยื่อส่วนอวัยวะสืบพันธุ์ใส่ในขวดเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่มีสารละลายบูแองส์ แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

**2.2 การล้างเนื้อเยื่อ (washing)** นำเนื้อเยื่อมาล้างสารละลายบูแองส์ออก โดยแช่ในเอทานอล 70% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำหลาย ๆ ครั้ง จนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสีเหลืองของสารละลายบูแองส์

**2.3 การขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration)** นำเนื้อเยื่อมาแช่ในเอทานอลความเข้มข้นต่ำไปความเข้มข้นสูง โดยเริ่มจากเอทานอล 80%, 90% และ 95% ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำเนื้อเยื่อไปแช่ในเอทานอล 100% 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง 30 นาที

**2.4 การทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing)** นำเนื้อเยื่อมาแช่ในไดออกเซน 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 แช่ครั้งละ 1 ชั่วโมง ส่วนครั้งที่ 3 แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

**2.5 การแทรกซึมของพาราฟิน (infiltration)** นำพาราพลาสติกใส่ในบีกเกอร์เพื่อทำให้หลอมเหลวในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 58-60 องศาเซลเซียส แล้วนำเนื้อเยื่อมาแช่ในพาราพลาสติกที่หลอมเหลว 3 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 และครั้งที่ 2 แช่ครั้งละ 1 ชั่วโมง ส่วนครั้งที่ 3 แช่ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง

**2.6 การฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding)** นำพาราพลาสติกใส่ในกาต้มน้ำสแตนเลสเพื่อทำให้หลอมเหลวในตู้อบลมร้อนที่อุณหภูมิ 58-60 องศาเซลเซียส แล้วตัดกระดาษพับเป็น

กระทง จากนั้นนำกระทงกระดาษวางบนเครื่องให้ความร้อน เทพารพลาสต์ที่หลอมเหลวลงไป ในกระทงประมาณ 1 ใน 4 ส่วนของกระทง ใช้ปากกิปีบเนื้อเยื่อแล้วค่อย ๆ วางลงในกระทง ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศ แล้วเทพารพลาสต์ที่หลอมเหลวให้ท่วมเนื้อเยื่อ หากมีฟองอากาศเกิดขึ้นให้ใช้เข็มจิ้มเชื้อลนไฟแล้วไล่ฟองอากาศจนหมด จากนั้นทำให้พาราพลาสต์ค่อย ๆ เย็นลง โดยนำกระทงไปแช่ในอ่างน้ำเย็น เมื่อพาราพลาสต์แข็งตัวทั่วแล้ว ให้แกะบล็อกที่ได้ออกจากกระทง จากนั้นเก็บบล็อกในถุงซิปล็อก

**2.7 การตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง (sectioning)** ใช้มีดกัดเตอร์ตัดแต่งผิวหน้าของบล็อกโดยค่อย ๆ ปาดพาราพลาสต์ที่ผิวหน้าของบล็อกออกจนเกือบถึงเนื้อเยื่อ แล้วตัดแต่งด้านข้างของบล็อกเป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมู เพื่อให้การตัดเนื้อเยื่อเป็นแผ่นบางแล้วแผ่นเนื้อเยื่อแต่ละแผ่นจะติดกันเป็นแถบยาว ส่วนอีกด้านของแผ่นเนื้อเยื่อจะเห็นรอยหยักเพื่อให้ทราบขอบเขตของเนื้อเยื่อแต่ละแผ่น จากนั้นติดบล็อกกับแท่งไม้ ทำการตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางโดยนำใบมีด (microtome knife) มาใส่ที่ตัวจับใบมีด (knife holder) และนำบล็อกมาใส่ที่ตัวจับบล็อก (block holder) หันหน้าบล็อกโดยให้ด้านคู่ขนานด้านที่สั้นกว่าเป็นด้านที่สัมผัสกับใบมีด จากนั้นเริ่มตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง โดยค่อย ๆ เลื่อนหน้าบล็อกเข้าหาใบมีด พร้อมกับหมุนวงล้อของเครื่อง ไมโครโทม จะสังเกตเห็นว่าใบมีดเริ่มตัดผิวหน้าของบล็อกออกมาเป็นแผ่นบาง ๆ ให้หมุนวงล้อของเครื่อง ไมโครโทมเพื่อตัดผิวหน้าของบล็อกไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งสังเกตเห็นว่าตัดเนื้อเยื่อเป็นแผ่นบางได้เต็มแผ่นและเห็นเนื้อเยื่อทุกส่วน จากนั้นปรับความหนาเป็น 6 ไมโครเมตร แล้วหมุนวงล้อของเครื่อง ไมโครโทมเพื่อตัดเนื้อเยื่อด้วยความเร็วสม่ำเสมอ จะได้เนื้อเยื่อแผ่นบางติดกันเป็นแถบยาว โดยขณะตัดเนื้อเยื่อให้ใช้ฟู่กันประคองเนื้อเยื่อแผ่นบางไม่ให้สัมผัสกับใบมีดด้วย เมื่อได้แถบเนื้อเยื่อที่มีความยาวตามต้องการแล้วให้หยุดหมุนวงล้อของเครื่อง ไมโครโทมและล็อกวงล้อของเครื่อง ไมโครโทมเพื่อป้องกันไม่ให้บล็อกเคลื่อนมาสัมผัสกับใบมีด จากนั้นใช้ฟู่กันอีกอันหนึ่งช่วยประคองแถบเนื้อเยื่อเพื่อนำไปวางบนกระดาษ ใช้มีดโกนตัดแผ่นเนื้อเยื่อที่หนาเกินทิ้งไป แล้วกำจัดเนื้อเยื่อส่วนที่ไม่ต้องการออกด้วยไซลีน

**2.8 การติดเนื้อเยื่อแผ่นบางบนสไลด์ (affix)** ทำการติดเนื้อเยื่อแผ่นบางบนสไลด์โดยเริ่มจากการล้างสไลด์ด้วยเอทานอล 70% ให้สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้ง ใช้มีดโกนตัดเนื้อเยื่อแผ่นบางประมาณ 2-3 แผ่น นำสไลด์มาวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ หยดสารละลายเจลาติน 1% ลงบนสไลด์ประมาณ 1-2 หยด จากนั้นนำเนื้อเยื่อแผ่นบางวางบนสไลด์ดังกล่าว โดยระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ วางสไลด์บนเครื่องอุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## 2.9 การย้อมสี (staining)

**2.9.1 การขจัดพาราฟิน (deparaffinization)** โดยจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

**2.9.2 การเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (hydration)** โดยจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในเอทานอล 100% เป็นเวลา 5 นาที แล้วจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในเอทานอล 95%, 80% และ 70% ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ตามลำดับ จากนั้นจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที

**2.9.3 การย้อมสีครั้งแรก (primary stain)** โดยจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อในสีมาทอกซิลินเป็นเวลา 1 นาที ซึ่งเวลาที่ใช้ในการย้อมด้วยสีมาทอกซิลินจะขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียมสไลด์ในแต่ละครั้ง โดยจะต้องทำการทดสอบการติดสีก่อนนำมาใช้ย้อมจริง

**2.9.4 การล้างสีส่วนเกิน (differentiation)** เป็นการล้างสไลด์เนื้อเยื่อโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านตลอด เพื่อให้เห็นความแตกต่างระหว่างส่วนประกอบของเนื้อเยื่อที่ติดสีและไม่ติดสี

**2.9.5 การปรับเนื้อเยื่อให้มีสภาพเป็นกลาง (neutralization)** โดยการจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในเอทานอล 70% เป็นเวลา 5 นาที

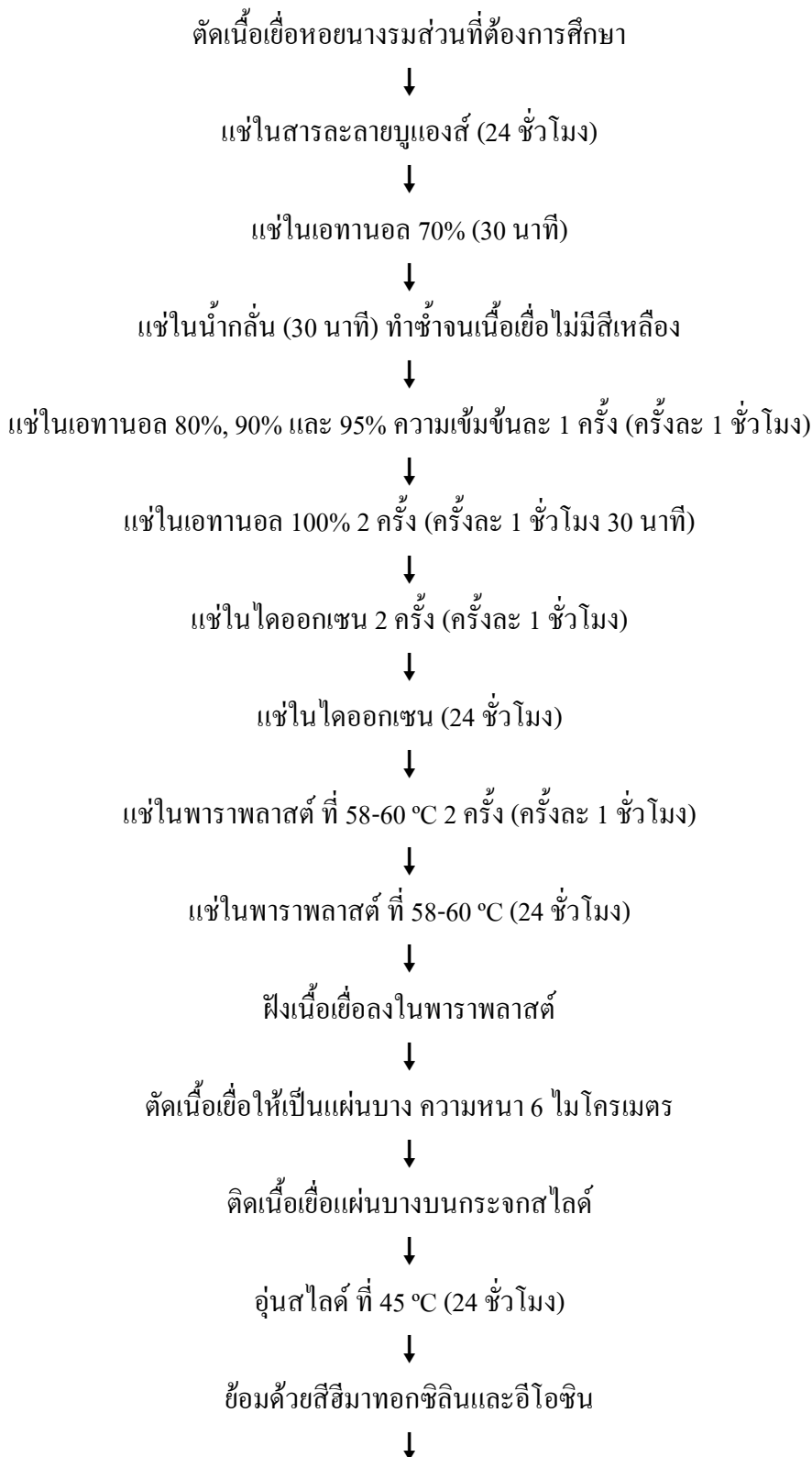
**2.9.6 การย้อมสีซ้ำ (counterstain)** โดยจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในอีโอซินเป็นเวลา 30 วินาที ซึ่งเวลาที่ใช้ในการย้อมด้วยอีโอซินจะขึ้นอยู่กับวิธีการเตรียมสไลด์ในแต่ละครั้ง โดยจะต้องทำการทดสอบการติดสีก่อนนำมาใช้ย้อมจริง

**2.9.7 การขจัดน้ำ (dehydration)** โดยจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในเอทานอล 95% แล้วนำขึ้นมาอย่างรวดเร็ว จากนั้นจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในเอทานอล 100% เป็นเวลา 5 นาที

**2.9.8 การขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing)** โดยจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในบิวทานอล 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในไซลีน 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที

**2.10 การปิดกระจกปิดสไลด์ (mounting)** ใช้ปากคีบคีบสไลด์ขึ้นจากไซลีน แล้วหยด permount ช้าง ๆ เนื้อเยื่อ จากนั้นวางกระจกปิดสไลด์ทำมุม 45° กับสไลด์โดยให้ขอบด้านหนึ่งของกระจกปิดสไลด์แตะกับ permount ค่อย ๆ วางกระจกปิดสไลด์ให้เอียงสัมผัสกับสไลด์ เป็นการไล่ฟองอากาศที่แทรกอยู่ระหว่างสไลด์กับกระจกปิดสไลด์ให้ออกมาด้านตรงข้ามกับด้านที่หยด permount แล้วใช้ปากคีบกดเบา ๆ บนกระจกปิดสไลด์เพื่อไล่ permount ให้ออกมาที่ขอบกระจกปิดสไลด์และเช็ดทำความสะอาด จากนั้นใช้น้ำยาทาเล็บแบบใสทาปิดที่ขอบของกระจกปิดสไลด์ แล้วเก็บสไลด์ลงในกล่องสไลด์

## สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน



ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์



ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

### 3. การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพลาสติก

เนื้อเยื่อกลุ่มที่สองแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำเนื้อเยื่อที่เก็บไว้มาตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 1 x 1 มิลลิเมตร แช่ใน 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1 M phosphate buffered saline ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที จากนั้นแช่ในเอทานอล 70%, 80%, 90% และ 95% ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที ตามลำดับ แล้วแช่ในเอทานอล 100% 3 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที จากนั้นแช่ใน propylene oxide 2 ครั้ง ๆ ละ 30 นาที แช่ใน propylene oxide : araldite 502 resin (2:1) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง และแช่ใน propylene oxide : araldite 502 resin (1:2) เป็นเวลา 12-14 ชั่วโมง จากนั้นฝังเนื้อเยื่อใน pure araldite 502 resin พอลิเมอร์ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 45 และ 60 องศาเซลเซียส อุณหภูมิละ 1 ครั้ง ๆ ละ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ตัดเนื้อเยื่อแบบ semi-thin section ให้มีความหนา 500-700 นาโนเมตร ย้อมด้วยสียเมทิลีนบลูในน้ำ แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และตัดเนื้อเยื่อแบบ ultra-thin section ให้มีความหนา 60-90 นาโนเมตร วางเนื้อเยื่อลงบน copper grid ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วย้อมด้วย saturated uranyl acetate ในเมทานอล 70% เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย 0.1% lead citrate ในน้ำ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพลาสติกเพื่อศึกษา

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

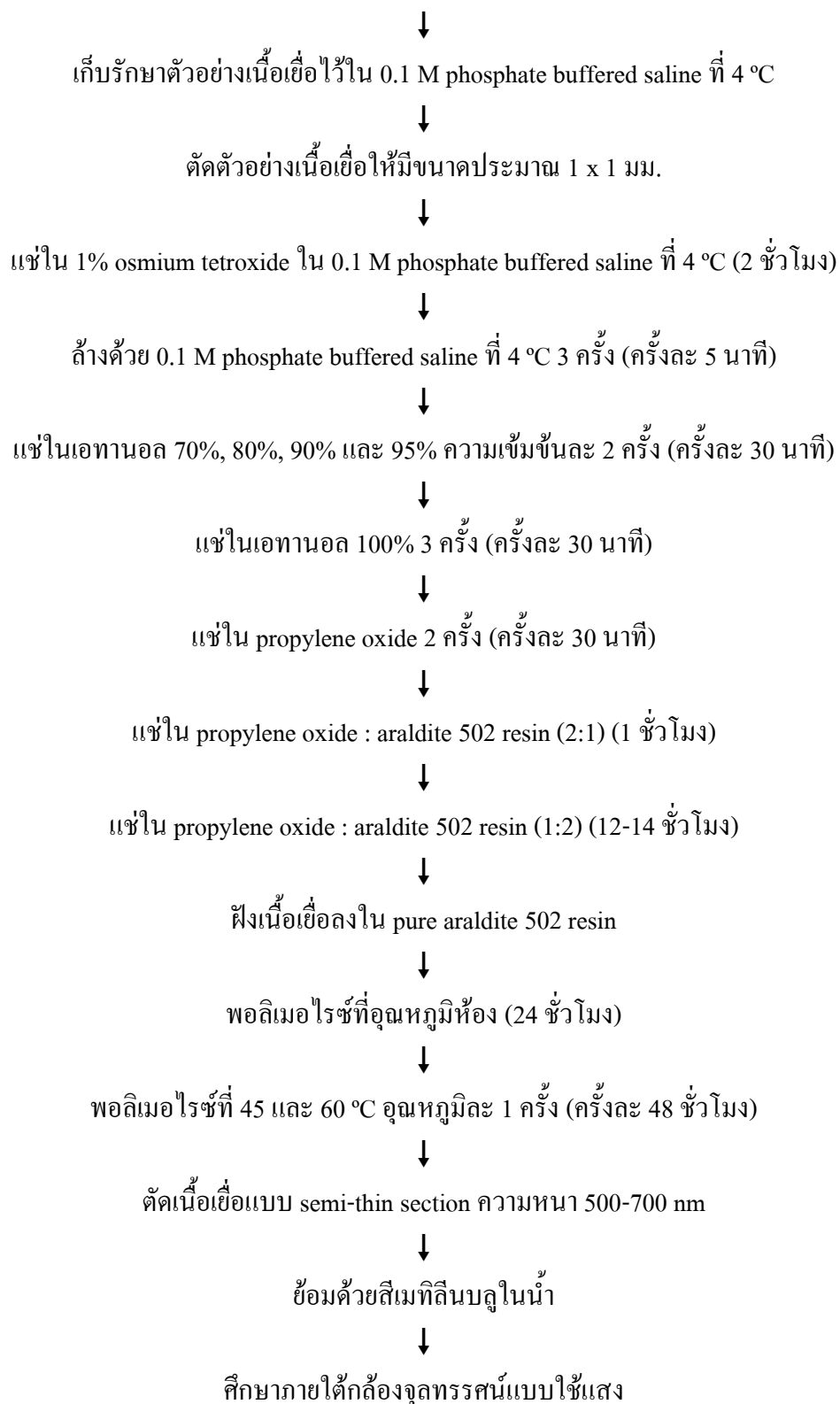
ตัดเนื้อเยื่อหอยนางรมส่วนที่ต้องการศึกษา



แช่ใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M phosphate buffered saline ที่ 4 °C (4 ชั่วโมง)

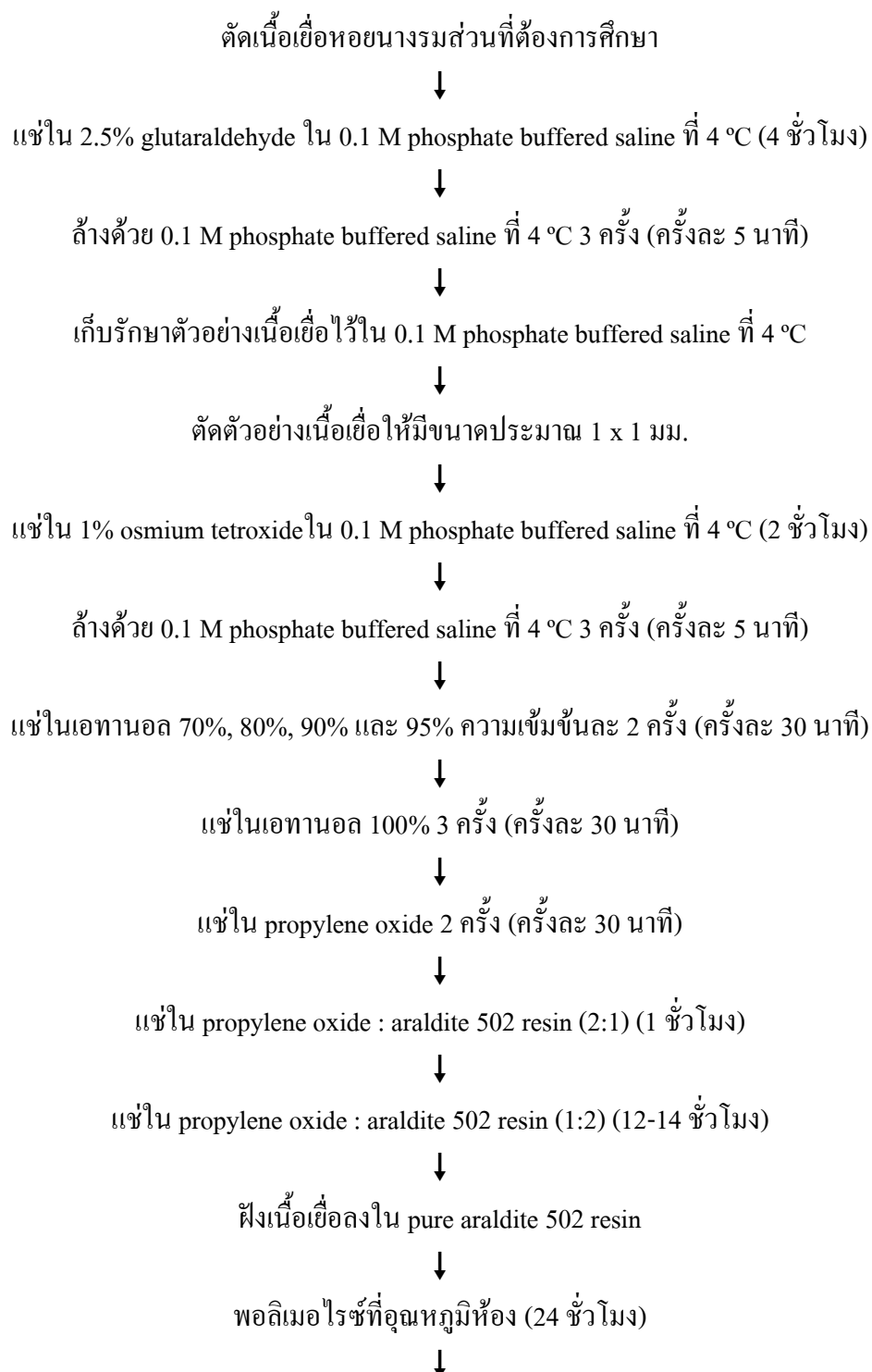


ล้างด้วย 0.1 M phosphate buffered saline ที่ 4 °C 3 ครั้ง (ครั้งละ 5 นาที)





สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพลาสติกเพื่อศึกษา  
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน



พอลิเมอไรซ์ที่ 45 และ 60 °C อุณหภูมิละ 1 ครั้ง (ครั้งละ 48 ชั่วโมง)



ตัดเนื้อเยื่อแบบ ultra-thin section ความหนา 60-90 nm



วางแผ่นเนื้อเยื่อลงบน copper grid ทิ้งไว้ให้แห้ง



ย้อมด้วย saturated uranyl acetate ในเมทานอล 70% (15 นาที)



ย้อมด้วย 0.1% lead citrate ในน้ำ (15 นาที)



ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

#### 4. การวัดขนาดนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์

ทำการวัดขนาดนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต่าง ๆ จากภาพที่บันทึกด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน โดยใช้โปรแกรม Optika Vision Lite แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

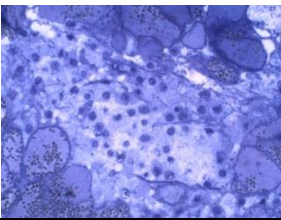
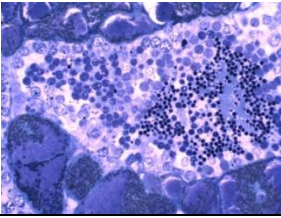
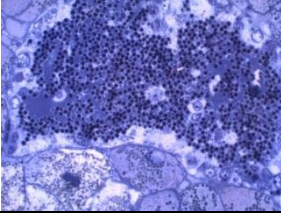
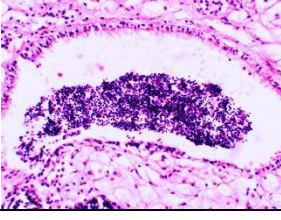
## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ

การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้แบ่งออกเป็น 4 ระยะ (ตารางที่ 4-1) คือ ระยะที่ 1 undifferentiated stage ระยะที่ 2 early stage of spermatogenesis ระยะที่ 3 mature stage of spermatogenesis และระยะที่ 4 spawned stage

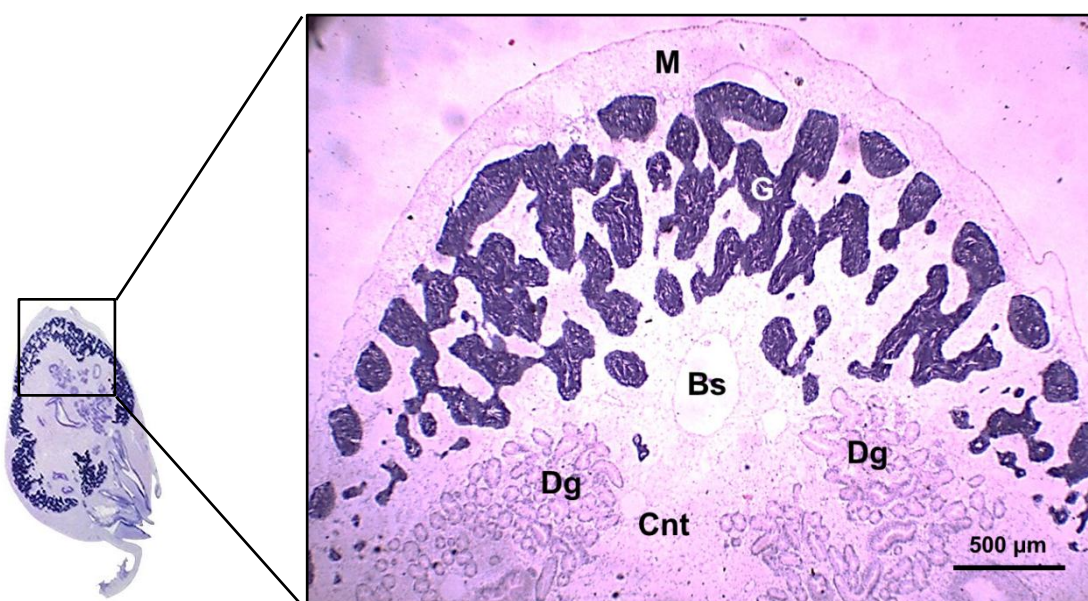
ตารางที่ 4-1 ระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ

| ระยะ   | ลักษณะ   |
|--|--|
| (1) undifferentiated stage<br>          | เป็นระยะเริ่มต้นของอวัยวะสืบพันธุ์ ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังไม่พัฒนาชัดเจน พบการรวมกลุ่มของเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรกแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน |
| (2) early stage of spermatogenesis<br>  | เป็นระยะที่เซลล์สืบพันธุ์เริ่มมีการแบ่งเซลล์ พบเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ จำนวนมาก   |
| (3) mature stage of spermatogenesis<br> | เป็นระยะที่เซลล์สืบพันธุ์พัฒนาอย่างสมบูรณ์ พบเซลล์อสุจิที่มีแฟลเจลลัมจำนวนมาก  |
| (4) spawned stage<br>                   | เป็นระยะที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์  |

## ลักษณะเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบเมื่อย้อมด้วย

### สีอีมาทอกซิลินและอีโอซิน

การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย โดยใช้เทคนิคทางมิถุนวิทยา (histology) เมื่อฝังตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน แล้วย้อมด้วย สีอีมาทอกซิลินและอีโอซิน จากการศึกษาพบว่า อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (male gonad) จะอยู่ระหว่าง เนื้อเยื่อชั้นแมนเทิลและต่อมสร้างน้ำย่อย มีลักษณะดังภาพที่ 4-1



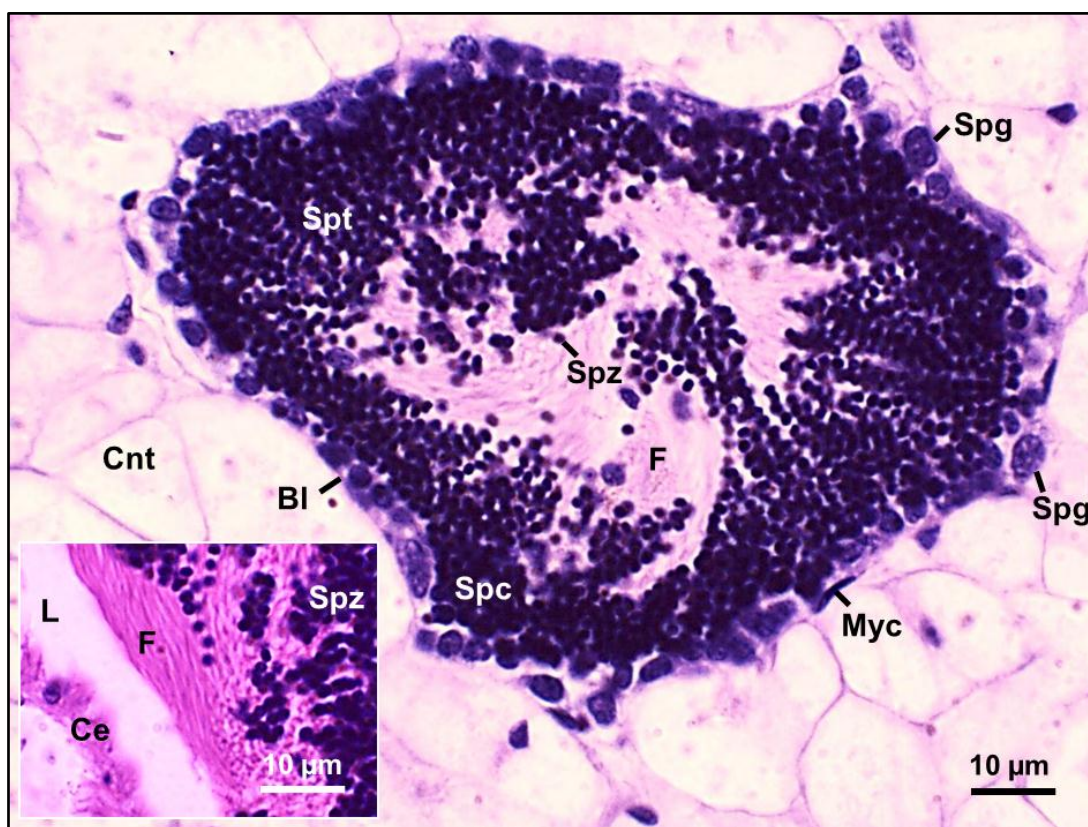
ภาพที่ 4-1 ตำแหน่งของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้

Bs = blood sinus; Cnt = connective tissue; Dg = digestive gland; G = gonad;

M = mantle

ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะแทรกอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยฐานของท่อ (basal lamina) จะเชื่อมติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน และพบเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างผนังของท่อ (myoepithelial cell) เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสค่อนข้างแบน ติดสีเข้ม ภายในท่อจะพบเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต่าง ๆ ประกอบด้วยสเปออร์มาโทโกเนียม เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ อยู่ใกล้กับฐานของท่อ นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างกลม และอาจพบนิวคลีโอลัส 1-2 อัน ถัดจากสเปออร์มาโทโกเนียมจะพบสเปออร์มาโทไซต์ (spermatocyte) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่าสเปออร์มาโทโกเนียมเล็กน้อย นิวเคลียสมีรูปร่างกลม ติดสีค่อนข้างเข้ม ถัดจากสเปออร์มาโทไซต์จะพบสเปออร์มาทิด เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก

นิวเคลียสมีรูปร่างกลม ติดสีเข้ม และถัดจากสเปออร์มาทิดจะพบสเปออร์มาโทซัว เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก นิวเคลียสมีรูปร่างกลม ติดสีเข้มมาก บริเวณกลางท่อจะพบสเปออร์มาโทซัวที่สมบูรณ์ โดยมีแฟลเจลลัม (flagellum) ช่วยในการเคลื่อนที่ ซึ่งการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อจะเริ่มจากด้านฐานของท่อเข้าสู่บริเวณลูเมน ดังภาพที่ 4-2 สเปออร์มาโทซัวที่สมบูรณ์จะหันด้านหัวเข้าสู่กลางท่อ ส่วนด้านหลังจะหันเข้าสู่ลูเมน โดยด้านหลังของท่อจะเป็นเนื้อเยื่อผิวหนังชนิด simple cuboidal ciliated epithelium ดังภาพแทรกที่ 4-2



ภาพที่ 4-2 เนื้อเยื่อภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เมื่อเชื่อมด้วยสีฮีมาทอกซิดินและอีโอซิน

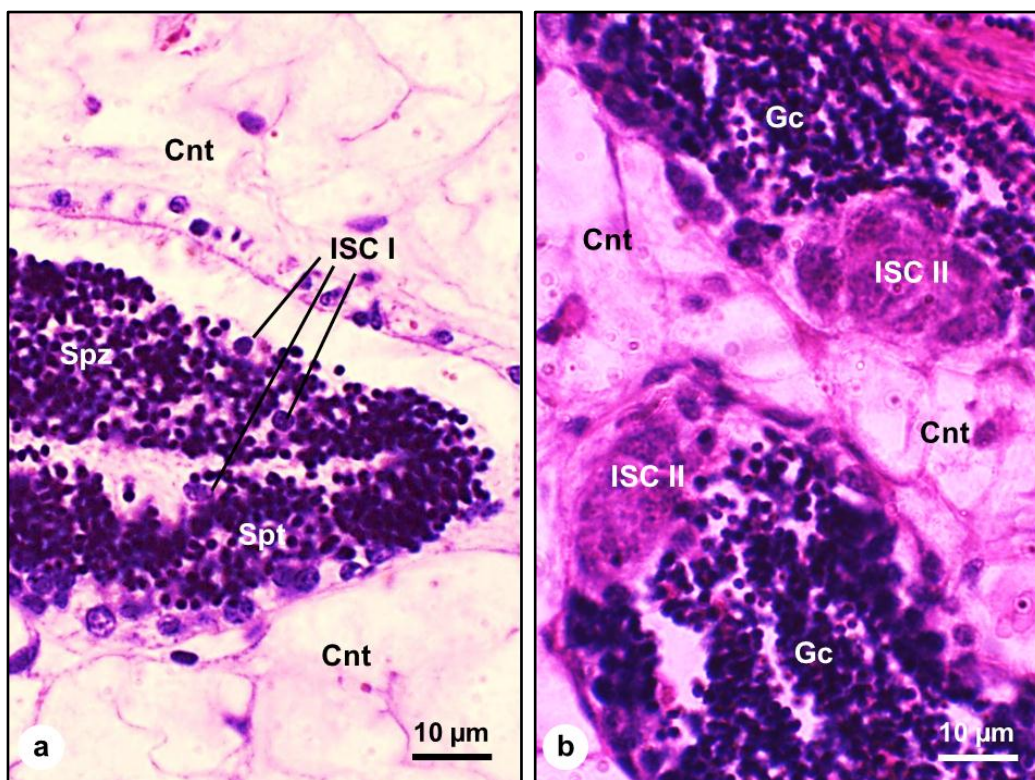
Bl = basal lamina; Cnt = connective tissue; Ce = simple cuboidal ciliated epithelium;

F = flagellum; L = lumen; Myc = Myoepithelial cell; Spc = spermatocyte;

Spg = spermatogonium; Spt = spermatid; Spz = spermatozoa

จากการศึกษาพบว่าภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังพบเซลล์ชนิดอื่นนอกเหนือไปจากเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์ร่างกาย รวมเรียกว่า เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (intragonadal somatic cells; ISCs) ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ ดังนี้ เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายใน

ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่ง (intra-gonadal somatic cell type I; ISC type I) เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสไม่กลม ติดสีจางกว่าเซลล์สืบพันธุ์ พบอยู่ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยแทรกอยู่ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ระยะสเปออร์มาทิดและสเปออร์มาโทซัว ดังภาพที่ 4-3a และเซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่สอง (intra-gonadal somatic cell type II; ISC type II) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ไม่เห็นนิวเคลียส ไซโทพลาซึมของเซลล์ติดสีม่วง พบที่บริเวณผนังด้านในของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ดังภาพที่ 4-3b นอกจากนี้ยังพบเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ติดสีอ้อชิน อยู่ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่อยู่ด้านนอกสุดติดกับเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิล โดยเซลล์สร้างเมือกจะแทรกอยู่ที่บริเวณผนังด้านในของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านลูเมน ซึ่งมีเนื้อเยื่อผิวหนังชนิด simple cuboidal ciliated epithelium ดังภาพที่ 4-4 และมีการหลั่งเมือก (mucin granule) เข้ามาในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ดังภาพแทรกที่ 4-4

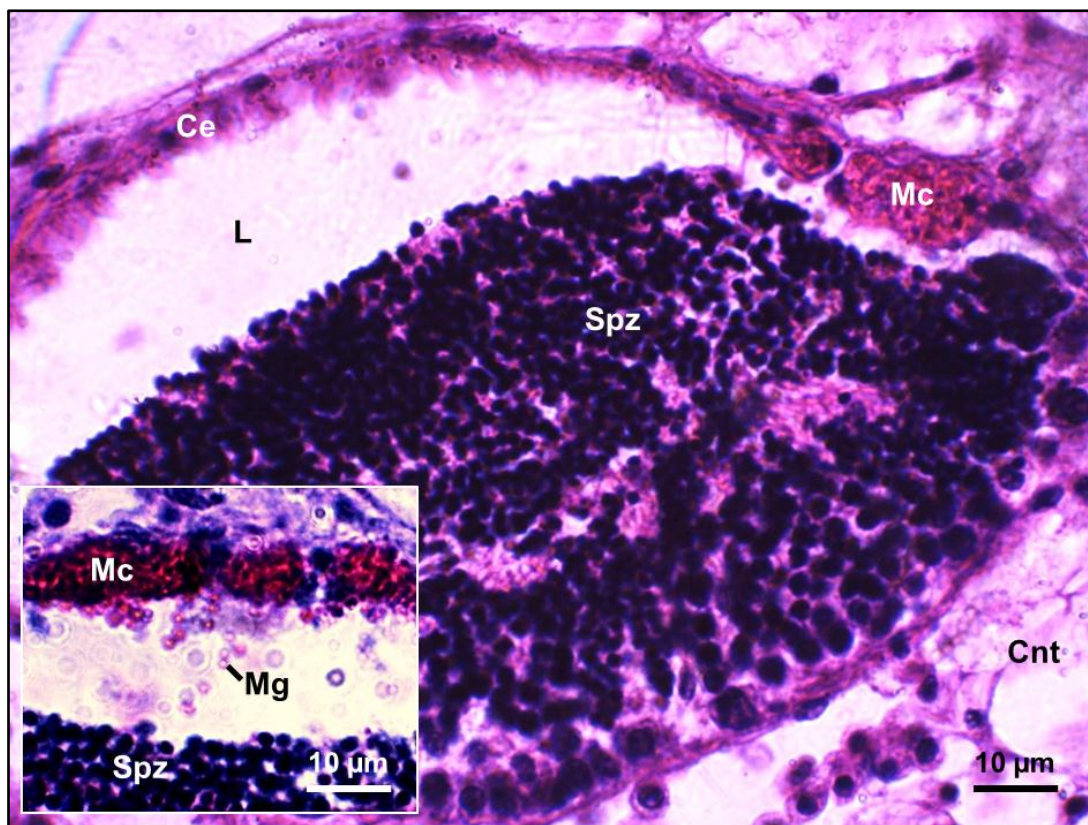


ภาพที่ 4-3 เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

(a) เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่ง; (b) เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่สอง; Cnt = connective tissue; Gc = germ cell;

ISC I = intra-gonadal somatic cell type I; ISC II = intra-gonadal somatic cell type II;

Spt = spermatid; Spz = spermatozoa



ภาพที่ 4-4 เซลล์สร้างเมือกที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

Ce = simple cuboidal ciliated epithelium; Cnt = connective tissue; L = lumen;

Mc = mucous cell; Mg = mucin granule; Spz = spermatozoa

### ลักษณะเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบเมื่อย้อมด้วย สีเมทิลีนบลู

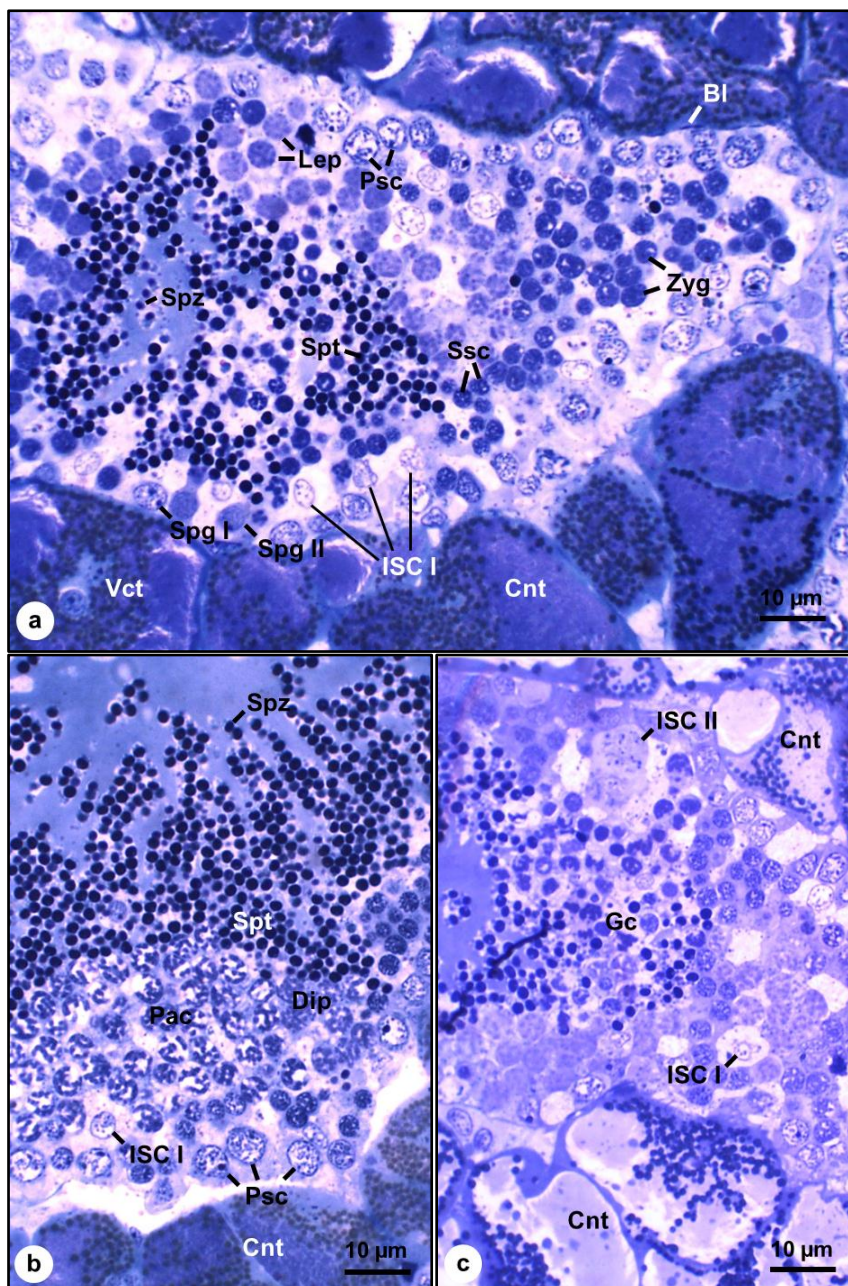
จากการศึกษาเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย โดยใช้เทคนิคทางมิถุวิทยา ฝังตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพลาสติก ตัดเนื้อเยื่อแบบ semi-thin section แล้วย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู พบว่าท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะแทรกอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบ ๆ ท่อ จะประกอบด้วยเซลล์ที่มีขนาดใหญ่และมีเม็ดสีเข้มกระจายอยู่ภายในเซลล์ เรียกว่าเซลล์ vesicular connective tissue (VCT) ที่ฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะพบสเปอร์มาโทโกเนียมแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ สเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่ง เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ฐานของเซลล์จะแบนติดกับฐานของท่อ นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างกลม ติดสีจาง และอาจพบ

นิวคลีโอลัส 1-2 อัน ส่วนสเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่สอง จะมีขนาดเล็กกว่าสเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่ง อยู่ใกล้กับฐานของท่อ นิวเคลียสค่อนข้างกลม ดิดสีเข้ม และอาจพบนิวคลีโอลัส 1-2 อัน ดังภาพที่ 4-5a

ถัดจากสเปอร์มาโทโกเนียมเข้ามาภายในท่อจะพบสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างกลม โครมาตินขดตัวหนาและดิดสีเข้ม โดยเฉพาะบริเวณผนังด้านในของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) สังเกตเห็นสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกในระยะย่อย ได้แก่ ระยะเลปโททีน เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาตินขดตัวดิดสีเข้มเป็นจุด ๆ กระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส ระยะไซโกทีน เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาตินขดตัวเป็นแท่งใหญ่และหนาขึ้น ดิดสีเข้มทั่วนิวเคลียส ดังภาพที่ 4-5a ระยะแพคทีน เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาตินขดตัวเป็นแท่งสั้นและหนา ดิดสีเข้มมาก ระยะดิโพลทีน เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาตินขดตัวเป็นแท่งหนาดัดกับผนังด้านในของเยื่อหุ้มนิวเคลียส บางเซลล์สังเกตุเห็นว่าโครมาตินเคลื่อนที่จากขอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียสเข้ามาอยู่ตรงกลางนิวเคลียส บางเซลล์โครโมโซม (chromosome) ประกอบด้วยโครมาทิด (chromatid) 2 แท่ง และบางเซลล์เห็นโครโมโซมมีลักษณะไขว้กัน ดังภาพที่ 4-5b ถัดจากสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกจะพบสเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กลงประมาณครึ่งหนึ่งจากสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาตินขดตัวหนาและดิดสีเข้มมาก ไม่สามารถจำแนกระยะย่อยของเซลล์ได้ ถัดจากสเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สองจะพบสเปอร์มาทิดจำนวนมาก เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก นิวเคลียสมีรูปร่างกลม ดิดสีเข้มมาก ด้านในสุดของท่อจะพบสเปอร์มาโทซัว เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุด นิวเคลียสดิดสีเข้มมาก บางเซลล์สังเกตุเห็นส่วนของอะโครโซม ไมโทคอนเดรีย และแฟลเจลลัม

นอกจากนี้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังพบเซลล์ที่มีลักษณะเป็นเซลล์ร่างกายเรียกว่าเซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ คือ เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่ง เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสไม่กลม รูปร่างของนิวเคลียสไม่แน่นอน ดิดสีจางกว่านิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ และมีไซโทพลาซึมขนาดใหญ่ ดิดสีจางมาก พบกระจายอยู่ทั่วไปภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ตั้งแต่บริเวณฐานของท่อ และแทรกอยู่ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ ส่วนเซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่สอง เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ ไม่สามารถสังเกตุเห็นนิวเคลียสของเซลล์ได้ เซลล์ดิดสีจาง พบที่บริเวณฐานของท่อ และมีเซลล์สืบพันธุ์มาแทรกอยู่ด้วย ดังภาพที่ 4-5c





ภาพที่ 4-5 เนื้อเยื่อภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เมื่อย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู

Bl = basal lamina; Cnt = connective tissue; Dip = diplotene; Gc = germ cell;

ISC I = intragonadal somatic cell type I; ISC II = intragonadal somatic cell type II

Lep = leptotene; Pac = pachytene; Psc = primary spermatocyte;

Spg I = spermatogonium type I; Spg II = spermatogonium type II; Spt = spermatid;

Spz = spermatozoa; Ssc = secondary spermatocyte;

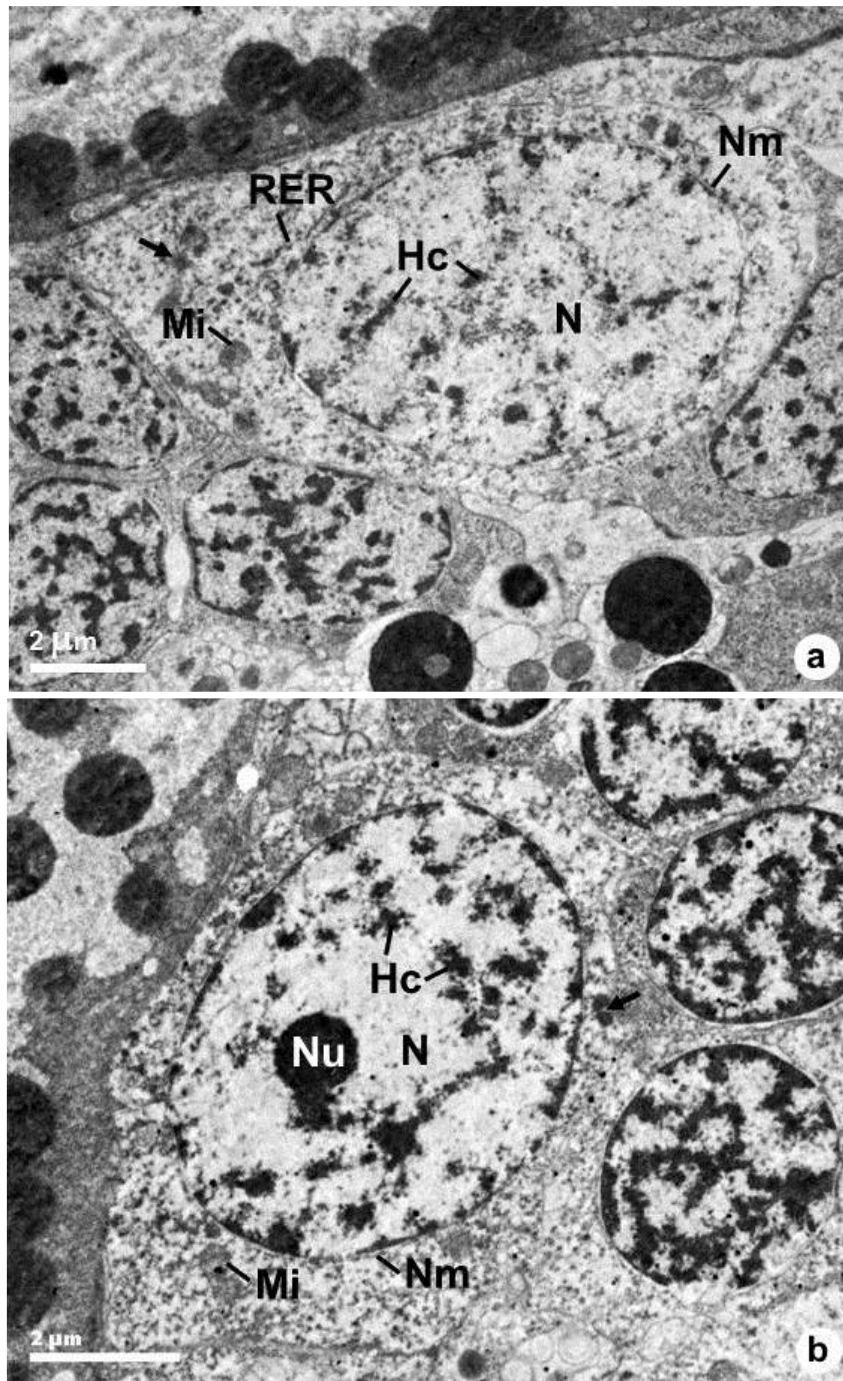
Vct = vesicular connective tissue cells; Zyg = zygotene

## โครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ

จากการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัยด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ จำแนกตามลักษณะของนิวเคลียส การขดตัวของโครมาทิน และองค์ประกอบของไซโทพลาซึมได้ดังนี้

สเปอร์มาโทโกเนียมเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ อยู่ใกล้กับฐานของท่อ จากการศึกษพบว่าสเปอร์มาโทโกเนียมแบ่งออกเป็น 2 ลักษณะ คือ สเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่ง ฐานของเซลล์จะแบนติดกับฐานของท่อ นิวเคลียสค่อนข้างกลม ขนาด  $4.9 \times 6.2$  ไมโครเมตร เฮเทอโรโครมาทิน (heterochromatin) ขดตัวดีดีสีเข้มกระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส และมียูโครมาทิน (euchromatin) กระจายอยู่ทั่วนิวเคลียสเช่นกัน ดังภาพที่ 4-6a ส่วนสเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่สอง จะอยู่ถัดเข้ามาภายในท่อใกล้กับสเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่ง นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาด  $3.8 \times 4.7$  ไมโครเมตร มีนิวคลีโอลัส เฮเทอโรโครมาทินขดตัวดีดีสีเข้มกว่าสเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่ง กระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส และอยู่ตามผนังด้านในของนิวเคลียส และมียูโครมาทินกระจายอยู่ทั่วนิวเคลียสเช่นกัน ดังภาพที่ 4-6b ในส่วนไซโทพลาซึมของสเปอร์มาโทโกเนียมทั้งสองชนิดจะประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ และ nuage

สเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างกลม ขนาด  $3.5 \times 4.1$  ไมโครเมตร เฮเทอโรโครมาทินขดตัวหนาขึ้น ดีดีสีเข้มกระจายอยู่ทั่วนิวเคลียสและบริเวณผนังด้านในของเยื่อหุ้มนิวเคลียส ในไซโทพลาซึมจะพบไมโทคอนเดรีย และ nuage ดังภาพที่ 4-7a และสามารถจำแนกสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกเป็นระยะย่อย ๆ ได้แก่ ระยะโปรเฟส (prophase) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างกลม เฮเทอโรโครมาทินหดสั้นจนเห็นเป็นแท่งโครโมโซม เยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มสลายตัว ดังภาพที่ 4-7b ระยะแพลิติน เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างกลม ภายในนิวเคลียสประกอบด้วยเฮเทอโรโครมาทินขดตัวเป็นแท่งหนา สังเกตเห็น synaptonemal complex ดังภาพที่ 4-7c และระยะเมทาเฟส เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ เยื่อหุ้มนิวเคลียสสลายตัว มีเซนทริโอล (centriole) และเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) ดังภาพที่ 4-7d

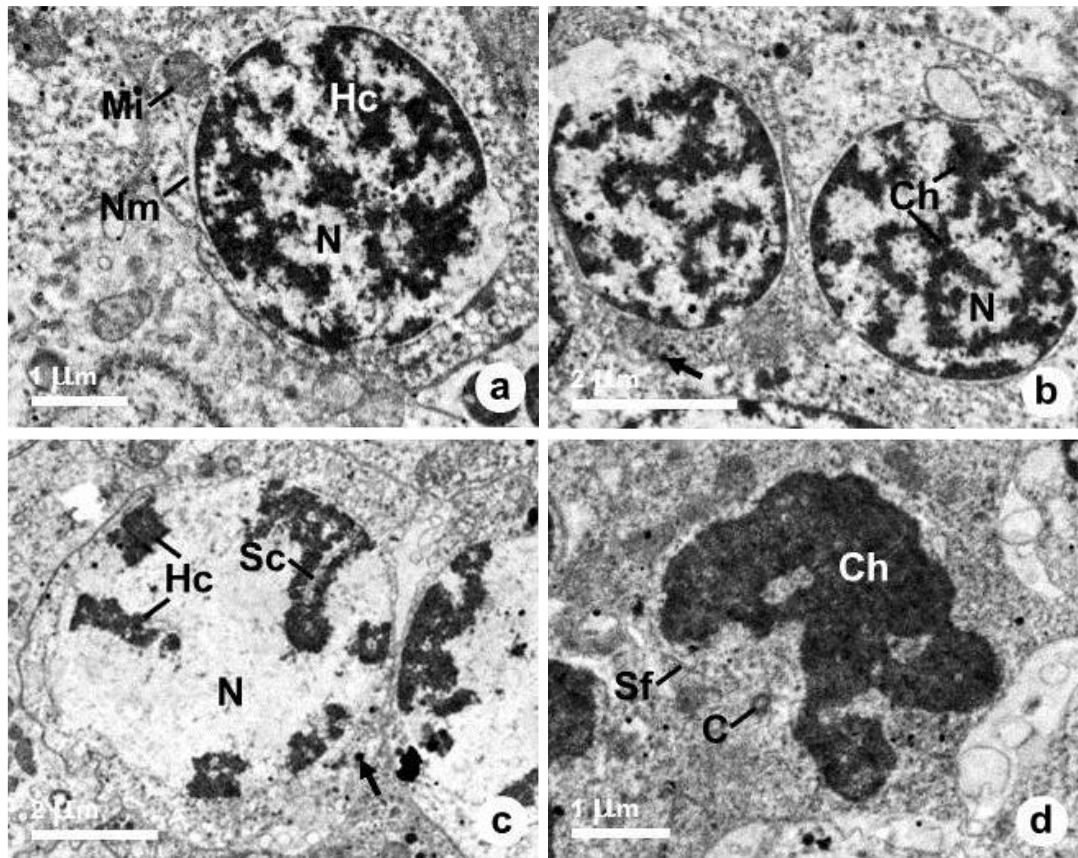


ภาพที่ 4-6 สเปออร์มาโทโกเนียม (spermatogonium)

(a) สเปออร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่ง; (b) สเปออร์มาโทโกเนียมชนิดที่สอง;

Hc = heterochromatin; Mi = mitochondria; N = nucleus; Nm = nuclear membrane;

Nu = nucleolus; RER = rough endoplasmic reticulum; arrow = nuage



ภาพที่ 4-7 สเปออร์มาโทไซต์ระยะแรก (primary spermatocyte)

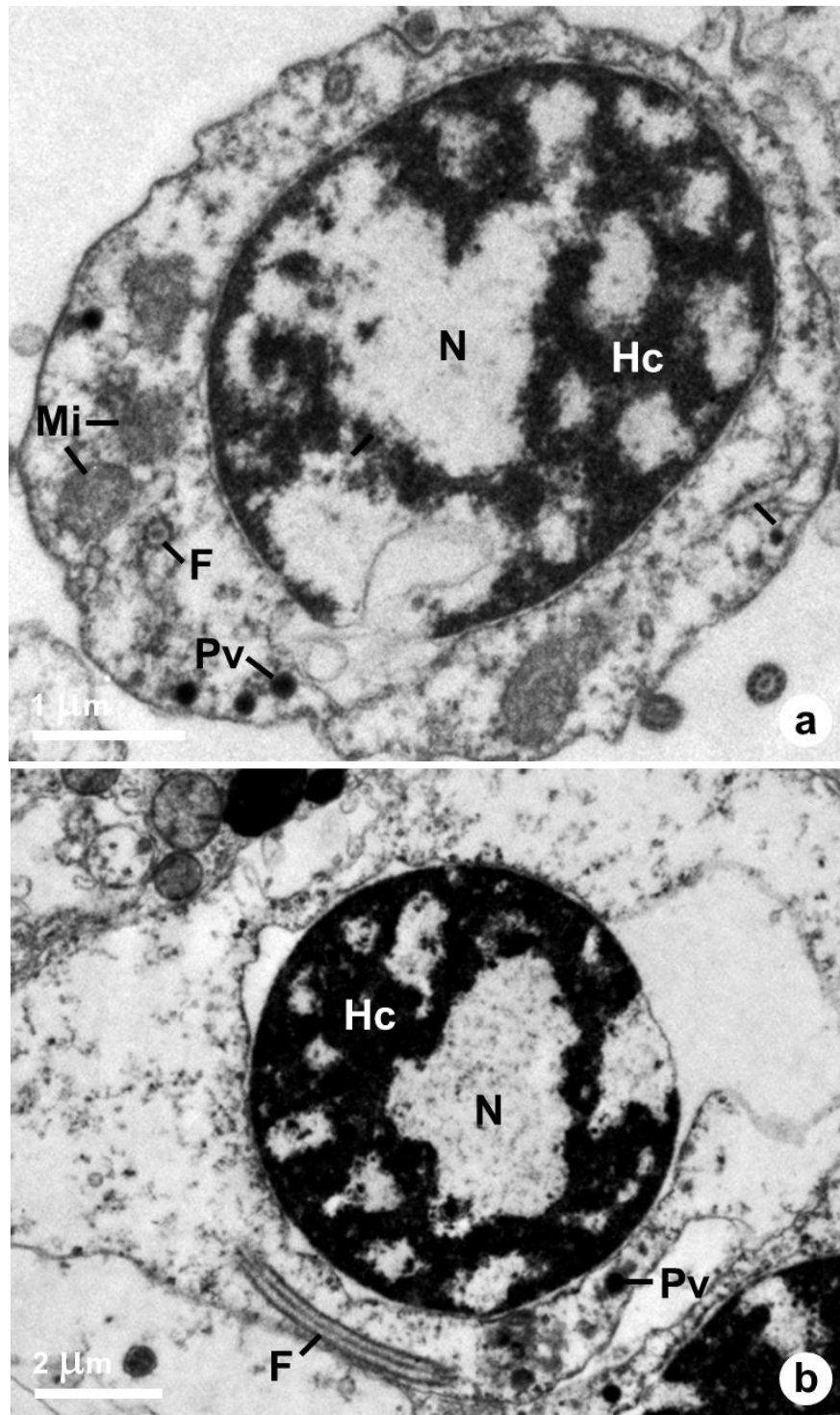
(a) สเปออร์มาโทไซต์ระยะแรก; (b) ระยะโพรเฟส; (c) ระยะแพลิติน;

(d) ระยะเมทาเฟส; C = centriole; Ch = chromosome; Hc = heterochromatin;

Mi = mitochondria; Sf = spindle fiber; N = nucleus; Nm = nuclear membrane;

Sc = synaptonemal complex; arrow = nuage

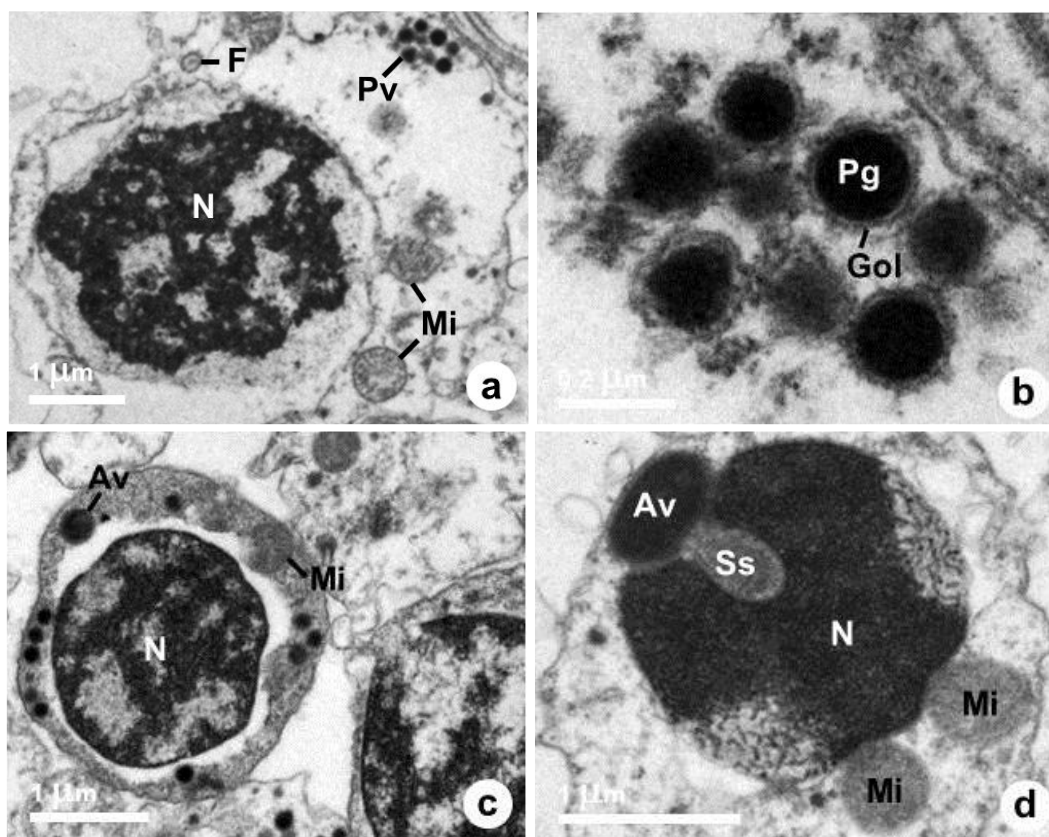
สเปออร์มาโทไซต์ระยะที่สองเป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสรูปทรงกลม ขนาด 3.4 ไมโครเมตร เฮเทอโรโครมาตินขนาดตัวหนามีลักษณะไขว้กัน ในไซโทพลาซึมประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ และ proacrosomal vesicle และเห็นโครงสร้างของแฟลเจลลัม ที่ประกอบด้วยไมโครทิวบูล (microtubule) ที่มีการเรียงตัวแบบ 9+2 ดังภาพที่ 4-8a และภาพที่ 4-8b



ภาพที่ 4-8 สเปออร์มาโทไซต์ระยะที่สอง (secondary spermatocyte)

F = flagellum; Hc = heterochromatin; Mi = mitochondria; N = nucleus;  
 RER = rough endoplasmic reticulum; Pv = proacrosomal vesicle

สเปออร์มาทิดเป็นระยะที่ไม่มีการแบ่งเซลล์ เซลล์จะมีการเปลี่ยนแปลงจากสเปออร์มาทิดไปเป็นสเปออร์มาโทซัว เรียกกระบวนการนี้ว่า spermiogenesis นิวเคลียสจะติดสีเข้ม ขนาด 2.2 ไมโครเมตร โครโมโซมชัดเจน ไมโทคอนเดรียมีขนาดใหญ่ขึ้น ไซโทพลาซึมมีขนาดเล็กลง สังเกตเห็นแฟลเจลลัมและกลุ่มของ proacrosomal vesicle ดังภาพที่ 4-9a โครงสร้างของ proacrosomal vesicle ประกอบด้วย proacrosomal granule ที่มีกอลจิ คอมเพล็กซ์ล้อมรอบ ดังภาพที่ 4-9b จากนั้น proacrosomal vesicle จะรวมตัวกันเป็น acrosomal vesicle ขนาดใหญ่ เคลื่อนที่เข้าใกล้ส่วนหน้าของนิวเคลียส ส่วนไมโทคอนเดรียจะรวมตัวกันเคลื่อนที่ไปอยู่ฝั่งตรงข้ามกับ acrosomal vesicle ดังภาพที่ 4-9c ช่วงท้ายของระยะสเปออร์มาทิด acrosomal vesicle จะอยู่ที่ส่วนหน้าของนิวเคลียส ส่วนไมโทคอนเดรียจะอยู่ฝั่งตรงข้าม และสังเกตเห็น subacrosomal space ดังภาพที่ 4-9d

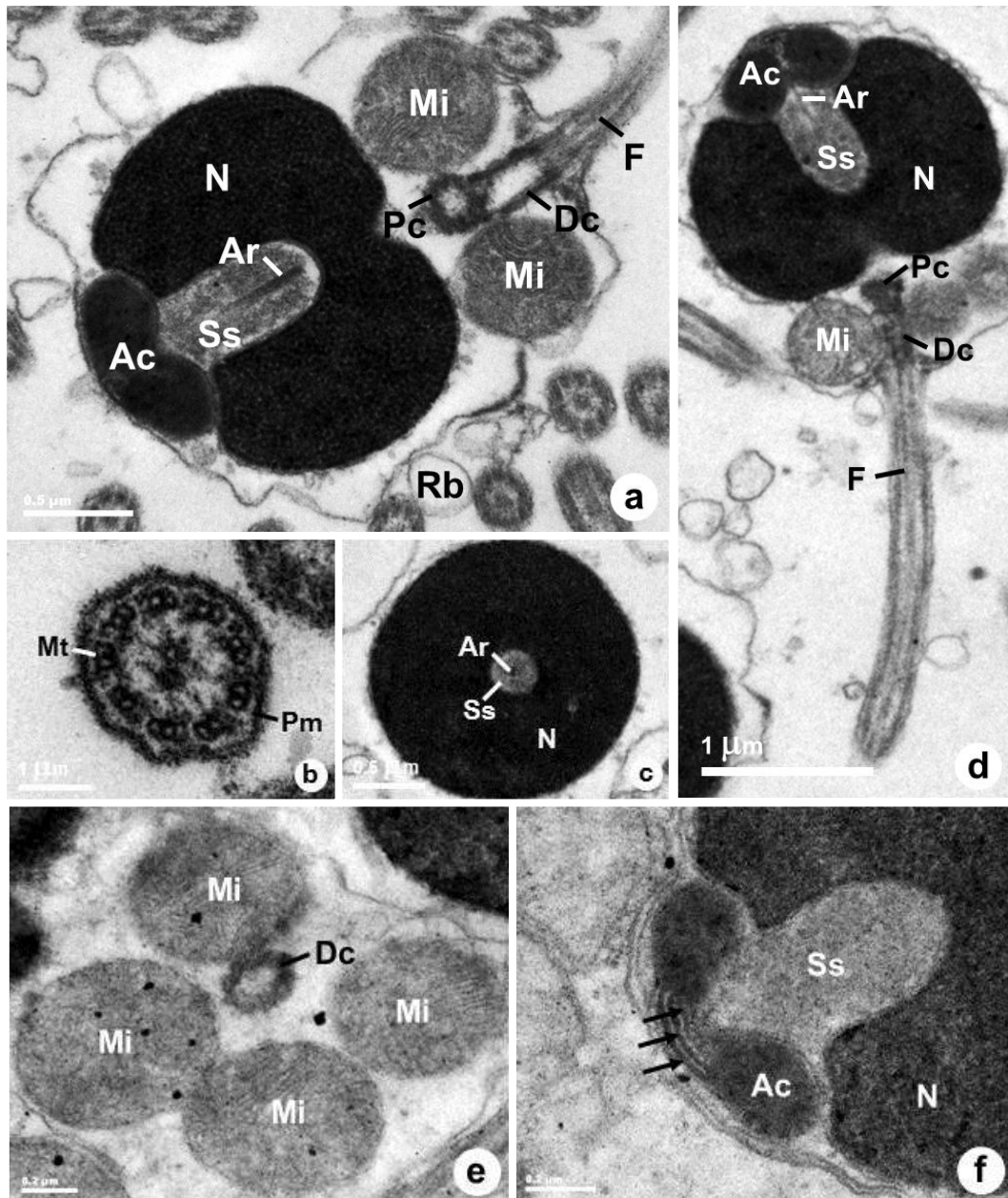


ภาพที่ 4-9 สเปออร์มาทิด (spermatid)

Av = acrosomal vesicle; F = flagellum; Gol = golgi complex; Mi = mitochondria;

N = nucleus; Pg = proacrosomal granule; Pv = proacrosomal vesicle;

Ss = subacrosomal space



ภาพที่ 4-10 สเปออร์มาโทซัว (spermatozoa)

Ac = acrosome; Ar = axial rod; Dc = distal centriole; F = flagellum;

Mi = mitochondria; Mt = microtubule; N = nucleus; Pc = proximal centriole;

Pm = plasma membrane; Rb = residual body; Ss = subacrosomal space;

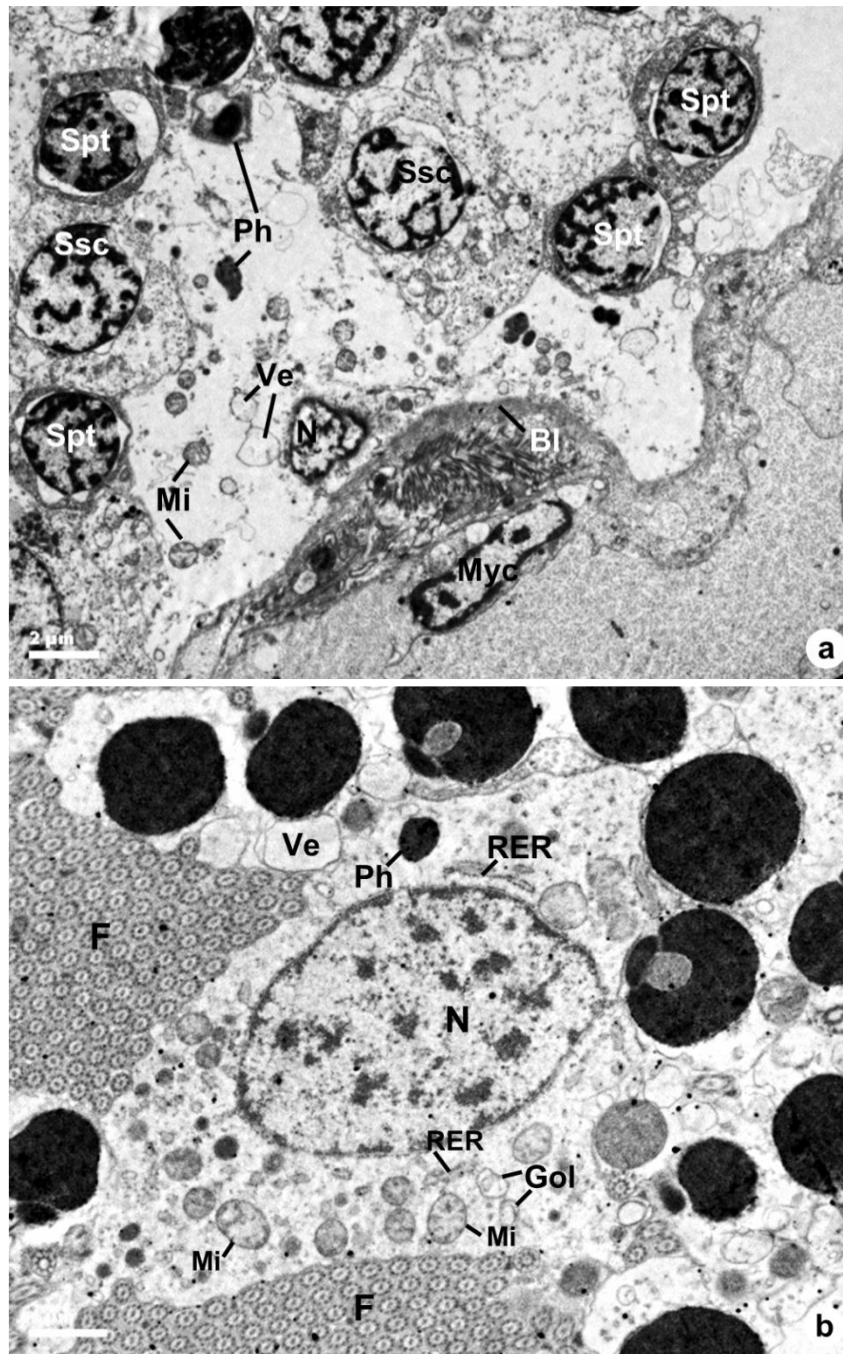
arrow = transverse band

ในกระบวนการ spermiogenesis จะมีการกำจัดส่วนที่เหลือจากกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ออกมา เรียกว่า residual body ดังภาพที่ 4-10a สเปออร์มาโทซัวประกอบด้วยส่วนหัว (head) ซึ่งมีนิวเคลียสเป็นรูปทรง barrel-shaped ขนาด 1.8 ไมโครเมตร มีอะโครโซมรูปร่างแบบ cup-shaped อยู่ด้านบนนิวเคลียส ส่วนปลายสุดของอะโครโซมจะพบ transverse band ขดเป็นเกลียวประมาณ 3-4 ชั้น ภาพตัดตามยาวจะสังเกตเห็น subacrosomal space และ axial rod อยู่ภายใน ส่วนหัวของสเปออร์มาโทซัว ส่วนลำตัว (middle piece) ประกอบด้วยไมโทคอนเดรียที่มีรูปร่างกลมจำนวน 4 อัน อยู่ล้อมรอบเซนทริโอลส่วนต้น (proximal centriole) และเซนทริโอลส่วนปลาย (distal centriole) ส่วนหาง (tail) หรือแฟลเจลลัมประกอบด้วยไมโครทิวบูลที่มีการเรียงตัวแบบ 9+2 และมีเยื่อหุ้ม (plasma membrane) ล้อมรอบ ดังภาพที่ 4-10b-f

จากการศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่ามีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต่าง ๆ และยังพบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ร่างกายอยู่ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้อีกด้วย แต่ไม่สามารถจำแนกเซลล์ดังกล่าวออกจากเซลล์สืบพันธุ์ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากไซโทพลาซึมของเซลล์ติดสติดคล้ายกับไซโทพลาซึมของเซลล์สืบพันธุ์ จึงทำการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่าเซลล์ค้ำจุนที่อยู่ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่ง (intra-gonadal somatic cell type I; ISC type I) นิวเคลียสของเซลล์จะมีรูปร่างไม่แน่นอนและไม่กลมเหมือนกับนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ โครโมโซมหดตัวสั้นติดสติดกระจายอยู่ภายในและติดกับเยื่อหุ้มด้านในของนิวเคลียส อาจพบนิวคลีโอไลต์ ส่วนไซโทพลาซึมติดสติดและมีย่านใหญ่กว่าไซโทพลาซึมของเซลล์สืบพันธุ์ องค์กรประกอบในไซโทพลาซึมประกอบด้วยเวสิเคิล (vesicle) ที่มีรูปร่างและขนาดต่าง ๆ กัน และมีไมโทคอนเดรียจำนวนมาก บางเซลล์สังเกตเห็นเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ กอลจิ คอมเพล็กซ์ และมีฟาโกไลโซโซม ตำแหน่งที่พบเซลล์ ISC type I ได้แก่ บริเวณฐานของท่อไปจนถึงกลางท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยมีเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ แทรกอยู่ด้วย ดังภาพที่ 4-11a และภาพที่ 4-11b

เมื่อสังเกตองค์ประกอบในไซโทพลาซึมของเซลล์ ISC type I ที่พบบริเวณกลางท่อกับบริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ พบว่าเซลล์ ISC type I ที่พบบริเวณกลางท่อจะประกอบด้วยไมโทคอนเดรียจำนวนมากอยู่ใกล้กับเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ กอลจิ คอมเพล็กซ์ เวสิเคิล และแกรนูลเล็ก ๆ จำนวนมาก ดังภาพที่ 4-12a ส่วนเซลล์ ISC type I ที่พบบริเวณฐานของท่อจะประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย เวสิเคิล ไลโซโซม ฟาโกไลโซโซม และแกรนูลเล็ก ๆ แต่มีปริมาณน้อยกว่าบริเวณกลางท่อ ดังภาพที่ 4-12b และภาพที่ 4-12c





ภาพที่ 4-11 เซลล์กำลังอยู่ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่ง

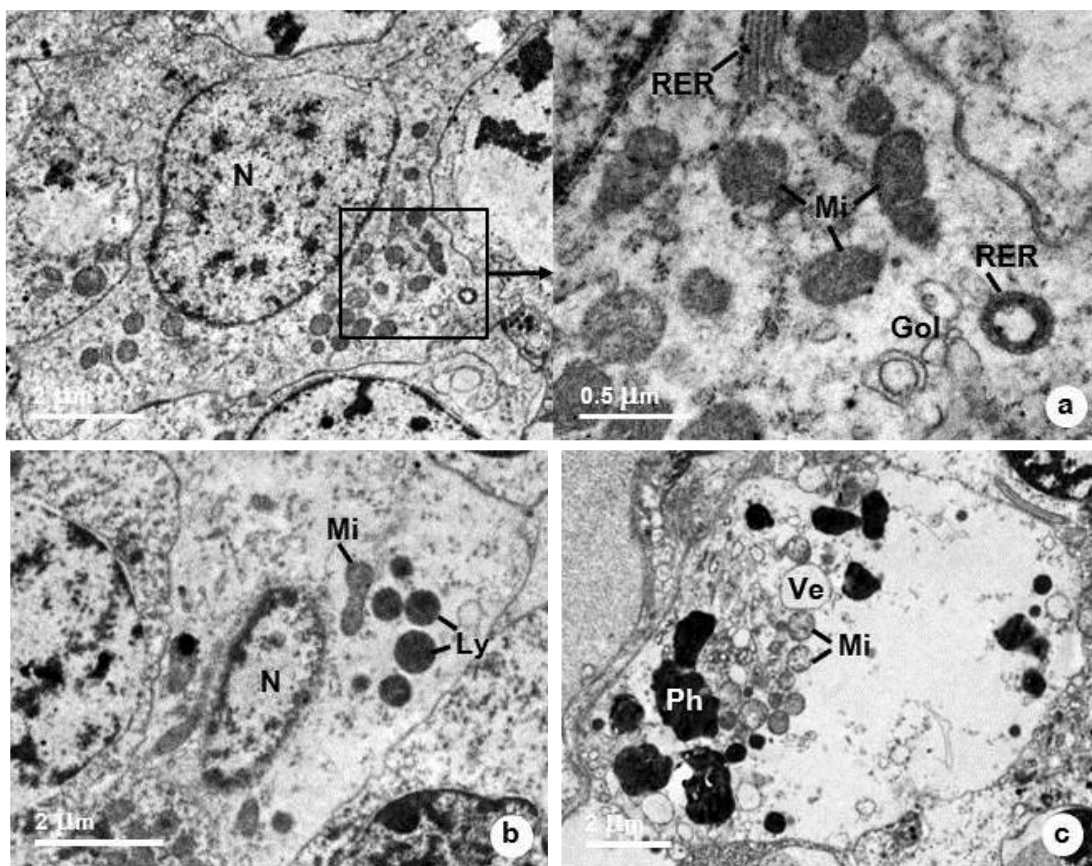
(a) ISC type I ที่บริเวณฐานของท่อ; (b) ISC type I ที่บริเวณกลางท่อ;

Bl = basal lamina; F = flagellum; Gol = golgi complex; Mi = mitochondria;

Myc = Myoepithelial cell; N = nucleus; Ph = phagolysosome;

RER = rough endoplasmic reticulum; Ssc = secondary spermatocyte;

Spt = Spermatid; Ve = vesicle



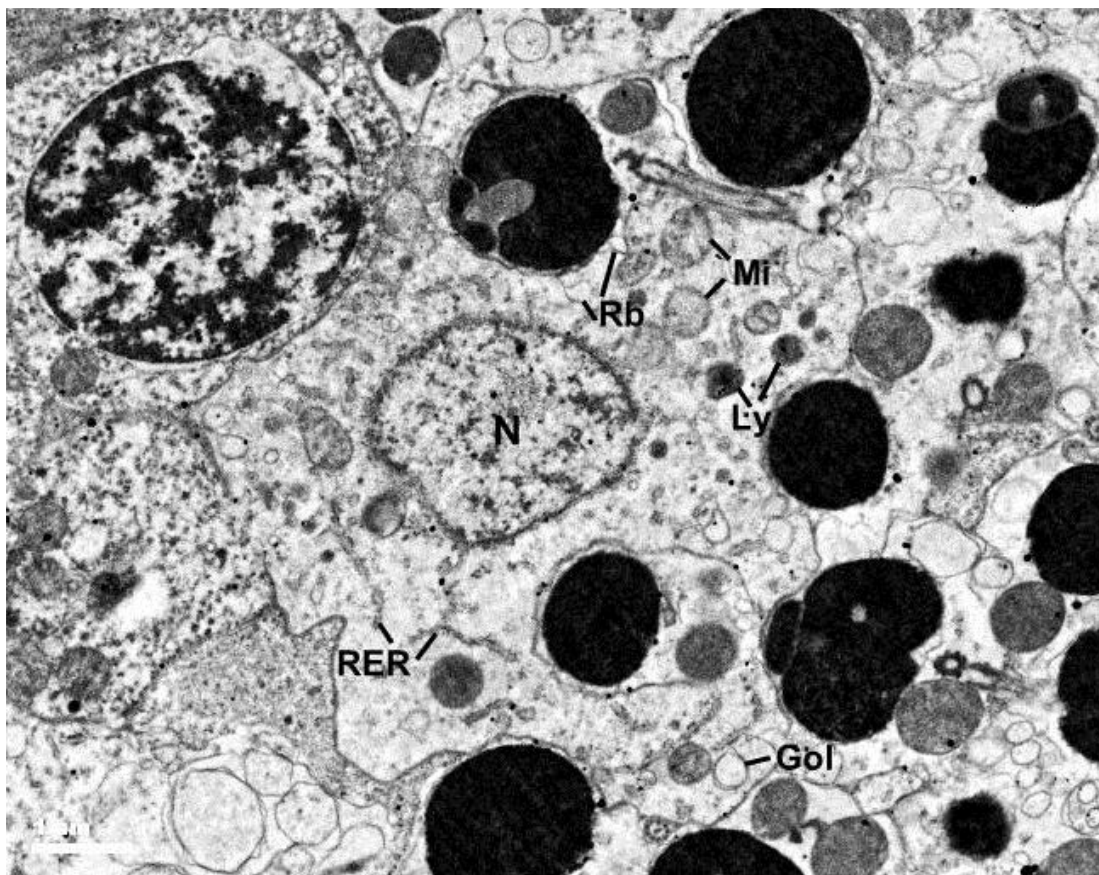
ภาพที่ 4-12 องค์ประกอบภายในไซโทพลาซึมของเซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่ง

(a) ISC type I ที่บริเวณกลางท่อ; (b) และ (c) ISC type I ที่บริเวณฐานของท่อ;

Gol = golgi complex; Ly = lysosome; Mi = mitochondria; N = nucleus;

Ph = phagolysosome; RER = rough endoplasmic reticulum; Ve = vesicle

นอกจากนี้เซลล์ ISC type I ที่อยู่บริเวณกลางท่อจะมีสเปออร์มาทิดและสเปออร์มาโทซัวเข้ามาแทรกอยู่ด้วย โดยสเปออร์มาทิดและสเปออร์มาโทซัวเหล่านั้นจะหันด้านหัวเข้าหาเซลล์ ISC type I และพบว่าองค์ประกอบภายในไซโทพลาซึมของเซลล์ ISC type I จะประกอบด้วยไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ กอลจี้ คอมเพล็กซ์ เวสซิเคิล และแกรนูลเล็ก ๆ จำนวนมาก และหลังจากเซลล์สืบพันธุ์เข้าสู่ระยะสเปออร์มาทิดจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์ระยะสเปออร์มาโทซัว เรียกกระบวนการนี้ว่า spermiogenesis โดยกระบวนการดังกล่าว สเปออร์มาทิดจะมีการกำจัดไซโทพลาซึมส่วนเกินออก กลายเป็น residual body หลุดเข้ามาในส่วนไซโทพลาซึมของเซลล์ ISC type I ด้วย ดังภาพที่ 4-13

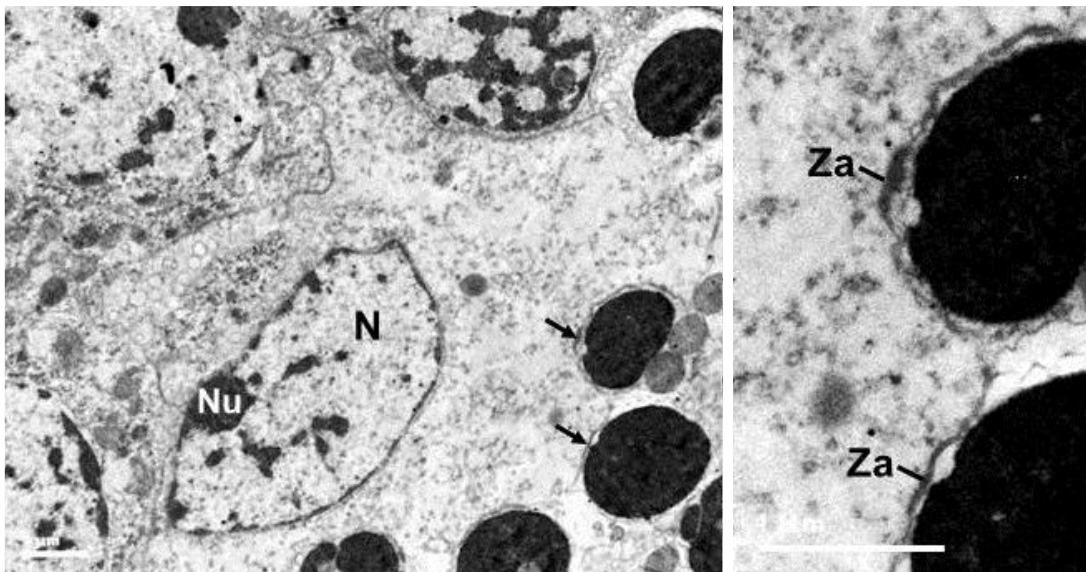


ภาพที่ 4-13 เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่งที่บริเวณกลางท่อและ spermiogenesis ระยะ maturation phase

Gol = golgi complex; Ly = lysosome; Mi = mitochondria;

N = nucleus; Rb = residual body; RER = rough endoplasmic reticulum

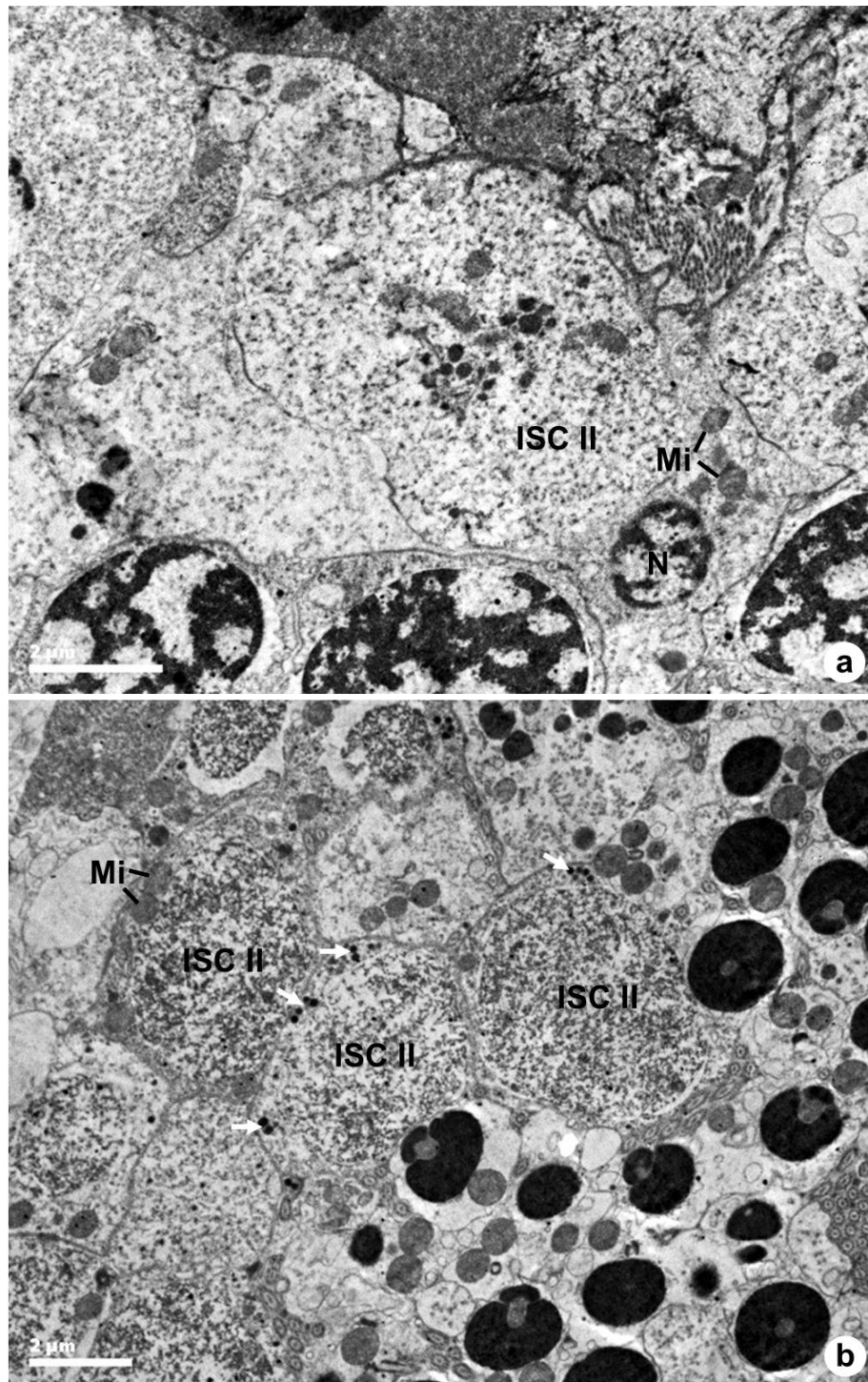
การเชื่อมติดกันของเซลล์ (cell junction) ระหว่างเซลล์ ISC type I กับเซลล์สืบพันธุ์จะมีลักษณะคล้ายกับ zonula adheren หรือ adheren junction คือ มีพลาสมา (plaque) อยู่ระหว่างเชื่อมหุ้มเซลล์ของสองเซลล์ที่อยู่ติดกันและมีช่องว่างระหว่างเซลล์ ทำให้เห็นลักษณะเซลล์ยึดติดกันแต่ไม่แน่นสนิท บริเวณตำแหน่งเชื่อมหุ้มเซลล์ที่มีพลาสมาเกาะอยู่จะติดสีเข้ม ส่วนช่องว่างระหว่างเซลล์จะติดสีแต่จางกว่า ดังภาพที่ 4-14



ภาพที่ 4-14 การเชื่อมติดกันของเซลล์ระหว่างเซลล์ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่งกับเซลล์สืบพันธุ์

N = nucleus; Nu = nucleolus; Za = zonula adherens

ส่วนเซลล์ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่สอง (intra-ovarian somatic cell type II; ISC type II) อาจสังเกตเห็นนิวเคลียสหรือไม่เห็นก็ได้ เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่มากไซโทพลาซึมติดสีเข้มกว่าเซลล์ ISC type I โดยในไซโทพลาซึมประกอบด้วยไมโทคอนเดรียจำนวนมาก มีแกรนูลติดสีเข้มอยู่ใกล้กับเยื่อหุ้มด้านในของเซลล์ และมีแกรนูลเล็ก ๆ กระจายอยู่อย่างหนาแน่น ตำแหน่งที่พบเซลล์ ISC type II ได้แก่ บริเวณฐานของท่อจนถึงกลางท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ดังภาพที่ 4-15a และภาพที่ 4-15b



ภาพที่ 4-15 เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่สอง

(a) ISC type II ที่บริเวณฐานของท่อ; (b) ISC type II ที่บริเวณกลางท่อ;

ISC II = intragonadal somatic cell type II (ISC type II); Mi = Mitochondria;

arrow = granule

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผล

#### อภิปรายผล

##### 1. โครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ

ในช่วงต้นชีวิตของหอยนางรมปากจีบ ไม่พบโครงสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์จะเริ่มต้นขึ้นเมื่อหอยนางรมเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ โดยการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์จะเกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิลและต่อมสร้างน้ำย่อย โดยพบว่ามีการพัฒนาของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์แทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งลักษณะดังกล่าวคล้ายกับที่พบในหอยนางรมที่เคยมีการรายงานแล้ว เช่น *C. virginica* (Galtsoff, 1964), *C. gigas* (Franco et al., 2008), *S. forskali* (Panasophonkul, 2000; Nuurai, Panasophonkul, Tinikul, Sobhon, and Wanichanon, 2016)

บริเวณรอบท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะพบเซลล์ขนาดใหญ่ล้อมรอบอยู่เรียกเซลล์นี้ว่าเซลล์ vesicular connective tissue (VCT) ภาพจุลกายวิภาคแสดงให้เห็นว่าภายในเซลล์ VCT นี้พบแกรนูลที่มีลักษณะทึบกระจายอยู่ทั่วเซลล์ แกรนูลชนิดนี้เกิดจากการการสะสมแป้งในรูปไกลโคเจน สำหรับใช้เป็นแหล่งพลังงานของร่างกาย (Eckelbarger & Davis, 1996)

ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ประกอบไปด้วยผนังท่อ มีลักษณะเป็นชั้นบาง ๆ ประกอบด้วยเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างผนังของท่อ โดยลักษณะดังกล่าวคล้ายกับที่พบที่ผนังท่อเซมินิเฟอร์รัส (semiferous tubule) ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Gartner & Hiatt, 2014) และมีการรายงานในหอยนางรม (Eckelbarger & Davis, 1996; Franco et al., 2008) ซึ่งเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างผนังของท่อทำหน้าที่สร้างไมโครฟิลาเมนต์ (microfilament) ที่ประกอบด้วยแอกติน (actin) ทำให้ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์สามารถบีบหรือหดตัวได้ในช่วงที่หอยนางรมมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์

ภาพตัดตามขวางแสดงให้เห็นว่าท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์สามารถจำแนกได้ 2 แบบ ได้แก่ (1) ท่อที่พัฒนาอยู่ด้านในของอวัยวะสืบพันธุ์ จะพบกระจายอยู่ทั่วไปในบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิลและต่อมสร้างน้ำย่อย ลักษณะเด่นของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบนี้คือผนังท่อที่มีลักษณะแบนบางสม่ำเสมอ การสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะเริ่มจากผนังท่อเข้าสู่กลางท่อ และ (2) ท่อที่พัฒนาอยู่รอบนอกของอวัยวะสืบพันธุ์ จะพบบริเวณขอบด้านนอกของอวัยวะสืบพันธุ์เท่านั้น ลักษณะเด่นของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบนี้คือ ผนังท่อที่มีลักษณะไม่สม่ำเสมอ กล่าวคือผนังท่อด้านที่ใกล้กับเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิลจะพบเนื้อเยื่อบุผิวชนิด simple cuboidal ciliated

epithelium ไม่พบการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ผนังท่อด้านนี้ และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ จะพบเฉพาะบริเวณผนังท่อด้านที่หันเข้าหาต่อมสร้างน้ำย่อยเท่านั้น การพบเนื้อเยื่อเยื่อผนังชนิด simple cuboidal ciliated epithelium แสดงให้เห็นว่าท่อดังกล่าวทำหน้าที่ช่วยในการ โบกพัดเซลล์ สืบพันธุ์หรืออสุจิที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วให้ออกสู่ช่องปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (gonopore) ที่อยู่ด้านข้าง ของลำตัว เช่นเดียวกับที่พบในหอยนางรม *C. virginica* (Galtsoff, 1964) และ *C. gigas* (Franco et al., 2008) ส่วนอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของคนจะพบเนื้อเยื่อเยื่อผนังชนิด simple cuboidal epithelium ซึ่ง ไม่มีซิเลียที่ท่อนำน้ำเชื้อส่วน tubuli recti และ rete testis (Gartner & Hiatt, 2014) ดังนั้นท่อสร้าง เซลล์สืบพันธุ์แบบที่สอง จึงอาจเรียกว่าท่อนำน้ำเชื้อก็ได้

นอกจากนี้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังพบเซลล์สร้างเมือกแทรกอยู่บริเวณเนื้อเยื่อ ผนัง โดยเซลล์สร้างเมือกทำหน้าที่หลั่งเมือก เพื่อช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิเช่นเดียวกับที่พบ ในหอยนางรม *C. virginica* (Galtsoff, 1964)

## 2. เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیب

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจیبมีรูปแบบเช่นเดียวกับที่ได้อธิบายไว้ ในหอยนางรมหลายชนิด เช่น *C. glomerata* (Dinamani, 1973), *Crassostrea angulate* (Sousa & Oliveira, 1994), *C. virginica* (Galtsoff, 1964; Eckelbarger & Davis, 1996), *C. gigas* (Franco et al., 2008; Kim, Chung, Choi, Lee, and Choi, 2010; Yurchenko, Radashevsky, and Reunov, 2010), *C. gasar* (Paixão et al., 2013) และ *S. forskali* (Panasonphonkul, 2000; Nuurai et al., 2016) กล่าวคือ ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบเซลล์สืบพันธุ์ที่กำลังแบ่งเซลล์ในระยะต่าง ๆ เริ่มจากที่ผนังของ ท่อเข้าสู่กลางท่อ ได้แก่ สเปออร์มาโทโกเนียม สเปออร์มาโทไซต์ สเปออร์มาทิด และสเปออร์มาโทซัว

สเปออร์มาโทโกเนียม (spermatogonium;  $2n$ ) เป็นเซลล์ที่อยู่ใกล้กับฐานของท่อ เกิดจาก เซลล์ต้นกำเนิด (undifferentiated gonial) แบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (Galtsoff, 1964) จากการศึกษาค้นคว้าพบว่าสเปออร์มาโทโกเนียมสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ (1) สเปออร์มาโทโกเนียมชนิดที่ หนึ่ง ฐานของเซลล์จะแบนติดกับฐานของท่อ และ (2) สเปออร์มาโทโกเนียมชนิดที่สอง จะอยู่ถัด จากสเปออร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่งเข้ามาภายในท่อและมีขนาดเล็กกว่าสเปออร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่ง ซึ่งจำนวนชนิดของสเปออร์มาโทโกเนียมสอดคล้องกับการรายงานของ Galtsoff (1964) และ Franco et al. (2008) ส่วนองค์ประกอบภายในไซโทพลาซึมนั้น นอกจากจะพบออร์แกเนลล์ (organelle) หลัก ๆ ภายในเซลล์แล้ว ยังพบว่ามีการสะสมไขมันที่เชื่อมอยู่ใกล้กับไมโทคอนเดรียซึ่งเรียกว่า nuage สอดคล้องกับลักษณะที่พบในเซลล์สเปออร์มาโทโกเนียมของหอยนางรมหลายชนิด แต่ยังไม่เป็นที่ทราบโดยแน่ชัดเกี่ยวกับที่มาของลักษณะดังกล่าวว่าจะเกี่ยวข้องกับนิวเคลียส นิวคลีโอไลส หรือ ไมโทคอนเดรีย จึงมีการใช้ชื่อเรียกแตกต่างกันออกไป เช่น granulo-fibrillar dense bodies (Sousa &

Oliveira, 1994; Nuurai et al., 2016), nuage (Franco et al., 2008) และ nuage-like material (Yurchenko et al., 2010)

สเปออร์มาโทไซต์ระยะแรก (primary spermatocyte; 2n) เกิดจากสเปออร์มาโทโกเนียมแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส โดยช่วงแรกของสเปออร์มาโทไซต์ระยะแรกจะพบลักษณะที่เรียกว่า nuage อยู่ในไซโทพลาซึมเช่นเดียวกับที่พบในหอยนางรม *C. angulate* (Sousa & Oliveira, 1994), *C. gigas* (Franco et al., 2008; Yurchenko et al., 2010) จากภาพตัดตามขวางของเนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสีเมทิลีนบลูพบว่าสามารถจำแนกสเปออร์มาโทไซต์ระยะแรกที่กำลังมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสได้เป็น 4 ระยะย่อย ได้แก่ (1) ระยะเลปโททีน โครมาทินจะขดตัวเป็นจุด ๆ กระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส (2) ระยะไซโกทีน โครมาทินจะขดตัวเป็นแท่งใหญ่และหนาขึ้น (3) ระยะแพคทีน โครมาทินจะขดตัวเป็นแท่งสั้นและหนา และ (4) ระยะดิโพลทีน โครมาทินจะขดตัวเป็นแท่งหนา จนกระทั่งโครโมโซมมีลักษณะไขว้กันประกอบด้วยโครมาทิด 2 แท่ง และเริ่มเคลื่อนที่เข้ามาอยู่ตรงกลางนิวเคลียส ซึ่งลักษณะดังกล่าวคล้ายคลึงกับการศึกษาในหอยหวาน *Babylonia areolata* Link, 1807 (อัมพร ทองกู่เกียรติกุล, เพชรรัตน์ จรัส โสภณ, เสาวภา สวัสดิ์พีระ และวรเทพ มุฑวรณ, 2547) และหอยนางรม *S. forskali* (Panasophonkul, 2000) ส่วนการศึกษาในระดับจุลกายวิภาคทำให้สามารถสังเกตเห็นสเปออร์มาโทไซต์ระยะแรกในระยะโปรเฟสซึ่งนิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างกลม เซโทโรโครมาทินหดสั้นจนเห็นเป็นแท่งโครโมโซม เยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มสลายตัว ในระยะแพคทีนจะพบ synaptonemal complex ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เชื่อมติดระหว่างโฮโมโลกัสโครโมโซม (homologous chromosome) ทำให้โครโมโซมมีการเข้าคู่กันตลอด ในระยะเมทาเฟสจะพบเซนทริโอล เส้นใยสปินเดิล และเยื่อหุ้มนิวเคลียสสลายตัว ลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในหอยนางรม *C. gigas* (Franco et al., 2008; Kim et al., 2010; Yurchenko et al., 2010) และ *S. forskali* (Nuurai et al., 2016)

สเปออร์มาโทไซต์ระยะที่สอง (secondary spermatocyte; n) เกิดจากสเปออร์มาโทไซต์ระยะแรกแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส นิวเคลียสของเซลล์จึงมีขนาดเล็กและกลมมากขึ้น แต่ไม่พบลักษณะของ nuage อยู่ในไซโทพลาซึมของสเปออร์มาโทไซต์ระยะที่สอง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sousa & Oliveira (1994), Franco et al. (2008) และ Yurchenko et al. (2010) จากการศึกษาในระดับจุลกายวิภาคพบว่า ช่วงปลายของสเปออร์มาโทไซต์ระยะที่สองจะเริ่มมี proacrosomal vesicle ปรากฏขึ้น โครงสร้างของ proacrosomal vesicle ประกอบด้วย proacrosomal granule ซึ่งมีกอลจิ คอมเพล็กซ์ล้อมรอบ แสดงให้เห็นว่า proacrosomal vesicle พัฒนามาจากกอลจิ คอมเพล็กซ์ นอกจากนี้ยังมีการสร้างแฟลเจลลัม ซึ่งสังเกตเห็นได้จากโครงสร้างของไมโครทิวบูลที่มีการเรียงตัวแบบ 9+2 และไมโทคอนเดรียมีขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวมีการรายงานไว้ในหอยนางรม



*C. virginica* (Eckelbarger & Davis, 1996), *C. gigas* (Kim et al., 2010; Yurchenko et al., 2010) และ *S. forskali* (Nurrai et al., 2016)

สเปออร์มาทิด (spermatid; n) เกิดจากสเปออร์มาโทไซต์ระยะที่สองแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ในระยะนี้สเปออร์มาทิดจะมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสเปออร์มาโทซัวดังกระบวนการที่เรียกว่า spermiogenesis จึงเป็นระยะที่ไม่มีมีการแบ่งเซลล์ จากการศึกษาพบว่าการพัฒนาของสเปออร์มาทิดสามารถแบ่งได้เป็น 3 ช่วง คือ (1) ในช่วงต้นของสเปออร์มาทิดจะมี proacrosomal vesicle จำนวนมากอยู่ภายในไซโทพลาซึม (2) ในช่วงกลาง proacrosomal granule จะรวมกันเป็น acrosomal granule บรรจุอยู่ใน acrosomal vesicle และเคลื่อนไปติดกับเยื่อหุ้มนิวเคลียส และ (3) ในช่วงท้ายของสเปออร์มาทิดจะพบ acrosomal vesicle อยู่บริเวณส่วนหน้าของนิวเคลียส ส่วนด้านตรงข้ามจะมีไมโทคอนเดรีย และสังเกตเห็น subacrosomal space ซึ่งการพัฒนาของสเปออร์มาทิดทั้ง 3 ระยะ สอดคล้องกับที่มีการอธิบายไว้ในการศึกษาในหอยนางรม *C. angulate* (Sousa & Oliveira, 1994), *C. gigas* (Yurchenko et al., 2010) และ *S. forskali* (Nurrai et al., 2016)

สเปออร์มาโทซัว (spermatozoa; n) หรืออสุจิ (sperm) เกิดจากการที่สเปออร์มาทิดมีการพัฒนาจนกระทั่งเป็นสเปออร์มาโทซัวที่สมบูรณ์ การศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของสเปออร์มาโทซัวของหอยนางรมปากจิบพบว่ามี 3 ส่วน ได้แก่ (1) ส่วนหัว มีนิวเคลียสเป็นรูปทรง barrel-shaped มีอะโครโซมรูปร่างแบบ cup-shaped โดยส่วนปลายสุดของอะโครโซมมี transverse band 3-4 ชั้น สามารถสังเกตเห็น subacrosomal space และ axial rod (2) ส่วนลำตัว ประกอบด้วยไมโทคอนเดรียจำนวน 4 อันอยู่ล้อมรอบเซนทริโอลส่วนต้นและส่วนปลาย และ (3) ส่วนหางหรือแฟลเจลลัมเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า axoneme คือมีไมโครทิวบูลเรียงตัวแบบ 9+2 แสดงว่าสเปออร์มาโทซัวของหอยนางรมปากจิบมีความคล้ายคลึงกับหอยนางรมในวงศ์เดียวกันที่ได้มีการศึกษาไว้ก่อนหน้านี้ ได้แก่ *C. angulate* (Sousa & Oliveira, 1994), *C. virginica* (Eckelbarger & Davis, 1996), *C. gigas* (Kim et al., 2010; Yurchenko, 2010) และ *S. forskali* (Nurrai et al., 2016)

### 3. เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (intra-germinal somatic cells; ISCs)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของสัตว์มีกระดูกสันหลังในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมได้ มีการอธิบายกระบวนการ โครงสร้าง และหน้าที่ของเซลล์ร่างกายที่พบภายในท่อเซมินิเฟอรัสไว้ อย่างชัดเจน โดยเซลล์เซอร์โทไลเป็นเซลล์ที่เลี้ยงทำหน้าที่สร้างและลำเลียงสารอาหารให้กับเซลล์สืบพันธุ์ กำจัดส่วนที่เหลือจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ที่ไม่สมบูรณ์ และผลิตของเหลวเพื่อใช้ในการเคลื่อนที่ของอสุจิ ส่วนเซลล์เลย์ดิกหรือเซลล์อินเตอร์สติเชียล (interstitial cell) เป็นเซลล์ที่แทรกอยู่ระหว่างท่อเซมินิเฟอรัสทำหน้าที่สร้างและหลั่งสเตียรอยด์ฮอร์โมน ได้แก่ เทสโทสเตอโรน ส่วนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังก็มีการศึกษาเกี่ยวกับ

เซลล์ร่างกายที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เรียกว่าเป็น somatic cell (Riesgo et al., 2008) ส่วนในกลุ่มหอยสองฝา ก็มีข้อมูลเกี่ยวกับเซลล์ร่างกายที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เช่นกัน แต่ใช้ชื่อเรียกแตกต่างกันไปเพื่ออธิบายหน้าที่ของเซลล์ดังกล่าว เช่น sertoli-like cells (Dorange & Penneç, 1989); somatic cell (Johnson, Casse, and Penneç, 1996); sertoli cell (Erkan & Sousa, 2002); accessory cell (Kim et al., 2010); intragonadal somatic cell (Franco et al., 2011)

การศึกษาด้านเนื้อเยื่อวิทยาและ โครงสร้างจุลกายวิภาคภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจิบในช่วงที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะพบว่าเต็มไปด้วยเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ และนอกจากนี้ยังพบเซลล์ร่างกายอยู่ภายในท่อด้วย ซึ่งเรียกว่า เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (intragonadal somatic cells; ISCs) เซลล์ชนิดนี้เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสรูปร่างไม่แน่นอนและไม่กลมเหมือนกับนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ โดยพบเซลล์ ISCs ตั้งแต่บริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เข้าไปจนถึงกลางท่อ ลักษณะเด่นอีกประการหนึ่งของเซลล์ ISCs ก็คือจะพบอยู่ติดกับเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ และจะสามารถพบเซลล์ ISCs ได้มากในระยะเริ่มต้นของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยสามารถจำแนกเซลล์ ISCs ได้เป็น 2 ชนิด คือ เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่ง (intragonadal somatic cell type I; ISC type I) และ เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่สอง (intragonadal somatic cell type II; ISC type II)

เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่ง (ISC type I) พบได้มากที่บริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์และพบการกระจายตัวเข้าไปจนถึงกลางท่อ โดยเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสรูปร่างไม่แน่นอน ภายในไซโทพลาซึมของเซลล์ ISC type I ประกอบด้วย ไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ กอลจิ คอมเพล็กซ์ เวสซิเคิล ไลโซโซม ฟาโกไลโซโซม และแกรนูลเล็ก ๆ จำนวนมาก การพบเอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ กอลจิ คอมเพล็กซ์ และแกรนูลจำนวนมากภายในเซลล์ แสดงให้เห็นว่าเซลล์ชนิดนี้ทำหน้าที่สร้างไลโซโซม เพื่อช่วยในการย่อย residual body ที่เหลือจากสเปิร์มาทิด โดยสังเกตได้จาก การพบฟาโกไลโซโซมจำนวนมากภายในเซลล์ โดยเฉพาะบริเวณฐานของเซลล์ที่อยู่ติดกับท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และการศึกษาในหอยนางรมปากจิบครั้งนี้พบว่ามี residual body ของสเปิร์มาทิด หลุดเข้ามาในไซโทพลาซึมของเซลล์ ISC type I แสดงให้เห็นว่าเซลล์ ISC type I ทำหน้าที่กำจัดส่วนที่เหลือจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อให้สเปิร์มาทิดลดขนาดและพัฒนาเป็นสเปิร์มาโทซัวที่สมบูรณ์ได้ ซึ่งหน้าที่ดังกล่าวนี้สอดคล้องกับหน้าที่ของเซลล์เซอร์โทไลที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Hess & França, 2005)

นอกจากนี้ยังมีรายงานเกี่ยวกับเซลล์ที่มีลักษณะดังกล่าวในหอยสองฝาหลายชนิด เช่น พบเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอนแทรกอยู่ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ที่บริเวณฐานของท่อเข้าสู่ด้านลูเมน มีนิวเคลียสรูปร่างไม่แน่นอนและอาจพบนิวเคลียส 2-3 อัน มีไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม กอลจิ คอมเพล็กซ์ ไรโบโซม ไมโครทิวบูล ฟาโกไลโซโซม เม็ดไกลโคเจน และเวสิเคิลที่มีลักษณะคล้ายน้ำมัน (lipid vesicle) ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาบ *Spisula subtruncata* (Erkan & Sousa, 2001), *P. rudis* และ *C. gallina* (Erkan & Sousa, 2002) และหอยนางรม *C. gigas* (Franco et al., 2008; Kim et al., 2010) นอกจากนี้ตามรายงานของ Franco et al. (2011) พบว่าในระยะที่ 0 (ระยะพักตัว) จนถึงระยะที่ 1 (ระยะเริ่มพัฒนาการ) จะพบฟาโกไลโซโซมจำนวนมากภายในไซโทพลาซึมของ intragonadal somatic cells (ISCs) ซึ่งคาดว่าเซลล์ชนิดนี้จะเกี่ยวข้องกับการกำจัด residual body ที่มาจากสเปอร์มาทิด และยังช่วยกำจัดเซลล์สืบพันธุ์ที่มีลักษณะผิดปกติอีกด้วย

เซลล์คำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่สอง (ISC type II) พบได้มากที่บริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีนิวเคลียสรูปร่างไม่แน่นอน มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ลักษณะเด่นของเซลล์ ISC type II คือพบแกรนูลขนาดเล็กคล้ายกับเม็ดไกลโคเจนจำนวนมากกระจายอยู่ในไซโทพลาซึม นอกจากนี้ยังพบไมโทคอนเดรียอีกด้วย เมื่อพิจารณาตามลักษณะโครงสร้างและองค์ประกอบในไซโทพลาซึมของเซลล์ เซลล์ ISC type II นี้อาจทำหน้าที่เป็น storage cell คือมีหน้าที่สะสมอาหารเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยแกรนูลขนาดเล็กที่กระจายอยู่ในไซโทพลาซึมมีลักษณะคล้ายคลึงกับเม็ดไกลโคเจนที่พบในเซลล์เซอโทไลของหอยสองฝานชนิดอื่น ๆ เช่น *Loripes lucinalis* (Johnson et al., 1996), *Cerastoderma glaucum* (Erkan & Sousa, 2001), *P. rudis* และ *C. gallina* (Erkan & Sousa, 2002) และในหอยนางรม *C. gigas* (Kim et al., 2010; Franco et al., 2011) ซึ่งตามรายงานของ Kim et al. (2010) จะเรียกเซลล์นี้ว่าเซลล์ pleomorphic accessory ทำหน้าที่ให้สารอาหารแก่เซลล์สืบพันธุ์ที่กำลังพัฒนา โดยเฉพาะในสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกและสเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สองจะพบว่าเม็ดไกลโคเจนจำนวนมากอยู่ในไซโทพลาซึมของเซลล์ pleomorphic accessory

ส่วนการเชื่อมติดกันของเซลล์ (cell junction) ระหว่างเซลล์ ISCs type I กับเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบมีลักษณะคล้ายกับ zonula adheren หรือ adheren junction เป็นการยึดกันระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยไกลโคโปรตีนในกลุ่ม cadherin ซึ่งต้องใช้แคลเซียมไอออนในการยึดติด ถ้าแคลเซียมไอออนไม่เพียงพอก็จะหลุดออกจากกันได้ (Hartsock & Nelson, 2008) ซึ่งเซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะมีการเปลี่ยนรูปร่าง และเมื่อถึงระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ สเปอร์มาโทซัวก็จะเคลื่อนที่ออกจากท่อ การเชื่อมติดกันระหว่างเซลล์ ISCs type I กับเซลล์

สปีพันธุจึงเป็นการยึดเกาะแบบไม่เสถียร แต่ในการศึกษาครั้งนี้ยังไม่พบการเชื่อมติดกันระหว่างเซลล์ ISC type II กับเซลล์สปีพันธุ และการเชื่อมติดกันระหว่างเซลล์ ISCs กับเซลล์ ISCs ที่ชัดเจน โดยการศึกษาในกลุ่มหอยสองฝาก่อนหน้านี้มีการรายงานว่าพบ desmosome-like junction ระหว่างเซลล์เซอโทไลกับสเปอร์มาโทโกเนียมและระหว่างเซลล์เซอโทไลกับสเปอร์มาโทไซต์ (Erkan & Sousa, 2002) ส่วนในหอยนางรม *C. gigas* พบว่ามี adhesive junction ระหว่างเซลล์เซอโทไลกับเซลล์เซอโทไล (Franco et al., 2011) แต่ก็ยังไม่มีการอธิบายหน้าที่ของจังก์ชันที่พบดังกล่าวอย่างชัดเจน

## สรุปผลการวิจัย

หอยนางรมปากจิบจะเริ่มมีการพัฒนาอวัยวะสปีพันธุเมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ โดยท่อสร้างเซลล์สปีพันธุจะแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณระหว่างเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิลกับต่อมสร้างน้ำย่อย มีเซลล์ vesicular connective tissue (VCT) ซึ่งมีแกรนูลไกลโคเจนทำหน้าที่เป็นแหล่งพลังงานอยู่ล้อมรอบท่อ ผนังของท่อสร้างเซลล์สปีพันธุเป็นชั้นแบนบางมีเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างผนังของท่อทำหน้าที่สร้างไมโครฟิลาเมนต์ช่วยให้ท่อสามารถบีบหรือหดตัวได้ ท่อสร้างเซลล์สปีพันธุแบ่งเป็น 2 แบบ ได้แก่ ท่อที่พัฒนาอยู่ด้านในของอวัยวะสปีพันธุ และท่อที่พัฒนาอยู่รอบนอกของอวัยวะสปีพันธุ โดยผนังท่อที่อยู่รอบนอกติดกับเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิลจะเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิด simple cuboidal ciliated epithelium เป็นท่อนำน้ำเชื้อช่วยในการโบกพัดเซลล์สปีพันธุที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วออกสู่ช่องปล่อยเซลล์สปีพันธุที่อยู่ด้านข้างลำตัว และมีเซลล์สร้างเมือกทำหน้าที่หลั่งเมือกช่วยในการเคลื่อนที่ของเซลล์อสุจิ

ภายในท่อสร้างเซลล์สปีพันธุพบเซลล์สปีพันธุในระยะต่าง ๆ ได้แก่

1. สเปอร์มาโทโกเนียม เป็นเซลล์ที่อยู่บริเวณฐานของท่อ แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ
  - 1.1 สเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่ง ฐานของเซลล์จะแบนติดกับฐานของท่อนิวเคลียสค่อนข้างกลมขนาด  $4.9 \times 6.2$  ไมโครเมตร มีนิวคลีโอลัส 1-2 อัน ไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ และ nuage
  - 1.2 สเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่สอง อยู่ถัดจากสเปอร์มาโทโกเนียมชนิดที่หนึ่ง มีนิวเคลียสค่อนข้างกลมขนาด  $3.8 \times 4.7$  ไมโครเมตร มีนิวคลีโอลัส 1-2 อัน ไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ และ nuage
2. สเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก อยู่ถัดจากสเปอร์มาโทโกเนียม นิวเคลียสค่อนข้างกลมขนาด  $3.5 \times 4.1$  ไมโครเมตร เชื้อหุ้มนิวเคลียสเริ่มสลายตัวและไม่พบนิวคลีโอลัส มีไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ และ nuage ซึ่งสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกมีการแบ่งเซลล์แบบ

ไมโอซิส พบเซลล์ในระยะโพรเฟส แบ่งเป็นระยะย่อย ๆ คือ ระยะเลปโททีน ระยะไซโกทีน ระยะแพคทีน และระยะดิโพลทีน โดยระยะแพคทีนจะพบ synaptonemal complex ส่วนระยะเมทาเฟส เยื่อหุ้มนิวเคลียสจะสลายตัว พบเซนทริโอลและเส้นใยสปินเดิล

3. สเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง อยู่ถัดจากสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก นิวเคลียสมีรูปร่างกลมขนาด 3.4 ไมโครเมตร มีไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ แต่ไม่พบ nuage เริ่มสังเกตเห็น proacrosomal vesicle และแฟลเจลลัมที่ประกอบด้วยไมโครทิวบูล เรียงตัวแบบ 9+2

4. สเปอร์มาทิด อยู่ถัดจากสเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง นิวเคลียสมีรูปร่างกลมขนาด 2.2 ไมโครเมตร ซึ่งสเปอร์มาทิดจะมีการพัฒนาไปเป็นสเปอร์มาโทซัว โดยโครโมโซมเริ่มขดตัวแน่นขึ้น ไซโทพลาซึมมีขนาดเล็กลง ไมโทคอนเดรียมีขนาดใหญ่ขึ้น ระยะสเปอร์มาทิดแบ่งเป็น 3 ช่วง คือ ช่วงต้นจะพบ proacrosomal vesicle จำนวนมาก ช่วงกลางจะพบ proacrosomal vesicle รวมกันเป็น acrosomal vesicle เคลื่อนที่เข้าใกล้ส่วนหน้าของนิวเคลียส และช่วงท้ายจะพบ acrosomal vesicle อยู่ติดกับเยื่อหุ้มนิวเคลียส ส่วนไมโทคอนเดรียจะเคลื่อนมาอยู่ส่วนท้ายของนิวเคลียส ซึ่งสังเกตเห็น subacrosomal space

5. สเปอร์มาโทซัวหรืออสุจิ อยู่ถัดจากสเปอร์มาทิด มีนิวเคลียสรูปทรง barrel-shaped ขนาด 1.8 ไมโครเมตร มีอะโครโซมรูปร่าง cup-shaped ซึ่งมี transverse band 3-4 ชั้น สังเกตเห็น subacrosomal space และ axial rod มีไมโทคอนเดรียจำนวน 4 อันอยู่ล้อมรอบเซนทริโอลส่วนต้น และส่วนปลาย และมีแฟลเจลลัมที่มีไมโครทิวบูลเรียงตัวแบบ 9+2

นอกจากนี้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้นของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังพบเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ร่างกาย เรียกว่า เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (ISCs) แบ่งเป็น 2 ชนิด ได้แก่

1. เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่หนึ่ง (ISC type I) พบที่บริเวณฐานของท่อ ไปจนถึงกลางท่อและมีเซลล์สืบพันธุ์แทรกอยู่ด้วย เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอน มีไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมแบบขรุขระ กอลจิ คอมเพล็กซ์ เวสซิเคิล ไลโซโซม และฟาโกไลโซโซม ซึ่ง ISC type I อาจทำหน้าที่คล้ายกับเซลล์เซอโทไลด์โดยช่วยกำจัดส่วนที่เหลือจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

2. เซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ชนิดที่สอง (ISC type II) พบที่บริเวณฐานของท่อ ไปจนถึงกลางท่อและมีเซลล์สืบพันธุ์แทรกอยู่ด้วย เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอน มีไมโทคอนเดรีย และแกรนูลเล็ก ๆ จำนวนมาก โดยแกรนูลดังกล่าวมีลักษณะคล้ายกับเม็ดไกลโคเจน แสดงว่า ISC type II อาจจะทำหน้าที่เป็น storage cell สะสมอาหารเพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

การเชื่อมติดกันของเซลล์ระหว่างเซลล์ ISC type I กับเซลล์สปีพันธุมีลักษณะคล้ายกับ zonula adheren หรือ adheren junction แต่ยังไม่พบการเชื่อมติดกันระหว่างเซลล์ ISC type II กับเซลล์สปีพันธุ และการเชื่อมติดกันระหว่างเซลล์ ISCs กับเซลล์ ISCs และไม่สามารถอธิบายหน้าที่ของจังก์ชันที่พบดังกล่าวได้อย่างชัดเจน

### ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับโครงสร้างเซลล์สปีพันธุในระยะต่าง ๆ ภายในท่อสร้างเซลล์สปีพันธุเพศผู้ เพื่อเป็นการรวบรวมข้อมูลและรายละเอียดให้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น
2. ควรมีการศึกษาเพื่อตรวจสอบเกี่ยวกับโครงสร้างและองค์ประกอบภายในเซลล์ของเซลล์ค้ำจุนที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สปีพันธุทั้ง 2 ชนิด เพื่อช่วยในการอธิบายหน้าที่และการทำงานของเซลล์ดังกล่าว

## บรรณานุกรม

- กนกธร ปิยธำรงรัตน์. (2546). *เนื้อเยื่อวิทยา*. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.
- คเชนทร เฉลิมวัฒน์ และวรรณภา กสิฤกษ์. (2540). *รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ การศึกษาวงจรสืบพันธุ์ของหอยสองฝาบางชนิดที่พบมากบริเวณชายหาดบางแสนและอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี*. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา.
- คเชนทร เฉลิมวัฒน์. (2544). *การเพาะเลี้ยงหอย*. กรุงเทพฯ: ไร่เขียว.
- ชุตินันท์ ศรีสัมพันธ์. (2544). *วงสืบพันธุ์ของหอยแครง (Anadara granosa L.) จากบริเวณเมืองใหม่ จังหวัดชลบุรี*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาชีววาริชศาสตร์, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ธีรยา ช่วยสุรินทร์, ณัฐพงศ์ ต้นสาถิ และศิระ ธนาพล. (2549). *ฤดูกาลความสมบูรณ์เพศของหอยตะโกรมในแหล่งเลี้ยงอ่าวบ้านคอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี*. สุราษฎร์ธานี: ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งสุราษฎร์ธานี.
- วนิดา ไตรพาณิชย์กุล. (2550). *จุลกายวิภาคศาสตร์ของอวัยวะในระบบร่างกาย*. กรุงเทพฯ: ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.
- สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. (2546). *คู่มือการเพาะและอนุบาลหอยนางรมสำหรับการเลี้ยง*. กรุงเทพฯ: สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- สิริธร กิ่งเส้ง และชัชวาล หมื่นโพธิ์. (2555). *ระยะสืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ Perna viridis (Linnaeus, 1758) ในอ่าวปัตตานี จังหวัดปัตตานี ระหว่างเดือนพฤษภาคม-สิงหาคม*. ใน *การประชุมวิชาการแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน ครั้งที่ 9* (หน้า 1397-1404). นครปฐม: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน.
- สุใจ รัตนยุวกร และพวงผกา บำรุงราษฎร์. (2551). *พัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเสียบ Donax faba (Gmelin, 1791) บริเวณหาดวอนนภา บางแสน จังหวัดชลบุรี*. ใน *การประชุมวิชาการประมง ประจำปี 2551* (หน้า 238-246). กรุงเทพฯ: กรมประมง.
- อัมพร ทองกู่เกียรติกุล, เพชรรัตน์ จรัสโสภณ, เสาวภา สวัสดิ์พีระ และวรเทพ มุฑุวรรณ. (2547). *กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยหวาน (Babylonia areolata) Link, 1807*. *วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา*, 9(1-2), 31-35.

- Bertazzi, G. D., & Domínguez, F. G. (2005). Reproductive cycle of the Rock oyster *Hyotissa hyotis* (Linné, 1758) (Griphaeidae) at the La Ballena Island, Gulf of California, México. *Journal of Shellfish Research*, 24(4), 987-993.
- Bliss, T., & Walker, R. (2012). Reducing the minimal-legal harvest size of oysters in Georgia. Retrieved from [http://www.oyster-restoration.org/wp-content/uploads/2012/06/Occasional\\_Paper\\_Vol.\\_14\\_Minimal\\_harvest\\_size\\_of\\_Oysters.pdf](http://www.oyster-restoration.org/wp-content/uploads/2012/06/Occasional_Paper_Vol._14_Minimal_harvest_size_of_Oysters.pdf)
- Cárdenas, E. R. B., Aranda, D. A., Sevilla, M. L., & Espinosa P. F. R. (2007). Variations in the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), Pueblo Viejo lagoon, Veracruz, Mexico. *Transitional Waters Bulletin*, 2, 37-46.
- Choi, K. S. (2008). Oyster capture-based aquaculture in the Republic of Korea. In A. Lovatelli, & P. F. Holthus (Eds). *Capture-based aquaculture: Global overview* (pp. 271-278). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Chung, E. Y. (2008). Ultrastructure of germ cells, the Leydig cells, and Sertoli cells during spermatogenesis in *Boleophthalmus pectinirostris* (Teleostei, Perciformes, Gobiidae). *Tissue and Cell*, 40(3), 195-205.
- Coe, W. R. (1931). Spermatogenesis in the California oyster (*Ostrea lurida*). *Biological Bulletin*, 61(3), 300-315.
- Dangwatanakul, R. (1992). *Reproductive biology of the Large oyster Crassostrea belcheri in Thailand*. Master's thesis, Technology of Environment Management, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.
- Díaz, M. E., Pouvreau, S., Villalba, J. C., & Pennec, M. L. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: evidence of an environment-dependent strategy. *Aquaculture International*, 17(5), 491-506.
- Dinamani, P. (1973). Reproductive cycle and gonadial changes in the New Zealand Rock oyster *Crassostrea glomerata*. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 8(1), 39-65.
- Dorange, G., & Pennec, M. L. (1989). Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in *Pecten maximus* (Mollusca, Bivalvia). *Invertebrate Reproduction and Development*, 152, 109-117.



- Eckelbarger, K. J., & Davis, C. V. (1996). Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. II. Testis and spermatogenesis. *Marine Biology*, 127, 89-96.
- Erkan, M., & Sousa, M. (2001). Ultrastructure of spermatogenesis in *Cerastoderma glaucum* (Cardiacea) and *Spisula subtruncata* (Mactracea). *Invertebrate Reproduction and Development*, 40(2-3), 227-238.
- Erkan, M., & Sousa, M. (2002). Fine structural study of the spermatogenic cycle in *Pitar rudis* and *Chamelea gallina* (Mollusca, Bivalvia, Veneridae). *Tissue and Cell*, 34(4), 262-272.
- Franco, A., Berthelin, C. H., Goux, D., Sourdain, P., & Mathieu, M. (2008). Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue and Cell*, 40, 251-260.
- Franco, A., Kellner, K., Goux, D., Mathieu, M., & Berthelin, C. H. (2011). Intragonadal Somatic Cells (ISCs) in the male oyster *Crassostrea gigas*: Morphology and contribution in germinal epithelium structure. *Micron*, 42, 718-725.
- Galtsoff, P. S. (1964). *The American Oyster Crassostrea virginica Gmelin*. Washington, D.C.: United States Government Printing Office.
- Gartner, L. P., & Hiatt, J. L. (2014). *Color Atlas and Text of Histology* (6<sup>th</sup> Ed.). Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.
- Gomes, C. H. A. M., Silva, F. C., Lopes, G. R., & Melo, C. M. R. (2014). The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. *Brazilian Journal of Biology*, 74(4), 967-976.
- Hartsock, A., & Nelson, W. J. (2008). Adherens and tight junctions: Structure, function and connections to the Actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*, 1778(3), 660-669.
- Hayes, P. F., & Menzel, R. W. (1981). The reproductive cycle of early setting *Crassostrea virginica* (Gmelin) in the Northern Gulf of Mexico, and its implication for population recruitment. *The Biological Bulletin*, 160, 80-88.
- Hess, R. A., & França, L. R. (2005). Structure of the Sertoli cell. In M. K. Skinner, & M. D. Griswold (Eds.), *Sertoli Cell Biology* (pp. 19-40). London: Elsevier Academic Press.

- Jaramillo, C. R., Hurtado, M. A., Vivas, E. R., Ramírez, J. L., Manzano, M., & Palacios, E. (2008). Gonadal development and histochemistry of the Tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. *Journal of Shellfish Research*, 27(5), 1129-1141.
- Johnson, M. J., Casse, N., & Pennec, M. L. (1996). Spermatogenesis in the Endosymbiont-bearing Bivalve *Loripes lucinalis* (Veneroidea: Lucinidae). *Molecular Reproduction and Development*, 45, 476-484.
- Kang, S. G., Choi, K. S., Bulgakov, A. A., Kim, Y., & Kim, S. Y. (2003). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) used in quantification of reproductive output in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*, in Korea. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 282, 1-21.
- Kim, J. H., Chung, E. Y., Choi, K. H., Lee, K. Y., & Choi, M. S. (2010). Ultrastructure of the testis and germ cell development during spermatogenesis in male *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae) in Western Korea. *Korean J. Malacol*, 26(3), 235-244.
- Li, Q., Liu, W., Shirasu, K., Chen, W., & Jiang, S. (2006). Reproductive cycle and biochemical composition of the Zhe oyster *Crassostrea plicatula* Gmelin in an eastern coastal bay of China. *Aquaculture*, 261, 752-759.
- Loor, A., & Sonnenholzner, S. (2014). Reproductive cycle of the Rock oyster, *Striostrea prismatica* (Gray, 1825) from two locations on the southern coast of Ecuador. *Aquaculture Research*, 1-11.
- Lorio, W. J., & Malone, S. (1994, October). The cultivation of American oysters (*Crassostrea virginica*). *SRAC Publication*, 432, 1-8.
- Mondol, M. R., Kim, C. W., Kim, B. K., Kang, C. K., & Choi, K. S. (2012). Early growth and reproduction of hatchery-produced Pacific oyster *Crassostrea gigas* in Gamakman Bay off the southern coast of Korea. *The Japanese Society of Fisheries Science*, 78, 1285-1292.
- Nabhitabhata, J. (2009). *Checklist of Mollusca Fauna in Thailand*. Bangkok: Office of Natural Resources and Environmental Policy and Planning.

- Ngo, T. T. T., Kang, S. G., & Choi, K. S. (2002). Seasonal changes in reproductive condition of the Pacific oysters, *Crassostrea gigas* (Thunberg) from suspended culture in Gosung Bay, Korea. *Korean Journal of Environmental Biology*, 20, 268-275.
- Nurrai, P., Panasophonkul, S., Tinikul, Y., Sobhon, P., & Wanichanon, R. (2016). Spermatogenesis in the Rock oyster, *Saccostrea forskali* (Gmelin, 1791). *Tissue and Cell*, 48, 43-48.
- Paixão, L., Ferreira, M. A., Nunes, Z., Sizo, F. F., & Rocha, R. (2013). Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the Mangrove oyster (*Crassostrea gasar*): Implications for the collection of broodstock oysters. *Aquaculture*, 6(12), 380-383.
- Panasophonkul, S. (2000). *Spermatogenesis and chromatin condensation in the male germ cells of a marine oyster, Saccostrea forskali Gmelin*. Master's thesis, Anatomy, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University.
- Poutiers, J. M. (1998). Bivalves (Acephala, Lamellibranchia, Pelecypoda). In K. E. Carpenter, & V. H. Niem (Eds), *The living marine resource of the Western Central Pacific: Volume 1. Seaweeds, corals, bivalves and gastropods* (pp. 123-362). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Powell, E. N., Ormond, E. A. W., & Choi, K. S. (1993). Gonadal analysis - *Crassostrea virginica*. In G. G. Lauenstein, & A.Y. Cantillo (Eds.), *NOAA Technical Memorandum NOS ORCA 71* (pp. 11.55-11.62). Silver Spring, MD: National Oceanic and Atmospheric Administration.
- Quayle, D. B., & Newkirk, G. F. (1989). *Farming bivalve molluscs: Methods for study and development*. Canada: The International Development Research Centre.
- Ren, J. S., Marsden, I. D., Ross, A. H., & Schiel, D. R. (2003). Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 37, 171-182.
- Riesgo, A., Maldonado, M., & Durfort, M. (2008). Occurrence of somatic cells within the spermatid cysts of demosponges: A discussion of their role. *Tissue and Cell*, 40, 387-396.

- Sousa, M., & Oliveira, E. (1994). An ultrastructural study of *Crassostrea angulata* (Mollusca, Bivalvia) spermatogenesis. *Marine Biology*, 120, 545-551.
- Sukumar, P., & Joseph, M. M. (1988) Annual reproductive cycle of the Rock oyster *Saccostrea cucullata* (von Born). In *Proceedings of the First Indian Fisheries Forum* (pp. 207-210). Mangalore, India: Asian Fisheries Society Indian Branch.
- Yoosukh, W., & Duangdee, T. (1999). Living oyster in Thailand. *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, 19(2), 363-370.
- Yurchenko, O. V., Radashevsky, V. I., & Reunov, A. A. (2010). Ultrastructural study of spermatogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae) from the Sea of Japan. *Invertebrate Zoology*, 7(1), 55-69.

ภาคผนวก

## การเตรียมน้ำยาคงสภาพเนื้อเยื่อ

### สารละลายบูแองส์ (Bouin's fluid)

ชั่งกรดพิคริก 1.2 กรัม ละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตร คนให้ละลาย ตวงสารละลายกรดพิคริกที่ได้ 75 มิลลิลิตร เติมฟอร์มาลิน 25 มิลลิลิตร และกรดแอสติกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร

## การเตรียมสีย้อมฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน

### สีย้อมฮีมาทอกซิลิน (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

#### Stock solution I

|                                    |    |           |
|------------------------------------|----|-----------|
| potassium aluminium sulfate (alum) | 5  | กรัม      |
| น้ำกลั่น                           | 50 | มิลลิลิตร |

#### Stock solution II

|                  |     |           |
|------------------|-----|-----------|
| absolute alcohol | 5   | มิลลิลิตร |
| haematoxylin     | 0.5 | กรัม      |

#### Stock solution III (1% Sodium Iodate)

|               |     |           |
|---------------|-----|-----------|
| Sodium iodate | 0.1 | กรัม      |
| น้ำกลั่น      | 10  | มิลลิลิตร |

1. เตรียม Stock solution I โดยผสม potassium aluminium sulfate (alum) 5 กรัม กับน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ต้มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส พร้อมคนด้วย magnetic bar ที่ 550 รอบต่อนาที
2. เติม Stock solution II ต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พร้อมคนด้วย magnetic bar ที่ 550 รอบต่อนาที จนกระทั่งเป็นสีม่วงเข้ม (ประมาณ 10 นาที)
3. เติม Stock solution III 1.5 มิลลิลิตร ต้มต่อจนได้สีม่วงเข้ม (ประมาณ 2-3 นาที)
4. ทำให้เย็นลง เติม glacial acid 1 มิลลิลิตร แล้วนำมากรองก่อนนำไปใช้

### สีย้อมอีโอซิน (ปริมาตร 50 มิลลิลิตร)

ชั่ง Eosin yellowish 0.25 กรัม เติม 70% ethanol 50 มิลลิลิตร แล้วคนให้ละลาย