รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย: โครงสร้างจุลกายวิภาคเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียและเพศผู้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ
(Ultrastructure of oogenesis and spermatogenesis in gonad of the Cupped oyster)

สุทิน กิ่งทอง

Sutin Kingtong

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้

จากกองทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยบูรพา

ประจำปี พ.ศ. 2558

สัญญาเลขที่ 9/2558

โครงการวิจัย: โครงสร้างจุลกายวิภาคเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียและเพศผู้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ
(Ultrastructure of oogenesis and spermatogenesis in gonad of the Cupped oyster)

สุทิน กิ่งทอง
Sutin Kingtong

สิงหาคม 2559

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร
(Executive Summary)

ข้าพเจ้า ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิน กิ่งทอง ได้รับทุนสนับสนุนโครงการวิจัย ประเภทงบประมาณเงินรายได้จากกองทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยบูรพา
โครงการวิจัยเรื่อง:

โครงสร้างจุลกายวิภาคเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียและเพศผู้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ

Ultrastructure of oogenesis and spermatogenesis in gonad of the Cupped oyster

สัญญาเลขที่ 9/2558
ระยะเวลาการดำเนินงาน 1 ปี 9 เดือน ระหว่างวันที่ 1 ตุลาคม พ.ศ. 2558 – วันที่ 30 กรกฎาคม พ.ศ. 2559

ผลผลิต

ผลงานวิจัยที่ได้รับเงินทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยที่แล้วเสร็จในบางส่วนได้รับการนำเสนอในงานประชุมวิชาการที่มีผู้ทรงคุณวุฒิร่วมกลั่นกรอง และบทความฉบับสมบูรณ์ (Full Paper) ได้รับการตีพิมพ์ในรายงานสืบเนื่องจากการประชุมวิชาการ (Proceedings) โดยประกาศกิตติคุณแก่มหาวิทยาลัยในทุกกรณี โดยได้นำเสนอผลงานในงานประชุมระดับชาติวิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 7 ที่ มหาวิทยาลัยนเรศวร ดังนี้

รัตนชาติ คิ้วสกุลกาญจน์, วิไลภรณ์ นุ่นสพ, และ สุทิน กิ่งทอง*. (2558). กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระยะต้นของหอยนางรมปากจีบ. ใน *การประชุมวิชาการระดับชาติ วิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 7*. พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยนเรศวร. (รายละเอียดดังภาคผนวก)

นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ผลยังมีผลการศึกษาเรื่อง Ultrastructure of oogenesis in the Hooded oyster *Saccostrea cucullata* from the coastal water of Thailand ที่กำลังเตรียมพร้อมสำหรับการตีพิมพ์อีก 1 เรื่อง

ประโยชน์ที่ได้รับ

ด้านวิชาการ ได้ข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับการผลิตเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียของหอยนางรมปากจีบที่พบในจังหวัดชลบุรี ซึ่งข้อมูลที่ได้จะเป็นประโยชน์ต่อการวิจัยเพื่อพัฒนาต่อยอดการเพิ่มผลผลิตการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในเขตจังหวัดชลบุรีและจังหวัดอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

ด้านนโยบาย งานวิจัยชิ้นนี้ช่วยส่งเสริมการหาแม่พันธุ์ดีซึ่งมีความสำคัญต่อการส่งเสริมการเพาะเลี้ยงหอยนางรม และจะนำไปสู่การพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงหอยนางรม โดยสามารถยกระดับการเพาะเลี้ยงโดยไม่ต้องอาศัยลูกอ่อนหอยนางรมจากธรรมชาติเพียงอย่างเดียว แต่สารถเพาะเลี้ยงได้เอง ดังนั้นด้านนโยบายอาจจะส่งเสริมให้เกษตรกรเพาะเลี้ยงลูกอ่อนหอยนางรมโดยทำการคัดเลือกเพาะพ่อแม่พันธุ์ที่คุณภาพน้ำเชื้อดีต่อไป

ด้านเศรษฐกิจ/พาณิชย์ การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบถึงพัฒนาการในระยะต่าง ๆ ของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมียของหอยนางรมปากจีบ ซึ่งคาดว่าจะทำให้เห็นลักษณะของแม่พันธุ์ที่ดี และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการคัดเลือกแม่พันธุ์เพื่อใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงหอยนางรมเชิงพาณิชย์ต่อไปในอนาคต

ด้านสังคมและชุมชน เนื่องจากปัจจุบันการเพาะเลี้ยงหอยนางรมจะใช้วิธีการเก็บหอยตัวอ่อนจากธรรมชาติ ซึ่งมีความแปรปรวนสูงดังที่กล่าวไปแล้วนั้น ดังนั้นหากสามารถเลือกแม่พันธุ์ที่มีคุณภาพดี มีความสมบูรณ์พันธุ์ เพื่อใช้ผสมเทียมสำหรับเพาะพันธุ์ตัวอ่อนหอยนางรมก็จะทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในประเทศได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความพยายามที่จะศึกษาลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในระบบเพาะเลี้ยงหอยนางรมต่อไป ซึ่งในระยะยาวจะเป็นการสร้างประโยชน์ให้เกษตรกรในชุมชนเพาะเลี้ยงหอยนางรม

เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้จะนำไปพัฒนาเพื่อหาวิธีตรวจสอบหาแม่พันธุ์ดีสำหรับการเพาะเลี้ยงหอยนางรมในอนาคต นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ยังเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาชีวิทยาของกลไกลการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในกลุ่มหอยสองฝาที่ปฏิสนธิโดยการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกสู่ภายนอก (spawner)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณนางสาววิไลภรณ์ นุ่นสพ สาขาการสอนชีววิทยา คณะศึกษาศาสตร์ และนางสาวรัตนชาติ คิ้วสกุลกาญจน์ หลักสูตรวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์ สาขาชีววิทยาศึกษา มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้ตั้งใจ พากเพียร ร่วมทำงานวิจัยชิ้นนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ดี

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณกองทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปี พ.ศ. 2558 เลขที่สัญญา 9/2558

สิงหาคม 2559
สุทิน กิ่งทอง

โครงสร้างจุลกายวิภาคเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียและเพศผู้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของศึกษาในครั้งนี้คือศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียและเพศผู้ในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) ร่วมกับเทคนิคมิญวิทยา ผลการศึกษาพบว่าหอยนางรมมีเพศแยก การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศผู้และเพศเมียพบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal tubule) ซึ่งอยู่ภายในอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) โดยพบอวัยวะสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียเชื่อมติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ระหว่างต่อมย่อยอาหารกับแมนเทิล เพศเมียพบเซลล์ไข่ถายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนาจะอยู่ติดกับฐานของท่อและมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากมีการสะสมอาหารในไซโทพลาซึมมากขึ้นในรูปของโปรตีนและไขมัน ไข่ที่พัฒนาสมบูร์แล้วจะมีการพัฒนาชั้น envelop คลุมเซลล์ไข่ตลอดทั้งเซลล์ ในหอยนางรมปากจีบไข่ที่พร้อมปฏิสนธิอยู่ในระยะ Primary oocyte และจะเริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเมื่อได้รับการผสมกับเซลล์อสุจิ สำหรับในเพศผู้จะพบ Spermatogonium อยู่บริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์และแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสได้เป็นเซลล์ Spermatocyte จากนั้น Spermatocyte จะแบ่งแบบไมโอซิสเพื่อสร้าง Spermatid จากนั้น Spermatid จึงพัฒนาไปเป็น Sperm หรืออสุจิ ตามลำดับ กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เริ่มจากด้านฐานของท่อเข้าสู่ลูเมน สังเกตจากเซลล์มีขนาดเล็กลง เซลล์อสุจิที่สมบูรณ์จะพบนิวเคลียสที่ส่วนหัว และพบอะโครโซมด้านหน้าสุด พบไมโทคอนเดรียที่คอรวมกันเป็นพูใหญ่ 4-5 อันต่อเซลล์ ด้นหลังจะเป็นส่วนหางแฟลกเจลลัม เซลล์อสุจิที่สมบูรณ์แล้วจะเคลื่อนตัวมายังกลางลูเมน นอกจากนี้ที่บริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ยังพบเซลล์ Intragonadal somatic cell เป็นลักษณะของเซลล์ร่างกายที่มีนิวเคลียสไม่กลม ซึ่งเซลล์ชนิดนี้อาจทำหน้าที่สาคัญคล้ายกับ Sertoli cell ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

คำสำคัญ: หอยนางรม / เซลล์ไข่ / ไมโทซิส / ไมโอซิส / อวัยวะสืบพันธุ์ / เซลล์ไข่

Ultrastructure of oogenesis and spermatogenesis in gonad of the Cupped oyster

Abstract

The objective of recent work was to investigate Ultrastructure of oogenesis and spermatogenesis in gonad of the Cupped oyster *Saccostrea cucullata* by using transmission electron microscope (TEM) and histological technique. The results showed that oyster is a dioecious (sex-separated) animal. Gametogenesis of male and female was developed in gonadal tubules of gonad. The gonad of both sexes was surrounded by connective tissue. The gonad is located between mantle and digestive glands. In female, during oogenesis, oocytes is originated and developed at the basement of gonadal tubules. Developing oocyte was increased in size with the accumulation of yolk granules in cytoplasm. The Yolk granules could be observed in both protein and lipid yolk granules. Mature oocyte could be noticed by the development of envelop to cover entirely oocyte. In the Hooded oyster, mature oocyte remained in primary oocyte stage. This stage will undergoes meiosis while fertilized with sperm. In male oyster, spermatogonium was located at the basement of gonadal tubules and would undergoes mitosis to produce primary spermatocyte. The primary spermatocyte was developed to spermatid by meiosis. The spermatid was consequently developed to sperm or spermatozoa by spermiogenesis. During spermatogenesis, germ cells were decreasing in size toward developmental stage of germ cell lineage. Sperm is the smallest cell and located toward lumen of gonadal tubule. Structure of mature sperm consisted of head which contained entire genetic material as dense chromatin, neck which contained 4-5 large mitochondria and long flagellum. Acrosome was located at the front of sperm. Moreover, Intragonadal somatic cells (ISCs) were also observed at the basement of gonadal tubule of male oyster. These cells may play an important role as Sertoli cell which existing in seminiferous tubules of vertebrates.

Keyword: Oyster / oocyte / mitosis / meiosis / gonad /oocyte

สารบัญ

หน้า

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร (Executive Summary) .....ก
กิตติกรรมประกาศ.....ค
บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
สารบัญ.....ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....2
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....7
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....11
บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุปผล.....23
บรรณานุกรม.....25
ภาคผนวก (เอกสารเผยแพร่งานวิจัย).....26
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด.....31

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำวิจัย

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

ปัจจุบันการเพาะเลี้ยงหอยนางรมจะใช้วิธีการเก็บหอยตัวอ่อนจากธรรมชาติ ซึ่งมีความแปรปรวนสูงขึ้นอยู่กับสภาพธรรมชาติในปีนั้นๆ และอาจได้รับผลกระทบเพิ่มขึ้นในอนาคตจากสภาวะมลพิษปนเปื้อนทางทะเล ดังนั้นความพยายามที่จะผสมเทียมเพาะพันธุ์ตัวอ่อนหอยนางรมจึงได้เริ่มนำมาใช้ สำหรับประเทศไทยได้มีการทดลองผสมเทียม แต่การนำมาใช้งานจริงยังมีข้อจำกัดอยู่มาก อาจเนื่องมากจากปัญหาหลายประการ ปัญหาสำคัญอย่างหนึ่งคือ มาจากความสมบูรณ์พันธุ์ของพ่อแม่พันธุ์ที่ใช้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความพยายามที่จะศึกษาลักษระของเซลล์สืบพันธุ์ที่มีความสมบูรณ์ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในระบบเพาะเลี้ยงหอยนางรมต่อไป ซึ่งในระยะยาวจะเป็นการสร้างประโยชน์ให้เกษตรกรในชุมชนที่ทำอาชีพเพาะเลี้ยงหอยนางรม

หอยนางรมเป็นสัตว์ที่มีเพศผู้และเพศเมียแยกกันและมีการปฏิสนธิภายนอก โดยช่วงที่มีการผสมพันธุ์หอยเพศเมียจะปล่อยไข่และหอยเพศผู้จะปล่อยน้ำเชื้อออกมาผสมกันในน้ำ อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonad) ของหอยนางรมอยู่ในส่วนที่เรียกว่า Visceral mass ซึ่งอยู่ระหว่างอวัยวะภายในกับแมนเทิล (Mantle) โดยอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะแผ่ล้อมรอบต่อมสร้างน้ำย่อย (Digestive gland) เมื่อสังเกตสีของแมนเทิลจะพบว่าหอยเพศผู้และเพศเมียมีสีขาวครีมเหมือนกัน จึงไม่สามารถแยกเพศของหอยนางรมได้โดยการสังเกตสี ดังนั้นการศึกษาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการทางเนื้อเยื่อวิทยา (คเชนทร เฉลิมวัฒน์, 2544) และส่วนใหญ่เป็นการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน การศึกษาในหอยนางรม *Crassostrea gigas* พบว่าไม่มีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ชัดเจนในช่วงแรกของชีวิต เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จึงจะมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gametogenesis) เกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue) ซึ่งอยู่ระหว่างต่อมสร้างน้ำย่อยกับแมนเทิล การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เกิดขึ้นภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Gonadal tubule) โดยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Spermatogenesis) เริ่มจากเซลล์สเปอร์มาโทโกเนียม (Spermatogonium) แบ่งตัวแบบไมโทซิส (Mitosis) เพื่อเพิ่มจำนวนได้เซลล์สเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก (Primary spermatocyte) และแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้ง

ที่ 1 (Meiosis I) ได้เซลล์สเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง (Secondary spermatocyte) และแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 2 (Meiosis II) ได้เซลล์สเปอร์มาทิด (Spermatid) และพัฒนาเป็นเซลล์อสุจิ (Spermatozoa) ต่อไป

หอยนางรมพันธุ์เล็กหรือหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) เป็นหอยที่พบในธรรมชาติและมีการเพาะเลี้ยงตามแถบชายฝั่งทะเลทางภาคตะวันออกของประเทศไทย เนื่องจากหอยนางรมปากจีบเป็นหอยที่มีมูลค่าทางเศรษฐกิจ จึงมีการศึกษาทางด้านชีววิทยาของหอยชนิดนี้กันมาก แต่พบว่าข้อมูลระดับจุลกายวิภาคที่อธิบายกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียในระยะเริ่มต้นของหอยนางรมปากจีบยังมีน้อยมาก ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงเป็นการศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของเซลล์ที่พบในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียในระยะเริ่มต้นของหอยนางรมปากจีบโดยใช้เทคนิคทางเนื้อเยื่อวิทยา เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการอธิบายกลไกการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยสองฝา นอกจากนี้ยังใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาวิธีการคัดเลือกพ่อพันธุ์สำหรับการผสมเทียมเพื่อผลิตลูกหอยนางรมปากจีบในระบบเพาะเลี้ยงต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

การวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์หลักเพื่อ

1. ศึกษาเนื้อเยื่อที่เป็นองค์ประกอบของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ผู้และเพศเมีย (male and female gonad) ของหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* วัยเจริญพันธุ์ด้วยเทคนิคมิญชวิทยาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
2. ศึกษาเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่างๆ ที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal tubules) ของหอยนางรมปากจีบเพศเมียด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
3. ศึกษาโครงสร้างเซลล์ไข่ (Oocyte) ของหอยนางรมปากจีบที่ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
4. ศึกษาโครงสร้างเซลล์อสุจิ (Sperm) ของหอยนางรมปากจีบที่ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* ที่พบในชายฝั่งจังหวัดชลบุรี เก็บตัวอย่างกลับมาที่ห้องปฏิบัติการเพื่อคัดเลือกเพศเมียและเพศผู้ ผ่าตัดเตรียมเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์สำหรับศึกษาด้วยเทคนิคมิญชวิทยาและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

หอยนางรมเป็นหอยสองฝาที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์สู่ภายนอกลำตัว (spawner) เพื่อปฏิสนธิภายนอกตัว สำหรับเพศเมียโดยทั่วไปแล้วไข่ของสัตว์ที่มีการปฏิสนธิภายนอกตัวมักพบการสะสมอาหารภายในไซโทพลาซึมของเซลล์ไข่ อาหารที่สะสมนี้จะเป็นแหล่งพลังงานสำรองเพื่อใช้เลี้ยงตัวอ่อนที่พัฒนาภายหลังกรปฏิสนธิ โดยตัวอ่อนจะไม่ได้รับอาหารจากแม่ ดังนั้นแหลังพลังงานทั้งหมดจึงต้องรับมาจากอาหารที่เก็บสะสมภายในเซลล์ไข่นั่นเอง ซึ่งลักษณะการสะสมอาหารในเซลล์ไข่ของสัตว์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันทำให้ขนาดของไข่แตกต่างกันไป ในระขนาดของเซลล์ไข่ ในทางตรงกันข้ามเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ภายหลังการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสแล้วเซลล์จะพัฒนาให้มีขนาดเล็กลง เพราะต้องทำหน้าที่นำสารพันธุกรรมไปผสมกับเซลล์ไข่ ดังนั้นเซลล์ต้องมีขนาดเล็กและมีการพัฒนาแฟลกเจลลัมเพื่อให้ว่ายน้ำได้ดี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

หอยนางรมปากจีบ ชนิด *Saccostrea cucullata* จัดเป็นหอยเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นอาหารทะเลที่มีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายในประเทศไทย หอยนางรมเป็นอาหารทะเลที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูง คุณค่าทางอาหารที่พบในหอยนางรม ได้แก่ โปรตีน ไกลโคเจน ไขมัน แร่ธาตุ และน้ำ หอยนางรมที่บริโภคอยู่ในรูปหอยสดทั้งตัวไม่แกะเปลือก หอยแกะเนื้อแช่เย็น หอยตากแห้งรมควัน หอยดองเปรี้ยวและดองเค็มบรรจุกระป๋อง นอกจากนี้เปลือกหอยนางรมใช้ทำปูนขาว และทำเป็นอาหารเสริมสำหรับเลี้ยงเป็ดและไก่ หอยนางรมอาศัยอยู่ทั้งในน้ำกร่อยและในทะเล พบชุกชุมบริเวณที่มีน้ำขึ้นน้ำลงอยู่เป็นประจำ เช่น บริเวณที่ตื้นตามปากแม่น้ำและลำคลอง ตามชายเกาะหรือชายฝั่งที่มีกระแสน้ำหมุนเวียนถ่ายเทดี หอยนางรมที่พบในน่านน้ำไทยมีประมาณ 15 ชนิด แต่ที่นำมาเลี้ยงในเชิงพาณิชย์มีอยู่ 2 กลุ่ม คือ หอยนางรมพันธุ์เล็กหรือหอยนางรมปากจีบ ส่วนใหญ่เป็นหอยนางรมในสกุล *Saccostrea* ที่เลี้ยงกันแพร่หลายในจังหวัดชลบุรี จันทบุรี และตราด ได้แก่ *Saccostrea cucullata* นิยมเรียกชื่อหอยนางรมปากจีบหรือหอยเจาะ ส่วนหอยนางรมอีกกลุ่มหนึ่งเป็นหอยนางรมพันธุ์ใหญ่หรือที่รู้จักกันดีว่าหอยตะโกรม ได้แก่ หอยตะโกรมกรามดำ (*Crassostrea iredalei*) พบได้ในแหล่งเลี้ยงหอยที่จังหวัดชลบุรี จันทบุรี และตราด นอกจากนี้ยังพบทางภาคใต้ จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ และระนอง หอยตะโกรมกรามขาว (*Crassostrea belcheri*) พบมากในแหล่งเลี้ยงหอยภาคใต้ที่จังหวัดสุราษฎร์ธานี ระนอง พังงา สงขลา กระบี่ และปัตตานี หอยชนิดนี้ยังพบที่บริเวณจังหวัดจันทบุรีด้วย โดยทั่วไปหอยนางรมมีลักษณะภายนอกหรือลักษณะเปลือกหอยที่แปรผันตามสภาพแวดล้อมของแหล่งกำเนิดและวัตถุที่หอยเกาะ หอยนางรมชนิดเดียวกันอาจมีรูปร่างที่แตกต่างกันเนื่องจากสภาพพื้นที่ที่อาศัย จึงเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการสับสนในการจำแนกชนิดโดยเฉพาะกลุ่มหอยนางรมพันธุ์เล็กซึ่งมีอยู่หลายชนิดและพบกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน ดังนั้นจากการศึกษาความหลากหลายของชนิดหอยนางรมที่มีความสำคัญในเชิงพาณิชย์ของไทยโดยการศึกษาสัณฐานวิทยาของเปลือกหอยและตัวหอยประกอบกับการศึกษาทางพันธุศาสตร์ พบหอยนางรมจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ หอยมือหมี (*Hypotissa hyotis*) หอยตะโกรมกรามขาว (*C. belcheri*) หอยตะโกรมกรามดำ (*C. iredalei*) หอยนางรมปากจีบ 2 ชนิด ได้แก่ *S. cucullata* และ *S. myliloides* หอยนางรมลอย (*Dendrostrea folium*) และหอยเล็บเหยี่ยว (*Lopha cristagalli*) หอยนางรมชนิดที่จัดว่ามีความสำคัญในเชิงพาณิชย์และสามารถนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์ได้มี 3 ชนิด คือ หอยนางรมปากจีบชนิด *S. cucullata* หอยตะโกรมกรามขาว (*C. belcheri*) และหอยตะโกรมกรามดำ (*C. iredalei*) (Yoosukh and Duangdee, 1999)

ลักษณะทั่วไปของหอยนางรม เป็นหอยทะเลกาบ 2 ฝา มีกาบหนาแข็ง ซึ่งฝาทั้งสองมีขนาดไม่เท่ากัน กาบบนจะใหญ่และแบนกว่ากาบล่าง ส่วนกาบล่างที่มีลักษณะโค้งเว้า และเป็นด้านที่ยึดติดกับวัตถุแข็ง เช่น ก้อนหิน ไม้หลัก หรือเปลือกหอยที่จมอยู่ในทะเล มักจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่มๆ ตั้งแต่ชายฝั่งถึงระดับน้ำลึก 5 เมตร เปลือกซ้ายหรือเปลือกล่างยึดติดกับหินหรือวัสดุยึดเกาะมีลักษณะลึกลงเป็นแอ่ง เปลือกขวาแบนและยาวขนาบไปกับเปลือกล่าง มีกล้ามเนื้อขนาดใหญ่ (adductor muscle) ทำหน้าที่ยึดเปลือกทั้งสองให้ยึดแน่นติดกัน หากขูดบริเวณกล้ามเนื้อนี้ออกจะเห็นเป็นรอยกล้ามเนื้อ (muscle scar) มีรูปร่างคล้ายไตและปรากฏ

แถบสีน้ำตาลสลับเหลือง ซึ่งลักษณะของรอยกล้ามเนื้อนี้มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิด จึงใช้ประกอบการจำแนกสปีชีย์หอยนางรมได้อีกทางหนึ่ง ที่ขอบเปลือกด้านในจะพบลักษณะปุ่มเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวตามสันเปลือก ส่วนเปลือกอีกด้านหนึ่งจะพบแอ่งเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวตามสันเปลือกเช่นกัน เมื่อหอยปิดเปลือกปุ่มเล็ก ๆ เหล่านี้จะประกบเข้ากับแอ่งเล็ก ๆ พอดีทำให้หอยปิดฝากเปลือกได้แข็งแรงมากขึ้น เมื่อโตเต็มที่จะมีขนาดประมาณ 5-7 ซม. หอยชนิดนี้มีถิ่นอาศัยกระจายอยู่ทั่วไปตามชายฝั่งทะเลประเทศไทย (Yoosukh and Duangdee, 1999) และเป็นหอยที่มีการปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี (Kingtong *et al.,* 2007)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมีย (Oogenesis)

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมีย (Oogenesis) เป็นกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมียเกิดขึ้นภายในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) ในหอยนางรมอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีตำแหน่งอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิล (Mantle) กับต่อมสร้างน้ำย่อย (Digestive glands) ซึ่งในสภาวะปกติเซลล์บริเวณนี้จะประกอบด้วยเซลล์พื้นฐาน หรือ connective tissue เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์เซลล์ที่อยู่ใน connective tissue จะมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์ โดยจะเริ่มจากการพัฒนากลุ่มเซลล์ขึ้นมาแล้วเกิดเป็นท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal tubules) ภายในพบการสร้างและพัฒนาของเซลล์ไข่ในระยะต่างๆ โดยเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์ไข่ หรือ Oogonium ซึ่งมีโครโมโซมสองชุด (2n) อยู่ติดกับฐานของท่อจะแบ่งตัวแบบไมโทซิส (Mitosis) เพื่อเพิ่มจำนวนกลายเป็น Primary oocyte (2n) จากนั้น Primary oocyte จะเริ่มแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส (Meiosis) ครั้งที่ 1 กลายเป็น Secondary oocyte (n) จากนั้น Secondary oocyte จะแบ่งเซลล์แบบ Meiosis ครั้งที่ 2 เพื่อให้ได้เซลล์ไข่ 4 เซลล์ (Fukazawa *et al.,* 2007) ในสัตว์บางชนิดเช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม เซลล์ไข่ทั้ง 4 เซลล์จะมีขนาดไม่เท่ากัน จะมีเซลล์ไข่ 1 ใบ ที่มีขนาดใหญ่ และพัฒนาไปเป็นไข่ที่สมบูรณ์ แต่ในหอยสองฝาเซลล์ไข่ทุกใบที่ได้จากการแบ่งเซลล์จะมีการพัฒนาไปเป็นเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์ (mature oocyte) พร้อมที่จะปล่อยออกสู่ภายนอกเพื่อให้เกิดการปฏิสนธิได้ โดยจะมีการสะสมอาหาร (yolk) ไว้ภายในไซโทพลาซึมมากขึ้น ทำให้ขนาดของเซลล์ไข่ใหญ่ขึ้นตามลำดับ (Lango-Reynoso *et al.,* 2000) การศึกษาการสร้างเซลล์ไข่ของหอยสองฝามีข้อมูลจำกัด สำหรับหอยนางรมมีรายงานในหอยนางรม *Crassostrea virginica* (Galtsoff, 1964)

การศึกษาในหอยสองฝาโดยศึกษาระยะสืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ด้วยเทคนิคเนื้อเยื่อวิทยา (Histology) ย้อมด้วยสี Harris's Hematoxylin และ Eosin พบว่าสามารถแบ่งระยะการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยแมลงภู่ทั้งเพศผู้และเพศเมียได้เป็น 5 ระยะ คือ ระยะเซลล์สืบพันธุ์พักตัว ระยะการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ ระยะเซลล์สืบพันธุ์เจริญเต็มที่ ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์และระยะหลังปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (Pronker *et al*., 2008) สำหรับหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* นั้น ยังไม่พบข้อมูลการศึกษาโครงสร้างระดับจุลกายวิภาค (ultrastructure) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษา

การสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของเพศผู้ (Spermatogenesis)

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ จะเริ่มจากการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (Mitosis) ของเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรก (Primary germ cell) ที่อยู่รอบ ๆ ผนังฟอลลิเคิล ให้สเปอร์มาโทโกเนียระยะแรก (Primary spermatogonia) และระยะที่สอง (Secondary spermatogonia) โดยสเปอร์มาโทโกเนียระยะแรกและระยะที่สองจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องใกล้กับศูนย์กลางของลูเมน ขนาดของสเปอร์มาโทโกเนียระยะแรก จะเล็กกว่าเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรก แต่จะใหญ่กว่าสเปอร์มาโทโกเนียระยะที่สอง แล้วสเปอร์มาโทโกเนียระยะที่สองจะ

เปลี่ยนไปเป็นสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก (Primary spermatocyte) ซึ่งจะแบ่งตัวแบบไมโอซิส (Meiosis) ต่อไปเป็นสเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง (Secondary spermatocyte) หลังจากนั้นจะมีการแบ่งตัวแบบไมโอซิสขั้นสุดท้ายเปลี่ยนแปลงไปเป็นสเปอร์มาทิด (Spermatid) การสร้างสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกและระยะที่สองและสเปอร์มาทิดเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจากผนังเซลล์เข้าสู่ศูนย์กลางของลูเมน สเปอร์มาทิดจะเปลี่ยนแปลงเป็นสเปอร์มาโทซัว (Spermatozoa) จนเต็มลูเมน (คเชนทร เฉลิมวัฒน์ และวรรณภา กสิฤกษ์, 2540)

ลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม อสุจิ (Sperm) ของหอยนางรม ประกอบด้วยส่วนหัว ส่วนกลาง และส่วนหาง ส่วนหัวจะมีนิวเคลียส (Nucleus) มีอะโครโซม (Acrosome) ซึ่งมีเอนไซม์ (Enzyme) ที่ใช้ในการย่อยผนังของไข่ ส่วนกลางของสเปิร์มมีไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ประมาณ 4-5 อัน ล้อมรอบเซนทริโอล (Centriole) ส่วนหางของสเปิร์ม คือ แฟลเจลลัม (Flagellum) นอกจากนี้ส่วนหางยังมีไซโทพลาซึม (Cytoplasm) เป็นปริมาณมาก (Franco et al., 2008; สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตาชู, เยาวลักษณ์ จิตราวงศ์ และศิริวรรณ จันทเตมีย์, 2538)

การศึกษาโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยสองฝา Family Veneridae ได้แก่ *Pitar rudis* และ *Chamelea gallina* พบว่าภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ นอกจากจะพบเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต่าง ๆ แล้ว ยังสามารถพบ Sertoli cell ซึ่งเป็นเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ภายในเซลล์พบไกลโคเจน โครงสร้างคล้ายถุงที่ภายในบรรจุสารคล้ายไขมัน และ พบ Phagolysosome ภายใน Sertoli cell อีกด้วย เซลล์ดังกล่าวอาจทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมกระบวนการส้รางเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Erkan and Sousa, 2002)

การศึกษาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรม *C. gigas* (Franco et al., 2008; Franco et al., 2011) พบว่าพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์แบ่งเป็น 4 ระยะ คือ

1. ระยะที่ 0 เป็นระยะพักตัวของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ Germ cells ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังไม่มีการพัฒนา จึงไม่สามารถแยกเพศของหอยนางรมได้

2. ระยะที่ 1 เป็นระยะเริ่มพัฒนาการ Spermatogonia มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส พบเซลล์ระยะ Spermatogonium จำนวนมากบริเวณขอบด้านในของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงพบ Spermatogonium 2 ชนิด คือ Type I Spermatogonia และ Type II Spermatogonia

3. ระยะที่ 2 เป็นระยะที่ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีขนาดใหญ่ขึ้น เนื่องจากมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์จำนวนมาก พบเซลล์ระยะ Primary spermatocytes มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเป็นเซลล์ระยะ Secondary spermatocytes

4. ระยะที่ 3 เป็นระยะสุดท้ายของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ก่อนเข้าสู่ระยะเซลล์สืบพันธุ์สุก จะพบเซลล์ระยะ Spermatids และ Spermatozoa ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์

นอกจากนี้ยังได้ศึกษาโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้พบว่า ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ล้อมรอบด้วยเนื้อเยื่อชั้นเดียว ประกอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อที่มีลักษณะแบน และพบเซลล์ที่เรียกว่า Intragonadal somatic cells แทรกอยู่ด้วย โดยเซลล์นี้มีลักษณะแตกต่างจากเซลล์สืบพันธุ์ จากนั้นจึงได้ทำการศึกษาโครงสร้างระดับจุลกายวิภาคของ Intragonadal somatic cell (ISC) พบว่าในระยะเริ่มต้นของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มี Phagolysosome จำนวนมากใน Cytoplasm ของ ISCs แสดงว่า ISCs มีบทบาทในการกำจัดส่วนที่เหลือจากการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรม *C. gigas* นอกจากนี้ใน Cytoplasm ของ ISC ยังพบหยดน้ำมันและ Mitocondria อกด้วย หน้าที่ของ ISC อาจเทียบได้กับ Sertoli cell ทีทำหน้าที่ควบคุมการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope; TEM)

เป็นกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ใช้ศึกษาตัวอย่างชนิดบาง ซึ่งเตรียมขึ้นโดยวิธีพิเศษเพื่อให้ลำอนุภาคอิเล็กตรอนผ่านทะลุได้ การสร้างภาพจากกล้องประเภทนี้จะทำได้โดยการตรวจวัดอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่าง เครื่อง TEM เหมาะสำหรับศึกษารายละเอียดขององค์ประกอบภายในของตัวอย่าง เช่น องค์ประกอบภายในเซลล์ ลักษณะของเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์เป็นต้น ซึ่งจะให้รายละเอียดสูงกว่ากล้องจุลทรรศน์ชนิดอื่น ๆ เนื่องจากมีกำลังขยายและประสิทธิภาพในการแจกแจงรายละเอียดสูงมาก (กำลังขยายสูงสุดประมาณ 0.1 นาโนเมตร)

หลักการทำงานของเครื่อง TEM จะประกอบด้วยแหล่งกำเนิดอิเล็กตรอนซึ่งทำหน้าที่ผลิตอิเล็กตรอนเพื่อป้อนให้กับระบบ โดยกลุ่มอิเล็กตรอนที่ได้จากแหล่งกำเนิดจะถูกเร่งด้วยสนามไฟฟ้า จากนั้นกลุ่มอิเล็กตรอนจะผ่านเลนส์รวบรวมรังสี (Condenser Lens) เพื่อทำให้กลุ่มอิเล็กตรอนกลายเป็นลำอิเล็กตรอนซึ่งสามารถปรับให้ขนาดของลำอิเล็กตรอนใหญ่หรือเล็กได้ตามต้องการ จากนั้นอิเล็กตรอนจะเคลื่อนที่ผ่านตัวอย่างที่จะศึกษา (Specimen) ซึ่งตัวอย่างที่จะศึกษาจะต้องมีลักษณะแบนและบางมาก จากนั้นกระเจิงอนุภาคขึ้นเมื่ออิเล็กตรอนผ่านตัวอย่างและอิเล็กตรอนที่ทะลุผ่านตัวอย่างนี้จะถูกปรับโฟกัสของภาพโดยเลนส์ใกล้วัตถุ (Objective Lens) ซึ่งเป็นเลนส์ที่ทำหน้าที่ขยายภาพให้ได้รายละเอียดมากที่สุด จากนั้นจะได้รับด้วยการขยายด้วยเลนส์ทอดภาพไปสู่จอรับ (Projector Lens) และปรับโฟกัสของลำอนุภาคอิเล็กตรอนให้ยาวพอดีที่จะปรากฏบนฉากรับแสงจนสามารถเกิดการสร้างภาพขึ้นมาได้ (Akaishi *et al.,* 2004)

การใช้กล้อง TEM ในการศึกษาครั้งนี้ จะทำให้ทราบรายละเอียดของกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เกิดขึ้นภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบเพศเมีย นอกจากนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ยังจะทำให้ทราบรายละเอียดของเซลล์ไข่ที่พัฒนาสมบูรณ์ว่าจะมีลักษณะอย่างไร ซึ่งจะเป็นพื้นฐานสำหรับการศึกษาด้านชีววิทยาการเจริญของหอยนางรมและสัตว์ในกลุ่มหอยสองฝาและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังต่อไป

บทที่ 3
วิธีการทดลอง

1. การสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ

ในการศึกษาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียในครั้งนี้ เก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* จากพื้นที่ชายฝั่งจังหวัดชลบุรี และนำตัวอย่างกลับมาทำการศึกษา ณ ห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับใช้ในการศึกษาโดยใช้เทคนิคเนื้อเยื่อวิทยา

2. การคัดแยกเพศหอยนางรม

หอยนางรมเป็นหอยที่มีเพศแยก เพศผู้และเพศเมียมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แยกกัน เมื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์สมบูรณ์แล้ว หอยจะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกจากอวัยวะสืบพันธุ์ผ่านช่องปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (gonophore) ซึ่งมีตำแหน่งอยู่ด้านข้างของลำตัว เซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมไม่มีสี ดังนั้นการแยกเพศของหอยนางรมจึงทำได้ยากมาก ไม่สามารถจำแนกได้จากลักษณะภายนอก ต้องทำการสุ่มตัดเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) เพื่อตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อดูว่าจะเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย โดยเพศผู้จะพบอสุจิขนาดเล็ก ส่วนเพศเมียจะพบเซลล์ไข่ขนาดใหญ่

3. การศึกษาเนื้อเยื่อตัวอย่างด้วยพาราฟินเทคนิค

นำเนื้อเยื่อแช่ในสารละลายบูแองส์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแช่ในเอทานอล 70% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือง แล้วแช่ในเอทานอล 80%, 90% และ 95% ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นแช่ในเอทานอล 100% 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วแช่ในไดออกเซน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในไดออกเซนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ตามด้วยแช่ในพาราพลาส ที่อุณหภูมิ 58-60 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แล้วแช่ในพาราพลาสทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นฝังเนื้อเยื่อในพาราพลาส ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 6 ไมครอน แล้วติดเนื้อเยื่อลงบนกระจกสไลด์ อุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสไลด์มาย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน

สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน

ตัดเนื้อเยื่อหอยนางรมส่วนที่ต้องการศึกษา

↓

แช่ในสารละลายบูแองส์ (24 ชั่วโมง)

↓

แช่ในเอทานอล 70% (30 นาที)

↓

แช่ในน้ำกลั่น (30 นาที) ทำซ้ำจนเนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือง

↓

แช่ในเอทานอล 80%, 90% และ 95% ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง (ครั้งละ 1 ชั่วโมง)

↓

แช่ในเอทานอล 100% 2 ครั้ง (ครั้งละ 1 ชั่วโมง 30 นาที)

↓

แช่ในไดออกเซน 2 ครั้ง (ครั้งละ 1 ชั่วโมง)

↓

แช่ในไดออกเซน (24 ชั่วโมง)

↓

แช่ในพาราพลาส ที่ 58-60 °C 2 ครั้ง (ครั้งละ 1 ชั่วโมง)

↓

แช่ในพาราพลาส ที่ 58-60 °C (24 ชั่วโมง)

↓

ฝังเนื้อเยื่อลงในพาราพลาส

↓

ตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบาง ความหนา 6 ไมครอน

↓

ติดเนื้อเยื่อแผ่นบางบนกระจกสไลด์

↓

อุ่นสไลด์ ที่ 45 °C (24 ชั่วโมง)

↓

ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน

↓

ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

↓

ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การย้อมสีด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน เป็นการย้อมสีเนื้อเยื่อเพื่อให้เห็นความแตกต่างของเซลล์และเนื้อเยื่อชัดเจนขึ้น โดยสี (Dye) หรือสารเคมีแต่ละอย่างจะย้อมสีติดองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์และเนื้อเยื่อแตกต่างกันออกไป ซึ่งเป็นประโยชน์แก่การศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา สีย้อมที่นิยมใช้กันทั่วไป ได้แก่ ฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน โดยฮีมาทอกซิลินมีสภาพเป็นด่าง ชอบรวมตัวกับส่วนของเซลล์ที่มีสภาพเป็นกรด เช่น นิวเคลียส นิวคลีโอลัส ซึ่งจะติดสีน้ำเงินหรือม่วง ส่วนอีโอซินมีสภาพเป็นกรด ชอบ

4. การศึกษาเนื้อเยื่อตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

แช่เนื้อเยื่อใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate buffer saline (PBS) ที่ 4 องศาเซลเซียสนาน 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาล้างใน 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที เก็บรักษาเนื้อเยื่อไว้ใน 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส นำตัวอย่างที่เก็บไว้มาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 1 x 1 มิลลิเมตร คงสภาพด้วย 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ล้างด้วย 0.1 M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียส 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที ดึงน้ำออกด้วยเอทานอลความเข้มข้น 70%, 80%,

90%, 95% ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง และ100% 3 ครั้ง ครั้งละ 30 นาที ตามลำดับ นำ propylene oxide (PO) เข้าสู่เซลล์ 2 ครั้ง ครั้งละ 30 นาทีตามด้วย PO : Araldite 502 resin (2:1) นาน 1 ชั่วโมงและ (1:2) นาน 12 ชั่วโมง ฝังเนื้อเยื่อใน pure Araldite 502 resin และ polymerized ที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ชั่วโมง ที่ 45 องศาเซลเซียสและ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ นำเนื้อเยื่อไปตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome ให้มีความหนาประมาณ 500 นาโนเมตร ย้อมด้วย methylene blue เพื่อศึกษาเนื้อเยื่อโดยทั่วไป (Semi-thin section) และเนื้อเยื่อที่ถูกนำมาตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome ประมาณ 60 นาโนเมตร (Ultra-thin section) นำเนื้อเยื่อที่ผ่านการตัด มาวางลงบน Copper grid ทิ้งไว้จนแห้ง แล้วย้อมด้วย saturated uranyl acetate ใน 70% methanolและ 0.1% lead citrate ในน้ำ อย่างละ 15 นาที ทิ้งไว้จนแห้ง นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM รุ่น TECHNI 20, Philips) ที่ 75 kV

สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพลาสติกเพื่อศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ดังต่อไปนี้

ตัดเนื้อเยื่อหอยนางรมส่วนที่ต้องการศึกษา

↓

แช่ใน 2.5% Glutaraldehyde ใน 0.1 M Phosphate buffered saline ที่ 4 ºC (4 ชั่วโมง)

↓

ล้างด้วย 0.1 M Phosphate buffered saline ที่ 4 ºC 3 ครั้ง (ครั้งละ 5 นาที)

↓

เก็บรักษาตัวอย่างเนื้อเยื่อไว้ใน 0.1 M Phosphate buffered saline ที่ 4 ºC

↓

ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อให้มีขนาดประมาณ 1 x 1 มม.

↓

แช่ใน 1% Osmium tetroxideใน 0.1 M Phosphate buffered saline ที่ 4 ºC (2 ชั่วโมง)

↓

ล้างด้วย 0.1 M Phosphate buffered saline ที่ 4 ºC 3 ครั้ง (ครั้งละ 5 นาที)

↓

แช่ในเอทานอล 70%, 80%, 90% และ 95% ความเข้มข้นละ 2 ครั้ง (ครั้งละ 30 นาที)

↓

แช่ในเอทานอล 100% 3 ครั้ง (ครั้งละ 30 นาที)

↓

แช่ใน Propylene oxide 2 ครั้ง (ครั้งละ 30 นาที)

↓

แช่ใน Propylene oxide : Araldite 502 resin (2:1) (1 ชั่วโมง)

↓

แช่ใน Propylene oxide : Araldite 502 resin (1:2) (12-14 ชั่วโมง)

↓

ฝังเนื้อเยื่อลงใน Pure araldite 502 resin

↓

พอลิเมอไรซ์ที่อุณหภูมิห้อง (24 ชั่วโมง)

↓

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

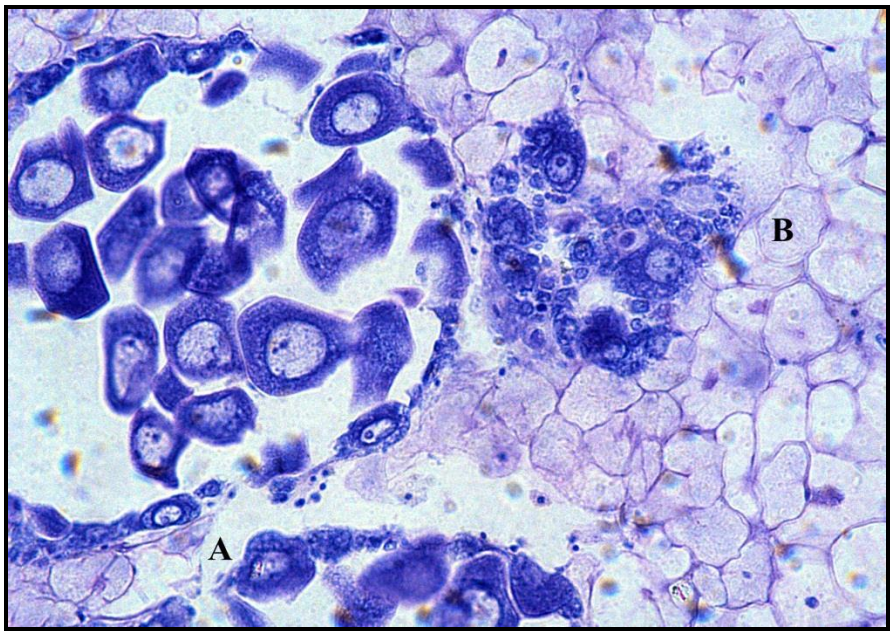
บทที่ 4

ผลการศึกษา

1. การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (oogenesis) ของหอยนางรมปากจีบ

1.1 การศึกษาด้วยเทคนิคมิญวิทยา

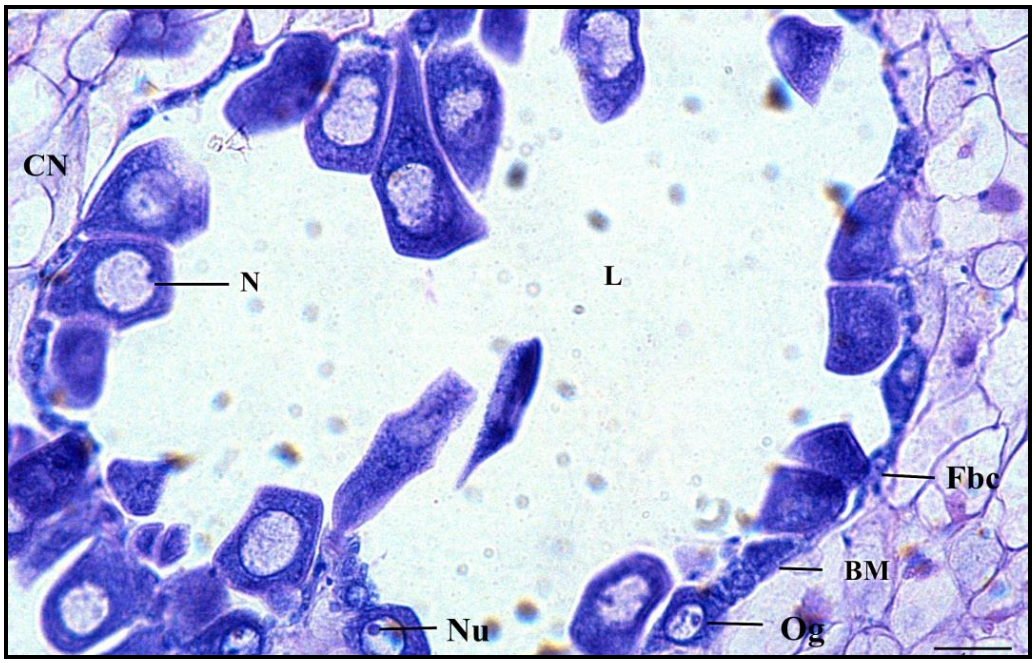
จากการศึกษาอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ของหอยนางรมเพศเมียโดยใช้เทคนิคเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เกิดขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเนื้อเยื่อแมนเทิล และต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) โดยพบว่าขณะที่หอยเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์นั้น กลุ่มเซลล์ที่อยู่ระหว่างแมนเทิลและต่อมสร้างน้ำย่อย จะพบกลุ่มของเซลล์สืบพันธุ์ขึ้น หลังจากนั้นกลุ่มของเซลล์สืบพันธุ์นี้จะพัฒนามากขึ้นโดยมีการสร้างท่อสืบพันธุ์ (gonadal tubule) และมีช่องว่าง (lumen) ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วจะพบเซลล์สืบพันธุ์เรียงตัวบริเวณกลางท่อ และสามารถพบเซลล์ต้นกำเนิดที่บริเวณฐานของท่อ ดังภาพที่ 4-1 เซลล์ต้นกำเนิดจะแบ่งตัวทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ เซลล์ต้นกำเนิดที่พบในเพศเมีย คือ oogonium ดังนั้นลักษณะโดยทั่วไปที่สามารถพบได้เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง คือ ในเพศเมียจะพบไข่ที่กำลังพัฒนาภายในท่อสืบพันธุ์ โดยไข่มีขนาดใหญ่มากเมื่อเทียบกับอสุจิในเพศผู้ ไข่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ไม่พบการขดตัวแน่นของเส้นใยโครมาทิน สามารถพบนิวคลีโอลัสติดสีทึบของฮีมาทอกไซลินภายในนิวเคลียส ไซโทพลาซึมติดสีม่วงของฮีมาทอกไซลิน



ภาพที่ 4-1 ลักษณะท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบเพศเมีย ซึ่งแสดงกลุ่มที่พัฒนาสมบูรณ์แล้ว (A; Mature gonadal tubule) และกลุ่มที่กำลังเริ่มต้นพัฒนา (B; Developing gonadal

tubule)

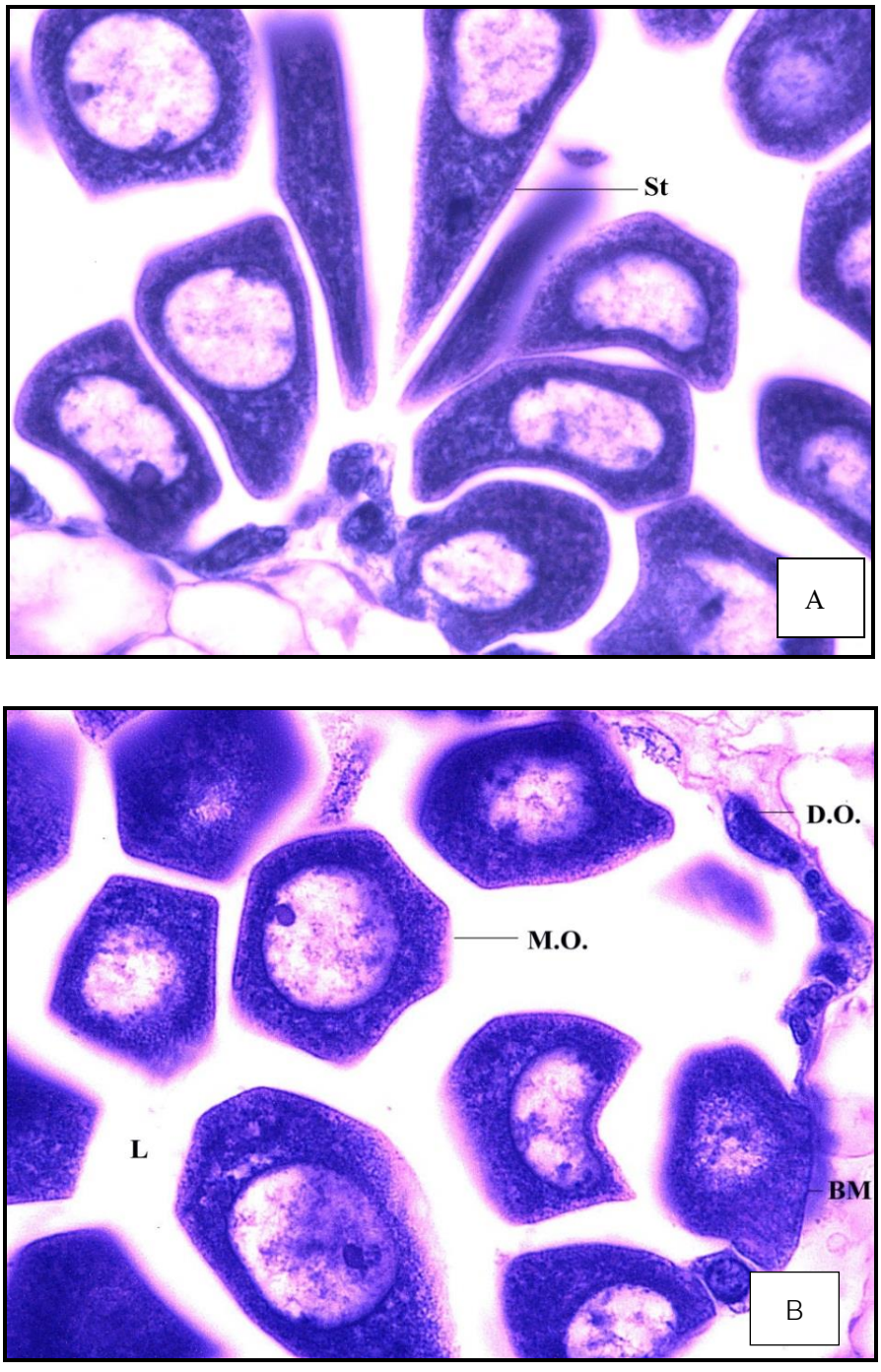
ภาพที่ 4-2 เป็นภาพตัดตามขวางแสดงให้เห็นว่าเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียมีการพัฒนาอยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ภายนอกท่อสร้างเซลล์พบเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันอยู่ล้อมรอบ ที่ฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบ basement membrane โดยบริเวณนี้จะพบ Fibrocyte ซึ่งเป็นเซลล์ร่างกาย (somatic cell) ที่ทำหน้าที่ล้อมรอบท่อสืบพันธุ์ และพบ oogonium ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย เป็นเซลล์มีขนาดเล็กเนื่องจากยังไม่มีการสะสมอาหารหรือโยล์ค (yolk) เมื่อเซลล์ได้รับการพัฒนาโดยการสะสมโปรตีน yolk จะทำให้ไซโทพลาซึมมีขนาดใหญ่ขึ้นทำให้เห็นเซลล์ใหญ่ขึ้นตามไปด้วย ไข่ที่มีขนาดใหญ่นี้จัดอยู่ในระยะ primary oocyte ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมสำหรับการปฏิสนธิหากมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกสู่ภายนอก หากเซลล์ไข่ได้รับการปฏิสนธิจึงจะมีการแบ่งนิวเคลียสแบบ ไมโอซิสที่ 1 (Meiosis I) และ ไมโอซิสที่ 2 (Meiosis II) ต่อไป แต่หากไข่ที่ปล่อยออกจากตัวแม่ไม่ได้รับการปฏิสนธิก็จะหยุดอยู่ในระยะ primary oocyte เท่านั้น ซึ่งต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่จะพบว่าระยะตกไข่หรือระยะที่ไข่พร้อมผสมกับเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ต้องอยู่ในระยะ Metaphase I ของ Meiosis I เท่านั้น ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะพบระยะของไข่ที่มีความพร้อมในการปฏิสนธิแตกต่างกันไป



ภาพที่ 4-2 ลักษณะท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบเพศเมีย ที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกไปแล้วบางส่วน ทำให้เหลือส่วนที่กำลังพัฒนาขึ้นมาใหม่ (ภาพ A กำลังขยาย 100 เท่า และภาพ B)

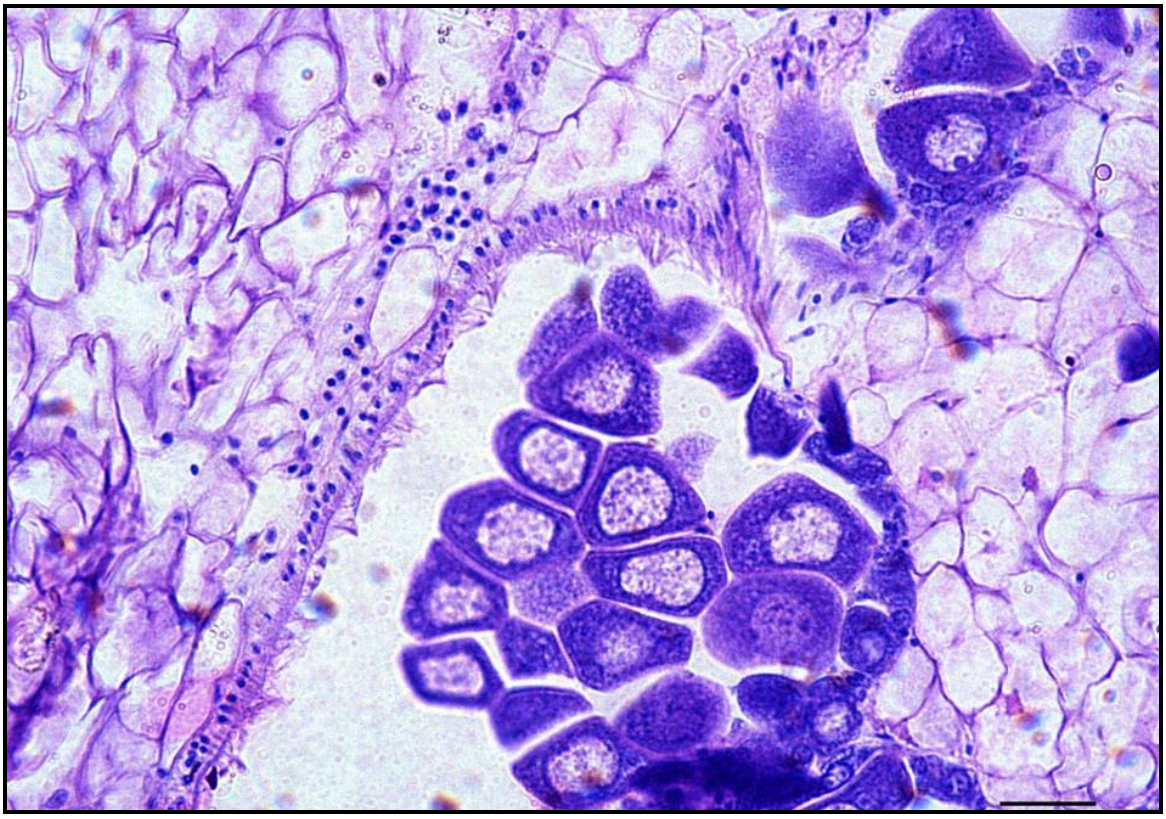
จะเห็นลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ที่เจริญในระยะไข่สุก พร้อมที่จะปล่อยออกสู่ภายนอกเพื่อผสมพันธุ์ โดยสังเกตจากไข่มีขนาดใหญ่และกลม ภาพที่ 4-1 แสดงลักษณะของกลุ่มเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียที่มีการเจริญในขั้นต้น โดยสังเกตจากกลุ่มของเซลล์สืบพันธุ์ยังไม่พัฒนาเป็นท่อที่มีขอบเขตชัดเจน แต่จะเห็นไข่ที่มีการพัฒนาภายในกลุ่มเซลล์สืบพันธุ์ เริ่มมีการสะสมอาหารในไซโทพลาสซึม สังเกตได้จากไซโทพลาสซึม

มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ข้างเคียงขนาดเล็กที่กำลังพัฒนา โดยกลุ่มเซลล์เหล่านี้จะพัฒนาไปเป็นท่อที่สมบูรณ์ต่อไปในอนาคต



ภาพที่ 4-3 ลักษณะเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียหรือเซลล์ไข่ (oocyte) ที่พัฒนาใน gonadal tubule จนเห็นหลากหลายรูปทรง เช่น ไข่ที่กำลังพัฒนาอยู่จะมีทรงรีคล้ายลูกแพร์มีส่วนฐานหรือ stalk ยึดติดกับท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ดังภาพ A ส่วนเซลล์ไข่ที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วจะมีลักษณะทรงกลมและเคลื่อนมาเรียงตัวกลางท่อ ที่พร้อมจะผสมพันธุ์ และมีลักษณะทรงกลมดังภาพ B (ภาพกำลังขยาย 1000 เท่า) St = Stalk, L = Lumen, M.O. = Mature Oocyte, D.O. = Developing Oocyte, BM = Basement membrane

บริเวณของท่อรวม เป็นท่อที่นำไข่ออกจากอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อส่งออกนอกร่างกายทาง gonophore เมื่อตัดตามขวางจะพบลักษณะดังภาพที่ 4-4 ด้านในของท่อหรือด้านที่ใกล้กับ digestive gland จะพบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ สังเกตได้จากมีเซลล์ต้นกำเนิดขนาดเล็กอยู่ที่บริเวณฐานของท่อ ทำหนเที่แบ่งเซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์ใหม่ ส่วนด้านตรงข้ามของท่อจะพบเนื้อเยื่อบุผิวที่มีการเรียงตัวชั้นเดียวแบบ ciliated cuboidal epithelium พบซิเลียซึ่งคาดว่าจะทำหน้าที่โบกพัดเซลล์ไข่ขณะที่มีการปล่อยเซลล์ไข่ออกสู่ภายนอก ซึ่งบริเวณที่มีซิเลียจะเป็นด้านที่อยู่ติดกับแมนเทิลเสมอ

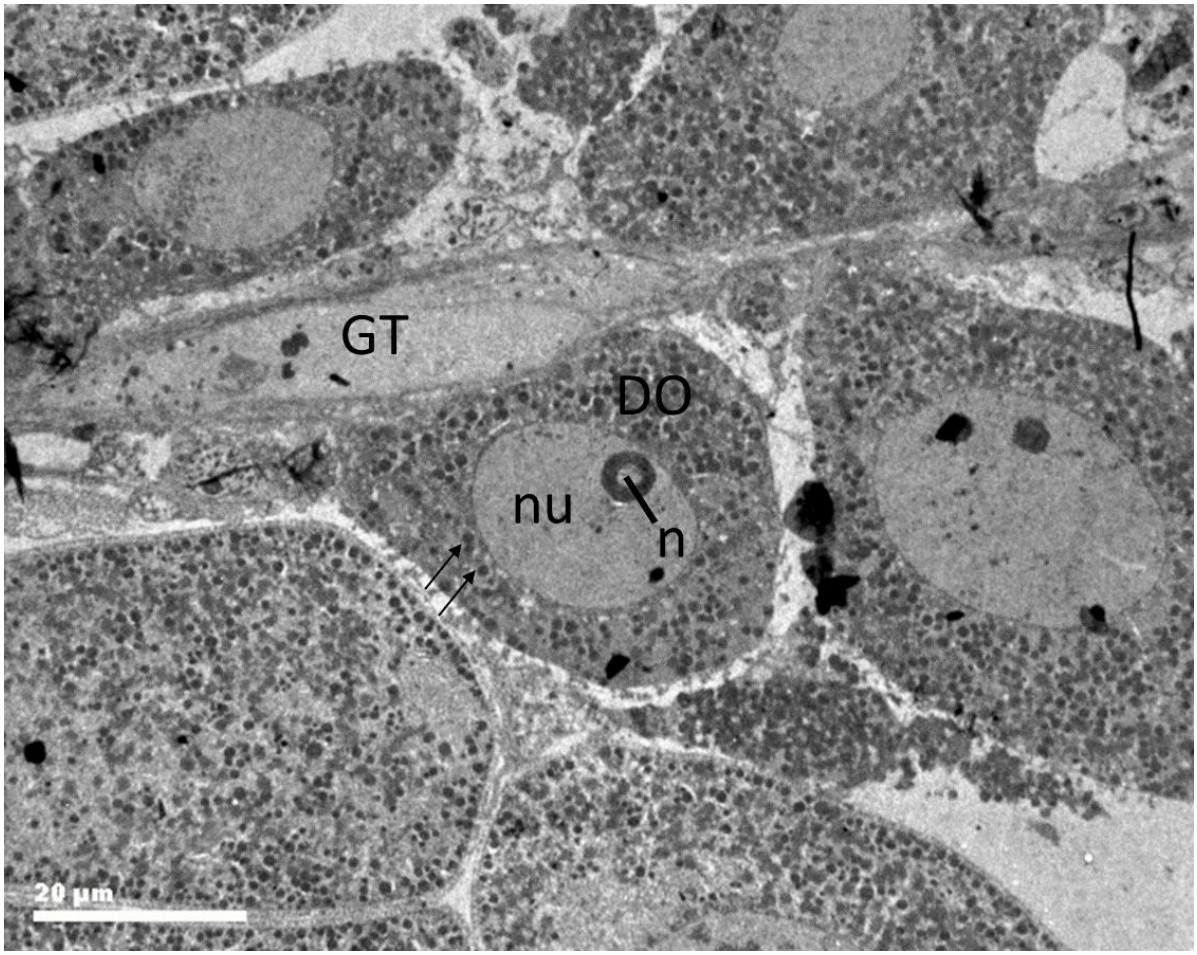


ภาพที่ 4-4 ลักษณะเซลล์ไข่ภายในท่อท่อรวม ซึ่งเป็นท่อที่จะส่งไข่ออกไปยัง gonophore เพื่อขณะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ Bar = 50 µm

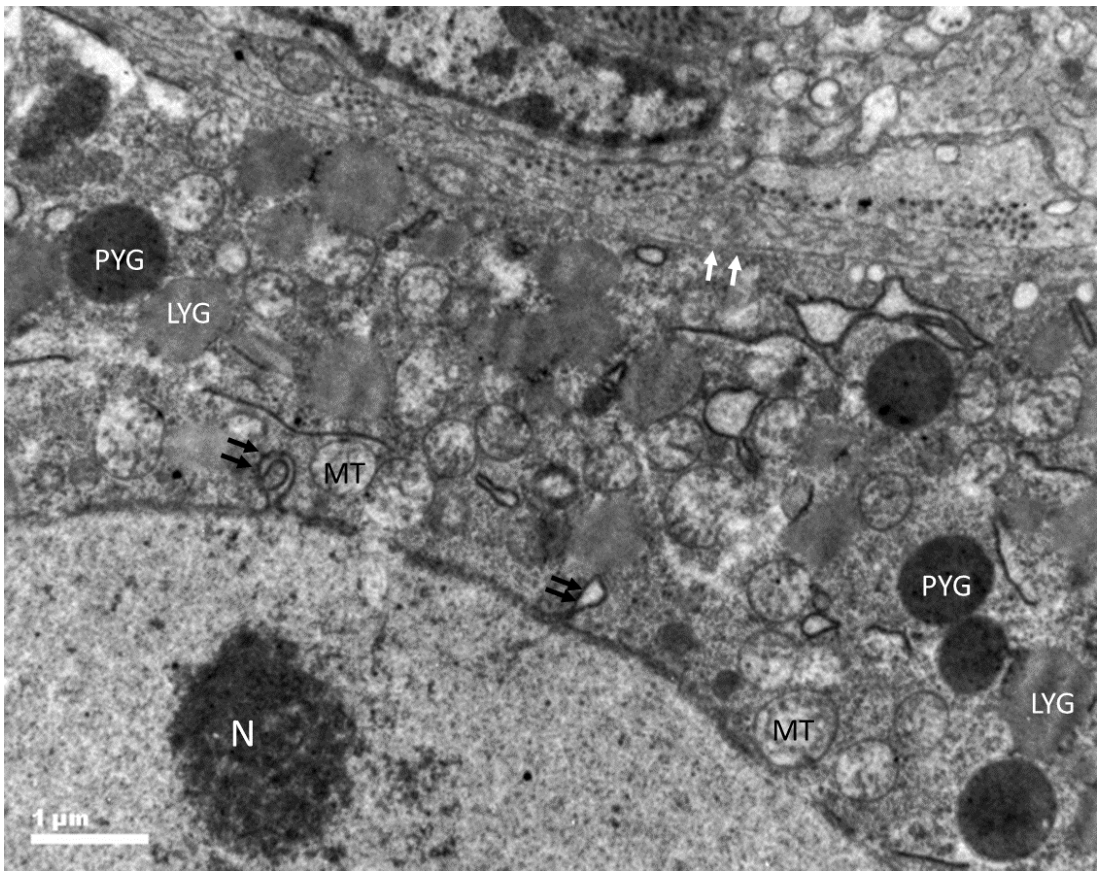
1.2 โครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

การศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของสืบพันธุ์เพศเมียหรือเซลล์ไข่โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) เผยให้เห็นโครงสร้างของเซลล์ไข่ดังภาพที่ 4-5 โดยพบว่าไข่ที่กำลังพัฒนา (DO, developing oocyte) จะติดกับส่วนของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (GT, gonadal tubules) พบนิวคลีโอลัสมีลักษณะทึบถายในนิวเคลียสขนาดใหญ่ ไซโทพลาซึมมีขนาดใหญ่ ภายในไซโทพลาซึมพบโครงสร้างของถุงอาหารสะสมชนิดเด่น 2 ชนิด ได้แก่ ถุงสะสมโปรตีน (protein vesicle) มีลักษณะทึบ และ ถึงสะสมไขมัน (lipid vesicle) มีลักษณะจางกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนายังสามารถพบไมโทคอนเดรียและ rough endoplasmic reticulum จำนวนมาก ดังรายละเอียดในภาพที่ 4-6

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ทำการยืนยันระยะของไข่ที่พร้อมปฏิสนธิว่าอยู่ในระยะ Primary oocyte ด้วย โดยการทดสอบการปฏิสนธิกับเซลล์อสุจิ ทำโดยการนำเซลล์ไข่จากตัวเมีย และนำเซลล์อสุจิจากตัวผู้มาทำการผสมเทียม โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกคือกลุ่มควบคุม เป็นกลุ่มที่มีเซลล์ไข่เพียงชนิดเดียว กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มทดสอบที่มีเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิอยู่รวมกัน การทดสอบดัดแปลงวิธีการจาก Song et al (2009) ผลการทดสอบพบว่า เซลล์ไข่ในกลุ่มควบคุมไม่ได้รับการปฏิสนธิเนื่องจากไม่มีเซลล์อสุจิจะไม่พบการแบ่งเซลล์ไม่ว่าจะทิ้งไว้นานเพียงในก็ตาม แต่เซลล์ไข่ในกลุ่มทดสอบที่ได้รับการการปฏิสนธิเนื่องจากมีเซลล์อสุจิจะเกิดการแบ่งเซลล์แบบ Meiosis I ภายในระยะเวลาประมาณ 30 นาที โดยจะสังเกตเห็นเซลล์ polar body ซึ่งเป็นเซลล์ขนาดเล็กเนื่องจากมีไซโทพลาซึมน้อย

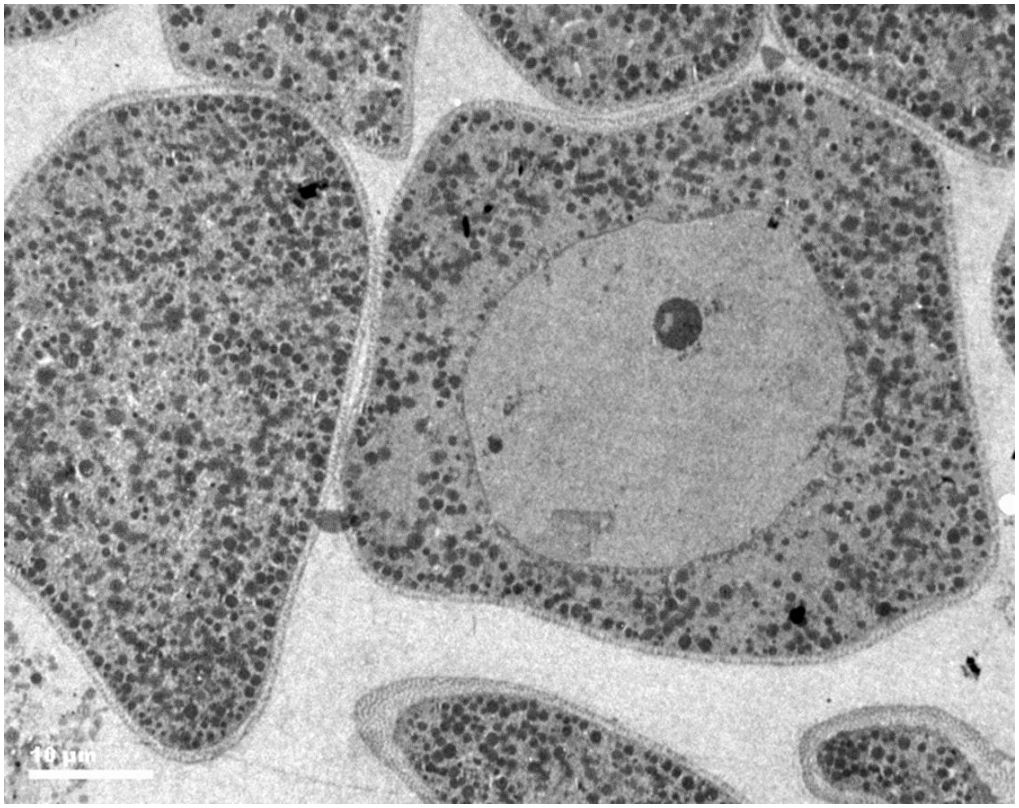


ภาพที่ 4-5 โครงสร้างจุลกายวิภาคของสืบพันธุ์เพศเมียหรือเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนา
n, nucleolus; GT, gonadal tubule; DO, developing oocyte.

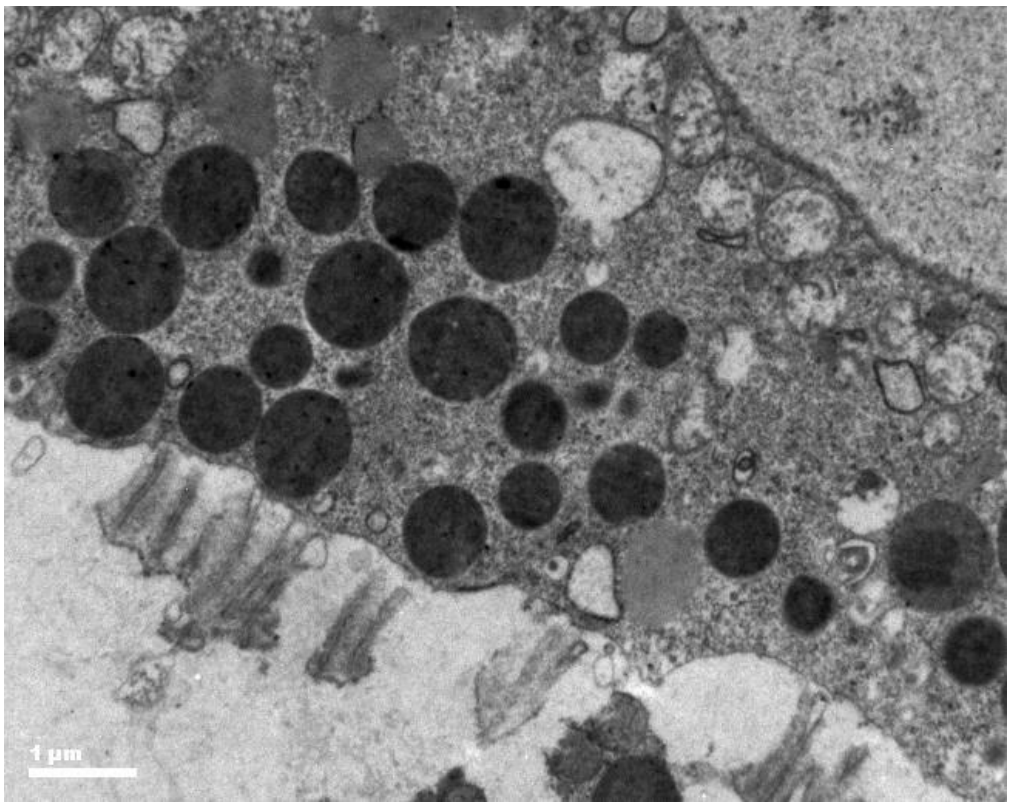


ภาพที่ 4-6 โครงสร้างจุลกายวิภาคของสืบพันธุ์เพศเมียหรือเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนา แสดงรายละเอียดเพิ่มขึ้น N, nucleolus; PYG, protein yolk granule; LPG, lipid yolk granule; MT, mitochondria; ลูกศรสีขาวม บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนาอยู่ติดกับฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์; ลูกศรทึบ, การโป่งออกของเยื่อหุ้มนิวเคลียสเพื่อกลายเป็น rough endoplasmic reticulum

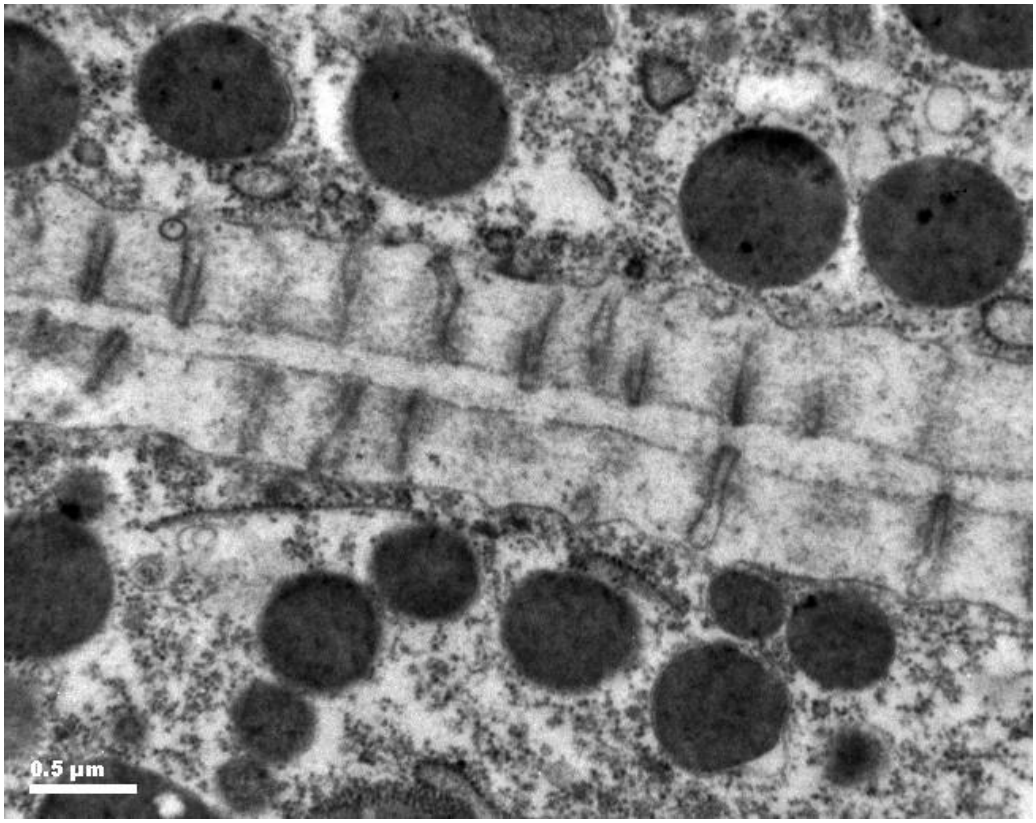
เมื่อเซลล์ไข่พัฒนาเต็มที่แล้ว (mature oocyte) ภาพที่ 4-7 ไข่จะมีลักษณะกลมมากขึ้นและหลุดจากบริเวณฐานของท่อ เคลื่อนที่ออกไปสู่บริเวณกลางท่อ พร้อมสำหรับการกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์เพื่อสืบพันธุ์ต่อไป ขนาดของนิวเคลียสใหญ่ พบนิวคิโอลัสทึบ ไซโทพลาซึมประกอบด้วยถึงอาหารประเภทโปรตีนและไขมันดังที่พบในไข่ที่กำลังพัฒนา แต่มีจำนวนมากขึ้น มีการสร้างชั้นคลุม (envelop) ที่บริเวณผิวของเซลล์ไข่ ขนาดของเซลล์ไข่จะใหญ่ขึ้น มีขนาดเฉลี่ยประมาณ 50 µm การสังเกตเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนากับเซลล์ไข่ที่พัฒนาแล้วภายใต้กล้อง TEM สามารถทำได้โดยสังเกตชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ไข่ ดังแสดงในภาพที่ 4-8 และ 4-9 เซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนาจะเห็นชั้นหุ้มเซลล์ที่กำลังสร้าง (ภาพที่ 4-8) ส่วยเซลล์ไข่ที่พัฒนาสมบรณ์แล้วชั้นหุ้มเซลล์จะสมบูรณ์ (ภาพที่ 4-9)



ภาพที่ 4-7 โครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์ไข่ที่พัฒนาเต็มที่แล้ว (mature oocyte)



ภาพที่ 4-8 การสร้างชั้นคลุม (envelop) ที่บริเวณผิวของเซลล์ไข่

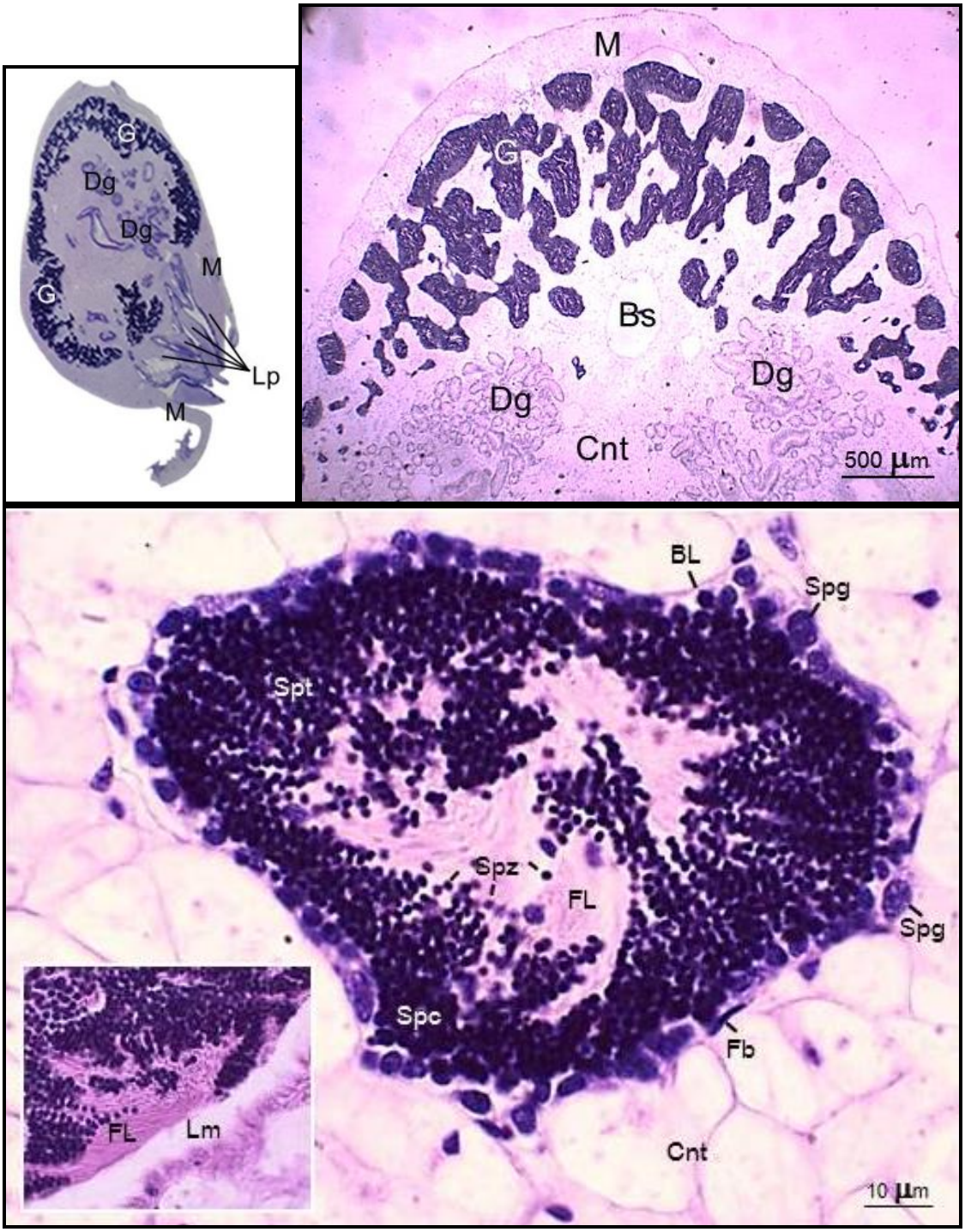


ภาพที่ 4-9 ชั้นคลุม (envelop) บริเวณผิวของเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์แล้ว

2. การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogenesis) ของหอยนางรมปากจีบ

2.1 การศึกษาด้วยเทคนิคมิญวิทยา

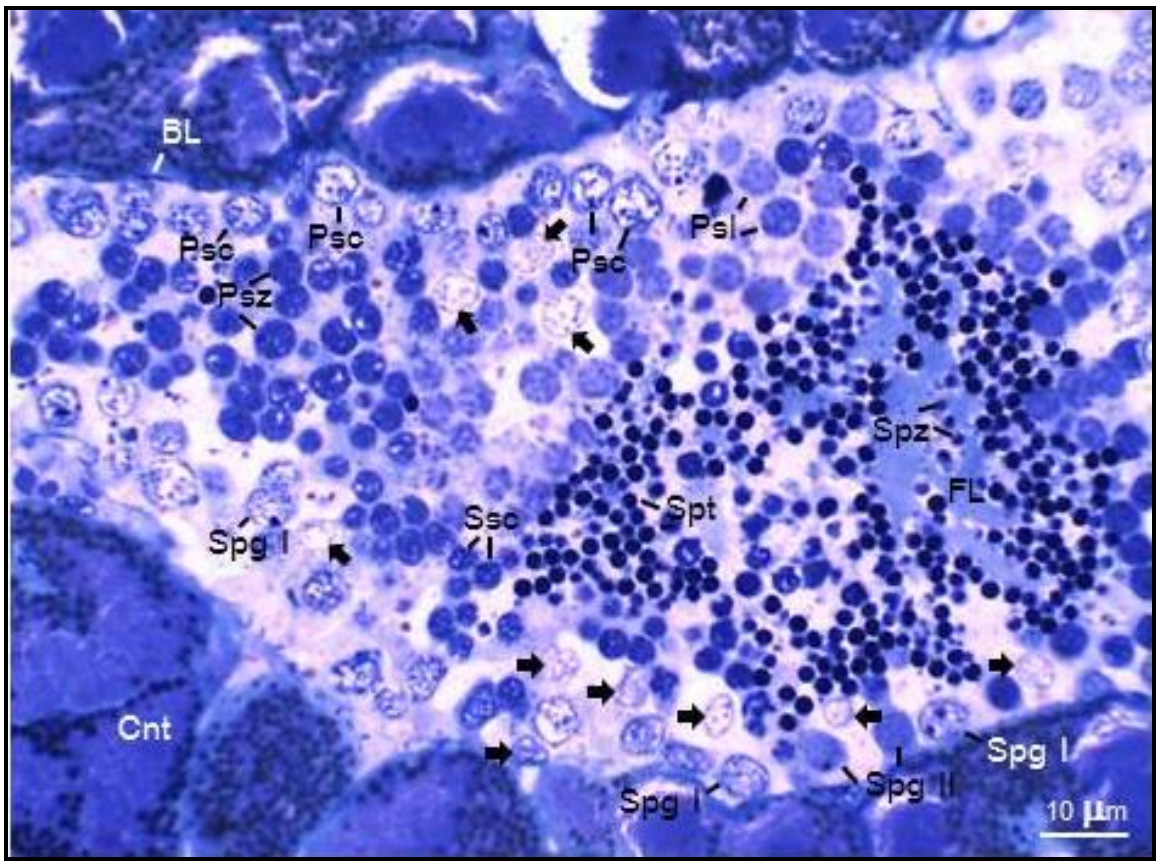
การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย โดยใช้เทคนิคทางมิญชวิทยา เมื่อฝังตัวอย่างเนื้อเยื่อในบล็อกพาราฟิน แล้วย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin (H&E) จากการศึกษาพบว่า อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male gonad) จะอยู่ระหว่างแมนเทิล (mantle) กับต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) โดยท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal tubule) จะเชื่อมติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ที่ฐานของท่อ (basal lamina) จะพบเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างผนังของท่อ (fibroblast) เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสค่อนข้างแบน ภายในท่อจะพบเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต่าง ๆ ประกอบด้วย สเปอร์มาโทโกเนียม (spermatogonium) เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ อยู่ใกล้กับฐานของท่อ มีนิวเคลียสค่อนข้างกลม และอาจพบนิวคลีโอลัส 1-2 อัน จากนั้นจะมีการแบ่งเซลล์ได้สเปอร์มาโทไซต์ (spermatocyte) เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ มีนิวเคลียสกลม ติดสีเข้ม ซึ่งจะมีการแบ่งเซลล์ไปเป็นสเปอร์มาทิด (spermatid) เป็นเซลล์ขนาดเล็ก มีนิวเคลียสกลม ติดสีเข้ม และพัฒนาไปเป็นสเปอร์มาโทซัว (spermatozoa) ที่สมบูรณ์ มีแฟลเจลลา (flagella) ช่วยในการเคลื่อนที่ โดยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะเริ่มจากด้านฐานของท่อเข้าสู่บริเวณลูเมน (lumen) ดังภาพที่ 4-9



ภาพที่ 4-9 เนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้เมื่อย้อมด้วยสี H & E

Dg = Digestive gland, G = Gonad, Lp = Labiel palp, M = Mantle, Bs = Blood sinus, Cnt = Connective tissue, BL = Basal lamina, Fb = Fibroblast, FL = Flagellum, Lm =Lumen, Spc = Spermatocyte, Spg = Spermatogonium, Spt = Spermatid, Spz = Spermatozoa

ด้านลูเมนของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ จะมีเนื้อเยื่อบุผิวชนิดที่มีขน (Ciliated epithelium) ทำหน้าที่โบกพัดเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ นอกจากนี้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังพบเซลล์ที่มีนิวเคลียสไม่กลม ซึ่งเป็นลักษณะนิวเคลียสของเซลล์ร่างกายที่เรียกว่า Intragonadal somatic cell (ISC) แทรกอยู่ด้วย ดังภาพที่ 4-10



ภาพที่ 4-10 ภาพขยายแสดงเนื้อเยื่อภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เมื่อย้อมด้วยสีเมทิลลีนบลู
BL = Basal lamina, Cnt = Connective tissue, FL = Flagellum,
Psc = Primary spermatocyte, Psd = Primary spermatocyte diplotene
Psl = Primary spermatocyte leptotene, Psp = Primary spermatocyte pachytene,
Psz = Primary spermacyte zygotene, Spg I = Spermatogonium type I,
Spg II = Spermatogonium type II, Spt = Spermatid, Spz = Spermatozoa,
Ssc = Secondary spermatocyte, arrow = Intragonadal somatic cell (ISC)

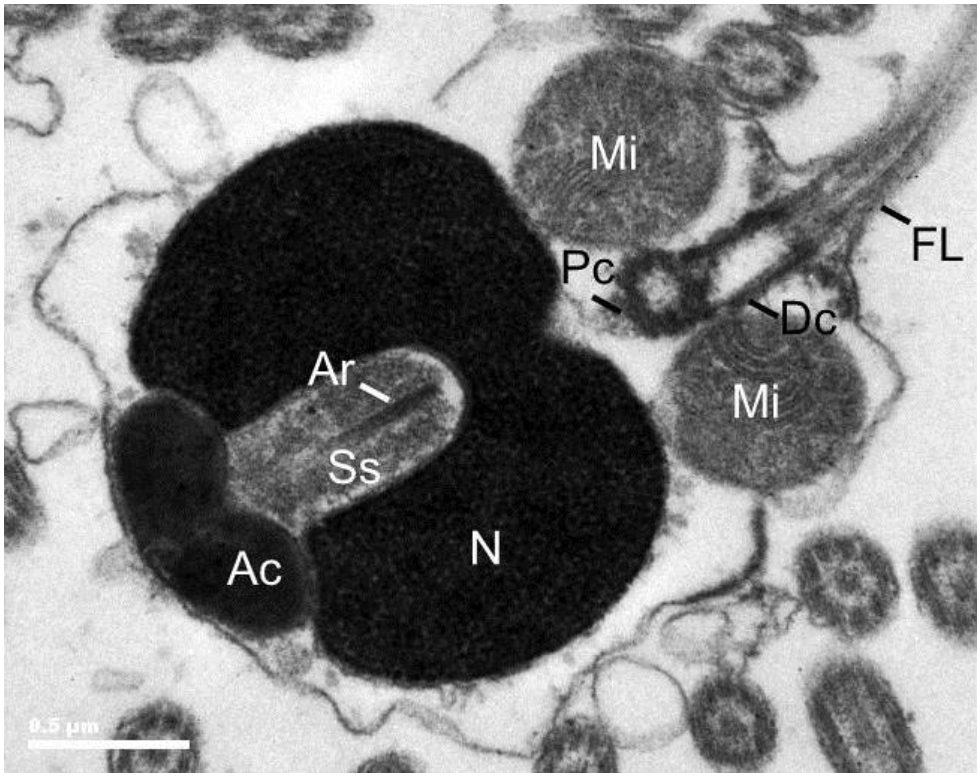
ถัดจากสเปอร์มาโทโกเนียมเข้ามาภายในท่อจะพบสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก (Primary spermatocyte) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างค่อนข้างกลม โครมาทินเริ่มมีการขดตัวหนาและติดสีเข้มโดยเฉพาะบริเวณขอบด้านในของเซลล์ติดกับเยื่อหุ้มนิวเคลียส พบเซลล์ในระยะต่าง ๆ ได้แก่ ระยะเลปโททีน (Primary spermatocyte leptotene) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาทินขดตัวติดสีเข้มเป็นจุด ๆ กระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส ระยะไซโกทีน (Primary spermatocyte zygotene) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาทินเริ่มขดตัวเป็นแท่งใหญ่หนาขึ้น ติดสีเข้มทั่วนิวเคลียส

ระยะแพคีทีน (Primary spermatocyte pachytene) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาทินขดตัวเป็นแท่งสั้นและหนา ติดสีเข้มมาก ระยะดิโพลทีน (Primary spermatocyte diplotene) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาทินขดตัวเป็นแท่งหนาบริเวณขอบด้านในของเยื่อหุ้มนิวเคลียส บางเซลล์พบว่าโครมาทินเริ่มเคลื่อนที่จากขอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียสเข้ามาอยู่ตรงกลางนิวเคลียส บางเซลล์สังเกตเห็นโครโมโซมประกอบด้วยโครมาทิด 2 แท่ง และบางเซลล์เห็นโครโมโซมมีลักษณะไขว้กัน ถัดจากสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกจะพบสเปอร์มาโทไซด์ระยะที่สอง (Secondary spermatocyte) เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กลงครึ่งหนึ่งจากสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาทินขดตัวหนา และติดสีเข้มมาก ไม่สามารถจำแนกระยะต่าง ๆ ของเซลล์ได้ ถัดจากสเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สองจะพบสเปอร์มาทิด (spermatid) จำนวนมาก โดยเป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก นิวเคลียสมีรูปร่างกลม ติดสีเข้มมาก ด้านในสุดของท่อจะพบสเปอร์มาโทซัว เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุด บางเซลล์พบส่วนของอะโครโซม (acrosome) ไมโทคอนเดรีย (mitochondria) และแฟลเจลลัม (flagellum)

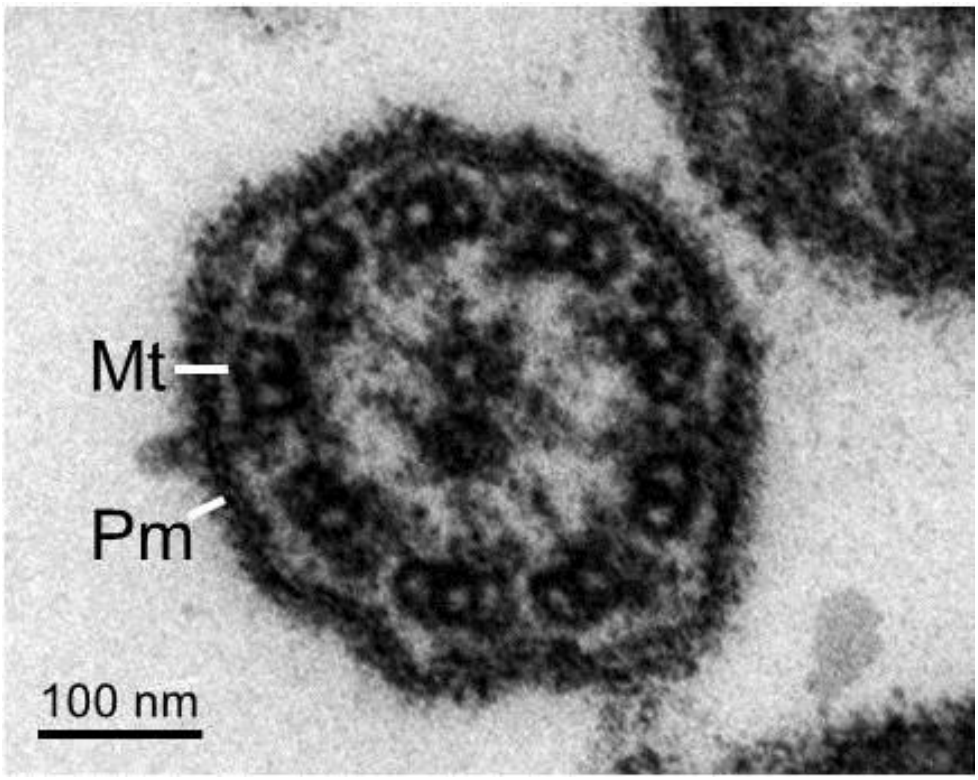
2.2 โครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

โครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ หรือ ของสเปอร์มาโทซัว หรือ อสุจิ (sperm) ดังแสดงในภาพที่ 4-11 ส่วนหัว (head) ของสเปอร์มาโทซัว จะมีนิวเคลียสเป็นรูปทรง barrel-shaped มีอะโครโซมรูปร่าง cup-shaped อยู่ด้านบนนิวเคลียส ภายในสังเกตเห็น Subacrosomal space และ Axial ส่วนลำตัว (middle piece) ประกอบด้วย ไมโทคอนเดรียที่มีรูปร่างกลมล้อมรอบเซนทริโอลส่วนต้น (proximal centriole) และเซนทริโอลส่วนปลาย (distal centriole) ส่วนหาง (tail) หรือแฟลเจลลัมประกอบด้วยไมโครทูบูล (microtubule) ที่มีการเรียงตัวแบบ 9+2 และมีเยื่อหุ้ม (plasma membrane) ล้อมรอบ ดังภาพที่ 4-12

ส่วนหัว (head) ของสเปอร์มาโทซัว จะมีนิวเคลียสเป็นรูปทรง barrel-shaped มีอะโครโซมรูปร่าง cup-shaped อยู่ด้านบนนิวเคลียส ภายในสังเกตเห็น Subacrosomal space และ Axial ส่วนลำตัว (middle piece) ประกอบด้วย ไมโทคอนเดรียที่มีรูปร่างกลมล้อมรอบเซนทริโอลส่วนต้น (proximal centriole) และเซนทริโอลส่วนปลาย (distal centriole) ส่วนหาง (tail) หรือแฟลเจลลัมประกอบด้วยไมโครทูบูล (microtubule) ที่มีการเรียงตัวแบบ 9+2 และมีเยื่อหุ้ม (plasma membrane) ล้อมรอบ



ภาพที่ 4-11 โครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ



ภาพที่ 4-12 โครงสร้างจุลกายวิภาคของส่วนหาง (flagellum) ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ

บทที่ 5

อภิปรายผลการศึกษา

1. การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (oogenesis) ของหอยนางรมปากจีบ

หอยนางรมปากจีบเป็นหอยที่มีเพศแยก อวัยวะที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะอยู่ระหว่างแมนเทิลกับต่อมสร้างน้ำย่อย โดยท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะเชื่อมติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียมีการพัฒนาอยู่ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ภายนอกท่อสร้างเซลล์พบเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันอยู่ล้อมรอบ ที่ฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบ basement membrane โดยบริเวณนี้จะพบ Fibrocyte ซึ่งเป็นเซลล์ร่างกาย ที่ ทำหน้าที่ล้อมรอบท่อสืบพันธุ์ และพบ oogonium ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย เป็นเซลล์มีขนาดเล็กเนื่องจากยังไม่มีการสะสมอาหารหรือโยล์ค (yolk) เมื่อเซลล์ได้รับการพัฒนาโดยการสะสมโปรตีน yolk จะทำให้ไซโทพลาซึมมีขนาดใหญ่ขึ้นทำให้เห็นเซลล์ใหญ่ขึ้นตามไปด้วย ไข่ที่มีขนาดใหญ่นี้จัดอยู่ในระยะ primary oocyte ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมสำหรับการปฏิสนธิหากมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกสู่ภายนอก หากเซลล์ไข่ได้รับการปฏิสนธิจึงจะมีการแบ่งนิวเคลียสแบบ ไมโอซิสที่ 1 (Meiosis I) และ ไมโอซิสที่ 2 (Meiosis II) ต่อไป แต่หากไข่ที่ปล่อยออกจากตัวแม่ไม่ได้รับการปฏิสนธิก็จะหยุดอยู่ในระยะ primary oocyte เท่านั้น ซึ่งต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมที่จะพบว่าระยะตกไข่หรือระยะที่ไข่พร้อมผสมกับเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ต้องอยู่ในระยะ Metaphase I ของ Meiosis I เท่านั้น ในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันจะพบระยะของไข่ที่มีความพร้อมในการปฏิสนธิแตกต่างกันไป

การศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของสืบพันธุ์เพศเมียหรือเซลล์ไข่โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เผยให้เห็นโครงสร้างของเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนา (DO, developing oocyte) จะพบติดกับส่วนของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (GT, gonadal tubules) พบนิวคลีโอลัสมีลักษณะทึบถายในนิวเคลียสขนาดใหญ่ ไซโทพลาซึมมีขนาดใหญ่ ภายในไซโทพลาซึมพบโครงสร้างของถุงอาหารสะสมชนิดเด่น 2 ชนิด ได้แก่ ถุงสะสมโปรตีน (protein vesicle) มีลักษณะทึบ และ ถึงสะสมไขมัน (lipid vesicle) มีลักษณะจางกว่า นอกจากนี้ยังพบไมโทคอนเดรียและ rough endoplasmic reticulum จำนวนมาก ลักษณะดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าไข่กำลังมีการใช้พลังงานจากไมโทคอนเดรียเพื่อกระตุ้นการสร้างอาหารสะสมไว้ภายในไซโทพลาซึม เพื่อเตรียมพร้อมสำหรับการเจริญของตัวอ่อน หากไข่ได้รับการปฏิสนธิ

2. การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (spermatogenesis) ของหอยนางรมปากจีบ

ในระยะเริ่มต้นของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะพบเซลล์ในระยะ Spermatogonia จำนวนมากที่ด้านในของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งอยู่ติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน โดยพบเซลล์ในระยะ Spermatogonia ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสมีลักษณะค่อนข้างกลม ติดสีจาง ฐานของเซลล์จะแบนติดกับขอบของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ บางเซลล์สังเกตเห็นการขดตัวของเส้นใยโครมาทินที่บริเวณด้านในติดกับเยื่อหุ้มนิวเคลียส และอาจจะพบนิวคลีโอลัส 1-2 อัน อยู่ตรงกลางนิวเคลียส ถัดจากชั้นของเซลล์ในระยะ Spermatogonia จะพบเซลล์ในระยะ Primary spermatocyte ระยะ Pachytene เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสค่อนข้างกลม เส้นใยโครมาทินขดตัวหนาขึ้น ติดสีเข้ม เนื่องจากในระยะนี้โครโมโซมคู่เหมือน (Homologous chromosome) จะมาเข้าคู่กันตลอดความยาวของแท่งโครโมโซม นอกจากนี้ถัดจากชั้นของเซลล์ในระยะ Spermatogonia ยังพบเซลล์ใน

ระยะ Primary spermatocyte ระยะ Diplotene เซลล์จะมีขนาดเล็กลงเล็กน้อย นิวเคลียสมีรูปร่างกลม โครมาทินเริ่มเคลื่อนที่จากขอบของเยื่อหุ้มนิวเคลียสเข้ามาอยู่ตรงกลางนิวเคลียส บางเซลล์เห็นโครโมโซมประกอบด้วยโครมาทิด 2 แท่งชัดเจน บางเซลล์เห็นโครโมโซมมีลักษณะไขว้กัน เนื่องจากในระยะนี้โครโมโซมคู่เหมือนเริ่มแยกออกจากกัน โดยการหลุดจากกันแบบสุ่ม ทำให้บางตำแหน่งยังติดกันอยู่ ส่วนเซลล์ในระยะ secondary spermatocyte เป็นระยะที่จำแนกได้ยาก เนื่องจากนิวเคลียสจะเข้มมาก ถัดจากชั้นของเซลล์ในระยะ Spermatocyte จะพบเซลล์ในระยะ Spermatid จำนวนมาก โดยเซลล์ที่พบบางเซลล์เป็นเซลล์ขนาดเล็ก นิวเคลียสกลม ติดสีเข้ม บางเซลล์พบส่วนของอะโครโซม (Acrosome) และไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) ส่วนเซลล์ในระยะ Spermatozoa เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุด และเป็น Spermatozoa ที่สมบูรณ์ ซึ่งมี Flagellum ช่วยในการเคลื่อนที่ ซึ่งเซลล์ในระยะต่างๆ ที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบมีลักษณะสอดคล้องกับงานวิจัยในหอยนางรม Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) ที่ได้จำแนกเซลล์ที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็น 5 ชนิด (Franco, et al., 2008) นอกจากนี้ที่บริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังพบเซลล์ที่นิวเคลียสมีลักษณะไม่กลม ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ร่างกาย (Somatic cell) ตามรายงานของ Franco, et al. (2011) พบเซลล์ร่างกายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรม Pacific oyster โดยเรียกเซลล์ร่างกายที่พบในท่อนี้ว่า Intragonadal somatic cell

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการเพิ่มข้อมูลความรู้ด้านกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมชนิดที่พบในประเทศไทย เพื่อใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการจำแนกเพศของหอยนางรมในช่วงต้นของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และช่วยในการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์หอยนางรมที่มีความสมบูรณ์ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย กองทุนวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปี พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่สัญญา 9/2558

บรรณานุกรม

Akaishi, F. M., Silva de Assis, H. C., Jakobi, S. C. G., Eiras-Stofella, D. R., St-Jean, S. D., Courtenay, S. C., Lima, E. F., Wagener, A. L. R., Scofield, A. L., & Oliveira Ribeiro, C. A., 2004. Morphological and neurotoxicological findings in tropical freshwater fish (*Astyanax* sp.) after waterborne and acute exposure to water soluble fraction (WSF) of crude oil. Archives of Environmental Contamination and Toxicology. 46, 24-32.

Franco, A., Heude Berthelin, C., Goux, D., Sourdaine, P. and Mathieu, M. (2008). Fine structure of the early stage of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Tissue and cell*, 40, 251-260.

Franco, A., Kellner, K., Goux, D., Mathieu, M. and Berthelin Heude C. (2011). Intragonadal Somatic Cells (ISCs) in the male oyster *Crassostrea gigas*: Morphology and contribution in germinal epithelium structure. *Micron*, 42, 718-725.

Fukazawa, H., Kawamura, T., Takami, H., Watanabe, Y., 2007. Oogenesis and relevant changes in egg quality of abalone *Haliotis discus* during a single spawning season Aquaculture 270, 265-275.

Galtsoff, P.S. (1964). *The American Oyster Crassostrea virginica Gmelin*. Washington, D.C.: United States Government Printing Office.

Kingtong, S., Chitramvong, Y., Janvilisri, T., 2007. ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. Aquatic Toxicology 85, 124-132.

Lango-Reynoso, F., Chávez-Villalba, J., Cochard, J., Le Pennec, M., 2000. Oocyte size, a means to evaluate the gametogenic development of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. Aquaculture 190, 183-199.

Pronker, A. E., Nevejan, N. M., Peene, F., Geijsen, P., Sorgeloos, P., Hatchery broodstock conditioning of the blue mussel *Mytilus edulis* (Linnaeus 1758). 2008. Part I. Impact of different micro-algae mixtures on broodstock performance. Aquaculture International 16, 297-307.

Song, Y.P., Suquet, M., Quéau, I., Lebrun, L., 2009. Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. Aquaculture, 287: 311–314.

Yoosukh, W., Duangdee, T., 1999. Living oysters in Thailand. Phuket Mar Biol 19, 363-370.

ภาคผนวก
เอกสารเผยแพร่งานวิจัย

ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด

หัวหน้าโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิน กิ่งทอง
หน่วยงาน	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
	169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมืองฯ จ. ชลบุรี 20131
โทรศัพท์	038-103-127
โทรสาร	038-393-489
อีเมลล์	sutin@buu.ac.th