รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาโครงสร้าง หน้าที่ และ
ความสัมพันธ์ของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์
ของหอยเป๋าฮื้อพันธุ์พื้นเมือง *Haliotis asinina* Linnaeus"

Studies of the structures, roles and relationships between the nervous and reproductive systems of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus

หัวหน้าโครงการ: ศ.ดร. ประเสริฐ โศภน
หน่วยงาน: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

มประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุน
รวิจัย (สกว) ประเภท "ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการ
สัญญาเลขที่ BRG4/2540 ลงวันที่ 1 มกราคม 2540

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง "การศึกษาโครงสร้าง หน้าที่ และ
ความสัมพันธ์ของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์
ของหอยเป๋าฮื้อพันธุ์พื้นเมือง *Haliotis asinina* Linnaeus"

Studies of the structures, roles and relationships between the nervous and reproductive systems of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus

หัวหน้าโครงการ: ศ.ดร. ประเสริฐ โศภน
หน่วยงาน: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับเงินสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ประเภท "ทุนวิจัยองค์ความรู้ใหม่ที่เป็นพื้นฐานต่อการพัฒนา" ตามสัญญาเลขที่ BRG4/2540 ลงวันที่ 1 มกราคม 2540

2 บทคัดย่อ

ระบบประสาทของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* เป็นแบบดั้งเดิม (primitive type) กล่าวคือ ยังไม่มีกระบวนการ centralization และ cephalization เป็นระบบประสาทกลาง ระบบประสาทจึงประกอบด้วยปมประสาทที่โยงต่อกันด้วยแท่งประสาท (nerve cords) ปมประสาทที่สำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ คือ ปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral

ปมประสาทแต่ละปมแบ่งออกเป็นชั้น cortex และ medulla ชั้น cortex เป็นขอบนอกที่ประกอบด้วยเซลล์ประสาท (neuron-NR) เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell-NS) และเซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (neuroglia–NG) ส่วน medulla ประกอบด้วยมัดของใยประสาท (nerve bundles) ที่สานกันไปมา และเซลล์ neuroglia ที่แทรกอยู่ระหว่างใยประสาท

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาโดยการย้อมด้วยสีพิเศษ ทำให้เราสามารถแยกเซลล์ NR ออกได้เป็น 4 ชนิด เซลล์ NS 3 ชนิด เซลล์ NG 3 ชนิด การศึกษาด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงความแตกต่างในไซโตปลาสซึมของเซลล์ NS_1 NS_2 ในปมประสาท cerebral และ pleuropedal โดยเซลล์เหล่านี้ผลิตแกรนูลที่มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน ส่วน NS_3 มีลักษณะเหมือนกัน จึงคาดว่า NS_1 กับ NS_2 น่าจะเป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่กำลังสร้างและหลั่งฮอร์โมน ส่วน NS_3 อาจจะเป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่กำลังจะสลายตัว

การศึกษาการกระจายของฮอร์โมนที่คล้าย human GH, insulin, LH และ FSH พบว่า มีฮอร์โมนคล้าย GH ปริมาณมากที่สุด และมี insulin-liked, FSH–liked hormone น้อยมากในปมประสาท cerebral การกระจายของ GH-liked hormone พบอยู่ในเซลล์ NS_1 กับ NS_3 และในมัดใยประสาทกลาง medulla ส่วนในปมประสาท pleuropedal กับ visceral ไม่มี GH และ insulin-liked hormone แต่อาจจะมี FSH-liked และ LH-liked hormone อยู่บ้าง แต่ไม่สามารถบอกปริมาณได้ เนื่องจากข้อจำกัดในเรื่องของส่วนอนุรักษ์ที่มีเหลืออยู่ในฮอร์โมนของมนุษย์และของหอยอาจจะน้อยมาก ทำให้การย้อมด้วยแอนติบอดีต่อฮอร์โมนของมนุษย์ไม่ติดสีเท่าที่ควร การศึกษาโดยวิธีimmunoblotting สามารถชี้ชัดได้เฉพาะ GH-liked hormone ซึ่งมีอยู่ในปริมาณสูงในปมประสาท cerebral โดยอาจจะปรากฏเป็น 2 แถบ คือ ที่ MW 95 และ 130 kD

รังไข่และอัณฑะของหอยเป๋าฮื้อ ไม่มีการแยกหน่วยผลิตเซลล์สืบพันธุ์ออกจากกันเด็ดขาด แต่จะมีการแบ่ง gonad ออกเป็นห้องเล็ก ๆ (compartments) โดยแผ่นเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae ที่ยึดระหว่าง gonadal capsule กับ hepatopancreatic capsule เซลล์สืบพันธุ์พัฒนามาจาก gonia เซลล์ที่เกิดและอยู่ติดกับแผ่น trabeculae โดยเฉพาะทางด้านฐานที่ติดกับ gonadal capsule

เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แบ่งออกเป็น 13 ขั้น คือ spermatogonia (Sg), primary spermatocytes (LSc, ZSc, PSc, DSc, MSc), secondary spermatocytes (SSc), spermatids 4 ขั้น (St_{1-4}), spermatozoa 2 ขั้น (Sz_{1-2}), เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียแบ่งเป็น 6 ขั้นคือ oogonia (Og), และ primary oocytes 5 ขั้น (Oc_{1-5})

การศึกษาเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้โดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้เข้าใจวิธีขดของเส้นใยโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งเป็นแบบ "fibrous to granular type" การพัฒนาของ acrosome ในระยะ St_3 และ St_4 เกิดขึ้นจากการรวมตัวของ proacrosomal granules ที่อาจจะถูกสร้างขึ้นตั้งแต่ระยะ PSc การเรียงตัวของ centriole และไมโตคอนเดรียที่ด้านท้ายของนิวเคลียสของเซลล์ St_3 และ St_4 เป็นจุดเริ่มต้นของการพัฒนาหาง

การศึกษาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้สามารถแยกเซลล์ตามกระบวนการสังเคราะห์ (synthetic activities) ออกเป็นช่วงต่าง ๆ คือ Oc_1 สังเคราะห์ ribosomes เป็นหลักจึงเรียกว่า ribosomal phase Oc_2 มี organelles ที่ประกอบด้วย RER และ Golgi complexes เป็นหลักจึงเรียกว่า Golgi-RER phase Oc_3 มีการสังเคราะห์ jelly coat granules และ cortical granules เป็นหลักจึงเรียกว่า synthetic phase Oc_4 มีการสร้าง vitelline-jelly coat เป็นหลักจึงเรียกว่า vitelline-jelly coat phase Oc_5 พัฒนาเต็มที่จึงเรียกว่า mature phase

วงจรการสืบพันธุ์ของอัณฑะและรังไข่ในรอบหนึ่งปี แบ่งออกเป็น 5 ช่วง คือ proliferative, premature, mature, spawning และ spent โดยเพศเมียมี spawning 2 ช่วงในรอบปี คือ ประมาณเดือนมีนาคมถึงเมษายน และสิงหาคมถึงตุลาคม หอยเพศผู้มีช่วงการ spawning ที่ยาวกว่า และบางตัวสามารถ spawn ได้เกือบตลอดปี

จากการศึกษารังไข่ด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าอาจจะมี LH-liked hormone และ Egg Laying hormone ในรังไข่ โดยอาจจะมีกลุ่มเซลล์ในแผ่น trabeculae ที่เป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนเหล่านี้

ระบบประสาทโดยเฉพาะปมประสาทของหอยเป๋าฮื้อ มีการพัฒนา 2 ช่วงคือ ช่วง juvenile ระหว่าง 1-5 เดือน ในช่วงนี้มหกายวิภาคของระบบประสาทพัฒนาเป็นรูปแบบสมบูรณ์ แต่ในส่วน cortex ของปมประสาทยังมีจำนวนเซลล์ประสาทไม่มากนัก โดยเฉพาะเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก และช่วง premature ระหว่าง 6-11 เดือน ซึ่งมีการเพิ่มของจำนวนเซลล์ NS และ NR_1 มาก และการติดสี chrome-hematoxylin และ paradehyde fuchsin ของแกรนูลในเซลล์ NS ระบบประสาทและปมประสาทพัฒนาสมบูรณ์เมื่อหอยอายุได้ 12 เดือนขึ้นไป

3 สารบัญ

	หน้า
1. กิตติกรรมประกาศ	
2. บทคัดย่อ	i
3. สารบัญ	iv
4. บทนำ	1
4.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	1
4.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ	3
5. วิธีการทดลอง	4
5.1 การเลี้ยงและการเลือกหอยเป๋าฮื้อเพื่อการทดลอง	4
5.2 การศึกษามหกายวิภาคของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์	4
5.3 การศึกษากายวิภาคของระบบประสาทในระดับ จุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	5
5.3.1 การศึกษาในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา	5
5.3.2 การศึกษาในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	5
5.4 การศึกษาชนิด ลักษณะ และหน้าที่ของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน และประเภทของสารฮอร์โมนในปมประสาทต่าง ๆ	5
5.4.1 การศึกษาจุลกายวิภาคและการกระจายของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน	5
5.4.2 การศึกษาและแยกประเภทของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน โดยการย้อมด้วยสีพิเศษ	6
5.4.3 การตรวจหาเซลล์ในปมประสาทที่ผลิตฮอร์โมนที่กระตุ้น การเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์โดยวิธี immunohistochemistry	7
5.4.4 การวิเคราะห์สารฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ในปมประสาทโดยวิธี immunoblotting	7
5.5 การศึกษากายวิภาคของระบบสืบพันธุ์และการผลิตเซลล์สืบพันธุ์ ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	8
5.5.1 การศึกษาด้วยจุลทรรศน์ธรรมดา	8
5.5.2 การศึกษาด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	8

5.6 การศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ในหอยตัวเต็มวัยในรอบ 1 ปี 9
5.7 การศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนาการของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ 9
6. ผลการทดลอง 10
6.1 มหกายวิภาคของระบบประสาทและปมประสาท 10
6.2 จุลกายวิภาคของปมประสาท 13
6.2.1 ปมประสาท cerebral 13
6.2.2 ปมประสาท pleuropedal 13
6.2.3 ปมประสาท visceral 14
6.3 การจำแนกชนิดของเซลล์ในปมประสาทโดยการย้อมด้วยสีพิเศษ 14
6.3.1 ปมประสาท cerebral 14
6.3.2 ปมประสาท pleuropedal 17
6.3.3 ปมประสาท visceral 20
6.3.4 จุลกายวิภาคและชนิดของเซลล์ในปมประสาท pedal cord 21
6.4 การศึกษาลักษณะของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 27
6.4.1 ปมประสาท cerebral 27
6.4.2 ปมประสาท pleuropedal 30
6.5 การศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมน GH-liked, Insulin-liked, FSH liked และ LH liked ในปมประสาทโดยวิธี immunohistochemistry 36
6.5.1 ปมประสาท cerebral 36
6.5.2 ปมประสาท pleuropedal 36
6.5.3 ปมประสาท visceral 38
6.6 การศึกษาฮอร์โมน GH-liked ในปมประสาท cerebral ด้วยวิธี immunoblotting 42
6.7 มหกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ 45
6.8 ลักษณะจุลกายวิภาคของอัณฑะและรังไข่ 45
6.9 การศึกษาลักษณะและการจำแนกขั้นของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา 48
6.10 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่อยู่ในต่อมอัณฑะ 51
6.10.1 เซลล์ในช่วง Spermatogenesis 51
6.10.2 เซลล์ในช่วง Spermiogenesis และการขดของไยโครมาติน 55
6.10.3 เซลล์ Spermatozoa 58

6.11 การศึกษาลักษณะและการจำแนกขั้นของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย
ในรังไข่โดยจุลทรรศน์ธรรมดา 61
6.12 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต่าง ๆ ในรังไข่โดย TEM 65
6.13 การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของต่อมอัณฑะและรังไข่
ของหอยที่เลี้ยงในระบบปิดซึ่งเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลในรอบ 1 ปี 72
6.14 การศึกษาการกระจายของ FSH-liked, LH-liked และ Egg Laying hormone
ของหอยเป๋าฮื้อในรังไข่และอัณฑะด้วยวิธี immunohistochemistry 75
6.14.1 FSH-liked และ LH-liked hormone 75
6.14.2 Egg Laying hormone (ELH) ของหอยเป๋าฮื้อ 75
6.15 การพัฒนาของระบบประสาท 79
6.16 การพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ 87
7. บทวิจารณ์ 91
7.1 มหกายวิภาคของระบบประสาทและปมประสาท 91
7.2 จุลกายวิภาคของปมประสาท 92
7.3 การจำแนกชนิดของเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน 92
7.4 การศึกษาลักษณะโครงสร้างละเอียดของเซลล์ประสาท
และเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 94
7.5 การศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมนที่คล้ายฮอร์โมน GH, insulin, FSH และ
LH ของสัตว์มีกระดูกสันหลังในปมประสาทโดยวิธี immunohistochemistry 95
7.6 การศึกษา GH-liked ฮอร์โมนในปมประสาท cerebral ด้วยวิธี immunoblotting 96
7.7 มหกายวิภาคของรังไข่และอัณฑะ 97
7.8 ลักษณะจุลกายวิภาคของอัณฑะและรังไข่ 97
7.9 การศึกษาลักษณะและการจำแนกขั้นของเซลล์สืบพันธุ์
ในหอยเพศผู้โดยจุลทรรศน์ธรรมดา 98
7.10 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้โดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 99
7.11 การสังเกตลักษณะและการจำแนกขั้นของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย
โดยจุลทรรศน์ธรรมดา 102
7.12 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน 103
7.13 การศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของอัณฑะและรังไข่ของหอย
ในระบบปิดซึ่งเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลในรอบ 1 ปี 105

7.14 การศึกษาการกระจายของ FSH-liked, LH-liked hormone
และ Egg Laying Hormones (ELH) ในรังไข่และอัณฑะของหอยเป๋าฮื้อ 105
7.15 การพัฒนาของระบบประสาท 106
7.16 การพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ 107
8. หนังสืออ้างอิง 108
9. ผลลัพธ์ 113
10. ภาคผนวก 120

4 บทนำ

4.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

หอยเป๋าฮื้อ หอยโข่งทะเล หรือหอยร้อยรู (abalone) เป็นหอยชนิดหนึ่งที่ชาวจีนและชาวญี่ปุ่นนิยมนำมาปรุงเป็นอาหารเป็นเวลานานกว่า 1500 ปี แต่เริ่มมีการบริโภคอย่างแพร่หลายและมีความสำคัญทางเศรษฐกิจในประเทศต่าง ๆ ทั่วโลกเมื่อประมาณ 30 กว่าปีที่ผ่านมา

หอยเป๋าฮื้อเป็นหอยกาบเดียว มีประมาณ 100 สปีชีส์ พบแพร่กระจายอยู่ตามชายฝั่งทะเลของทวีปต่าง ๆ ในเขตร้อน เขตอบอุ่น และเขตหนาว โดยทั่วไปหอยเป๋าฮื้อที่อาศัยอยู่ในเขตอบอุ่นและเขตหนาวมักมีขนาดใหญ่ และสปีชีส์ที่อาศัยอยู่ในเขตร้อนมักมีขนาดเล็ก (Ino, 1980; Uki, 1989; Hahn, 1989) หอยเป๋าฮื้อที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมีอยู่ประมาณ 20 สปีชีส์ ส่วนใหญ่มีขนาดใหญ่ และถูกจับจากแหล่งอาศัยธรรมชาติ ขณะนี้ได้เริ่มมีการเพาะเลี้ยงในระดับอุตสาหกรรมที่ทำรายได้สูงเช่นในประเทศญี่ปุ่น ออสเตรเลีย เม็กซิโก สหรัฐอเมริกา นิวซีแลนด์ และอัฟริกาใต้ (Uki, 1989) (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงประเทศที่ประกอบกิจการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ (*Haliotis* spp.) สายพันธุ์ต่าง ๆ ในเชิงอุตสาหกรรม (Cox, 1962; Ino, 1980; Fallu, 1991; Shepherd *et al.*, 1992)

ประเทศที่เพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อ	ชื่อวิทยาศาสตร์ของหอยเป๋าฮื้อ	ชื่อทั่วไป	ขนาด (ซ.ม.)	แหล่งอาศัยในธรรมชาติ
ญี่ปุ่น	*H. discus hannai*	ezo abalone Pacific abalone disc abalone	13-14	temperate
สหรัฐอเมริกา	*H. rufescens*	red abalone	7-20	temperate
เม็กซิโก	*H. corrugata* *H. fulgens*	pink abalone green abalone	15-18 12-20	temperate temperate
ออสเตรเลีย	*H. rubra* *H. laevigata*	blacklip abalone greenlip abalone	12-14 13-14	warm temperate
นิวซีแลนด์	*H. iris*	black-footed paua	18	temperate
ไต้หวัน	*H. diversicolor supertexta*	small abalone	5	tropical
ฝรั่งเศส	*H. tuberculata*	ormer abalone	12	temperate

เนื่องจากมีการนิยมบริโภคหอยเป๋าฮื้อกันอย่างแพร่หลาย การทำประมงหอยเป๋าฮื้อจากแหล่งอาศัยธรรมชาติอย่างเดียวจึงไม่เพียงพอต่อความต้องการของผู้บริโภค เนื่องจากปริมาณของหอยเป๋าฮื้อในแหล่งอาศัยธรรมชาติมีแนวโน้มลดลงเรื่อย ๆ จึงมีความจำเป็นที่ต้องมีการเพิ่มผลผลิตของหอยเป๋าฮื้อ โดยการพัฒนาด้านการเพาะเลี้ยงเพื่อสนองความต้องการของตลาดโลก

ในน่านน้ำไทยซึ่งอยู่ในเขตร้อนพบหอยเป๋าฮื้อ 3 ชนิด คือ *H. asinina, H. ovina* และ *H. varia* (Tookwinas *et al.*, 1986; Nateewathana and Hylleberge, 1986; Nateewathana and Bussawarit, 1988; Kahkai and Petjamrat, 1992) *H. asinina* พบที่จังหวัดชลบุรี จังหวัดระยอง จังหวัดตราด และที่ทะเลฝั่งอันดามัน เปลือกมีลักษณะบาง ยาว เรียว ผิวเรียบ สีเขียวมะกอกหรือสีเขียวปนน้ำตาล มีความยาวเฉลี่ย 8 ซ.ม. และความกว้างเฉลี่ย 4 ซ.ม. *H. ovina* พบที่จังหวัดชลบุรี จังหวัดระยอง จังหวัดตราด และที่ทะเลฝั่งอันดามัน เปลือกมีลักษณะค่อนข้างแข็งกลม รี สีม่วงหรือสีเขียวมะกอก มีความยาวเฉลี่ย 5 ซ.ม. และความกว้างเฉลี่ย 4 ซ.ม. *H. varia* พบที่เกาะภูเก็ตและที่ฝั่งทะเลอันดามัน เปลือกมีลักษณะกลมรี ค่อนข้างแข็ง ผิวขรุขระ สีเขียวมะกอกหรือสีน้ำตาลแดง มีความยาวเฉลี่ย 4 ซม. และความกว้างเฉลี่ย 3 ซม. ดังนั้น *H. asinina* จึงมีขนาดใหญ่ที่สุด หอยเป๋าฮื้อเป็นสัตว์ที่เคลื่อนไหวช้า กินพืชประเภทสาหร่ายสีแดงเป็นอาหาร และหากินในเวลากลางคืน *H. asinina* อาศัยอยู่ตามโขดหินและซากปะการัง ส่วน *H. ovina* และ *H. varia* อาศัยอยู่ตามซอกของโขดหิน หอยเป๋าฮื้อทั้งสามชนิดพบในระดับน้ำขึ้นน้ำลงจนถึงระดับความลึก 1-7 เมตร

ในประเทศไทย ศูนย์พัฒนาประมงทะเลฝั่งตะวันออกได้ประสบผลสำเร็จในการเพาะเลี้ยง *H. asinina* ในระดับหนึ่ง (Singhagraiwan, 1989; Singhagraiwan and Sasaki, 1991) สำหรับการเพาะเลี้ยง *H. ovina* ได้เริ่มมีการศึกษาโดย Jarayabhand *et al.*, (1991) ส่วน *H. varia* นั้นยังไม่มีการศึกษา ข้อมูลพื้นฐานต่างๆ เกี่ยวกับหอยเป๋าฮื้อที่พบในประเทศไทยยังมีน้อยมาก จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องทำการศึกษาวิจัย ในประเด็นที่สามารถนำเอาความรู้ขั้นพื้นฐานไปประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อได้ โดยเฉพาะในเรื่องวงสืบพันธุ์ของหอย ระยะเวลาการสร้างและการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ชนิดและหน้าที่ของปมประสาท ตลอดจนชนิดของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่ควบคุมการสืบพันธุ์ของหอย วิธีการกระตุ้นการตกไข่และสเปิร์ม วิธีการกระตุ้นให้หอยมีอัตราการเกาะเพิ่มขึ้น การเร่งอัตราการเติบโตและการอยู่รอดของลูกหอย ตลอดจนการศึกษาอาหารตามธรรมชาติ และการผลิตอาหารเสริมของหอย ทั้งนี้เพื่อจะได้นำข้อมูลพื้นฐานดังกล่าวมาเป็นแนวทางประยุกต์ใช้ในการเพาะเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อในเชิงพาณิชย์ต่อไป

4.2 วัตถุประสงค์ของโครงการ

โครงการวิจัยนี้มุ่งที่จะศึกษาชีววิทยาการสืบพันธุ์และระบบประสาทของหอยเป๋าฮื้อ โดยเน้นประเด็นต่าง ๆ ดังนี้

4.2.1 ศึกษามหกายวิภาค (gross anatomy) ของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ของตัวเต็มวัยของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina*

4.2.2 ศึกษากายวิภาคในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของปมประสาทที่ควบคุมการสืบพันธุ์ของตัวเต็มวัยของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina*

4.2.3 ศึกษาชนิดลักษณะและหน้าที่ของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neuro-secretory cells) และประเภทของสารฮอร์โมนในปมประสาทต่างๆ ของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina*

4.2.4 ศึกษากายวิภาคในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของระบบสืบพันธุ์และกระบวนการผลิตเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina*

4.2.5 ศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ในรอบ 1 ปีของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina*

4.2.6 ศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนาการของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina*

5 วิธีการทดลอง

5.1 การเลี้ยงและการเลือกหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* เพื่อการทดลอง

การเพาะเลี้ยงหอยกระทำที่ศูนย์พัฒนาประมงทะเลฝั่งตะวันตก (โดยกลุ่มของนายธเนศ พุ่มทอง) และที่สถานีเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำอ่างศิลา จ.ชลบุรี ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (โดยกลุ่มของ รศ. ดร. เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์) โดยเลี้ยงหอยเป๋าฮื้อในบ่อซีเมนต์ที่มีน้ำไหลถ่ายเทตลอดเวลา และให้สาหร่ายสีแดงชนิด *Gracilaria* spp. เป็นอาหารหลัก พร้อมกับให้อาหารเสริมที่ผลิตขึ้นเอง จะเลือกใช้หอยเป๋าฮื้อโตเต็มวัยที่แข็งแรงสมบูรณ์ มีขนาดเปลือกใกล้เคียงกัน และใช้ทั้งหอยเพศผู้และเพศเมีย การแยกเพศหอยสามารถทำได้โดยค่อย ๆ เปิดส่วนแมนเทิลที่อยู่ใต้เปลือกขึ้น จะเห็นอวัยวะสืบพันธุ์หุ้มอยู่รอบ ๆ hepatopancreas ซึ่งรวมเรียกว่า conical organs ซึ่งอยู่ค่อนมาทางด้านซ้ายของลำตัว หอยเพศเมียมี ovary สีเขียวเข้ม และหอยเพศผู้มี testis สีขาวหรือเหลืองนวล

นำหอยเป๋าฮื้อตัวเต็มวัยมาใส่ชามแก้วหรือพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 12 ซ.ม. สูง 6.5 ซ.ม. ชามละหนึ่งตัว ใส่น้ำทะเลให้เต็มภาชนะและใส่เกล็ดเมนทอลลงไปประมาณ 2-3 เกล็ด หากระจกมาปิดด้านบนภาชนะเพื่อไม่ให้เมนทอลระเหย ทิ้งไว้ประมาณ 10-30 นาที แล้วค่อย ๆ เพิ่มปริมาณเกล็ดเมนทอลเป็นระยะ ๆ และทิ้งไว้ประมาณ 1-1.5 ชั่วโมง กล้ามเนื้อของหอยจะคลายตัวเต็มที่ หลังจากนั้นค่อย ๆ เอาใบมีดผ่าตัดสอดไปที่บริเวณระหว่างเปลือกด้านในและตัวหอยเพื่อตัดกล้ามเนื้อที่ยึดระหว่างเปลือกกับตัวหอย จะทำให้สามารถแยกส่วนเปลือกและตัวหอยออกมาศึกษาได้

5.2 การศึกษามหกายวิภาคของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์

นำหอยเป๋าฮื้อตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย อย่างละประมาณ 10 ตัวมาทำให้สลบ แกะเปลือกออก นำมาใส่จานสำหรับผ่าตัดที่มีน้ำเกลือ 0.6% ศึกษาลักษณะภายนอก เช่น รูปร่าง ลักษณะ และรงควัตถุของส่วนหัว แผ่นเท้า หนวด และแมนเทิล เป็นต้น แล้วศึกษาลักษณะภายในโดยเฉพาะมหกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์เพศผู้ เช่น testis, vas deferens และ prostate gland และเพศเมีย เช่น ovary, oviduct และ albumen gland ฯลฯ เป็นต้น และระบบประสาทกับปมประสาท เช่น cerebral ganglia, pleuropedal ganglia, visceral ganglia และปมประสาทอื่น ๆ เป็นต้น การศึกษาตัวหอยกระทำภายใต้กล้องสเตริโอ และบันทึกผลโดยใช้ camera lucida และถ่ายภาพจากกล้องสเตริโอ วัดขนาดอวัยวะต่างๆ โดยใช้ map measurer และ ocular micrometer และคำนวณหาขนาดที่แท้จริงโดยใช้ stage micrometer

5.3 การศึกษากายวิภาคของระบบประสาทในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

5.3.1 การศึกษาในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope)

สลบหอยเป๋าฮื้อตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียด้วย $MgCl_2$ แล้วตัด cerebral ganglia, pleuropedal glanglia และ visceral ganglia จากตัวของหอย แล้วนำไปแช่ในน้ำยา Bouin เป็นเวลา 6 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 70% ethanol หลาย ๆ ครั้ง หลังจากนั้น dehydrate ด้วย 70%, 80%, 95%, 100% ethanol ตามลำดับ และ dioxane 2 ครั้ง โดยแช่ในสารแต่ละชนิดเป็นเวลาครั้งละ 20 นาที เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนดังกล่าวแล้ว นำเนื้อเยื่อไปฝังใน paraplast ตัดเนื้อเยื่อหนา 6 ไมครอน แล้วนำไปย้อมด้วยสี Harris' Hematoxylin และ eosin และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเพื่อตรวจหาชนิด ลักษณะ การกระจายตัว และการต่อเนื่องของเซลล์ประสาทและเส้นประสาทระหว่างปมต่าง ๆ

5.3.2 การศึกษาในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope)

สลบหอยด้วย $MgCl_2$ ตัดเนื้อเยื่อ cerebral ganglia และ pleuropedal ganglia แช่เนื้อเยื่อใน 2.5% glutaraldehyde ใน 0.1 M cacodylate buffer ที่ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย cacodylate buffer 3 ครั้ง ต่อจากนั้น fix ด้วย 1% osmium tetroxide ใน buffer เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง และ fix ใน 1% uranyl acetate ใน ethanol เป็นเวลา 0.5 ชั่วโมง แล้วจึงล้างในน้ำกลั่นและ dehydrate ใน 50%, 70%, 90% และ 100% ethanol ตามลำดับขั้นตอนละ 10 นาที ต่อจากนั้นนำก้อนเนื้อเยื่อไป embed ในพลาสติก Araldite และตัดชิ้นเนื้อเยื่อด้วย ultramicrotome แล้วศึกษาด้วย transmission electron microscope (TEM) เพื่อสังเกตดูโครงสร้างละเอียดของเซลล์ประสาท กิ่งประสาท รวมทั้งการต่อเนื่องของมันและโครงสร้างละเอียดของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ

5.4 การศึกษาชนิด ลักษณะ และหน้าที่ของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนและประเภทของสารฮอร์โมนในปมประสาทต่าง ๆ

5.4.1 การศึกษาจุลกายวิภาคและการกระจายของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน

นำ paraffin sections ที่ย้อมด้วยสี Harris's hematoxylin และ eosin จากข้อ 5.3.1 มาศึกษาจุลกายวิภาคของปมประสาทชนิดต่าง ๆ และการกระจายตัวของเซลล์ผลิตฮอร์โมนในปมประสาทแต่ละปมโดยละเอียด โดยการสังเกตด้วยจุลทรรศน์ธรรมดา แล้วถ่ายรูปและทำแผนที่การกระจายของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน

5.4.2 การศึกษาและแยกประเภทของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนโดยการย้อมด้วยสีพิเศษ

การแสดงเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนในปมประสาทของหอย กระทำได้โดยใช้วิธีการย้อมด้วยสี Chrome-hematoxylin-phloxine และ Paraldehyde-fuchsin

5.4.2.1 การย้อมสี Chrome-hematoxylin-phloxine

นำ section มาสกัดสารพาราฟินออกโดยแช่ใน xylene แล้วนำไปแช่ในสารละลาย 3% potassium permanganate และกรด sulfuric ล้าง sections ในน้ำประปา แล้วฟอกสีโดยแช่ใน 5% sodium bisulfite นำ section ที่ผ่านขบวนการดังกล่าวแล้วไปย้อมสีในสารละลายที่ส่วนผสม 1:1 ของ 1% aqueous hematoxylin และ 3% chrome alum ที่ทิ้งไว้อย่างน้อย 48 ชั่วโมง ตรวจดูการติดสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์จนเห็นว่า section ติดสีน้ำเงินเข้ม ซึ่งมักใช้เวลาย้อมประมาณ 25-30 นาที จากนั้นนำ section ไปแช่ใน 1% (0.125 N) HCl ประมาณ 30 นาที แล้วล้างในน้ำประปาจน section ปรากฏเป็นสีน้ำเงินใส หลังจากนั้นนำ section ไปย้อมในสารละลาย 0.5% phloxine B ในน้ำ โดยใช้เวลาประมาณ 15 นาที ล้างด้วยน้ำประปา แล้วแช่ในสารละลาย 5% phosphotungstic acid 1 นาที และล้างในน้ำประปาจนสีแดงเริ่มปรากฏขึ้น แล้วนำ section ไปล้างใน 95% และ 100% แอลกอฮอล์ตามลำดับ แช่ในสาร xylene แล้วปิด section ใต้แผ่นกระจกปิด

5.4.2.2 การย้อมสี Paraldehyde-fuchsin

นำ section ที่ล้างพาราฟินออกแล้วมาแช่ในสารละลาย Gomori (0.15 g $KMnO_4$ ในน้ำ 50 ml และ 0.1 ml conc. H_2SO_4) ประมาณ 1 นาที ฟอกสี permanganate ออกโดยล้างใน 2.5% sodium bisulfite ประมาณ 2-3 นาที แล้วล้างในน้ำกลั่น นำ section ไปแช่ในแอลกอฮอล์ 30%-70% แล้วจึงนำไปย้อมในสารละลาย paraldehyde fuchsin (0.5 g basic fuchsin + 1 ml paraldehyde ใน 70% แอลกอฮอล์ + 1.5 ml conc. HCl) นำ slide ไปล้างใน 90% และ 95% แอลกอฮอล์ประมาณ 3 นาที นำ section ไป rehydrated ใน 70% และ 30% แอลกอฮอล์ และย้อมสีในสารละลาย Halmi (10.2 g light green yellow + 1% orange G + 0.5 g chromotrope 2R + 0.5 g phosphotungstic acid + 1 ml glacial acetic acid ในน้ำกลั่น 100 ml) เป็นเวลา 5 นาที ล้าง section ใน 95% และ 100% แอลกอฮอล์ 2 ครั้ง แช่ใน xylene แล้วจึงปิดทับด้วยแผ่นกระจกปิด

จากการย้อมด้วยสีดังกล่าวแล้ว จะทำให้เซลล์ประสาทติดสีม่วงใน chrome-hematoxylin-phloxine และสีเขียวเหลืองใน paraldehyde-fuchsin ซึ่งแสดงเม็ดแกรนูลกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตปลาสซึม เมื่อแยกประเภทของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนโดยการย้อมสีพิเศษได้

แล้ว ก็ทำการนับจำนวนและทำแผนที่การกระจายของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ จากภาพถ่ายจุลทรรศน์

5.4.3 การตรวจหาเซลล์ในปมประสาทที่ผลิตฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์โดยวิธี immunohistochemistry

นอกจากการจำแนกเซลล์ผลิตฮอร์โมนในปมประสาทโดยการย้อมด้วยสีพิเศษตามข้อ 5.4.1 และ 5.4.2 ซึ่งจะได้ผลที่ไม่ค่อยจำเพาะแล้ว เราได้ตรวจหาเซลล์ที่ผลิตฮอร์โมนแต่ละชนิดโดยใช้วิธี immunohistochemistry ซึ่งมีความจำเพาะยิ่งขึ้น โดยการนำซีรั่มของหนูที่มีแอนติบอดีต่อ human GH, insulin, LH และ FSH และโมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ frog LH, FSH มาเป็น primary antibody ย้อม paraffin หรือ frozen section ของปมประสาทต่าง ๆ โดยวิธี immunohistochemistry แล้วตรวจสอบตำแหน่งการเกาะของแอนติบอดีกับสารฮอร์โมนในเซลล์ประเภทต่าง ๆ ของปมประสาท โดยการใช้แอนติบอดีระดับสอง (secondary antibody) ต่อ IgG ของหนูที่ติดสลากกับ HRP หลังจากทำปฏิกริยากับสาร substrate ซึ่งทำให้เกิดสีน้ำตาล แล้วก็นำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา นอกจากนั้นแล้วเรายังได้พยายามใช้วิธี immunocytochemistry ตรวจสอบเซลล์ที่ผลิตฮอร์โมนในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยการใช้ LR White embedded plastic sections ของปมประสาทย้อมด้วยแอนติบอดีระดับแรกต่อฮอร์โมนต่าง ๆ ตามที่กล่าวมาแล้ว ตามด้วยแอนติบอดีระดับสองที่ติดสลากด้วย HRP หรือ gold particles ตามวิธี immunoenzyme cytochemistry (Childs, 1983) และ immunogold cytochemistry (Joshi, 1993; Kiss and McDonald, 1993) จากการทดลองนี้ทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับการกระจายของฮอร์โมนที่คล้าย GH, FSH และ LH ในปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral

5.4.4 การวิเคราะห์สารฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ในปมประสาทโดยวิธี immunoblotting

ตัดปมประสาท cerebral และ plueropedal จากหอยตัวเต็มวัย รวบรวมปมประสาทประมาณ 10-20 ปมต่อหนึ่งตัวอย่าง แล้วนำไปบดให้ละเอียดโดยวิธี mechanical homogenization และ ultrasonication สกัดสารจากปมประสาทโดย physiological saline แล้วนำไปแยกหาแถบโปรตีนและไกลโคโปรตีนด้วยวิธี 12.5% SDS-PAGE ย้ายแถบโปรตีนและไกลโคโปรตีนลงไปบนแผ่น nitrocellulose โดยวิธี electroblotting แล้วย้อมแผ่น nitrocellulose ด้วยสีย้อมโปรตีน amido black หลังจากนั้นจะทำการวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณสัมพัทธ์ของแถบโปรตีนกับไกลโคโปรตีนต่างๆ ซึ่งอาจจะเป็นสารฮอร์โมนในต่อม โดยการใช้กรรมวิธี immunoblotting (Towbin *et al.*, 1979; Legocki and Verma, 1981) กล่าวคือ แยกสารโปรตีนและไกลโคโปรตีนจากปมประสาทดังกล่าวข้างต้นด้วย 12.5% SDS-PAGE แล้วย้ายแถบโมเลกุล

เหล่านี้ลงบนแผ่น nitrocellulose (NC) แช่แผ่น NC ใน non-immune serum ของหนูหรือกระต่าย แล้วแช่แผ่น NC ในสารละลายที่มีแอนติบอดีของหนูหรือกระต่ายต่อฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองของมนุษย์ ซึ่งได้แก่ growth hormone (GH), insulin, luteinizing hormone (LH) และ follicle stimulating hormone (FSH) นอกจากนี้ยังใช้แอนติบอดีของหนูต่อฮอร์โมนของต่อมใต้สมองในกบย้อมแผ่น NC ด้วย แช่แผ่น NC ที่มีแอนติบอดีต่อฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ เกาะอยู่ในสารละลายแอนติบอดีระดับสอง (เช่น goat anti-rabbit IgG หรือ rabbit anti-mouse IgG) ซึ่งติดสลากกับ HRP เพื่อย้อมหาแถบโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มี epitopes ร่วมกับฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ ดังกล่าว แล้วเปรียบเทียบแถบสารฮอร์โมนที่วิเคราะห์ได้กับแถบโมเลกุลโปรตีนและไกลโคโปรตีนที่ตรวจพบในขั้นแรก การที่คาดว่าจะสามารถใช้แอนติบอดีต่อฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองของของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและกบ เป็นตัววิเคราะห์หาแถบฮอร์โมนที่คล้ายคลึงกันในหอยเป๋าฮื้อได้นั้น เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าฮอร์โมนต่าง ๆ ในสัตว์เหล่านี้ ยังคงมีส่วนของโมเลกุลที่ยังอนุรักษ์ (conserved part) เนื่องมาจากมียีนที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมนซึ่งยังมีส่วนของรหัสที่คล้ายคลึงกัน (common ancestral genes) (Mathieu *et al.*, 1991; Morse, 1984; Paynter and Chen, 1991)

5.5 การศึกษากายวิภาคของระบบสืบพันธุ์และการผลิตเซลล์สืบพันธุ์ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาและจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

5.5.1 การศึกษาด้วยจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope)

สลบหอยเป๋าฮื้อตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียด้วย $MgCl_2$ แล้วตัด gonad ของหอยออกมาแช่ในน้ำยา Bouin เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่าง gonad โดยวิธีพาราฟิน แล้วย้อมสี section ด้วย Harris' Hematoxylin และ eosin (ดูข้อ 5.3.1) แล้วศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เพื่อสังเกตจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ และจำแนกชนิดตลอดจนความต่อเนื่องของเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต่าง ๆ ซึ่งทำให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับขั้นตอนของเซลล์สืบพันธุ์และขบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอย

5.5.2 การศึกษาด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Transmission Electron Microscope-TEM)

สลบหอยด้วย $MgCl_2$ ตัด gonad เป็นชิ้นเล็ก ๆ แล้วนำไปแช่ใน 2.5% glutaraldehyde ที่ 4°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่าง gonad เพื่อสังเกตด้วย TEM (ตามวิธีในข้อ 5.3.2) ศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งทำให้เราเข้าใจลักษณะของเซลล์เหล่านี้โดยละเอียด ตลอดจนการพัฒนาและปรับสภาพของเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต่าง ๆ ขบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ต่อเนื่องและสรีรวิทยาการสืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อได้ดียิ่งขึ้น

5.6 การศึกษาวงจรการสืบพันธุ์ในหอยตัวเต็มวัยในรอบ 1 ปี

นอกจากการศึกษาชนิดและลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์แล้ว เรายังได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยตัวเต็มวัยที่อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงฤดูกาลต่าง ๆ ตลอดปี โดยการคัดเลือกหอยตัวเต็มวัยทุก ๆ เดือนของช่วงปี แล้วนำมาเก็บตัวอย่าง gonads เพื่อเตรียม sections สำหรับศึกษาด้วยวิธีจุลทรรศน์ธรรมดา ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อมูลเกี่ยวกับช่วงของปีที่หอยอาจจะมีการผลิตเซลล์สืบพันธุ์สูงที่สุดที่เหมาะต่อการกระตุ้นให้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์โดยวิธีต่าง ๆ ต่อไป

5.7 การศึกษาการเจริญเติบโตและพัฒนาการของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์

5.7.1 เก็บตัวอย่างหอยเป๋าฮื้ออายุต่าง ๆ กันตั้งแต่ 1, 2, 3 ถึง 12 เดือน ที่ได้จากการผสมพันธุ์ในบ่อโดยวิธีธรรมชาติ แล้วเลี้ยงในระบบปิดตามที่กล่าวมาแล้ว

5.7.2 การศึกษาในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา (light microscope)

ลบหอยด้วย $MgCl_2$ แล้วตัด cerebral ganglia, pleuropedal ganglia, visceral ganglia และ gonads ของหอย นำมาแช่ในน้ำยา Bouin เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เตรียมตัวอย่างโดยวิธีพาราฟินและย้อมสี section ด้วย Harris' Hematoxylin และ eosin (ตามวิธีในข้อ 5.3.1) แล้วศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาเพื่อเปรียบเทียบการพัฒนาด้านโครงสร้าง ปริมาณและชนิดของเซลล์ของระบบประสาท และการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงอายุต่าง ๆ ของหอย โดยเฉพาะช่วงที่เข้าสู่วัยเจริญพันธุ์

6 ผลการทดลอง

6.1. มหกายวิภาคของระบบประสาทและปมประสาท (รูปที่ 2 และ 3)

ระบบประสาทของหอยเป๋าฮื้อตัวเต็มวัยประกอบด้วยแท่งประสาท (nerve cords หรือ commissures) และใยประสาทเกี่ยวพัน (nerve connectives) ที่โยงระหว่างปมประสาท (nerve ganglia) ต่าง ๆ ที่สำคัญอยู่ 3 วง คือ cerebral nerve cords หรือ commissures ซึ่งโยงระหว่าง cerebral ganglia ทั้งสองด้าน โดยมีแท่งบน (dorsal cerebral commissure) และแท่งล่าง ventral cerebral commissure ล้อมรอบท่ออาหารส่วนต้น (esophagus) จาก cerebral ganglia มีเส้นประสาทที่สำคัญส่งไปทางด้านหน้า 2 คู่คือ optic nerves ไปสู่ตา และ tentacle nerves ไปสู่หนวด (tentacles) ซึ่งมีอยู่ 2 คู่ที่อยู่ด้านในต่อตา ได้แก่ คู่สั้นอยู่ติดกับก้านตา และคู่ยาวอยู่ในสุด ตรงกลางของ cerebral commissure อันล่างพองออกเป็น buccal ganglion ซึ่งเป็นปมประสาทขนาดเล็กที่ควบคุมกล้ามเนื้อ buccal mass สำหรับการเคี้ยวอาหาร

จาก cerebral ganglion แต่ละข้างมีแท่งประสาทคู่ เรียกว่า cerebropedal และ cerebropleural cords หรือ connectives โยงไปยัง pleuropedal ganglion ซึ่งเป็นปมประสาทขนาดใหญ่ที่อยู่ด้านหลังต่อ cerebral ganglia จาก pleuropedal ganglion มีวงของแท่งประสาทแยกออกไป 2 วง คือ visceral (หรือ abdominal) nerve cord โยงไปยัง visceral (หรือ abdominal ganglion) วงประสาท visceral มีลักษณะคล้ายเลข 8 จากการไขว้ของแท่งประสาทเนื่องจากการบิดตัวของหอย (torsion) จากวงประสาทนี้มีเส้นประสาทขนาดเล็กแตกออกไปเลี้ยงอวัยวะภายในของร่างกาย เช่น อวัยวะของระบบย่อยอาหารและระบบสืบพันธุ์ นอกจากนี้แล้วยังมีแท่งประสาทคู่ขนาดใหญ่จาก pleuropedal ganglion ทอดไปบนกล้ามเนื้อเท้า (pedal muscle) ของหอยตามแนวกลางของลำตัวซึ่งเรียกว่า pedal nerve cords มีเส้นประสาทเล็ก ๆ เชื่อมระหว่างคู่ของแท่งประสาท pedal nerve cord ทั้งสองเป็นระยะ ๆ pedal nerve cord เป็นแหล่งกำเนิดของเส้นประสาทขนาดเล็กจำนวนมากที่แตกออกไปเลี้ยงกล้ามเนื้อ pedal muscle ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อขนาดใหญ่ที่มองเห็นจากด้านล่างของตัวหอย (รูปที่ 1) ซึ่งหอยใช้เป็นกล้ามเนื้อหลักในการเคลื่อนที่ไปมา

ปมประสาทที่มีขนาดใหญ่ และที่น่าจะมีความสำคัญมากในการควบคุมขบวนการทางสรีรวิทยาของหอยมีอยู่ 3 ปม คือ cerebral ganglia ทำหน้าที่คล้ายกับสมองของหอย ซึ่งเป็นศูนย์ประสาทบัญชาการที่รับทราบการกระตุ้นจากสิ่งเร้าภายนอกผ่านหน่วยรับสัมผัส (receptors) ต่าง ๆ เช่น จากตาโดยผ่าน optic nerve และจากหนวดโดยผ่าน tentacle nerve แล้วออกคำสั่งให้เกิดการตอบสนอง โดยส่งสัญญาณไปยัง pleuropedal ganglion และ pedal

nerve cord ซึ่งเป็นเสมือนหนึ่ง spinal cord ที่ควบคุม pedal muscle ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อหลักในการเคลื่อนไหวของหอย จาก pleuropedal ganglion ยังมีเส้นประสาทที่แตกออกไปควบคุมอวัยวะภายในอีกด้วย นอกจากนั้นแล้วแท่งประสาทและปมประสาทซึ่งเป็นหน่วยหลักอีกแหล่งหนึ่งที่ส่งเส้นประสาทไปควบคุมอวัยวะภายใน คือ visceral หรือ abdominal cords และ ganglion ซึ่งเปรียบได้กับระบบประสาทอัตโนมัติ (autonomic nervous system) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง

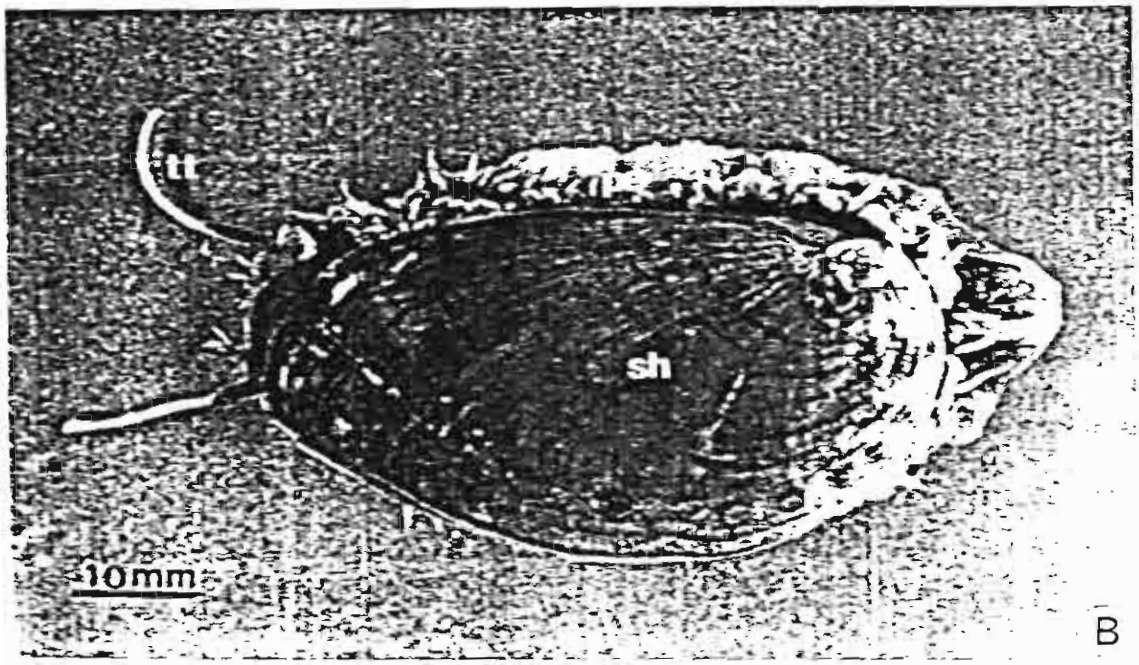
รูปที่ 1 A) กลุ่มของหอยเป๋าฮื้ออายุประมาณ 18 เดือน ซึ่งเลี้ยงในถังซิเมนต์โดยใช้ระบบปิด
B) หอยเป๋าฮื้อที่กำลังเคลื่อนไหว แสดงหนวด (tentacle-Tt) และเท้า (pedal muscle-Pe) คลุมโดยเปลือกแข็งที่มีรูหายใจเรียงเป็นแถว
C) หอยเป๋าฮื้อที่ถูกหงายขึ้นเพื่อแสดงแผ่นกล้ามเนื้อเท้า (pedal muscle-Pe)

รูปที่ 2 หอยเป๋าฮื้อที่ถูกผ่าแสดงตำแหน่งและลักษณะของปมประสาท cerebral ganglia (cg) และ cerebral commissure (cc) ซึ่งวางตัวอยู่รอบท่ออาหารส่วนต้น bc-buccal mass, sa-salivary gland

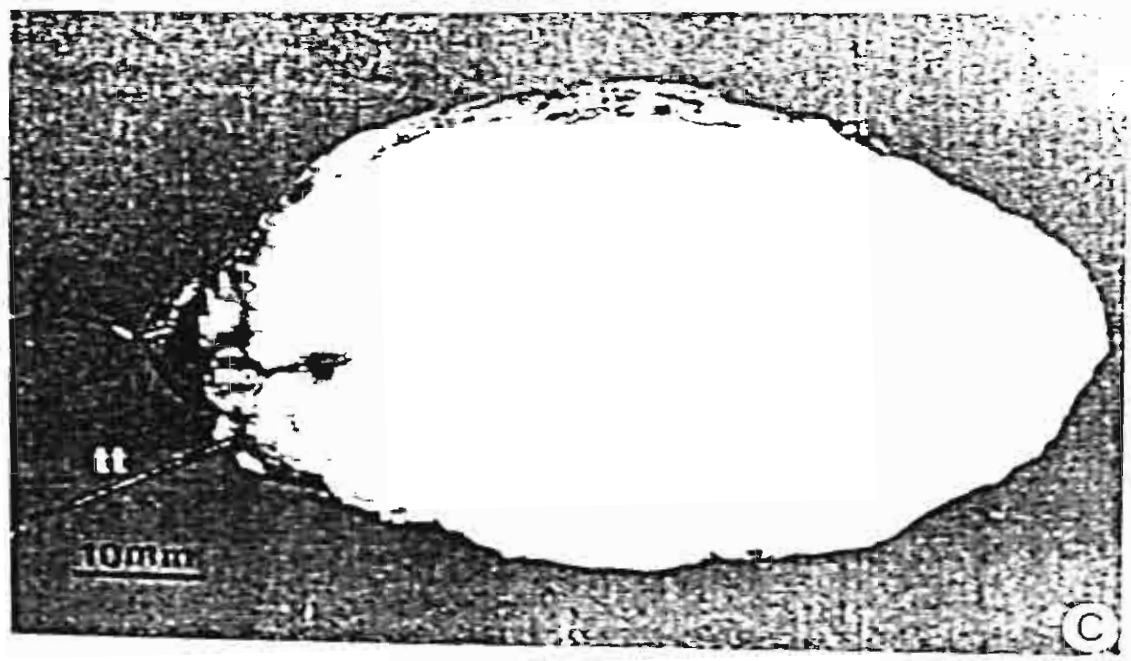
รูปที่ 3 ภาพวาดแสดงมหกายวิภาคของระบบประสาท ซึ่งประกอบด้วยปมประสาท (ganglia) และแท่งประสาท (nerve cords) ต่าง ๆ



A



B



C

Figure 2

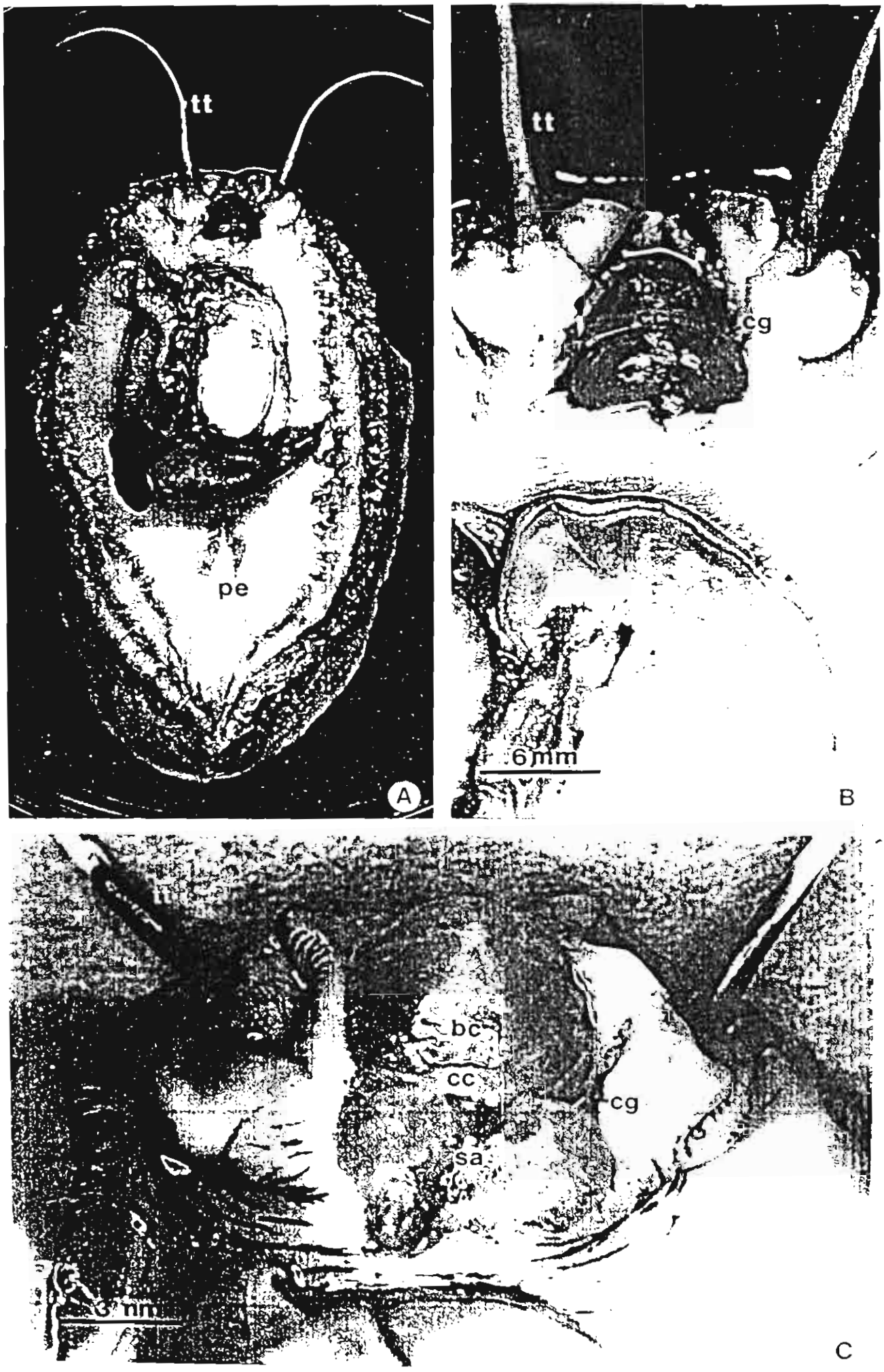
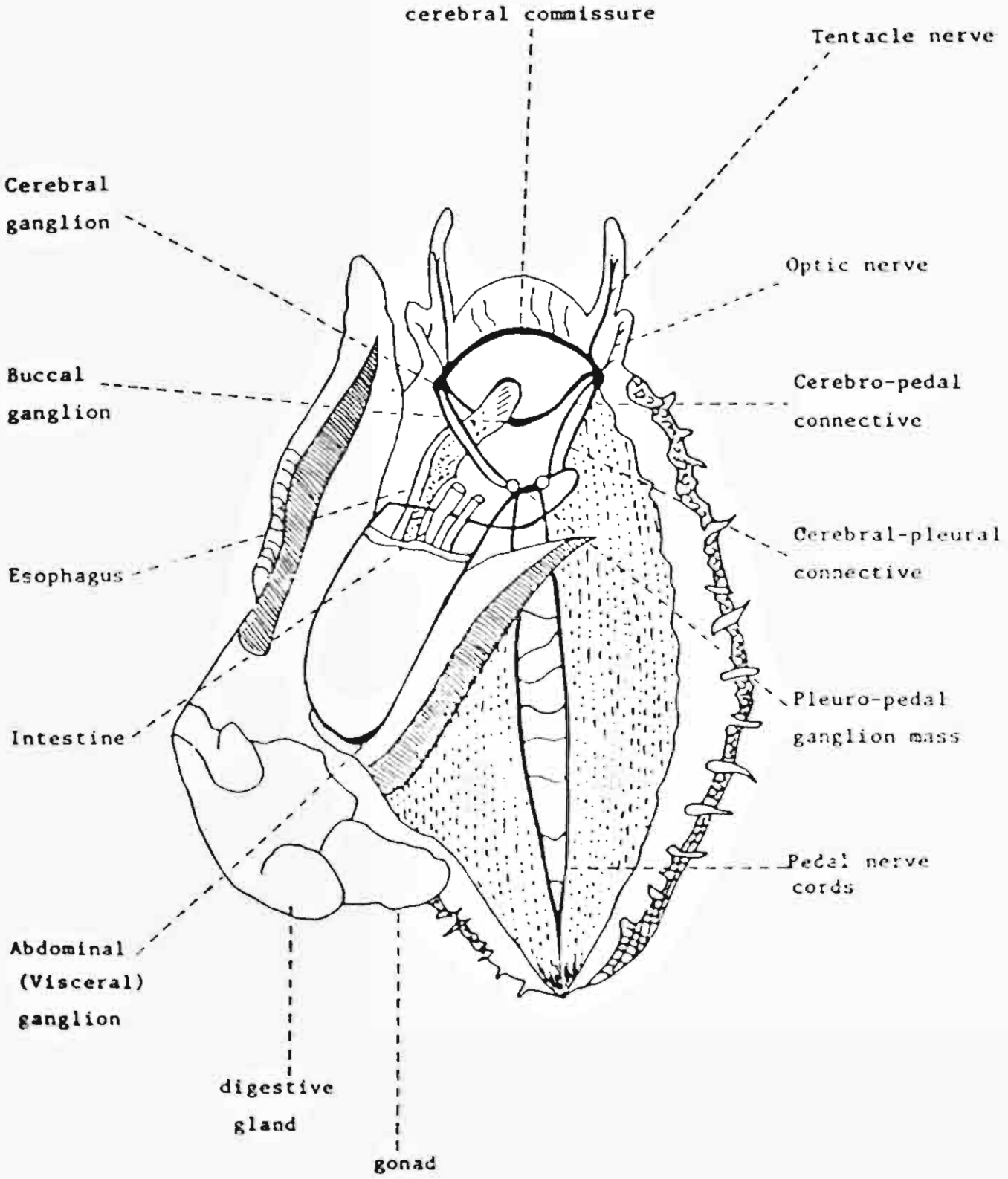


Figure 3


cerebral commissure
Tentacle nerve
Cerebral ganglion
Optic nerve
Buccal ganglion
Cerebro-pedal connective
Cerebral-pleural connective
Esophagus
Intestine
Pleuro-pedal ganglion mass
Pedal nerve cords
Abdominal (Visceral) ganglion
digestive gland
gonad

6.2. จุลกายวิภาคของปมประสาท

ปมประสาทที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมอวัยวะภายในและกระบวนการเจริญเติบโต กับการสืบพันธุ์ที่สามารถชี้ตำแหน่งได้ชัดเจน และได้ตัดออกมาศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาค แล้วในรายงานนี้ คือ cerebral ganglia, pleuropedal ganglia และ visceral ganglia

Cerebral ganglia (รูปที่ 4, 5, 6, 7, 8)

cerebral ganglia มีอยู่ข้างละ 1 ปม แต่ละปมมีลักษณะเป็นแท่งยาวแทรกอยู่ ระหว่างชั้นผิวและ dermis กับชั้นกล้ามเนื้อที่หุ้มรอบ jaw กับ radula (รูปที่ 4A-C) ส่วนบนและ ล่างของปมประสาททั้งคู่โยงต่อกันโดยแท่งประสาท dorsal และ ventral cerebral commissures cerebral ganglion ถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อเกี่ยวพันบาง ๆ (loose connective tissue) ซึ่งมีเส้น ใยคอลลาเจน (collagen) สานไปมา และแนบชิดกับถุงหุ้มปมประสาทมีหลอดโลหิตผนังบางหุ้ม อยู่โดยรอบ (รูปที่ 4C; 5A) ขอบนอก (cortex) ของปมประสาทประกอบด้วยเซลล์ประสาท (neuron-NR) และเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cells-NS) ปะปนกันอยู่ ชั้นของ เซลล์เหล่านี้ตั้งอยู่บนแผ่น basement membrane บาง ๆ ซึ่งประกอบด้วยใยเกี่ยวพันและสาร matrix ปะปนกัน โดยมีส่วนที่ยื่นแทรกเข้าไปในเนื้อของ cerebral ganglion เพื่อเสริมความแข็ง แกร่งทำให้ปมประสาทคงสภาพอยู่ได้ ชั้น cortex มีความหนากับจำนวนชั้นของเซลล์เปลี่ยนแปลง ไปตามตำแหน่งต่าง ๆ โดยทั่วไปแล้วชั้น cortex ด้านขอบนอก (lateral edge) มีความหนามาก กว่าทางขอบใน (medial edge) (รูปที่ 4C; 5A,B) ชั้น cortex มักจะหนาเป็นพิเศษในบริเวณขอบ บน (dorsal horn) ขอบล่าง (ventral horn) และส่วนของขอบ ณ บริเวณที่มีรากของเส้นประสาท แตกออกไปจากปมประสาท ส่วนในรากของเส้นประสาทเองและใน commissure เปลือก cortex และชั้นของเซลล์ประสาท NR และ NS จะลดความหนาลงทันที (รูปที่ 4C) เนื้อในหรือ medulla ของ cerebral ganglion ประกอบด้วยมัดของใยประสาท (nerve bundles หรือ tracts) ที่ทอดไป ตามความยาวของปมประสาทสอดแทรกด้วยใยประสาทที่วิ่งตามขวาง ภายในเนื้อ medulla มีเซลล์แทรกอยู่น้อยมาก ซึ่งส่วนมากเป็นเซลล์ขนาดเล็กที่มีนิวเคลียสเรียวและติดสีเข้ม (รูปที่ 5A,B; 6A,D)

Pleuropedal ganglia (รูปที่ 9, 10, 11, 12)

ปมประสาท pleuropedal เป็นปมประสาทขนาดใหญ่ มีตำแหน่งค่อนไปทางด้าน หน้าของตัวหอยและแทรกอยู่ระหว่างกล้ามเนื้อ pedal muscle ซึ่งอยู่ทางด้านล่าง (ventral side) ต่อปมประสาท และกลุ่มของอวัยวะภายในซึ่งอยู่ด้านบน (dorsal side) ต่อปมประสาท pleuropedal ganglion มีลักษณะคล้ายรูปตัวอักษร H โดยมีเขา (horns) อยู่ 4 ข้าง ตัวปมประสาทถูกล้อมรอบด้วยถุงหุ้มที่เป็นเยื่อเกี่ยวพันแบบหลวม และชิดกับถุงหุ้มปมประสาทมี

ช่องว่างคล้ายหลอดเลือดแนบอยู่จำนวนมาก (รูปที่ 9A) เส้นประสาทจากปมประสาท pleuropedal แตกออกไปเลี้ยงกล้ามเนื้อ pedal muscle และอวัยวะที่อยู่ด้านบนต่อปมประสาท

ตัวปมประสาทประกอบด้วยเปลือกนอกหรือชั้น cortex และเนื้อในหรือชั้น medulla ชั้น cortex ประกอบด้วยของเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน ซึ่งมีจำนวนชั้นและความหนาเปลี่ยนแปลงไปตามบริเวณต่าง ๆ โดยทั่วไปชั้น cortex ตามขอบด้านบน (dorsal edge) และด้านข้าง (lateral edge) ประกอบด้วยเซลล์ 4 ถึง 6 ชั้น ซึ่งหนากว่าขอบด้านล่าง (ventral edge) ที่ประกอบด้วยเซลล์เพียง 2-3 ชั้น (รูปที่ 9A,B) ภายใน medulla มีเส้นประสาทสานกันอยู่ทั่วไปทั้งในแนวนอนและแนวตั้ง โดยไม่ปรากฏเป็นมัดของเส้นประสาทขนาดใหญ่อย่างที่สังเกตได้ใน medulla ของ cerebral ganglia

ณ บริเวณที่มีเส้นประสาทแตกออกจากปมประสาท ชั้น cortex ของปมประสาทมักจะมีความหนาเป็นพิเศษ และเซลล์ประกอบด้วยทั้ง NR และ NS ส่วนในโคนของเส้นประสาทเอง ชั้น cortex ไม่เหลืออยู่เลย (รูปที่ 9C,D)

Visceral ganglia (รูปที่ 13, 14)

ปมประสาท visceral เป็นปมประสาทที่เป็นส่วนหลังสุดของ visceral nerve cord ซึ่งพองออกมา (รูปที่ 3) จากปมประสาทนี้ และจาก viceral nerve cord มีเส้นประสาทแตกแขนงออกไปเลี้ยงอวัยวะภายในของหอย ได้แก่ อวัยวะของระบบทางเดินอาหาร และระบบสืบพันธุ์ ปมประสาท visceral มีรูปร่างคล้าย dumbbell โดยมีส่วนด้านข้างพองออกทั้งสองข้างซึ่งเชื่อมต่อกันโดยท่อนกลาง (รูปที่ 13A) บริเวณ cortex ของด้าน lateral และ ventral ของกระเปาะทั้งสองด้าน และบางส่วนของด้าน ventral ของท่อนกลางมีความหนามากกว่าบริเวณอื่น โดยมีเซลล์อยู่ 2-3 ชั้น (รูปที่ 13B,C) ส่วนบริเวณที่เหลือมีชั้น cortex ที่บางมาก และบางแห่งอาจมีเพียงชั้นของ glia cells (NG_2) เรียงตัวอยู่เพียงชั้นเดียว ภายในบริเวณ medulla ของปมประสาทมีมัดเล็ก ๆ ของเส้นประสาทสานกันไปมาทั้งตามยาวและตามขวาง โดยทั่วไปปมประสาท visceral มีจำนวนเซลล์ในชั้น cortex น้อยกว่าปมประสาท cerebral และ pleuropedal มาก

6.3 การจำแนกชนิดของเซลล์ในปมประสาทโดยการย้อมด้วยสีพิเศษ

Cerebral ganglia (รูปที่ 5, 6, 7, 8)

ขอบในของชั้น cortex ประกอบด้วยเซลล์ประสาท 1 หรือ 2-3 ชั้น โดยมีเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนปะปนอยู่น้อยมาก ส่วนที่ขอบบน ขอบล่าง และขอบนอกของชั้น cortex มีเซลล์อยู่ 4-5 ชั้น (รูปที่ 5B) ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนปะปนกันอยู่ โดยบริเวณขอบบนและขอบล่างมักมีจำนวนชั้นของเซลล์และปริมาณของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนมากกว่าบริเวณอื่น ๆ

จากการย้อมด้วยสีพิเศษชนิดต่าง ๆ ได้แก่ Hematoxylin และ eosin (H & E), Gomori's stain หรือ chrome-hematoxylin-phloxine (CA), paraldehyde fuchsin (PF) ทำให้เราสามารถแยกชนิดของเซลล์ ตามลักษณะและการติดสีออกได้เป็น 10 ชนิด คือ เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนมี 3 ชนิด เซลล์ประสาทมี 4 ชนิด และเซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (neuroglia) มี 3 ชนิด

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่หนึ่ง (NS_1) (รูปที่ 5C,D; 6B-D; 8)

เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ประมาณ 10 x 20 μm ตัวเซลล์มีรูปร่างรีคล้ายไข่ และมักเรียงตัวอยู่ด้านนอกสุดของชั้น cortex ติดกับชั้น basement membrane นิวเคลียสกลมขนาดประมาณ 8 μm และอยู่ไปทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ นิวเคลียสมี euchromatin เกือบทั้งนิวเคลียส โดยมีขอบบาง ๆ ของ heterochromatin เกาะอยู่ตามด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส โครมาตินที่เหลือส่วนมากเป็น euchromatin ซึ่งมีลักษณะโปร่ง และเนื้อนิวคลีโอปลาสซึม (nucleoplasm) ใสและโปร่งแสง จึงทำให้เห็นนิวคลีโอลัส (nucleolus) ซึ่งมีลักษณะเด่นชัดเจน ไซโตปลาสซึมคงรูปอยู่อย่างสมบูรณ์และแสดงขอบเขตชัดเจน เนื้อไซโตปลาสซึมติดสีชมพูแดงด้วยสี H & E (รูปที่ 6B-D) หรือสีชมพูม่วงด้วยสี CA (รูปที่ 7D) หรือปรากฏเป็นแกรนนูลสีม่วงด้วยสี PF ซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปในเนื้อไซโตปลาสซึม

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่สอง (NS_2) (รูปที่ 5C,D; 6B-D; 8)

เป็นเซลล์ที่เล็กกว่า NS_1 และกระจายอยู่ในชั้นเดียวกันกับ NS_1 และชั้นถัดเข้าไปเซลล์ NS_2 มีขนาดของตัวเซลล์ประมาณ 10 x 12 μm และมีขนาดของนิวเคลียสประมาณ 7 μm ภายในนิวเคลียสมีก้อนหนาของ heterochromatin เกาะอยู่ตามขอบในของเยื่อหุ้มนิวเคลียสและบางก้อนกระจายอยู่ในส่วนกลางของนิวเคลียส ทำให้มีลักษณะดูคล้ายหน้าปัทม์นาฬิกา (clock-faced pattern) นิวคลีโอลัสไม่เห็นเด่นชัด ไซโตปลาสซึมมีรูปร่างเป็นวงรี เนื้อไซโตปลาสซึมมีลักษณะการติดสีเช่นเดียวกับ NS_1 โดยก้อนแกรนูลอาจจะมีจำนวนน้อยกว่าเมื่อเปรียบกับ NS_1

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 3 (NS_3) (รูปที่ 5C; 6B-D; 7D; 8)

เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุดในกลุ่ม NS เซลล์ โดยมีรูปไข่หรือสามเหลี่ยมขนาดประมาณ 8 x 10 μm นิวเคลียสมีแท่ง heterochromatin หนาสานต่อกันไปมา จึงปรากฏคล้ายเป็นร่างแหทั้งทั้งนิวเคลียส นิวคลีโอลัสไม่ปรากฏ ไซโตปลาสซึมมักมีก้อนแกรนูลขนาดใหญ่รูปร่างไม่แน่นอนอัดอยู่เต็มเซลล์

เซลล์ประสาทขนาดยักษ์ (Giant neuron-NR_1) (รูปที่ 5D; 6D; 7C,D; 8)

เป็นเซลล์ประสาทขนาดใหญ่ มีรูปร่างคล้ายกับปิระมิด (pyramidal shape) โดยมีขนาดของเซลล์ประมาณ 15 x 30 μm นิวเคลียสมีรูปร่างกลมขนาดประมาณ 10 μm

มี euchromatin เกือบทั้งหมด และมีนิวคลีโอลัสเด่น ไซโตปลาสซึมด้านฐานกว้างและตั้งอยู่บน basement membrane ด้านปลายเรียวและยื่นเข้าไปในเนื้อ medulla ไซโตปลาสซึมติดสีแดงชมพูอ่อน ๆ สม่ำเสมอจากสี H & E และสีชมพูม่วงเรื่อ ๆ จากสี CA และไม่ติดสี PF เลย จึงไม่แสดงแกรนูลอย่างที่สังเกตได้ในเซลล์ NS_1 และ NS_2

เซลล์ประสาทชนิดที่สอง (NR_2) (รูปที่ 5C,D; 6A-C; 8)

เป็นเซลล์ประสาทที่มีจำนวนมากที่สุด และเป็นเซลล์หลักของ cortex ซึ่งกระจายอยู่ในชั้นกลางของ cortex ตัวเซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างกลม โดยนิวเคลียสมีขนาดประมาณ 4-6 μm เนื้อไซโตปลาสซึมที่ล้อมรอบนิวเคลียสมีขนาดเล็ก และไม่แสดงขอบเขตชัดเจน นิวเคลียสประกอบด้วยก้อน heterochromatin กระจายอยู่ทั่วไปอย่างสม่ำเสมอ

เซลล์ประสาทชนิดที่สาม (NR_3) (รูปที่ 5C,D; 6A-C; 8)

เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กกว่า NR_2 เล็กน้อย และมักกระจายอยู่ที่ชั้นในสุดของ cortex นิวเคลียสมีขนาดประมาณ 3-4 μm และมีรูปร่างรี ภายในมีก้อน heterochromatin ขนาดใหญ่และเข้มขึ้น อยู่ติดกันจนทำให้นิวเคลียสดูทึบกว่า NR_2

เซลล์ประสาทชนิดที่ 4 (NR_4) เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลมหรือรี ขนาดใกล้เคียงกับ NR_2 แต่ภายในนิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin ซึ่งค่อนข้างใส แต่ขอบของนิวเคลียสมีแถบ herterochromatin ค่อนข้างหนา นิวเคลียสจึงมีลักษณะคล้ายวงแหวน (รูปที่ 6B) เซลล์ชนิดนี้มีจำนวนน้อยมากใน cerebral ganglia

เซลล์ประสาทพี่เลี้ยงชนิดที่ 1 (neuroglia 1-NG_1) (รูปที่ 6B; 7D; 8)

เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสรูปกระสวย (spindle-shaped) ขนาดเล็กประมาณ 3 x 6 μm ขอบเรียบหรือหยักเล็กน้อย มีแถบ heterochromatin บาง ๆ เกาะอยู่ตามขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส ภายในนิวเคลียสโปร่งใส เซลล์ NG_1 นี้อาจเป็น neuroglia ชนิดหนึ่งที่แทรกอยู่ในชั้น cortex

เซลล์ประสาทพี่เลี้ยงชนิดที่ 2 (neuroglia 2-NG_2) (รูปที่ 5C; 6A; 8)

เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างและขนาดของนิวเคลียสคล้ายกับเซลล์ NG_1 แต่โครมาตินทึบแสงกว่า และเป็นเซลล์ที่เรียงตัวติดกับขอบในของ basement membrane โดยมักเรียงตัวเป็นแถวขนานกับเซลล์บุผิวหลอดเลือดฝอย (endothelial cells) และ fibroblast ที่อยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่รองรับ basement membrane

เซลล์ประสาทพี่เลี้ยงชนิดที่สาม (neuroglia 3-NG_3) (รูปที่ 5B; 6A; 7B-D; 8)

เซลล์ชนิดนี้แทรกอยู่ระหว่าง nerve bundles และกระจายอยู่ทั่วไปในชั้น medulla ของปมประสาท นิวเคลียสมีรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle) ขนาดเล็กที่สุดประมาณ 2-3 μm

และมี heterchromatin อัดอยู่แน่น จึงทำให้นิวเคลียสปรากฏทึบแสง เซลล์ชนิดนี้อาจจะเป็นกลุ่มเซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (neuroglia) อีกกลุ่มหนึ่งที่แทรกอยู่ทั่วไปกับใยประสาท และไซโตปลาสซึมของมันมักแสดงกิ่งแทรกอยู่กับใยประสาทในชั้น medulla เซลล์ชนิดนี้เป็นเพียงชนิดเดียวที่พบทั่ว ๆ ไปในเส้นประสาท

Pleuropedal ganglia (รูปที่ 9, 10, 11, 12)

จากการศึกษาในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาด้วยสี H & E, Gomori (CA), และ PF สามารถจัดเซลล์ใน pleuropedal ganglion ออกได้เป็น 3 กลุ่มเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral คือ เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell-NS) เซลล์ประสาท (neuron-NR) และเซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (neuroglia-NG)

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน มี 3 ชนิด ตามลักษณะของนิวเคลียสและขนาดของเซลล์ คือ

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 1 (NS_1) (รูปที่ 9B-D; 10A-D; 11A)

เป็นเซลล์ NS ขนาดใหญ่ที่สุด โดยมีขนาดของเซลล์ประมาณ 10 x 20 µm และขนาดของนิวเคลียสประมาณ 8 µm นิวเคลียสอยู่ค่อนไปด้านหนึ่งของเซลล์และประกอบด้วย euchromatin ส่วนมาก ยกเว้นแถบ heterochromatin บาง ๆ ติดอยู่กับด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส ตรงกลางนิวเคลียสอาจมีท่อนโครมาตินที่ไม่ค่อยทึบแสงนักกระจายอยู่ นิวเคลียสจึงมีลักษณะโปร่งแสงและแสดงนิวคลีโอลัสที่เล็กแต่เด่นชัด ไซโตปลาสซึมมีรูปร่างกลมหรือรูปไข่แสดงขอบเขตชัดเจนและติดสีชมพูแดงโดยสี H & E ชมพูม่วงโดยสี CA (รูปที่ 10A-D; 11A) และมีแกรนูลสีม่วงโดยสี PF (รูปที่ 12B,C) เซลล์ NS_1 มักจะอยู่ติดกับด้านถุงหุ้มปมประสาท pleuropedal โดยวางตัวอยู่บนชั้น basement membrane

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 2 (NS_2) (รูปที่ 10A-D; 11A)

เป็นเซลล์ NS ขนาดรองลงมาจาก NS_1 ตัวเซลล์และนิวเคลียสมีรูปร่างกลม โดยตัวเซลล์มีขนาด 10 x 12 µm และนิวเคลียสมีขนาด 7 µm นิวเคลียสมีก้อน heterochromatin ขนาดเล็กและทึบแสง เกาะอยู่ตามขอบในของเยื่อหุ้มนิวเคลียสคล้ายหน้าปัทม์นาฬิกา (clock-faced pattern) และมีบางก้อนกระจายอยู่ภายในนิวเคลียส นิวคลีโอปลาสซึมปรากฏทึบแสงมากขึ้น ไซโตปลาสซึมติดสีเช่นเดียวกับ NS_1 แต่มีขนาดเล็กลง เซลล์ NS_2 มักจะอยู่ในชั้นถัดเข้าไปสู่ medulla จากเซลล์ NS_1

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 3 (NS_3) (รูปที่ 10A-C)

เป็น NS ขนาดเล็กที่สุด โดยมีขนาดของเซลล์ประมาณ 8 x 10 µm และขนาดของนิวเคลียสประมาณ 6 µm นิวเคลียสมักจะอยู่กระเดียดไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์

ไซโตปลาสซึมติดสีคล้าย NS_1 และ NS_2 แต่ขอบเขตไม่ชัดเจน โครมาตินในนิวเคลียสปรากฏเป็นแถบ heterochromatin ที่หนาและยาวสานต่อกันไปมา โดยมีส่วนที่ปรากฏเป็นแถบหนาเกาะอยู่ตามขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส และส่วนที่เป็นแถบทึบไขว้กันไปมาที่ปรากฏในส่วนกลางของนิวเคลียส

เซลล์ NS_1, NS_2 และ NS_3 มีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์ NS ทั้งสามประเภทที่พบในปมประสาท cerebral แต่ในปมประสาท pleuropedal เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน NS_2 และ NS_3 มักมีจำนวนมากกว่าเซลล์ NS_1

เซลล์ประสาท (neuron-NR) แยกออกเป็น 4 ชนิดเช่นเดียวกับในปมประสาท cerebral กล่าวคือ

เซลล์ประสาทขนาดยักษ์ (NR_1) (รูปที่ 10C,D; 11A,B) เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่มาก โดยทั้งตัวเซลล์และนิวเคลียสอาจปรากฏเป็นรูปวงรี หรือตัวเซลล์เป็นรูปปิรามิดซึ่งมีกิ่งประสาทออกจากตัวเซลล์แทรกเข้าไปในชั้น medulla ขนาดของตัวเซลล์ประมาณ 25 x 40 μm และขนาดของนิวเคลียสประมาณ 13 μm ภายในนิวเคลียสมีแถบ heterochromatin บาง ๆ และก้อนโครมาตินขนาดเล็กเกาะติดอยู่ตามขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส โครมาตินภายในส่วนที่เหลือของนิวเคลียสเป็น euchromatin เนื้อนิวคลีโอปลาสซึมมีลักษณะโปร่งแสง จึงทำให้นิวเคลียสโดยรวมค่อนข้างใส นิวคลีโอลัสปรากฏเด่นชัดและติดสีแดง ซึ่งชี้บ่งว่าน่าจะมี nucleolar activities เกิดขึ้นในอัตราสูง เซลล์ NR_1 มีลักษณะเช่นเดียวกับ NR_1 ในปมประสาท cerebral แต่มีจำนวนมากกว่าและขนาดใหญ่กว่า

เซลล์ประสาทชนิดที่สอง (NR_2) (รูปที่ 10B; 11A,C,D)

เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลมขนาดประมาณ 4-6 μm ไซโตปลาสซึมมีน้อยและไม่แสดงขอบเขตที่เด่นชัดเหมือนเซลล์ NR_1 ภายในนิวเคลียสมี heterochromatin ปรากฏเป็นแถบหนาอยู่ติดกับขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส และก้อนโครมาตินหนากระจายในส่วนกลางของนิวเคลียส เนื้อนิวคลีโอปลาสซึมค่อนข้างโปร่งแสง เซลล์ NR_2 เป็นเซลล์ประสาทที่มีจำนวนมากที่สุดในชั้น cortex ของ pleuropedal ganglion เซลล์ชนิดนี้มีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์ประสาท NR_2 ในปมประสาท cerebral

เซลล์ประสาทชนิดที่สาม (NR_3) (รูปที่ 10A,C,D; 11A,C,D)

เป็นเซลล์ประสาทที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ NR_2 แต่นิวเคลียสมีรูปไข่และมีขนาดเล็กลงเหลือประมาณ 3-5 μm โครมาตินขดพันเป็นก้อน heterochromatin หนา ปริมาณมากขึ้นเมื่อเทียบกับ NR_2 และเนื้อนิวคลีโอปลาสซึมทึบแสงมากกว่า NR_2 ภายในบางเซลล์โครมาตินขด

พันกันแน่นและปรากฏทึบแสงเกือบเต็มที่ เซลล์ชนิดนี้มีจำนวนรองจาก NR_2 และมีลักษณะเช่นเดียวกับ NR_3 ในปมประสาท cerebral แต่มีจำนวนมากกว่า

เซลล์ประสาทชนิดที่สี่ (NR_4) (รูปที่ 10C)

เป็นเซลล์ที่มีจำนวนน้อยที่สุด โดยตัวเซลล์ไม่ปรากฏขอบเขตชัดเจน นิวเคลียสมีลักษณะกลมหรือรีขนาดประมาณ 4-6 μm ภายในมี heterochromatin เป็นแถบหนาเฉพาะตามขอบในของเยื่อหุ้มนิวเคลียส แต่เนื้อนิวคลีโอปลาสซึมและโครมาตินในส่วนกลางของนิวเคลียสโปร่งใส จึงทำให้เห็นนิวคลีโอลัสเด่นชัด เซลล์ NR_4 มีจำนวนน้อยมากในปมประสาท cerebral เมื่อเทียบกับปมประสาท pleuropedal

เซลล์กลุ่ม neuroglia-NG แยกออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

เซลล์ neuroglia ชนิดที่หนึ่ง (NG_1) (รูปที่ 10B; 11A,C)

เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสรูปกระสวย โดยมีขนาดประมาณ 3 x 6 μm มีขอบนิวเคลียสเรียบหรือหยักไปมาเล็กน้อย โครมาตินปรากฏเป็นแถบบาง ๆ เกาะติดอยู่ตามขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส โครมาตินในส่วนกลางของนิวเคลียสและเนื้อนิวคลีโอปลาสซึมโปร่งแสง ส่วนเนื้อไซโตปลาสซึมและขอบของมันไม่ปรากฏชัดเจน เซลล์ชนิดนี้แทรกอยู่กับ NS และ NR ในระดับต่าง ๆ ของ cortex และเซลล์กลุ่มนี้มีลักษณะเช่นเดียวกับ NG_1 ในปมประสาท cerebral

เซลล์ neuroglia ชนิดที่สอง (NG_2) (รูปที่ 10B-D)

เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสรูปกระสวยคล้าย NG_1 ซึ่งแบน ยาว เรียว แต่มีโครมาตินทึบแสงกว่าเซลล์ NG_1 เซลล์กลุ่มนี้มักเกาะเป็นแนวอยู่ตามขอบในของถุงหุ้มปมประสาท pleuropedal โดยปรากฏเป็นชั้นชัดเจนแยกจากเซลล์บุผิวของหลอดเลือด (endothelial cells) และเซลล์เยื่อเกี่ยวพัน (fibroblast) ซึ่งมักแทรกตัวอยู่ในเยื่อเกี่ยวพันของถุงหุ้ม เซลล์ชนิดนี้อาจจะเป็น neuroglia ที่ทำหน้าที่กั้นระหว่างส่วนของเนื้อเยื่อในระบบประสาทกับส่วนของเลือด (blood-brain barrier) ในหลอดเลือดฝอยที่หุ้มอยู่รอบ ๆ ปมประสาท

เซลล์ neuroglia ชนิดที่สาม (NG_3) (รูปที่ 9B-D)

เป็นเซลล์ขนาดเล็กที่สุด นิวเคลียสรูปรีหรือรูปกระสวยขนาดประมาณ 2-3 μm ภายในมีโครมาตินขดพันกันแน่นและทึบแสงตลอด เซลล์ NG_3 มีมากที่สุดในกลุ่ม neuroglia และมีกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในชั้น medulla หรือ neuropil ของปมประสาท pleuropedal โดยแทรกอยู่ระหว่างใยประสาทที่สานกันไปมา เซลล์กลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่ปรากฏในเส้นประสาทที่แตกออกมาจากปมประสาท และมีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์ NG_3 ใน neuropil ของปมประสาท cerebral

Visceral ganglia (รูปที่ 13, 14, 15, 16, 17)

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cells-NS) เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนในปมประสาท visceral ที่สังเกตได้จากการย้อมด้วยสี Hematoxylin & eosin (H & E), Gomori (CA) และ Paraldehyde-fuschin (PF) มีอยู่ 3 ชนิด เช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral และ pleuropedal กล่าวคือ

NS_1 เป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยเซลล์มีขนาดประมาณ 15-17 µm นิวเคลียสมีขนาดประมาณ 5-7 µm และมีรูปร่างกลมเป็นแบบ vesicular โดยมีก้อน heterochromatin ขนาดเล็กเกาะตามขอบในของถุงหุ้มนิวเคลียส และมีท่อนหรือแถบบาง ๆ ของ heterochromatin กระจายอยู่ประปรายในนิวเคลียส ซึ่งมีนิวคลีโอปลาสซึมค่อนข้างใส นิวคลีโอลัสเด่นชัด (รูปที่ 14A) ไซโตปลาสซึมติดสีชมพูอ่อนโดยสี H & E (รูปที่ 14A) ติดสีชมพูเข้มปนม่วงโดยสี CA (รูปที่ 15C; 16A,C) และแสดงแกรนูลละเอียดติดสีม่วงโดยสี PF (รูปที่ 17C,D)

NS_2 เป็นเซลล์ที่มีขนาดประมาณ 8-13 µm นิวเคลียสมีขนาดประมาณ 5-6 µm รูปร่างกลม และมีการกระจายของก้อน heterochromatin เป็นแบบหน้าปัทม์นาฬิกา (clock-faced pattern) เนื่องจากมีก้อน heterochromatin ค่อนข้างกลมที่มีขนาดใหญ่กระจายอยู่ตามขอบนิวเคลียส และบางส่วนกระจายอยู่ภายในนิวเคลียส (รูปที่ 14A,B) ไซโตปลาสซึมแสดงลักษณะการติดสีเช่นเดียวกับ NS_1 โดยสีทั้งสามชนิด

NS_3 เป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่มีขนาดเล็กที่สุด โดยตัวเซลล์มีขนาดประมาณ 6-10 µm นิวเคลียสมีขนาดประมาณ 4-6 µm และมีรูปร่างรี heterochromatin ปรากฏเป็นขอบหนาตามด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส และมีลักษณะเป็นท่อนหรือเส้นหนาต่อเนื่องกันและสานกันไปมาในส่วนกลางของนิวเคลียส (รูปที่ 14B; 16A-C) ไซโตปลาสซึมมีลักษณะการติดสีเช่นเดียวกับ NS_1 และ NS_2 แต่ไซโตปลาสซึมมีปริมาณน้อยกว่า

เซลล์ประสาท (neuron-NR) เซลล์ประสาทมี 4 ชนิด ซึ่งมีขนาดและลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral และ pleuropedal กล่าวคือ

NR_1 เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่สุดในปมประสาท โดยมีขนาดของเซลล์ประมาณ 25-30 µm มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ประมาณ 10-12 µm รูปร่างกลม และมีนิวคลีโอปลาสซึมใส เนื่องจากมีโครมาตินเป็นแบบ euchromatin ไซโตปลาสซึมติดสีชมพูจางและไม่มีแกรนูล (รูปที่ 14D; 16A,D) เซลล์เหล่านี้มีจำนวนน้อยมากเมื่อเทียบกับที่พบในปมประสาท pleuropedal และ pedal

NR_2 และ NR_3 เป็นเซลล์ประสาทขนาดเล็กประมาณ 4-6 μm นิวเคลียสเป็นรูปไข่หรือค่อนข้างรี heterochromatin ปรากฏเป็นแถบหนาอยู่ตามขอบนิวเคลียสและสานกันอยู่ในส่วนกลางของนิวเคลียส โดยมีปริมาณ hetrochromatin เพิ่มขึ้นตามลำดับจาก NR_2 ถึง NR_3

NR_4 เป็นเซลล์ประสาทที่มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับ NR_2 และ NR_3 แต่มีแถบหนาของ heterochromatin เกาะอยู่ตามด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส โดยส่วนกลางของนิวเคลียสมีลักษณะใส และมีก้อน heterochromatin อยู่น้อยมาก (รูปที่ 14C) ส่วนไซโตปลาสซึมของ NR_2, NR_3 และ NR_4 มีปริมาณน้อยมากจนไม่ปรากฏชัดเจนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

เซลล์ประสาทพี่เลี้ยง neuroglia-NG

เซลล์ NG มีอยู่ 3 ชนิดเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral และ pleuropedal กล่าวคือ NG_1 เป็น neuroglia ที่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนในชั้น cortex NG_2 วางตัวเป็นแนวประกบกับแผ่น basement membrane และถุงหุ้ม (capsule) ของปมประสาท ส่วน NG_3 เป็น neuroglia ที่แทรกอยู่ระหว่างเส้นประสาทในชั้น medulla ของปมประสาท (รูปที่ 14B-D; 16A,C) โดยทั่วไปแล้วทั้งเซลล์ NR และ NG มีปริมาณและความหนาแน่นน้อยกว่าในปมประสาท cerebral และ pleuropedal มาก

จุลกายวิภาคและชนิดของเซลล์ในปมประสาท Pedal cord

pedal cord ganglia เป็นปมประสาทที่ปรากฏเป็นคู่ ๆ อยู่เป็นระยะ ๆ ตามความยาวของ pedal cord (รูปที่ 3) มักมีเส้นประสาทขนาดใหญ่และยาว แตกแขนงออกจากปมประสาทและจาก pedal cord ไปเลี้ยงกล้ามเนื้อ pedal muscle ซึ่งอยู่ทางด้านล่างของปมประสาท ด้าน ventral ของปมประสาท pedal มีบริเวณ cortex หนา ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ประมาณ 4-5 ชั้น (รูปที่ 18A-C; 19B,C) เซลล์ NS, NR และ NG มีการจำแนกประเภทและลักษณะของเซลล์เช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral และ pleuropedal (รูปที่ 21) โดยทั่วไปแล้วปมประสาท pedal cord มีเซลล์ NS_3 มากกว่าเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ (รูปที่ 20A-C) และเซลล์ NR_1 มีจำนวนและการกระจายที่หนาแน่นกว่าในปมประสาท visceral และ cerebral โดยเซลล์เหล่านี้มีขนาดใหญ่และมีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท pleuropedal (รูปที่ 18C; 20A,D) ส่วนเซลล์ NR_{2-4} และ NG_{1-3} มีลักษณะความหนาแน่นและการกระจายเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral และ pleuropedal

การเปรียบเทียบเซลล์ประสาทในปมประสาททั้งสามปม

โดยสรุปแล้ว เซลล์ประสาทและเซลล์ neuroglia ในปมประสาท cerebral, pleuropedal, visceral และ pedal cord ganglia มีชนิดและลักษณะคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ มีเซลล์ประสาท 3 ชนิดหลัก (NR_1, NR_2, NR_3) และมีเซลล์ neuroglia 3 ชนิดเช่นกัน (NG_1, NG_2,

NG_3) เซลล์ NG_1 กับ NG_2 อาจเป็นกลุ่มเดียวกันที่ทำหน้าที่คล้ายกับ astroglia ในระบบประสาทของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ซึ่งเป็นทั้งแนวของ blood-brain barrier และเป็นเซลล์พี่เลี้ยงของเซลล์ประสาททั่วไปในชั้น cortex ด้วย ส่วน NG_3 อาจทำหน้าที่คล้ายกับ oligodendroglia ซึ่งสร้างเยื่อไมอีลิน (myelin) ทั้งในระบบประสาทกลางและในเส้นประสาทรอบนอก ส่วนเซลล์ประสาท NR_1 ซึ่งเป็น multipolar cell ขนาดใหญ่ อาจจะเป็น motor neuron ของระบบประสาท และเป็นที่น่าสังเกตว่ามันมีจำนวนมากเป็นพิเศษและขนาดใหญ่กว่าในปมประสาท pleuropedal ในขณะที่มีจำนวนน้อยและขนาดเล็กกว่าในปมประสาท cerebral และปมประสาท visceral ทั้งนี้อาจจะเนื่องจากปมประสาท pleuropedal ทำหน้าที่ควบคุมกล้ามเนื้อเท้า (pedal muscle) ซึ่งเป็นกล้ามเนื้ออันใหญ่สุดของร่างกาย ซึ่งต้องมี motor neuron ขนาดใหญ่จำนวนมาก ส่วน NR_2, NR_3 อาจจะเป็นกลุ่มของเซลล์ประสาทรับความรู้สึก (sensory neurons) และ/หรือเซลล์ประสาทประสานงาน (association neurons) ของปมประสาทดังกล่าว

รูปที่ 4 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาแสดงตำแหน่งและลักษณะของปมประสาท cerebral โครงสร้างที่แสดงในภาพ ได้แก่ cg-cerebral ganglia, ra-radula, ja-jaw, mu-jaw muscle, ep-epithelium, ey-eyes, te-tentacle, ca-capillary

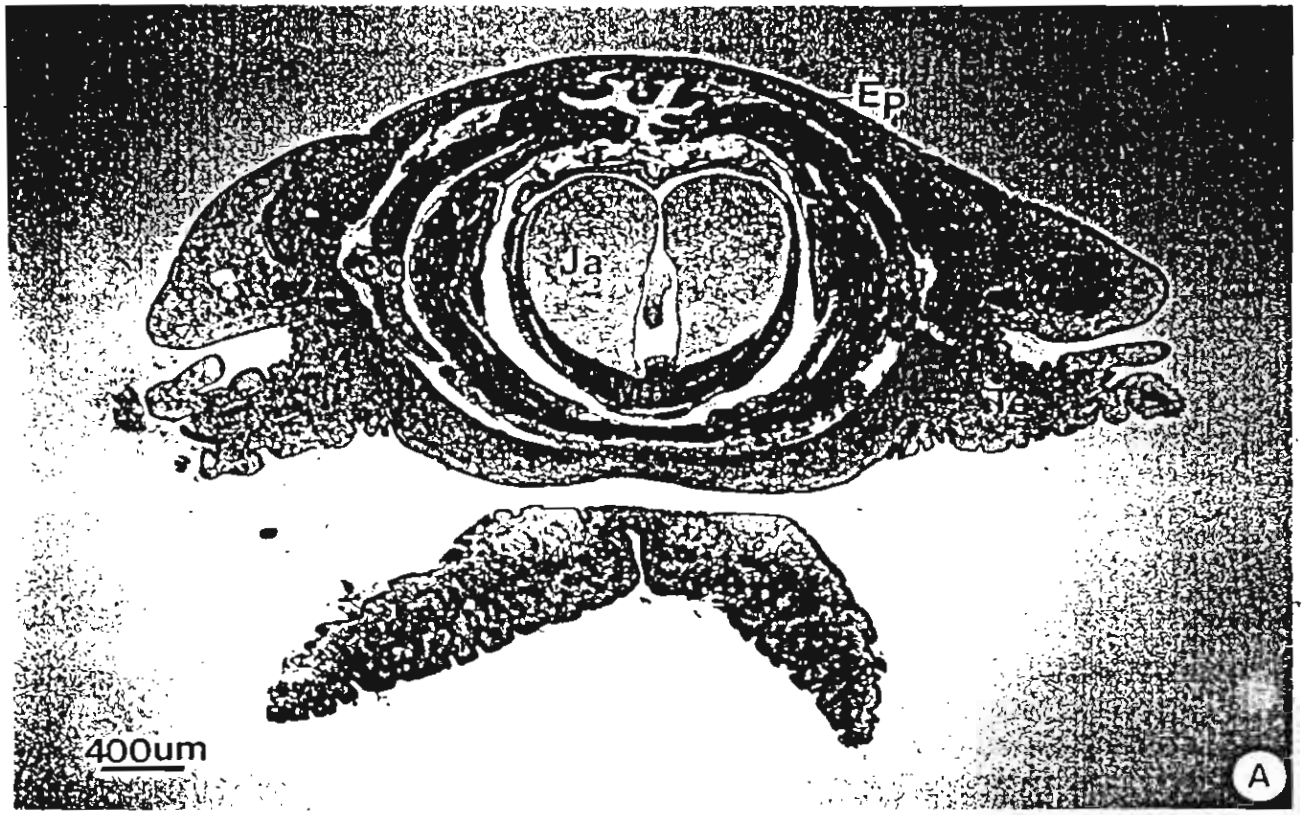
รูปที่ 5 A&B) ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำและปานกลางของส่วนตัดตามยาวของปมประสาท cerebral ที่ย้อมด้วยสี H & E แสดงขอบนอก (La) ขอบใน (Me) และขอบบน (Do) ขอบนอกและขอบบนมีชั้น cortex (Co) หนากว่าขอบใน
C&D) ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงชนิดของเซลล์ต่าง ๆ ในชั้น cortex ของขอบนอก

รูปที่ 6 ภาพถ่ายกำลังขยายปานกลางของ section ของปมประสาท cerebral ที่ย้อมด้วยสี H & E (A) และกำลังขยายสูง (B,C,D) แสดงเซลล์ประเภทต่าง ๆ ในชั้น cortex ได้แก่ ns_1-neurosecretory cell type 1, ns_2-neurosecretory cell type 2, nr_1-neuron type 1 (giant neuron), nr_2-neuron type 2, nr_3-neuron type 3, ng_1-neuroglia type 1, ng_2-neuroglia type 2, ng_3-neuroglia type 3, np-neuropil, nt-nerve tract

รูปที่ 7 ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C,D) ของปมประสาท cerebral ที่ย้อมด้วย Gomori stain แสดงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในชั้น cortex (Co) ของปมประสาท และชั้น medulla หรือ neuropil (Np)

รูปที่ 8 ภาพวาดของชั้น cortex และ medulla ของปมประสาท cerebral แสดงเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cells-ns) ซึ่งมี 3 ชนิด คือ ns_1 และ ns_2 เซลล์ประสาท (neuron-nr) ซึ่งมีอยู่ 4 ชนิด คือ nr_1, nr_2, nr_3 และ nr_4 กับเซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (neuroglia-ng) ซึ่งมี 3 ชนิด ng_1, ng_2, ng_3

Figure 4



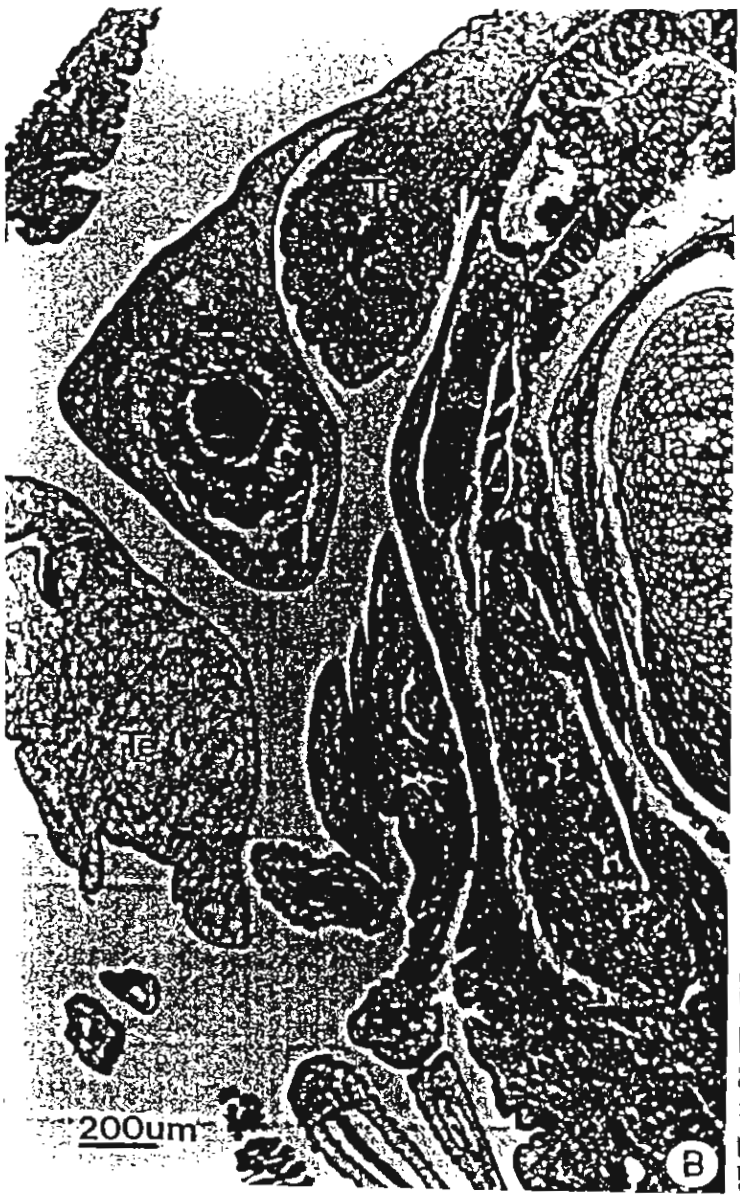
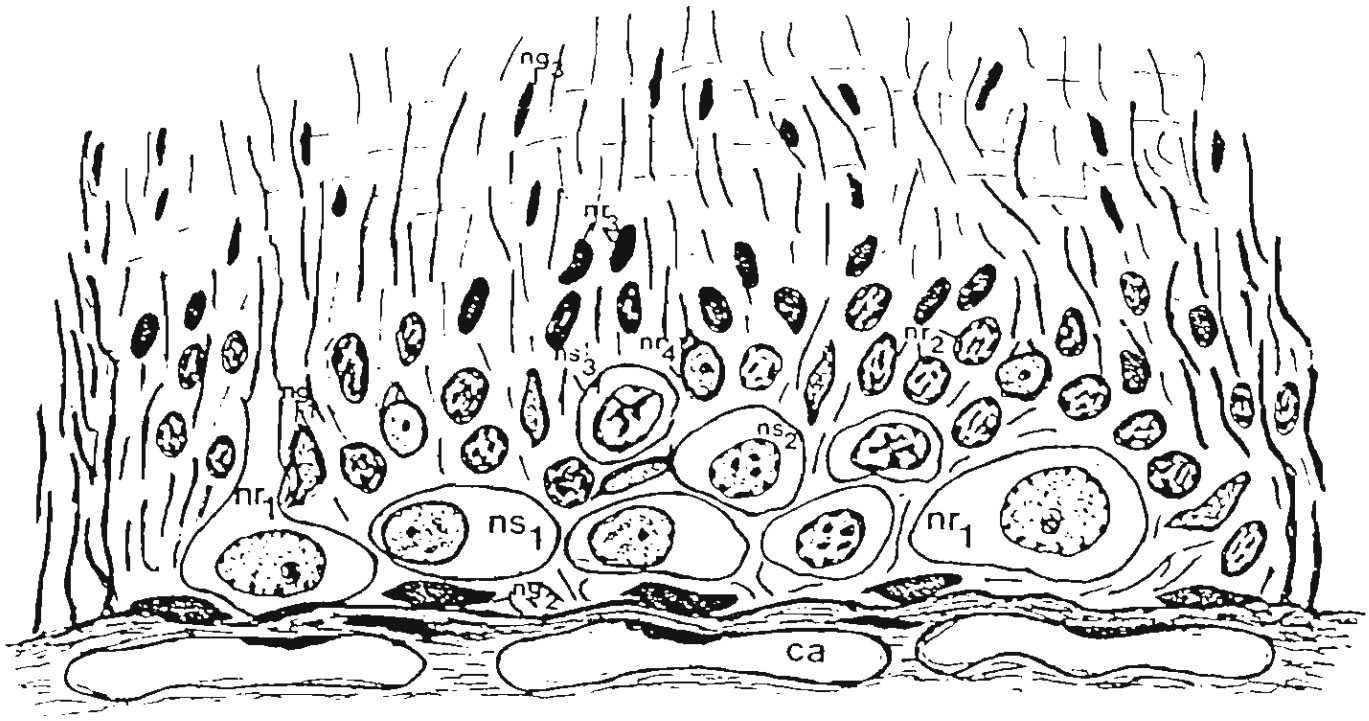




Figure 8

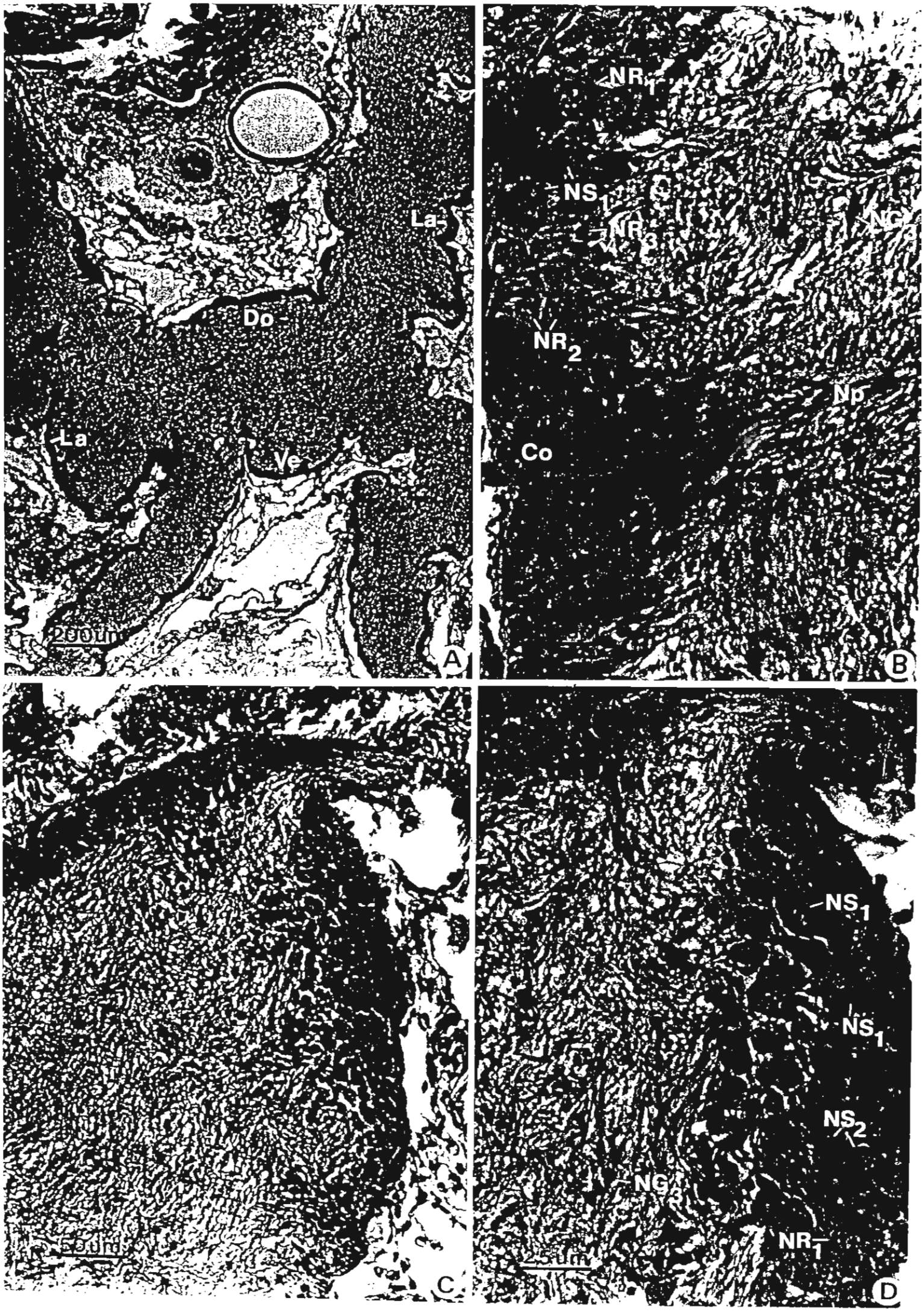


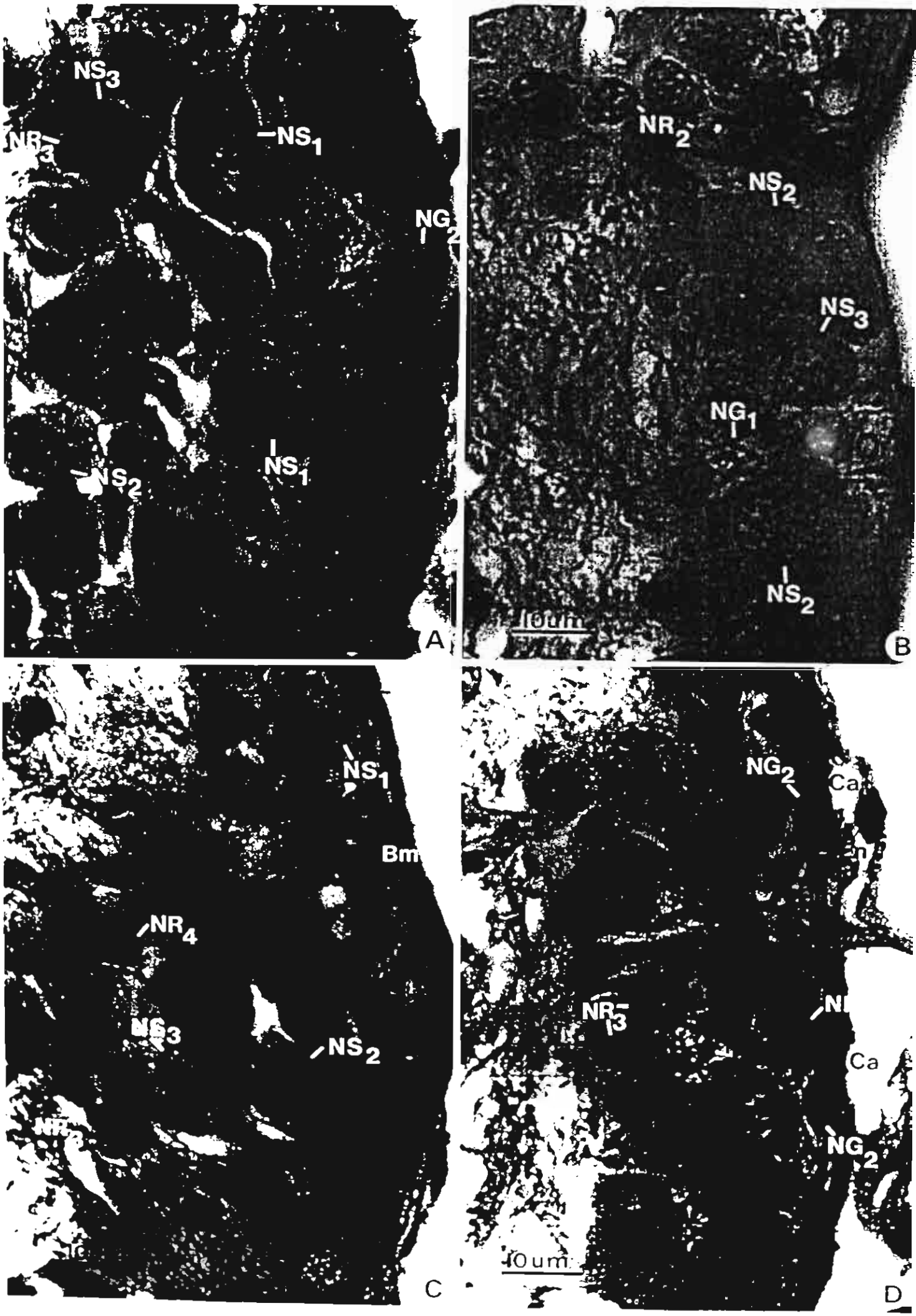
รูปที่ 9 ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (C) และสูง (B,D) ของปมประสาท pleuropedal ที่ย้อมด้วยสี Gomori แสดงขอบนอก (La) ขอบบน (Do) และขอบล่าง (Ve) ในรูป A ชั้น cortex ที่ขอบนอกและขอบบนหนากว่า cortex ที่ขอบล่าง (A,B) และชั้น cortex บริเวณที่เส้นประสาทแตกออกจากปมประสาท (ลูกศร) จะมีความหนาและจำนวนชั้นของเซลล์มากกว่าแห่งอื่น (C,D)

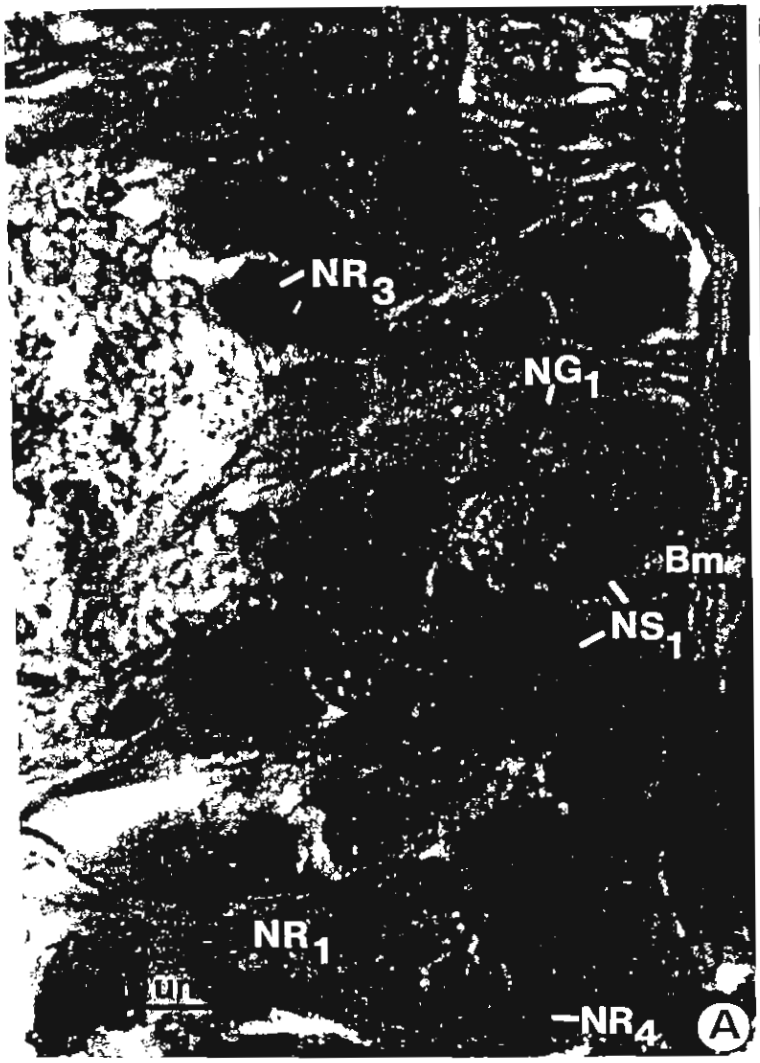
รูปที่ 10 ภาพถ่ายกำลังขยายสูงแสดงชั้น cortex ของปมประสาท pleuropedal ที่ย้อมด้วยสี Gomori แสดงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ ns_1-neurosecretory cell type, ns_2-neurosecretory cell type 2, ns_3-neurosecretory cell type 3, nr_1-neuron type 1, nr_2-neuron type 2, nr_3-neuron type 3, nr_4-neuron type 4, ng_1-neuroglia type 1, ng_2-neuroglia type 2, ng_3-neuroglia type 3, และโครงสร้างอื่น ๆ คือ ca-capillary; bm-basement membrane

รูปที่ 11 ภาพถ่ายกำลังขยายสูงของปมประสาท pleuropedal ซึ่งย้อมด้วยสี Gomori เพื่อแสดงเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell-ns) เซลล์ประสาท (neuron-nr) และเซลล์ neuroglia (ng) ชนิดต่าง ๆ

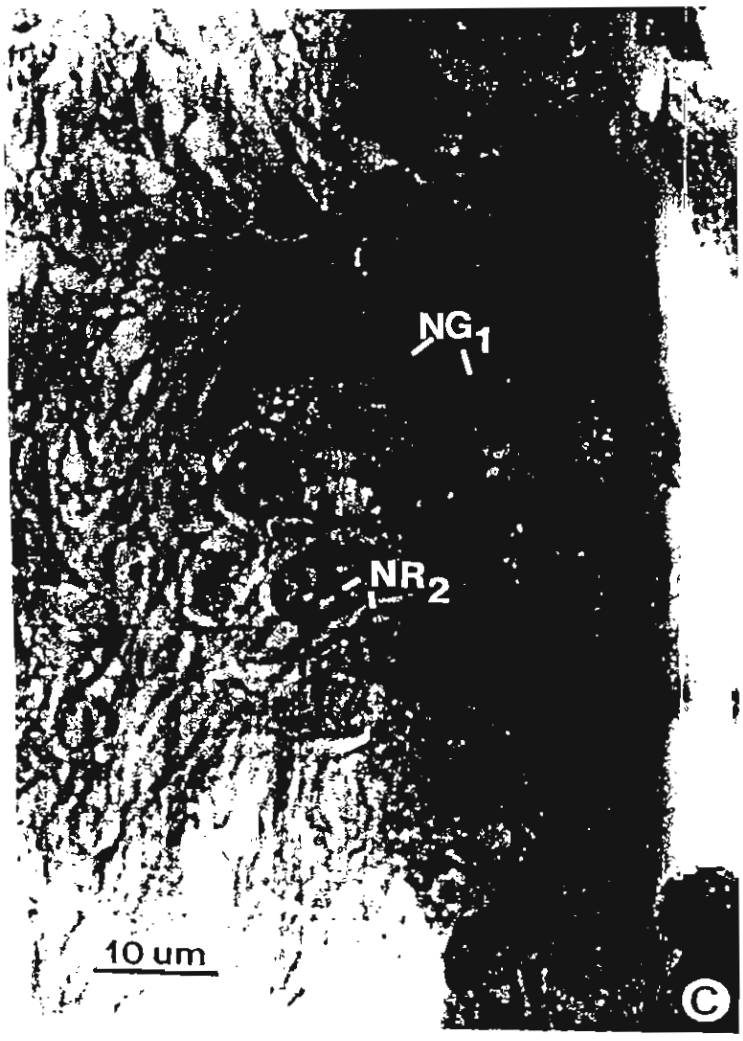
รูปที่ 12 ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C,D) ของปมประสาท pleuropedal ซึ่งย้อมด้วยสี paraldehyde-fuschin แสดงการติดสีม่วงของแกรนูลในไซโตปลาสซึมของ neurosecretory cells (ns) (รูป B,C) ส่วน neuron (nr, nr_{1-2}) ติดเพียงสีเขียวเช่นเดียวกับโครงสร้างอื่น ๆ (รูป C,D)


La
Do
La
Ve
200um
A
NR1
NS1
NR3
NG
NR2
Np
Co
B
C
NS1
NS1
NS2
NG3
NR1
50um
D


NS3
NR3
NS1
NG2
NS1
NS2
A
NR2
NS2
NS3
NG1
NS2
10um
B
NS1
Bm
NR4
NG3
NS2
C
NG2
Ca
NR3
Ca
NG2
40um
D

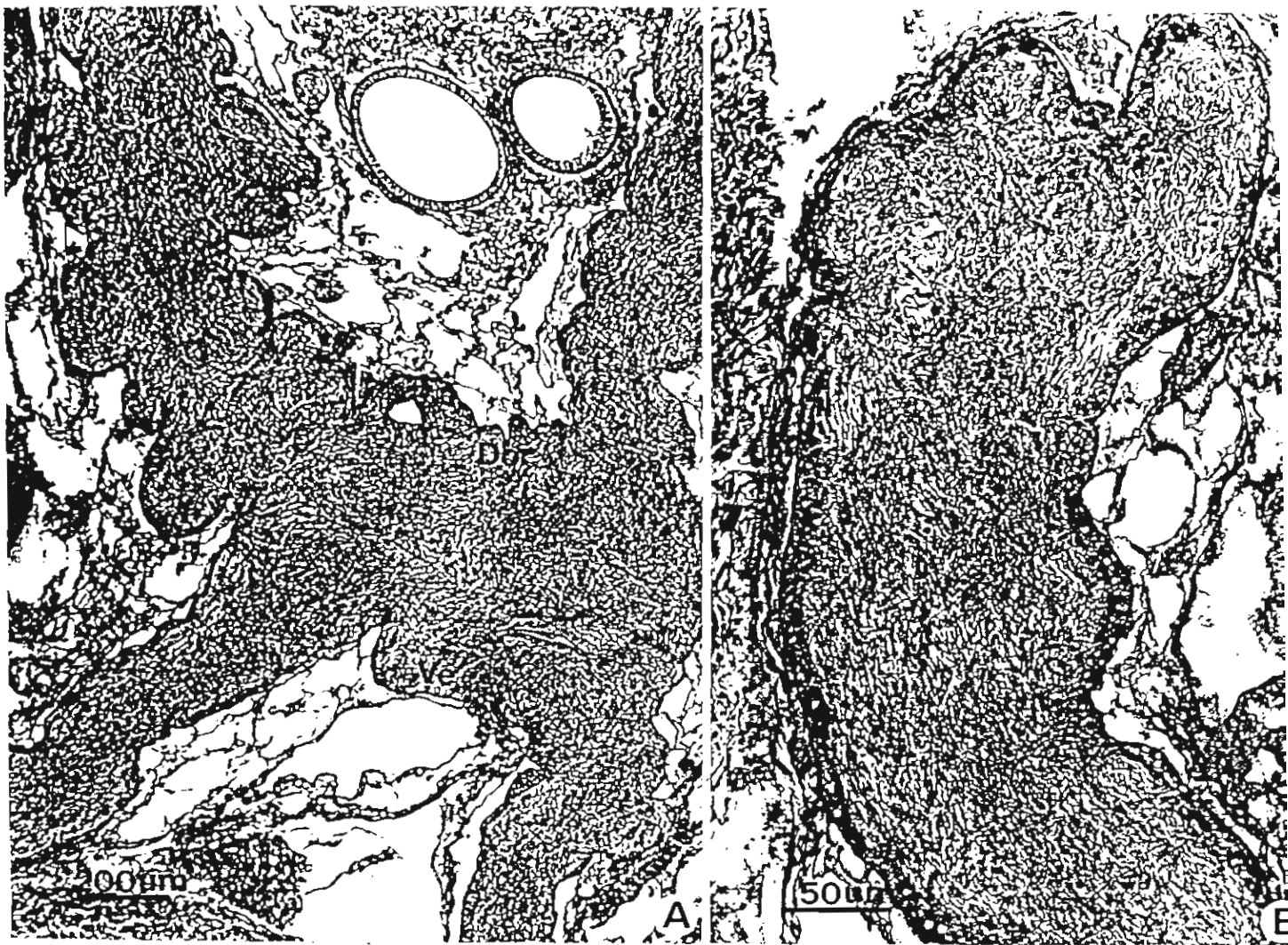

NR3
NG1
Bm
NS1
NR1
NR4
A

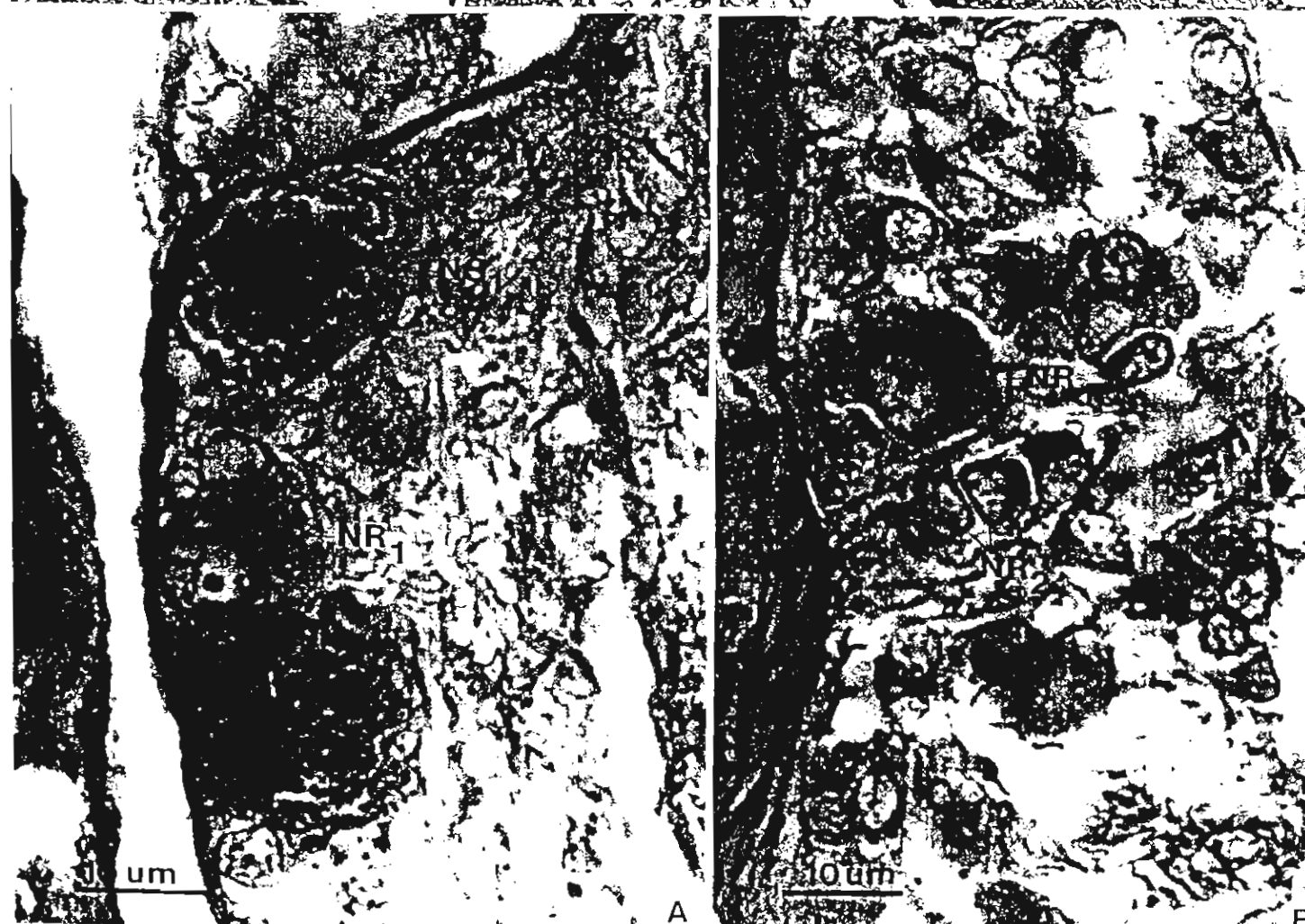

NR1
B


NG1
NR2
10 um
C


NR2
NR2
D

Figure 12





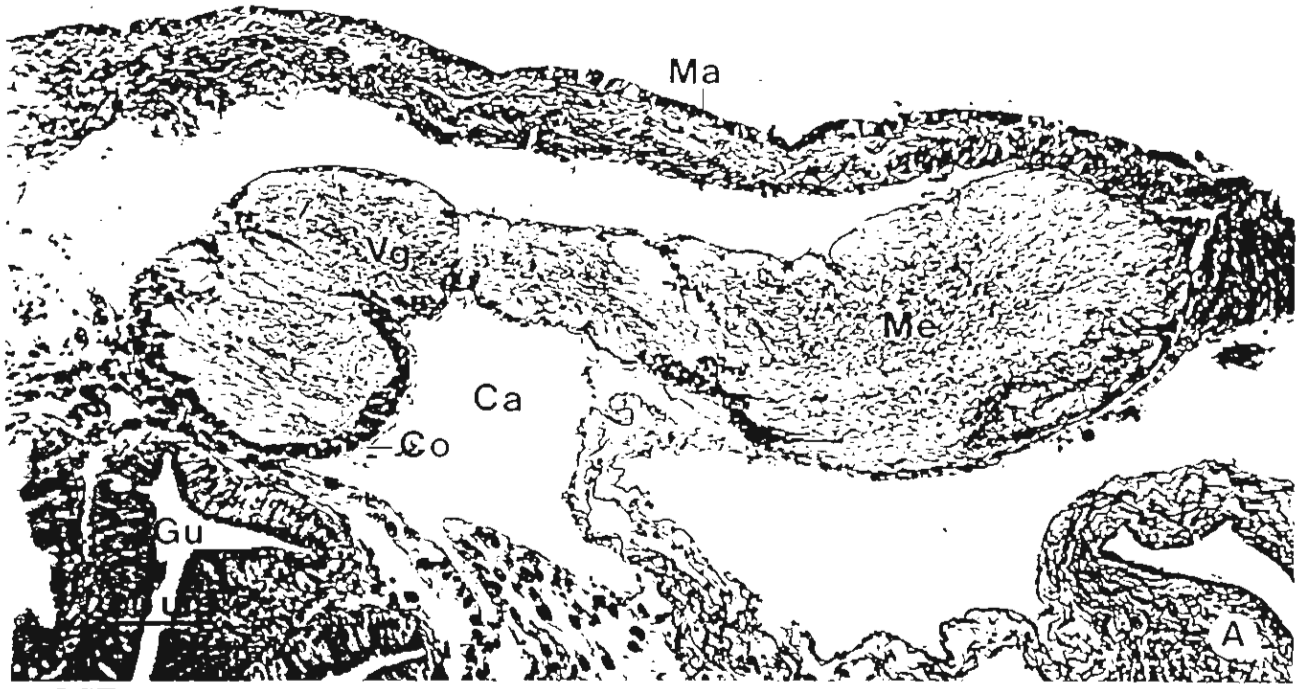
รูปที่ 13 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และ ปานกลาง (B,C) ของส่วนตัดขวางปมประสาท visceral ที่ย้อมโดยสี H & E แสดงลักษณะคล้าย dumbbell และชั้น cortex มีความหนาเป็นพิเศษในบริเวณด้าน lateral และ ventral ของปมประสาท Bm-Basement membrane, Ca-capillary, Co-cortex, Gu-gut, Ma-mantle, Md-medulla, Mu-muscle, Np-neuropil, Nt-nerve tract, Vg-visceral ganglia

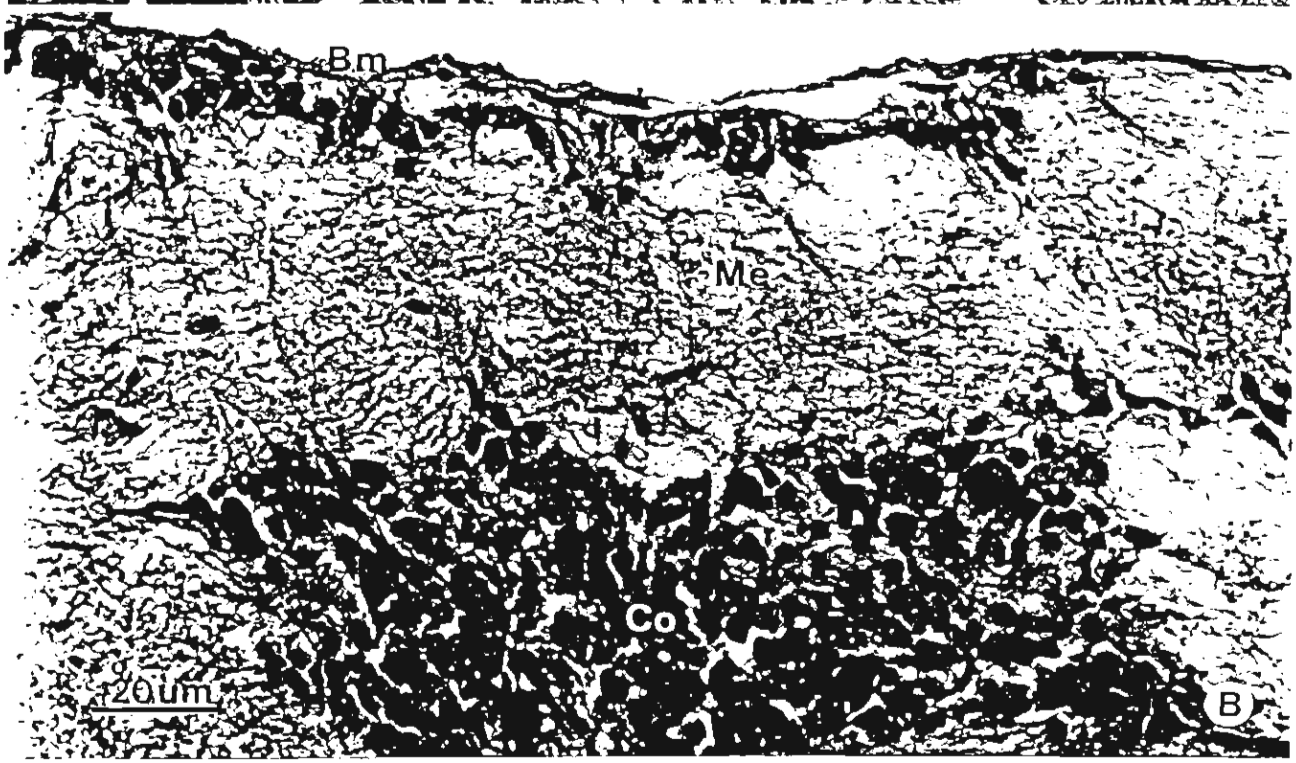
รูปที่ 14 ภาพกำลังขยายสูงของปมประสาท visceral ที่ย้อมด้วยสี H & E แสดงเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ (NS_1, NS_2, NS_3) เซลล์ประสาท (NR_1, NR_2, NR_3, NR_4) และเซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (NG_1, NG_2, NG_3)

รูปที่ 15 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และ ปานกลาง (B,C) ของปมประสาท visceral ย้อมด้วยสี Gomori

รูปที่ 16 ภาพกำลังขยายสูงของปมประสาท visceral ย้อมด้วยสี Gomori แสดงเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (NS_{1-3}) เซลล์ประสาท (NR_{1-4}) และเซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (NG_{1-3})

รูปที่ 17 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และสูง (B,C) ของปมประสาท visceral ย้อมด้วยสี paraldehyde-fuschin เซลล์ติดสีม่วงคือ เซลล์ NS ซึ่งส่วนใหญ่อาจเป็น NS_3


Ma
Vg
Me
Ca
Co
Gu
A


Bm
Me
Co
20um
B

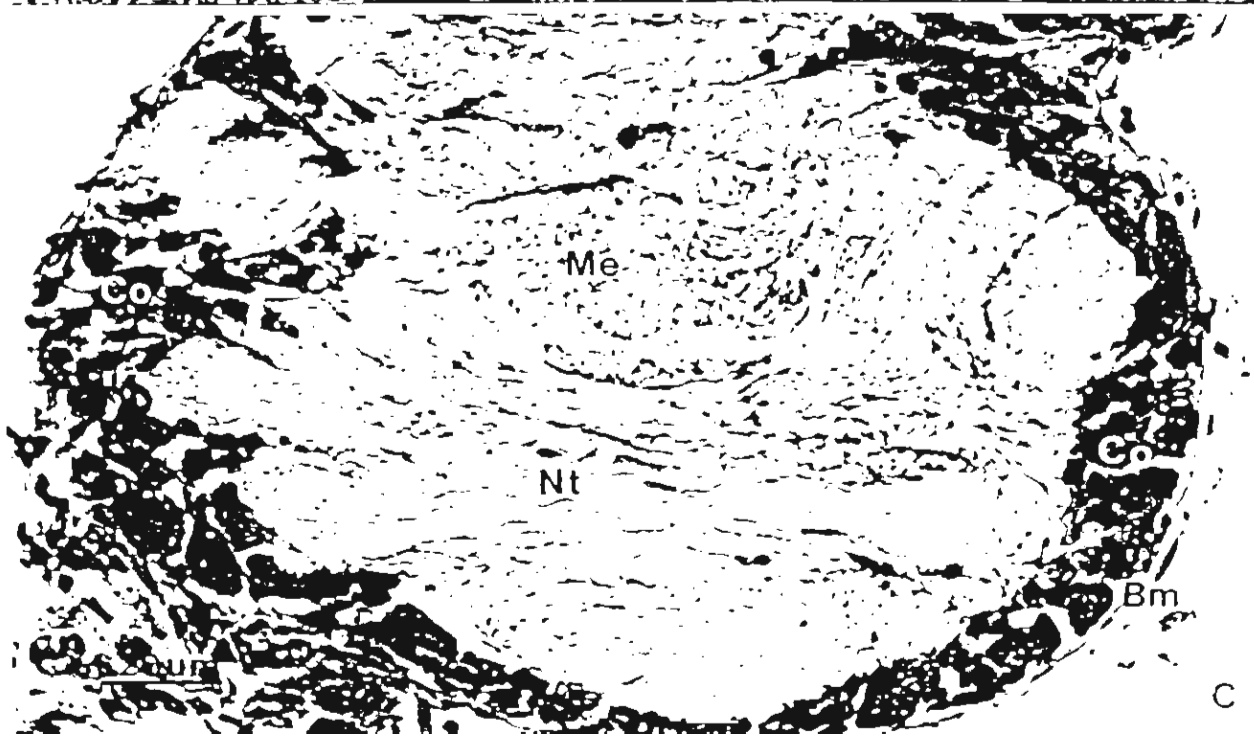
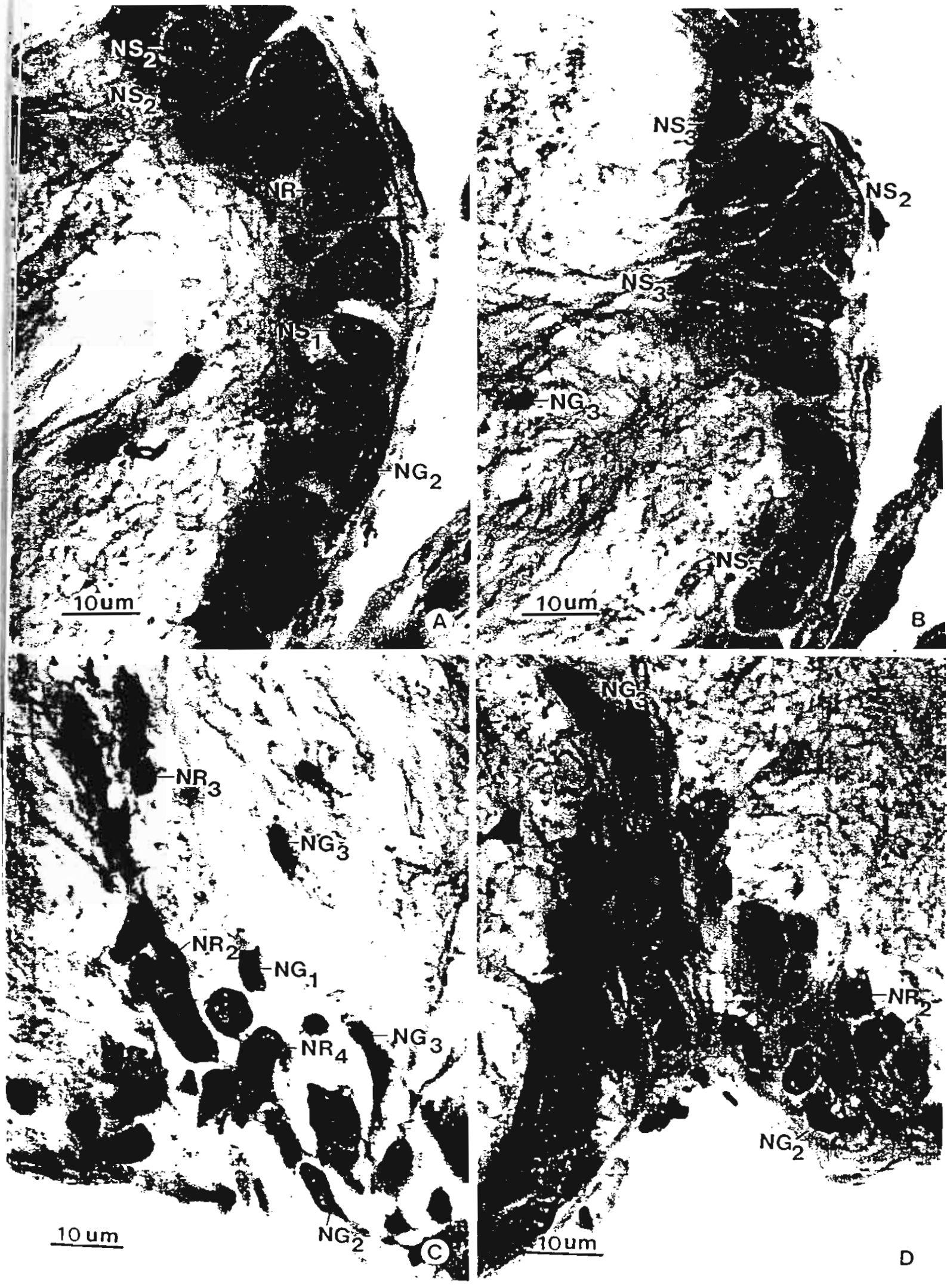
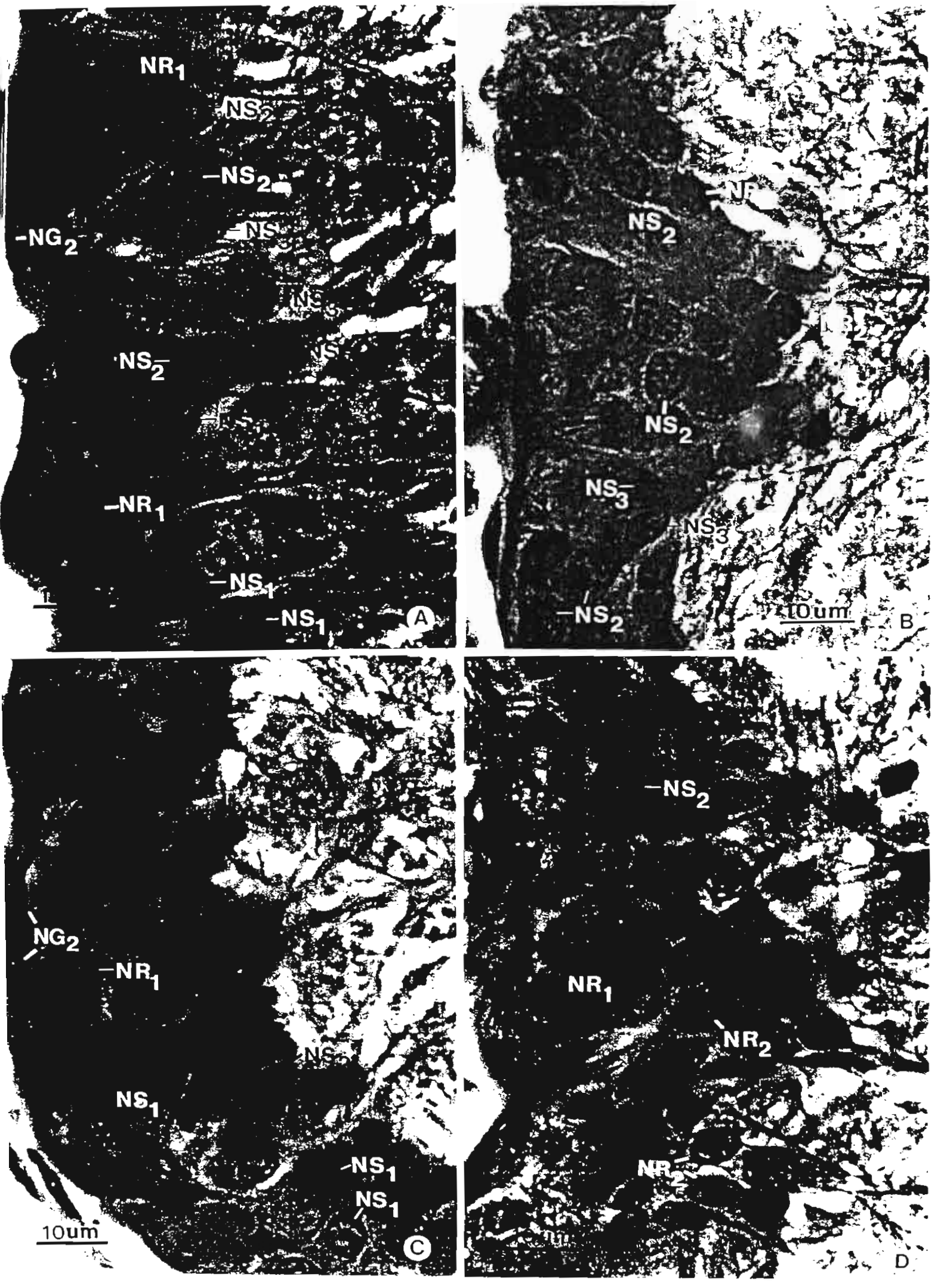

Me
Co
Nt
Co
Bm
C

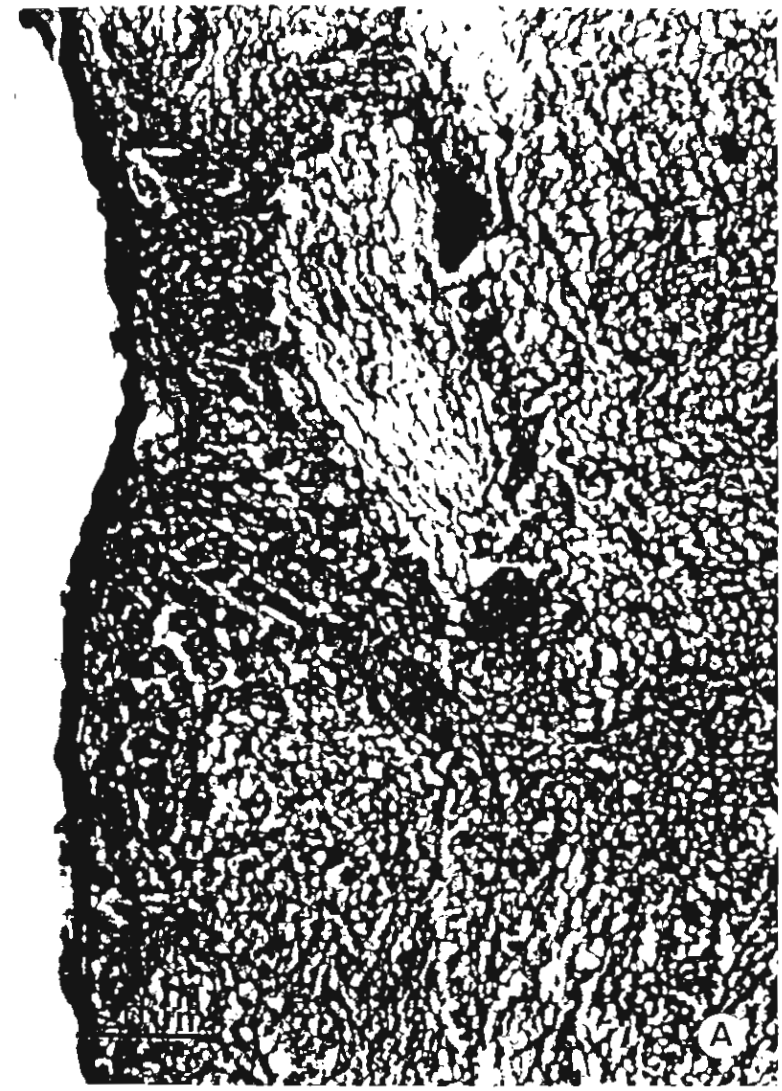
Figure 14

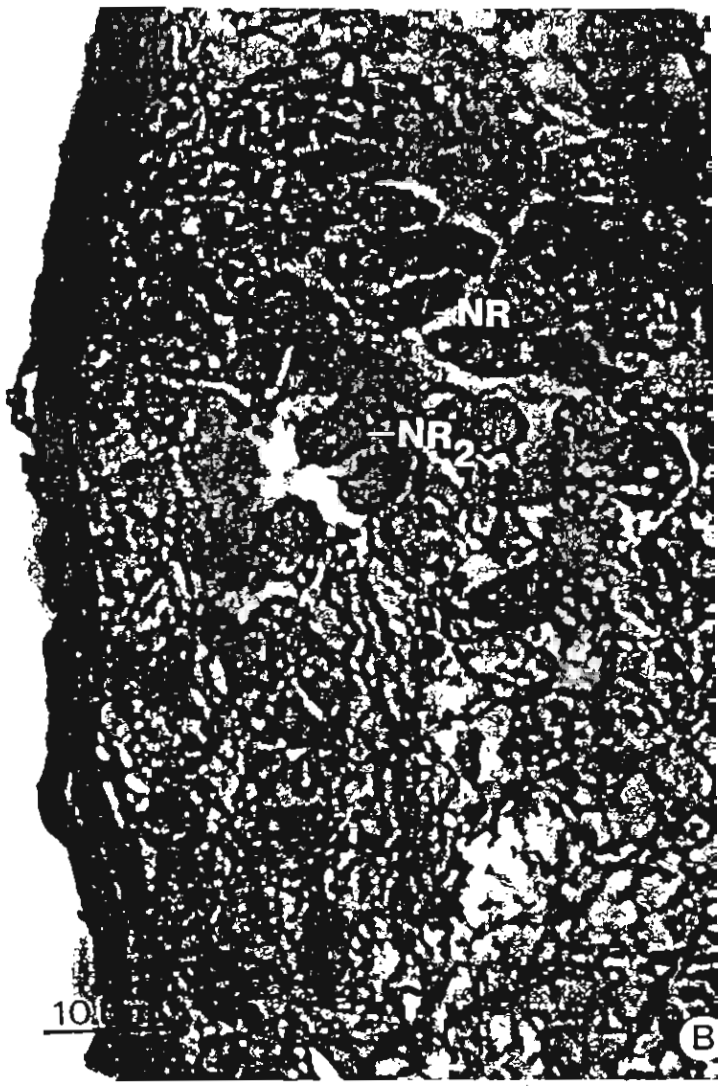

NS2
NS2
NR
NS1
NG2
10um
A
NS3
NS2
NS3
NG3
NS3
10um
B
NR3
NG3
NR2
NG1
NR4
NG3
NG2
10 um
C
NG3
NR2
NG2
10um
D


Ma
Vg
Mu
Gu
Gu
A
M
NG3
Co
B
Ng3
NS3
NS3
NS1
NS1
NG2
C

Figure 16


NR1
NS2
NS2
NG2
NS2
NR1
NS1
NS1
A
NS2
NS2
NS3
NS3
NS2
10um
B
NG2
NR1
NS1
NS1
NS1
10um
C
NS2
NR1
NR2
NR2
D


A


NR
NR2
10
B


NR1
NS1
10 um
C


NS
10 um
D

รูปที่ 18 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C) ของปมประสาท pedal ย้อมด้วยสี H & E แสดงชั้น cortex มีความหนาทางด้าน ventral มากกว่าด้านอื่น และมีเส้นประสาท (Nr) วิ่งออกจากปมประสาท ในรูป C แสดงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่ม NS, NR และ NG, Pd-pedal ganglion

รูปที่ 19 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) ปานกลาง (B) และสูง (C) ของปมประสาท pedal ย้อมด้วยสี Gomori

รูปที่ 20 ภาพขยายกำลังสูงของปมประสาท pedal ย้อมด้วยสี Gomori แสดงเซลล์ชนิดต่าง ๆ ในกลุ่ม NS, NR และ NG

รูปที่ 21 ภาพกำลังขยายต่ำ (A) และกำลังขยายสูง (B,C,D) ของปมประสาท pedal ย้อมด้วยสี paraldehyde-fuschin เซลล์ที่ติดสีม่วงน่าจะเป็น NS โดยเฉพาะ NS_3 ส่วนเซลล์ประสาท เช่น NR_1 ไม่ติดสีเลย

Figure 18

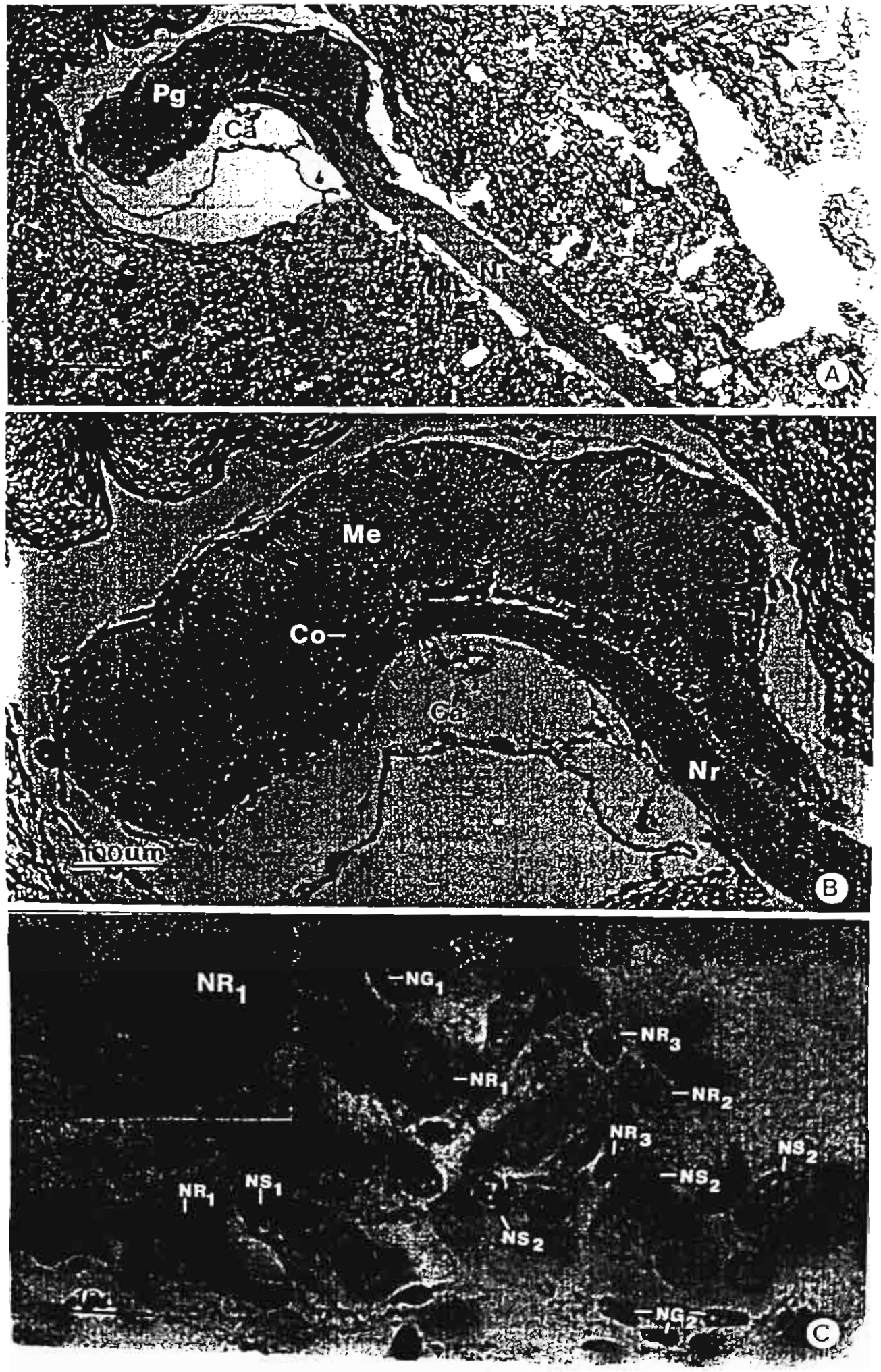
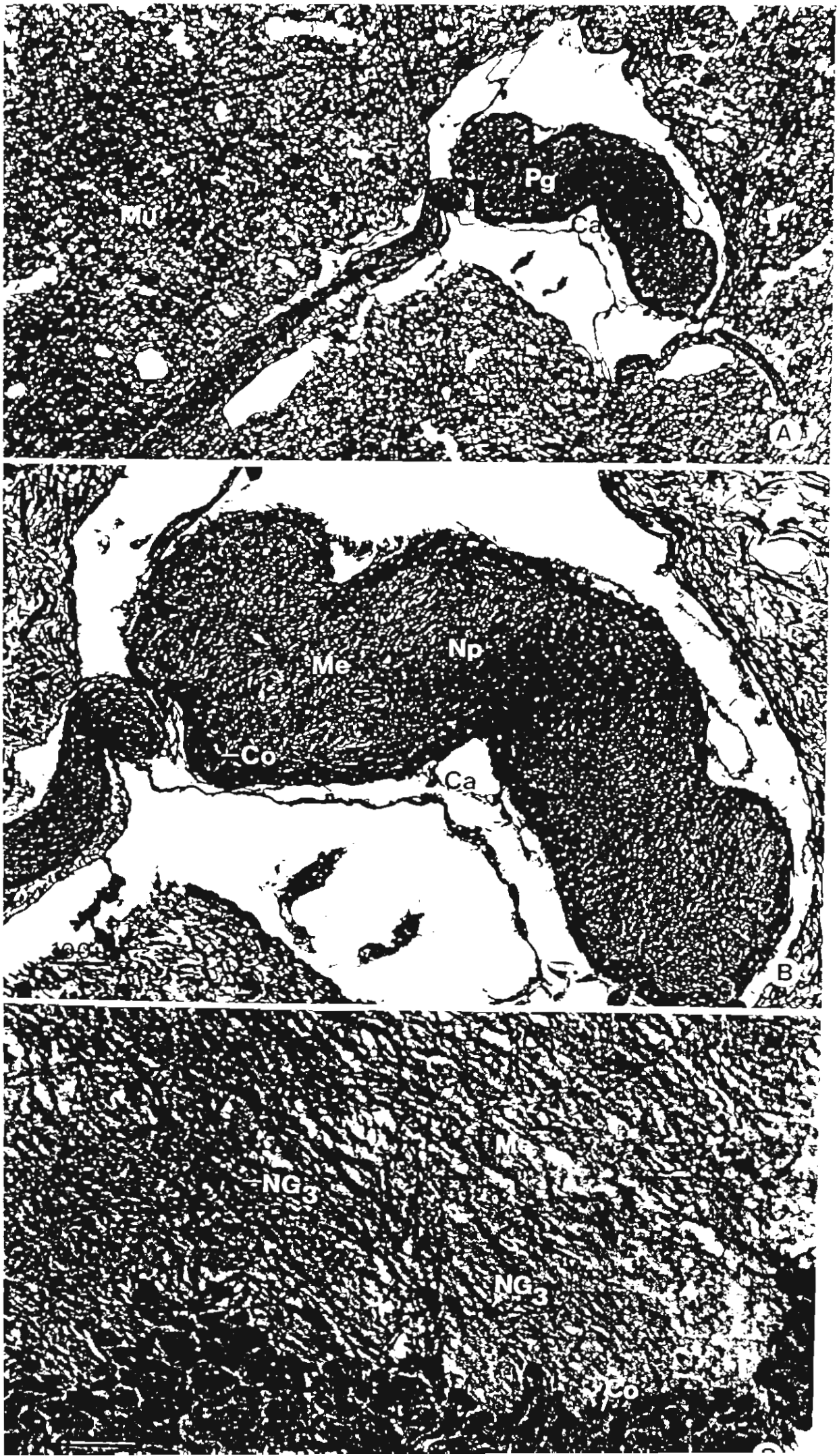

Pg
Ca
Nr
A
Me
Co
Ca
Nr
100um
B
NR1
NG1
NR3
NR1
NR2
NR3
NS2
NS2
NR1
NS1
NS2
NG2
C

Figure 19



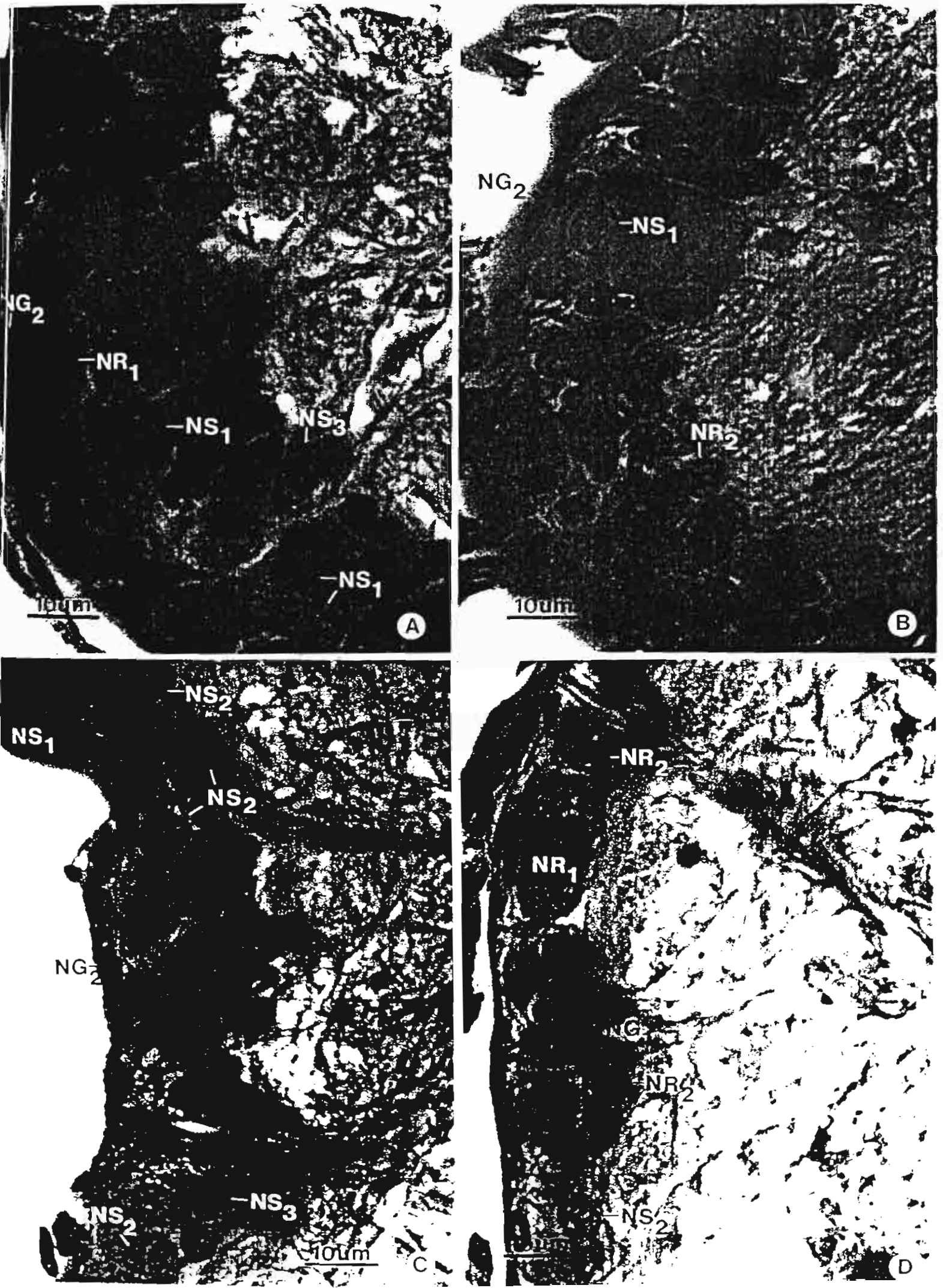
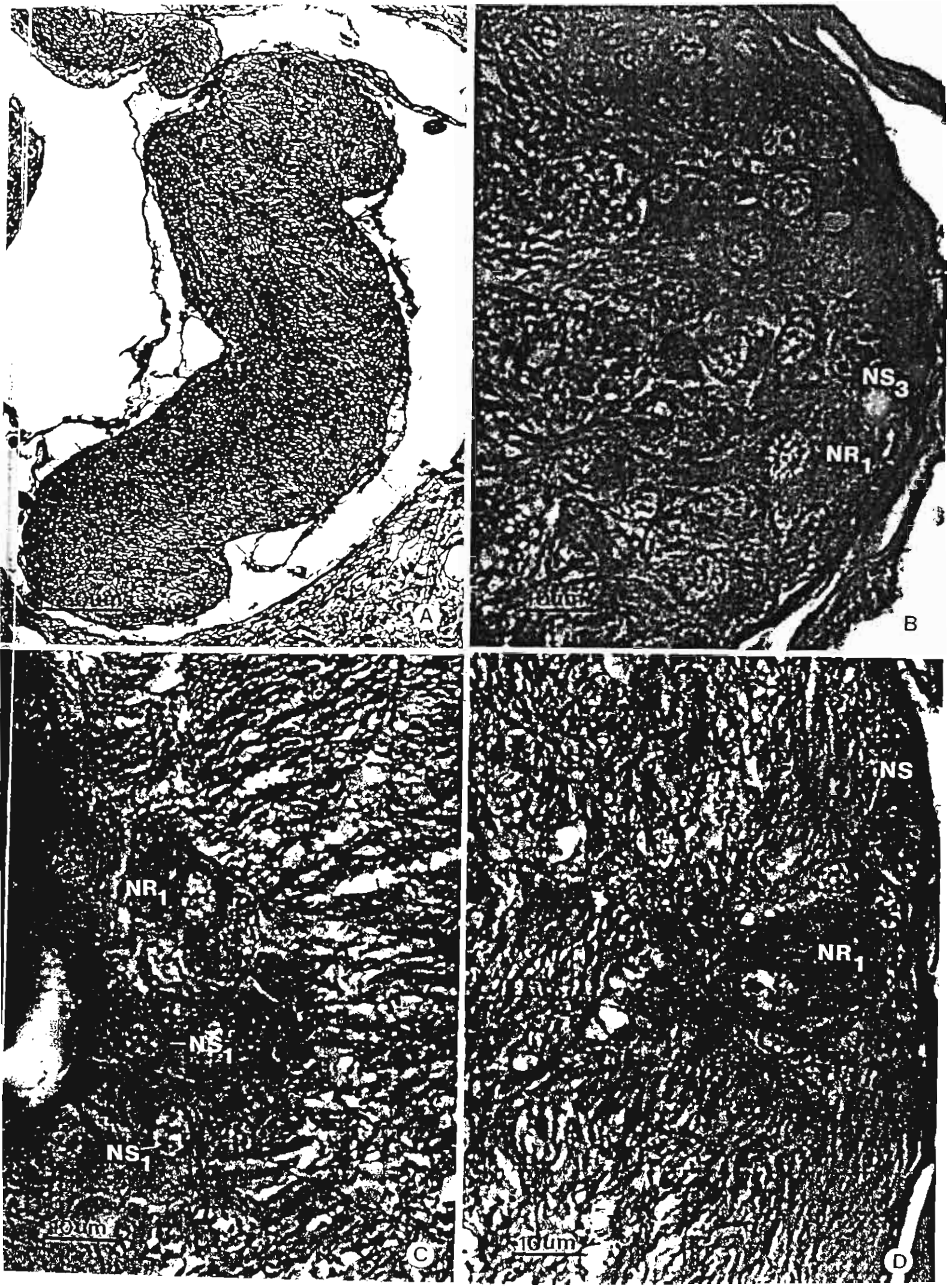

NG2
NR1
NS1
NS3
NS1
10um
A
NG2
NS1
NR2
10um
B
NS2
NS1
NS2
NG2
NS3
NS2
10um
C
NR2
NR1
NR2
NS2
D

Figure 21



6.4 การศึกษาลักษณะของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนในปมประสาท Cerebral และ Pleuropedal โดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Transmission Electron Microscope (TEM)

ปมประสาท Cerebral

ส่วนของ cortex มีเซลล์ NS 3 ชนิด NR 4 ชนิด และเซลล์ NG 3 ชนิด ซึ่งมีลักษณะของโครงสร้างละเอียด (ultrastructure) ที่ปรากฏในกล้อง TEM ดังนี้

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 1 (NS_1)

NS_1 เป็นเซลล์รูปร่างกลมหรือรูปไข่ ที่มีขนาดของเซลล์ประมาณ 10-15 μm และมีนิวเคลียสกลมขนาดประมาณ 5-6 μm ในนิวเคลียสมี heterochromatin เป็นแถบบาง ๆ เกาะอยู่ตามด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส และมีแถบบาง ๆ ของ heterochromatin กระจายอยู่ในส่วนกลางนิวเคลียส นิวคลีโอลัสมีขนาดใหญ่และเด่นชัด (รูปที่ 22A,C) ภายในไซโตปลาสซึมมีร่างแหแบบขรุขระ (rough endoplasmic reticulum-RER) อยู่พอประมาณ และไมโตคอนเดรียกระจายอยู่ทั่วไป แกรนูลในไซโตปลาสซึมมี 2 แบบ คือ แกรนูลขนาดเล็กรูปร่างกลม ภายในบรรจุสารทึบแสงอิเล็กตรอนปรากฏเป็นสีดำเข้มขนาดประมาณ 60 nm แกรนูลชนิดนี้กระจายอยู่ทั่วทุกส่วนของไซโตปลาสซึม แต่มีจำนวนมากเป็นพิเศษบริเวณด้าน maturing face ของ Golgi complexes (รูปที่ 22D,E) แกรนูลแบบที่สองมีรูปร่างกลมและมีขนาดใหญ่ประมาณ 800 nm ภายในบรรจุสารทึบแสงอิเล็กตรอนที่มีความเข้มปานกลาง โดยมักมีผลึกทึบแสงอิเล็กตรอนมากกว่า ขนาดต่าง ๆ ฝังอยู่ภายใน (รูปที่ 22A-C) แกรนูลชนิดนี้มีจำนวนน้อยและมักกระจายอยู่รอบ ๆ ด้าน maturing face ของ Golgi complexes (รูปที่ 22D) นอกจากแกรนูลทั้งสองชนิดแล้วบริเวณรอบ ๆ Golgi complexes ยังมี condensing vesicles ขนาดต่าง ๆ รวมกลุ่มกันอยู่อย่างหนาแน่นซึ่งอาจจะเป็นขั้นต่าง ๆ ที่กำลังจะรวมตัวและกลายไปเป็นแกรนูลทั้งสองแบบ (รูปที่ 22D,E)

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 2 (NS_2)

NS_2 เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลมหรือรี โดยมีขนาดของเซลล์ประมาณ 10-12 μm และขนาดของนิวเคลียสประมาณ 4-5 μm ในนิวเคลียสมีก้อน heterochromatin ขนาดเล็กเกาะอยู่ตามด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส และภายในนิวเคลียสมีก้อนหรือท่อนสั้น ๆ ของ heterochromatin ที่ทึบแสงอิเล็กตรอนกระจายอยู่ในตำแหน่งต่าง ๆ ที่ทำให้นิวเคลียสดูคล้ายหน้าปัทม์นาฬิกา (clock-faced pattern) (รูปที่ 23A,C) ในไซโตปลาสซึมมี RER และไมโตคอนเดรียจำนวนมากกระจายอยู่ทั่วทั้งเซลล์ กอลจิคอมเพลกมีขนาดใหญ่และเด่นชัด แกรนูลมีขนาดใหญ่คล้ายกับแกรนูลแบบที่สองในเซลล์ NS_1 โดยมีรูปร่างกลมหรือรี

ขนาดประมาณ 500-800 nm ภายในแกรนูลมีก้อนผลึกทึบแสงอิเล็กตรอนขนาดต่าง ๆ กระจายอยู่ในเนื้อซึ่งมีความทึบแสงอิเล็กตรอนน้อยกว่า (รูปที่ 23C,D) แกรนูลมักรวมตัวอยู่ใกล้ ๆ กับกอลจิคอมเพลก (รูปที่ 23A,B) โดยเฉพาะทางด้าน maturing face และมี condensing vesicles ขนาดเล็กกระจายอยู่รอบ ๆ กอลจิคอมเพลก (รูปที่ 23B) ส่วนแกรนูลขนาดเล็กและเข้มที่มีลักษณะคล้ายแกรนูลแบบที่หนึ่งในเซลล์ NS_1 มีอยู่น้อยมาก (รูปที่ 23A,C)

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 3 (NS_3)

NS_3 เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างรีขนาดเล็กกว่า NS_1 และ NS_2 โดยมีเซลล์ขนาดประมาณ 8-10 μm และนิวเคลียสมีรูปร่างรีขนาดประมาณ 4-5 μm ภายในนิวเคลียสนอกจาก heterochromatin ที่ปรากฏเป็นก้อนหนาเกาะตามขอบด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียสแล้ว ยังมี heterochromatin ปรากฏเป็นท่อนหรือแถบยาวสานต่อกันอยู่ส่วนในของนิวเคลียส (รูปที่ 24A,C,E) ไซโตปลาสซึมมีออแกนเนลต่าง ๆ เช่น RER ไมโตคอนเดรีย และกอลจิคอมเพลก ซึ่งมีปริมาณและขนาดลดลงมากเมื่อเทียบกับเซลล์ NS_1 และ NS_2 เนื่องจากออแกนเนลเหล่านี้ถูกแทนที่ด้วยแกรนูล โดยที่เนื้อไซโตปลาสซึมของเซลล์บางเซลล์อาจจะอัดแน่นและเต็มไปด้วยแกรนูลขนาดใหญ่ (1000-7000 nm) แกรนูลเหล่านี้มีก้อนผลึกทึบแสงอิเล็กตรอนสีดำขนาดต่าง ๆ เกาะกันเป็นกลุ่ม ฝังอยู่ในเนื้อของแกรนูลที่มีลักษณะใส (รูปที่ 24E,F) เซลล์ NS_3 บางเซลล์มีแกรนูลที่ลักษณะเช่นเดียวกับที่พบใน NS_2 ที่กล่าวข้างต้น แต่มีผลึกที่ความเข้มพอประมาณฝังอยู่ในเนื้อแกรนูลที่มีลักษณะเป็นวุ้นสม่ำเสมอ ปะปนกับแกรนูลที่ผลึกรวมเป็นกลุ่มของก้อนทึบแสงอิเล็กตรอนขนาดต่าง ๆ ที่ฝังอยู่ในเนื้อแกรนูลที่โปร่งแสง (รูปที่ 24A-D) ลักษณะของแกรนูลดังกล่าวคล้าย ๆ กับลักษณะของ aging pigment ที่สะสมในเซลล์ประสาทที่มีอายุมากและกำลังจะสลายตัว ดังนั้นเราคาดว่า NS_3 อาจจะเป็นเซลล์ NS_2 หรือ NS_1 ที่หมดอายุไขและกำลังอยู่ในช่วงของการสลายตัว

เซลล์ประสาทชนิดที่ 1 (NR_1)

เป็นเซลล์รูปร่างกลมหรือรี และมีกิ่งประสาททอดออกจากตัวเซลล์แทรกเข้าไปในเนื้อของ cortex เซลล์มีขนาดใหญ่ที่สุดในปมประสาท มีขนาดประมาณ 25-40 μm และนิวเคลียสมีขนาดประมาณ 13-15 μm โครมาตินภายในนิวเคลียสเกือบทั้งหมดเป็น euchromatin ยกเว้นมีแถบ heterochromatin ที่บางมากฉาบอยู่ตามด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส นิวคลีโอลัสมีขนาดใหญ่มากและมักอยู่กลางนิวเคลียส ไซโตปลาสซึมมีขนาดใหญ่ที่สุดและเต็มไปด้วย RER และไมโตคอนเดรีย แต่ไม่ปรากฏแกรนูลอย่างเช่นที่พบในเซลล์ NS (รูปที่ 25A)

เซลล์ประสาทชนิดที่ 2 และ 3 (NR_2 และ NR_3)

เป็นเซลล์รูปไข่ซึ่งมีขนาดเซลล์ประมาณ 4-6 μm และมีขนาดนิวเคลียสประมาณ 3-5 μm ภายในนิวเคลียสมี heterochromatin ปรากฏเป็นแถบหนาเกาะตามด้านในของถุงหุ้ม

นิวเคลียส และเป็นท่อนหรือแถบที่ติดต่อกันพาดอยู่ในส่วนกลางของนิวเคลียส (รูปที่ 25A-C) NR_3 (รูปที่ 25D) มีแถบของ heterochromatin หนากว่าและปริมาณมากกว่าในเซลล์ NR_2 (รูปที่ 25B,C) เซลล์ทั้งสองชนิดมีไซโตปลาสซึมเป็นขอบบาง ๆ หุ้มรอบนิวเคลียส ไซโตปลาสซึมมีเพียงไรโบโซมและไมโตคอนเดรียอยู่ประปราย (รูปที่ 25B-D) แต่ใน NR_2 อาจจะมี Golgi complexes ขนาดเล็ก และ RER อยู่บ้าง

เซลล์ประสาทชนิดที่ 4 (NR_4)

เป็นเซลล์รูปร่างค่อนข้างกลม ขนาดประมาณ 4-6 μm และขนาดของนิวเคลียสประมาณ 3-5 μm ในนิวเคลียสมี heterochromatin ปรากฏเป็นแถบหนาติดกับขอบด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส ส่วนเนื้อในของนิวเคลียสค่อนข้างโปร่ง เนื่องจากมีแถบหรือท่อนของ heterochromatin ปรากฏอยู่น้อยมาก (รูปที่ 26A) ไซโตปลาสซึมของ NR_4 มีปริมาณมากกว่าเซลล์ NR_2 และ NR_3 โดยมี Golgi complexes ขนาดเล็ก RER และไมโตคอนเดรียรวมตัวอยู่ทางด้านหนึ่งของเซลล์ ส่วนไรโบโซมกระจายอยู่ทั่วทั้งไซโตปลาสซึม (รูปที่ 26A)

เซลล์ประสาทพีเลี้ยงชนิดที่ 1 (NG_1)

NG_1 เป็นเซลล์รูปเรียวยาว เซลล์มีขนาดประมาณ 3 x 7 μm และนิวเคลียสมีขนาดประมาณ 3 x 5 μm ในนิวเคลียสมี heterochromatin ปรากฏเป็นแถบต่อเนื่องกันทั้งที่ฉาบอยู่ด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส และที่พาดอยู่ส่วนกลางนิวเคลียส (รูปที่ 26B) ไซโตปลาสซึมมีปริมาณน้อยและค่อนข้างโปร่งแสง เนื่องจากมีออแกนเนลต่าง ๆ อยู่น้อยมาก

เซลล์ประสาทพีเลี้ยงชนิดที่ 2 (NG_2)

NG_2 เป็นเซลล์ที่เรียงตัวเป็นแนวติดกับด้านในของถุงหุ้มปมประสาท (รูปที่ 26C) ตัวเซลล์และนิวเคลียสมีลักษณะเป็นรูปกระสวยเรียวยาว ขนาดเซลล์ประมาณ 3 x 8 μm และขนาดนิวเคลียสประมาณ 3 x 5 μm ภายในนิวเคลียสโครมาตินมีลักษณะเป็น heterochromatin เกือบทั่วทั้งนิวเคลียส ซึ่งปรากฏเป็นแถบทึบโดยมีรอยโปร่งใสของนิวคลีโอปลาสซึมอยู่เพียงตรงกลางนิวเคลียส (รูปที่ 26D) ไซโตปลาสซึมมีปริมาณน้อยมากและแทบจะไม่มีออแกนเนลอื่น ๆ อยู่เลยยกเว้นไรโบโซม

เซลล์ประสาทพีเลี้ยงชนิดที่ 3 (NG_3)

NG_3 เป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายคลึงกับ NG_2 แต่แทรกอยู่ระหว่างมัดเส้นประสาทใน neuropil

โครงสร้างละเอียด (ultrastructure) ของ neuropil ในบริเวณ medulla

ภายใน neuropil ของบริเวณ medulla ประกอบด้วยกิ่งประสาทอัดกันอยู่แน่น ภายในกิ่งประสาทมีแกรนูลอยู่จำนวนมาก ซึ่งอาจแยกชนิดของกิ่งประสาทตามลักษณะแกรนูลที่บรรจุอยู่ภายในออกได้เป็น 4 แบบคือ แบบที่หนึ่ง ภายในกิ่งประสาทไม่มีแกรนูลเลย แบบที่สอง

มีแกรนูลขนาดกลางคล้าย ๆ กับแกรนูลที่พบในเซลล์ NS_1 แบบที่สาม มีแกรนูลขนาดใกล้เคียงกับแบบที่สองแต่เนื้อแกรนูลใส และแบบที่สี่ ซึ่งมีแกรนูลขนาดเล็กและละเอียดกระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 27A-C) อาจเป็นไปได้ว่ากิ่งประสาทแบบที่ 1 เป็นกิ่งประสาท dendrite ซึ่งมักไม่มีแกรนูลที่เป็น neurohumoral vesicles ส่วนกิ่งประสาทแบบที่ 2, 3 และ 4 เป็นส่วนของกิ่ง axon หรือปลาย axon ที่มี vesicles บรรจุสารสื่อประสาทประเภท neurohormones หรือ neurotransmitter อยู่จำนวนมาก และเป็นไปได้ว่ากิ่งประสาทบางกิ่งเป็นส่วนของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน โดยเฉพาะเซลล์ NS_1

ปมประสาท Pleuropedal

ส่วน cortex ของปมประสาท pleuropedal มีเซลล์ NS, NR และ NG คล้ายกับเซลล์ประเภทเดียวกันกับที่พบในปมประสาท cerebral แต่เซลล์ NS มีลักษณะแตกต่างกันในรายละเอียด กล่าวคือ

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน NS_1

NS_1 เป็นเซลล์ NS ขนาดใหญ่ที่สุด มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเซลล์ประมาณ 10-15 μm และขนาดนิวเคลียสประมาณ 6-8 μm ภายในนิวเคลียสมี heterochromatin ปรากฏเป็นแถบบาง ๆ เกาะอยู่กับด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส และบางส่วนปรากฏเป็นก้อนเล็ก ๆ หรือแถบบาง ๆ กระจายอยู่ทั่วไปภายในเนื้อของนิวเคลียส นิวคลีโอลัสมีขนาดใหญ่และเห็นเด่นชัด ภายในไซโตปลาสซึมมี RER เป็นแนวยาวเรียงตัวอยู่อย่างหนาแน่น (รูปที่ 28A,B) กอลจิคอมเพลกมีขนาดใหญ่และพัฒนาเต็มที่ (รูปที่ 28C) ไมโตคอนเดรียมีจำนวนมากและกระจายอยู่ทั่วทั้งเซลล์ แกรนูลมีชนิดเดียวซึ่งมีลักษณะกลมขนาดเล็กประมาณ 120 nm เนื้อในของแกรนูลมีลักษณะตั้งแต่ทึบแสงอิเล็กตรอนพอประมาณจนถึงทึบแสงมาก (รูปที่ 28C,D) จำนวนแกรนูลเปลี่ยนแปลงไปตามขั้นตอนการพัฒนาของเซลล์ เซลล์ที่เริ่มพัฒนาจะมีแกรนูลน้อย (รูปที่ 28A,B) ซึ่งส่วนมากมักจะรวมกลุ่มอยู่ใกล้กับกอลจิคอมเพลก (รูปที่ 28C) ส่วนเซลล์ที่พัฒนาเต็มที่มักมีแกรนูลอัดกันอยู่แน่นเกือบทั่วทั้งไซโตปลาสซึม (รูปที่ 28D) ทางด้าน maturing face ของกอลจิคอมเพลกมักมี condensing vesicles ขนาดต่าง ๆ สะสมอยู่ ซึ่งกำลังพัฒนาเป็นแกรนูลที่สมบูรณ์ต่อไป (รูปที่ 28C)

เซลล์ NS_1 ของปมประสาท pleuropedal แตกต่างจากเซลล์ NS_1 ของปมประสาท cerebral ในส่วนที่มีแกรนูลขนาดเล็กที่มีเนื้อเข้มอยู่เพียงชนิดเดียว ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าแกรนูลแบบที่ 1 ของ NS_1 ของปมประสาท cerebral ประมาณ 2 เท่า (120 nm: 60 nm)

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน NS_2

NS_2 มีขนาดของเซลล์ประมาณ 10-12 μm และขนาดนิวเคลียสประมาณ 6-8 μm มีก้อน heterochromatin ค่อนข้างกลมและทึบแสงอิเล็กตรอน กระจายอยู่ตามขอบและ

ภายในนิวเคลียส ทำให้นิวเคลียสมีลักษณะคล้ายหน้าปัทม์นาฬิกา (รูปที่ 29A,D) ภายในไซโตปลาสซึมมีแกรนูลอยู่ในปริมาณต่าง ๆ กัน ตั้งแต่เซลล์ที่มีแกรนูลจำนวนน้อยที่กระจายอยู่เฉพาะรอบบริเวณกอลจิคอมเพลก (รูปที่ 29A-C) จนถึงเซลล์ที่มีแกรนูลจำนวนมากอัดแน่นไซโตปลาสซึม (รูปที่ 29D,E) แกรนูลมีรูปร่างกลมขนาดใกล้เคียงกับแกรนูลที่พบใน NS_1 แต่เนื้อมีความทึบแสงอิเล็กตรอนน้อยกว่า และมีขนาดใหญ่กว่า 2 เท่า คือมีขนาดประมาณ 240 nm (รูปที่ 29E) ออแกนเนล ได้แก่ rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes และไมโตคอนเดรียมีอยู่อย่างหนาแน่นในเซลล์แบบแรก (รูปที่ 29A-C) ส่วนในเซลล์แบบที่สอง ออแกนเนลมีจำนวนลดลงมาก เนื่องจากถูกแทนที่โดยแกรนูลที่อัดอยู่แน่นเกือบทั้งไซโตปลาสซึม (รูปที่ 29D,E) เซลล์ NS_2 ในปมประสาท pleuropedal แตกต่างจากเซลล์ NS_2 ในปมประสาท cerebral ในส่วนที่มีแกรนูลขนาดเล็ก (240 nm) จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วทั้งเซลล์ ในขณะที่ NS_2 ของปมประสาท cerebral มีแกรนูลรูปร่างกลมหรือรีขนาดใหญ่ (500-800 nm) ที่มักมีผลึกฝังตัวอยู่ภายในเนื้อแกรนูล และแกรนูลดังกล่าวก็มีจำนวนค่อนข้างน้อย ทั้ง ๆ ที่เซลล์ทั้งสองชนิดมีลักษณะของนิวเคลียสเป็นแบบหน้าปัทม์นาฬิกาคล้ายกัน

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน NS_3

NS_3 ของปมประสาท pleuropedal มีลักษณะเช่นเดียวกับ NS_3 ของปมประสาท cerebral และมี 2 แบบ (รูปที่ 30A-D) ซึ่งอาจเป็นเพียงขั้นตอนการพัฒนาของเซลล์ชนิดนี้เช่นเดียวกับที่กล่าวแล้วในปมประสาท cerebral

เซลล์ประสาท NR_1, NR_2, NR_3 และ NR_4

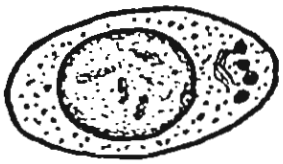
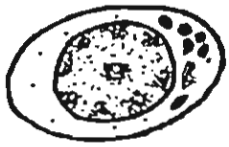
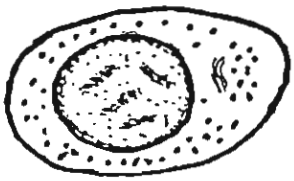
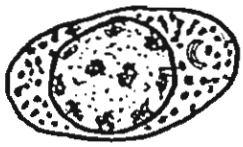
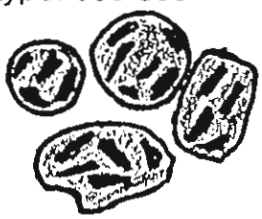
เซลล์ประสาททั้ง 4 ชนิด ก็มีขนาดและลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral (รูปที่ 31A-D)

เซลล์ประสาทพี่เลี้ยง NG_1, NG_2, NG_3

เซลล์ประสาทพี่เลี้ยงทั้งสามชนิดก็มีขนาด รูปร่าง ลักษณะ และตำแหน่งการกระจายเช่นเดียวกับที่พบในปมประสาท cerebral (รูปที่ 32A,B)

Neuropil ก็ประกอบด้วยกิ่งประสาทที่มีลักษณะคล้ายกับที่พบในปมประสาท cerebral (รูปที่ 32C,D)

Table 2 การเปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างละเอียดของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนในปมประสาท Cerebral กับปมประสาท Pleuropedal

cell structures	NS_1	NS_2	NS_3
TEM diagrams cerebral			
pleuropedal			
cell size	15-20 μm	10-12 μm	8-10 μm
nucleus (chromatin pattern)	vesicular	clock-faced	patchy
granules			
cerebral	2 types: 500-800 nm  60 nm	1 type: 500-800 nm 	1 type: aggregates of dense globules 
pleuropedal	1 type: 120 nm 	1 type: 240 nm 	1 type: aggregates of dense globules
organelles	**Golgi & RER:** numerous in synthetic cells and reduced in mature cells **mitochondria:** numerous in young cells and reduced in mature cells	**Golgi & RER:** numerous in synthetic cells and reduced in mature cells **mitochondria:** numerous in young cells and reduced in mature cells	**Golgi & RER & mitochondria:** drastically reduced in number

รูปที่ 22 รูป TEM เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 1 (NS_1) ในปมประสาท cerebral (A,B) แสดงนิวเคลียสซึ่งประกอบด้วยแถบ heterochromatin (He) บาง ๆ ตามขอบเยื่อหุ้มนิวเคลียส และแถบบาง ๆ กระจายอยู่กลางนิวเคลียส นิวคลีโอลัส (No) มีลักษณะเด่นในไซโตปลาสซึมมี rough endoplasmic reticulum (rer) จำนวนมากและ Golgi complex (Gc) มีขนาดใหญ่ (C-E) แกรนูล (granules-gr) มีสองแบบคือ แกรนูลกลมขนาดใหญ่มีเนื้อทึบแสงอิเล็กตรอนพอประมาณ (Gr_1) มีจำนวนน้อยและกระจายอยู่รอบ ๆ กอลจิคอมเพลก (B-D) และแกรนูลกลมขนาดเล็ก (Gr_2) ซึ่งกระจายอยู่ทั่วไซโตปลาสซึมของเซลล์ แต่มีจำนวนมากเป็นพิเศษรอบ ๆ ด้าน mature face ของกอลจิคอมเพลก (C-E)

รูปที่ 23 รูป TEM ของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่สอง (NS_2) ในปมประสาท cerebral แสดงนิวเคลียสที่มีก้อน heterochromatin (He) ค่อนข้างใหญ่และทึบกระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส มีลักษณะแบบหน้าปัทม์นาฬิกา (A,C) ในไซโตปลาสซึมมี rough endoplasmic reticulum และ mitochondria (Mt) จำนวนมาก Golgi complexes มีขนาดใหญ่ (A-D) แกรนูลมีแบบเดียว และมีลักษณะเป็นก้อนกลมหรือรูปหลายเหลี่ยม (Gr_1) ภายในมีเนื้อทึบแสงอิเล็กตรอนระดับต่าง ๆ กัน โดยมักจะมีผลึกเข้มขนาดต่าง ๆ (ลูกศร) ฝังตัวอยู่ภายใน (B,D) นอกจากนั้นบริเวณ Golgi complexes มักมี condensing vesicles (Cv) ขนาดเล็กกระจายอยู่รอบ ๆ

รูปที่ 24 รูป TEM ของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 3 (NS_3) ในปมประสาท cerebral แสดงนิวเคลียสซึ่งมี heterochromatin (He) ที่มีลักษณะเป็นแถบหนาและยาวต่อเนื่องกัน กระจายอยู่ตามขอบและบริเวณส่วนในของนิวเคลียส (C,E) เซลล์ชนิดนี้อาจจะมี 2 ชั้น คือ เซลล์ที่ยังมีแกรนูลจำนวนน้อยและออแกนเนลจำนวนมาก ได้แก่ rough endoplasmic reticulum (rer) ไมโตคอนเดรียและ Golgi complexes (A,C) กับเซลล์ที่มีแกรนูลอยู่เต็มไซโตปลาสซึมและจำนวนออแกนเนลน้อยลง ในเซลล์กลุ่มแรก (A,C) แกรนูลมีขนาดใหญ่รูปกลมหรือหลายเหลี่ยม ภายในมีเนื้อทึบแสงอิเล็กตรอนพอประมาณ และมีผลึกเข้มเป็นแท่งหรือก้อนเล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป (Gr_1) (B,D) แกรนูลบางอันมีเนื้อโปร่งแสงทำให้เห็นผลึกชัดขึ้น (Gr_2) (A,D) ในเซลล์กลุ่มที่สอง แกรนูลมีขนาดใหญ่มากคล้ายกับเกิดจากการรวมตัวของแกรนูลที่พบในเซลล์กลุ่มที่ 1 แกรนูลเหล่านี้อัดกันแน่นอยู่ในไซโตปลาสซึม (E) โดยผลึกดำเข้มรวมตัวกันเป็นก้อนขนาดต่าง ๆ ที่มีความทึบแสงอิเล็กตรอนมาก ในขณะที่เนื้อที่เหลือของแกรนูลค่อนข้างใส (E,F)

Figure 22

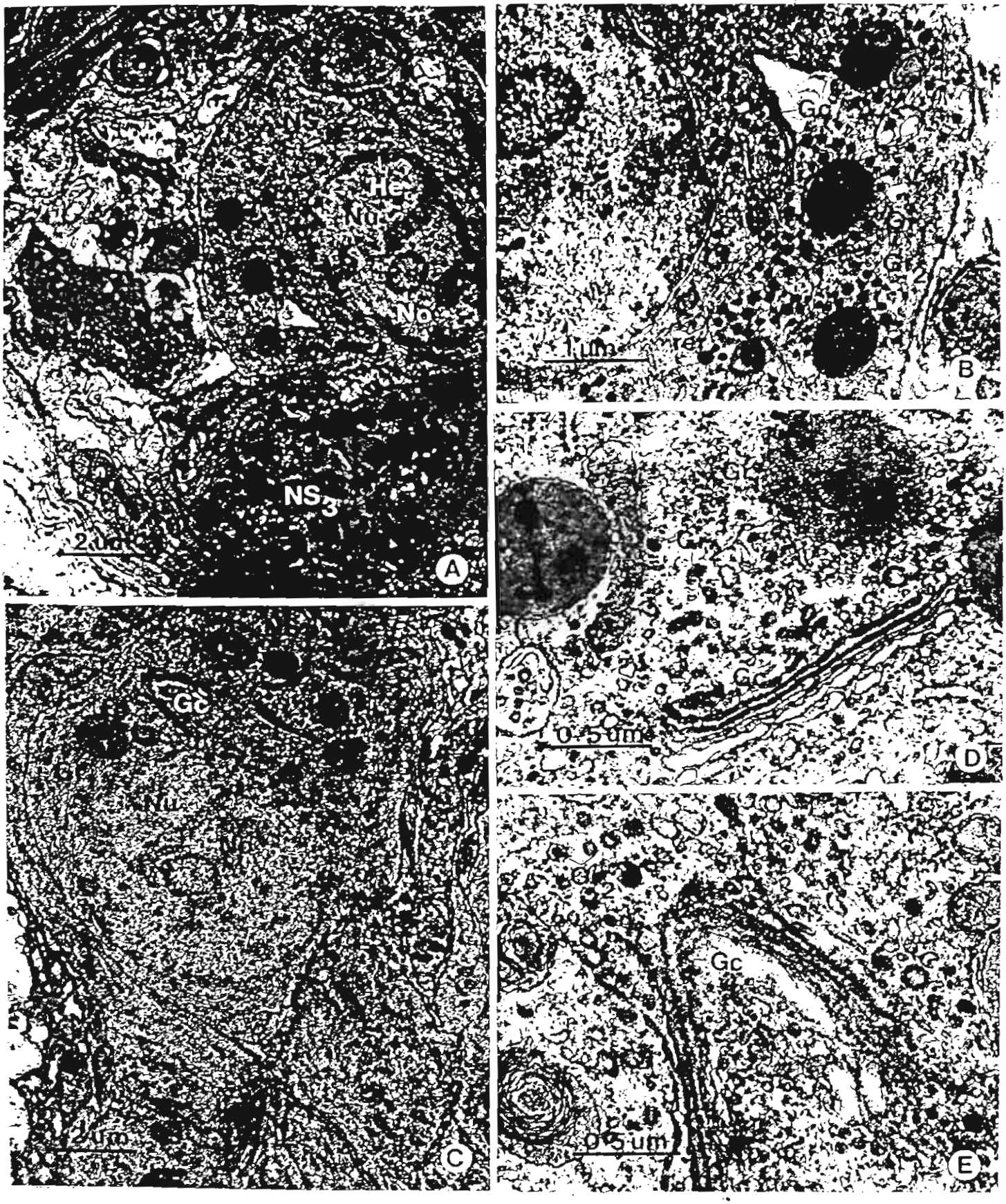


Figure 23

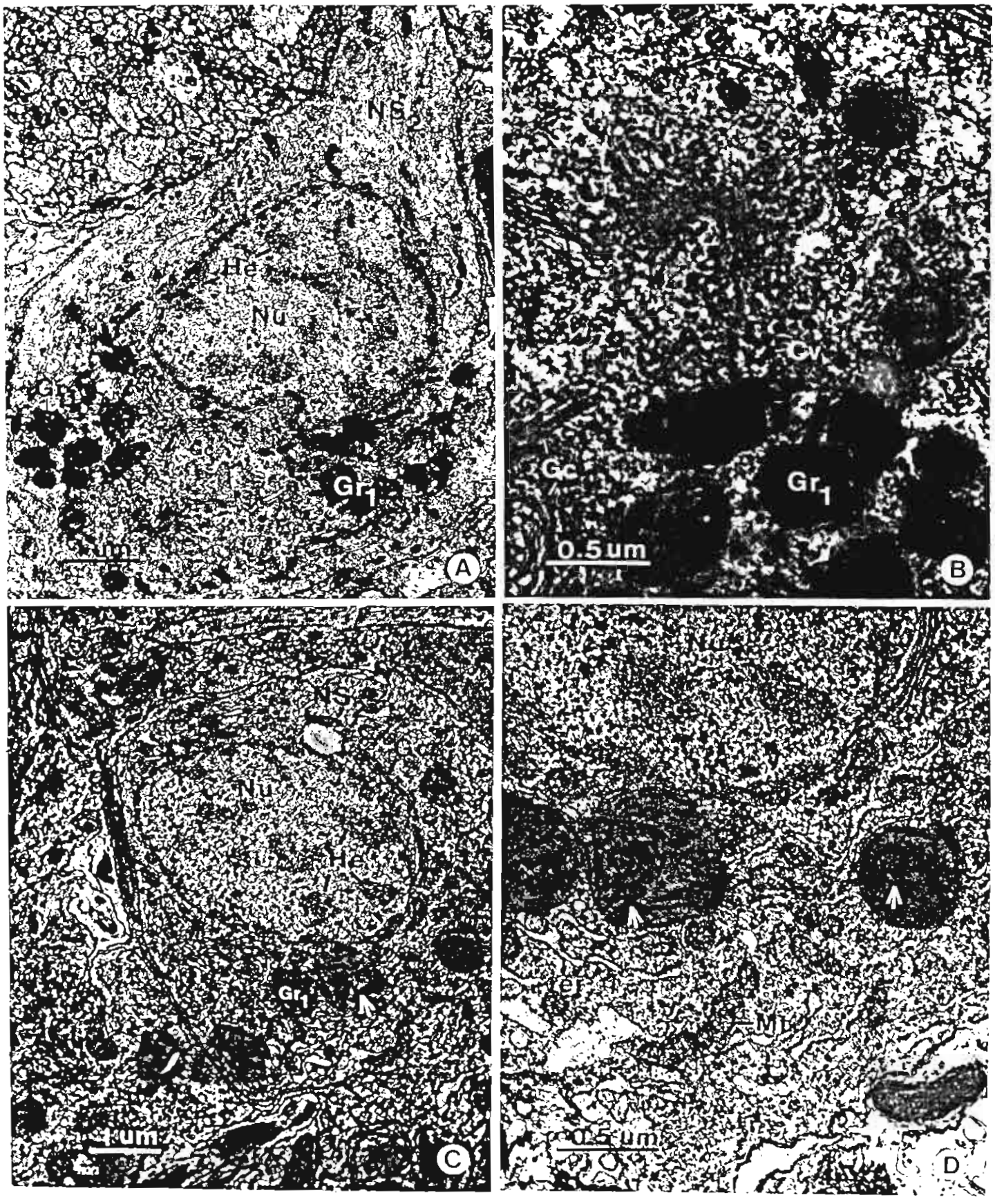
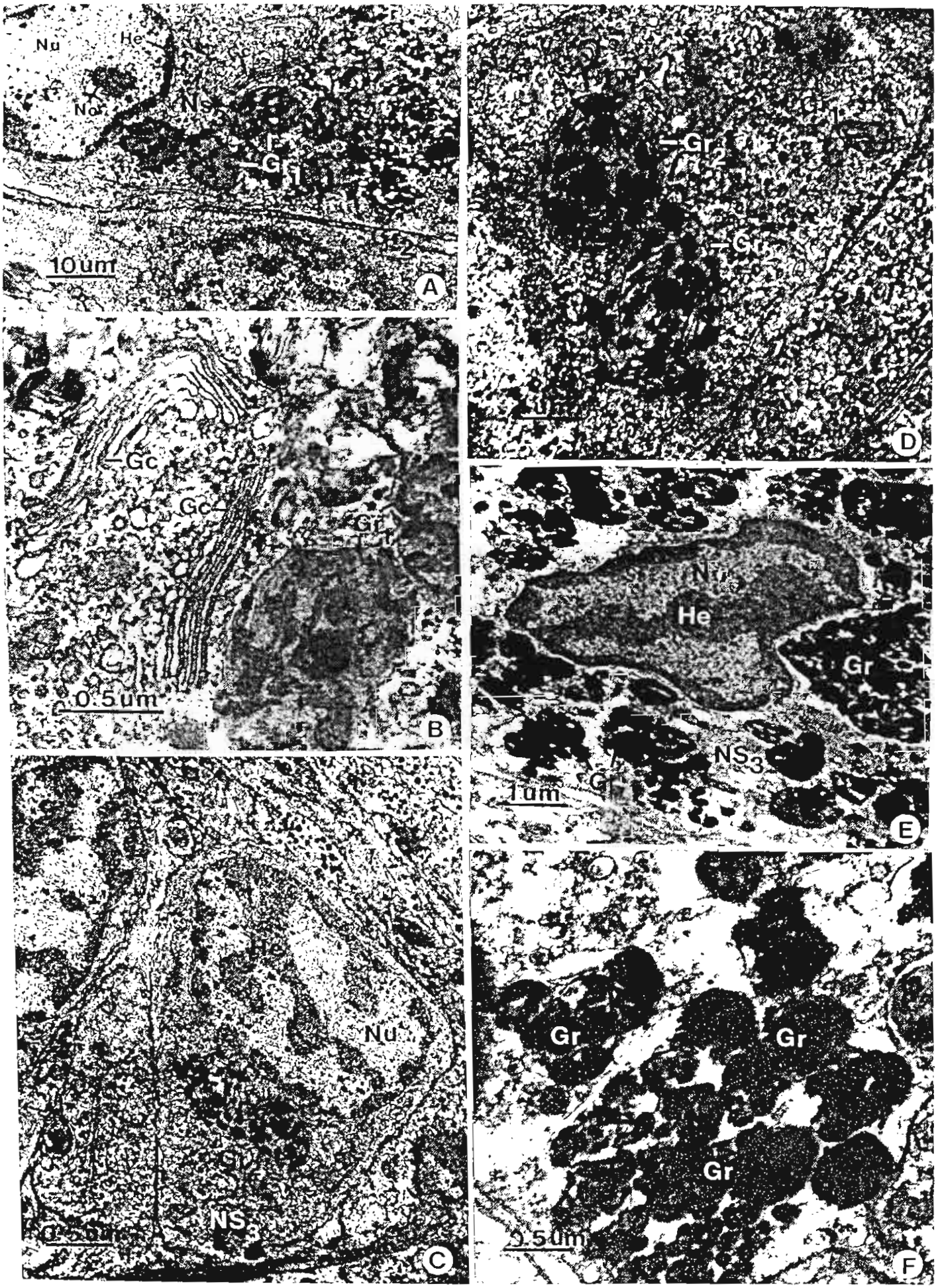


Figure 24


Nu
He
Nu
Ns
Gr1
10um
A
Gr2
Gr1
D
Gc
Gc
Gr
0.5um
B
Nu
He
Gr
NS3
1um
Gr
E
He
Nu
Gr
NS3
0.5um
C
Gr
Gr
Gr
0.5um
F

รูปที่ 25 ภาพ TEM แสดงเซลล์ประสาท (Neurons-NR_1, NR_2) ในปมประสาท cerebral เซลล์ NR_1 (A) เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่สุด แสดงนิวเคลียสที่มี euchromatin เกือบทั่วทั้งนิวเคลียส ไซโตปลาสซึมไม่มีแกรนูลแต่มีออแกนเนล โดยเฉพาะ rough endoplasmic reticulum (rer) และไมโตคอนเดรียอยู่หนาแน่นมาก เซลล์ประสาทชนิดที่ 2 (NR_2) (B,C) เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสรูปไข่ มี heterochromatin ปรากฏเป็นแถบทึบที่ติดต่อกันกระจายอยู่ทั่วทั้งเซลล์ ไซโตปลาสซึมมีปริมาณน้อยอยู่รอบ ๆ เซลล์ประสาทชนิดที่ 3 (NR_3) (D) มีขนาดและรูปร่างคล้ายคลึงกับ NR_2 แต่แถบ heterochromatin หนาและเข้มขึ้น

รูปที่ 26 ภาพ TEM ของเซลล์ประสาทชนิดที่ 4 (NR_4) (A) เซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (Neuroglia) ชนิดที่ 1 (NG_1) (B) และชนิดที่ 2 (NG_2) (C,D) เซลล์ NR_4 เป็นเซลล์รูปไข่คล้าย NR_2 และ NR_3 แต่มีแถบ heterochromatin เด่นตามขอบของนิวเคลียส ภายในนิวเคลียสค่อนข้างโปร่งแสงอิเล็กตรอน (A) NG_1 (B) เป็นเซลล์ที่มีรูปรีหรือรูปกระสวย มีนิวเคลียสรูปร่างเช่นเดียวกัน ซึ่งมีโครมาตินหนาเกาะอยู่ตามขอบของนิวเคลียสและติดต่อกันทั่วทั้งส่วนในของนิวเคลียส NG_2 (C,D) เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างเรียวยาวมากกว่า NG_1 นิวเคลียสมี heterochromatin เป็นแถบหนาอยู่ตามขอบและตรงกลางนิวเคลียสโดยมีปริมาณมากกว่า NG_1 เซลล์ NG_2 เรียงเป็นแนวติดกับแนวถุงหุ้ม (capsule-Cp) ของปมประสาท cerebral

รูปที่ 27 ภาพ TEM ของ neuropil ในชั้น medulla แสดงกิ่งประสาท axon หรือ dendrite 4 แบบ คือ แบบที่ 1 มีเนื้อในใส แบบที่ 2 เนื้อในกิ่งประสาทมีแกรนูลกลมขนาดปานกลาง ซึ่งมีเนื้อทึบแสงอิเล็กตรอน แบบที่ 3 กิ่งประสาทมีแกรนูลขนาดเดียวกับแบบที่สอง แต่มีเนื้อโปร่งแสงอิเล็กตรอน แบบที่ 4 เป็นกิ่งประสาทที่มีแกรนูลขนาดเล็กติดสีดำเข้มทึบแสงอิเล็กตรอนกระจายอยู่ทั่วไป

Figure 25

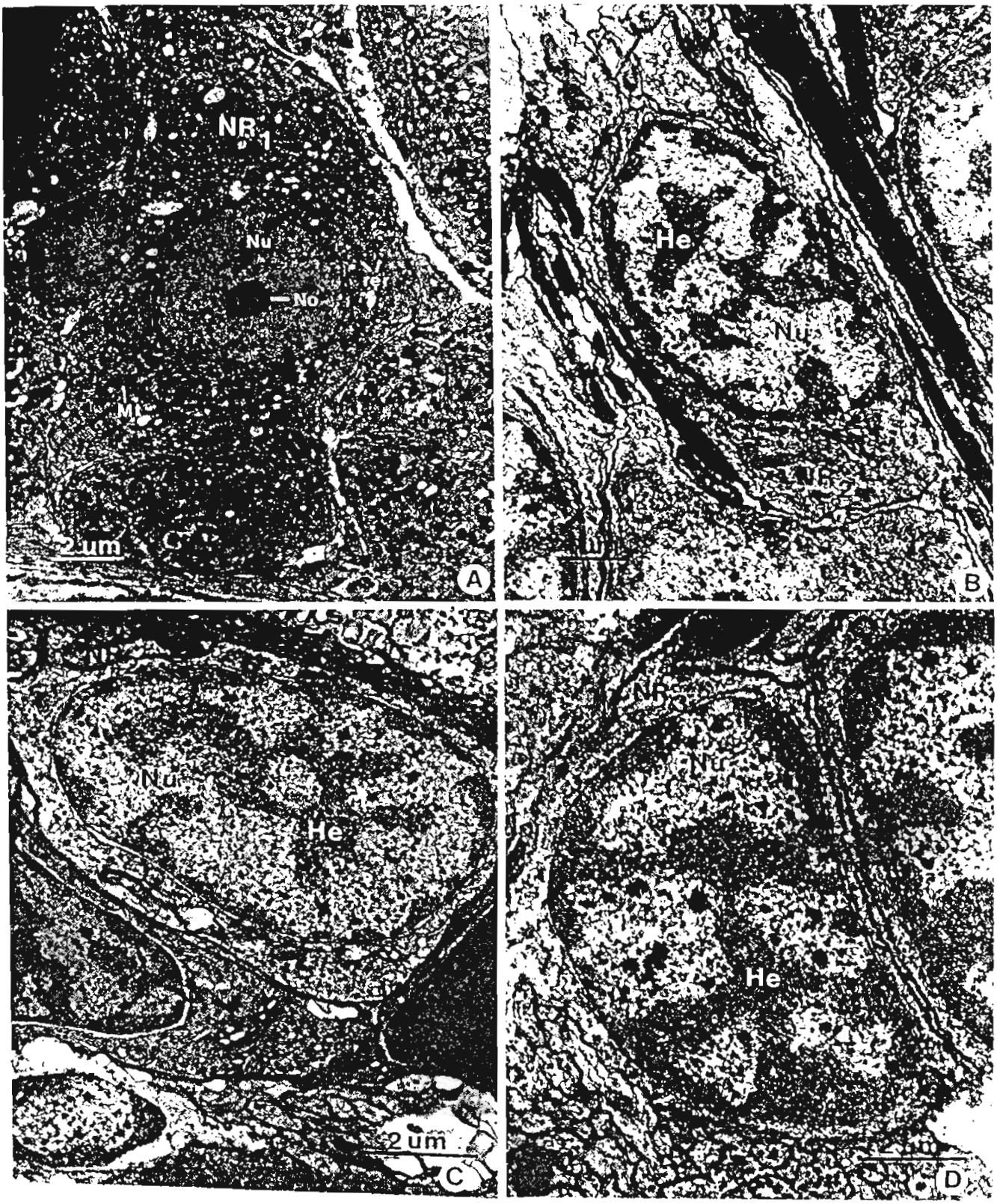


Figure 26

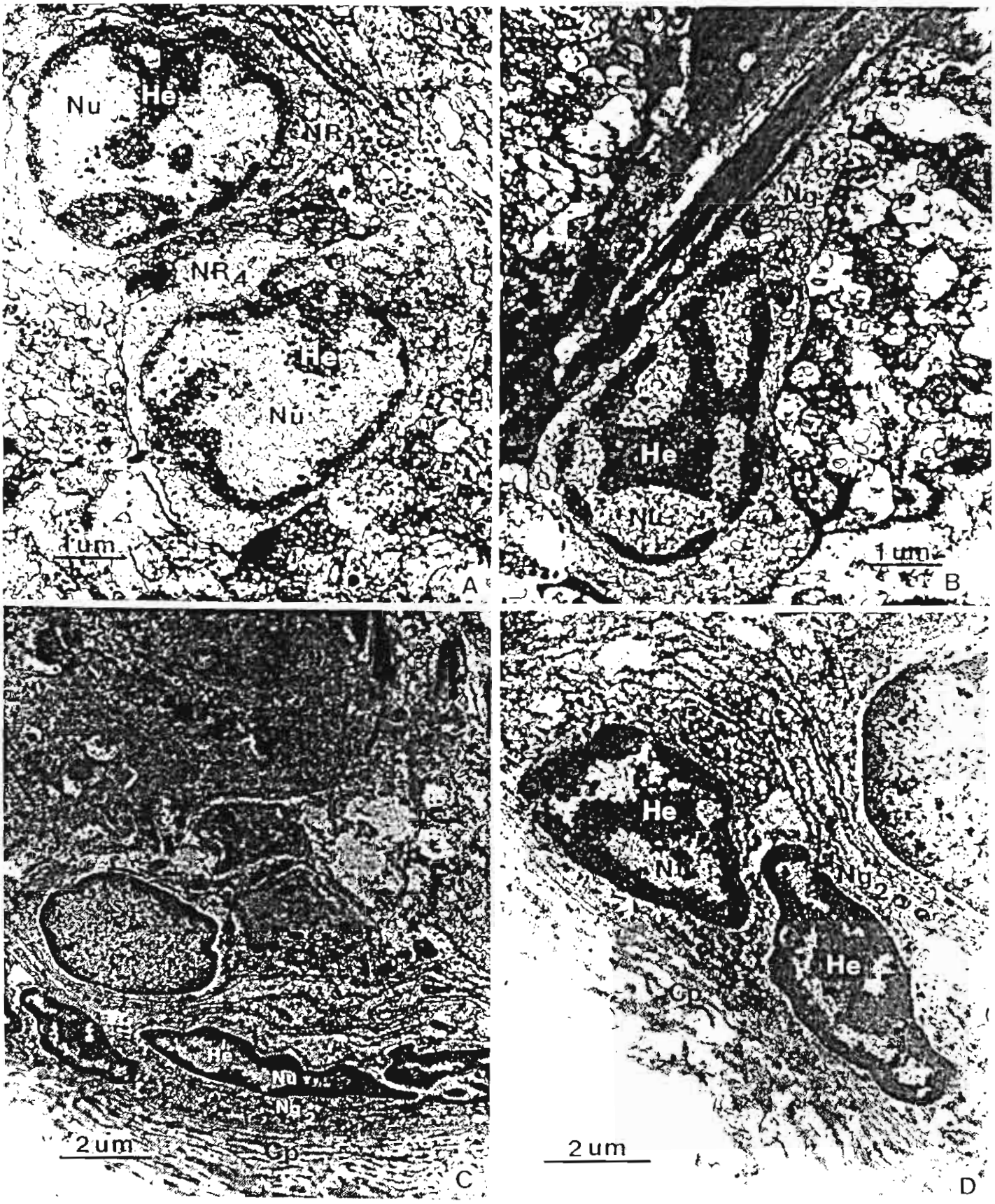
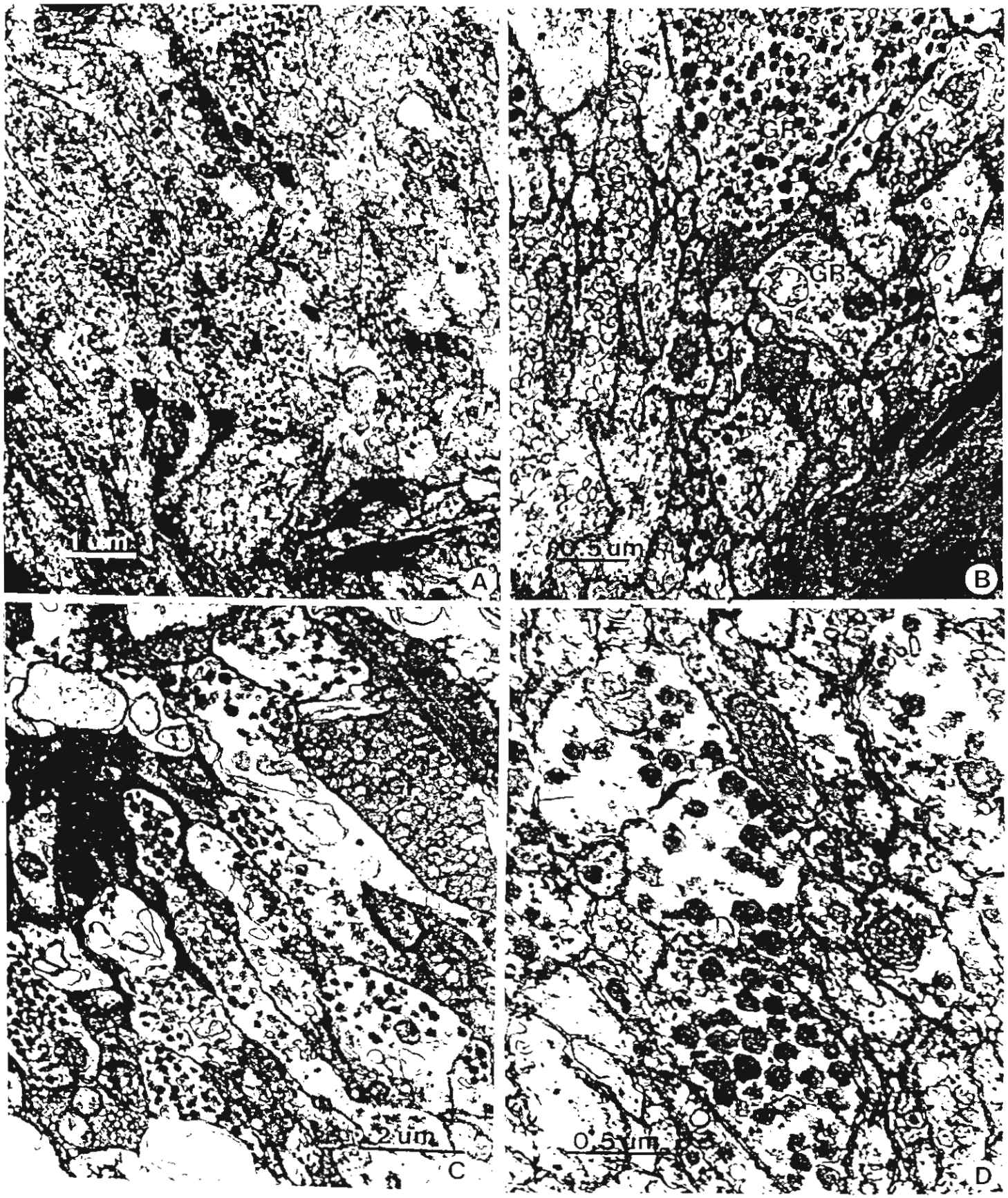


Figure 27



รูปที่ 28 ภาพ TEM ของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่1 (NS_1) ในปมประสาท pleuropedal เซลล์ NS_1 แสดงนิวเคลียสที่มีก้อน heterochromatin (He) บาง ๆ กระจายอยู่ตามขอบและภายในนิวเคลียส นิวคลีโอลัส (No) เด่น (A,B) ในไซโตปลาสซึมมี rough endoplasmic reticulum (rer) และไมโตคอนเดรียอยู่หนาแน่น และ Golgi complexes (Gc) พัฒนาเต็มที่ โดยมีแกรนูล (Gr) รูปร่างกลมขนาดเล็ก เนื้อทึบแสงอิเล็กตรอน รวมกลุ่มอยู่ทางด้าน mature face ของ Golgi complexes และกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตปลาสซึม (B-D)

รูปที่ 29 ภาพ TEM ของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 2 (NS_2) ในปมประสาท pleuropedal เซลล์ NS_2 แสดงนิวเคลียสที่มีก้อน heterochromatin ค่อนข้างกลม กระจายอยู่ทั่วไปภายในนิวเคลียส ทำให้มีลักษณะคล้ายหน้าปัทม์นาฬิกา (A,D) ภายในไซโตปลาสซึมมีแกรนูลอยู่ในปริมาณต่าง ๆ กัน ตั้งแต่เซลล์ที่มีแกรนูลจำนวนประปรายในบริเวณ Golgi complexes (A-C) จนถึงเซลล์ที่มีแกรนูลแน่นไซโตปลาสซึม (D) แกรนูลมีรูปร่างกลมขนาดใหญ่กว่าแกรนูลที่พบใน NS_1 ประมาณ 21 เท่า แต่มีความทึบของเนื้อในน้อยกว่า (E) ออแกนเนล ได้แก่ rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes และไมโตคอนเดรีย มีอยู่อย่างหนาแน่นในเซลล์แบบแรก (A-C) ส่วนในเซลล์แบบที่สองออแกนเนลมีจำนวนลดลงมาก เนื่องจากถูกแทนที่โดยแกรนูล (D,E)

รูปที่ 30 ภาพ TEM ของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดที่ 3 (NS_3) ซึ่งมีสองแบบเช่นเดียวกับ NS_3 ที่พบในปมประสาท cerebral คือ แบบที่หนึ่ง มีแกรนูลน้อย (A,B) ส่วนแบบที่สองมีแกรนูลจำนวนมากอัดแน่นอยู่ในไซโตปลาสซึม (C,D) เซลล์ NS_3 ทั้งสองแบบมีลักษณะและโครงสร้างละเอียดเช่นเดียวกับเซลล์ NS_3 ที่พบในปมประสาท cerebral

รูปที่ 31 ภาพ TEM ของเซลล์ประสาท (neuron) 3 ชนิดคือ NR_2 (A), NR_3 (B,C) และ NR_4 (D) ซึ่งมีรูปร่าง ขนาด และลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์ NR_2, NR_3 และ NR_4 ที่พบในปมประสาท cerebral ในรูป D ยังมีเซลล์ NS_1 ที่ยังไม่พัฒนาอยู่หนึ่งเซลล์

รูปที่ 32 ภาพ TEM ของเซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (neuroglia-NG_1 และ NG_3) ของปมประสาท pleuropedal เซลล์ NG_1 (A) มีรูปรีหรือแหลมไปทางด้านใดด้านหนึ่ง heterochromatin เป็นแถบหนาตามขอบของนิวเคลียส และตรงกลางนิวเคลียสมีก้อนหรือแถบ heterochromatin ขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วไป (A) เซลล์ NG_3 (B) มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ NG_2 ที่พบในปมประสาท cerebral แต่เซลล์เหล่านี้แทรกอยู่ระหว่างกิ่งประสาทใน neuropil กิ่งประสาท (C,D) ใน neuropil ของชั้น medulla มีชนิดและลักษณะคล้าย ๆ กับที่พบในปมประสาท cerebral

Figure 28

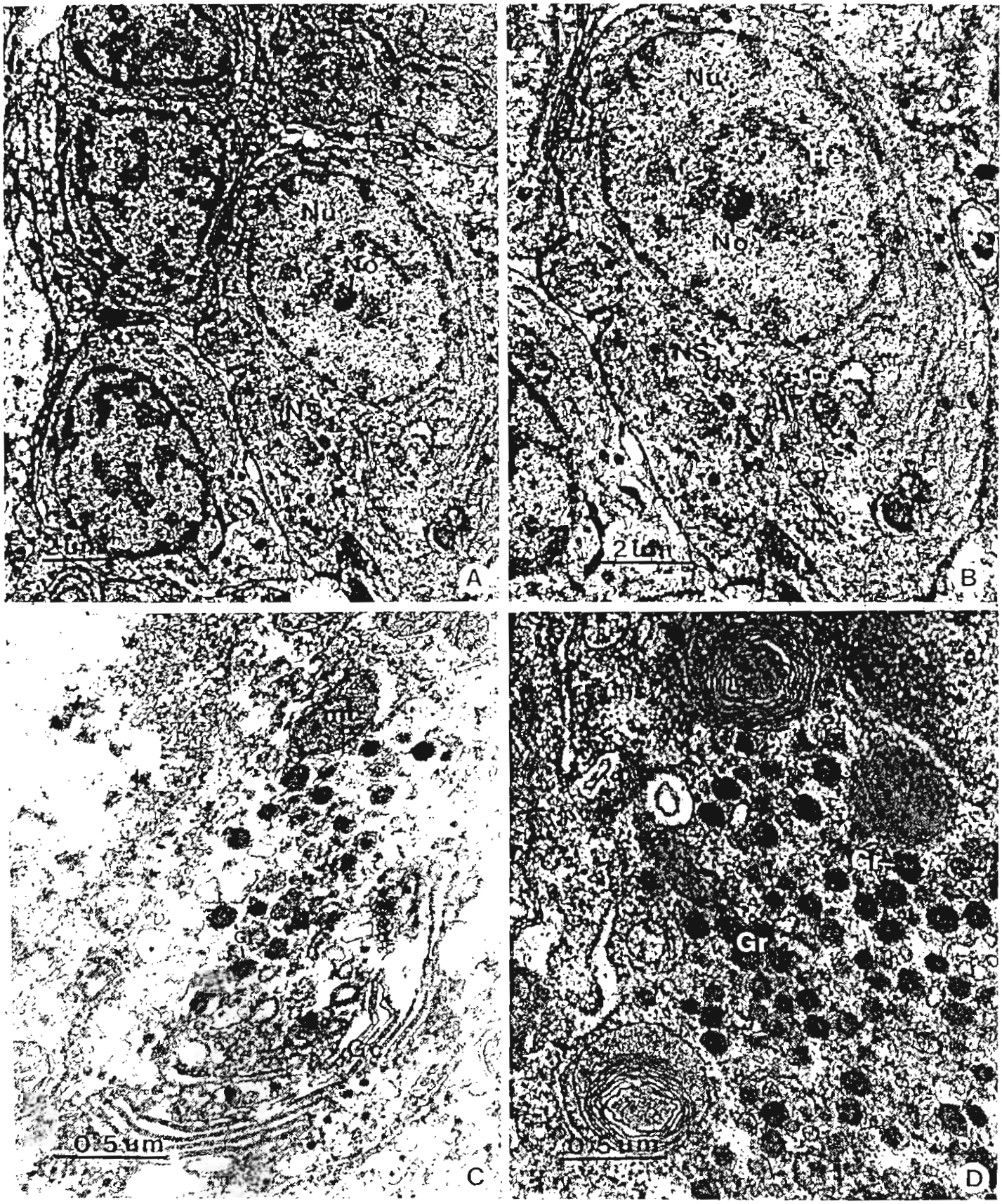


Figure 29

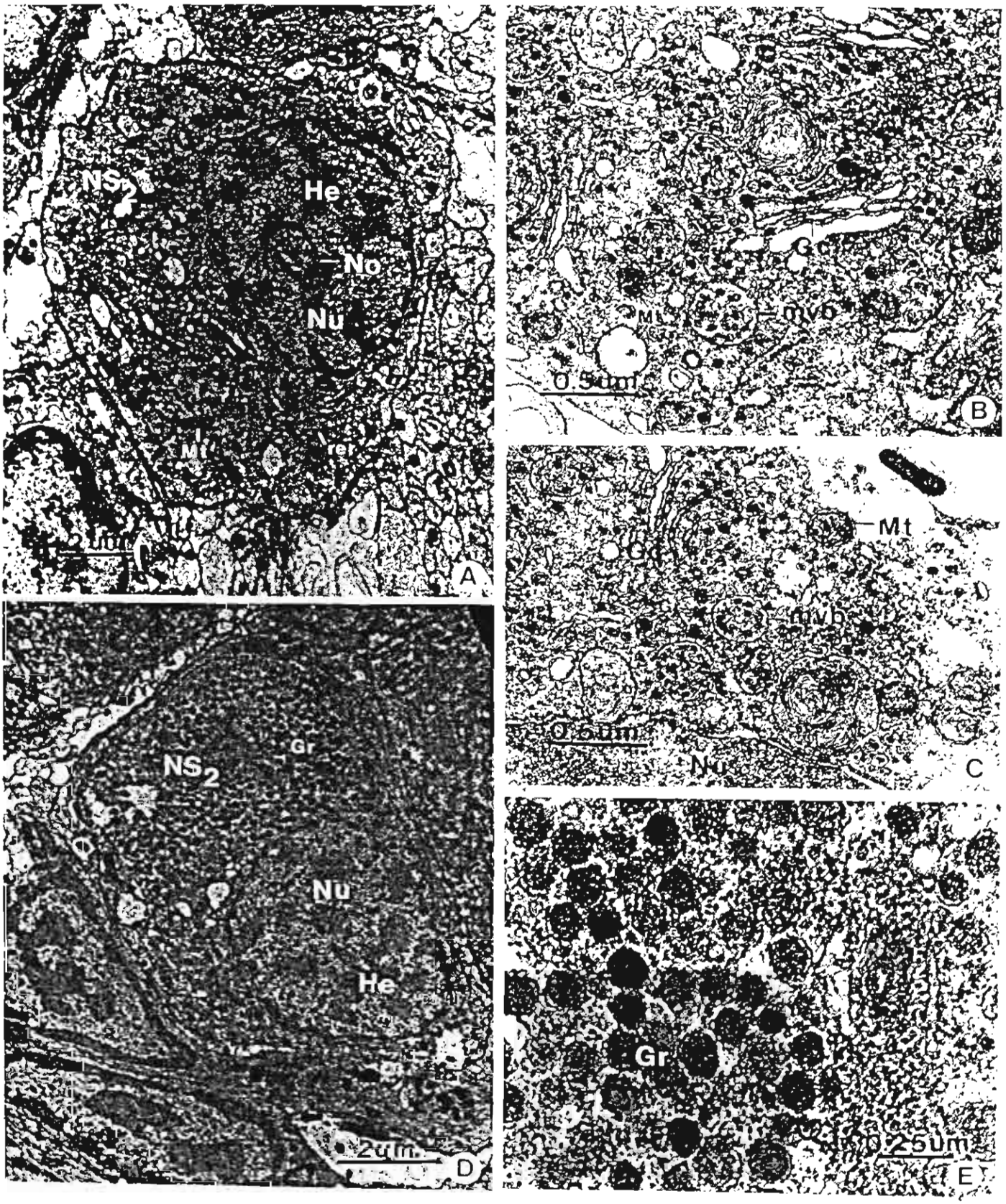

NS2
He
No
Nu
Mt
rer
1um
A
Gr
mvb
0.5um
B
Mt
Gr
mvb
0.5um
Nu
C
NS2
Gr
Nu
He
2um
D
Gr
0.25um
E

Figure 30

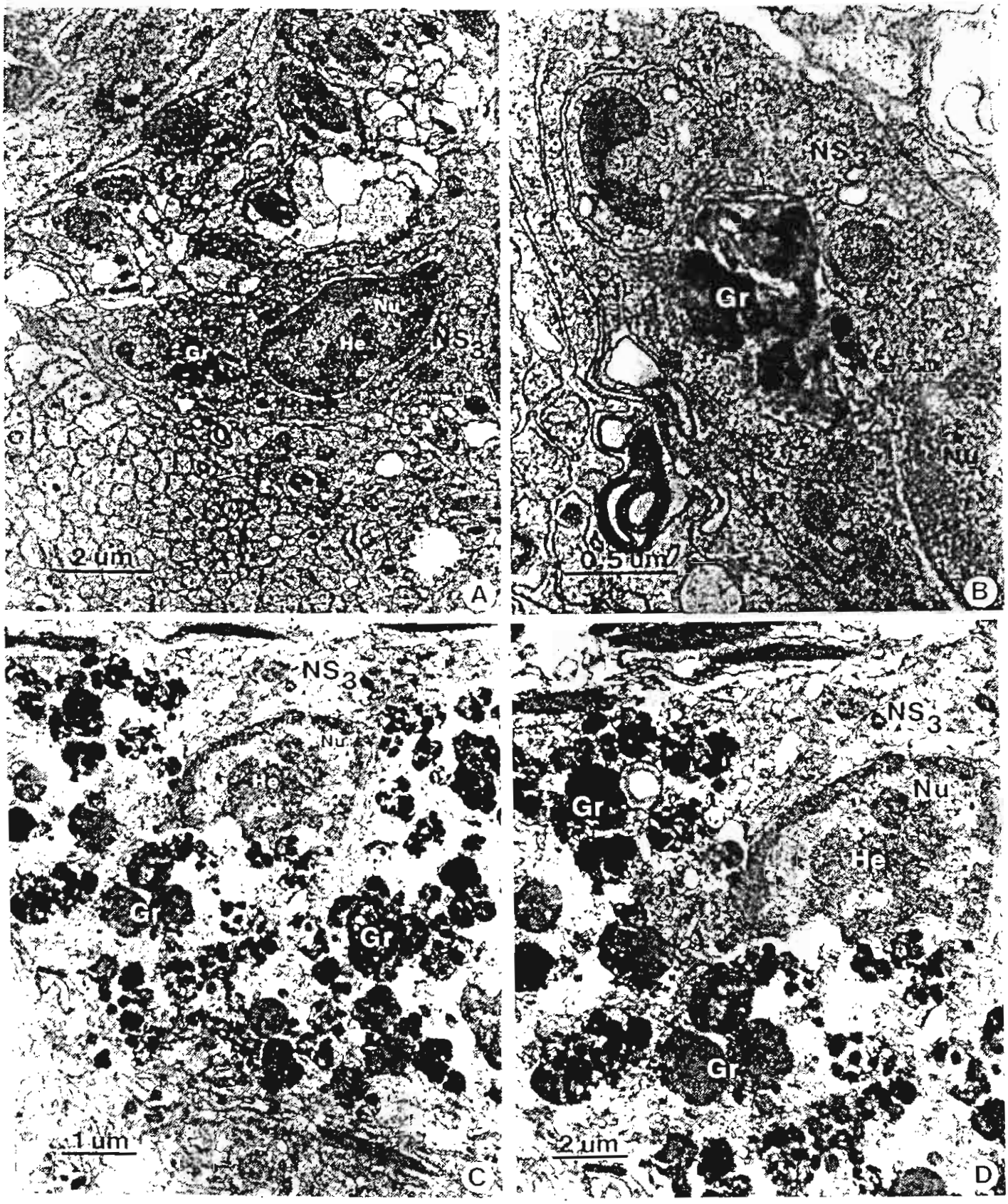

Nu
He
NS3
Gr
2 um
A
NS3
Gr
Nu
0.5 um
B
NS3
Nu
He
Gr
Gr
1 um
C
NS3
Nu
Gr
He
Gr
2 um
D

Figure 31

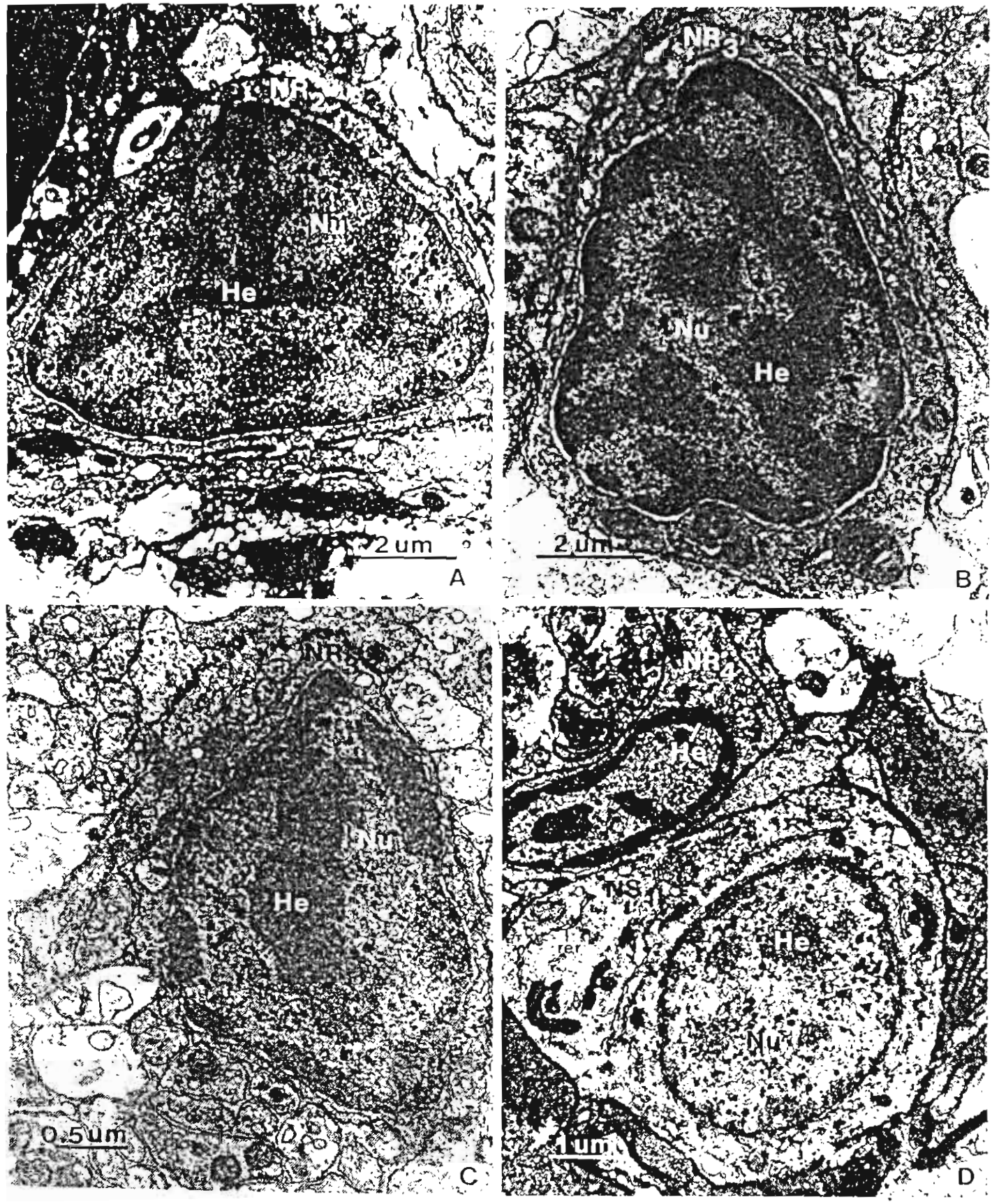
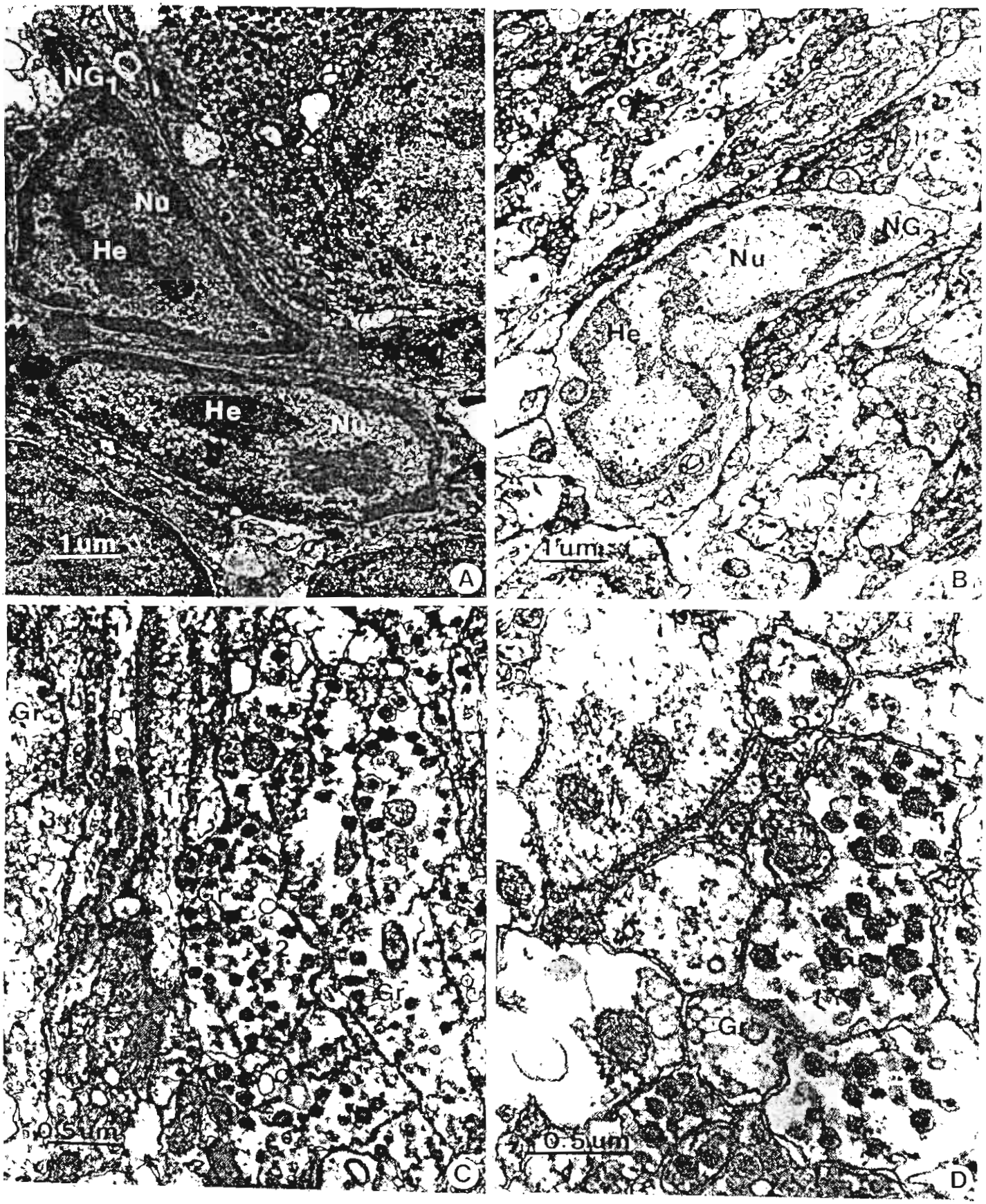

NR2
Nu
He
2 um
A
NR3
Nu
He
2 um
B
NR
Nu
He
0.5um
C
NR4
He
NS
rer
He
Nu
1 um
D

Figure 32



6.5 การศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโต (Growth-liked hormone) ฮอร์โมนคล้ายอินซูลิน (Insulin-liked hromone-ILH) ฮอร์โมนคล้าย FSH และ LH ในปมประสาท Cerebral และ Pleuropedal

GH-liked Hormone (GH)

เราได้ใช้กรรมวิธี immunohistochemistry แบบ immunoperoxidase โดยใช้ rabbit anti-human GH และ mouse anti-human insulin เป็น primary antibody probes ย้อมหาตำแหน่งของเซลล์ที่ผลิตฮอร์โมนที่คล้าย GH และโครงสร้างอื่นในปมประสาทที่มี GH อยู่ เนื่องจาก GH เป็นฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโตที่มีส่วนคงสภาพเดิม (conservative part) ในสัตว์ชนิดต่าง ๆ คล้ายกัน แอนติบอดีต่อฮอร์โมน GH ของสัตว์ชั้นสูงจึงสามารถทำปฏิกิริยาและเกาะกับ GH ของสัตว์ชั้นต่ำได้ เนื่องจากการเกิดปฏิกิริยาข้ามชนิด (cross-reaction) กับส่วน conservative part นี้ ดังนั้นจึงสามารถใช้แอนติบอดีดังกล่าวเป็น probes ในการศึกษาตำแหน่งการกระจายของฮอร์โมน GH ในหอยเป๋าฮื้อได้ทางอ้อม

จากการศึกษาด้วยวิธีดังกล่าว ปรากฏว่าพบ GH-liked hormone ในเซลล์ NS ของปมประสาท cerebral โดยเฉพาะกลุ่มเซลล์ที่กระจายอยู่บริเวณ cortex ส่วนบนและล่างของปมประสาท นอกจากนั้นแล้วยังมีสีน้ำตาลเข้มที่แสดงตำแหน่งของ GH อยู่ในมัดของเส้นประสาทที่อยู่บริเวณแกนของ medulla ซึ่งมัดประสาทดังกล่าวทอดไปตามความยาวของปมประสาท cerebral (รูปที่ 33A,B; 34A) เมื่อตรวจดูที่กำลังขยายสูง ปรากฏว่าเซลล์ NS ที่ติดสีน้ำตาลส่วนมากน่าจะเป็นเซลล์ประเภท NS_1 และ NS_3 (รูปที่ 33C,D; 34B-D) โดย NS_1 มีไซโตปลาสซึมที่ติดสีน้ำตาลพอประมาณ ส่วน NS_3 มีแกรนูลสีน้ำตาลขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน กระจุกตัวอยู่อย่างหนาแน่นทั่วทั้งไซโตปลาสซึม ในขณะที่เซลล์ NS_2 ติดสีจางมาก ส่วนสีน้ำตาลในมัดประสาทนั้นปรากฏอยู่ในกิ่งประสาท (axons) ส่วนเซลล์ประสาท NR ทุกชนิดนั้นไม่ติดสีเลย (รูปที่ 33C,D; 34A,C,D)

ในปมประสาท pleuropedal ไม่ปรากฏว่ามี GH-liked hormone อยู่ ทั้งในเซลล์และในมัดประสาทของ medulla

Insulin-liked Hormone (ILH)

ปรากฏว่าพบ ILH อยู่ในปมประสาท cerebral โดยมีการติดสีในเซลล์ NS ที่กระจายอยู่ทั่วทั้งปมประสาท ส่วนใยประสาทใน medulla ไม่ติดสีเลย (รูปที่ 35A-D) ปริมาณสีที่ติดในเซลล์ และจำนวนเซลล์ที่แสดงผลบวกมีน้อยกว่าในกรณีของ GH มาก เนื่องจากการติดสีไม่ค่อยชัดเจน จึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าเซลล์ NS ที่ติดสีน่าจะเป็นชนิดใด ส่วนในปมประสาท pleuropedal ไม่มีเซลล์และกิ่งประสาทที่ติดสีที่แสดง ILH อยู่เลย (รูปที่ 37A)

LH-liked Hormone (LH)

ในปมประสาท cerebral ไม่ปรากฏว่ามีสีติดซึ่งแสดงการกระจายของ LH.อยู่เลย (รูปที่ 36A) ส่วนในปมประสาท pleuropedal มีสีติดแต่ค่อนข้างจาง และเซลล์ที่ติดสีมีจำนวนน้อยและกระจายตัวมาก (รูปที่ 37B-D)

FSH-like Hormone (FSH)

ปรากฏว่าในปมประสาท cerebral มีสีติดชัดเจนในเซลล์ NS แต่ค่อนข้างน้อย (รูปที่ 36B,C) แต่สีติดค่อนข้างเข้มในปมประสาท pleuropedal (รูปที่ 38A-C) และสีที่ติดส่วนมากจะกระจายอยู่ในไซโตปลาสซึมของ NS เซลล์ ในรูปของแกรนูลที่เห็นได้ลาง ๆ (รูปที่ 36B-E; 38A-D)

ดังนั้น จึงอาจสรุปได้ว่าปมประสาท cerebral มีปริมาณ GH-liked hormone ค่อนข้างสูง ปริมาณ ILH ปานกลาง ปริมาณ FSH น้อย และไม่มี LH เลย ส่วนในปมประสาท pleuropedal มีปริมาณ FSH สูง ปริมาณ LH น้อย และไม่มี GH กับ ILH อยู่เลย

การเปรียบเทียบการติดสีที่ย้อมด้วยวิธี immunoperoxidase **ในเซลล์ NS ของปมประสาท** Cerebral

primary antibody probes	จำนวนเซลล์ NS ที่ติดสีและความเข้มของการติดสี	
	ปมประสาท cerebral	ปมประสาท pleuropedal
rabbit anti-human GH	+ + + +	0
mouse anti-human insulin	+ +	0
mouse anti-human FSH	+ +	+ +
mouse anti-human LH	0	+

เนื่องจากการติดสีที่แสดง ILH, FSH และ LH-liked hormone ในปมประสาททั้งสองชนิดไม่เข้มมาก และจำนวนเซลล์ที่แสดงผลบวกก็มีจำนวนน้อย ซึ่งยังไม่สามารถจำแนกชนิดของเซลล์ที่ติดสีแต่ละชนิดได้ชัดเจน ส่วนในกรณีของ GH นั้นน่าจะเป็นเซลล์ NS_1 เป็นหลัก ส่วน NS_3 อาจจะเป็นขั้นที่เซลล์กำลังสลายตัว แต่ก็ยังมี GH products เหลืออยู่

การศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโต (GH-liked hormone) ฮอร์โมนคล้ายอินซูลิน (Insulin-liked hormone-ILH) ฮอร์โมนคล้าย FSH และ LH ในปมประสาท Visceral

เราได้ใช้กรรมวิธี immunohistochemistry แบบ immunoperoxidase โดยใช้ rabbit anti-human GH, mouse anti-human FSH และ LH กับ mouse anti-human insulin เป็น primary antibody probes ย้อมหาตำแหน่งของฮอร์โมนและเซลล์ที่อาจจะผลิตฮอร์โมนที่คล้ายกับฮอร์โมนดังกล่าวในปมประสาท visceral เช่นเดียวกับที่กระทำในปมประสาท cerebral และ pleuropedal พบว่าไม่มีเซลล์ที่แสดงผลบวกต่อ anti-GH และต่อ anti-insulin ในปมประสาท visceral อยู่เลย แต่มีเซลล์ที่แสดงผลบวกต่อ anti-FSH และ anti-LH อยู่บ้างซึ่งติดสีค่อนข้างจาง ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกันแล้ว การติดสีจาก anti-LH ดูเหมือนจะเข้มกว่า และเซลล์เหล่านี้ก็มีลักษณะเป็นเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell-NS) (รูปที่ 39, 40)

การทดลองนี้แสดงว่าปมประสาท visceral มีการผลิตฮอร์โมนที่คล้ายกับ human FSH และ LH ในปริมาณที่น้อย หรือฮอร์โมนดังกล่าวอาจจะมี epitope ที่เป็นส่วนอนุรักษ์ร่วมกับ human FSH และ LH น้อยจึงทำให้ติดสีจาง ปมประสาท visceral จึงน่าจะเป็นแหล่งผลิตฮอร์โมนคล้ายปมประสาท pleuropedal

รูปที่ 33 ภาพการย้อมแสดงการกระจายของฮอร์โมนคล้าย GH ในปมประสาท cerebral โดยใช้ rabbit anti-human GH เป็น primary antibody ตามกรรมวิธี immunoperoxidase (GH-rabbit antiGH-biotinylated-goat anti-rabbit IgG-avidin-biotinylated HRP) สีน้ำตาลเข้มกระจายอยู่ในมัดประสาท (Nt) กลาง medulla และในเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนชนิดต่าง ๆ (NS)

รูปที่ 34 ภาพการย้อมแสดงการกระจายของฮอร์โมน GH ในปมประสาท เช่นเดียวกับรูปที่ 33 แต่ sections ย้อมสี hematoxylin เป็น counterstain

รูปที่ 35 ภาพการแสดงการกระจายของฮอร์โมนคล้าย insulin โดยวิธี immunoperoxidase ในปมประสาท cerebral โดยใช้ mouse anti-human insulin เป็น primary antibody สีน้ำตาลอ่อนกระจายอยู่ในเซลล์ (NS) ตามขอบของชั้น cortex (Co) ใน medulla (Me) ไม่ติดสีเลย

รูปที่ 36 ภาพการแสดงการกระจายของฮอร์โมนคล้าย LH และ FSH โดยวิธี immunoperoxidase ในปมประสาท cerebral โดยการใช้ mouse anti-human LH และ FSH เป็น primary antibody ในภาพ A แสดง anti-LH ไม่เกาะติด sections และไม่เกิดสีเลย ในภาพ (B-E) แสดง anti-FSH มีการเกาะและทำให้ติดสีเข้มในกลุ่มเซลล์ตามขอบของ cortex (Co) ส่วนใน medulla ไม่มีการติดสีเลย

Figure 33

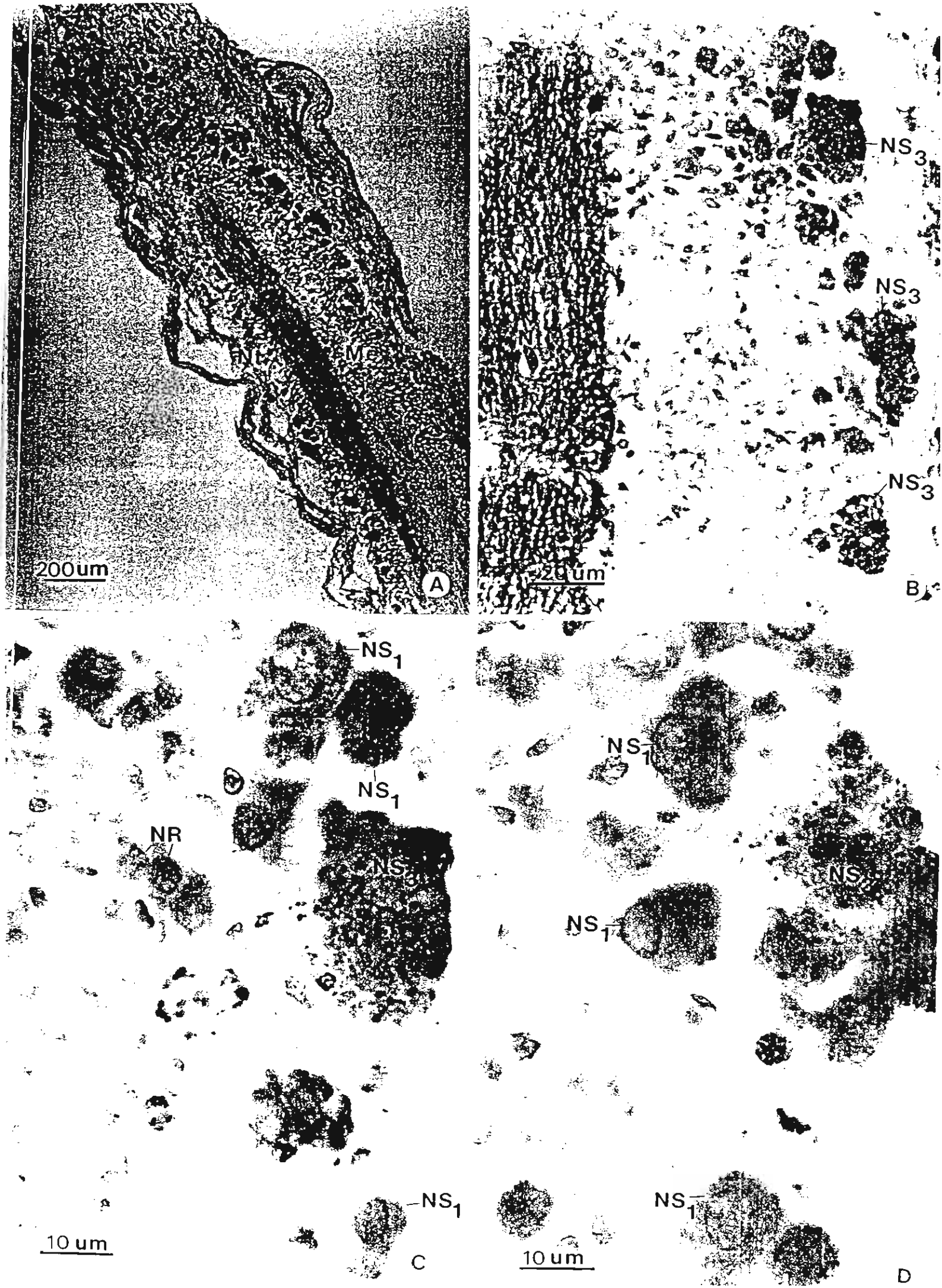
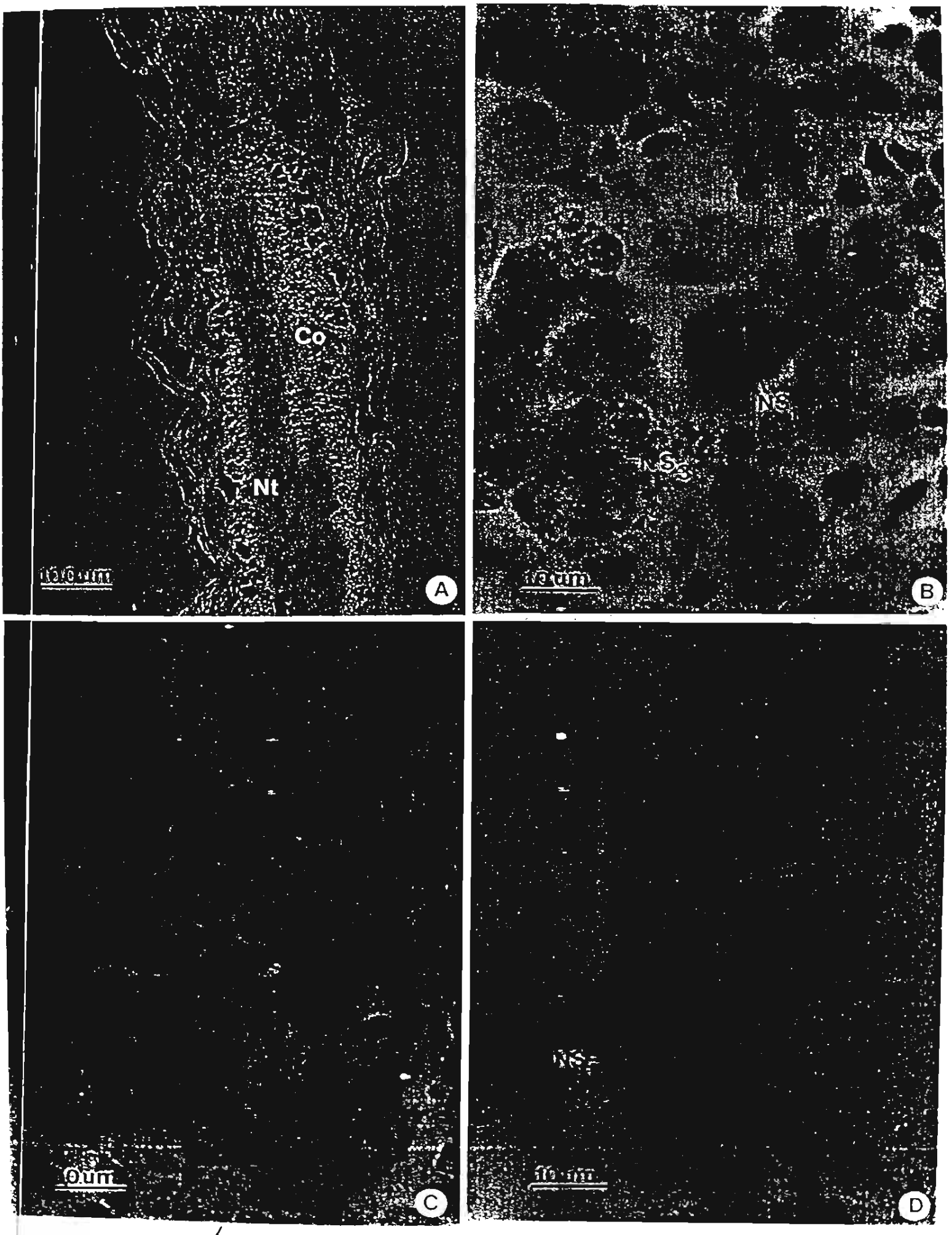


Figure 34



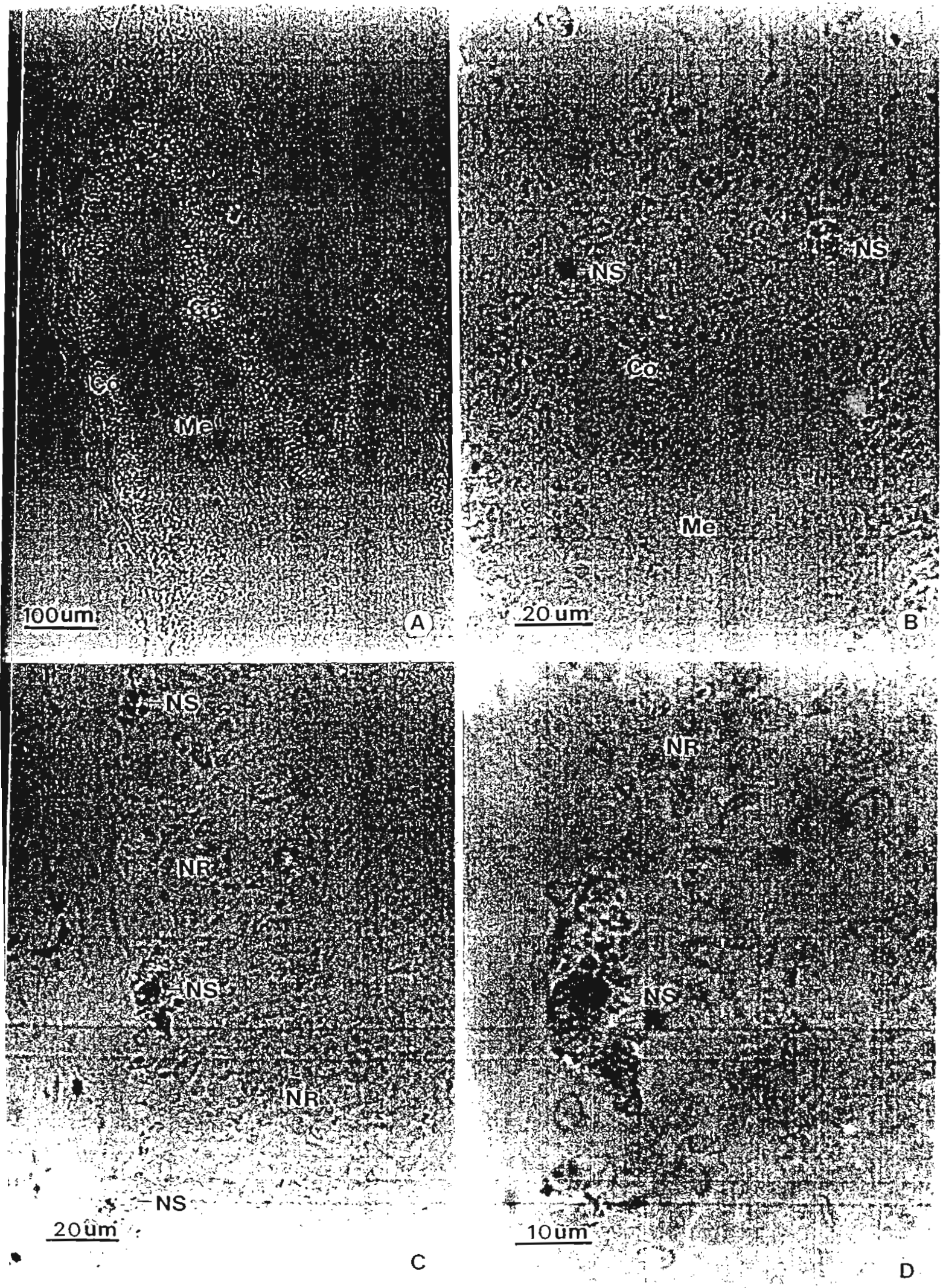
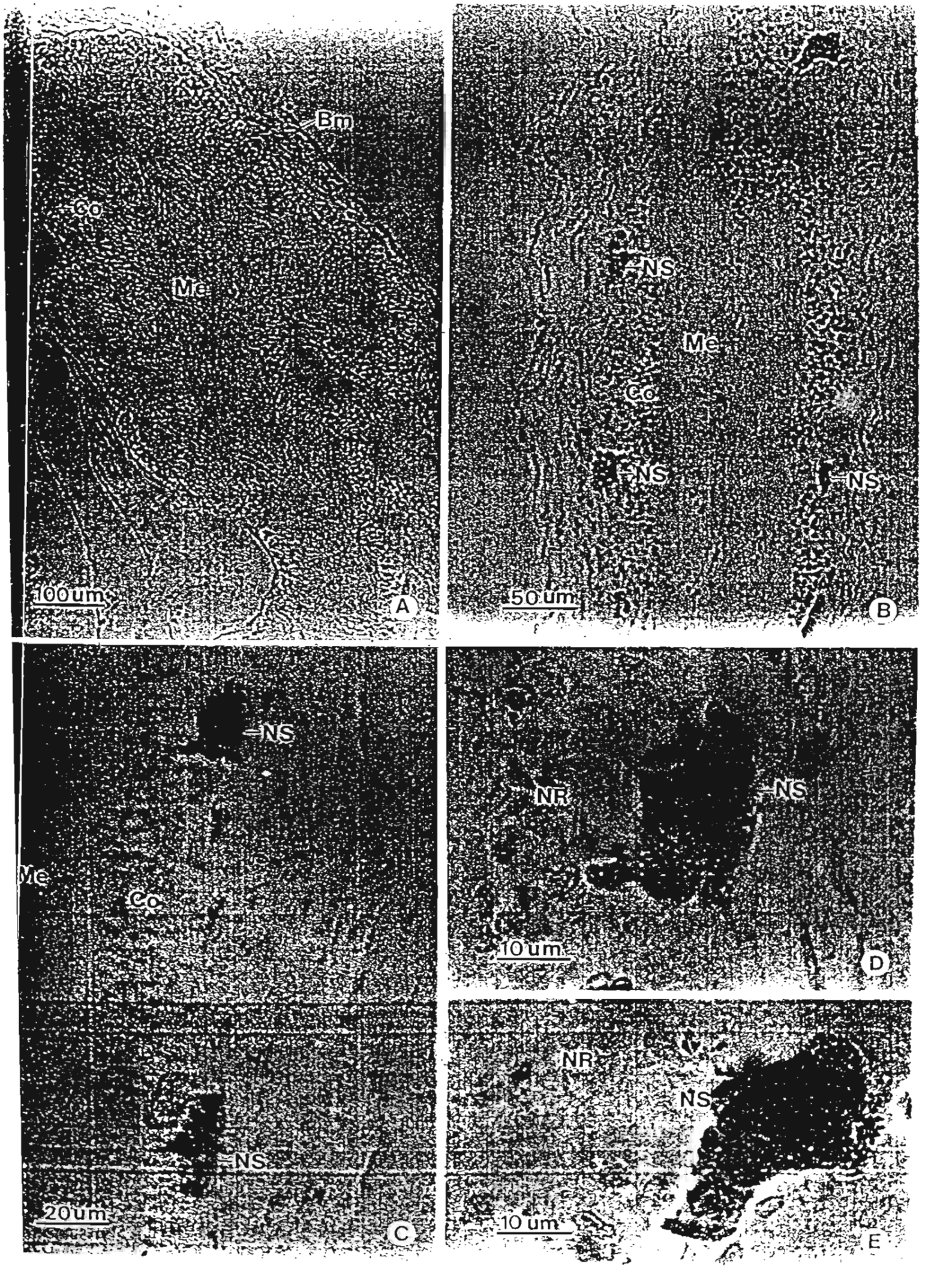

Co
Co
Me
100um
A
NS
NS
Co
Me
20 um
B
NS
NR
NS
NR
NS
20um
C
NR
NS
10um
D

Figure 36


Bm
Co
Me
100um
A
NS
Me
Co
NS
NS
50 um
B
NS
Me
Co
20um
C
NR
NS
10 um
D
NR
NS
10 um
E

รูปที่ 37 ภาพการย้อมโดยวิธี immunoperoxidase แสดงการกระจายของ anti-insulin (A) ในปมประสาท pleuropedal ซึ่งไม่มีการติดสีเลย ส่วนการย้อมด้วย anti-LH (B-D) ในปมประสาท pleuropedal มีสีติดจาง ๆ ในเซลล์บางเซลล์ของชั้น cortex (ลูกศร)

รูปที่ 38 ภาพการย้อมโดยวิธี immunoperoxidase แสดงการกระจายของฮอร์โมนคล้าย FSH ในปมประสาท pleuropedal ซึ่งแสดงมีการติดสีพอประมาณในกลุ่มเซลล์ของ cortex (ลูกศร) ส่วนในชั้น medulla ไม่ติดสีเลย

Figure 37

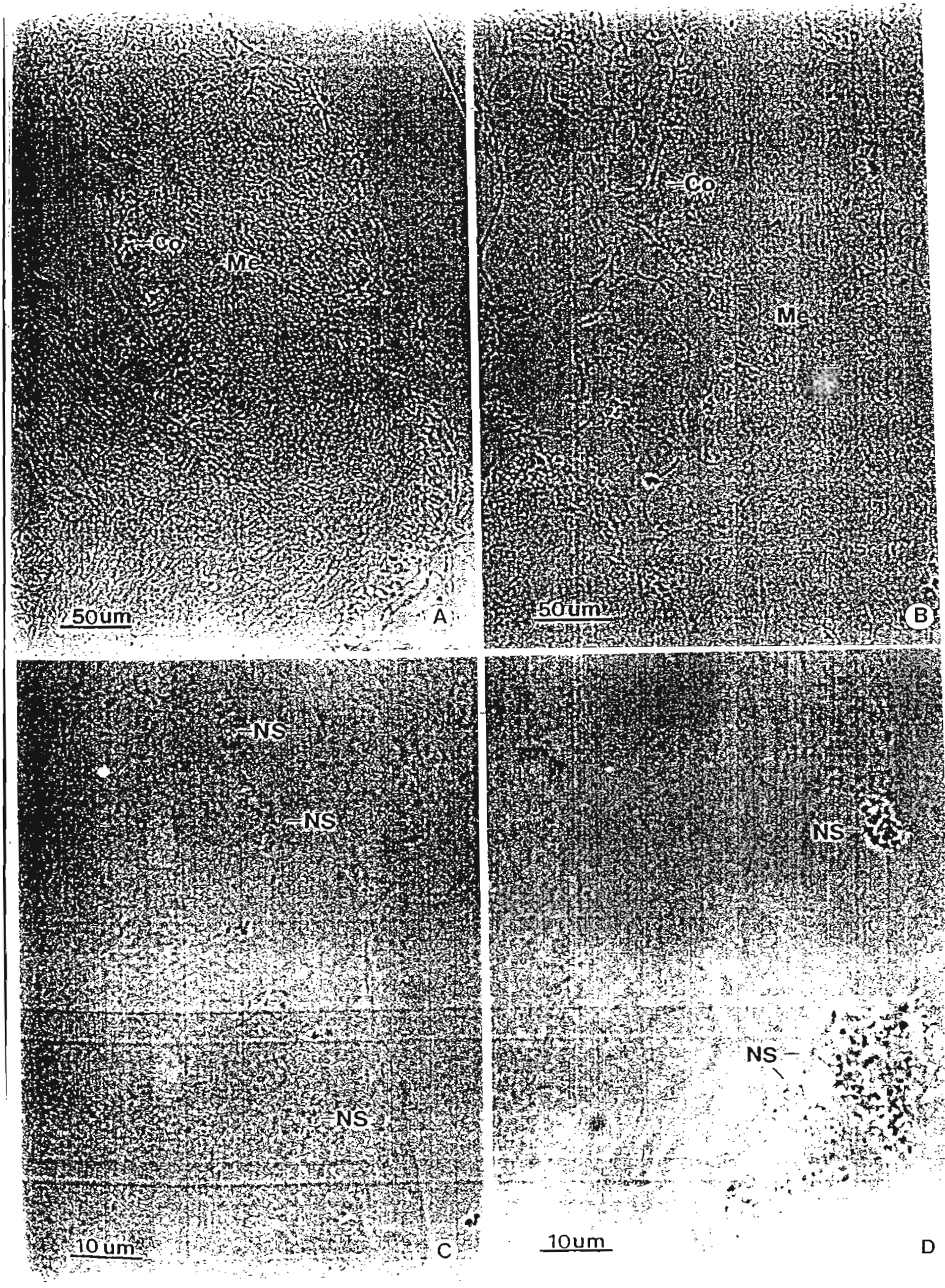
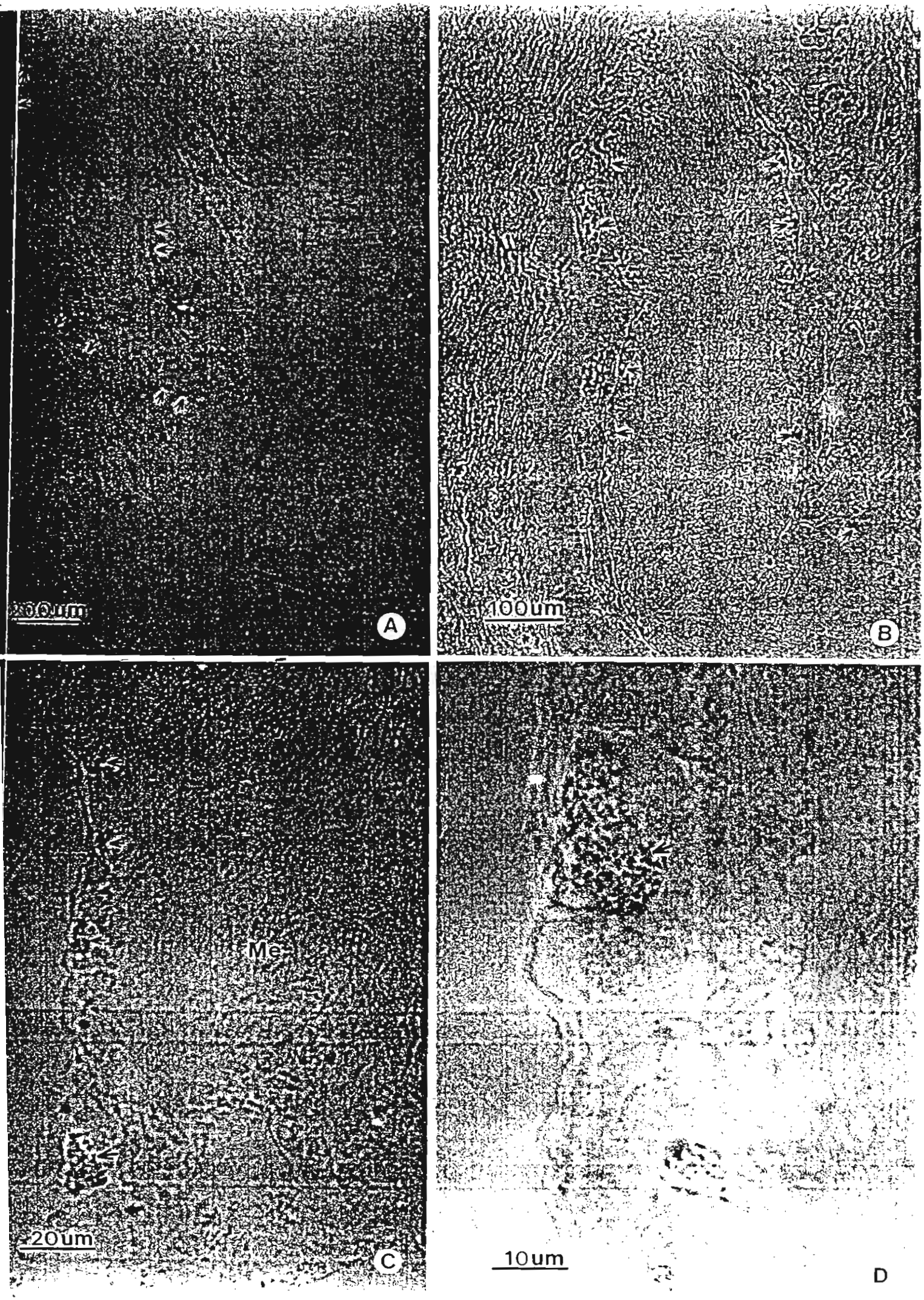


Figure 38



รูปที่ 39 Sections ของปมประสาท visceral ที่ย้อมด้วย rabbit anti-human GH (A) และ mouse anti-human insulin (B) ซึ่งไม่แสดงเซลล์ที่ติดสีเลย

รูปที่ 40 Sections ของปมประสาท visceral ที่ย้อมด้วย mouse anti-human LH (A) และ mouse anti-human FSH (B) แสดงการติดสีในเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (NS)

Figure 39

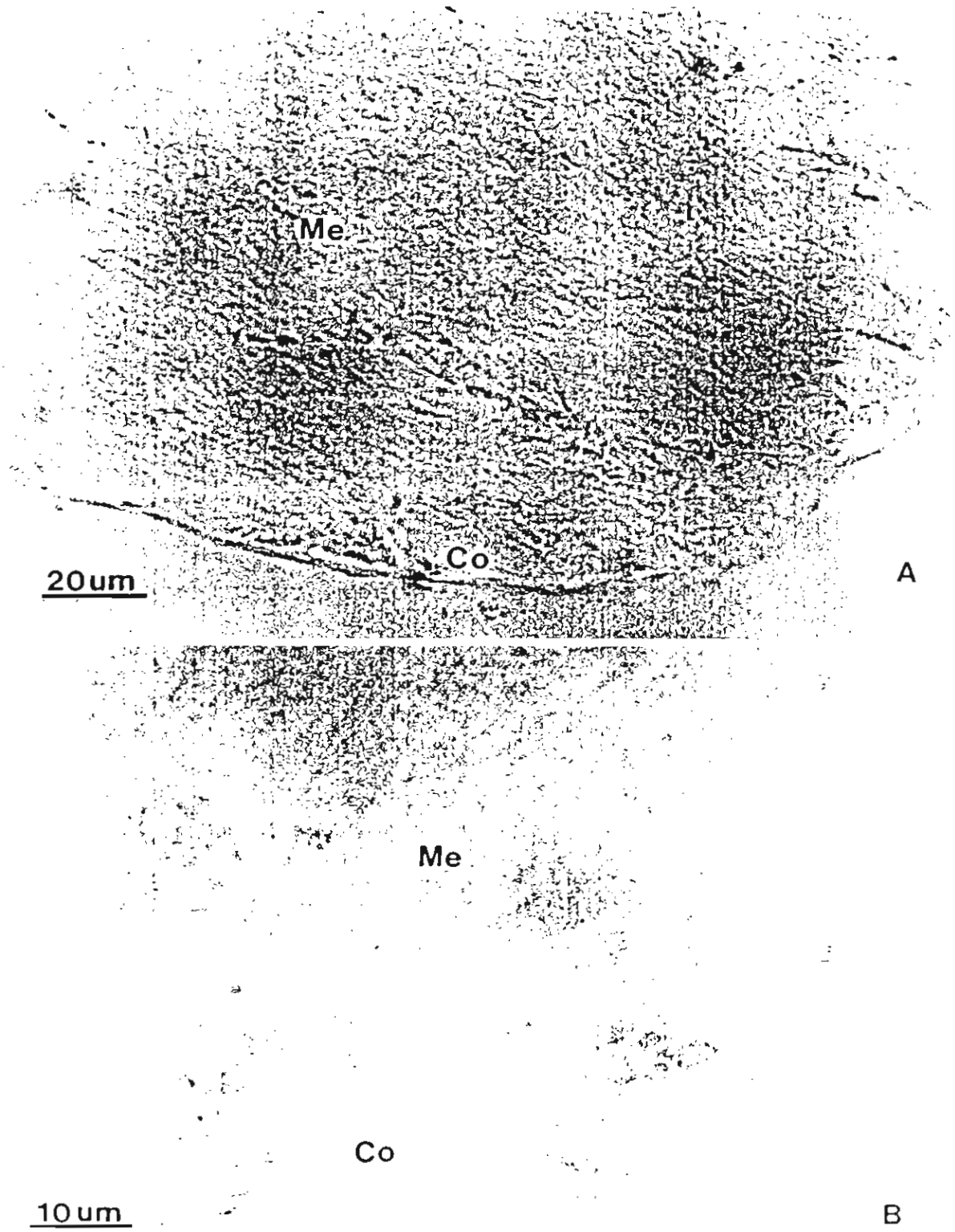
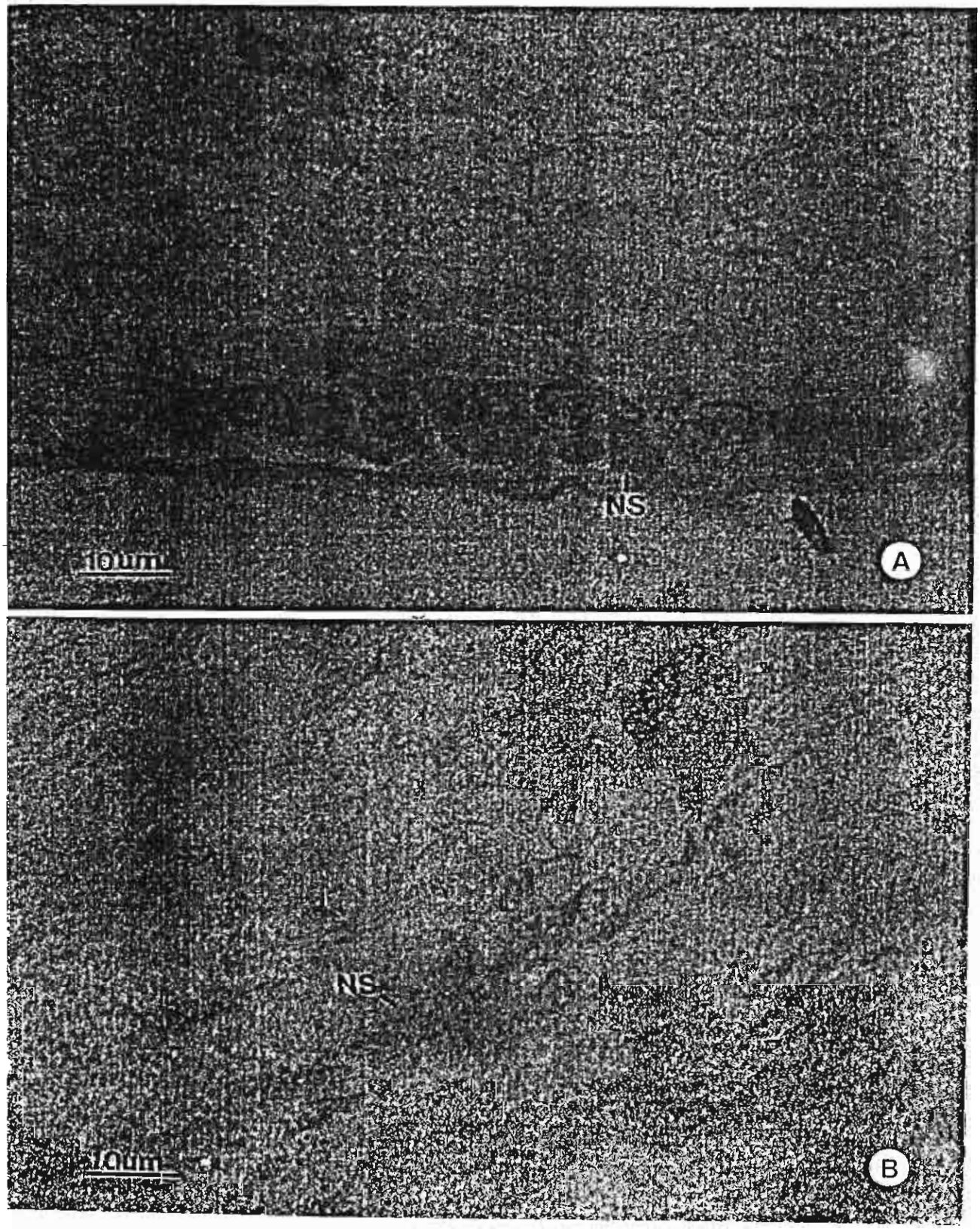


Figure 40



6.6 การศึกษาฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโต (GH-liked hormone) ในปมประสาท Cerebral ด้วยวิธี immunoblotting

เราได้ทำการศึกษาโดยผ่าเอาปมประสาท cerebral จากหอยเป๋าฮื้อตัวเต็มวัย บดให้ละเอียดใน PBS buffer แล้วนำไปวิเคราะห์แยกแถบโปรตีนโดยใช้ 10% SDS-PAGE จากนั้นนำ gel ที่ได้แผ่นหนึ่งไปย้อมด้วยสี Coomassie blue เพื่อวิเคราะห์หาแถบโปรตีนทั้งหมดที่สกัดได้จากปมประสาท cerebral และนำ gel อีกแผ่นหนึ่งไปตรวจสอบแถบโปรตีนที่อาจมีแอนติเจนซึ่งทำปฏิกริยากับ rabbit anti-human GH โดยวิธี immunoblotting โดยการย้ายแถบโปรตีนจาก gel ลงบนแผ่น nitrocellulose แล้วย้อมด้วย rabbit anti-human GH ตามด้วย biotinylated goat anti-rabbit IgG และ streptavidin-HRP จากนั้นแสดงแถบแอนติเจนที่มีผลบวกด้วยการย้อมด้วย 3, 3 diaminobenzidine (DAB) กับ H_2O_2 สำหรับแผ่น control ใช้ normal rabbit serum แทน primary antibody แล้วย้อมด้วย secondary antibody, streptavidin-HRP และ substrates

6.6.1 การวิเคราะห์แถบโปรตีนสกัดจากปมประสาท Cerebral บนแผ่น gel ที่ย้อมด้วยสี Coomassie Blue (รูปที่ 41A)

การวิเคราะห์การแยกแถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่สกัดได้จากปมประสาท cerebral ganglion ด้วยกรรมวิธี SDS-PAGE เป็นการแยกแถบโปรตีนตามขนาดน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) โดยมีการใช้แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานขนาดสูงและขนาดต่ำ (high and low molecular weight markers) เป็นแถบโปรตีนเปรียบเทียบ SDS-PAGE ถูกนำมาย้อมด้วยสี Coomassie blue เพื่อแสดงโปรตีนที่ติดเป็นแถบสีน้ำเงินในแผ่น gel (รูปที่ 41A) แถบโปรตีนต่าง ๆ ที่ถูกแยกตามน้ำหนักโมเลกุลจากปมประสาท cerebral ganglion ใน lanes 2, 3 และ 4 ซึ่งบรรจุโปรตีนจาก cerebral ganglia ในปริมาณต่าง ๆ กัน มีขนาดน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ โดยเปรียบเทียบกับแถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน มีจำนวนประมาณ 8 แถบ ซึ่งคงรวมทั้งโปรตีนที่เป็นฮอร์โมนและโปรตีนโครงสร้างอื่น ๆ เช่น จากเยื่อเกี่ยวพันของปมประสาท โดยวิธีนี้จึงยังไม่สามารถบอกได้ว่าแถบโปรตีนใดเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป๋าฮื้อ

6.6.2 การวิเคราะห์แถบโปรตีนที่เป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตในหอยเป๋าฮื้อโดยกรรมวิธี Immunoblotting (รูปที่ 41B,C)

แถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่าง ๆ กัน ถูกย้ายจาก SDS-PAGE ลงบนแผ่น nitrocellulose โดยวิธี electroblotting และถูกย้อมอย่างเฉพาะเจาะจงด้วย primary antibody คือ rabbit anti-human growth hormone ที่เจือจางในสัดส่วน 1:100 และ 1:500 ตามด้วย secondary antibody คือ biotinylated goat anti-rabbit IgG ที่เจือจางในสัดส่วน

1:500 จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose ไปย้อมด้วย HRP-streptavidin และ DAB substrates ตามลำดับ

แถบโปรตีนที่มี epitope ร่วมกับฮอร์โมน GH เท่านั้น ที่จะสามารถก่อให้เกิดปฏิกิริยาอย่างเฉพาะเจาะจงระหว่าง primary antibody และ secondary antibody โดยแสดงแถบสีน้ำตาลบนแผ่น nitrocellulose ใน lanes 3 และ 4 ของแผ่น nitrocellulose มีแถบสีน้ำตาลอย่างชัดเจนจำนวน 2 แถบ ซึ่งเป็นแถบโปรตีนที่น่าจะเป็นฮอร์โมนคล้ายกับ human GH ที่สกัดได้จากปมประสาท cerebral ganglion โดยมีน้ำหนักโมเลกุลปรากฏที่ระดับ 130 และ 95 kD (รูปที่ 41C)

การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปมประสาท cerebral ผลิตฮอร์โมนที่มีกลุ่ม epitopes คล้ายกับ human GH จากความเข้มข้นของสีที่ติดแถบโปรตีนดังกล่าว GH-liked hormone ในหอยน่าจะมีความคล้ายคลึงกับฮอร์โมน GH ของคนและสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงอื่น ๆ มาก ผลจากการทดลองนี้สนับสนุนผลจากการย้อม sections ของปมประสาท cerebral โดยวิธี immunoperoxidase ดังที่กล่าวมาแล้วในข้อ 6.5 ซึ่งพบว่ามี GH-liked hormone ปริมาณสูง ใน neurosecretory cells ชนิด NS_1 และ NS_3 และในมัดของเส้นประสาทที่อยู่ส่วนกลางของ medulla

เราได้ทำการทดลองในลักษณะเดียวกันใน cerebral ganglia โดยใช้ mouse anti-human insulin, LH และ FSH แต่ยังไม่ปรากฏผลบวกตามที่คาดไว้ และในกรณีของ pleuropedal ganglia ก็ยังไม่พบผลบวกอย่างที่ปรากฏในวิธี immunoperoxidase ที่ใช้โดยตรงกับ tissue sections ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปริมาณฮอร์โมน ILH, LH และ FSH-liked ที่อาจจะมีอยู่นั้นมีปริมาณน้อยมาก และอาจจะเป็นไปได้ว่ามี conserved part ระหว่างฮอร์โมนของมนุษย์และของหอยอยู่น้อยอีกด้วย จึงทำให้การศึกษาโดยวิธี immunoblotting ไม่ได้ผล เนื่องจากความไว (sensitivity) ต่ำกว่าวิธี immunoperoxidase

รูปที่ 41 A) ภาพของ 10% SDS-PAGE แสดงตำแหน่งแถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่สกัดได้จาก cerebral ganglion และถูกแยกตามขนาดของน้ำหนักโมเลกุล แล้วย้อมด้วยสี Coomassie blue

lane 1: แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานขนาดใหญ่ (high molecular weight marker-HMW) ขนาด 205, 116, 97, 66 และ 45 kD

lane 2-4: แถบโปรตีนชนิดต่าง ๆ จาก cerebral ganglion โดยมีการใส่ตัวอย่าง 20, 30 และ 40 µl ตามลำดับ แถบโปรตีนที่ติดสี Coomassie blue เด่นชัดมีประมาณ 8 แถบ

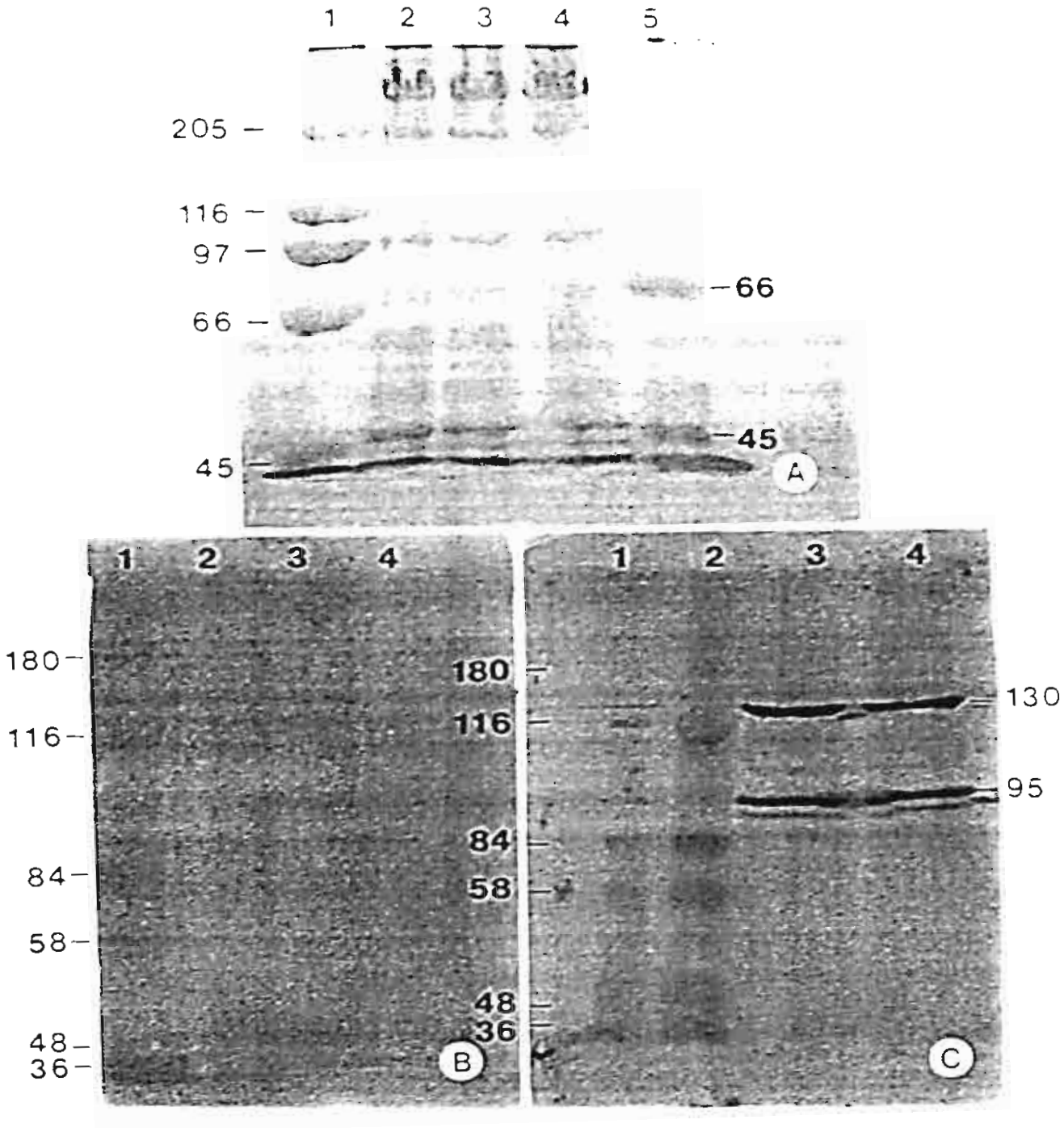
lane 5: แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐานขนาดเล็ก (low molecular weight markers-LMW) ขนาด 66 และ 45 kD

B,C) Immunoblot แสดงตำแหน่งของแถบโปรตีนที่คล้ายกับฮอร์โมน GH ซึ่งน่าจะเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป๋าฮื้อ ที่มี epitopes คล้ายกับ human GH แถบโปรตีนนี้สกัดมาจาก cerebral ganglion และทำปฏิกริยาโดยวิธี immunoblotting กับ rabbit anti-human growth hormone (primary antibody), biotin-goat anti-rabbit IgG (secondary antibody), HRP-streptavidin และ substrate DAB (รูป C) และ control gel ที่ใช้ normal rabbit serum แทน primary antibody (รูป B)

lanes 1-2: แถบโปรตีนน้ำหนักโมเลกุลมาตรฐาน: ขนาด 180, 116, 84, 58, 48 และ 36 kD

lanes 3-4: แถบโปรตีนที่สกัดจาก cerebral ganglion ของหอยเป๋าฮื้อ และทำปฏิกริยา immunoblotting โดยใส่ตัวอย่างในปริมาตร 30 และ 40 µl ตามลำดับ แถบโปรตีนที่ควรจะเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของหอยเป๋าฮื้อ ย้อมติดสีน้ำตาลเข้มตรงกับระดับน้ำหนักโมเลกุล 130 และ 95 kD ตามลำดับ

Figure 11


1
2
3
4
5
205
116
97
66
45
66
45
A
1
2
3
4
180
116
84
58
48
36
180
116
84
58
48
36
B
1
2
3
4
130
95
C

6.7 มหกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์

หอยเป๋าฮื้อเป็นสัตว์ที่มี 2 เพศ ซึ่งแยกจากกันอย่างชัดเจน อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยตัวเต็มวัยที่เห็นเด่นชัด คือ ต่อมอัณฑะและรังไข่ ซึ่งเป็นอวัยวะที่ห่อหุ้ม hepatopancreas และมีลักษณะเป็นรูปกรวย (cone-shaped) จึงรวมเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า conical organs ในหอยตัวผู้ต่อมอัณฑะมีสีเหลืองอ่อน ห่อหุ้มส่วนของทางเดินอาหารและ hepatopancreas ด้านปลายมีลักษณะแหลม (รูปที่ 42A,B) ในหอยตัวเมียรังไข่มีสีเขียวแก่ มีรูปร่างคล้ายกรวยและหุ้มรอบ hepatopancreas กับลำไส้เช่นเดียวกับต่อมอัณฑะ (รูปที่ 43A,B)

6.8 ลักษณะจุลกายวิภาคของอัณฑะและรังไข่

อัณฑะ (testis)

อัณฑะถูกห่อหุ้มด้วยถุงหุ้ม (capsule) (รูปที่ 44A,B; 45A,B) ซึ่งประกอบด้วยไยคอลลาเจนที่เรียงตัวแน่น ปรากฏเป็นแผ่นบาง ๆ อย่างชัดเจน เยื่อเกี่ยวพันจากถุงหุ้มที่มีลักษณะเป็นแผง (trabeculae) ยื่นเข้าไปในเนื้ออัณฑะ ภายในแผง trabeculae แต่ละอันมีหลอดเล็ก ๆ แทรกอยู่ ซึ่งอาจเป็นหลอดโลหิตฝอย (รูปที่ 45A,B) ปลายในสุดของ trabeculae ยื่นเข้าไปติดกับชั้นของเยื่อเกี่ยวพันที่ห่อหุ้ม hepatopancreas ต่อมอัณฑะส่วนต้นของ conical organs มีเนื้ออัณฑะบาง ๆ หุ้ม hepatopancreas ซึ่งมีขนาดใหญ่และหุ้มรอบหลอดลำไส้อีกต่อหนึ่ง (รูปที่ 44A) ทางด้านปลายของกรวยเนื้ออัณฑะจะมีมากขึ้นเรื่อย ๆ ในขณะที่เนื้อของ hepatopancreas ลดลง (รูปที่ 44B) จนกระทั่งที่ปลายสุดไม่มีเนื้อของ hepatopancreas อยู่เลย

แผง trabeculae เป็นแหล่งเกาะของเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ โดยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต้น ได้แก่ spermatagonia และ primary spermatocytes วางตัวติดอยู่กับทั้งสองด้านของแผ่นเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae เซลล์สืบพันธุ์ขั้นท้าย ๆ (secondary spermatocyte และ spermatids) จะอยู่ถัดออกไป ส่วนเซลล์อสุจิ (spermatozoa) จะกระจายอยู่รอบนอกสุด โดยหางของมันจะชี้ออกไปปะปนกับหางของเซลล์อสุจิที่มีกำเนิดมาจากหน่วยข้างเคียง ทำให้ปรากฏเป็นกลุ่มของเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ ครบชุดที่มี trabecula แต่ละอันเป็นแกนกลาง จึงเรียกว่า spermatogenic unit (รูปที่ 45A,B)

รังไข่ (Ovary)

ส่วนตัดขวางของรังไข่ แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคคล้ายกับของอัณฑะ (รูปที่ 44C; 65B-D) กล่าวคือ รังไข่ถูกห่อหุ้มด้วยถุง capsule ที่เป็นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบทึบ (dense collagenous connective tissue) โดยมีแผง trabeculae ยื่นเข้าไปประกบกับถุงหุ้ม hepatopancreas ที่ถูกรังไข่ล้อมรอบอยู่ รังไข่จึงถูกแบ่งออกเป็นห้อง ๆ (compartments) (รูปที่ 65A) โดยแผง trabeculae ที่มีหลอดเลือดเล็ก ๆ แทรกอยู่พร้อมกับเซลล์ที่มีนิวเคลียสเข้ม

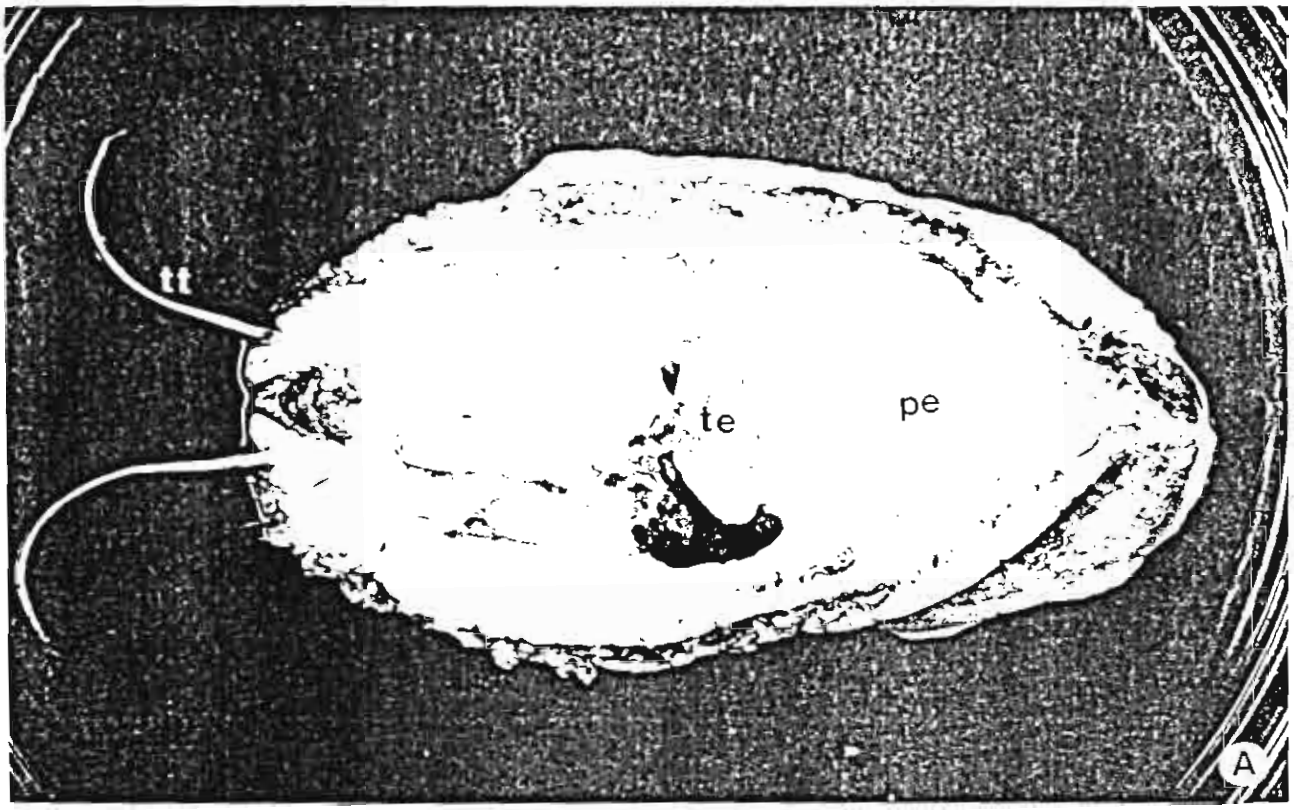
ขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป เซลล์สืบพันธุ์ระยะต้น เช่น oogonia และ primary oocytes ขั้นต้น จะติดอยู่กับเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae ส่วนเซลล์สืบพันธุ์ระยะปลาย จะกระจายแล่ะหลุดออก จากแผ่น trabeculae กลุ่มเซลล์ดังกล่าวจึงมีลักษณะคล้ายพวงองุ่น โดยมี trabecula แต่ละอัน เป็นแกนกลางจึงถือเป็น 1 หน่วย oogenetic unit ซึ่งเทียบได้กับ spermatogenic unit (รูปที่ 65A,C,D)

รูปที่ 42 A&B) หอยเป๋าฮื้อตัวผู้ที่ถูกผ่าแสดงอวัยวะภายในที่อยู่เหนือต่อ (dorsal) แผ่นกล้ามเนื้อเท้า (Pe-pedal muscle) อวัยวะต่าง ๆ ที่แสดงคือ te-testis (สีเหลือง), ad-adductor muscle, hp-hepatopancreas, kd-kidney, ma-mantle, gi-gill, bc-buccal mass, sa-salivary gland, ey-eyes, tt-tentacle

รูปที่ 43 A&B) หอยเป๋าฮื้อตัวเมียที่ถูกผ่าแสดงอวัยวะภายในที่อยู่เหนือต่อแผ่นกล้ามเนื้อเท้า อวัยวะต่าง ๆ ที่แสดงคือ ov-ovary (สีเขียวแก่) และอวัยวะอื่นๆ เช่นเดียวกับที่แสดงในรูปที่ 2

รูปที่ 44 ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำแสดงส่วนตัดขวางของต่อมอัณฑะ (รูป A,B) และรังไข่ (รูป C) ซึ่งห่อหุ้มด้วยถุงหุ้ม (capsule-cp) ทั้งอัณฑะและรังไข่หุ้มรอบ hepatopancreas (HP) และลำไส้ (IN)

Figure 42



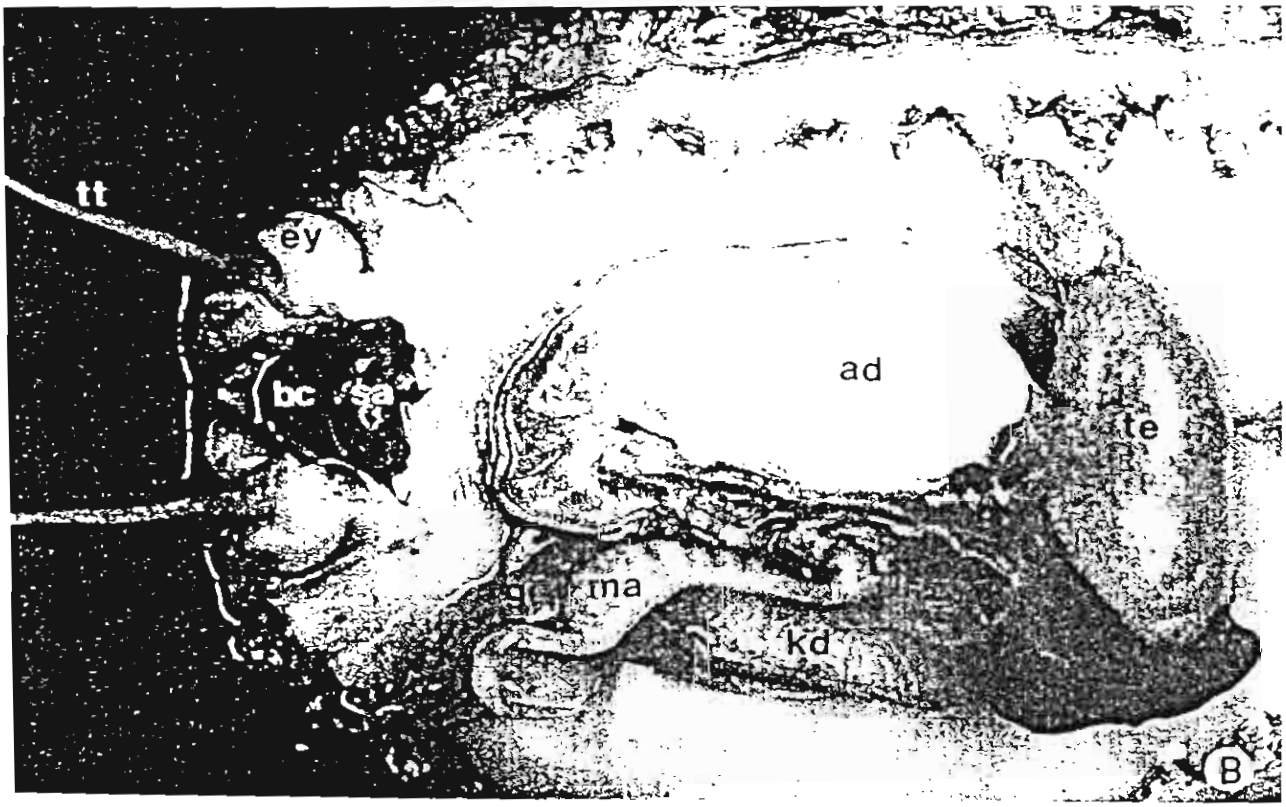


Figure 43

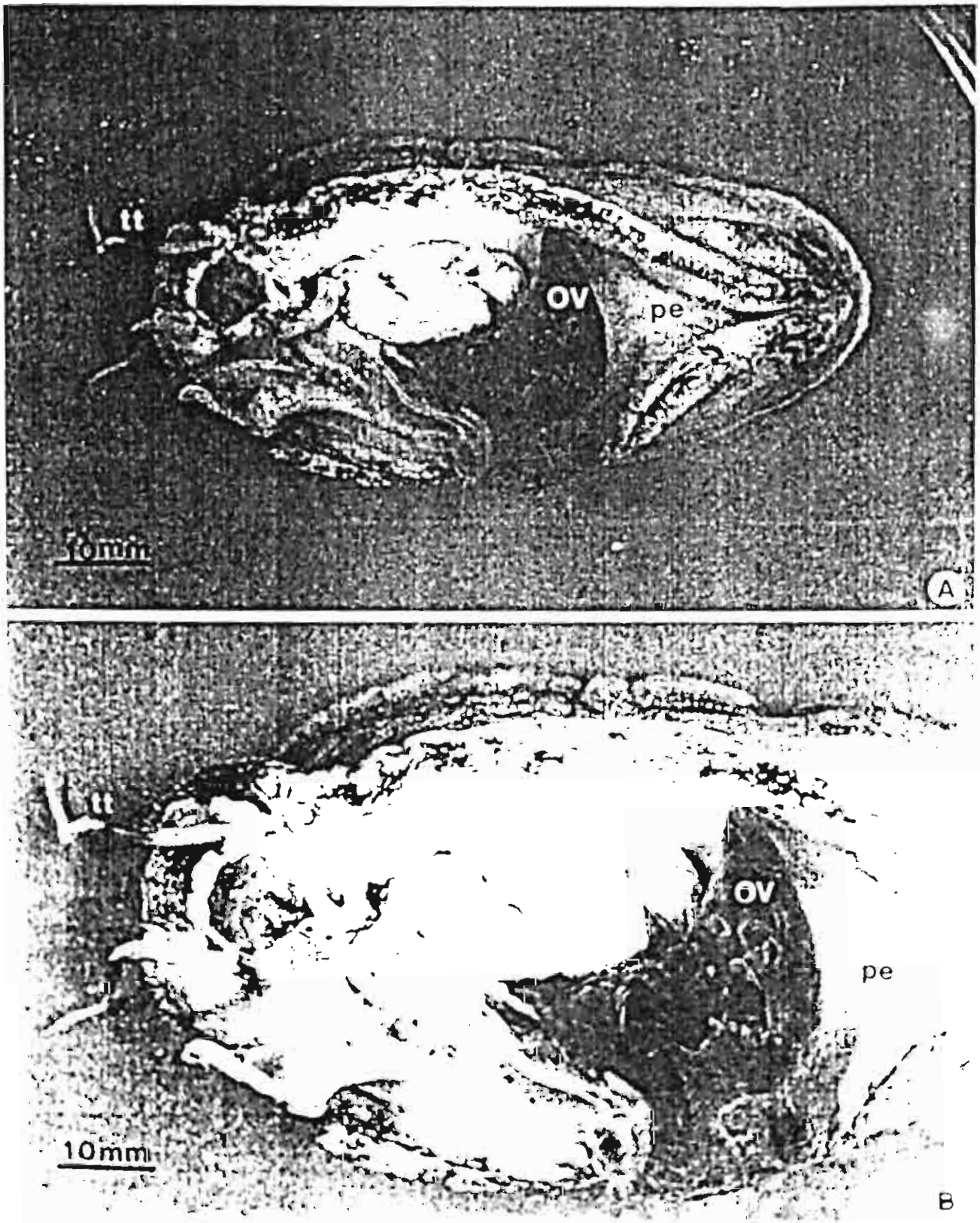
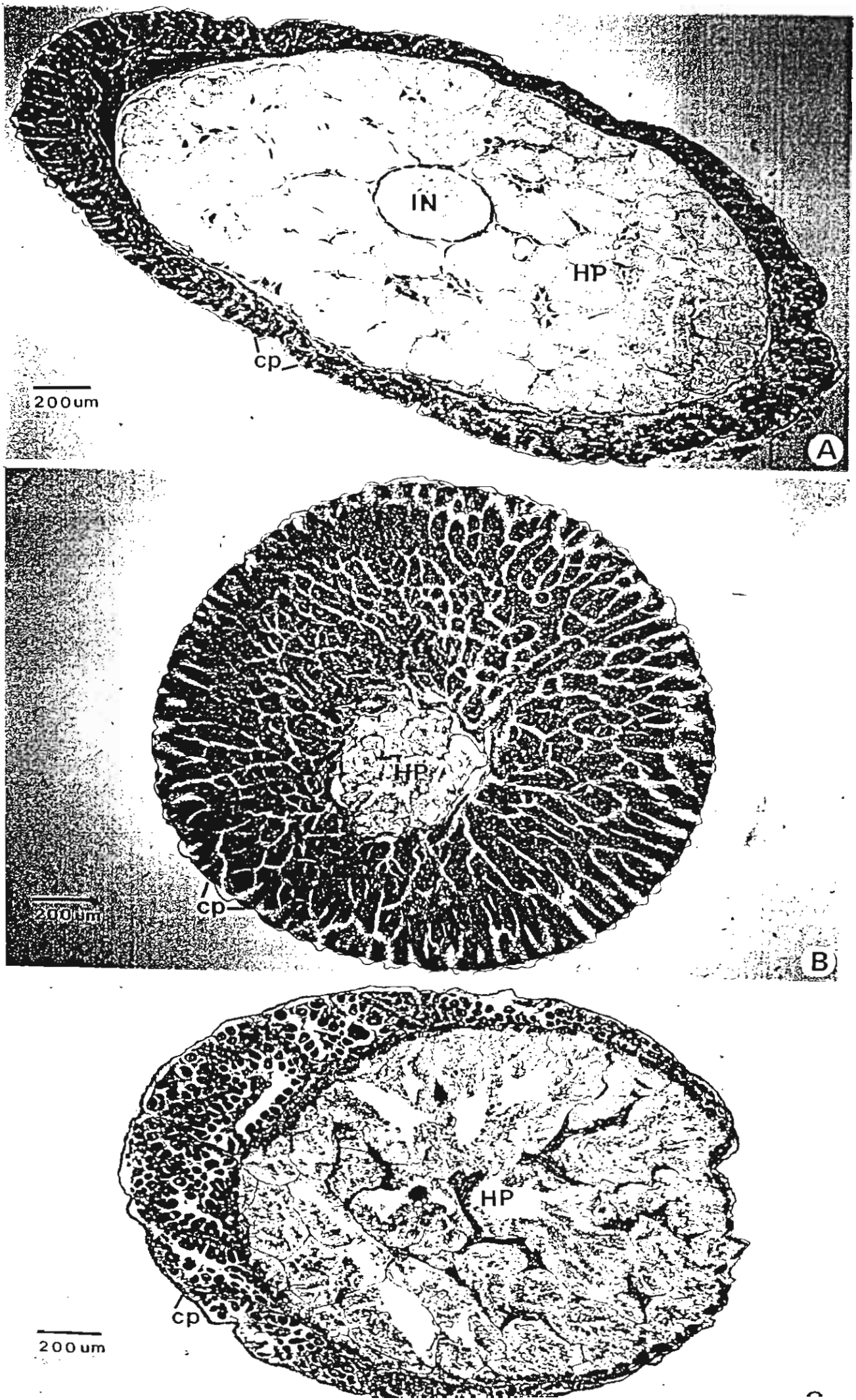


Figure 44



6.9 การศึกษาลักษณะและการจำแนกขั้นของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา

การศึกษาด้วยจุลทรรศน์ธรรมดาจากเนื้อเยื่อที่เตรียมด้วยพาราฟินและ semithin เทคนิค ทำให้เราสามารถแยกเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ออกได้เป็น 13 ขั้น คือ

Spermatogonia (Sg) (รูปที่ 45C; 46A,D)

Sg เป็นเซลล์ที่มีขนาดประมาณ 10-12 μm และมีนิวเคลียสขนาดประมาณ 6-7 μm ซึ่งเป็นรูปไข่หรือเว้าเข้าทางด้านใดด้านหนึ่ง นิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin เป็นส่วนมาก และ heterochromatin ปรากฏเป็นแถบบาง ๆ เกาะติดกับด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส เนื้อนิวคลีโอปลาสซึมโปร่งแสง นิวคลีโอลัสจึงปรากฏเด่นชัด

Primary spermatocytes (รูปที่ 45B-D; 46A,B)

มี 5 ระยะ คือ ระยะ Leptotene (LSc) ระยะ Zygotene (ZSc) ระยะ Pachytene (PSc) ระยะ Diplotene (DSc) และระยะ Metaphase (MSc) เซลล์เหล่านี้มีขนาดใหญ่ที่สุดในระยะ LSc ถึง PSc โดยมีขนาดเซลล์ประมาณ 12-15 μm และขนาดนิวเคลียสประมาณ 8-10 μm เซลล์มีขนาดเล็กลงเรื่อย ๆ จนถึงขั้น DSc ซึ่งตัวเซลล์มีขนาดประมาณ 7 μm และนิวเคลียสมีขนาดประมาณ 4 μm จากนั้นเซลล์จะมีขนาดขยายใหญ่ขึ้นอีกใน MSc และ DSc ข้อแตกต่างที่เห็นได้ชัดในเซลล์ระยะต่าง ๆ คือ การขดตัวของใยโครมาตินเป็นก้อนหรือเส้นที่มีความทึบแสงและขนาดต่าง ๆ กัน ในระยะ LSc ก้อน heterochromatin มีขนาดเล็กและกระจายอยู่ทั่วทั้งนิวเคลียสอย่างสม่ำเสมอ นิวคลีโอลัสมีขนาดเล็กลงมากและไม่เด่นชัดเมื่อเทียบกับ Sg ในระยะ ZSc ก้อน heterochromatin มีขนาดใหญ่และเข้มขึ้น และกระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส นิวคลีโอลัสไม่ปรากฏ ในระยะ PSc โครมาตินปรากฏเป็นเส้นหนาไขว้กันไปมา ซึ่งมีลักษณะคล้ายช่อดอกไม้หรือ bouquet pattern ในระยะ DSc เส้นใยโครมาตินหนาตัวและทึบแสงขึ้นอีก นิวเคลียสมีขนาดเล็กลง ทำให้เนื้อนิวคลีโอปลาสซึมทึบแสงยิ่งขึ้น ในระยะ MSc เส้นใยโครมาตินซึ่งกลายเป็นคู่ของโครมาติดเคลื่อนมาเรียงตัวกันที่แนวศูนย์สูตร (equatorial region)

Secondary spermatocyte (SSc) (รูปที่ 46A,D)

เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ประมาณ 8-10 μm และมีนิวเคลียสขนาดประมาณ 6 μm เส้นใยโครมาตินหนาขึ้นมากเมื่อเทียบกับระยะ DSc และไขว้กันไปมาเป็นรูปตาข่าย เนื้อนิวคลีโอปลาสซึมโปร่งแสงขึ้น

Spermatids (St) (รูปที่ 45D; 46C,D)

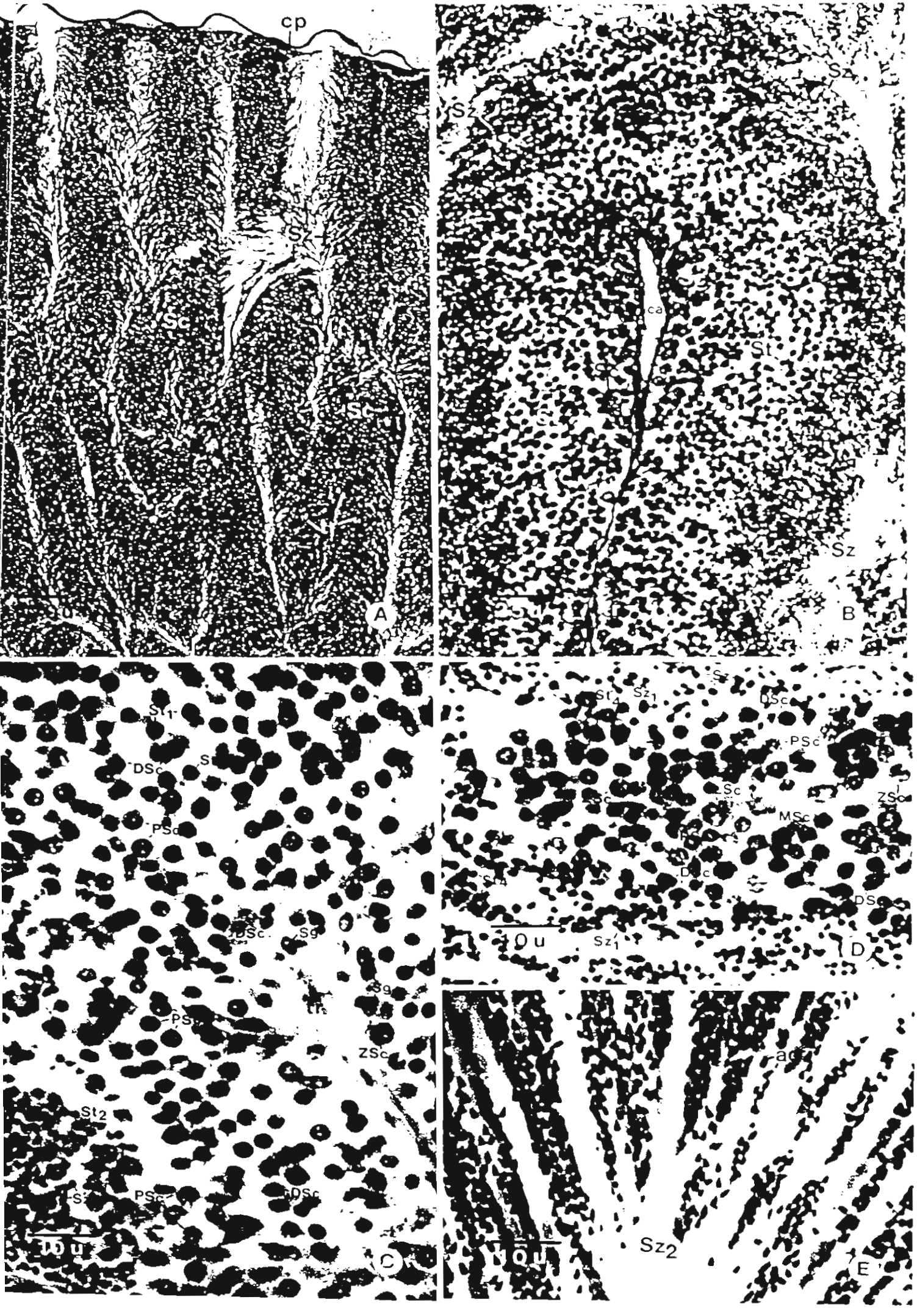
มี 4 ระยะ (St_{1-4}) ตามขนาดของนิวเคลียสและความทึบของโครมาติน นิวเคลียสของ St ทุกระยะมีรูปร่างกลม และมีขนาดตั้งแต่ 6 μm ใน St_1 ถึง 2-3 μm ใน St_4 โครมาตินปรากฏเป็นเม็ดละเอียดกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอและโปร่งแสงที่สุดใน St_1 และค่อย ๆ ปรากฏเป็นเม็ดหยาบที่มีขนาดใหญ่และทึบแสงขึ้นเรื่อย ๆ ใน St_2 และ St_3 จนกระทั่งในระยะ St_4 มีการขดแน่นของโครมาตินและนิวเคลียสทึบแสงที่สุด

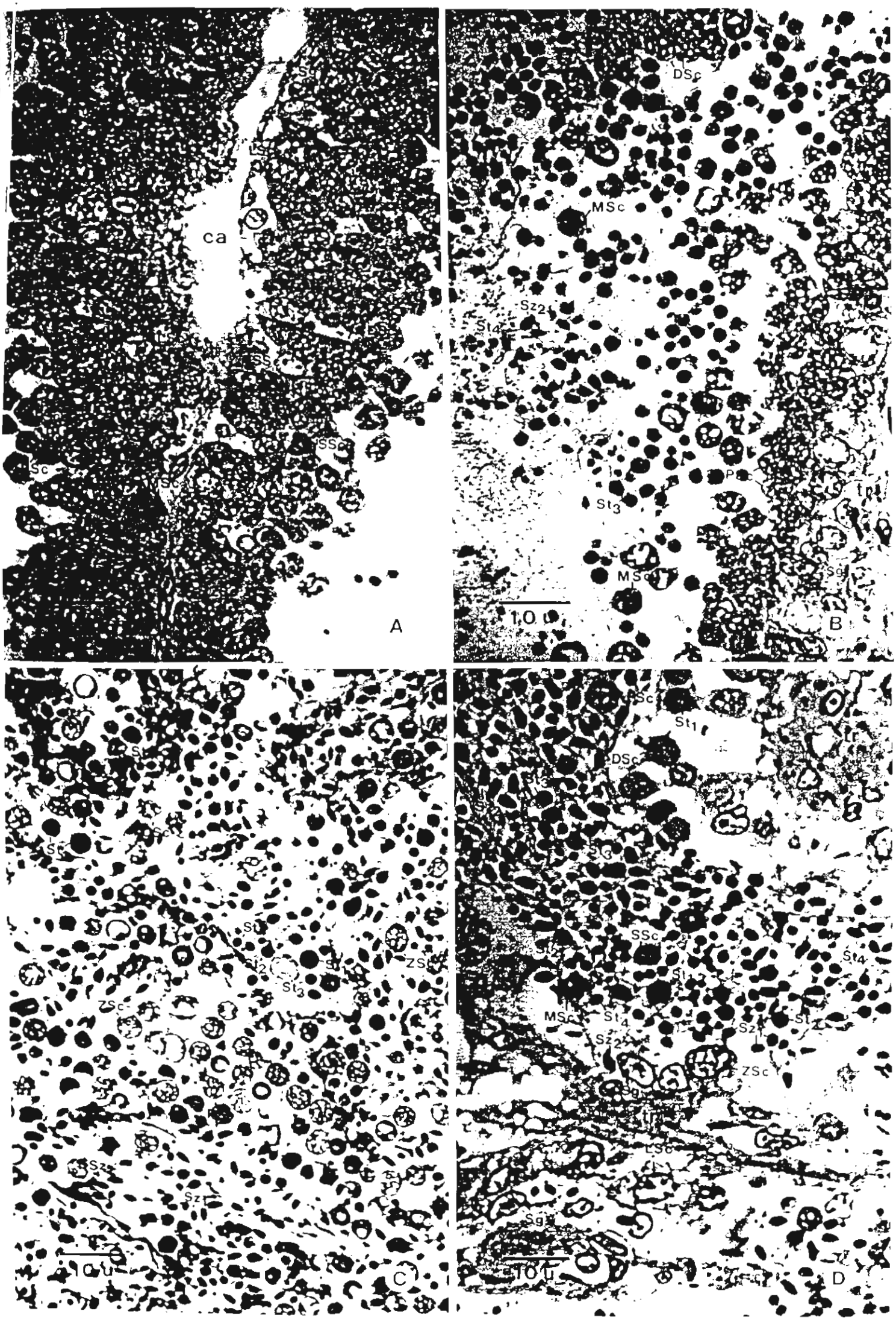
Spermatozoa (Sz) (รูปที่ 45C-E; 46C,D)

มี 2 ระยะคือ spermatozoa I (Sz_1) และ spermatozoa II (Sz_2) Sz_1 เป็นเซลล์ spermatozoa ที่ยังอ่อนอยู่ โดยมีนิวเคลียสรูปรีขึ้นเมื่อเทียบกับ St_4 และมีขนาดประมาณ 2-3 μm มีโครมาตินที่ยังไม่ทึบแสงเต็มที่ และมักปรากฏบริเวณใส ๆ คล้ายหมวกประกบกับด้านใดด้านหนึ่งของนิวเคลียส ซึ่งน่าจะเป็นส่วนของ acrosome ที่กำลังพัฒนาอยู่ ระยะ Sz_2 เป็นเซลล์ spermatozoa ที่พัฒนาเต็มที่แล้ว นิวเคลียสมีรูปร่างยาวเรียวและทึบแสงเต็มที่ขนาดประมาณ 1.5 x 3 μm เซลล์มีหางยาวและส่วนหัวยังฝังตัวอยู่กับเซลล์พี่เลี้ยง ที่ตั้งอยู่บนเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae ส่วนหางทอดออกไปปะปนกับหางของเซลล์ spermatozoa จาก spermatogenic unit ข้างเคียง (รูปที่ 45E)

รูปที่ 45 ภาพถ่ายกำลังขยายต่ำ (A,B) และปานกลาง (C) แสดงส่วนตัดขวางของอัณฑะซึ่งย้อมด้วยสี PAS แสดงโครงสร้างต่าง ๆ คือ cp-capsule, tr-trabeculae, ca-capillary ภาพ C แสดง spermatogenic unit 1 หน่วย ซึ่งแต่ละอันประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ (Sc, St, Sz) หุ้มรอบ trabecula

รูปที่ 46 A) ภาพถ่ายกำลังขยายสูง semithin sections ของอัณฑะที่ย้อมด้วยสี methylene blue แสดงเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ชั้นต่าง ๆ จาก PrSc ถึง Sz


cp
Sz
Sc
Sc
A
Sz
Sz
ca
St
Sz
B
St1
DSc
Sg
PSc
DSc
Sg
Sg
PSc
ZSc
St2
Sz
PSc
DSc
10 u
C
Sz
St1
Sz1
DSc
PSc
Sc
ZSc
MSc
Sg
DSc
10 u
Sz1
D
ag
10 u
Sz2
E


ca
Sc
SSc
A
DSc
MSc
Sz2
St4
St3
P
tp
Sg
1,0 µ
B
St1
SSc
St2
ZSc
Sz1
10 µ
C
LSc
D

6.10 การศึกษาโครงสร้างละเอียด (Ultrastructure) ของเซลล์สืบพันธุ์ช่วง Spermatogenesis, Spermiogenesis และเซลล์อสุจิที่อยู่ในต่อมอัณฑะด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission Electron Microscope-TEM)

6.10.1 เซลล์ในช่วง Spermatogenesis

เซลล์ในช่วง Spermatogenesis มี 7 ขั้น ตามที่กล่าวมาแล้ว คือ spermatogonia (Sg), primary spermatocytes 5 ขั้น คือ leptotene (LSc), zygotene (ZSc), pachytene (PSc), diplotene (DSc), metaphase (MSc) และ secondary spermatocyte (SSc) เมื่อสังเกตด้วย TEM พบว่าเซลล์ขั้นต่าง ๆ เหล่านี้เรียงตัวเป็นชั้น ๆ ตามลำดับ โดยมี Sg, LSc ส่วนใหญ่เรียงตัวใกล้แกนเยื่อเกี่ยวพัน trabeculae ชั้นถัดไปคือ PSc, DSc และ MSc (รูปที่ 47A-D) และชั้นสุดท้ายที่เซลล์ยังเกาะกลุ่มเป็น epithelium คือ ชั้น SSc ถัดจากชั้นนี้ออกไปคือกลุ่มของเซลล์ spermatids ขั้นต่าง ๆ ในช่วง spermiogenesis ซึ่งมักจะเป็นเซลล์ที่หลุดจากกัน (รูปที่ 47D; 53A)

Spermatogonia (Sg)

เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาด 8-10 μm นิวเคลียสมีขนาด 6-7 μm บรรจุโครมาตินซึ่งส่วนมากเป็น euchromatin โดยมี heterochromatin ปรากฏเป็นก้อนเล็ก ๆ เกาะอยู่ตามด้านในของเยื่อหุ้มนิวเคลียสกับกระจายทั่วไปในนิวเคลียส นิวคลีโอลัสมีขนาดใหญ่และลักษณะเด่น ไซโตปลาสซึมมี ribosome อยู่พอประมาณ และมี rough endoplasmic reticulum (rer) และไมโตคอนเดรียอยู่จำนวนน้อย โดยไม่มีแกรนูลอยู่เลย (รูปที่ 48A-D)

Leptotene primary spermatocyte (LSc)

เซลล์ในขั้นนี้อาจจะแบ่งออกเป็น 2 ขั้นย่อย คือ preleptotene (PLSc) และ leptotene (LSc) โดย PLSc เป็นเซลล์ขนาดไล่เลี่ยกับ Sg แต่โครมาตินเริ่มก่อตัวเป็นท่อน heterochromatin ขนาดเล็ก ๆ ในส่วนกลางของนิวเคลียสจำนวนมากขึ้น (รูปที่ 49A-D) และมีนิวคลีโอลัสใหญ่และเด่นชัด โดยอาจจะปรากฏเป็น 2 ส่วนคือ ขอบนอกทึบและในส่วนในโปร่ง (รูปที่ 49B,C) ในระยะ LSc เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นถึงประมาณ 12-15 μm โดยมีรูปร่างคล้ายรูปไข่ heterochromatin ที่ส่วนกลางของนิวเคลียสปรากฏเป็นท่อนยาวขึ้นแต่ยังค่อนข้างบาง ในขณะที่แถบ heterochromatin ตามขอบในของเยื่อหุ้มนิวเคลียสบางลงมาก (รูปที่ 50A-D) เส้นใยโครมาตินใน PLSc และ LSc มีการเรียงตัวเป็น 3 ระดับคือ เส้นใยเดี่ยวขนาด 30 nm ซึ่งเรียกว่าใยโครมาตินพื้นฐาน (fundamental chromatin fiber) หรือระดับที่2 ซึ่งอาจจะคลี่ออกเป็นใยเล็กลงขนาด 10-15 μm ซึ่งเรียกว่าระดับที่1 (รูปที่ 49F; 50E,F) ในทางกลับกันใยโครมาตินระดับ 2 อาจขดพันกันแน่นจนกลายเป็นก้อนหรือท่อน heterochromatin หรือระดับ 3 ซึ่งถึงแม้

ว่าจะปรากฏเป็นก้อนหรือท่อนขนาดต่าง ๆ กัน แต่ภายในก็ยังสามารถสังเกตเห็นใยระดับ 2 ซึ่งอัดกันแน่นอยู่อย่างชัดเจน (รูปที่ 49F; 50E,F) ในระยะ LSc นิวคลีโอลัสไม่ค่อยปรากฏชัด ส่วนไซโตปลาสซึมมี ribosomes และไมโตคอนเดรียหนาแน่นขึ้น และอาจจะมีก้อนแกรนูลทึบแสงอิเล็กตรอนกระจายอยู่อย่างประปราย

Zygotene primary spermatocyte (ZSc)

ZSc มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับ LSc แต่มีท่อน heterochromatin ที่หนาและยาวขึ้น ลักษณะเด่นของ ZSc คือการปรากฏตัวของ zynaptonemal complexes ซึ่งเป็นแผ่นที่ประกอบด้วยแถบทึบแสงอิเล็กตรอน 3 แถบ สลับกับแถบโปร่งแสงอิเล็กตรอน 2 แถบเรียงติดกัน โดย zynaptotemal complexes จะกระจายอยู่ในก้อน heterochromatin และเป็นที่ยึดของใยโครมาตินที่ขดพันกันแน่นมาก

Pachytene primary spermatocyte (PSc)

เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกับ LSc แต่จะมีท่อน heterochromatin ที่หนาขึ้นมาก และปรากฏเป็นแท่งยาวต่อเนื่องกันทั่วทั้งนิวเคลียส (รูปที่ 51A-D) ใยโครมาตินยังปรากฏเป็น 3 ระดับเช่นเดียวกับในระยะ LSc ถึงแม้ว่าท่อน heterochromatin จะหนาและยาวขึ้น แต่ภายในก็ยังประกอบด้วยใย 30 nm ที่อัดกันอยู่แน่นเช่นเดียวกับในระยะ LSc (รูปที่ 51C-F) ภายในไซโตปลาสซึมมีแกรนูลขนาดเล็กที่ทึบแสงอิเล็กตรอนจำนวนมากขึ้น และกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตปลาสซึม (รูปที่ 51A,B)

Diplotene primary spermatocyte (DSc)

DSc มีรูปร่างและลักษณะคล้าย PSc แต่ทั้งเซลล์และนิวเคลียสมีขนาดลดลงเหลือประมาณ 8 μm ท่อนโครมาตินกลับมีความหนามากขึ้นและกระชับเข้าหากันมากขึ้น (รูปที่ 50C)

Metaphase (diakinetic) primary spermatocyte (MSc)

เซลล์ MSc มีรูปร่างกลมขนาดขยายใหญ่ขึ้นเท่ากับ LSc ลักษณะเด่นคือ heterochromatin ปรากฏเป็นท่อนยาวต่อเนื่องกันจึงมีขนาดใหญ่ และมีจำนวนเพียง 1 หรือ 2 ท่อนอยู่ที่แถบกลางของเซลล์ โดยไม่มีถุงหุ้มนิวเคลียสล้อมรอบ ท่อน heterochromatin ก็ยังประกอบด้วยเส้นใยระดับ 2 ที่อัดกันอยู่แน่น ในไซโตปลาสซึมมีแกรนูลทึบแสงอิเล็กตรอนขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 52A-F)

Secondary spermatocyte (SSc)

SSc เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ใกล้เคียงกับ MSc ลักษณะเด่นคือ heterochromatin ปรากฏเป็นท่อนยาวหนา และสานกันเป็นรูปตาข่ายหรืออักษร Y ที่ต่อเนื่องกัน โดยแท่งโครมาติน

วางตั้งฉากซึ่งกันและกัน (รูปที่ 53A-F) ภายในแท่งโครมาตินยังประกอบด้วยใยโครมาตินระดับ 2 แต่ใยโครมาตินเหล่านี้สานกันอยู่หลวมขึ้น เมื่อเทียบกับระยะ MSc และ DSc (รูปที่ 53D-F)

ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่า ใยโครมาตินระดับ 2 เป็นระดับพื้นฐานที่อาจจะคลี่เป็นระดับ 1 ซึ่งเป็นส่วนของ euchromatin ซึ่งพบมากในเซลล์ขั้น Sg และ LSc เส้นใยระดับ 2 จะขดพันกันแน่นขึ้นเป็นก้อนที่มีขนาดใหญ่ และความแน่นทึบมากขึ้นเรื่อย ๆ ในขั้น PSc, DSc และ MSc เมื่อผ่านขั้น MSc ไปแล้ว ใยระดับ 2 จะค่อย ๆ คลายตัวออกอย่างที่สังเกตเห็นได้ในขั้น SSc และเมื่อเข้าสู่ระยะต้นของเซลล์ spermatids ใยระดับ 2 ก็จะคลี่ออกและกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียส โดยเฉพาะใน round spermatid ขั้นที่ 1 ซึ่งจะกล่าวถึงในตอนต่อไป

สิ่งที่น่าสังเกตอีกประการหนึ่งคือ ในไซโตปลาสซึมมีก้อนทึบแสงอิเล็กตรอนขนาดเล็กที่เริ่มปรากฏขึ้นในเซลล์ขั้น LSc และแกรนูลเหล่านี้มีจำนวนเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แม้กระทั่งใน MSc และมีปริมาณต่อเซลล์มากที่สุดใน round spermatid ขั้นที่ 1 ถ้าหากแกรนูลเหล่านี้เป็น proacrosomal granules ก็แสดงว่าการสร้าง acrosome เริ่มต้นเร็วกว่าที่มีผู้เคยเสนอความคิดกล่าวคือ เริ่มการสร้างในเซลล์ระยะต้น ๆ ตั้งแต่ขั้น LSc เมื่อเซลล์เริ่มสังเคราะห์ DNA และเริ่มเข้าสู่กระบวนการแบ่งเซลล์แบบ meiosis

รูปที่ 47 ภาพ TEM แสดงการเรียงตัวของเซลล์ PrSc ขั้นต่าง ๆ ใกล้กับระดับ trabeculae (A,B) และ SSc กับ St (C,D) ซึ่งเริ่มกระจายออกไปสู่ช่องว่างภายในช่องกลวงระหว่าง spermatogenic units

รูปที่ 48 A-D) ภาพ TEM ของเซลล์ spermatogonia แสดงลักษณะการกระจายของก้อน heterochromatin (Ch) ในนิวเคลียส และก้อน nucleolus (no) ที่ยังแน่นทึบ

รูปที่ 49 ภาพ TEM ของเซลล์ primary spermatocytes ขั้น preleptotene (PLSc) (A,B) แสดงลักษณะการกระจายของก้อน heterochromatin และ nucleolus ไยโครมาตินมีการจัดตัวเป็น 3 ระดับ (1, 2, 3 ใน C-F)

รูปที่ 50 ภาพ TEM แสดงการเรียงตัวของ LSc ปะปนกับ PSc และ DSc (A-D) กับการจัดไยโครมาตินเป็น 3 ระดับในนิวเคลียสของเซลล์ LSc (1, 2, 3 ใน E,F)

รูปที่ 51 ภาพ TEM แสดงการเรียงตัวของเซลล์ PSc และ DSc (A,B) กับภาพ TEM แสดงลักษณะของโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์ PSc (C-F) และการกระจายของ proacrosomal granules ในไซโตปลาสซึม (A,B)

รูปที่ 52 ภาพ TEM ของเซลล์ MSc แสดงลักษณะการขดพันของไยโครมาตินเป็นก้อนโครโมโซมขนาดใหญ่ (A-F) และการกระจายของ proacrosomal granules ในไซโตปลาสซึม (B)

รูปที่ 53 ภาพ TEM แสดงการเรียงตัวของเซลล์ SSc ที่แถวนอกสุด (A) และการไขว้ของแถบ heterochromatin เป็นตาราง (B-F) และการกระจายของ proacrosomal granules ในไซโตปลาสซึม (B,C)

Figure 47

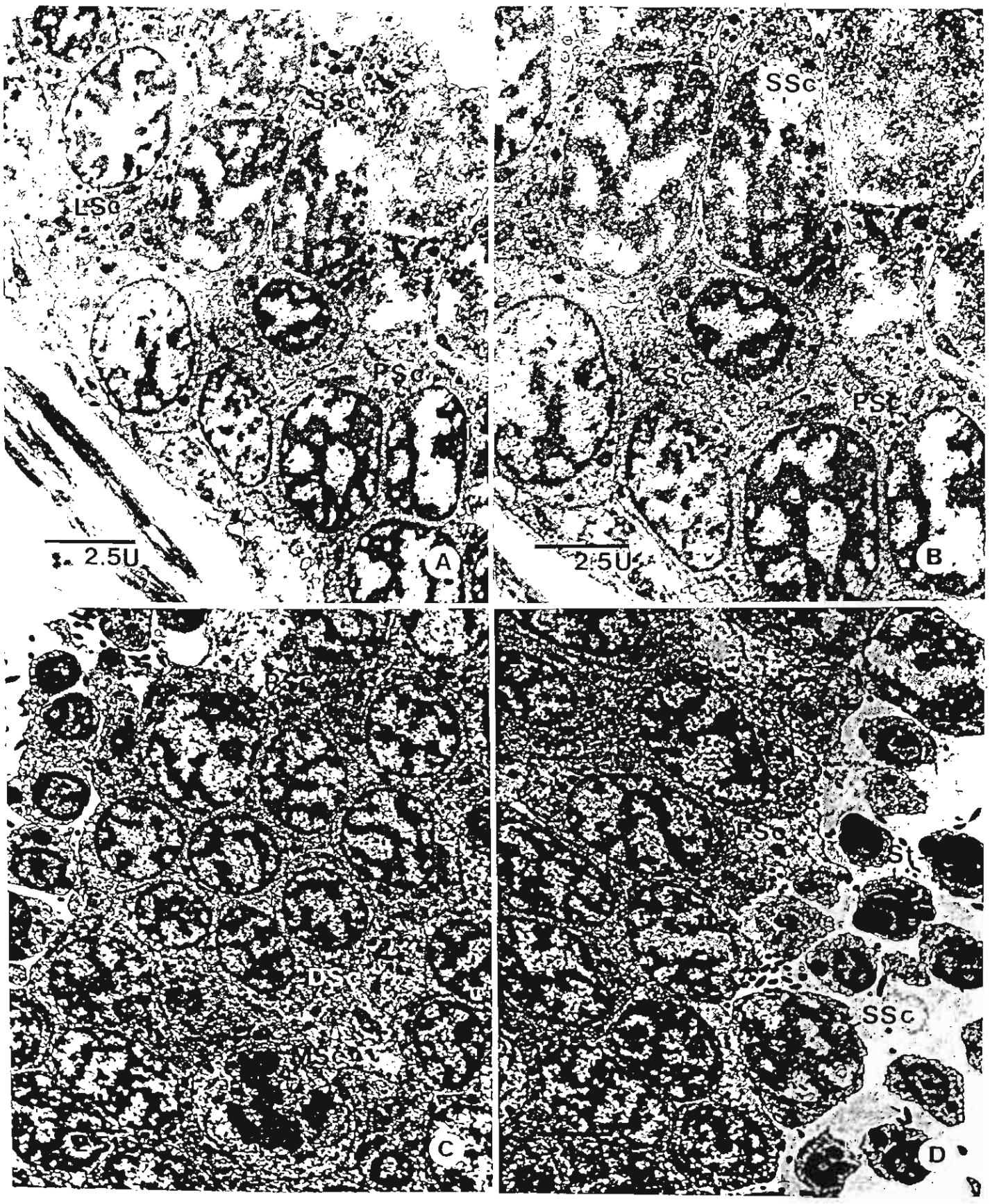


Figure 48

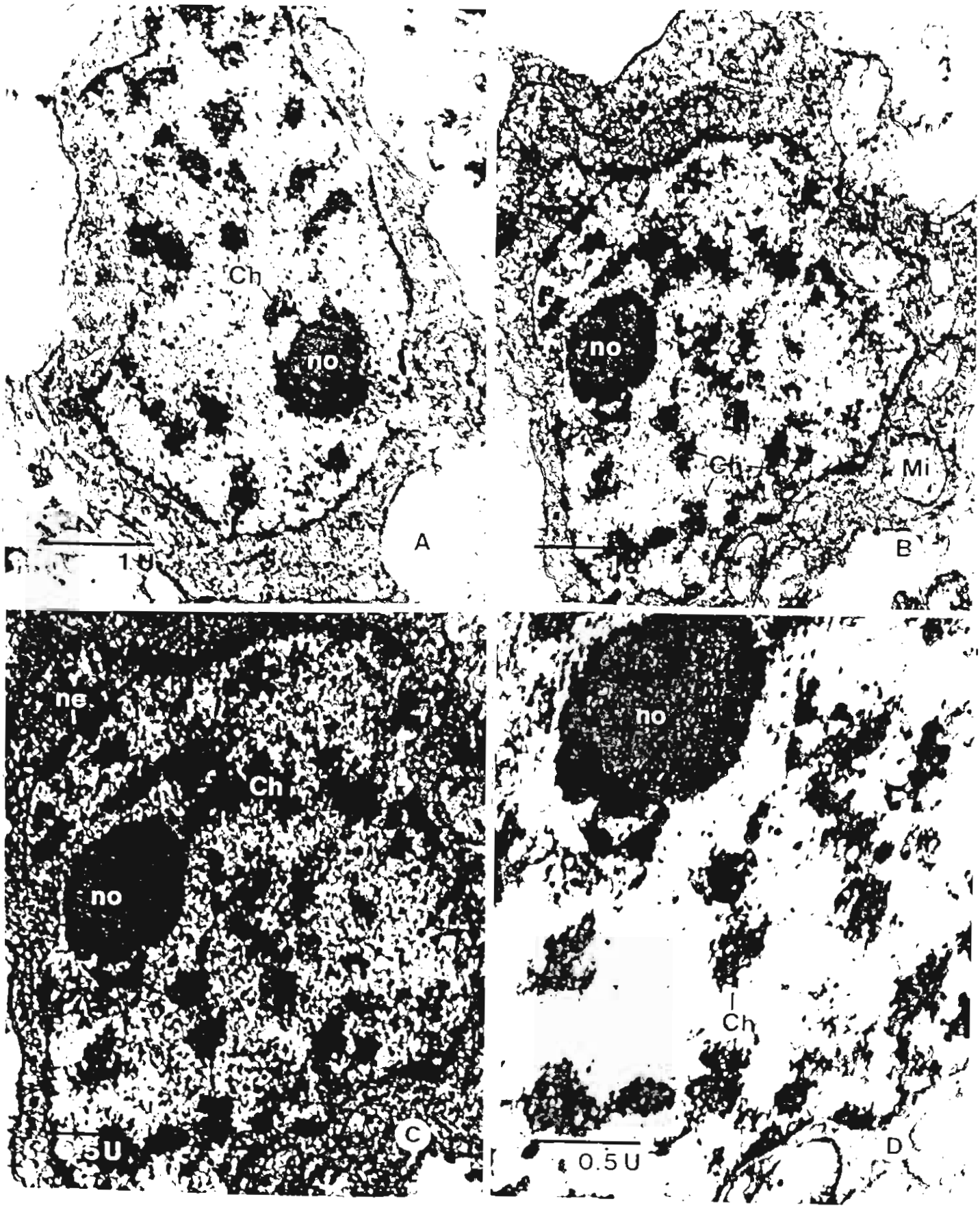


Figure 49

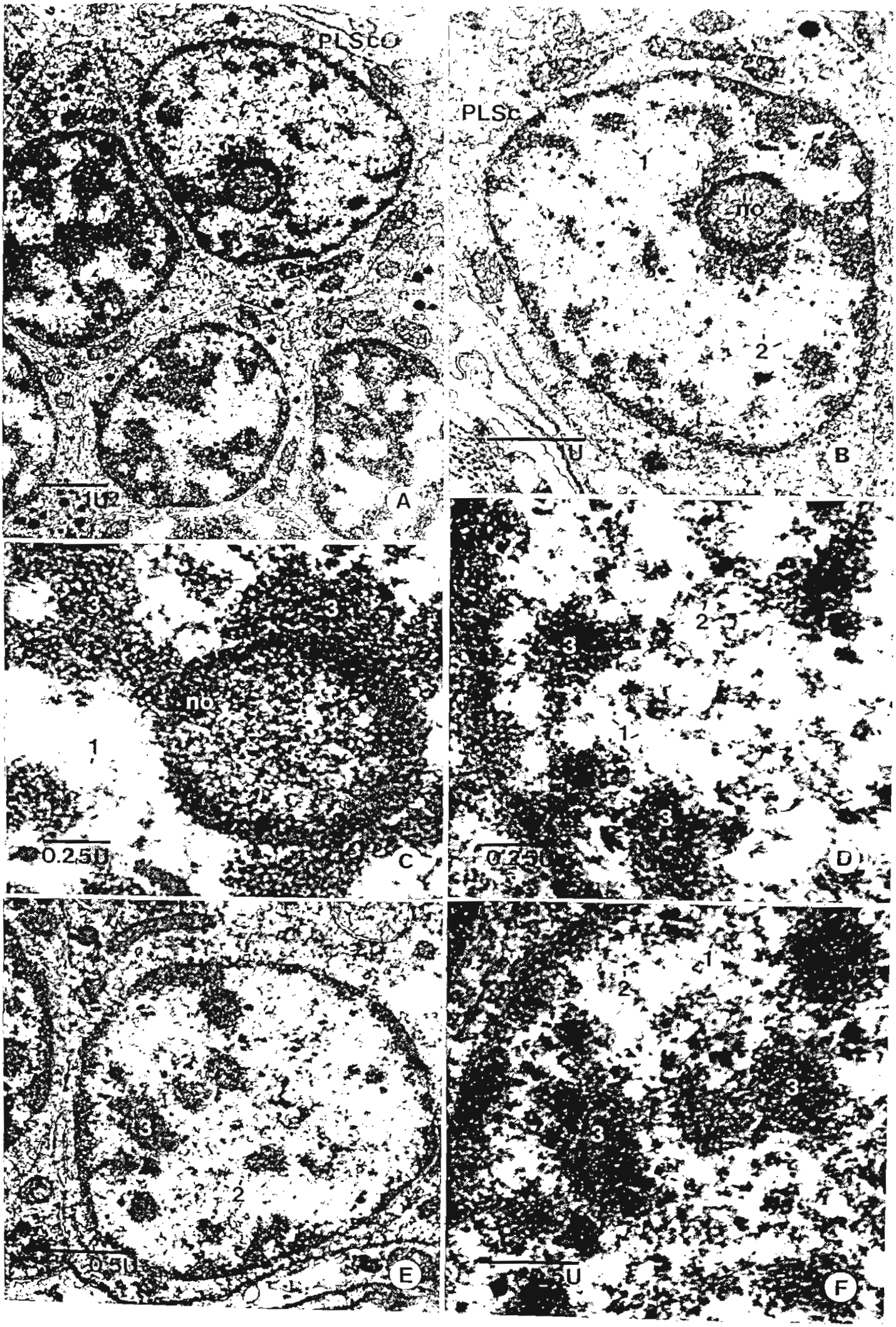


Figure 50

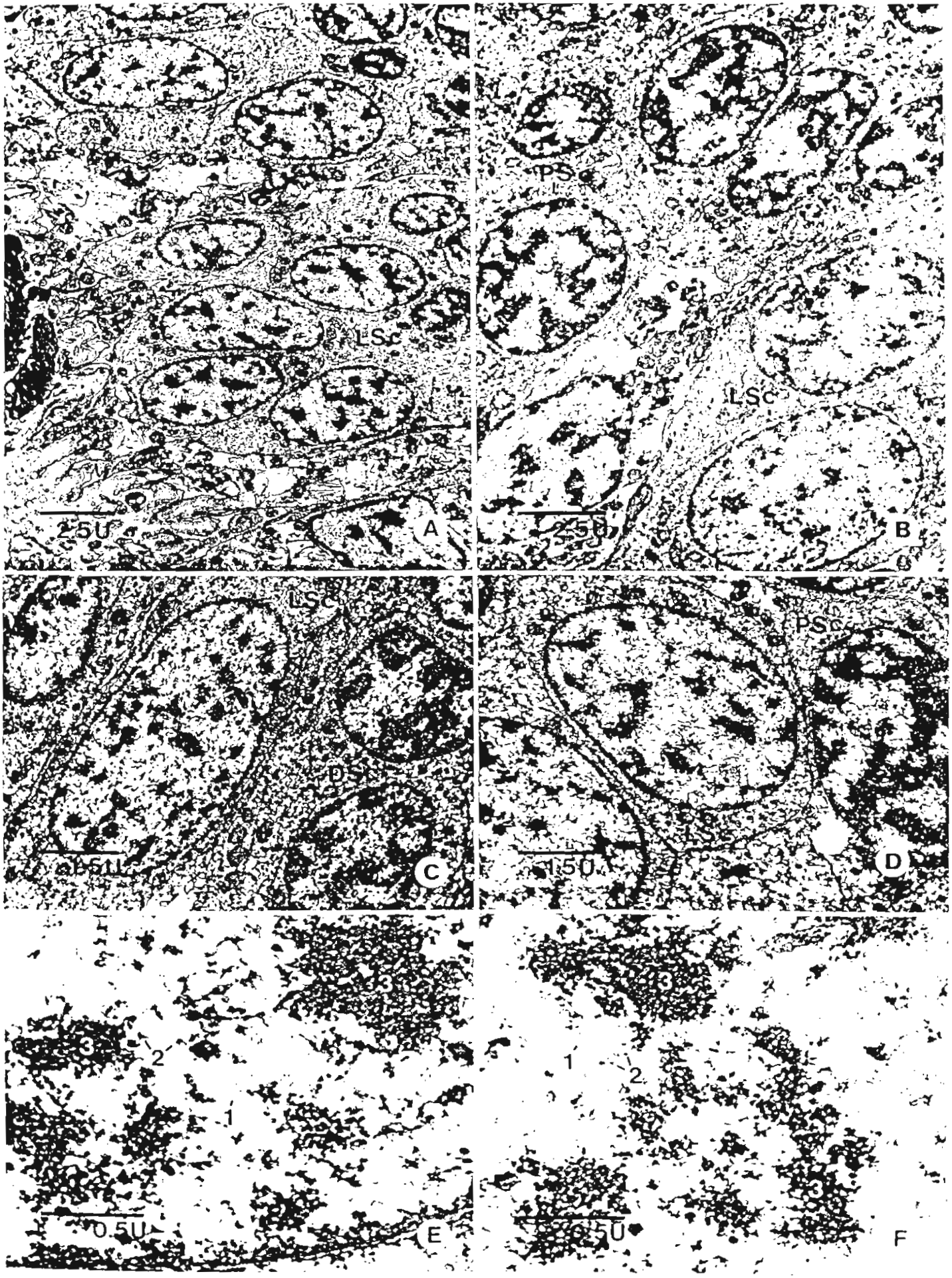


Figure 51

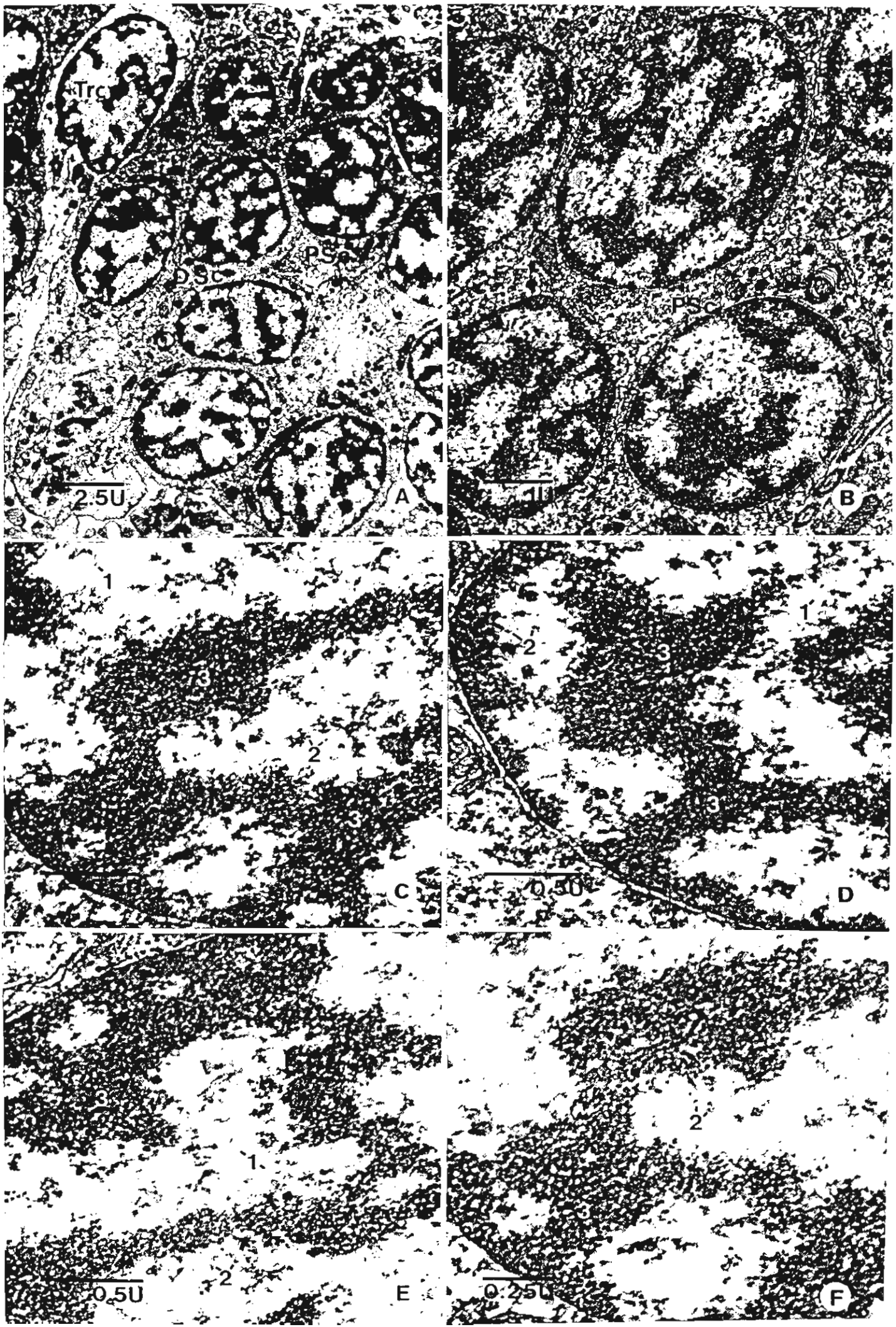


Figure 52

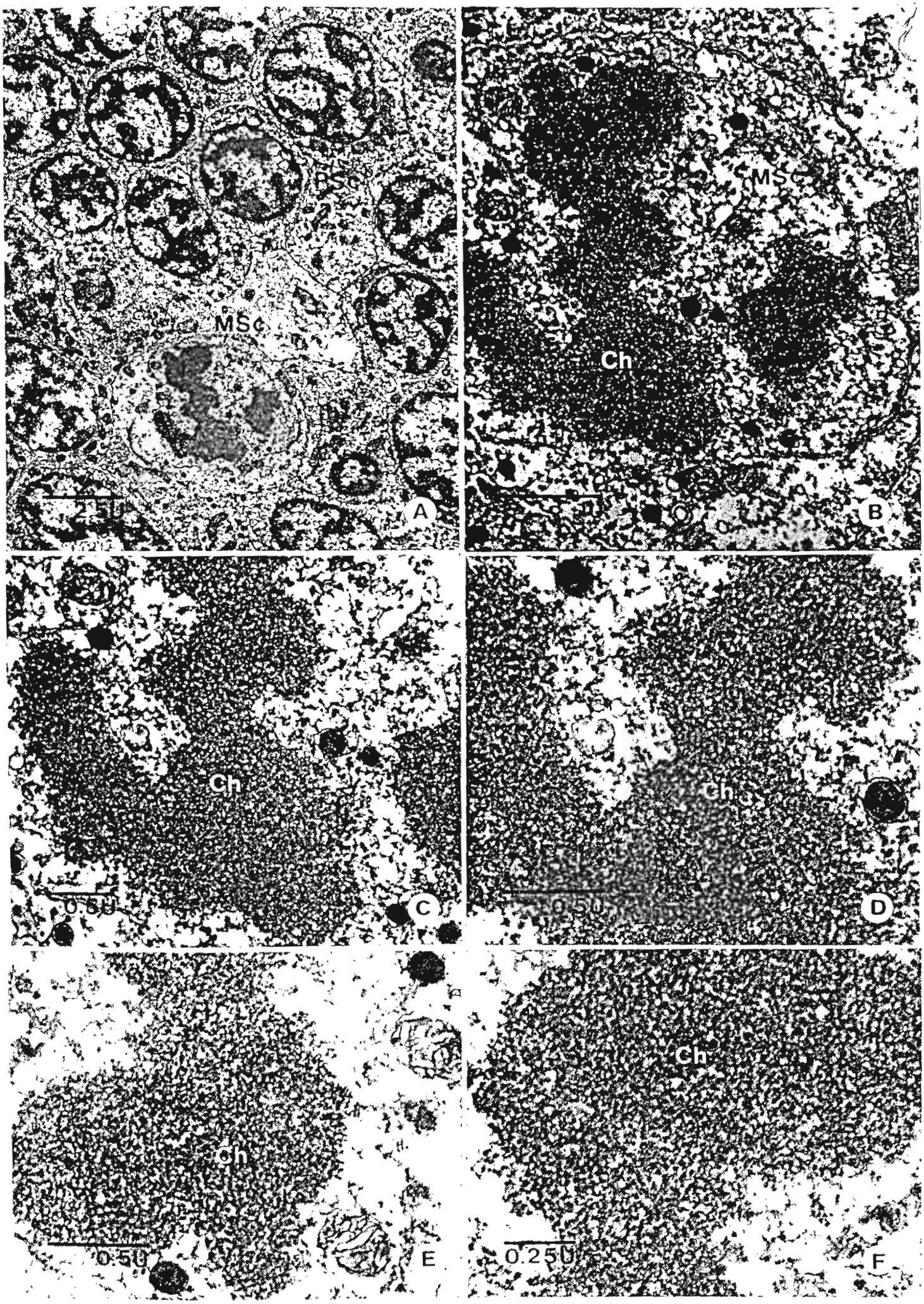
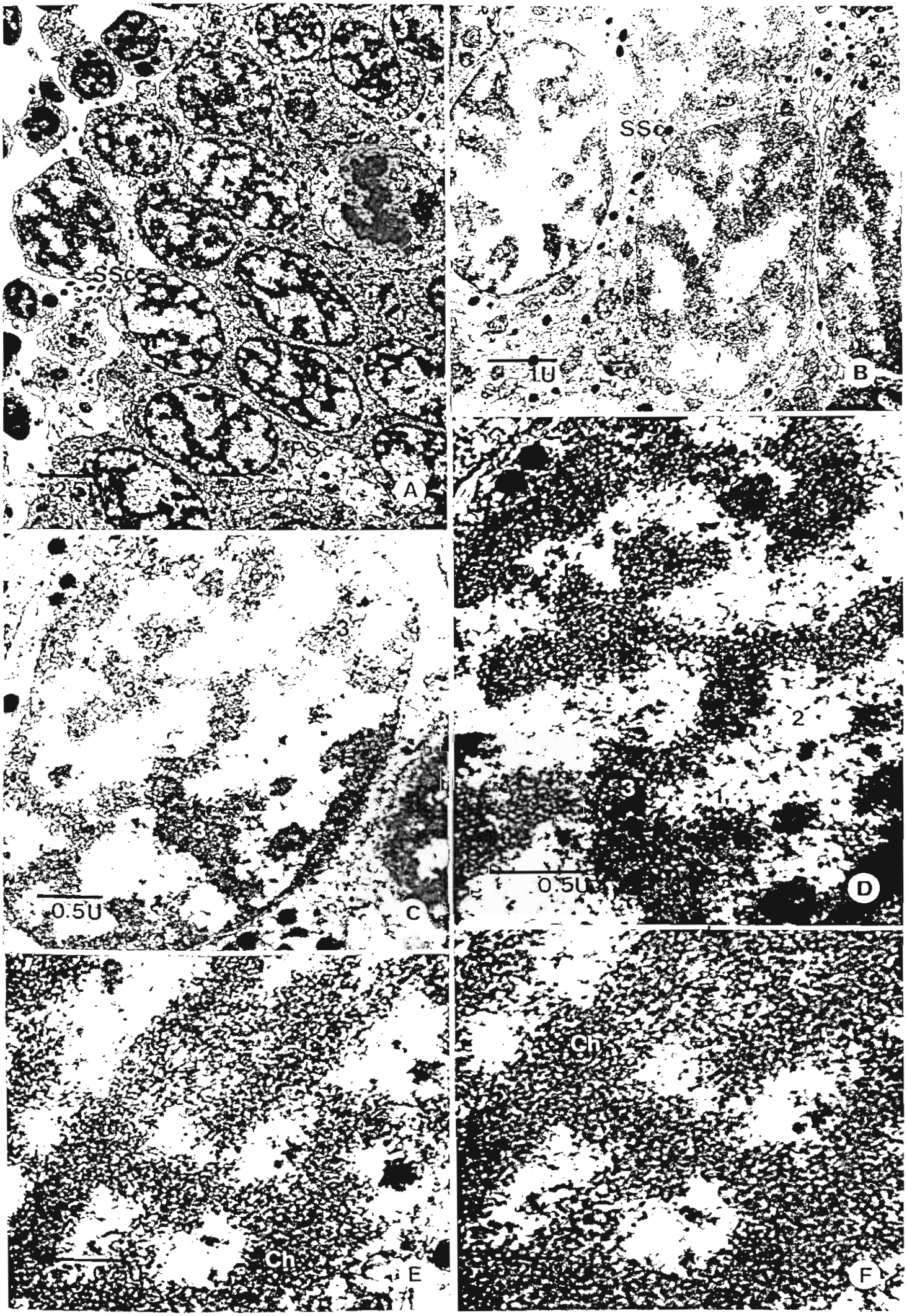


Figure 53



6.10.2 เซลล์ในช่วง Spermiogenesis และการขดของไยโครมาติน

เราได้แบ่งเซลล์ในช่วง spermiogenesis ของหอยเป๋าฮื้อออกเป็น 4 ขั้น จากการศึกษาในระดับ TEM (รูปที่ 54) และจากการศึกษาด้วยจุลทรรศน์ธรรมดาตามที่กล่าวมาแล้วในข้อ 6.9

Spermatid ขั้น I (St_1)

เมื่อสังเกตโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน นิวเคลียสมีลักษณะกลม มีโครมาตินค่อนข้างโปร่งแสงและกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียส เส้นไยโครมาตินเป็นระดับที่มีขนาด 30 nm ซึ่งกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียส (รูปที่ 55A-F) ไซโตปลาสซึมมีเม็ดแกรนนูลจำนวนมากรวมกลุ่มอยู่ทางด้านหนึ่งของเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็น proacrosomal granules ซึ่งเริ่มมีการสร้างตั้งแต่เซลล์ขั้น LSc ตามที่กล่าวมาแล้ว (รูปที่ 55A,B) ไมโตคอนเดรียมีอยู่เพียงประปรายและกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตปลาสซึม (รูปที่ 55A,B)

Spermatid ขั้น II (St_2)

ตอนต้นนิวเคลียสมีขนาดเล็กลง (รูปที่ 56A,B) จึงทำให้โครมาตินอัดกันแน่นขึ้น โดยไยโครมาตินสายเดี่ยวยังคงมีขนาด 30 nm เท่าเดิม ที่น่าสังเกตคือ มักมีบริเวณที่โครมาตินเริ่มขดพันกันแน่นทั้งที่บริเวณขอบและบริเวณส่วนกลางของนิวเคลียส บริเวณที่โครมาตินเริ่มขดตัวดังกล่าวมักมีเส้นทึบที่เป็นแกนกลาง (axis of condensation) โดยรอบ ๆ แกนจะมีเส้นไยโครมาตินขนาด 30 nm ขดเป็นบ่วงร้อยเข้ากับแกน (รูปที่ 56C,E,F) เส้นไยโครมาตินสายเดี่ยวในก้อนโครมาตินที่ขดตัวแน่นขึ้นยังคงมีขนาด 30 nm เท่าเดิม ในไซโตปลาสซึมมี proacrosomal granules จำนวนมากคั่งอยู่ทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ (รูปที่ 56B) ในบางเซลล์เริ่มมี axoneme ของหางเซลล์อสุจิปรากฏตัวขึ้น (รูปที่ 56A) ในนิวเคลียสของเซลล์ spermatid II ขั้นปลายบริเวณที่โครมาตินขดตัวขยายวงกว้างออกและแน่นทึบขึ้น จนไม่สามารถสังเกตเห็นแกนกลางได้อีกต่อไป บริเวณนิวคลีโอปลาสซึมระหว่างก้อนโครมาตินที่ขดตัวแน่นจะมีขนาดใหญ่และโปร่งแสงอิเล็กตรอนขึ้น (รูปที่ 57A-D; 58A-D) ในไซโตปลาสซึมมีก้อน proacrosomal granules ขนาดใหญ่ที่อาจจะเกิดจากการรวมตัวของก้อน proacrosomal granules ขนาดเล็กที่มีอยู่ในเซลล์ขั้นก่อนหน้านี้ ก้อน proacrosome ขนาดใหญ่ดังกล่าว เคลื่อนมาอยู่ทางด้านหน้าของเซลล์ โดยประกบติดอยู่กับถุงหุ้มนิวเคลียส (รูปที่ 57C,D; 58A,C)

Spermatid ขั้น III (St_3)

บริเวณที่โครมาตินขดตัวแน่นขยายขนาดออกไปอีก และมีความทึบแสงอิเล็กตรอนมากขึ้น เส้นโครมาตินสายเดี่ยวที่ปรากฏอยู่ในก้อนมีขนาดใหญ่ขึ้นถึงประมาณ 40 nm นิวคลีโอปลาสซึมระหว่างก้อนโครมาตินปรากฏเป็นบริเวณใสมากขึ้น (รูปที่ 57E,F; 58E,F; 59A-E)

ในไซโตปลาสซึม proacrosomal granule มีขนาดใหญ่ขึ้นและประกบอยู่ทางด้านใดด้านหนึ่งของนิวเคลียส ไมโตคอนเดรียขนาดใหญ่ 2-3 อัน เริ่มเคลื่อนไปประกบอยู่กับขอบของนิวเคลียสด้านตรงกันข้ามกับ proacrosome (รูปที่ 59B,E,F)

Spermatid ขั้น IV (St_4)

นิวเคลียสมีรูปร่างเรียวลงมาก ด้านหน้า proacrosomal granules พัฒนาเป็น acrosome เกือบสมบูรณ์ (รูปที่ 60A,E) ภายในนิวเคลียสก้อนโครมาตินขดตัวแน่นขึ้น และเริ่มอัดกันแน่นจนทำให้บริเวณนิวคลีโอปลาสซึมที่โปร่งแสงมีขนาดลดลงมาก (รูปที่ 60A-C) ภายในก้อนโครมาตินยังพอสังเกตเห็นเส้นใยโครมาตินสายเดี่ยวที่อัดติดกันแน่น โดยใยโครมาตินแต่ละเส้นมีความหนาถึง 60 nm (รูปที่ 60D-F) ด้านหลังของนิวเคลียสมี centriole 1 คู่ วางตั้งฉากซึ่งกันและกัน โดยมี axoneme ของหางงอกออกไปทางด้านหลัง รอบ centriole มีไมโตครอนเดรีย 3 ถึง 5 อันมาเรียงตัวอยู่ (รูปที่ 60E,F)

รูปที่ 54 ภาพวาดแสดงการขดตัวของใยโครมาติน (chromatin condensation) และการพัฒนา acrosome จากก้อน acrosomal granules ในเซลล์ spermatids และ spermatozoa

รูปที่ 55 ภาพ TEM ของเซลล์ St_1 แสดงการกระจายของใยโครมาตินระดับที่ 2 (30 nm) อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียส (A-F) และจำนวนของ proacrosomal granules ที่มากขึ้นและกระจายอยู่ทั่วไปในไซโตปลาสซึม (A,B)

รูปที่ 56 ภาพ TEM ระยะต้นของเซลล์ St_2 (A,B) แสดงการเริ่มพันตัวของใยโครมาตินระดับที่ 2 โดยเฉพาะรอบ ๆ บริเวณ condensation axis (ax) ซึ่งอาจจะติดอยู่กับถุงหุ้มนิวเคลียสหรือกระจายอยู่กลางนิวเคลียส (C-F)

รูปที่ 57 ภาพ TEM ระยะปลายของเซลล์ St_2 แสดงการขดตัวเพิ่มขึ้นของใยโครมาตินเป็นก้อน heterochromatin และการเริ่มรวมตัวของ proacrosomal granules เป็นก้อนใหญ่ขึ้น (Ac) (A-D) และภาพเซลล์ St_3 (E,F) แสดงการเริ่มทึบตัวของก้อนโครมาตินและช่องว่าง (vacuole-va) ที่เกิดขึ้นระหว่างก้อนโครมาติน

รูปที่ 58 ภาพ TEM ระยะต้นของเซลล์ St_3 แสดงความทึบของก้อนโครมาตินจากการขดตัวแน่นของใยโครมาติน (B-D) การรวมตัวของ proacrosomal granules ที่ด้านหน้าของนิวเคลียส ซึ่งกลายเป็นก้อน acrosome ขนาดใหญ่ (A,C) และการเคลื่อนของ mitochondria (Mi) ไปอยู่ทางด้านหลังของนิวเคลียส

รูปที่ 59 ภาพ TEM ระยะปลายของเซลล์ St_3 แสดงความแน่นทึบของก้อน heterochromatin ที่เกิดจากการขดตัวแน่นของใยขนาด 40 nm (A,B,C,E) ช่องว่างระหว่างก้อน heterochromatin แคบลง (A,C,D,E,F) ไมโตคอนเดรียเคลื่อนไปอยู่ด้านหลังของนิวเคลียส (B,D,E)

รูปที่ 60 ภาพ TEM ของเซลล์ St_4 แสดงก้อน heterochromatin ที่ทึบแสงเกือบเต็มที่จากการขดตัวของใยโครมาตินขนาด 60 nm (C-F) ช่องว่างภายในนิวเคลียส (va) แคบลงมาก (A,B,C,E) ไมโตคอนเดรียล้อมรอบ centriole (ce) ซึ่งเป็นจุดกำเนิดของหาง (T) ยืดยาวออกไปทางด้านหลัง

Figure 54

ABALONE

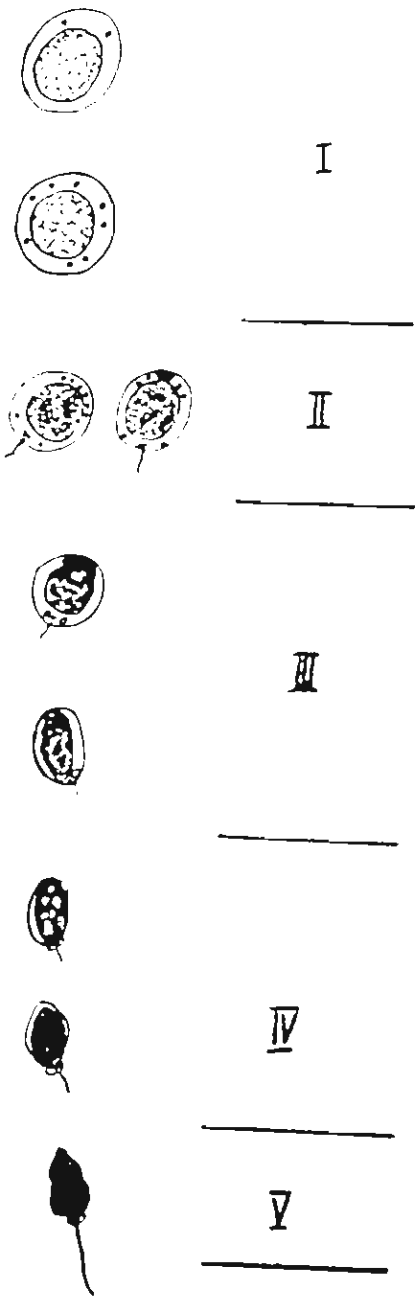


Figure 55

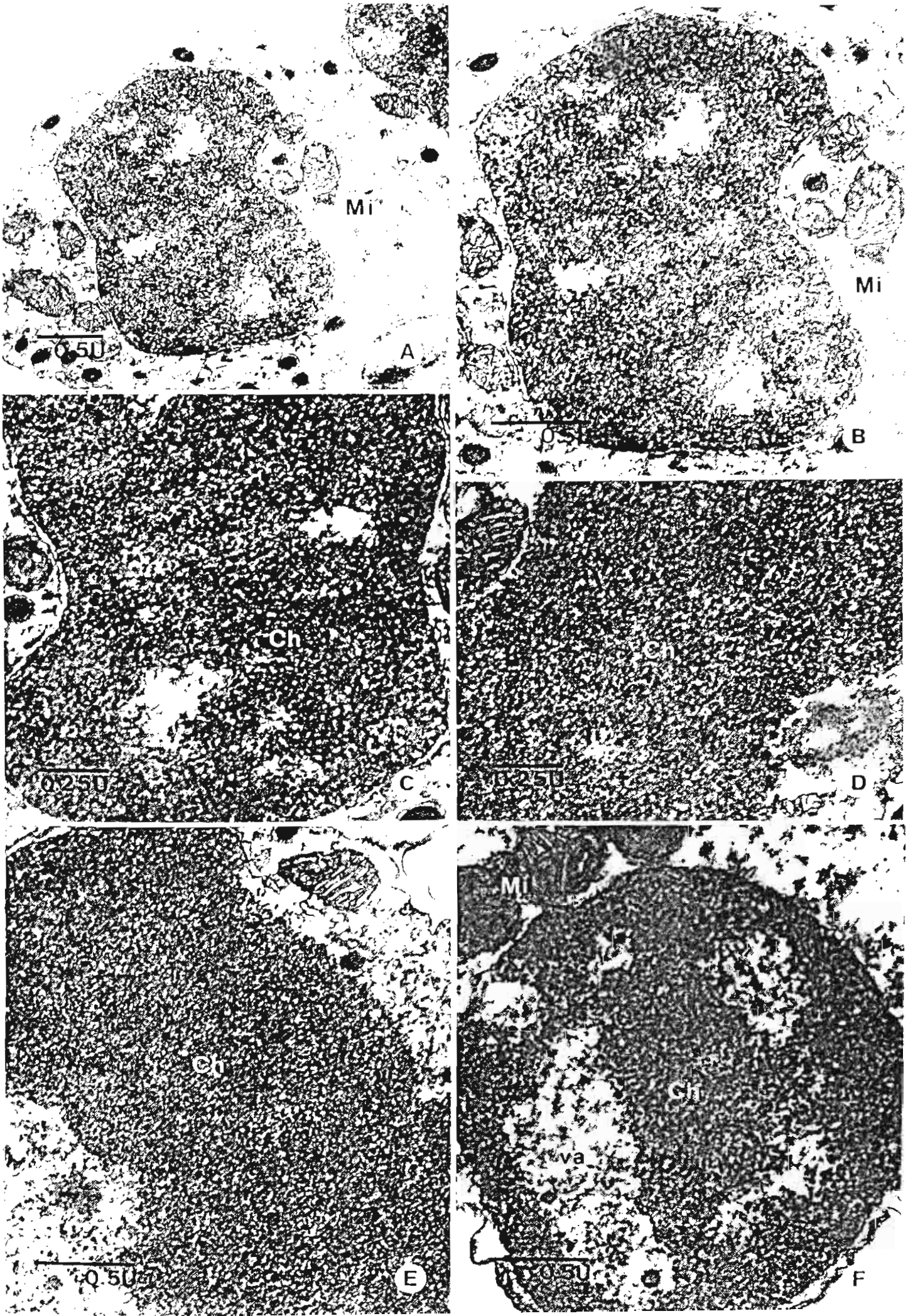


Figure 56

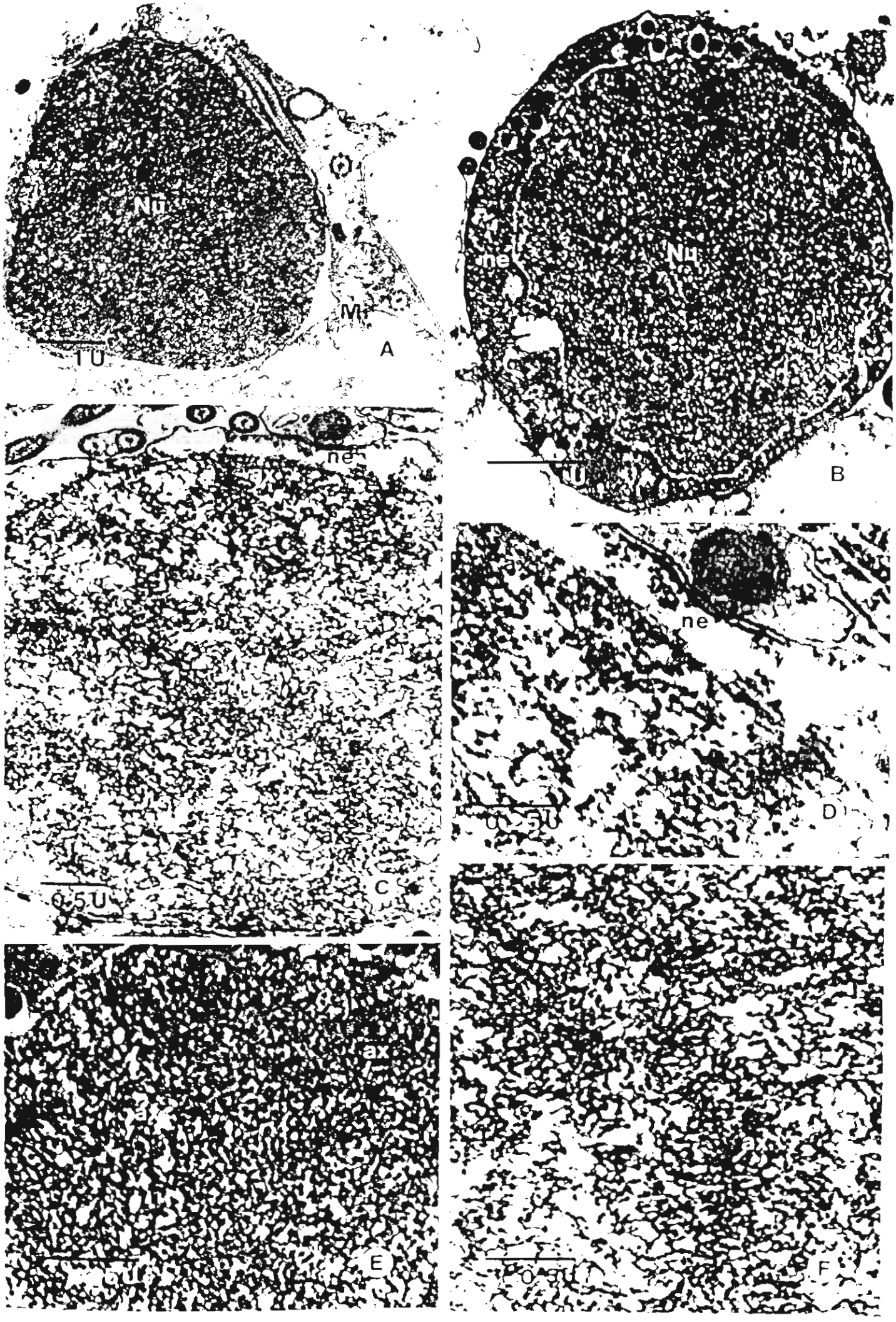


Figure 57

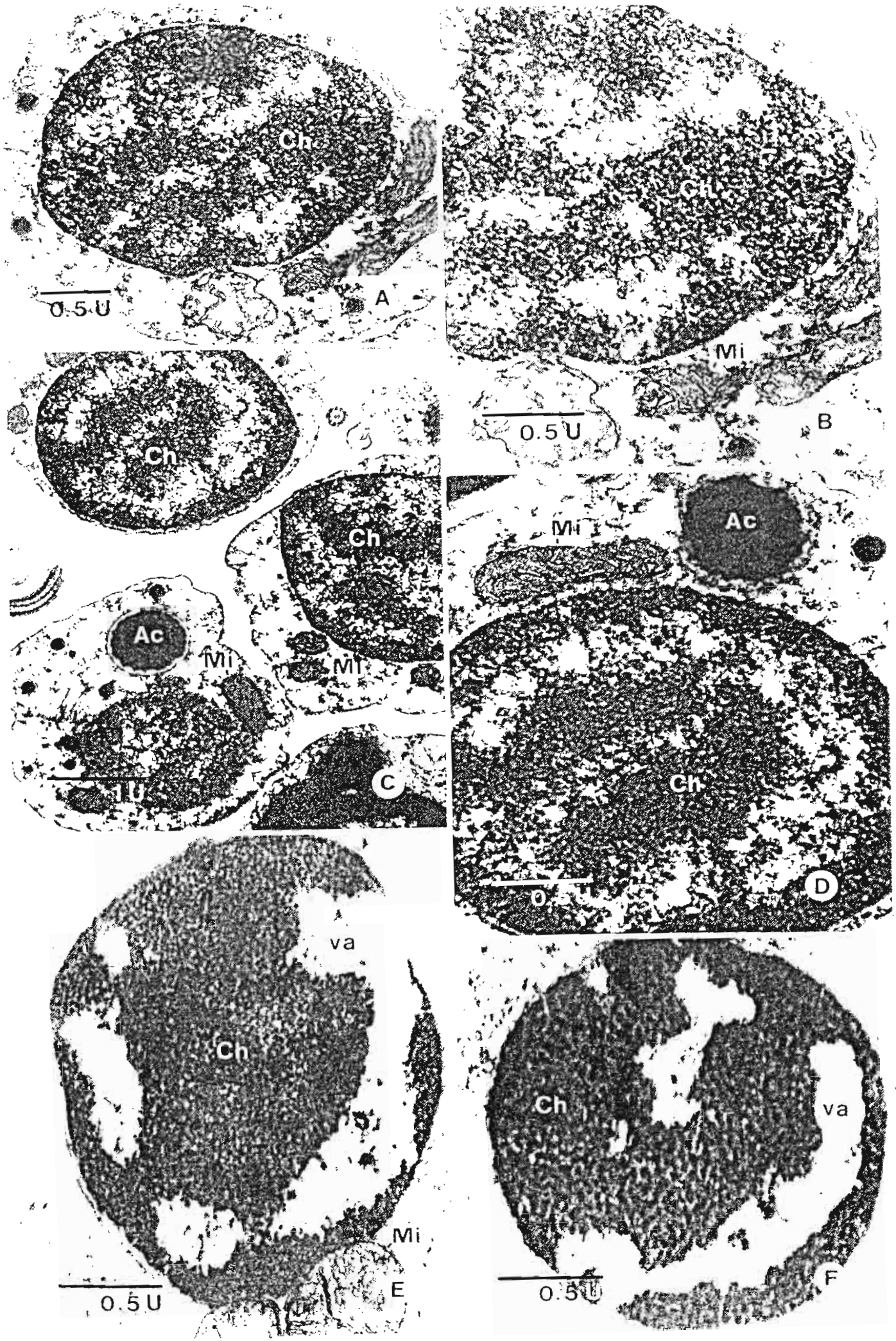

Ch
0.5 U
A
Ch
Mi
0.5 U
B
Ch
Ch
Ac
Mi
Mi
C
Mi
Ac
Ch
D
va
Ch
Mi
0.5 U
E
Ch
va
0.5 U
F

Figure 3b

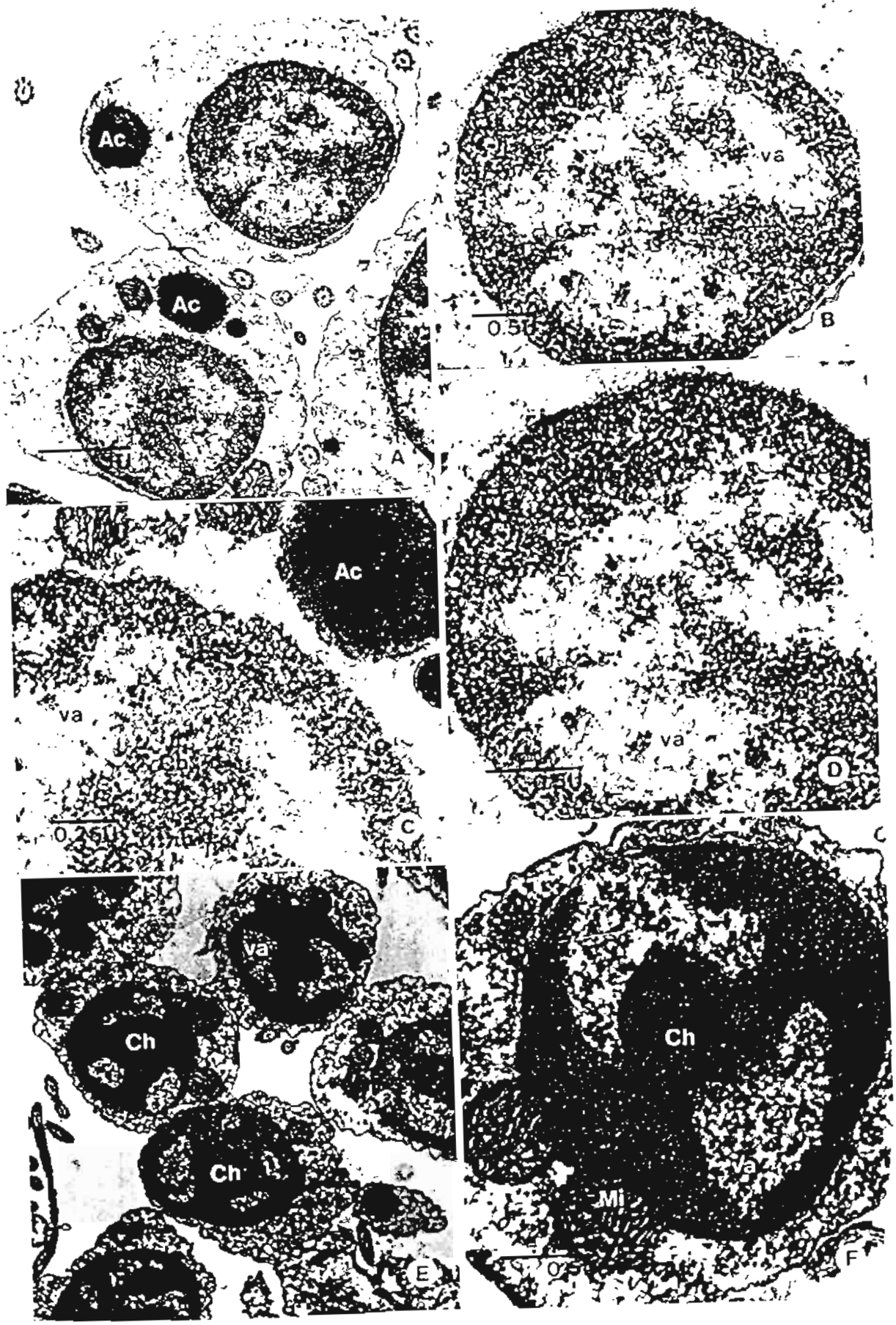
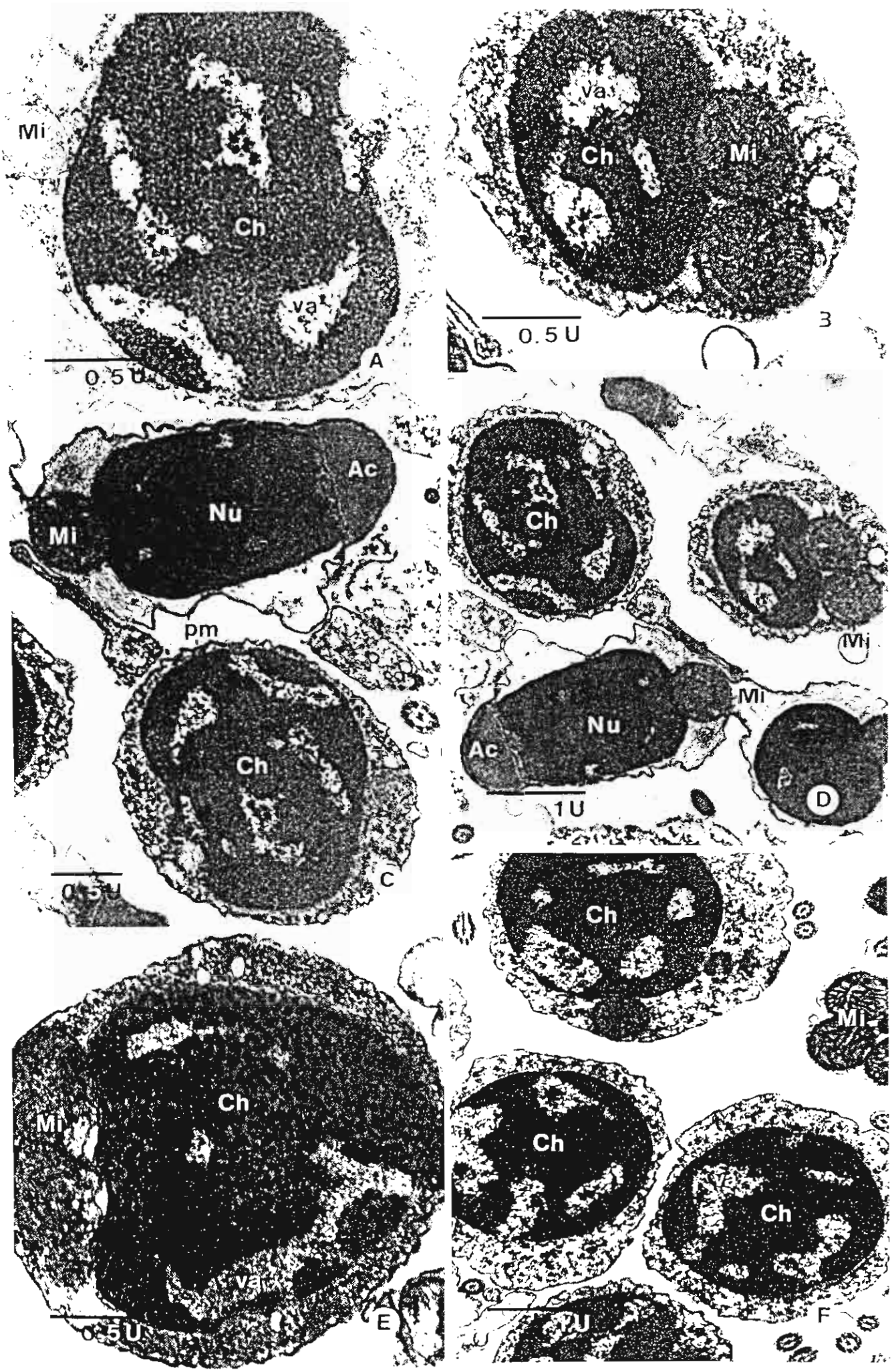
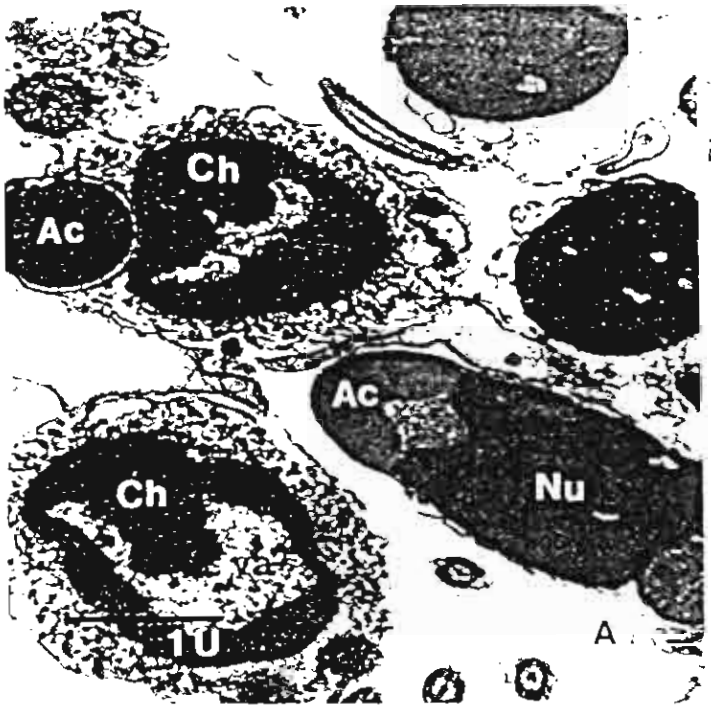
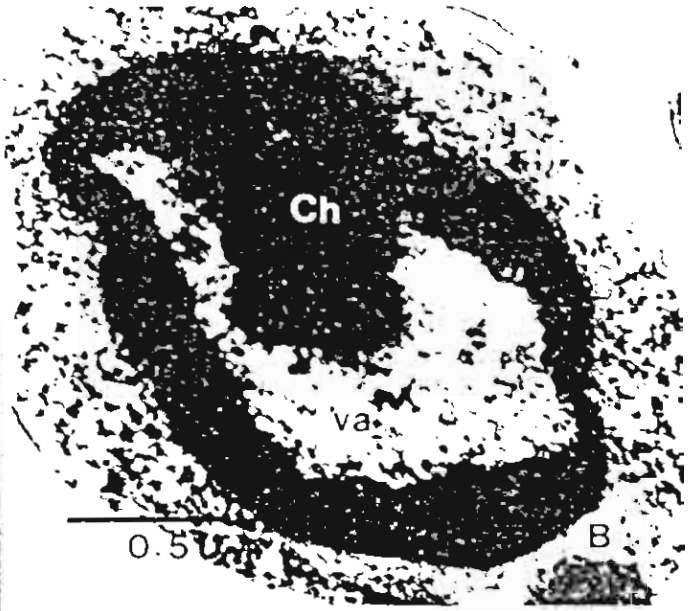


Figure 59

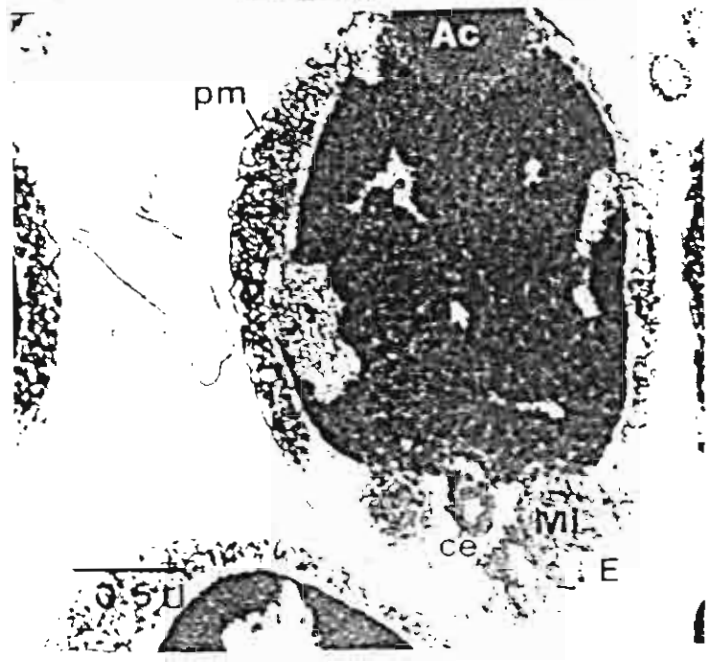

Mi
Ch
va
0.5 U
A
Va
Ch
Mi
0.5 U
B
Ac
Nu
Mi
pm
Ch
0.5 U
C
Ch
Mi
Mi
Nu
Ac
1 U
D
Ch
Mi
Mi
Ch
va
0.5 U
E
Ch
Va
Ch
1 U
F

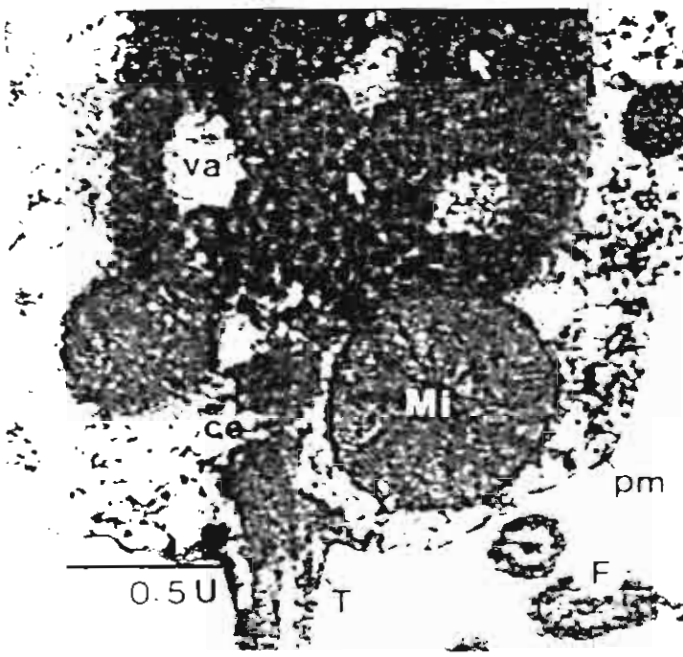

Ch
Ac
Ac
Nu
Ch
1U
A


Ch
va
0.5U
B


pm
Mi
Ac
Mi
ce
Nu
1U
C


pm
va
Mi
0.5U
D


Ac
pm
Mi
ce
E
0.5U


va
Mi
ce
pm
0.5U
T
F

6.10.3 การศึกษาลักษณะโครงสร้างละเอียดของเซลล์อสุจิในอัณฑะโดย TEM และ SEM

เซลล์อสุจิเป็นกลุ่มเซลล์ที่อยู่นอกสุดจากแผ่น trabeculae และบางเซลล์หลุดออกไปอยู่ในช่องกลวงระหว่าง spermatogenic units ข้างเคียง เซลล์อสุจิประกอบด้วยส่วนหัวและส่วนหาง จากการศึกษาด้วย SEM ส่วนหัวมีลักษณะเป็นรูปกรวย โดยมีความยาวจากปลายสุดถึงโคนหางประมาณ 3 μm ความกว้างที่ระดับ acrosome ประมาณ 1 μm และที่ระดับส่วนท้ายของหัวประมาณ 1.5 μm (รูปที่ 61A-D)

Acrosome มีลักษณะเป็นรูปถ้วยหรือหมวกครอบอยู่ด้านหัว ใน section ที่ตัดผ่านขอบจะเห็น acrosome มีลักษณะเป็นสามเหลี่ยม (รูปที่ 62C,F) ส่วนใน section ที่ตัดผ่านกลางจะเห็นรอยบุ๋มของ acrosome ประกบกับรอยบุ๋มในหัวของนิวเคลียส (รูปที่ 62E; 63E,F) acrosome มีเยื่อหุ้ม 2 ชั้นคือ plasma membrane และ acrosomal membrane หุ้มรอบ acrosomal matrix ซึ่งมีเนื้อสม่ำเสมอและทึบแสงอิเล็กตรอนปานกลาง (รูปที่ 62E; 63E,F) ภายในช่องของรอยบุ๋มระหว่าง acrosome และส่วนหน้าของนิวเคลียสบรรจุสารทึบแสงอิเล็กตรอนที่มีลักษณะการเรียงตัวเป็นแบบ crystal lattice (รูปที่ 63E,F)

ภายในนิวเคลียสมีโครมาตินที่อัดกันแน่น ในหัวเซลล์อสุจิส่วนมากโครมาตินอัดกันอยู่แน่นมากจนมีลักษณะทึบแสงอิเล็กตรอน (รูปที่ 62A,B; 63A-D) แต่เซลล์อสุจิจำนวนหนึ่งมีเส้นโครมาตินที่หนาและทึบแสงอิเล็กตรอนซึ่งยังไม่อัดกันแน่น ทำให้ปรากฏช่องว่างหรือรูขนาดเล็กระหว่างใยโครมาตินเหล่านี้ (รูปที่ 62C,D) เซลล์อสุจิดังกล่าวอาจจะเป็นเซลล์ที่ยังไม่พัฒนาเต็มที่ โครมาตินจึงยังไม่อัดแน่นจนปรากฏทึบแสงอิเล็กตรอนเต็มที่ ซึ่งอาจเป็นขั้น Sz_1 นอกจากนั้นแล้วภายในนิวเคลียสของเซลล์อสุจิทุกเซลล์มี nuclear vacuoles ที่มีลักษณะใสปรากฏอยู่ทั่วไป (รูปที่ 62A-F; 63A-D)

ด้านท้ายของนิวเคลียสมีไมโตคอนเดรียที่มีลักษณะเป็นก้อนกลมติดอยู่ใน section ที่ตัดผ่านกลางตัวนิวเคลียส จะสังเกตเห็นไมโตครอนเดรีย 2 อัน ขนาบข้าง centriole ที่เป็นจุดเริ่มต้นโคนหางของเซลล์อสุจิ (รูปที่ 63C,D) แต่ใน cross section ของหัวที่ตัดผ่านระดับไมโตครอนเดรีย จะปรากฏว่ามีก้อนไมโตคอนเดรียที่มีลักษณะกลมเรียงตัวรอบ centriole อยู่ 5 อัน (รูปที่ 63A,B) ลักษณะและจำนวนของไมโตคอนเดรียดังกล่าว แสดงให้เห็นโดยชัดเจนใน SEM (รูปที่ 61C,D) บริเวณไซโตปลาสซึมรอบ ๆ ไมโตคอนเดรียที่ยังเหลืออยู่ในส่วนหัวของเซลล์อสุจิ มีเส้นใยขนาดเล็กขนาดประมาณ 15 nm ที่หยักไปมาโยงระหว่างไมโตคอนเดรียกับเยื่อหุ้ม plasma membrane ที่คลุมส่วนท้ายของหัวอสุจิ (รูปที่ 62B,C,F) เยื่อหุ้มแผ่นนอกของไมโตคอนเดรียบริเวณใกล้กับนิวเคลียส เชื่อมติดกับ nuclear membrane โดยแถบที่มีลักษณะคล้ายซิพ (รูปที่ 62C,E,F)

ส่วนหางของตัวอสุจิเริ่มจากท่อน centriole ที่มีด้านหน้าฝังติดกับแถบหนา 2 แถบ ที่เชื่อมอยู่กับด้านท้ายสุดของนิวเคลียส (รูปที่ 64A,B) ต่อจาก centriole คือ axoneme ซึ่งประกอบด้วย microtubules เรียงตัวตลอดความยาวของหาง axoneme แต่ละอันประกอบด้วย microtubule doublets วงนอก 9 ชุด อยู่รอบ doublet ที่อยู่ตรงกลางอีก 1 ชุด (รูปที่ 64C) axoneme ส่วนต้นถูกห่อหุ้มด้วย plasma membrane ที่หยักไปมา เนื่องจากอาจจะยังมีไซโตปลาสซึมที่ต่อเนื่องกับส่วนท้ายของหัวอสุจิเหลืออยู่ (รูปที่ 63C; 64C) ที่ส่วนกลางและส่วนปลายของหาง plasma membrane หุ้ม axoneme อย่างกระชับและมีลักษณะเรียบ (รูปที่ 64C,F) ที่ส่วนท้ายของหาง axoneme อาจจะมี microtubule doublets ไม่ครบจำนวน เนื่องจาก microtubule บางอันคงจะสั้นกว่าจำนวนที่เหลือ

รูปที่ 61 ภาพ SEM ของเซลล์อสุจิในอัณฑะ แสดงหัว (H) ที่มีรูปร่างคล้ายกรวย และมีหางยาว (T) (ภาพ A,B) ไมโตคอนเดรีย (Mi) มีลักษณะเป็นก้อนกลมเรียงกันอยู่รอบ ๆ โคนหาง (ภาพ C,D) acrosome (Ac) มีลักษณะคล้ายหมวกครอบอยู่ทางด้านหน้าของหัว (ภาพ C)

รูปที่ 62 A-F) ภาพ TEM แสดงโครงสร้างละเอียดของเซลล์อสุจิซึ่งประกอบด้วย nucleus (Nu) acrosome (Ac) plasma membrane (pm) mitochondria (Mi) ที่ติดอยู่กับด้านท้ายของหัวและ vacuole (Va) ในนิวเคลียส ภาพ C และ D แสดงนิวเคลียสที่โครมาตินยังไม่ประกบกันสนิท โดยยังปรากฏร่องหรือรูขนาดเล็ก (ลูกศร) อยู่ระหว่างเส้นใยโครมาตินที่หนามาก

รูปที่ 63 A-D) ภาพ TEM แสดงไมโตคอนเดรีย เซลล์อสุจิบางเซลล์ที่ตัดผ่านกลางเซลล์แสดงไมโตคอนเดรีย 2 อัน ขนาบข้าง centriole (Ce) ที่เป็นส่วนต้นของหาง (ภาพ D) บางเซลล์ที่ตัดผ่านระดับไมโตคอนเดรียเอง แสดงการเรียงตัวของไมโตคอนเดรีย 5 อัน อยู่เป็นวงรอบ centriole (Ce) (ลูกศร) (ภาพ A,B) บางเซลล์ที่ตัดผ่านระดับผิวแสดงไมโตคอนเดรีย 3 อัน (ภาพ A-ลูกศร) ไมโตคอนเดรียเชื่อมติดอยู่กับส่วนท้ายของนิวเคลียสด้วยแถบหนา (ภาพ D-ลูกศร) ด้านหน้าของนิวเคลียสคลุมโดย acrosome (ac) ซึ่งมีสารที่เรียงตัวคล้าย crystal lattice อยู่ในรอยบุ๋มหรือช่องระหว่าง acrosome และ nucleus (ภาพ E,F-ลูกศร)

รูปที่ 64 ภาพ TEM แสดงส่วนหางของเซลล์อสุจิ ซึ่งประกอบด้วย centriole (Ce) ที่เชื่อมติดอยู่กับนิวเคลียสด้วยแถบหนา (ภาพ A,B,D-ลูกศร) ในไซโตปลาสซึมระหว่างนิวเคลียสและไมโตคอนเดรียมี microtubule (mt) หยักไปมาโยงระหว่างนิวเคลียสกับ plasma membrane (ภาพ B,E) ส่วนหางตัดตามขวาง (ภาพ C) และส่วนหางตัดตามยาว (F)

Figure 6

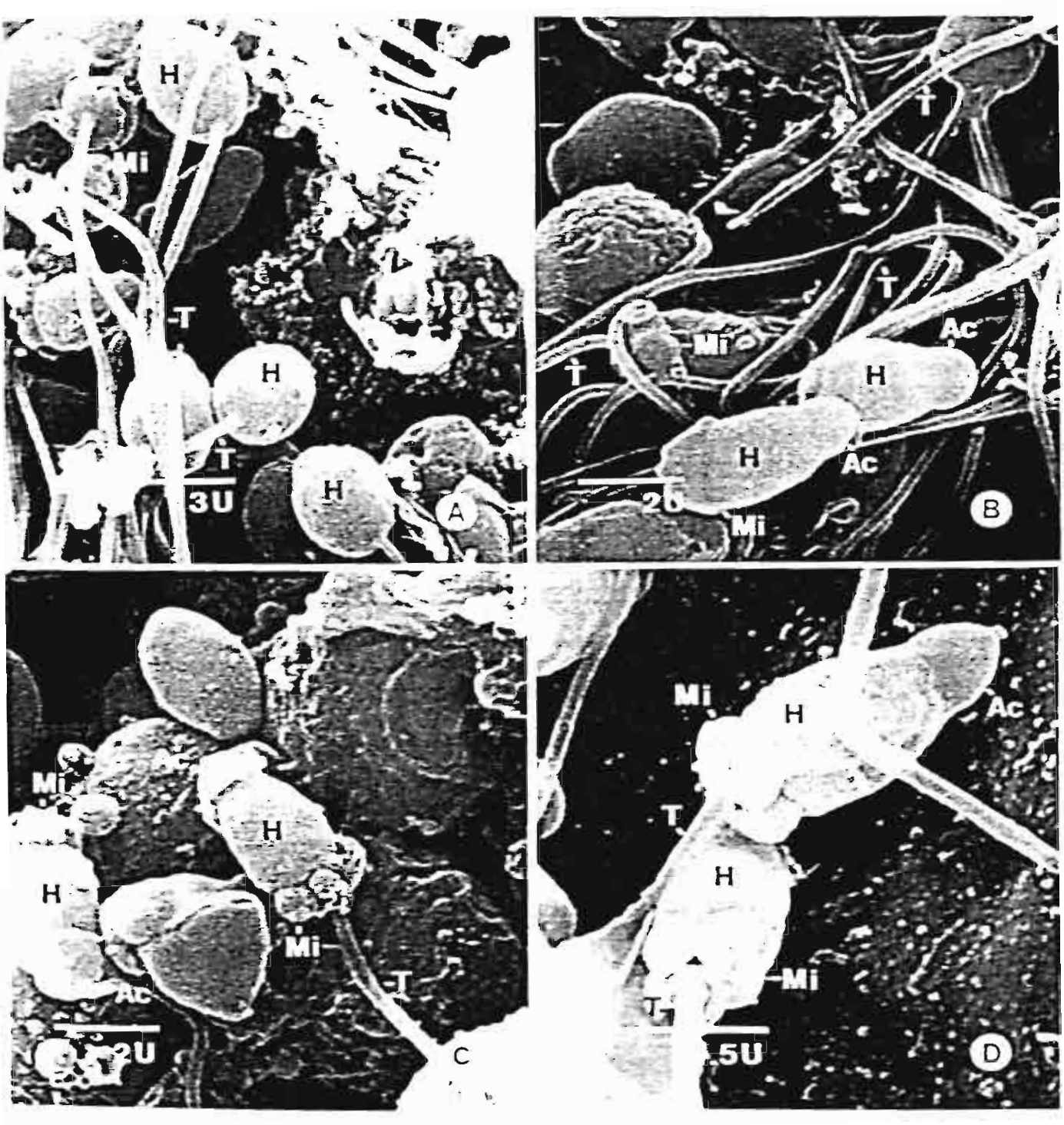


Figure 62

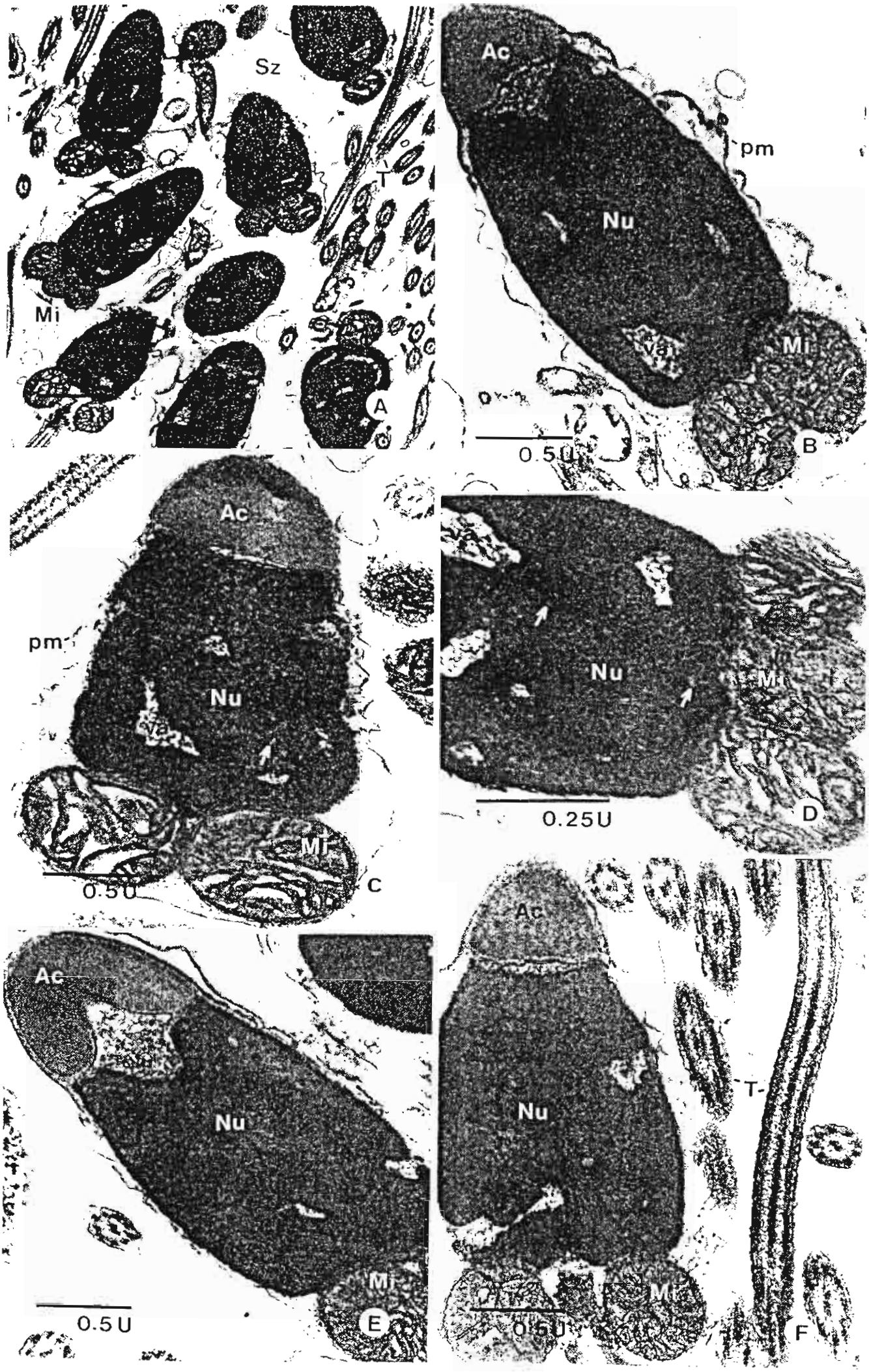

Sz
T
Mi
A
Ac
pm
Nu
Va
Mi
0.5U
B
Ac
pm
Nu
Va
Mi
0.5U
C
Nu
Mi
0.25U
D
Ac
Nu
Mi
0.5 U
E
Ac
Nu
T
Mi
0.5U
F

Figure 63

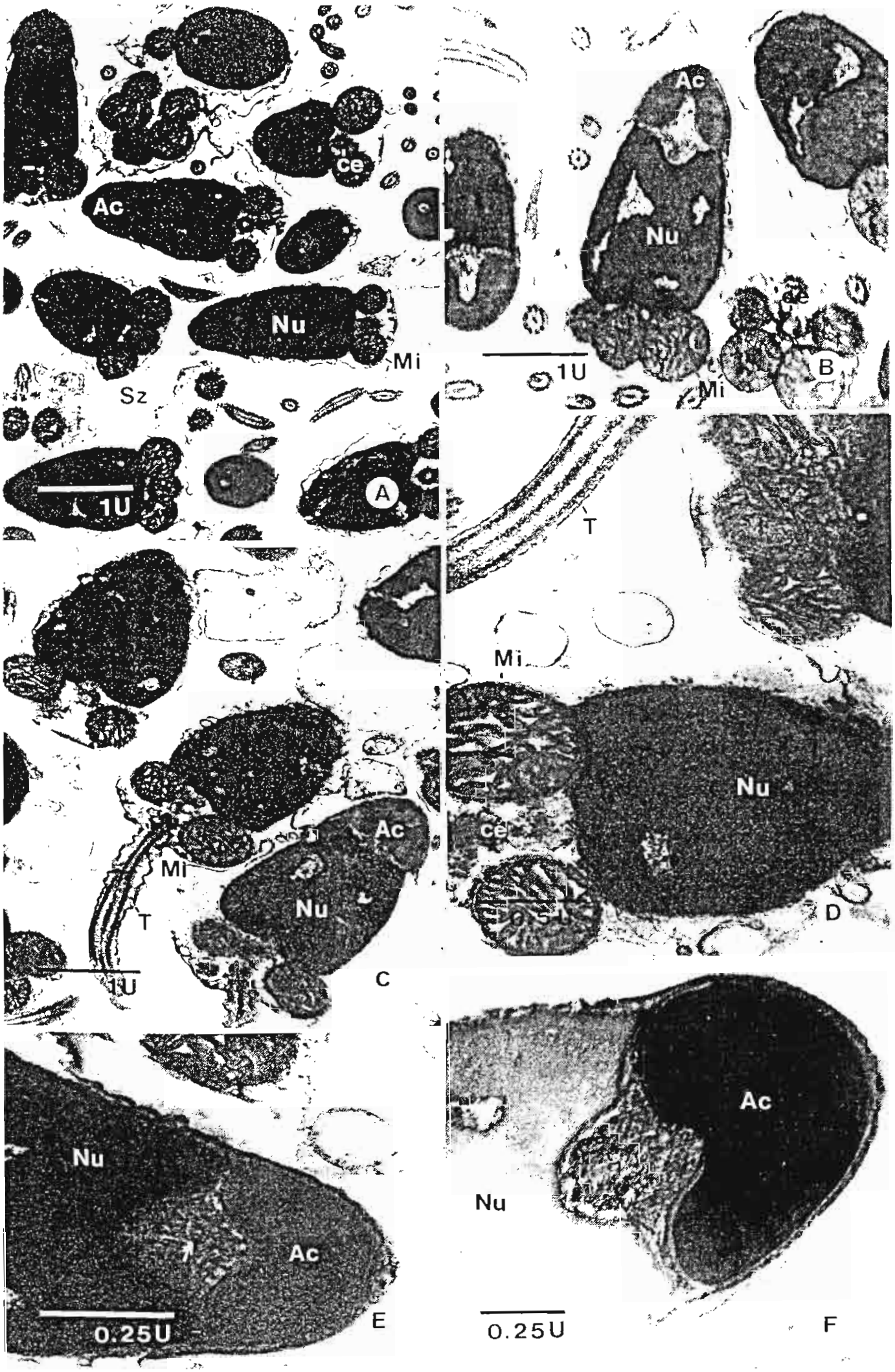
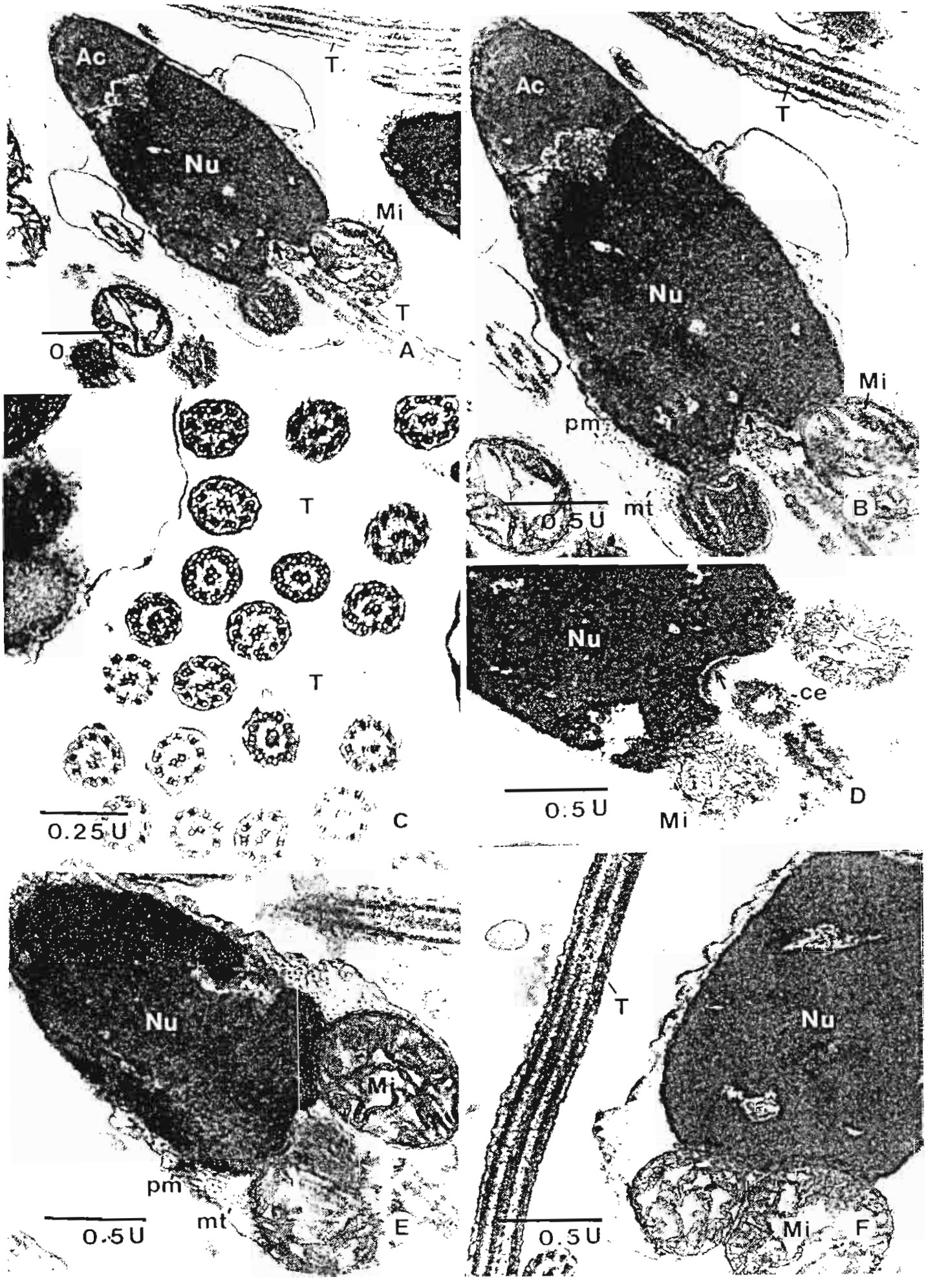


Figure 64


Ac
T
Nu
Mi
T
A
0.5U
T
T
T
0.25U
C
Ac
T
Nu
Mi
pm
mt
0.5U
B
Nu
ce
D
0.5U
Mi
Nu
Mi
pm
mt
0.5U
E
T
Nu
Mi
F

6.11 การศึกษาลักษณะและการจำแนกขั้นของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในรังไข่ด้วยจุลทรรศน์ธรรมดา

จากการศึกษาในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาด้วยเทคนิค paraffin และ semithin section แล้วย้อมด้วยสี Hematoxylin-eosin (H & E), PAS (Periodic acid Schiff) และ methylene blue สามารถแยกเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียออกได้เป็น 6 ระยะ คือ

Oogonia (Og) (รูปที่ 65B; 67A)

เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลมหรือรีเล็กน้อย ขนาดเล็กที่สุดในกลุ่ม โดยมีขนาดของตัวเซลล์ประมาณ 10-12 μm และขนาดของนิวเคลียสประมาณ 7 μm ภายในนิวเคลียสมี heterochromatin ก้อนเล็ก ๆ เกาะอยู่ด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียสคล้าย ๆ กับลักษณะของหน้าปัทม์นาฬิกา นิวคลีโอลัสยังมีขนาดเล็ก ส่วนกลางของนิวเคลียสประกอบด้วย euchromatin ซึ่งมีลักษณะใส เนื้อไซโตปลาสซึมใสและติดสีฟ้าอ่อน ๆ (จาก H & E และ methylene blue) ซึ่งแสดงคุณสมบัติ basophilia ของไซโตปลาซึมที่อาจเนื่องมาจากมีไรโบโซมอยู่ในปริมาณพอสมควร เซลล์ Og มักจะเกาะกันเป็นกลุ่ม ๆ อยู่ถัดไปทางด้านโคนของ traceculae ติดถุงหุ้มรังไข่ เซลล์ Og มี follicular cells ที่มีรูปร่างแบนขนาดเล็กประกบอยู่ทุกเซลล์

Oocyte ระยะที่หนึ่ง (Oc_1) (รูปที่ 65B,C; 67A,B)

เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีขนาดของตัวเซลล์ประมาณ 24 μm และมีขนาดของนิวเคลียสประมาณ 12 μm โครมาตินและนิวคลีโอปลาสซึมมีลักษณะทึบ นิวคลีโอลัสเป็นก้อนทึบเด่นชัด ถุงหุ้มนิวเคลียสมีขอบเขตที่ไม่ค่อยชัดเจน ไซโตปลาสซึมติดสีน้ำเงินเข้ม (จาก H & E และ methylene blue) ซึ่งแสดงถึงปริมาณของ basophilia ที่เป็นดรรชนีสะท้อนปริมาณของไรโบโซมที่เพิ่มขึ้น เซลล์ Oc_1 แต่ละเซลล์ถูกล้อมรอบด้วย follicular cell ซึ่งแผ่ไซโตปลาสซึมออกเป็นแผ่นแบนบางหุ้มรอบตัวเซลล์ Oc_1 เซลล์ Oc_1 ส่วนมากยังยังยึดติดอยู่กับเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae

Oocyte ระยะที่สอง (Oc_2) (รูปที่ 65B-D; 67B)

เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น และยืดออกเป็นรูปแท่งจากเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae รอบ ๆ เซลล์ Oc_2 มี follicular cells ห่อหุ้มอยู่ เซลล์ Oc_2 มีขนาดประมาณ 30 x 55 μm และนิวเคลียสของมันมีขนาดประมาณ 22 μm ภายในนิวเคลียสมีโครมาตินและนิวคลีโอปลาสซึมที่มีลักษณะโปร่งแสง ทำให้นิวคลีโอลัสปรากฏเด่นชัดขึ้น โครมาตินส่วนมากกลายเป็น euchromatin และภายในตัวนิวคลีโอลัสเองก็มีการคลี่ออกของเส้นใยโครมาติน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเริ่มมี genetic activities ทั้งจากโครมาตินและนิวคลีโอลัส ถุงหุ้มนิวเคลียส

ปรากฏเด่นชัด ไซโตปลาสซึมยังติดสีน้ำเงินแต่ไม่เข้มเหมือนกับเซลล์ Oc_1 นอกจากนั้นยังมี lipid droplets ซึ่งมักปรากฏเป็นฟองเล็ก ๆ ในไซโตปลาสซึมด้านที่อยู่ติดกับ trabeculae

Oocyte **ระยะที่สาม** (Oc_3) (รูปที่ 65B,C; 67B-D)

เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ขึ้นกว่า Oc_2 และมีรูปร่างคล้ายแก้วไวน์ที่ยังติดอยู่กับ trabeculae โดยด้านฐานซึ่งมีไซโตปลาสซึมที่แคบลง เซลล์มีขนาดประมาณ 35-70 µm และนิวเคลียสมีขนาดประมาณ 20 µm ภายในนิวเคลียสโครมาตินกลายสภาพเป็น euchromatin เกือบทั้งหมด นิวคลีโอปลาสซึมโปร่งแสงขึ้นมาก นิวคลีโอลัสขยายใหญ่และจางลง ซึ่งแสดงให้เห็นการคลี่ออกของ nucleolar chromatin และชี้บ่งว่ามีทั้ง chromosomal และ nucleolar activities เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ Oc_2 ถุงหุ้มนิวเคลียสปรากฏเด่นชัด นอกจาก lipid droplets ที่มีจำนวนมากขึ้นแล้ว ในไซโตปลาสซึมยังมีก้อน yolk platelets ซึ่งติดสีแดง (จาก H & E) กระจายอยู่ทั่วไป นอกจากนี้ยังมีเม็ดสีน้ำเงินละเอียดกระจายอยู่ทั่วไป โดยแทรกอยู่ระหว่างก้อน yolk ซึ่งอาจจะเป็นกลุ่มไรโบโซม follicular cells มีจำนวนมากขึ้น ทั้งในส่วนที่ล้อมรอบตัวเซลล์และที่ล้อมรอบส่วนฐานของเซลล์ซึ่งยังยึดติดกับแผ่น trabeculae

Oocyte **ระยะที่สี่** (Oc_4) (รูปที่ 66A,C; 67D)

เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ที่พัฒนาเกือบเต็มที่ ตัวเซลล์มีขนาดประมาณ 63 x 70 µm และนิวเคลียสมีขนาดประมาณ 35 µm โครมาตินภายในนิวเคลียสเป็น euchromatin ทั้งหมด และนิวคลีโอปลาสซึมโปร่งแสงเต็มที่ จึงทำให้สังเกตเห็นแนวของเยื่อหุ้มนิวเคลียสและนิวคลีโอลัสได้เด่นชัด ตัวนิวคลีโอลัสเองก็ขยายใหญ่เต็มที่ และโปร่งแสงขึ้นมากเมื่อเทียบกับระยะต้น ๆ ภายในไซโตปลาสซึมเต็มไปด้วยก้อน yolk ที่ติดสีแดงเข้ม lipid dropletes สีใส ๆ และเม็ดสีน้ำเงินซึ่งน่าจะเป็นกลุ่มของ cortical granules กระจายไปอยู่ตามขอบของเซลล์ใต้ชั้นเยื่อหุ้มเซลล์รอบ ๆ เยื่อหุ้มเซลล์เริ่มมีแผ่นบาง ๆ ของชั้น jelly coat ที่ติดสีชมพูจาก PAS ปรากฏขึ้นระหว่างชั้นเยื่อหุ้มเซลล์และแนวของ follicular cells ที่ยังหุ้มรอบ ๆ Oc_4 อยู่ อาจเป็นไปได้ว่า jelly coat ถูกสร้างขึ้นโดยทั้งเซลล์ไข่และ follicular cells เซลล์ Oc_4 บางเซลล์ยังยึดติดอยู่กับเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae โดยก้านไซโตปลาสซึมที่ยาวเรียว

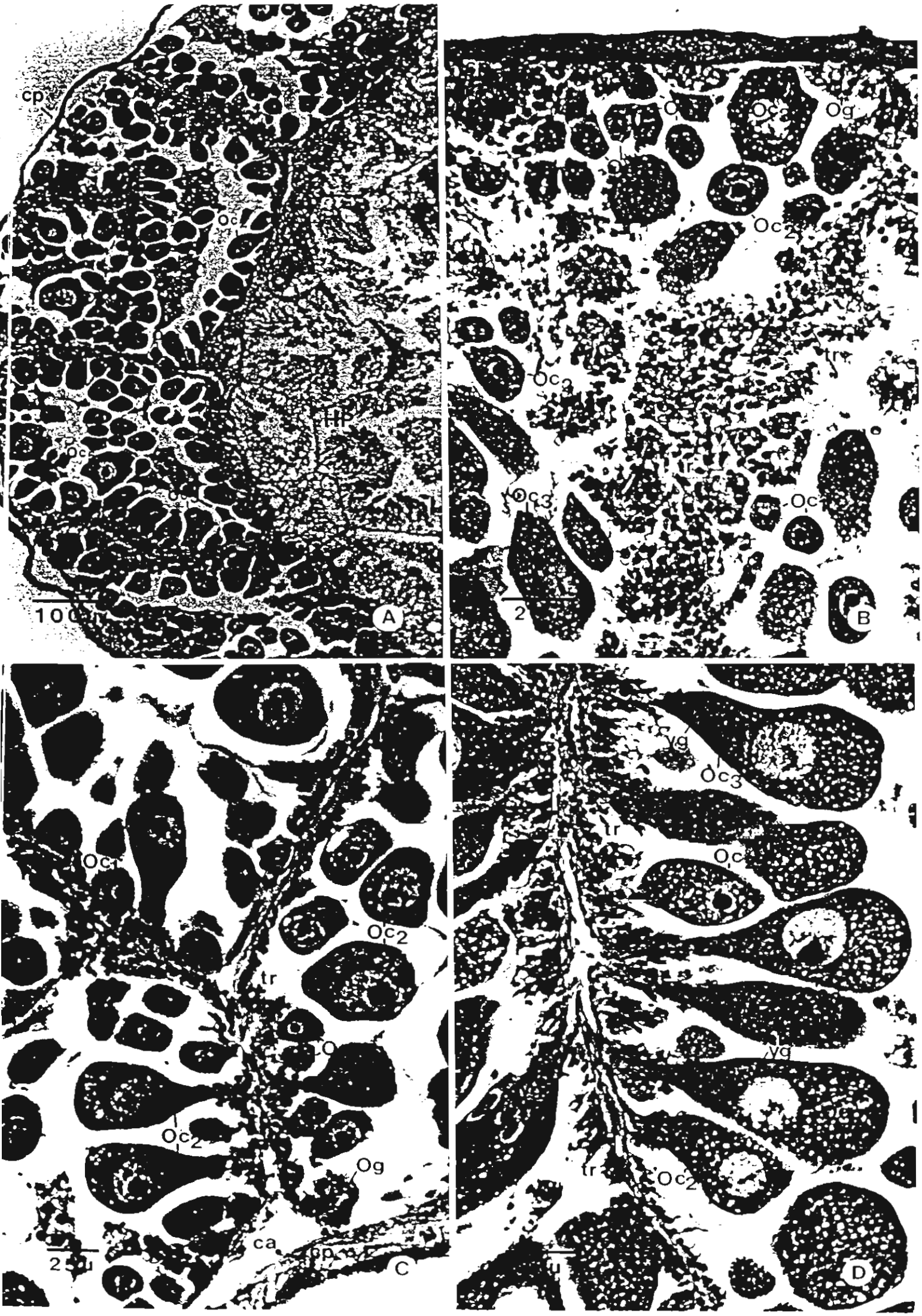
Oocyte **ระยะที่** 5 (Oc_5) (รูปที่ 66B-D; 67C,D)

เป็นเซลล์ไข่ที่พัฒนาเต็มที่ และเป็นขั้นสุดท้ายก่อนหน้าที่จะตกไข่ออกไปจากตัวหอย เซลล์ระยะนี้แบ่งออกเป็นสองกลุ่มย่อยที่มีลักษณะของก้อน yolk แตกต่างกัน แต่ลักษณะอื่น ๆ เหมือนกัน เซลล์ระยะนี้มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยมีขนาดเซลล์ประมาณ 70 x 140 µm และขนาดนิวเคลียสประมาณ 40 µm นิวเคลียสของเซลล์ในระยะนี้มีลักษณะเช่นเดียวกับนิวเคลียสของเซลล์ Oc_4 โดยมีโครมาตินที่กลายเป็น euchromatin ทั้งหมด และนิวคลีโอลัสโปร่ง

รูปที่ 65 ภาพ LM paraffin sections **ของรังไข่ที่ย้อมด้วยสี** H & E **แสดงเซลล์** oogonia (og) **และ** oocytes **ขั้นต้น** (Oc_1, Oc_2, Oc_3) **ที่ยังติดอยู่กับแผ่น** trabeculae (tr)

รูปที่ 66 ภาพ LM paraffin sections **ของรังไข่ย้อมด้วยสี** PAS **แสดงเซลล์** oocytes **ขั้นปลาย** (Oc_4, Oc_5) **ซึ่งพัฒนา** jelly coat (jc) **เกือบเต็มที่**

รูปที่ 67 Semithin sections **ของรังไข่ย้อมด้วยสี** methylene blue **แสดงเซลล์** oocytes **ขั้นต่าง ๆ** (Oc_1, Oc_2, Oc_3, Oc_4, Oc_5) oogonia (Og) **และเซลล์ต่าง ๆ ใน** trabeculae (tr), yg-yolk granules, jc-jelly coat, gm-granular cells in trabeculae


cp
oc
oc
HP
100
A
Oc
Oc2
Og
Oc2
tr
Oc3
Oc3
Oc
2
B
Oc
Oc2
tr
O
O
Oc2
Og
ca
25 u
C
Vg
Oc3
tr
Oc
Vg
Vg
tr
Oc2
u
D

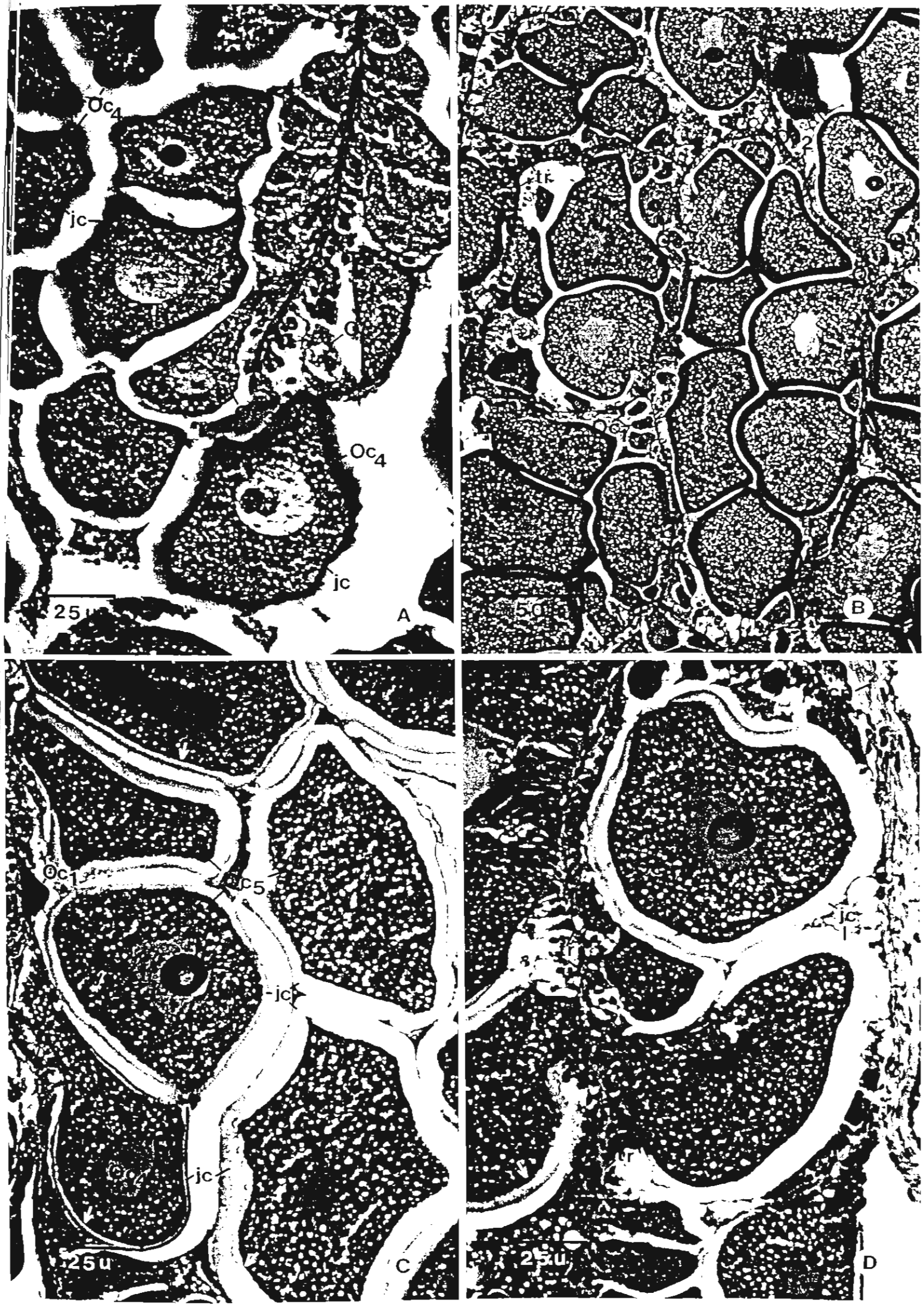
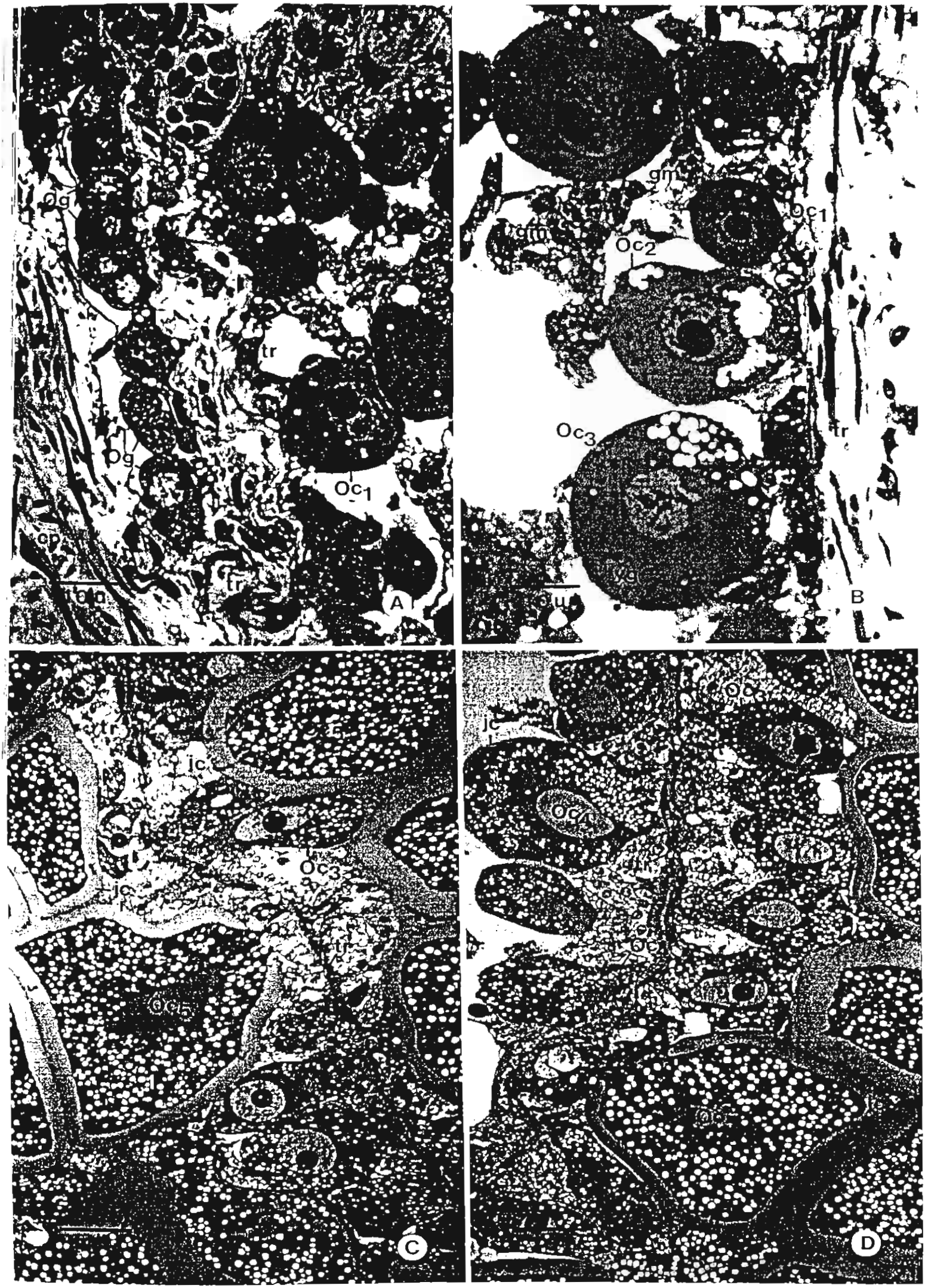

Oc4
jc
Oc4
jc
25u
A
tr
50
B
Oc1
Oc5
jc
jc
25u
C
jc
tr
25u
D

Figure 67



6.12 การศึกษาลักษณะโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต่าง ๆ ในรังไข่โดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM

เราสามารถแยกเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในหอยเป๋าฮื้อ ที่มีอยู่ในรังไข่ตามลักษณะที่ปรากฏในจุลทรรศน์ธรรมดาออกเป็น 5 ระยะ ได้แก่ ระยะ Oogonia, Oocyte I, Oocyte II, Oocyte III, Oocyte IV และ Oocyte V ตามที่กล่าวมาแล้วในข้อ 6.11 เราได้ศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์แต่ละขั้นเพิ่มเติมโดย TEM และได้ข้อสรุปดังนี้

Oogonia (Og)

ใน semithin section ที่ย้อมด้วยสี methylene blue Og เป็นเซลล์รูปร่างกลม มีขนาดประมาณ 8-10 μm เกาะติดอยู่กับเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae โดยเฉพาะด้านที่อยู่ใกล้กับ capsule นิวเคลียสมีนิวคลีโอลัสอยู่ 1 หรือ 2 อันซึ่งปรากฏเด่นชัด มีแถบ heterochromatin บาง ๆ เกาะอยู่ตามขอบในของนิวเคลียส เนื้อนิวคลีโอปลาสซึมค่อนข้างใส และมักมีก้อน heterochromatin เล็ก ๆ กระจายอยู่ทั่วไป ไซโตปลาสซึมมีปริมาณน้อยและติดสี methylene blue ค่อนข้างเข้ม ซึ่งแสดงว่ามีก้อน ribosomes อัดกันอยู่พอประมาณ ซึ่งสังเกตเห็นได้ใน TEM ระยะนี้ยังไม่มีการพัฒนาออแกนเนลชนิดอื่น เช่น rough endoplasmic reticulum (RER) หรือ Golgi complex (GC) อีกทั้งยังไม่ปรากฏ secretory granule (SG) ในไซโตปลาสซึม

Oocyte ระยะที่ 1 (Oc_1)

เซลล์ในระยะนี้มีรูปร่างกลมขนาดประมาณ 12-25 μm เซลล์ขั้นนี้มีลักษณะเด่นคือ ใน Oc_1 ระยะต้น นิวเคลียสมีนิวคลีโอลัสขนาดใหญ่ขึ้นมากเมื่อเทียบกับใน Og เนื้อนิวคลีโอปลาสซึมทึบแสงอิเล็กตรอนมากขึ้น เนื่องจากมีไยโครมาตินขนาดเล็กอัดกันอยู่แน่น นอกจากนั้นยังมีแถบหนาของ lampbrush chromosomes จำนวนมากกระจายอยู่ทั่วทั้งนิวเคลียส ทำให้นิวเคลียสปรากฏเป็นลายซัดเจน (รูปที่ 68D,E; 69A-D) lampbrush chromosome ประกอบด้วยเส้นไยโครมาตินขนาดใหญ่ ซึ่งใน cross section ปรากฏเป็นจุดกลม มีเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 100-120 nm lampbrush chromosomes โยงต่อกันด้วยเส้นไยโครมาตินขนาดเล็กซึ่งสานกันอยู่ทั่วทั้งนิวเคลียส (รูปที่ 69B,D,E,F) ไซโตปลาสซึมมีไรโบโซมอัดกันอยู่แน่น ดังนั้นใน semithin section ไซโตปลาสซึมของ Oc_1 จึงติดสี methylene blue ค่อนข้างเข้มขึ้นเมื่อเทียบกับ Og มีการพัฒนา RER และ GC ขึ้นแต่ยังมีขนาดเล็กและจำนวนน้อย นอกจากนั้นมีก้อน SG รูปร่างกลมขนาดประมาณ 560 nm ปรากฏอยู่ประปรายทั่วไซโตปลาสซึม และอาจจะมี lipid droplet อยู่ 1-2 อันต่อส่วนตัดขวางของเซลล์ ขนาดประมาณ 650 nm (รูปที่ 68A-C)

ใน Oc_1 ระยะปลาย เซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้นมาก (รูปที่ 70A,B) นิวเคลียสมีนิวคลีโอลัสที่ขยายใหญ่ขึ้น และทึบแสงอิเล็กตรอนน้อยลง โดยขอบนอกมีความทึบมากกว่าส่วน

กลาง ซึ่งสามารถสังเกตเห็นเส้นใยและก้อนของสารอัดกันแน่นอยู่ 2 ก้อน (รูปที่ 71A-C) จากนิวคลีโอลัสมีสายใยโครมาตินขนาดต่าง ๆ ทอดออกไปเป็นเส้นตรงตั้งฉากกับผิวของนิวคลีโอลัส (รูปที่ 71A-C) Lampbrush chromosomes เหลืออยู่น้อยเมื่อเทียบกับระยะต้น ส่วนมากจะคลี่ออกไปเป็นเส้นใยขนาดกลาง มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 40-60 nm และเส้นใยขนาดเล็กเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 7-12 nm ซึ่งสานกันอยู่ทั่วทั้งนิวเคลียส บางบริเวณในนิวเคลียสมีก้อนทึบแสงอิเล็กตรอนที่ประกอบด้วยเม็ดเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 25 nm อัดกันอยู่แน่น ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับ precursors ของไรโบโซม (รูปที่ 70C-F; 73E) ในไซโตปลาสซึมมี lipid droplets อยู่น้อยมากหรือไม่มีเลย เนื้อของไซโตปลาสซึมประกอบด้วยใย microtrabeculae ที่สานกันไปมาและมีไรโบโซมเกาะอยู่อย่างหนาแน่น มีไมโตคอนเดรียกระจายอยู่ทั่วไปจำนวนมาก แต่มีออแกนเนลชนิดอื่น ได้แก่ RER และ GC อยู่น้อยมาก ในระยะนี้ยังไม่ปรากฏ secretory granules นอกจากที่เหลือมาจากระยะ Oc, ตอนต้น ลักษณะที่เป็นเอกลักษณ์ของ Oc, ขั้นปลายคือ ก้อนสารทึบแสงอิเล็กตรอนที่กระจายอยู่รอบ ๆ นิวเคลียส บางก้อนอยู่เกือบติดกับถุงหุ้มนิวเคลียส โดยเฉพาะบริเวณที่มีนิวคลีโอพอร์ (nucleopores) อยู่จำนวนมาก (รูปที่ 70B-D) ก้อนเหล่านี้ประกอบด้วยเม็ดเล็ก ๆ ที่อัดกันแน่น และที่ขอบของก้อนมีเส้นใยแตกตกไปเชื่อมกับ microtrabecular fibers ที่มีเม็ดไรโบโซมเกาะอยู่ (รูปที่ 70D-F) อาจจะเป็นไปได้ว่าก้อนเหล่านี้คือ ไรโบโซมที่เพิ่งผ่านออกมาจากนิวเคลียส และกระจุกตัวอยู่บนใย microtrabeculae ก่อนหน้าที่ไรโบโซมจะกระจายออกไป พร้อมกับการคลี่ของใย microtrabeculae กลายเป็นร่างแหที่มีลักษณะโปร่งที่มีไรโบโซมเกาะอยู่ เช่นที่พบในไซโตปลาสซึมทั่วไป เราจึงเรียกก้อนเหล่านี้ว่า ribosomal microtrabecular mass (RMM)

จากข้อมูลดังกล่าวทำให้เราคิดว่า Oc, ที่เคยเป็นเซลล์ที่ถูกจัดเป็นกลุ่มเดียวเมื่อสังเกตด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา น่าจะถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ Oc, ขั้นต้น ซึ่งเป็นตอนที่มีการสังเคราะห์ DNA อย่างรวดเร็วจนกระทั่งทำให้เกิด lampbrush chromosomes หนาเนื่องจากสายใย DNA ที่เพิ่มจำนวนยังไม่แยกตัวจากกัน ต่อจากนั้นเมื่อถึง Oc, ขั้นปลาย lampbrush chromosomes เริ่มคลี่และใยโครมาตินกระจายออกทั่วทั้งนิวเคลียส นิวคลีโอลัสเองก็มีการสร้างไรโบโซมออกมามากมาย ซึ่งจะเห็นจากการขยายตัวออกของมัน โดยภายในปรากฏเป็นเส้นใยบาง ๆ เซลล์ขั้นนี้มีลักษณะเด่นมากคือ มีก้อนทึบแสงในไซโตปลาสซึมที่มักอยู่ติดกับถุงหุ้มนิวเคลียส ที่อาจจะเป็นก้อนที่เกิดจากการกระจุกตัวของไรโบโซมก่อนที่จะกระจายออกไปทั่วทั้งไซโตปลาสซึม ระยะ Oc, จึงเป็นระยะที่มีทั้งการสังเคราะห์ DNA ในรูปของ lampbrush chromosomes และการสร้างไรโบโซมในปริมาณสูงมากที่เริ่มกระจายออกไปสู่ไซโตปลาสซึม จึงอาจเรียกว่าเซลล์ขั้นนี้เป็น Ribosomal stage

Oocyte ระยะที่ 2 (Oc_2)

เป็นเซลล์ที่ยังมีรูปร่างกลม มีด้านหนึ่งติดแน่นอยู่กับแผ่น trabeculae ของรังไข่ เซลล์มีขนาดประมาณ 25-35 μm ลักษณะเด่นที่สังเกตเห็นได้ใน semithin section คือมี lipid droplet เพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก และมักจะเกาะกันอยู่เป็นกลุ่ม ๆ ภายในไซโตปลาสซึม (รูปที่ 67B; 72A) นิวคลีโอลัสมีขนาดใหญ่ และมีความโปร่งแสงอิเล็กตรอนใกล้เคียงกับที่เห็นใน Oc_1 ขั้นปลาย โครมาตินส่วนใหญ่คลี่ออกเป็นสายใยขนาดเล็กที่สานกันไปมา โดยมีปริมาณ lampbrush chromosomes ลดลง (รูปที่ 73A,C,D) ในระยะนี้มี nucleopore จำนวนมากและสังเกตเห็นได้ชัด nucleopore แต่ละอันประกอบด้วยก้อน central complex 1 ก้อน ล้อมรอบด้วย peripheral complexes 6-8 ก้อน (รูปที่ 73F) นอกจากการเพิ่มจำนวน lipid droplet แล้ว ลักษณะเด่นอีกประการหนึ่งในไซโตปลาสซึมคือ การเพิ่มจำนวนของ Golgi complexes (GC) ซึ่งมีกระจายอยู่เกือบทั่วทั้งไซโตปลาสซึม ถึงแม้ GC แต่ละอันจะมีการพัฒนาเป็นเยื่อซ้อนกันหลายชั้น และดูเกือบจะสมบูรณ์ แต่ก็ยังไม่มีการสร้าง secretory granules (SG) ที่เห็นได้ชัด (รูปที่ 72B,C) เนื้อไซโตปลาสซึมประกอบด้วยใย microtrabeculae สานกันไปมา และมีไรโบโซมเกาะอยู่จำนวนมาก (รูปที่ 72C-E) บางบริเวณมี ribosomal-microtrabecular mass (RMM) ที่ยังคงเหลืออยู่จากระยะ OC_1 แต่โดยทั่วไป RMM มีปริมาณน้อยกว่าที่พบใน Oc_1 มาก ในระยะ Oc_2 มีการเริ่มสร้าง SG ที่กระจายอยู่เป็นกลุ่มเล็ก ๆ โดย SG มี 2 แบบคือ แบบที่หนึ่ง (SG_1) เป็นก้อนกลมขนาดประมาณ 400-450 nm ภายในมีเนื้อทึบแสงอิเล็กตรอน แบบที่สอง (SG_2) มีลักษณะเป็นก้อนกลมขนาดประมาณ 330-370 nm ภายในมีเนื้อค่อนข้างโปร่งแสงอิเล็กตรอน จากการสังเกตลักษณะและการกระจายของ SG_1 ที่พบในระยะ Oc_4 และ Oc_5 ทำให้เราคิดว่า SG_1 คือแกรนูลที่มีสารสร้าง vitelline-jelly coat ส่วน SG_2 อาจจะเป็น cortical granules เซลล์ Oc_2 จึงเป็นระยะที่เซลล์เตรียมตัวสร้าง SG โดยการเพิ่มปริมาณและขนาดของ GC ทั่วทั้งไซโตปลาสซึม จึงอาจจะเรียกว่าเป็นระยะ Golgi stage

Oocyte ระยะที่ 3 (Oc_3)

ระยะนี้เซลล์เริ่มแยกตัวออกจาก trabeculae โดยเซลล์มีลักษณะคล้ายขวด (flask) มีด้านแคบหรือขั้วติดอยู่กับ trabeculae ลักษณะเด่นคือ เซลล์เริ่มมีแกรนูลทึบแสงขนาดใหญ่เกิดขึ้นในไซโตปลาสซึมซึ่งอาจจะเป็น yolk granules (รูปที่ 67B; 74A) เซลล์ Oc_3 มีขนาดประมาณ 35 x 70 μm นิวเคลียสมีลักษณะคล้ายกับของ Oc_2 แต่มี lampbrush chromosomes เหลืออยู่จำนวนน้อย โดยส่วนมากปรากฏเป็นท่อนสั้น ๆ โครมาตินส่วนมากกลายเป็นสายใยขนาดเล็กที่สานกันไปมาทั่วทั้งนิวเคลียส (รูปที่ 74B) ลักษณะเด่นของไซโตปลาสซึม คือการเพิ่มปริมาณแกรนูลโดยเฉพาะ SG_1 และ SG_2 ซึ่งมักรวมกันอยู่เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ กระจายเป็นกระจุกอยู่

ทั่วทั้งไซโตปลาสซึม โดย SG_1 มักมีปริมาณมากกว่า SG_2 (รูปที่ 74C) ในกลุ่ม SG แต่ละกลุ่มมักจะมี Golgi complex อยู่อย่างน้อย 1 อัน โดยบริเวณใกล้ ๆ กับ GC มักมี transitional granules ขนาดต่าง ๆ กระจายอยู่รอบ ๆ (รูปที่ 74C-E) ใน SG แต่ละกลุ่มจะมีทั้ง SG_1 และ SG_2 อยู่ปะปนกัน ส่วน Yolk granules ซึ่งมีขนาดใหญ่และทึบแสงอิเล็กตรอนยังมีจำนวนค่อนข้างน้อย ในบางบริเวณของไซโตปลาสซึมอาจมี ribosomal-microtrabecular mass เหลืออยู่ (รูปที่ 74F) Oc_3 จึงถือได้ว่าเป็นระยะที่มีการสร้าง SG ในอัตราสูงและปริมาณมาก จึงอาจจะเรียกว่าเป็นระยะ SG-synthetic stage

Oocyte ระยะที่ 4 (Oc_4)

ระยะนี้เซลล์เกือบจะแยกตัวออกจากแผ่น trabeculae โดยยังคงมีเพียงขั้วเรียวแคบโยงติดกับเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae (รูปที่ 67D) ตัวเซลล์มีขนาดประมาณ 50 x 80 µm ลักษณะเด่นของเซลล์ชนิดนี้ที่สังเกตเห็นใน semithin section คือปริมาณ lipid droplets ที่มีจำนวนมาก และกระจายอยู่เกือบทั่วทั้งไซโตปลาสซึม และจำนวน yolk granules ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 75A,B) เมื่อสังเกตด้วย TEM Oc_4 มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ภายในมีนิวคลีโอลัสขนาดใหญ่และโปร่งแสงอิเล็กตรอนมากกว่าขั้น Oc_{1-3} ภายในนิวคลีโอลัสปรากฏเป็นแถบเข้มสานกันไปมาในพื้นที่ค่อนข้างโปร่งแสงอิเล็กตรอน บางแห่งอาจจะมี nucleolar vacuoles เกิดขึ้นด้วย (รูปที่ 76A,C,D) รอบ ๆ ขอบนิวคลีโอลัสมีใยโครมาตินขนาดเล็กแผ่ออกมาจากผิว (รูปที่ 76B) lampbrush chromosomes เหลืออยู่น้อยมาก โดยโครมาตินส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นใยขนาดเล็กและละเอียดสานกันไปมา (รูปที่ 76E,F)

ในไซโตปลาสซึมของ Oc_4 นอกจากมี lipid droplets ขนาดประมาณ 1500-3000 nm และ SG_1 และ SG_2 จำนวนมากแล้วยังมี yolk granules (yg) ที่มีลักษณะเป็นรูปไข่และมีเนื้อทึบแสงอิเล็กตรอนขนาดประมาณ 1500-2500 nm กระจายอยู่ทั่วไป (รูปที่ 76A-D) เนื้อไซโตปลาสซึมระหว่าง granules และ lipid droplets ค่อนข้างทึบกว่าใน Oc_3 และประกอบด้วยไรโบโซมอัดกันอยู่แน่น (รูปที่ 75C,F) ผิวของ Oc_4 ปรับเป็นแผง microvilli จำนวนมากยื่นออกไปในชั้น vitelline หรือ jelly coat ที่มีเนื้อใสและสม่ำเสมอห่อหุ้มเยื่อหุ้มเซลล์ vitelline และ jelly coat ไม่แยกจากกันเหมือนในไข่ของหอยเม่น (sea urchin) หรือไข่ของหอยเป๋าฮื้อที่พบในเขตอบอุ่น ซึ่งแยกเป็นสองชั้นชัดเจน ชั้น vitelline-jelly coat อาจถูกสร้างโดยการหลั่งสารจาก SG_1 ออกมาเชื่อมกับเยื่อหุ้มเซลล์ (รูปที่ 75D) นอกจาก SG_1 แล้วส่วนของไซโตปลาสซึมที่อยู่ใต้เยื่อหุ้มมักมี mitochondria กระจายอยู่จำนวนมาก (รูปที่ 75F) เซลล์ Oc_4 จึงเป็นระยะที่มีการสร้าง yolk granules เพิ่มปริมาณมากขึ้นอย่างรวดเร็ว และเริ่มมีการสร้าง vitelline-jelly coat (VJC) พร้อมกันด้วย จึงอาจจะเรียกว่าเป็น YG-VJC synthetic stage

Oocyte ระยะที่ 5 (Oc_5)

เซลล์ Oc_5 เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่สุดประมาณ 90 x 110 μm ใน semithin section เซลล์ระยะนี้ติดสี methylene blue เข้มกว่าระยะ Oc_3 และ Oc_4 เนื่องจากมี yolk granules ขนาดใหญ่ (1600-3400 nm) ซึ่งติดสีน้ำเงินเข้มเพิ่มจำนวนมากขึ้น และกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งไซโตปลาสซึม ชั้น vitelline-jelly coat รอบเซลล์ Oc_5 มีความหนาสม่ำเสมอแตกต่างจากระยะ Oc_4 ซึ่งมี vitelline-jelly coat บางและขนาดไม่สม่ำเสมอ (รูปที่ 67C,D) เมื่อสังเกตด้วย TEM นิวเคลียสของ Oc_5 มีขนาดใหญ่มาก นิวคลีโอลัสเด่นและขยายใหญ่ทำให้โปร่งแสงอิเล็กตรอนเช่นเดียวกับนิวเคลียสใน Oc_4 lampbrush chromosomes ไม่เหลืออยู่เลย และโครมาตินส่วนมากมีลักษณะเป็นเส้นใยละเอียดขนาดเล็กสานกันไปมาทั่วทั้งนิวเคลียส จึงทำให้นิวเคลียสดูใสสม่ำเสมอ และค่อนข้างโปร่งแสงอิเล็กตรอนเช่นเดียวกับ Oc_4 (รูปที่ 76E,F; 77A,B) ภายในไซโตปลาสซึมมี SG_1, SG_2 ซึ่งเป็นแกรนูลขนาดเล็กที่กระจายอยู่ทั่วไป แต่มักจะมีจำนวนมากเป็นพิเศษที่บริเวณไซโตปลาสซึมใต้เยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีจำนวนหนึ่งเคลื่อนออกไปเชื่อมกับเยื่อหุ้ม การรวมตัวของแกรนูล SG_1 และ SG_2 ใต้เยื่อหุ้มเซลล์น่าจะเป็นสาเหตุที่ทำให้สังเกตเห็นแถบสีน้ำเงินบาง ๆ ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ทั้งใน paraffin และ semithin sections บางเซลล์มีการปล่อยสารจาก SG_1 ออกไปสู่ vitelline jelly coat โดย exocytosis ทำให้ vitelline-jelly coat เปลี่ยนจากสภาพที่มีเนื้อโปร่งแสงสม่ำเสมอ กลายเป็นลักษณะที่มีเส้นใยหนาติดสีเข้มสานกันไปมา (รูปที่ 78A,B,E,F) ในรูปขยายใหญ่ vitelline-jelly coat ในสภาพที่มีเนื้อสม่ำเสมอนั้นที่จริงแล้วประกอบด้วยเส้นใยขนาดเล็กสานกันอยู่แน่นและสม่ำเสมอ (รูปที่ 78C) แต่ในสภาพที่ถูกกระตุ้นจากการปล่อยสารจาก SG_1 จำนวนมาก เส้นใยเหล่านี้รวมกันเป็นมัด ๆ ขนาดใหญ่ขึ้น จึงทำให้เกิดมีช่องว่างระหว่างใยเหล่านี้ (รูปที่ 78C,E,F)

นอกจากลักษณะพิเศษของ vitelline-jelly coat และชั้นรอบนอกของไซโตปลาสซึมแล้ว Oc_5 ยังมีก้อน yolk granule ขนาดใหญ่ที่ทึบแสงอิเล็กตรอนอัดกันอยู่ทั่วทั้งไซโตปลาสซึม lipid droplets ก็มีจำนวนมาก และกระจายทั่วเซลล์ยกเว้นบริเวณไซโตปลาสซึมรอบ ๆ นิวเคลียส (รูปที่ 77A-F) ระยะ Oc_5 จึงเป็นระยะที่เซลล์ได้พัฒนาส่วนต่าง ๆ สมบูรณ์และอาจเรียกว่าเป็น mature stage

รูปที่ 68 A-F) ภาพ TEM ของเซลล์ oocyte ระยะต้น แสดง lampbrush chromosomes (Ch) nucleolus (no) granules (gr) ขนาดเล็กในไซโตปลาสซึม และแถบ rough endoplasmic reticulum (rer)

รูปที่ 69 A-C) ภาพ TEM ของ lampbrush chromosome (Ch) และ nucleolus (no) ที่มี vacuole (va)

D-F) ภาพแสดงไยโครโมโซมขนาดต่าง ๆ กัน 3 ขนาดในตัว lampbrush chromosomes และบริเวณรอบ ๆ (1, 2, 3)

รูปที่ 70 A,B) ภาพ TEM ของ oocyte I ระยะปลายแสดงนิวเคลียสที่มี lampbrush chromosomes (Ch) และ nucleolus (no)

D-F) ภาพแสดง ribosomal-microtrabecular mass (rmm) รูป F แสดงการกระจายตัวของ rmm ออกเป็นไย microtrabeculae ที่มีไรโบโซมเกาะอยู่ (ลูกศร)

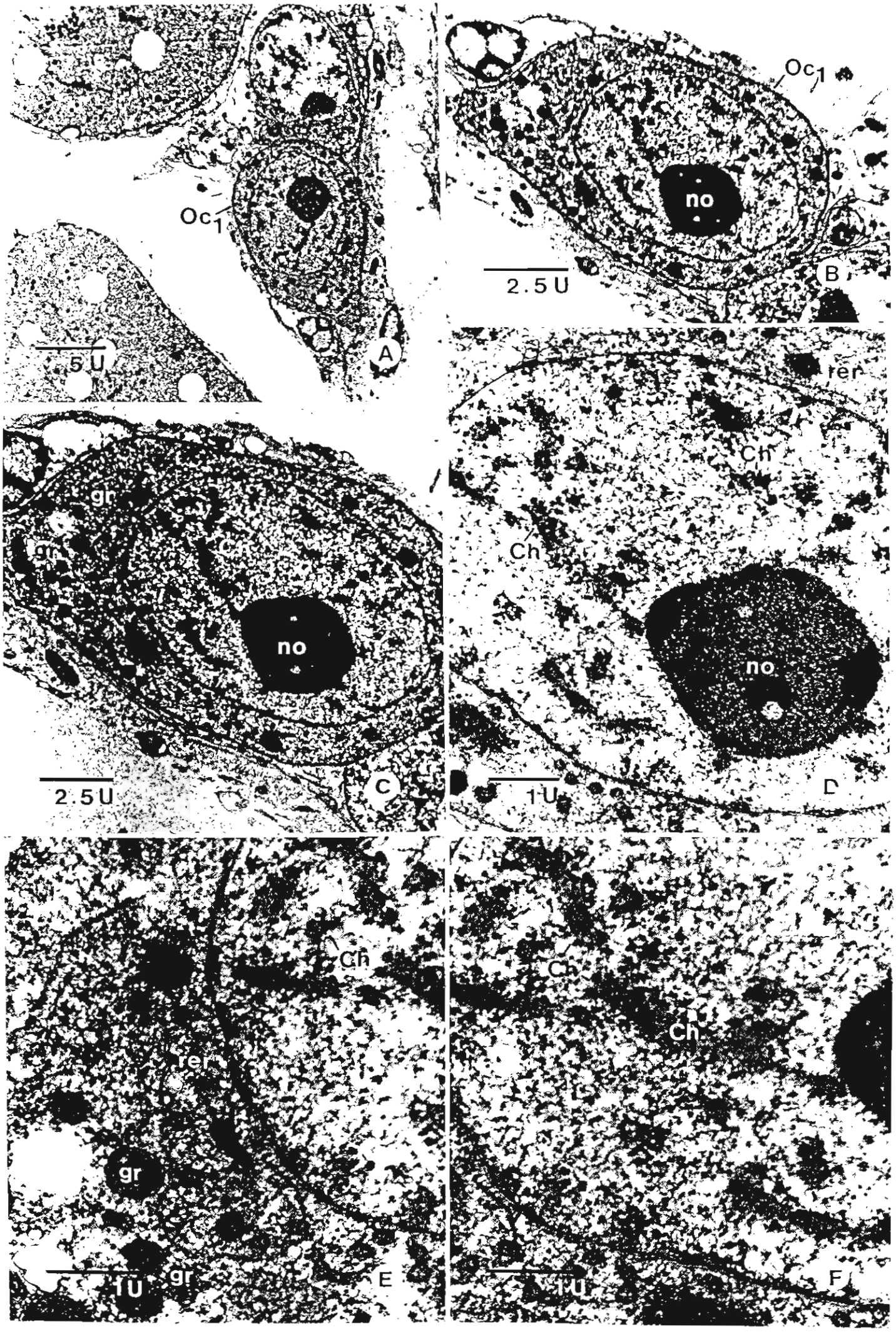
รูปที่ 71 A-C) ภาพ TEM ของ oocyte I ระยะปลาย แสดงนิวคลีโอลัส (no) ที่ขยายใหญ่ และไยโครมาตินรอบ ๆ (Ch)

D-F) ภาพแสดงไยโครมาตินแบบหนาใน lampbrush chromosomes ที่เหลืออยู่ (1) และไยขนาดกลางกับขนาดเล็กที่อยู่รอบ ๆ (2, 3)

รูปที่ 72 ภาพ TEM ของเซลล์ oocyte II แสดงนิวเคลียส (nu) nucleolus (no) (ภาพ A) ไซโตปลาสซึมที่มี Golgi complex (Gc) อยู่จำนวนมาก (ภาพ B) Golgi complex ล้อมรอบด้วยไย microtrabeculae ที่มีไรโบโซมเกาะอยู่ (ลูกศร) (ภาพ C) แกรนูลขนาดเล็กแบบ SG_1 และ SG_2 (ภาพ D,E) กับ ribosomal microtrabecular mass (rmm)

รูปที่ 73 ภาพ TEM ของเซลล์ oocyte II แสดง nucleolus ที่ขยายใหญ่ (no) และ lampbrush chromosomes (Ch) ที่เหลืออยู่ (ภาพ A,B) เส้นไยโครมาตินที่คลี่ออกจาก lampbrush chromosomes ขนาดกลางและขนาดเล็ก (2, 3) (ภาพ C,D) และก้อนของ ribosomal mass (rm) (ภาพ E) กับ nucleopore (np) ใน nuclear membrane (ภาพ F)

Figure 68



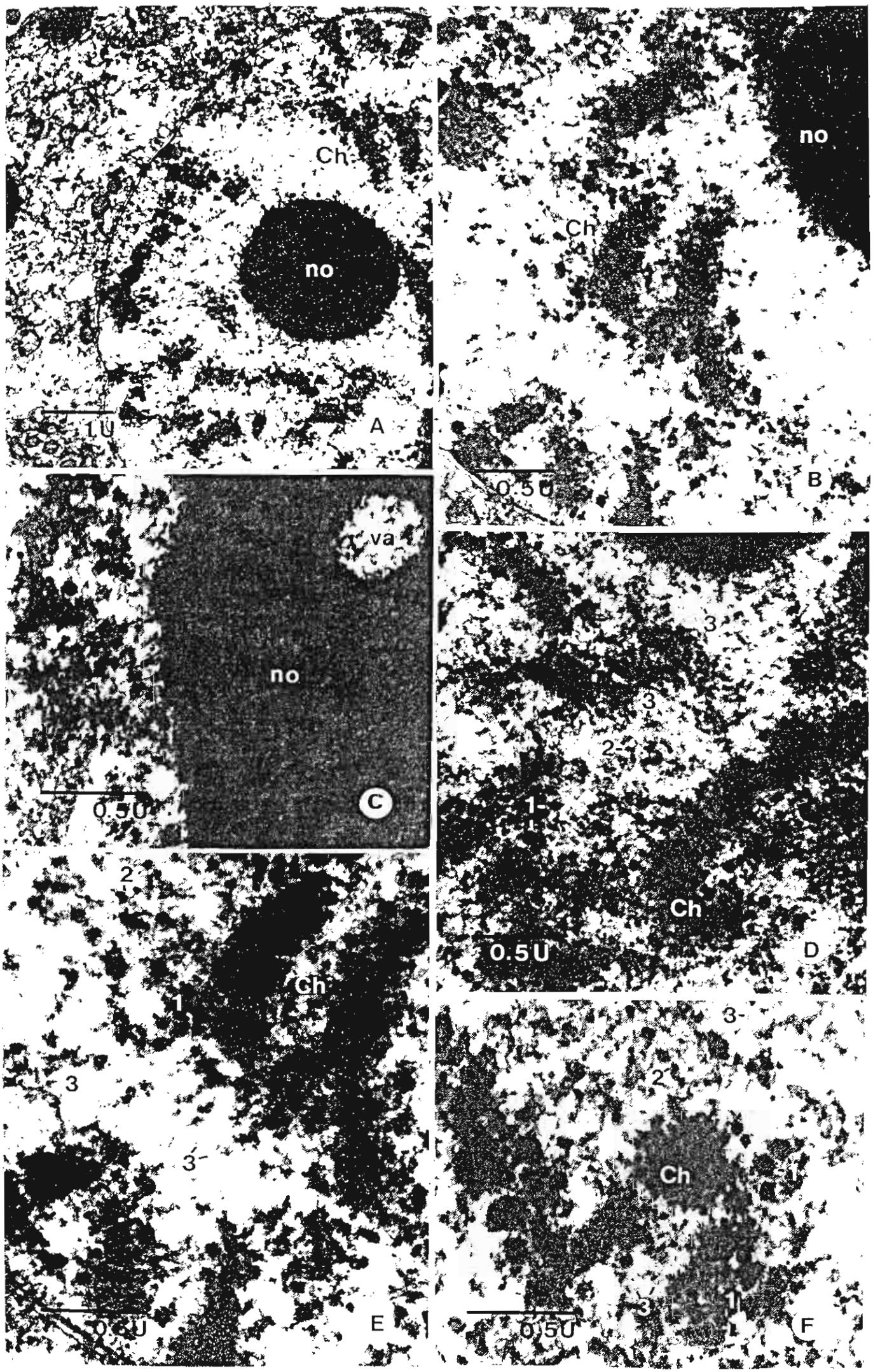

Ch
no
1 U
A
no
Ch
0.5 U
B
va
no
0.5U
C
3
3
2
1
Ch
0.5U
D
2
Ch
1
3
3
0.5U
E
3
2
Ch
3
1
0.5U
F

Figure 70

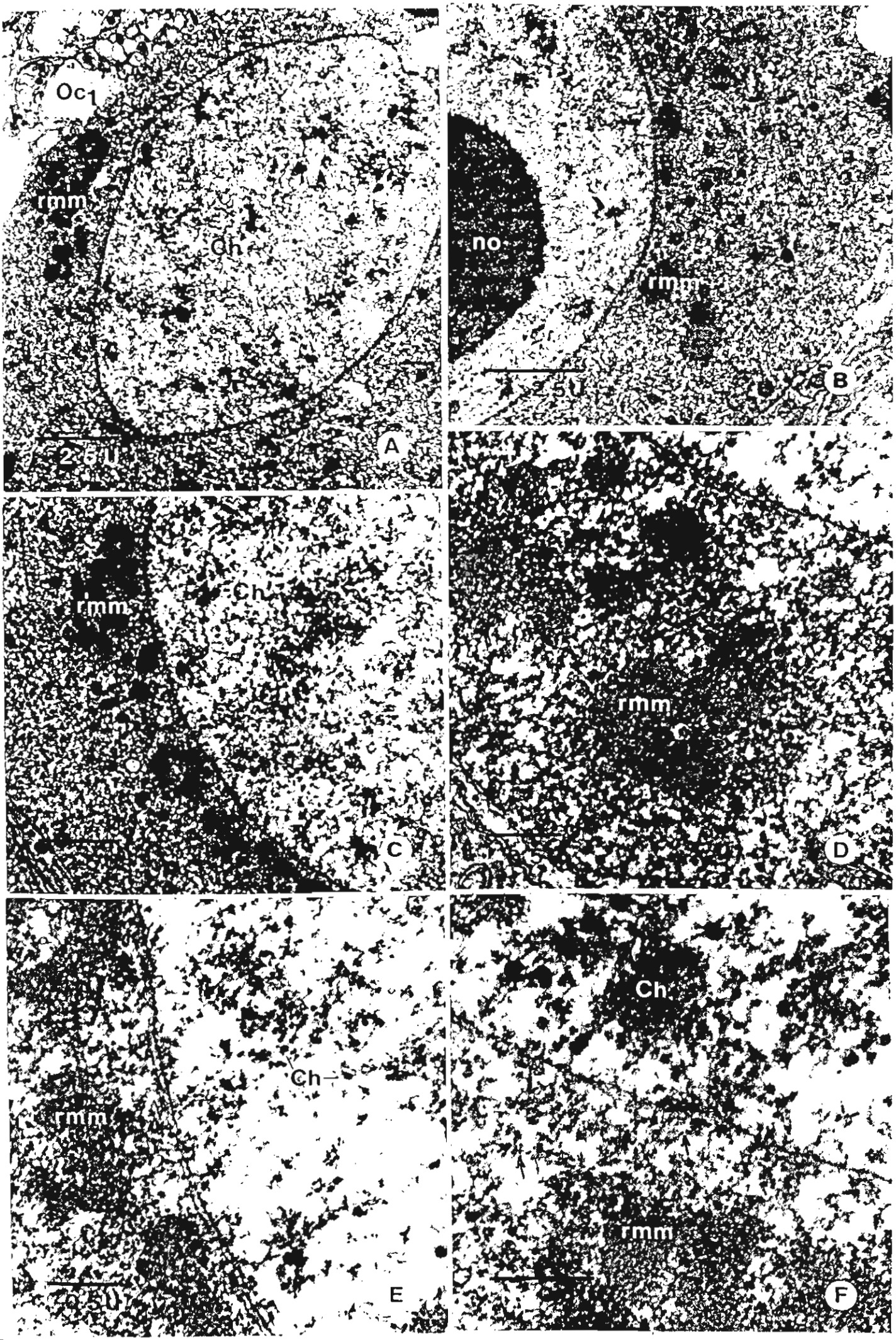
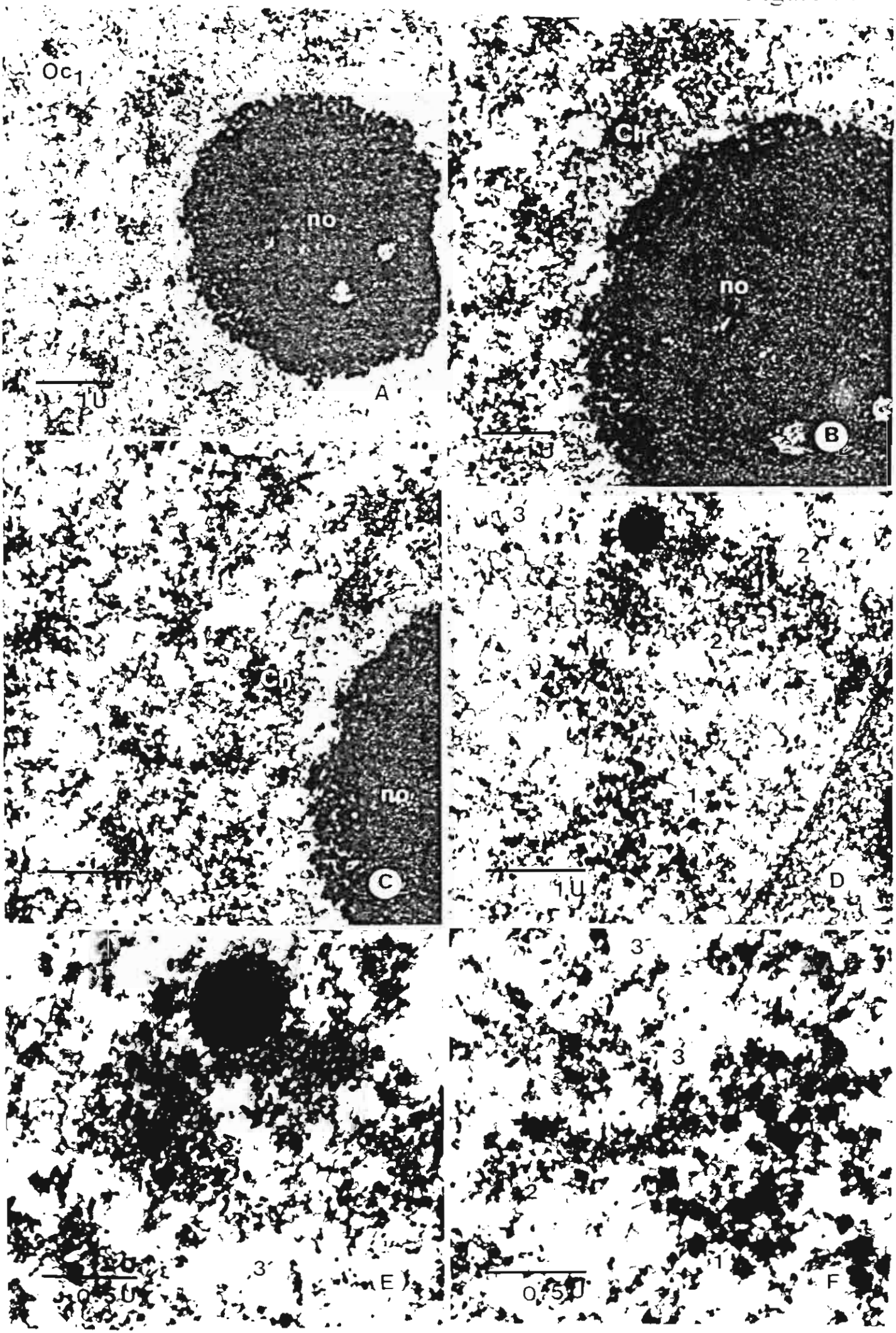


Figure 71



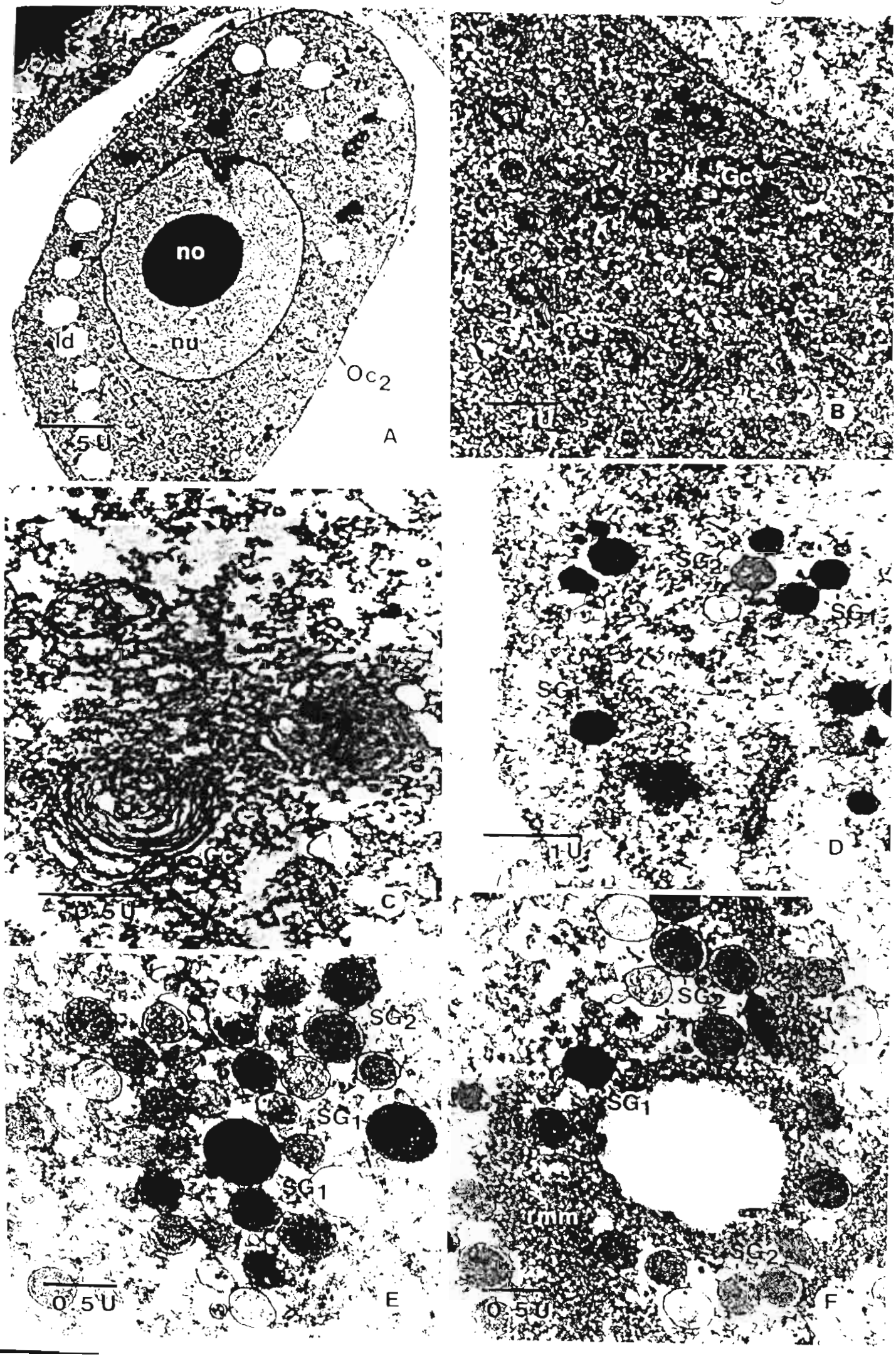
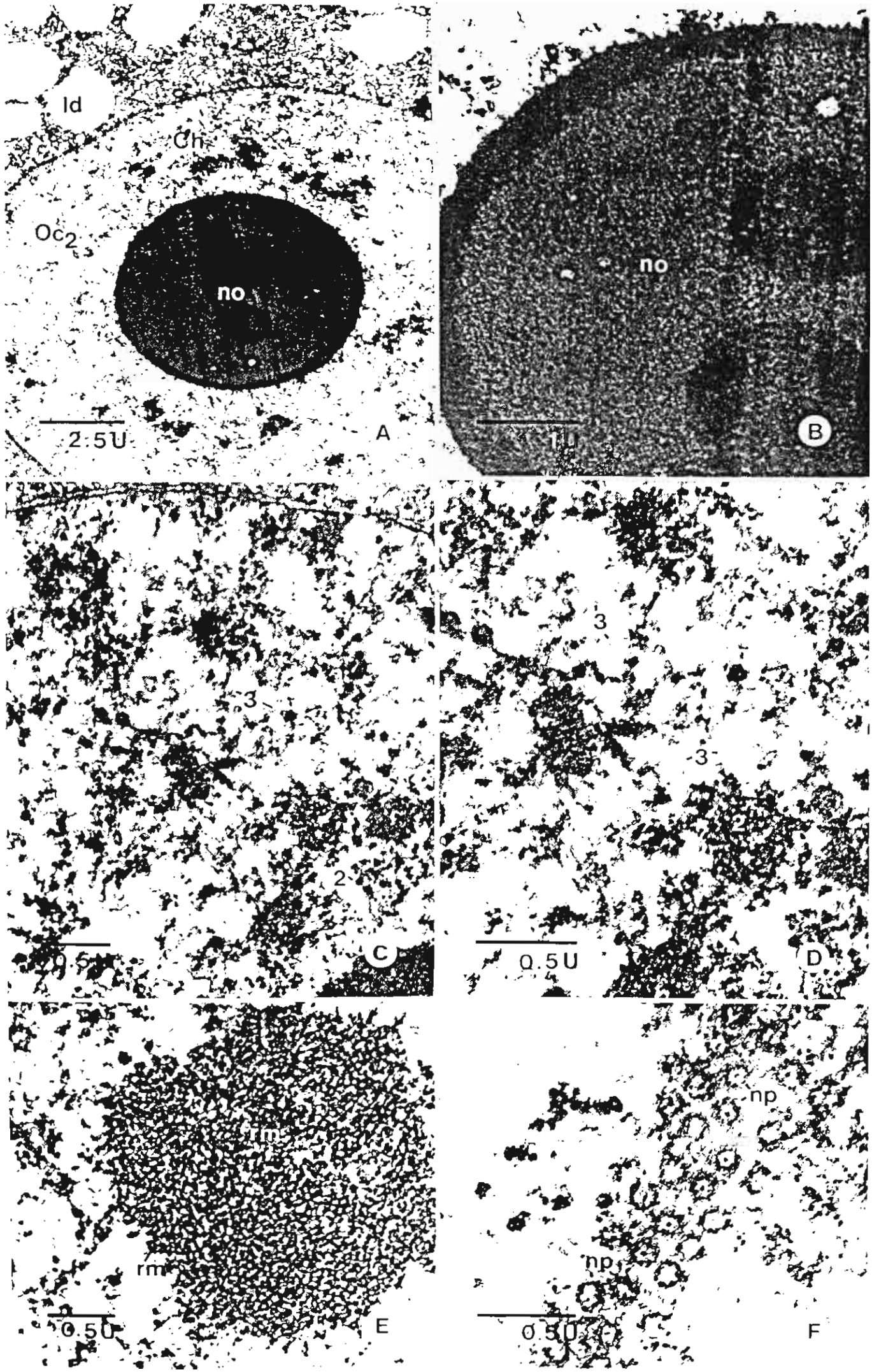

no
nu
ld
Oc2
5 U
A
Gc
1 U
B
SG2
SG1
SG1
1 U
D
0 5 U
C
SG2
SG1
SG1
0 5 U
E
SG2
SG1
mm
SG2
0 5 U
F

Figure 73



รูปที่ 74 ภาพ TEM ของเซลล์ oocyte III แสดงนิวเคลียส (nu) และไซโตปลาสซึมที่มีแกรนูล (SG_1, SG_2) อยู่เต็มพร้อมกับ lipid droplets (ld) (ภาพ A,B) แกรนูล SG_1 และ SG_2 อยู่เป็นกลุ่ม ๆ โดยแต่ละกลุ่มมี Golgi complexs (Gc) กำกับอยู่ 1 อัน (ภาพ C,F) บางบริเวณยังมี ribosomal microtrabecular mass (rmm) เหลืออยู่ (ภาพ D,F)

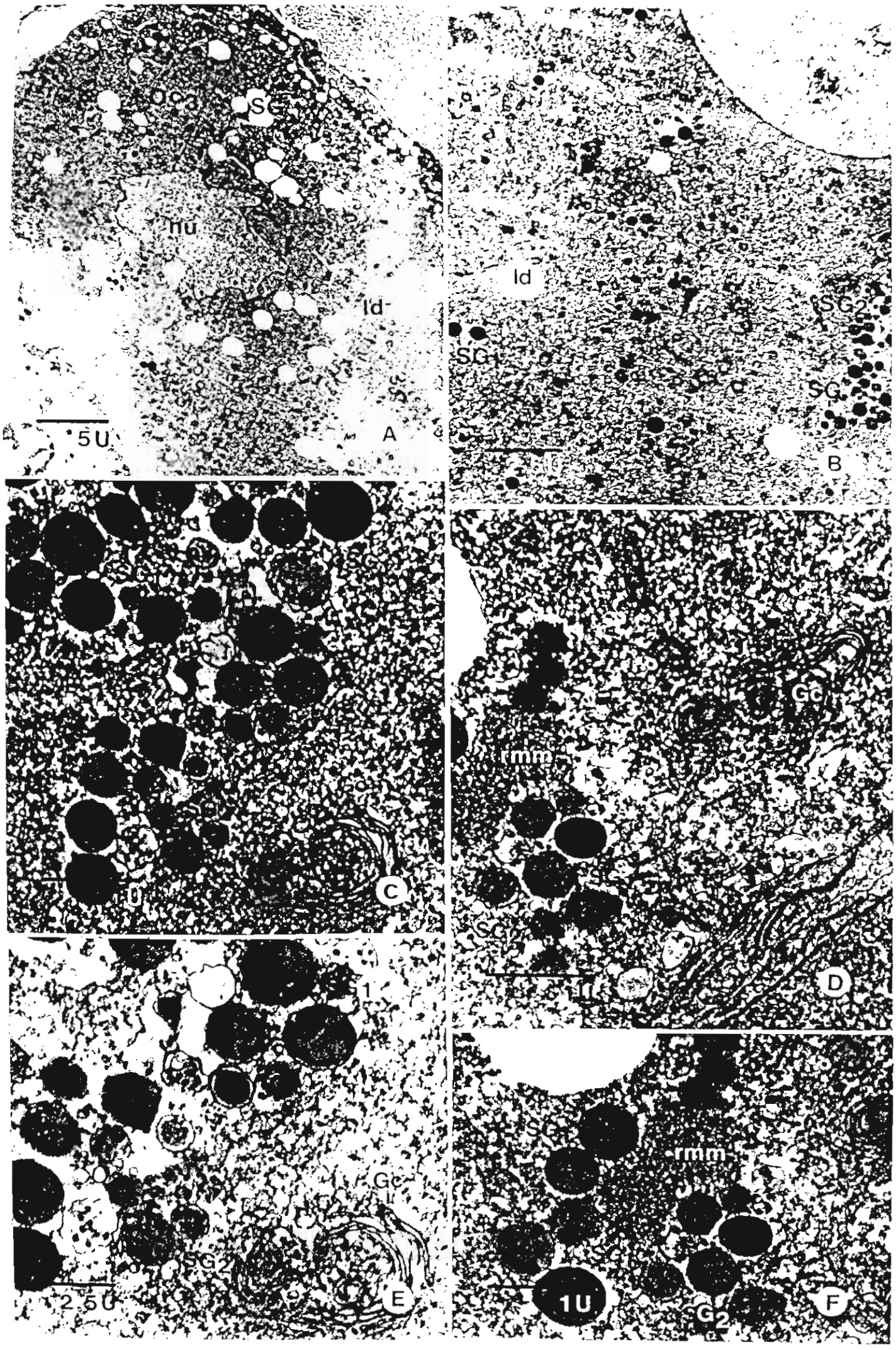
รูปที่ 75 ภาพ TEM ของเซลล์ oocyte IV แสดงนิวเคลียส (nu) ที่ใสไซโตปลาสซึมที่เต็มไปด้วย yolk granules (yg) jelly coat granule (SG_1) cortical granules (SG_2) และ lipid droplets (ld) (ภาพ A,B) ไซโตปลาสซึมระหว่างแกรนูลมีไรโบโซม (ลูกศร) อัดอยู่เต็ม (ภาพ C) ใต้เยื่อหุ้มเซลล์มีจำนวนแกรนูล SG_1 และ SG_2 และไมโตคอนเดรีย (Mi) อยู่มากเป็นพิเศษ และในบางเซลล์มี SG_1 เคลื่อนออกไปเชื่อมกับเยื่อหุ้มเซลล์ (ลูกศร) (ภาพ D-F)

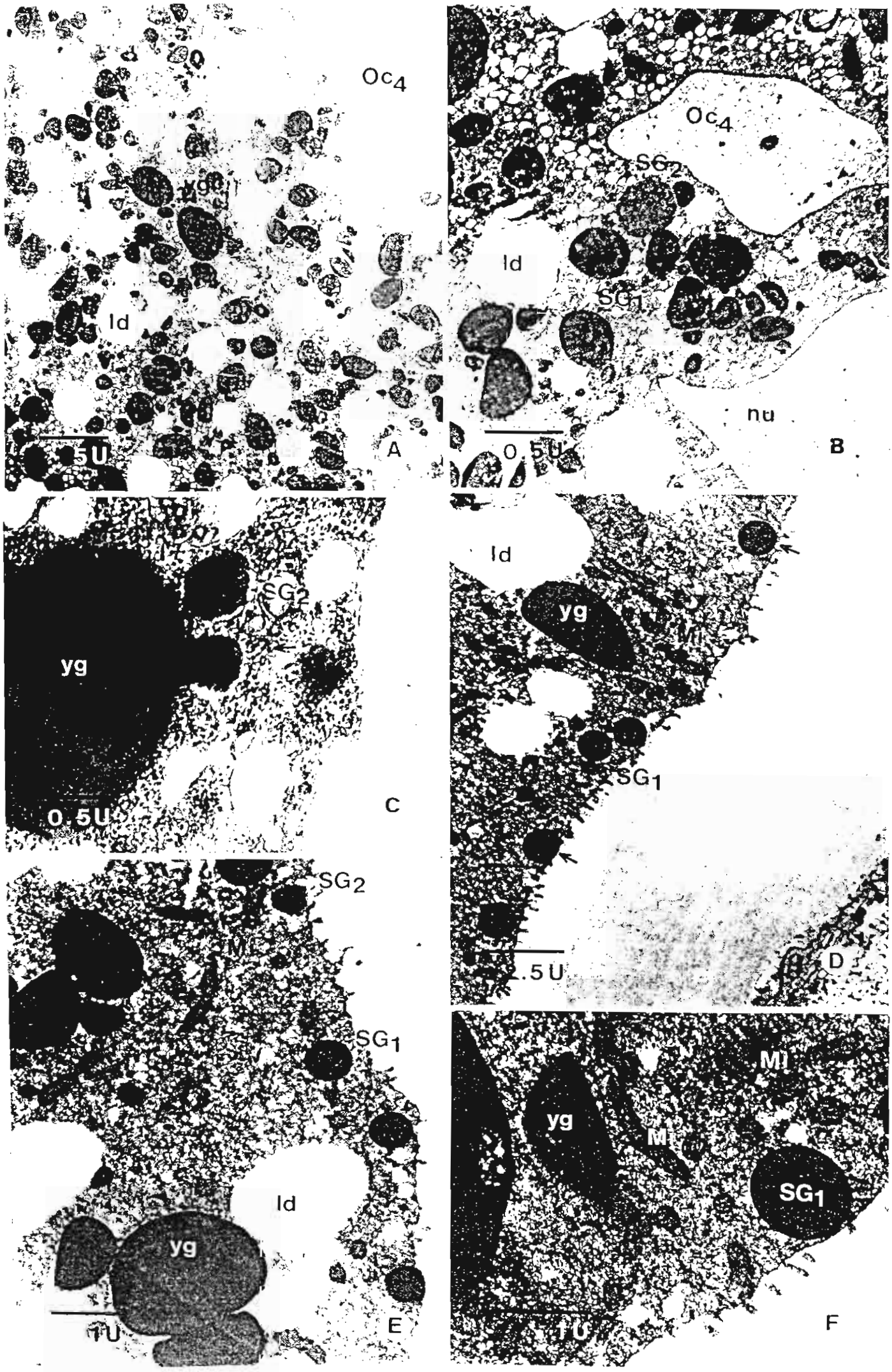
รูปที่ 76 A-F) ภาพ TEM ของเซลล์ oocyte IV แสดงการขยายตัวของนิวคลีโอลัส (no) และการคลี่ของโครมาตินออกเป็นเส้นใยขนาดเล็ก (3) โดยมี lampbrush chromosomes (Ch) เหลืออยู่น้อยมาก

รูปที่ 77 A-D) ภาพ TEM ของเซลล์ oocytes V แสดงนิวเคลียส (nu) และไซโตปลาสซึมที่มี yolk granules (yg) lipid droplets (ld) และแกรนูลขนาดเล็ก (SG_1, SG_2) อัดอยู่เต็ม
E,F) ไซโตปลาสซึมระหว่างแกรนูลประกอบด้วยใย microtrabeculae ที่มีไรโบโซม (ลูกศร) เกาะอยู่อย่างหนาแน่น

รูปที่ 78 A-C) ภาพ TEM ของเซลล์ oocyte V แสดง vitelline-jelly (Vc) coat 2 แบบ แบบที่หนึ่ง (Vc_1) มีลักษณะสม่ำเสมอและประกอบด้วยเส้นใยเล็ก ๆ อัดกันแน่น และแบบที่สอง (Vc_2) เป็นเส้นใยขนาดใหญ่ที่สานกันไปมา
E,F) เซลล์ที่ติดกับ Vc_1 ยังไม่มี exocytosis ของ SG_1 ส่วนที่ติดกับ Vc_2 มีการปล่อยสารจาก SG_1 (ลูกศร)

Figure 74


oc
SG
nu
ld
5U
A
ld
SG2
SG1
SG
B
C
D
Gc
rmm
SG
1
Gc
SG2
2.5U
E
rmm
SG
1U
G2
F


Oc4
yg
ld
0.5U
A
Oc4
SG2
ld
SG1
nu
0.5U
B
SG2
yg
0.5U
C
ld
yg
M
SG1
.5U
D
SG2
M
SG1
ld
yg
1U
E
M
yg
M
SG1
1U
F

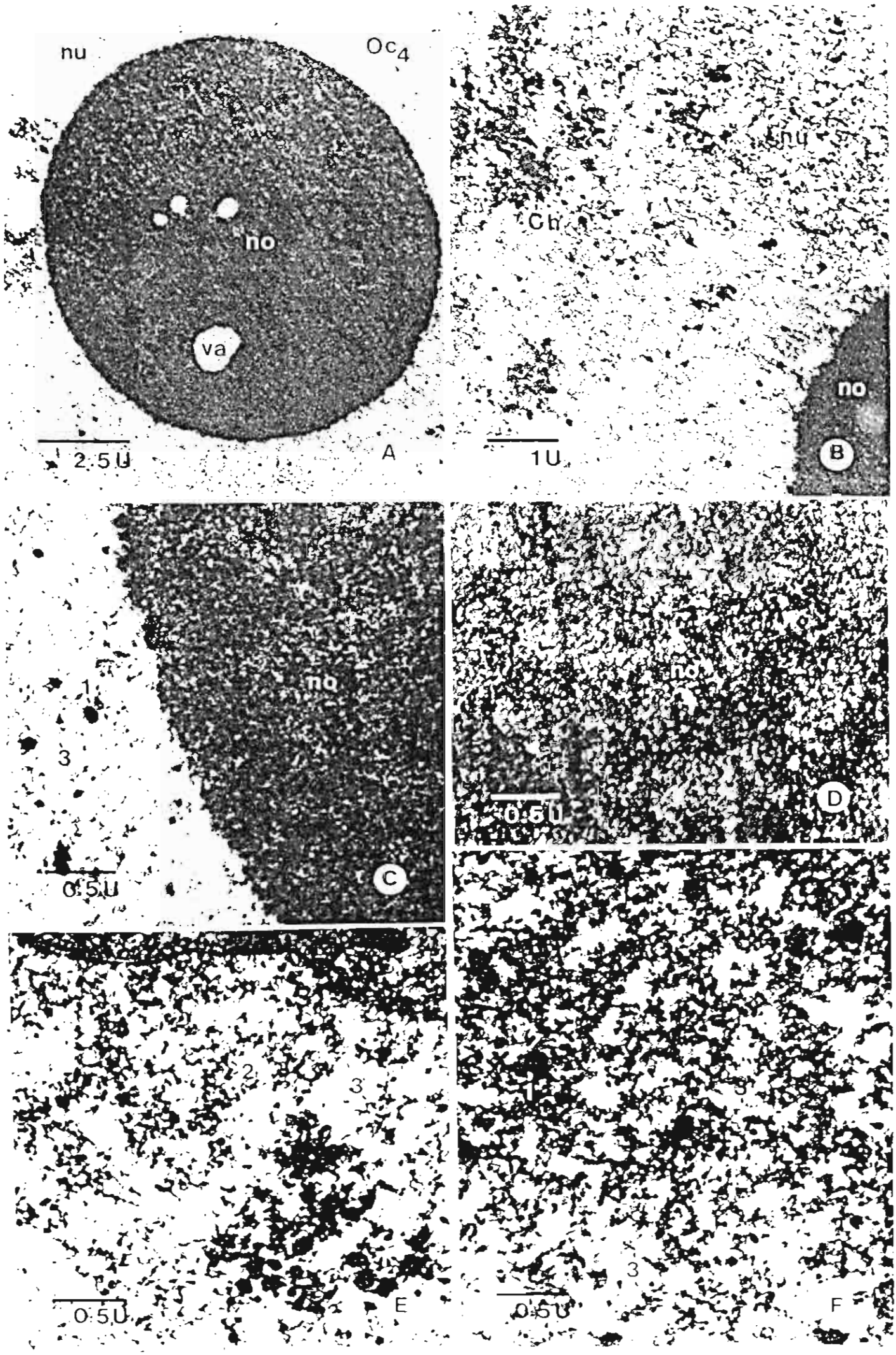
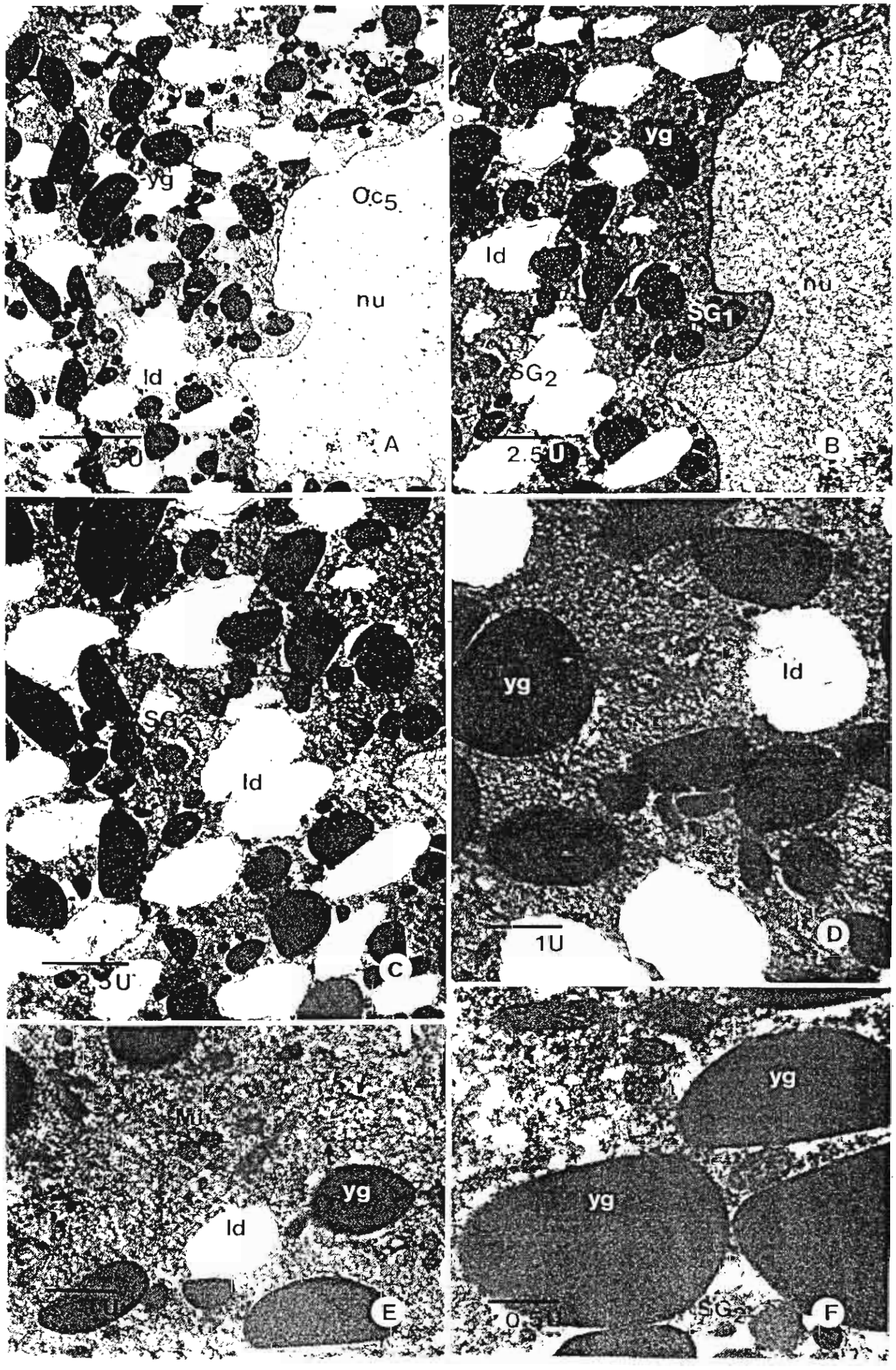
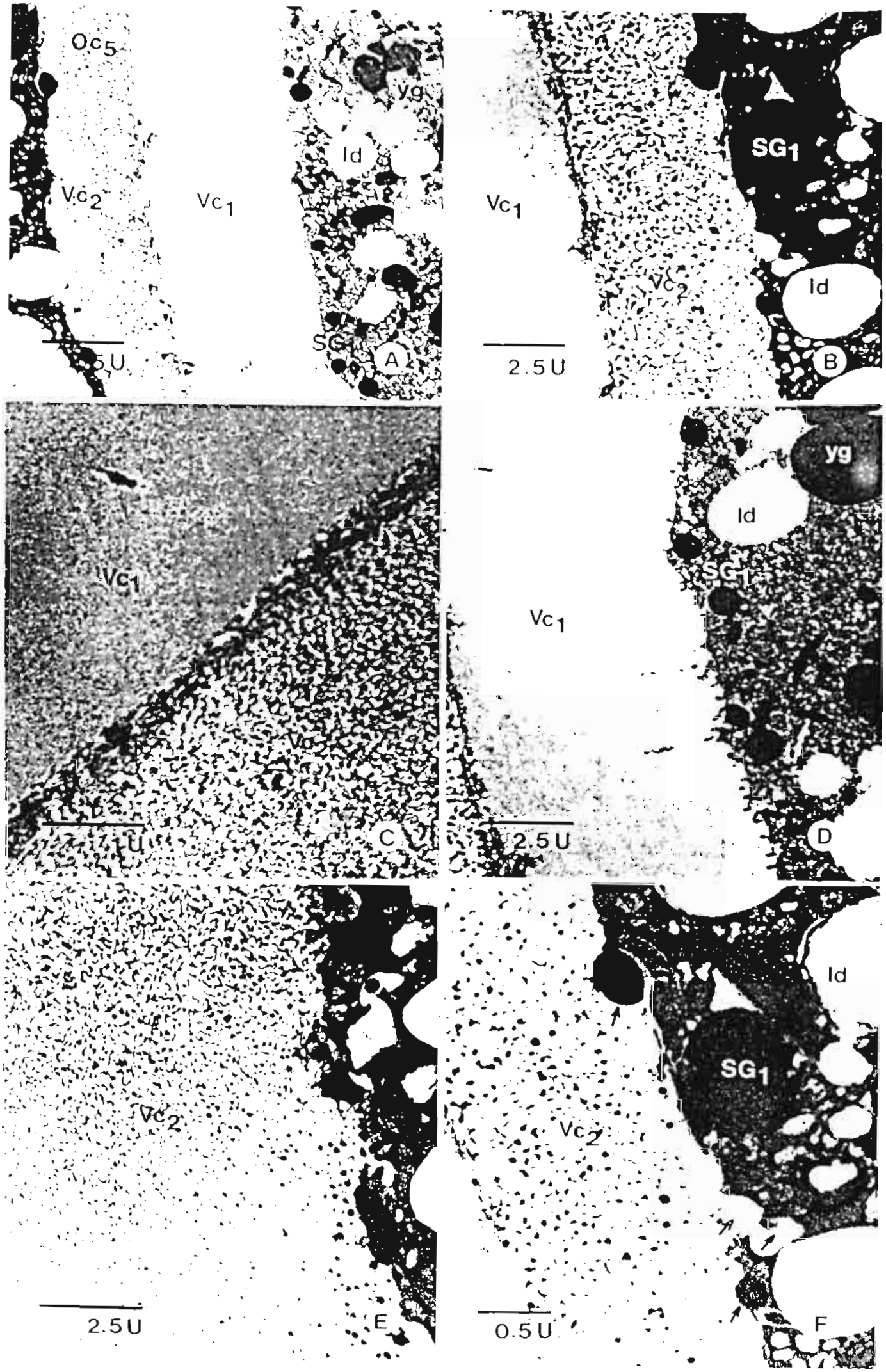

nu
Oc4
no
va
2.5 U
A
nu
Ch
no
B
1 U
no
C
1
3
0.5 U
no
D
0.5 U
2
3
0.5 U
E
3
0.5 U
F

Figure 77


yg
Oc5
nu
ld
A
5U
yg
ld
nu
SG1
SG2
2.5U
B
SG2
ld
C
2.5U
yg
ld
1U
D
Mu
yg
ld
E
U
yg
yg
SG2
0.5U
F


Oc5
Vc2
Vc1
yg
Id
SG
A
5U
SG1
Vc1
Vc2
Id
B
2.5U
Vc1
C
2.5U
yg
Id
SG1
Vc1
2.5U
D
Vc2
2.5U
E
Id
SG1
Vc2
0.5U
F

6.13 การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของต่อมอัณฑะและรังไข่ของหอยที่เลี้ยงในระบบปิดซึ่งเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลในรอบ 1 ปี

หอยที่เลี้ยงในระบบปิด เป็นกลุ่มที่ได้รับอาหารประเภทสาหร่ายและอาหารเสริมเต็มที่ และมีการไหลเวียนถ่ายเทของน้ำในปริมาณและคุณภาพความเค็มที่ควบคุมอย่างสม่ำเสมอ หอยเหล่านี้แสดงช่วง (phase) การพัฒนาของอัณฑะและรังไข่ออกได้เป็น 5 ช่วง ได้แก่ Proliferative phase, Premature phase, Mature phase, Spawn phase และ Spent phase ซึ่งแต่ละช่วงมีลักษณะทางจุลกายวิภาค โดยเฉพาะชนิดและปริมาณของเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต่าง ๆ แตกต่างกันไป กล่าวคือ

Proliferative phase

เป็นช่วงที่ gonads เริ่มมีเซลล์ขั้นต้นอยู่รวมเป็นกระจุกโดยเกาะติดกับ trabeculae เซลล์ส่วนมากในรังไข่เป็นขั้น oogonia, stage I และ II oocytes (รูปที่ 79A,B) ส่วนในอัณฑะเซลล์ส่วนมากอยู่ในขั้น spermatogonia และ primary permatocytes (รูปที่ 79C-E) trabeculae เริ่มงอกจากด้าน capsule ออกไปติดกับ capsule ของ hepatopancreas ซึ่งอยู่ตรงกลาง (รูปที่ 79A,B)

Premature phase

เป็นช่วงที่ gonads มีเซลล์อยู่เกือบเต็มพื้นที่และ trabeculae พัฒนากลับไปสู่สภาพที่เกือบสมบูรณ์เต็มที่ เซลล์ในรังไข่ส่วนมากเป็นเซลล์ขั้น oogonia, oocytes stage I, II และ oocytes stage III มีจำนวนเพิ่มขึ้นมาก oocyte IV และ V ยังมีจำนวนน้อยและกระจุกตัวเป็นหย่อม ๆ (รูปที่ 80A,B) ส่วนในอัณฑะเซลล์ส่วนมากเป็น spermatogonia และ spermatocytes ขั้นต่าง ๆ ส่วนเซลล์ spermatids และ spermatozoa ยังมีจำนวนน้อย (รูปที่ 80C-E) trabeculae งอกกลับไปสู่สภาพสมบูรณ์เช่นเดียวกันกับในช่วงก่อนหน้าที่จะมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกจาก gonads

Mature phase

เป็นช่วงที่ gonads มีเซลล์อัดกันแน่นอยู่เต็มพื้นที่ ภายในรังไข่มีเซลล์ oocytes stage IV และ V อัดกันอยู่เต็ม โดยมี oocytes stage I ที่กระจายอยู่เป็นหย่อม ๆ ติดกับแผ่น trabeculae (รูปที่ 81A,B) ในอัณฑะเซลล์ส่วนมากประกอบด้วย late spermatids และ spermatozoa ที่เรียงตัวกันเป็นริ้ว ๆ ส่วนเซลล์ที่ติดกับ trabeculae เป็นพวก spermatogonia และ early spermatocytes โดยมีเซลล์ spermatocytes ขั้นกลางอยู่น้อยมาก (รูปที่ 81C-E)

Spawn phase

เป็นช่วงที่ gonads เริ่มปล่อยเซลล์ที่พัฒนาเต็มที่ออกจากตัวหอย โดยในรังไข่เซลล์ oocytes stage IV และ V กระจายออกสู่ช่องกลางของ compartment และได้ถูกปล่อยออกไปจากรังไข่ ทำให้เหลือเพียง oogonia, oocytes stage I และ II จำนวนไม่มากนักยังเกาะติดอยู่กับ trabeculae (รูปที่ 82A,B) ในอัณฑะเซลล์ spermatozoa แตกกระจายออกจากริ้ว ที่เคยเรียงกันเป็นแถวอย่างมีระเบียบในขั้น mature phase เสมือนหนึ่งว่าเซลล์เหล่านี้กำลังหลุดออกจากที่เกาะและจะถูกปล่อยออกไปจาก อัณฑะ (รูปที่ 82C-E) แกน trabeculae มีเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต้นเหลือเกาะอยู่บ้าง หลังจากการปลดปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ Oc_5 และเซลล์ spermatozoa ออกไปเกือบหมดแล้ว มักจะมีก้อนสารสีเหลืองหรือน้ำตาลสะสมอยู่ในช่องกลวงของ compartment

Spent phase

เป็นช่วงที่มีการปล่อยเซลล์เกือบทั้งหมดออกจาก gonads ภายใน gonads จึงว่างเปล่า แผง trabeculae ส่วนมากก็สลายไปด้วย ที่ยังคงอยู่ใน trabeculae ก็มีแต่หลอดเลือดฝอยที่บวมเต่ง ส่วนถุงหุ้ม gonads ยังอยู่ในสภาพสมบูรณ์ เซลล์ที่ยังคงมีเหลือคือ gonia cells ที่ติดตามขอบของ gonadal capsule (รูปที่ 83A-D)

จากการศึกษาที่ได้กระทำต่อเนื่องครบ 1 ปี พบว่า ช่วงเวลาที่เป็น spawning phase ซึ่งมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยในหอยเพศเมียที่เลี้ยงในระบบปิด มักเกิดขึ้น 2 ช่วง คือ ระหว่างเดือนมีนาคมถึงเมษายน และสิงหาคมถึงตุลาคม ส่วนในหอยเพศผู้มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกในช่วงเดียวกันแต่มักมีช่วงเวลานานกว่า อีกทั้งบางตัวอาจจะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ทั้งปี จากข้อมูลเบื้องต้นจึงพอสรุปได้ว่า การพัฒนาของ gonads จากระยะ proliferative ถึง spawn phase ของหอยเป๋าฮื้อที่เลี้ยงในระบบปิด โดยไม่ได้รับสารกระตุ้นใด ๆ ต้องการเวลาประมาณ 3-4 เดือนต่อ 1 รอบ

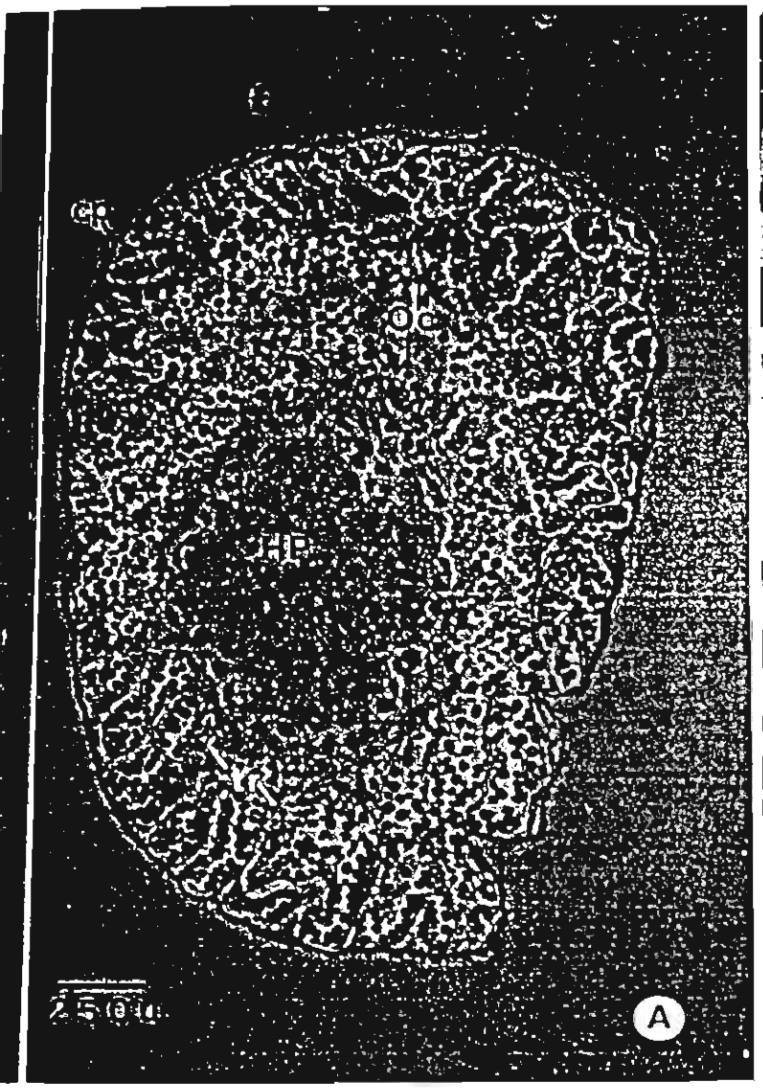
รูปที่ 79 ภาพถ่ายจุลทรรศน์ธรรมดาของช่วง Proliferative phase แสดงการเริ่มพัฒนาของ gonads อีกครั้งหลังจากช่วง spent เซลล์ในรังไข่ (A,B) ส่วนมากคือ stage I oocytes (Oc_1) และในอัณฑะ (C-E) คือ spermatogonia และ leptotene spermatocytes trabeculae (tr) เริ่มงอกกลับคืน

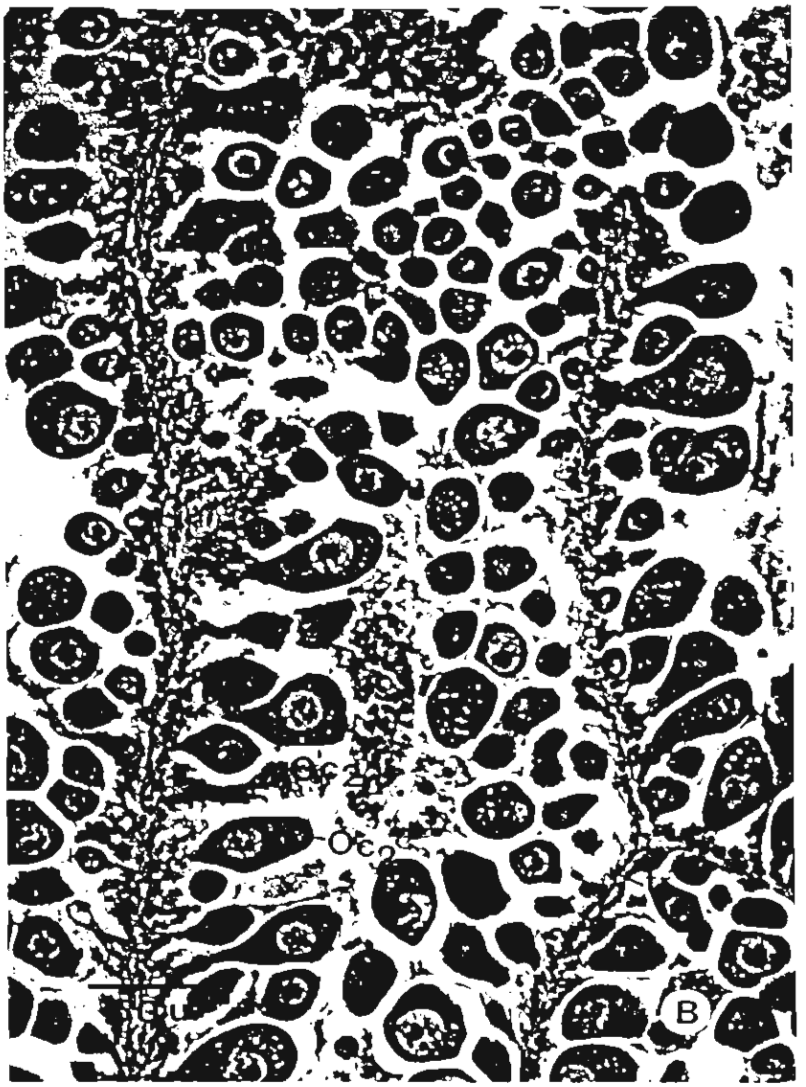
รูปที่ 80 ภาพถ่ายของช่วง Premature phase ในรังไข่ (A,B) เซลล์ส่วนมาก คือ oocytes stage I และ II (Oc_1, Oc_2) ในอัณฑะ (C-E) ส่วนมากคือ spermatocytes ขั้นต่าง ๆ (Sc) spermatozoa (Sz) ยังมีจำนวนน้อย ส่วน trabecula (tr) งอกกลับเกือบคืนสู่สภาพเดิม

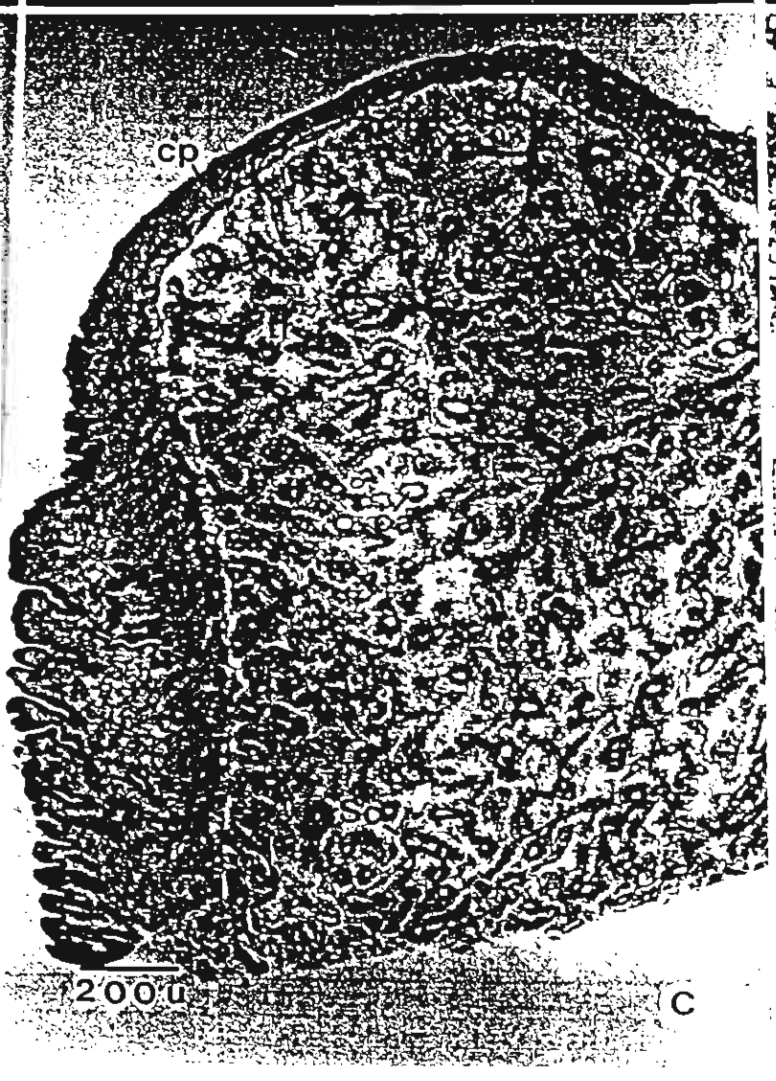
รูปที่ 81 ภาพถ่ายของช่วง Mature phase ในรังไข่ (A,B) เริ่มมี oocytes stage III, IV และ V แต่เซลล์ส่วนมากก็ยังคงเป็น oocytes stage I และ II ซึ่งอยู่ติดกับ trabeculae (tr) ส่วนในอัณฑะ (C-E) เซลล์ส่วนมากคือ late spermatids และ spermatozoa ซึ่งเรียงแถวกันเป็นริ้ว ๆ เซลล์ที่ติดกับ trabeculae มีจำนวนน้อยมากและส่วนมากเป็น spermatogonia (Sg) และ early spermatocytes (Sc)

รูปที่ 82 ภาพถ่ายของช่วง Spawn phase ในรังไข่ (A,B) เซลล์ส่วนมากเป็น oocytes stage IV และ V ($Oc_{4,5}$) โดยมีเซลล์ oocytes stage I (Oc_1) และ oogonia (Og) จำนวนน้อยติดอยู่กับ trabeculae (tr) ส่วนในอัณฑะ (C-E) เซลล์ส่วนมากคือ spermatozoa ซึ่งเริ่มกระจายออกจากริ้ว

รูปที่ 83 ภาพถ่ายของช่วง Spent phase เซลล์เกือบทั้งหมดถูกปล่อยออกจาก gonad ทำให้ทั้งรังไข่ (A,B) และอัณฑะ (C,D) ว่างเปล่า แผง trabeculae ส่วนมากก็สลายตัวด้วย ส่วนที่ยังเหลืออยู่มักแสดงหลอดเลือดฝอย (ca) ที่บวมเต่ง (D)

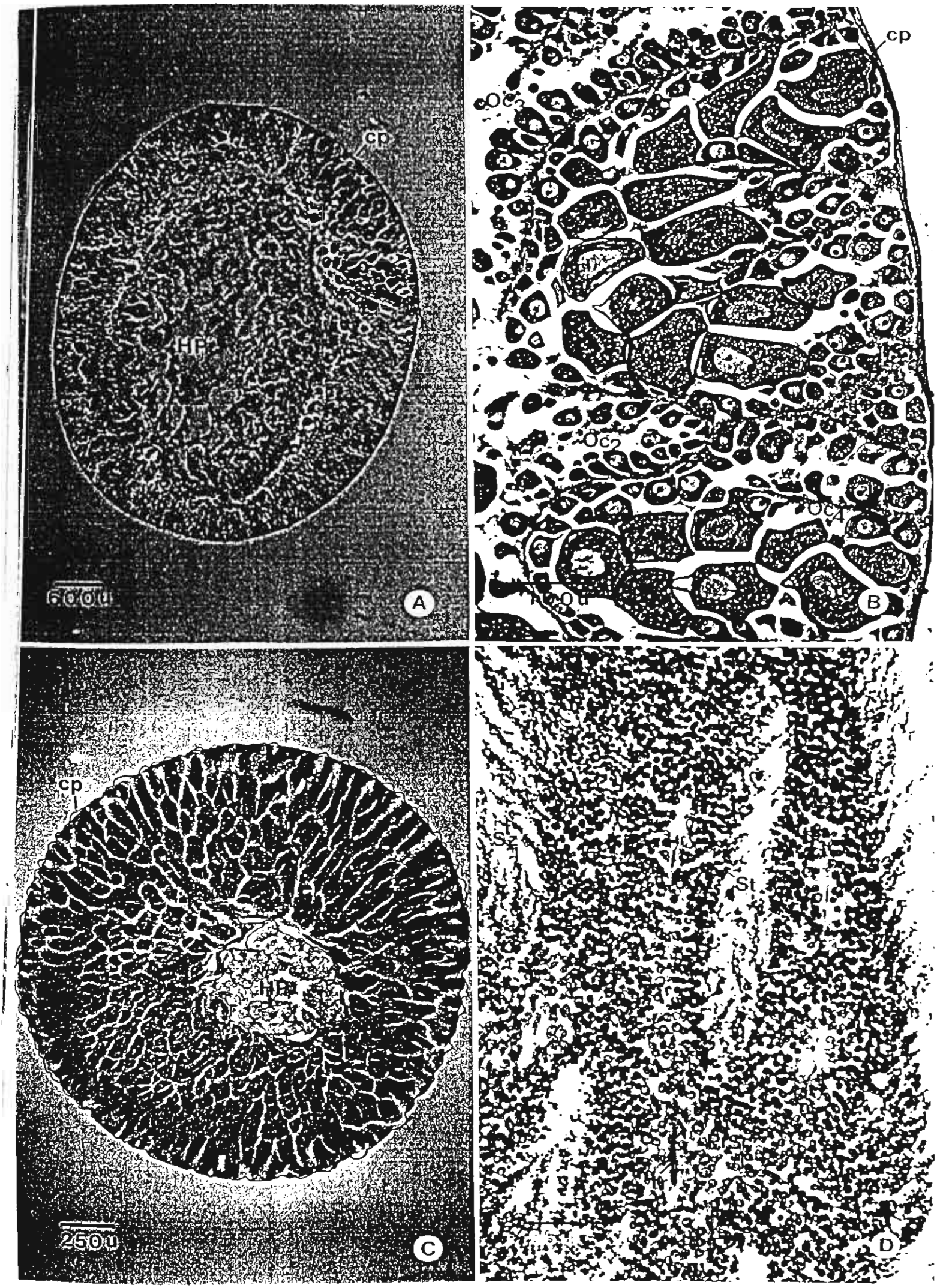

cp
Oc
HP
250u
A

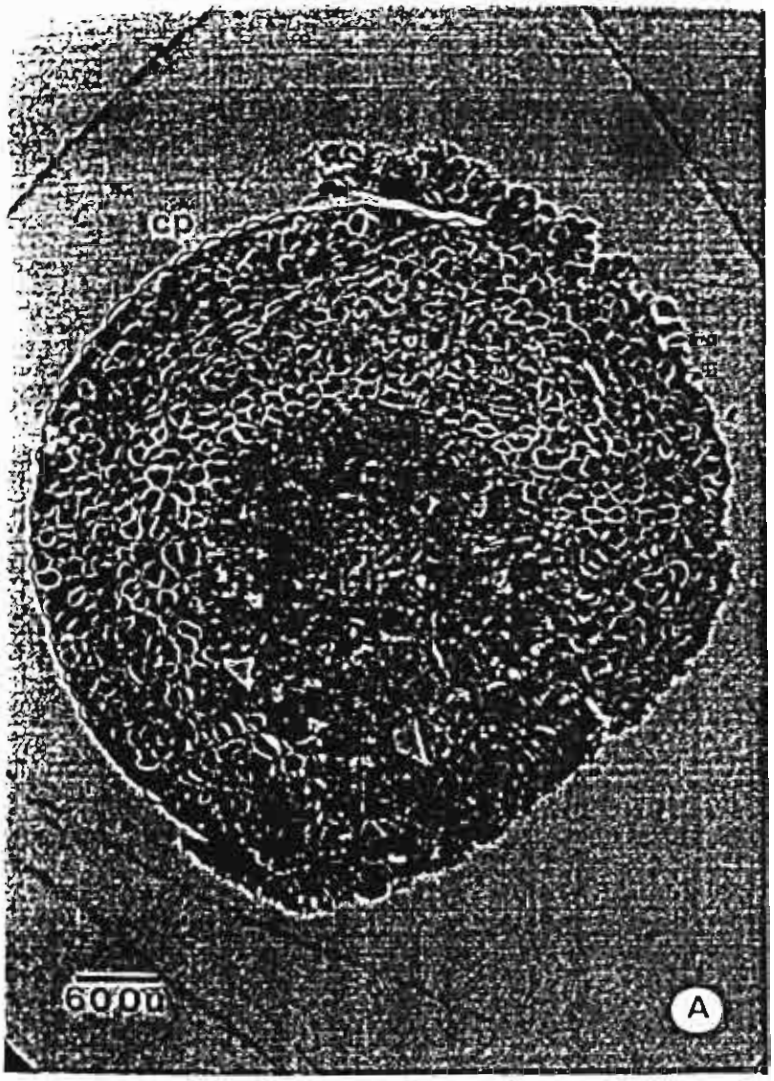

Oc
100u
B

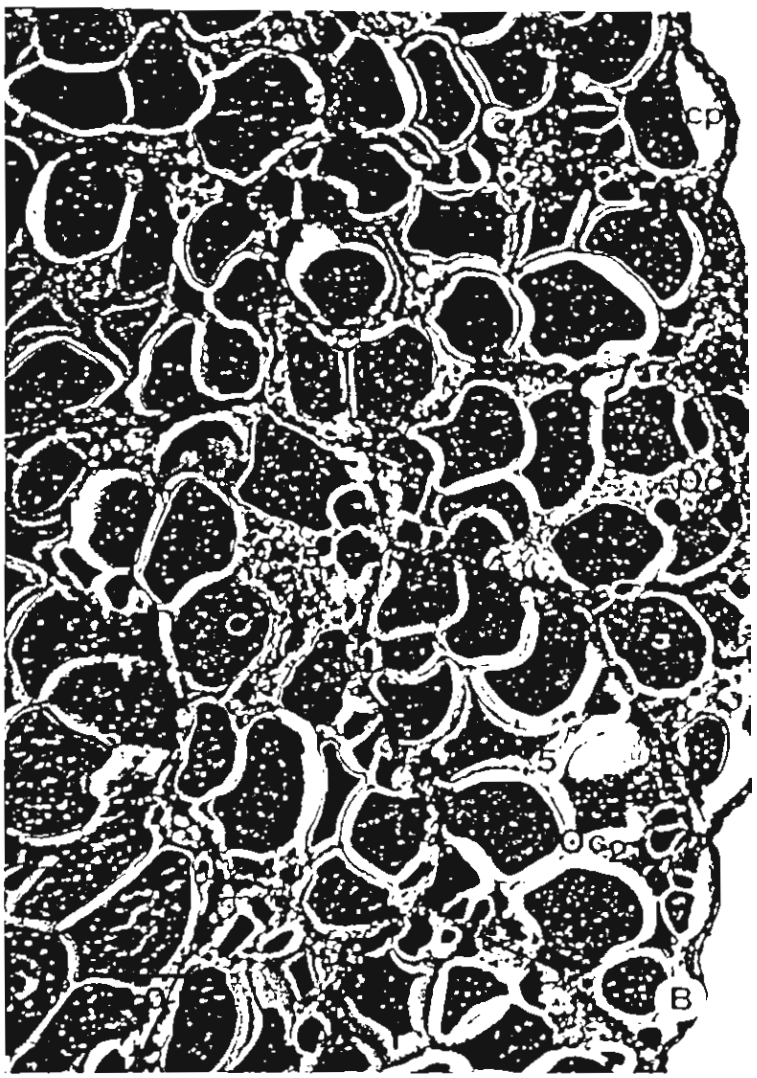

cp
1200u
C

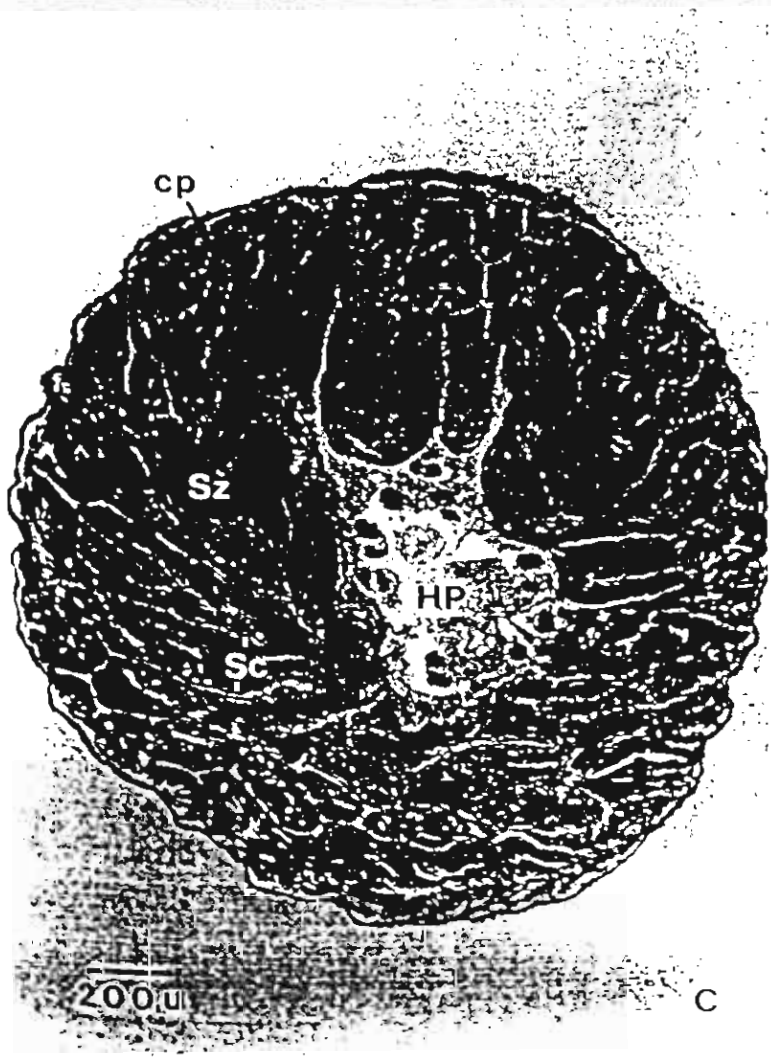

Sc
tr
50u
D

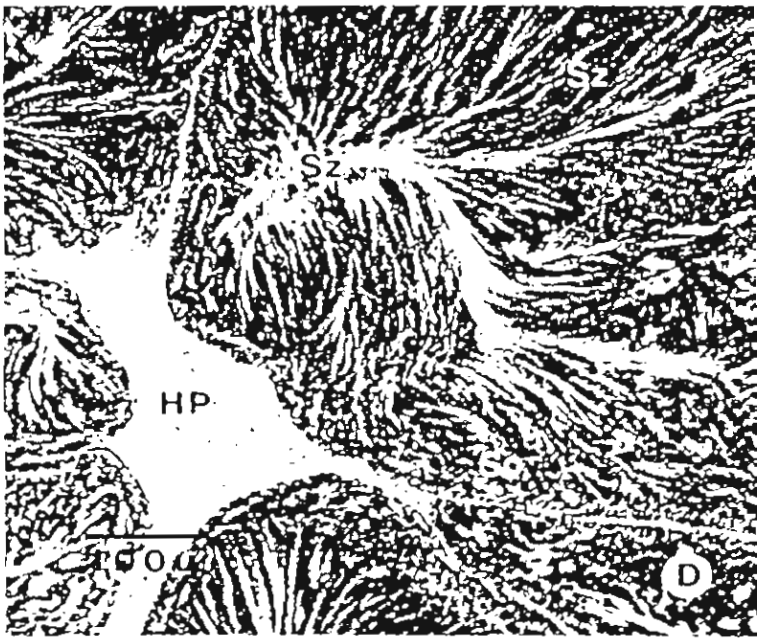

ca
Sc
50u
E

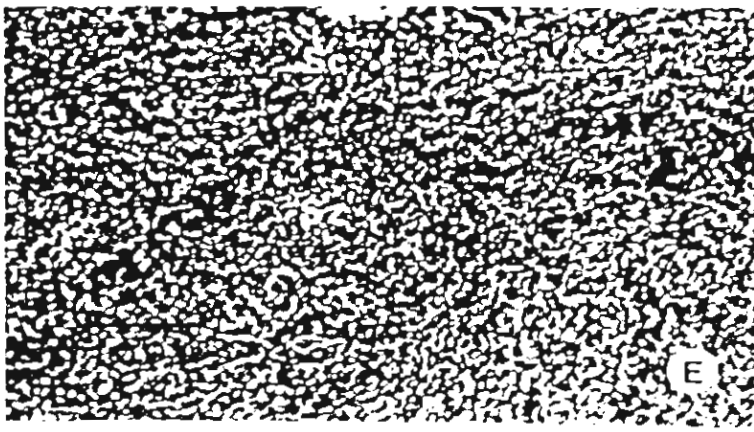

cp
HP
A
cp
OC2
OC1
OC4
B
cp
HP
C
St
St
St
D

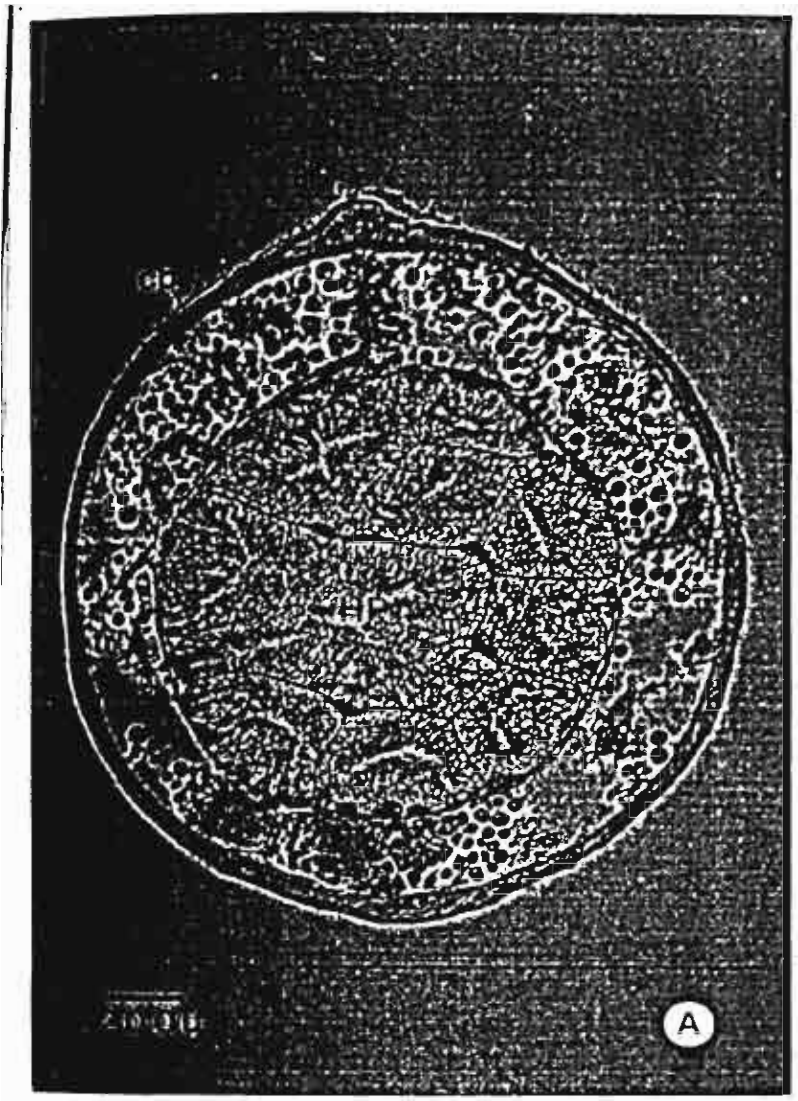

cp
600u
A

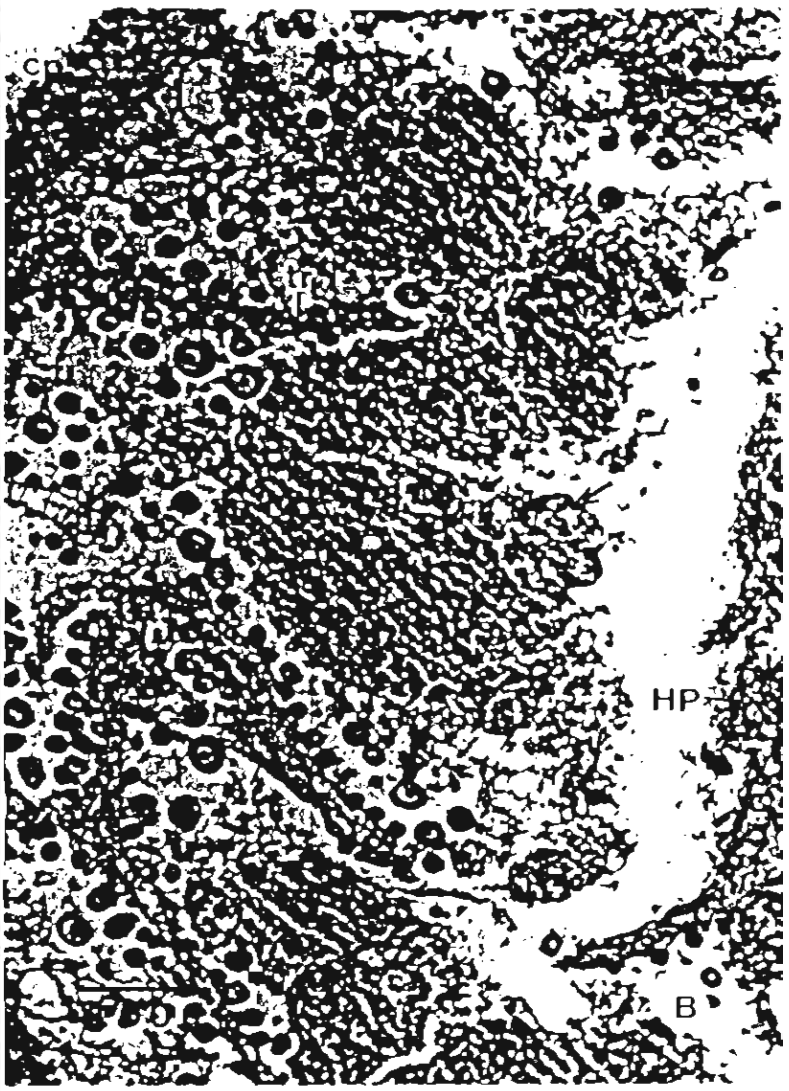

cp
B

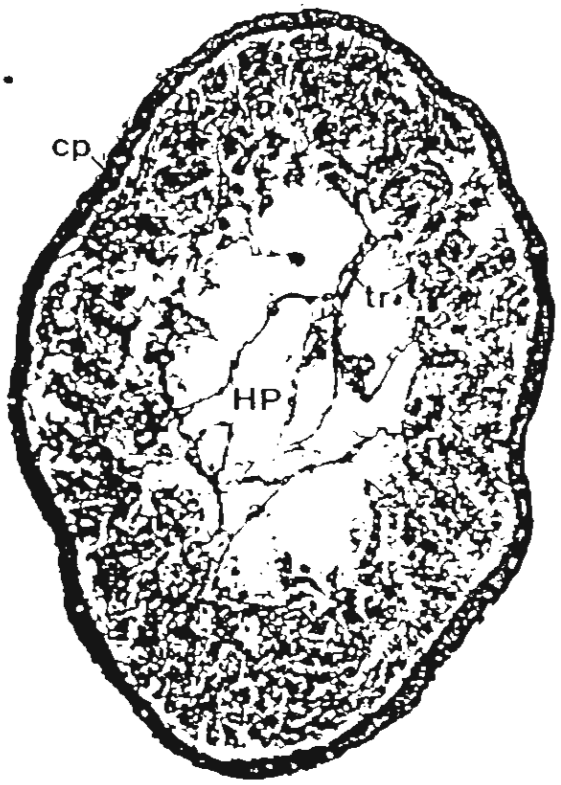

cp
Sz
HP
Sc
200u
C


Sz
HP
600u
D


E

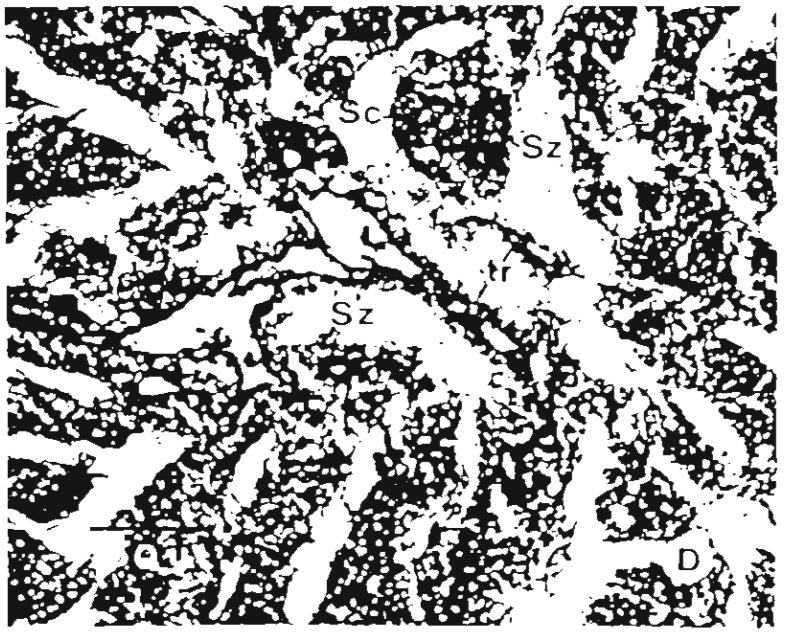




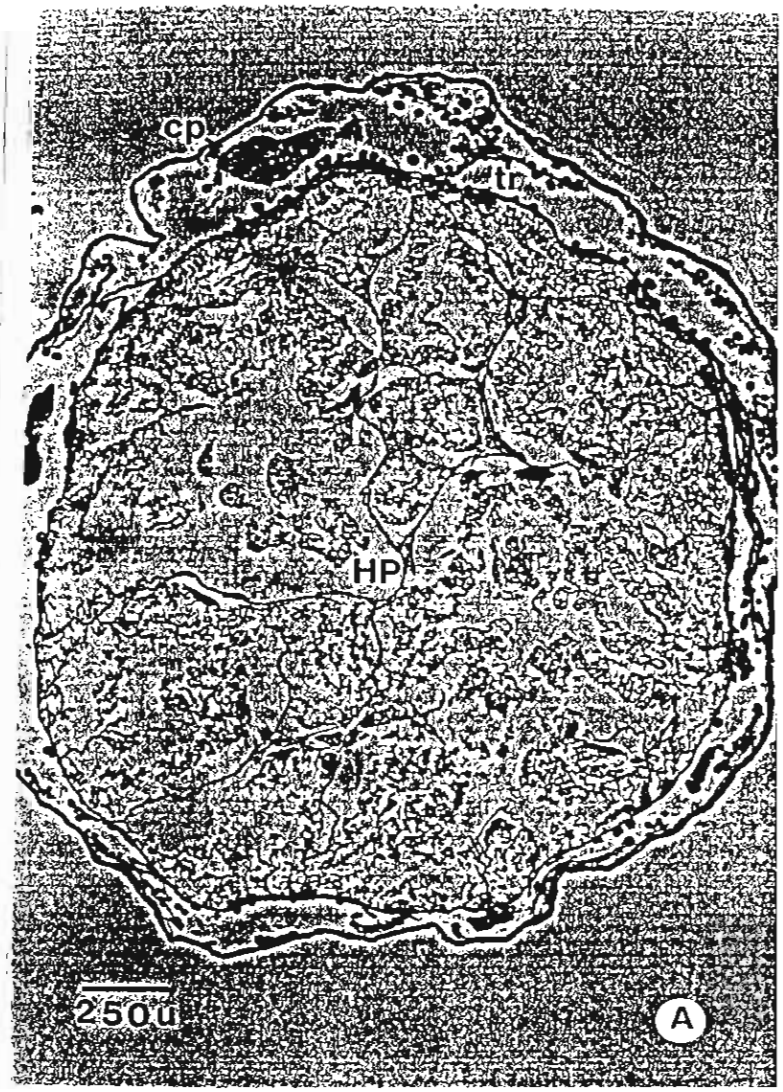


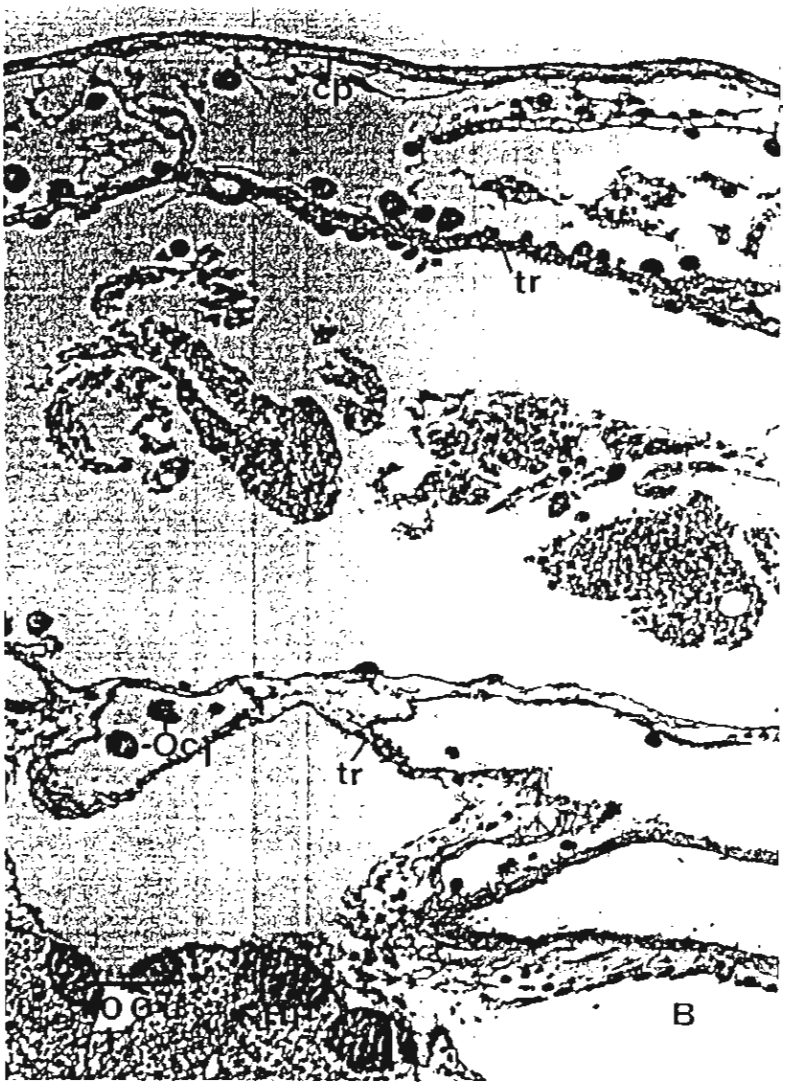
250u

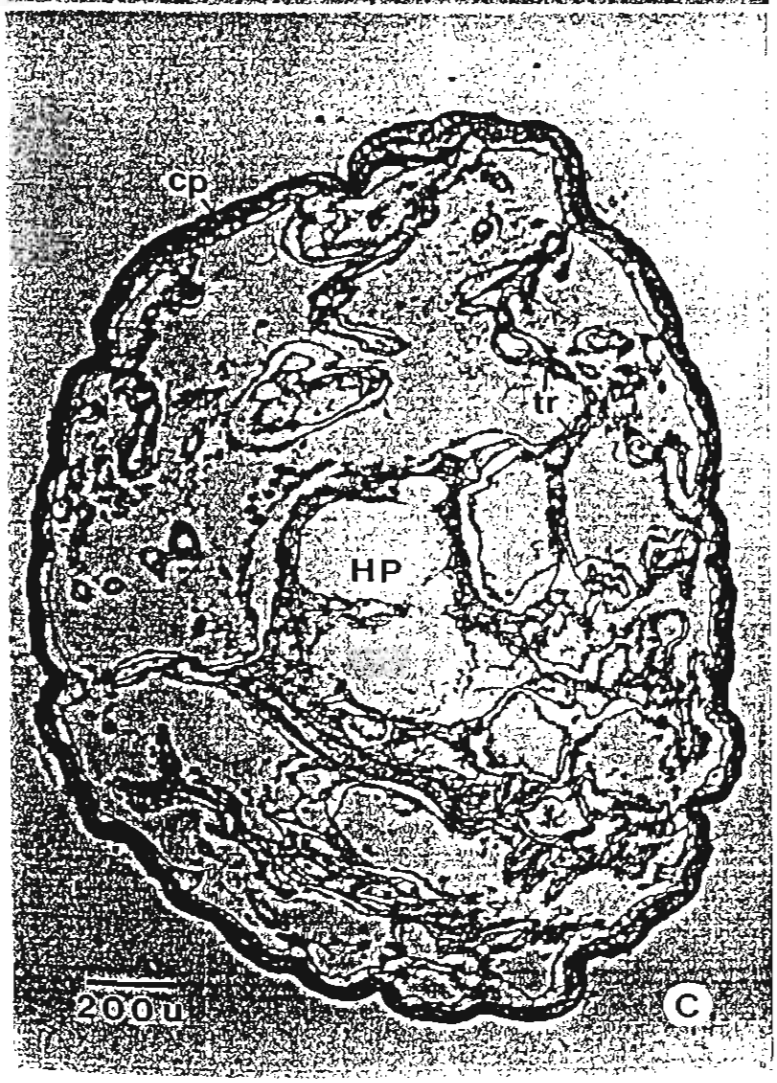
C






cp
tr
HP
250u
A


cp
tr
Oc
tr
B


cp
tr
HP
200u
C


tr
ca
tr
Sz
ca
cp
D

6.14 การศึกษาการกระจายของ FSH-liked, LH-liked และ Egg Laying hormone ของหอยเป๋าฮื้อ ในรังไข่และอัณฑะด้วยวิธี immunohistochemistry

6.14.1 FSH-liked และ LH-liked Hormone

จากการศึกษาโดยจุลทรรศน์พบว่า gonads มีกลุ่มของเซลล์ที่มีลักษณะคล้าย endocrine cells อยู่ใน trabeculae โดยเฉพาะในรังไข่ จึงอาจเป็นไปได้ว่าเซลล์เหล่านี้ผลิตฮอร์โมนที่ควบคุมขบวนการสืบพันธุ์ในหอย เราจึงได้ศึกษาตำแหน่งและการกระจายของฮอร์โมนที่อาจจะเหมือน LH กับ FSH ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง โดยการย้อม sections ของ gonads ด้วย primary antibodies (mouse anti-human FSH และ mouse anti-human LH) ตามด้วย biotinylated rabbit anti-mouse IgG-avidin-HRP ปรากฏว่าในรังไข่เมื่อย้อมด้วย anti-FSH เซลล์ oocytes ขั้นต้น ได้แก่ Oc_1 และ Oc_2 แสดงผลบวกโดยการติดสีน้ำตาลที่เกิดจากปฏิกริยาของ substrates ซึ่ง catalysed ด้วย HRP ค่อนข้างต่ำและปานกลาง Oc_3 แสดงผลบวกสูง ส่วน Oc_4 และ Oc_5 ไม่แสดงผลบวกเลย นอกจากเซลล์ oocytes แล้ว trabecular cells บางกลุ่มยังแสดงผลบวกหรือการติดสีน้ำตาลอีกด้วย (รูปที่ 84A,B; 85A,B) เนื่องจากเซลล์เหล่านี้มีขนาดเล็กจึงยังไม่สามารถแยกชนิดของเซลล์ที่แสดงผลบวกได้ ซึ่งคงจะต้องมีการศึกษาในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนต่อไป

เมื่อย้อมด้วย anti-LH เซลล์ที่แสดงผลบวกโดยการติดสีน้ำตาลเข้มคือ เซลล์ระยะ Oc_4, และ Oc_5 ส่วน Oc_{1-3} มีการติดสีพอประมาณถึงสีจาง ในขณะที่เซลล์ใน trabeculae ไม่ติดสีเลย (รูปที่ 85C,D)

ในต่อมอัณฑะที่ย้อมด้วย anti-FSH เซลล์ที่ติดสีจางพอมีอยู่บ้างใน trabeculae ส่วนเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต่าง ๆ ไม่ติดสีเลย (รูปที่ 86A,B) ในกรณีที่ย้อมด้วย anti-LH ไม่มีเซลล์ใดที่แสดงการติดสีอย่างชัดเจน

ข้อมูลเบื้องต้นนี้แสดงว่าอาจจะมี FSH และ LH-liked hormones อยู่ใน gonads ของหอยโดยเฉพาะในรังไข่ gonads เองอาจจะเป็นแหล่งผลิต gonadotrophic hormones ที่มีส่วนควบคุมการสืบพันธุ์ของหอยอีกแหล่งหนึ่ง ซึ่งน่าจะได้ทำการศึกษาเพิ่มเติมในรายละเอียดต่อไป

6.14.2 ฮอร์โมน Egg Laying Hormone (ELH) ของหอยเป๋าฮื้อ

นอกจากการย้อมหา LH และ FSH-liked hormone ในรังไข่และอัณฑะแล้ว เรายังได้ย้อมหาการกระจายของฮอร์โมน ELH ของหอยเป๋าฮื้อ ซึ่งใช้แอนติบอดีชนิด mouse monoclonal anti-egg laying hormone (ที่ได้รับบริจาคจาก Professor Peter Hanna มหาวิทยาลัย Deakin ประเทศออสเตรเลีย) เป็น primary antibodies สำหรับเกาะกับเซลล์ที่อาจจะมีฮอร์โมนคล้ายกับฮอร์โมนดังกล่าว พบว่า anti-ELH ติดสีเข้มมากในส่วน trabeculae

(รูปที่ 87, 88) ซึ่งแสดงว่าอาจมีเซลล์ใน trabeculae ที่ผลิตฮอร์โมน ELH เราจึงได้ทำการศึกษาวิเคราะห์ชนิดของเซลล์ในเยื่อเกี่ยวพันของ trabeculae โดยเฉพาะกลุ่มที่อาจจะเป็นเซลล์ที่ผลิตฮอร์โมน เราพบว่าในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา (รูปที่ 89) trabeculae ประกอบด้วยหลอดเลือดฝอยเป็นแกนที่ถูกหุ้มด้วยเซลล์กล้ามเนื้อซึ่งเรียงตัวตามยาว ที่ขอบของ trabeculae ประกอบด้วยเซลล์บุผิวชั้นเดียว และ follicular cells ซึ่งหุ้มรอบเซลล์ Oc_1, Oc_2 และ Oc_3 แทรกอยู่กับเซลล์กล้ามเนื้อ ในชั้นกลางที่ประกอบด้วยเยื่อเกี่ยวพันชนิด collagen มี fibroblasts และเซลล์ที่มีแกรนูลกระจายอยู่ทั่วไป การศึกษาโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในเบื้องต้นพบว่า กลุ่มเซลล์ที่มีแกรนูลอาจแยกออกได้เป็น 3 ชนิดตามขนาดของแกรนูล คือชนิดที่หนึ่ง เป็นเซลล์ที่มีแกรนูลรูปรักบี้ ขนาด 270 x 500 nm และมีเนื้อในทึบแสงอิเล็กตรอน ชนิดที่สอง เป็นเซลล์ที่มีแกรนูลรูปร่างกลม ขนาด 165 nm และเนื้อทึบแสงอิเล็กตรอน ชนิดที่สาม เป็นเซลล์ที่มีแกรนูลกลม ขนาดเล็กประมาณ 150 nm และมีเนื้อโปร่งแสงอิเล็กตรอน กิ่งของเซลล์ทั้งสามชนิดมักจะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ๆ โดยลักษณะตัวเซลล์แต่ละชนิดยังต้องมีการศึกษาในรายละเอียดต่อไป ที่น่าสนใจคือกลุ่มเซลล์เหล่านี้เกาะกับ anti-ELH จึงทำให้คิดว่าในรังไข่และอัณฑะน่าจะมีเซลล์ที่ผลิตฮอร์โมนซึ่งส่วนมากอาจจะแฝงอยู่ใน trabeculae แล้วทำหน้าที่ควบคุมการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ใน gonads และการปลดปล่อยเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิออกจาก gonads ในช่วง spawning ซึ่งน่าจะทำการศึกษาเซลล์เหล่านี้ และฮอร์โมนที่อาจจะเป็นผลิตภัณฑ์ของมัน ตลอดจนหน้าที่ของฮอร์โมนเหล่านี้โดยละเอียดต่อไป

รูปที่ 84 Control sections ของ ovary ที่ย้อมด้วย mouse anti-human FSH (ภาพ A) และ LH (ภาพ B)

รูปที่ 85 Sections ของรังไข่ที่ย้อมด้วย mouse anti-human FSH (ภาพ A,B) และย้อมด้วย mouse anti-human LH (ภาพ C,D) Oc-oocyte ขั้นต่าง ๆ tr-trabeculae, Cp-capsule

รูปที่ 86 Sections ของ testis ที่ย้อมด้วย mouse anti-human FSH, tr-trabeculae ลูกศร-เซลล์สืบพันธุ์ขั้นต่าง ๆ รอบ ๆ แถบ trabeculae Sz-เซลล์อสุจิ

Figure 84

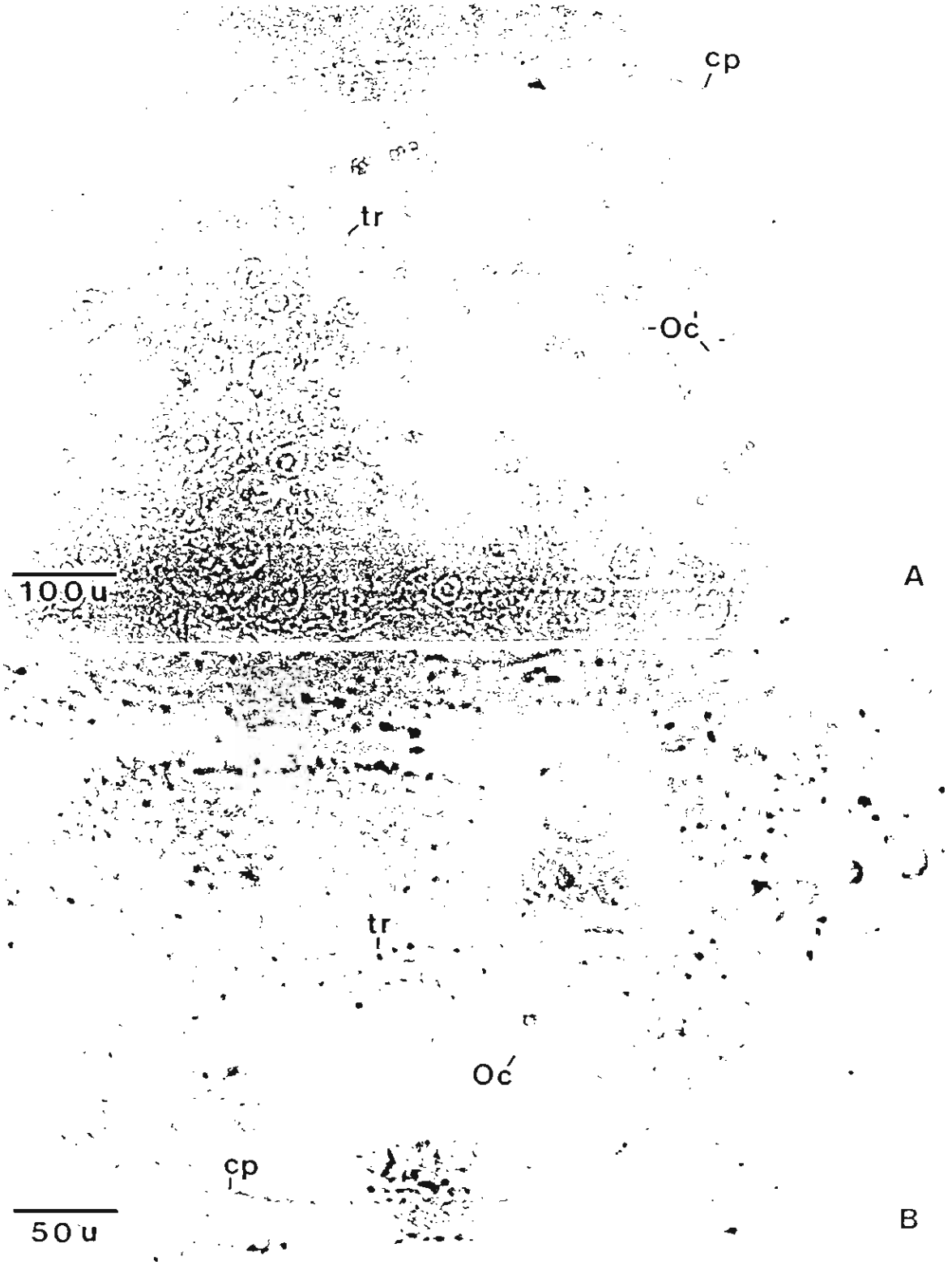


Figure 85

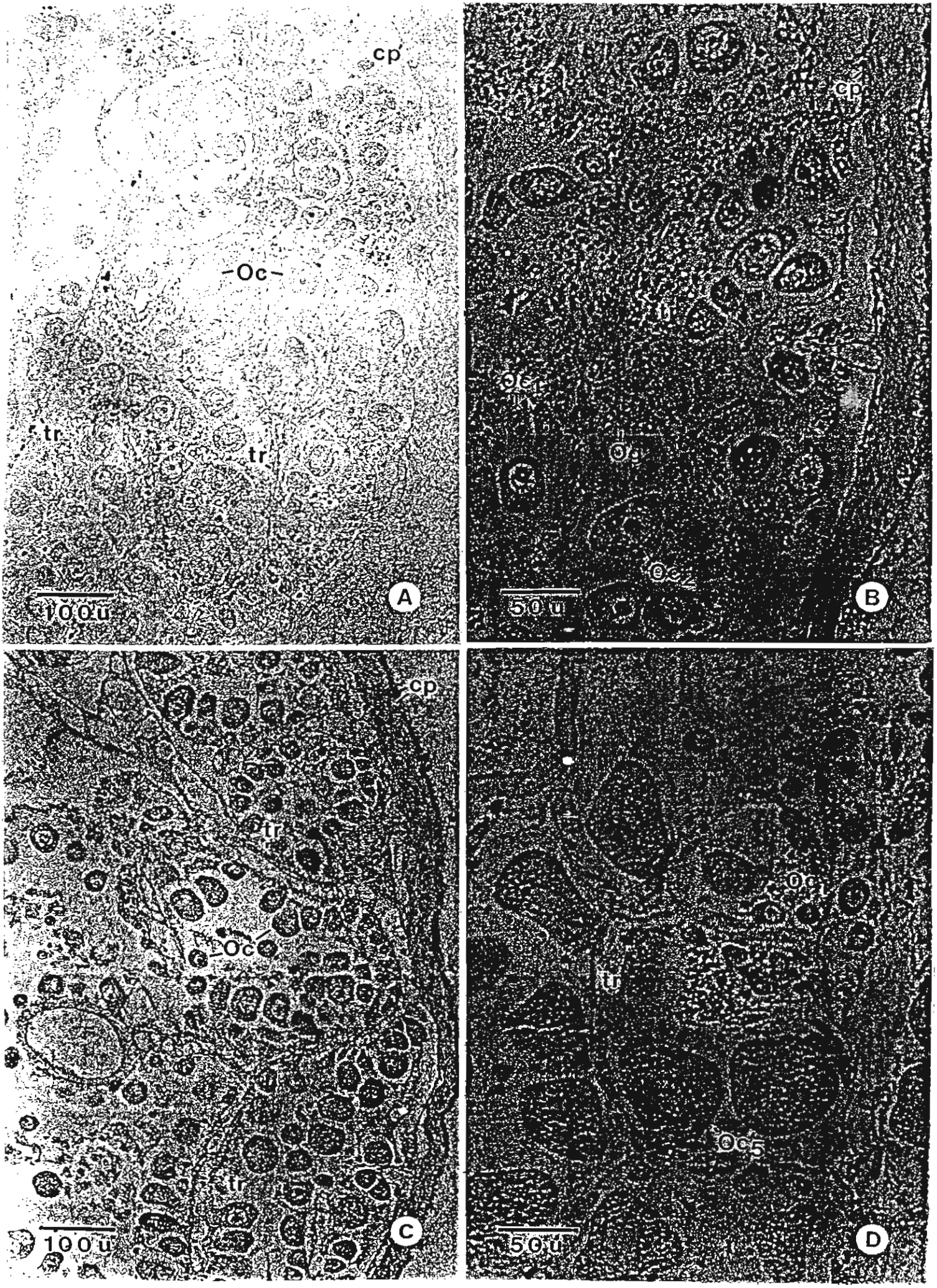
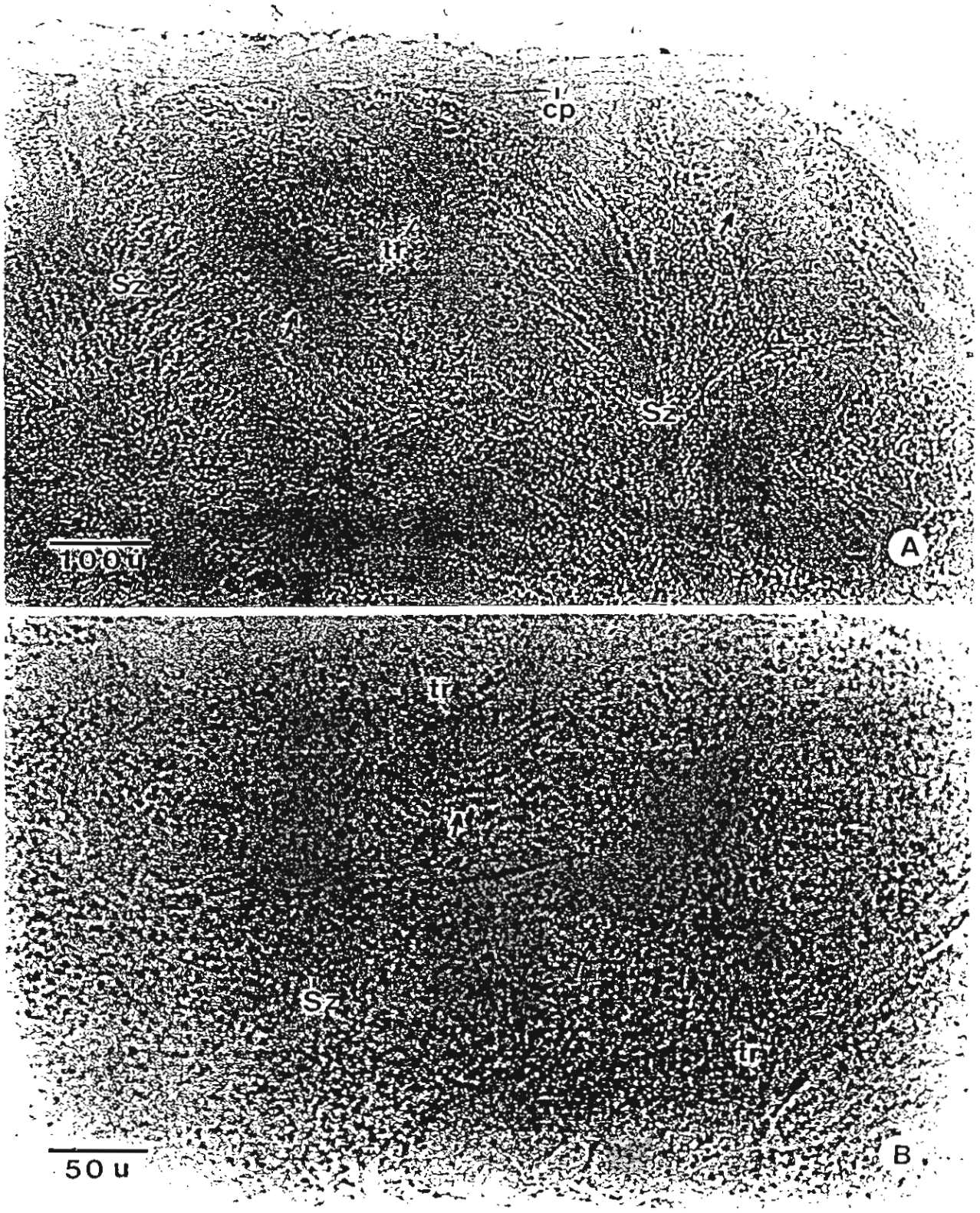

cp
Oc
tr
tr
100u
A
cp
tr
Oc1
Oc2
50u
B
cp
tr
Oc
tr
100u
C
Oc1
tr
Oc5
50u
D

Figure 86

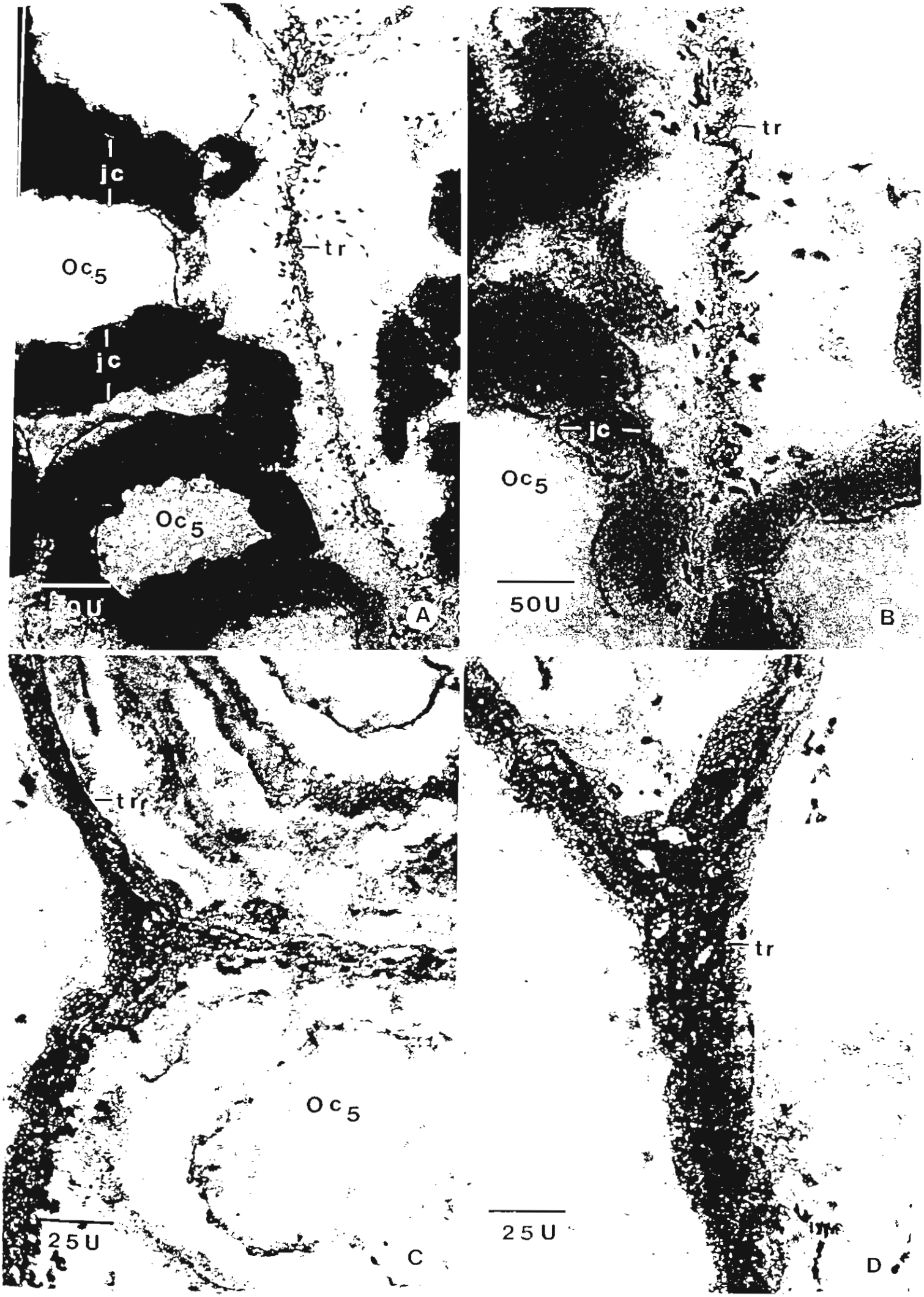


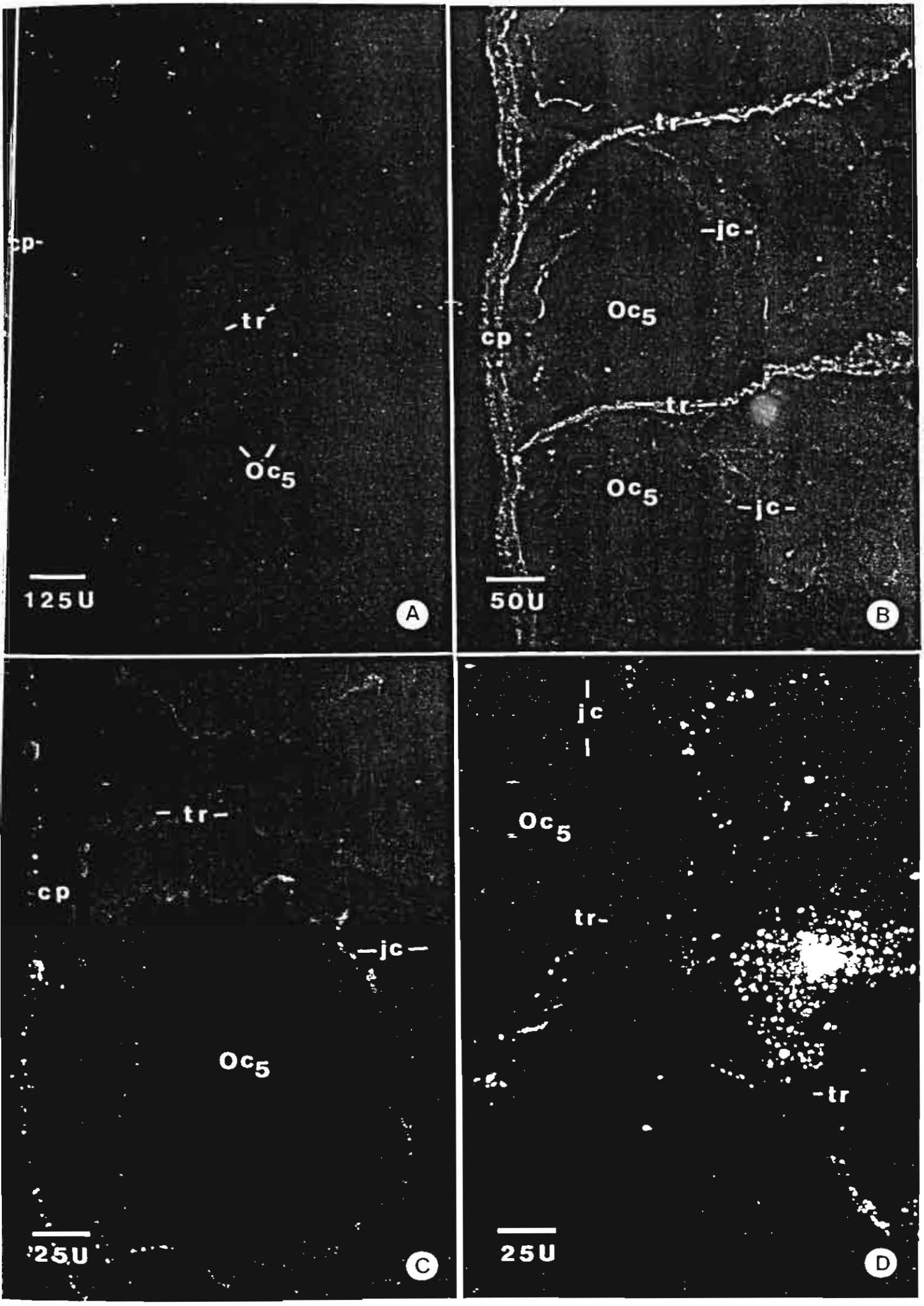
รูปที่ 87 ภาพ LM ของรังไข่ที่ย้อมด้วยวิธี immunohistogold โดยใช้โมโนโคลนัลแอนติบอดีต่อ Egg Laying Hormone (MAB-ELH) เป็น primary antibody แสดงการติดสี gold แบบจำเพาะในแกน trabeculae (A-D) ส่วน jelly coat ของเซลล์ Oc_5 ติดสี gold แบบไม่จำเพาะ (A,B) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control

รูปที่ 88 ภาพ LM ของรังไข่ที่ย้อมด้วยวิธี immunofluorescence โดยใช้ MAB-ELH เป็น primary antibody แสดงการเรืองแสงจำเพาะในแผ่น trabeculae (B-D) ในขณะที่ jelly coat เรืองแสงแบบไม่จำเพาะใน control section (A)

รูปที่ 89 ไดอะแกรมแสดงลักษณะจุลกายวิภาคของแผ่น trabeculae ในรังไข่ซึ่งประกอบด้วยเซลล์ชนิดต่าง ๆ รวมทั้งเซลล์ที่มีแกรนูล (granulated cells-gr) ที่อาจจะผลิตฮอร์โมน ELH

Figure 87




cp
tr
Oc5
125U
A
tr
jc
Oc5
cp
tr
Oc5
jc
50U
B
tr
cp
jc
Oc5
25U
C
jc
Oc5
tr
tr
25U
D

Cells in Trabeculae

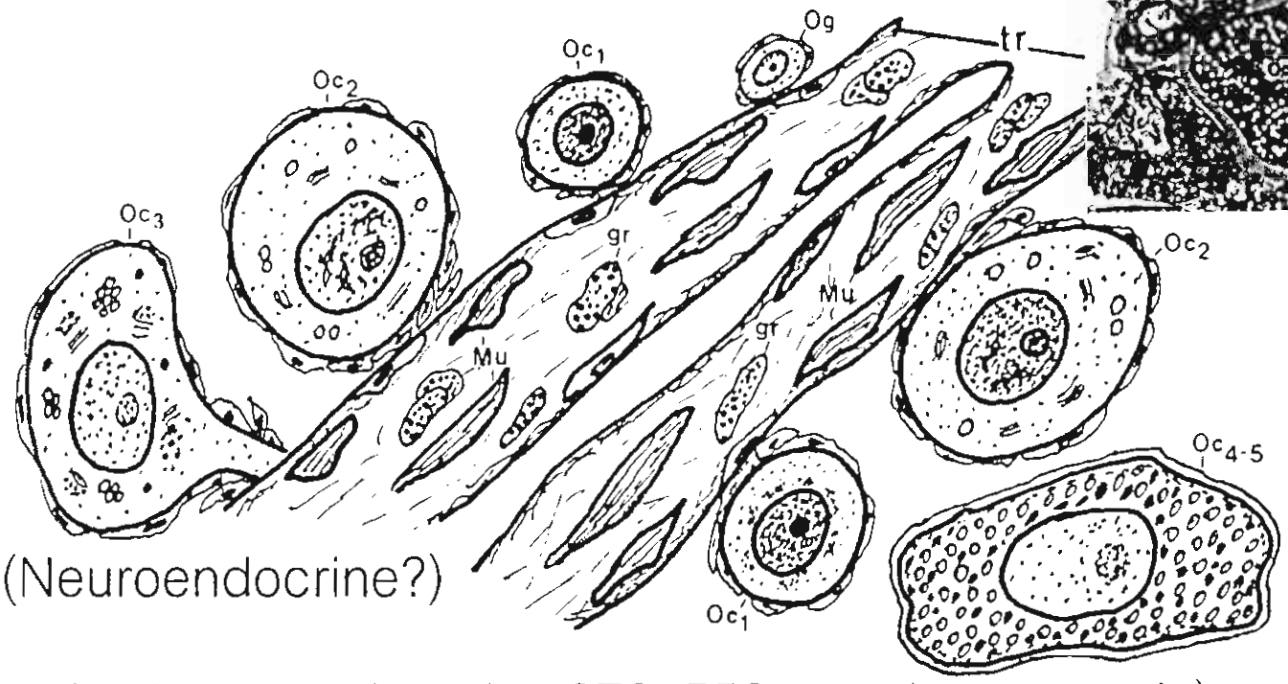


Fibroblasts

Muscle cells

Follicular cells

Granulated cells (Neuroendocrine?)



- Type 1 (granule shape-rugby; size 270x550 nm; dense matrix)
- Type 2 (granule shape-spherical; size 165 nm; dense matrix)
- Type 3 (granule shape-spherical; size 150 nm; light matrix)

Figure 89

6.15 การพัฒนาของระบบประสาท

ปมประสาทที่มีส่วนสำคัญในการควบคุมกระบวนการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์น่าจะประกอบด้วย 3 ปมหลัก คือ ปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral ganglia ดังนั้นเราจึงได้ศึกษาการพัฒนาของปมประสาทเหล่านี้ โดยเฉพาะสังเกตดูการเปลี่ยนแปลงของรูปร่าง ขนาด ปริมาณ และการกระจายของเซลล์ประสาท (neurons) และเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cells) ในส่วนต่าง ๆ ของปมประสาทดังกล่าว และได้ข้อสรุปดังนี้คือ

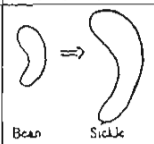
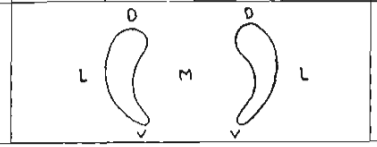
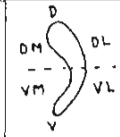
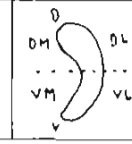
ปมประสาท Cerebral (ตารางที่ 3)

ปมประสาท cerebral ปรากฏชัดเจนเมื่อหอยมีอายุได้ 1 เดือน โดยแต่ละข้างมีรูปร่างคล้ายเม็ดถั่ว (bean shape) ขนาดโดยเฉลี่ย 121 x 471 μm ชั้น cortex ด้าน ventral และ dorsal มีความหนาที่สุด โดยมีชั้นของเซลล์ประมาณ 3-4 ชั้น ส่วนด้าน lateral หนากว่าด้าน medial โดยมีจำนวนชั้นของเซลล์ประมาณ 2-3 ชั้น จำนวนเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell-NS) ยังมีจำนวนน้อย โดยมีแค่ 1-2 เซลล์ต่อ section และเริ่มปรากฏที่ด้าน dorsal ก่อน และส่วนมากเป็นชนิด NS_1 ส่วนเซลล์ประสาทชนิดที่ 1 (NR_1) ยังมีน้อยมาก โดยเริ่มปรากฏอยู่ที่ด้าน dorsal เช่นเดียวกันกับเซลล์ NS

ในระยะ 2-4 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายคลึงกัน กล่าวคือ ปมประสาทค่อย ๆ ขยายขนาดขึ้น และยังมีรูปร่างคล้ายเม็ดถั่ว ชั้น cortex โดยรวมมีความหนาขึ้น และเมื่อเปรียบเทียบ cortex ในส่วนต่าง ๆ แล้ว ยังมีลักษณะคล้ายกับเมื่ออายุ 1 เดือน จำนวน NS เซลล์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยมีจำนวนตั้งแต่ 2-10 เซลล์ต่อ section ซึ่งส่วนมากเป็น NS_1 และ NS_2 เซลล์เหล่านี้เริ่มปรากฏในบริเวณอื่น ๆ เช่น ด้าน dorso-lateral, dorso-medial แล้วไปปรากฏที่ด้าน ventral และ ventro-medial เซลล์ประสาทประกอบด้วย NR_2 และ NR_3 เป็นส่วนใหญ่ NR_1 ยังมีจำนวนน้อยและมีปรากฏที่ด้าน dorso-medial และ ventral ทั้งหมด (รูปที่ 90)

เมื่อหอยอายุได้ 5 เดือน มีการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างจากระยะ 1-4 เดือนอย่างชัดเจน กล่าวคือ ปมประสาท cerebral มีขนาดใหญ่ขึ้นมาก โดยมีรูปร่างคล้ายเมล็ดถั่วหรือรูปเคียว และมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 202 x 632 μm ชั้น cortex ในส่วนต่าง ๆ ของปมประสาทหนาขึ้นอย่างชัดเจนโดยเฉพาะด้าน ventral และ dorsal จำนวนเซลล์ NS ต่อ section เพิ่มขึ้นอย่างมาก โดยมีจำนวนเฉลี่ย 20 เซลล์ต่อ section และ NS เซลล์มีทั้ง 3 ชนิด คือ NS_1, NS_2 และ NS_3 ซึ่งปรากฏขึ้นในแทบทุกส่วนของชั้น cortex ถึงแม้ว่าจะมีการรวมตัวอยู่ทางด้าน dorsal

Table 3 Key Events During the Development of Cerebral ganglion in *Haliotis asinina*

Month	Shape	Size (μm) WxL	Number of cell layers				Number of NS /section	Location of NS	Relative number of NS			Chrome-alum	PAF	Relative Number of NR				Location of NR1
			Ventral (V)	Dorsal (D)	Medial (M)	Lateral (L)			NS1	NS2	NS3			NR1	NR2	NR3	NR4	
1	Bean shape	121x471	4	3	0-1	2-3	1-2	D	+	-	-	-	-	+	++++	++	++	D
2	Bean shape	182x607	5	4	0-3	1-3	2-5	D, DL, DM	+	-	-	-	-	+	++++	++	++	D, DM
3	Bean shape	182x644	5	4	0-3	1-3	2-5	D, DL, DM, V, VM	+	+	-	-	-	+	++++	++	++	D, DM, V
4	Bean shape	174x628	6	7	0-3	2-4	10	D, DL, DM, V, VM	+	+	+	-	-	+	++++	+++	++	D, DM, V
5	Bean shape	203x632	6	7-8	0-3	1-4	20	in all areas	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	D, DM, DL, V, VL, VM
6	Sickle shape	202x637	4-5	6-8	0-3	1-3	20	"	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	same
7	Sickle shape	206x808	4-5	5-7	1-2	1-3	20	"	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	"
8	Sickle shape	273x735	4-5	5-7	0-3	1-5	20	"	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	"
9	Sickle shape	286x690	4-5	5-7	0-3	1-5	20	"	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	"
10	Sickle shape	294x787	4	6	0-3	1-4	30	"	+++	+++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
11	Sickle shape	377x810	4	5-7	1-3	1-4	30-40	"	+++	+++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
12	highly elongated and convoluted	376x901	4-6	6-7	1-3	1-5	30-40	"	+++	+++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
									- =0 cell/section +=1-5 cells/section ++=6-10 cells/section +++=11-15 cells/section ++++=>15 cells/section			-= nonreactive + = reactive		- =0 cell/section +=1-10 cells/section ++=11-20 cells/section +++=21-30 cells/section ++++ = >30 cells/section				

Significant changes were observed at 5, 10, 12 months:

5 month : numbers of neurosecretory cells (NS) are significant increased, and become both PAFand chrome alum positive ; numbers of neuron 1 (NR1) are significant increased

10 month : NS are increase further in size and number and become both PAF and chrome-alum positive

12 month : ganglion become highly elongated and convoluted, NS reach maximal number

Abbreviations : NS = Neurosecretory cell (consisting of 3 types : NS1, NS2, NS3)

NR = Neuron (consisting of 4 types : NR1, NR2, NR3, NR4)

The number in the table represent means of the numbers estimated from examming 20 slides from at least 3 animals

และ ventral เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนั้นแล้ว NS เซลล์ยังเริ่มติดสี paraldehyde fuschin (PF) ซึ่งแสดงการสะสมของแกรนูลของฮอร์โมนในเซลล์เหล่านี้ (รูปที่ 98) ส่วน NR เซลล์นั้นนอกจากจะมี NR_2, NR_3 และ NR_4 ตามปกติแล้ว เซลล์ยังเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างเห็นได้ชัดโดยเฉพาะที่ด้าน ventral, ventro-lateral และ ventro-medial (รูปที่ 91)

จาก 6 ถึง 9 เดือน ปมประสาท cerebral ค่อย ๆ เพิ่มขนาดขึ้นและยืดออกตามยาว ทำให้ปรับเปลี่ยนเป็นรูปเคียว (sickle shape) ชั้น cortex ของส่วนต่าง ๆ หนาเท่าเดิม และจำนวนกับตำแหน่งการกระจายของ NS เซลล์ก็คล้ายกับในช่วงอายุ 5 เดือน เซลล์ประสาท NR ก็มีชนิด ปริมาณ และการกระจายคล้าย ๆ กับในช่วง 5 เดือน

ในช่วง 10 เดือน ปมประสาท cerebral ขยายใหญ่อย่างเห็นได้ชัด โดยมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 294 x 787 μm ลักษณะอื่น ๆ คล้ายคลึงกับปมประสาทในช่วง 5-9 เดือน แต่ที่แตกต่างชัดเจนคือ เซลล์ NS ทั้งสามชนิด และเซลล์ NR_1 เพิ่มจำนวนขึ้นมากอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 92)

เมื่อหอยมีอายุครบ 12 เดือน ปมประสาท cerebral พัฒนาเต็มที่คล้ายคลึงกับที่พบในหอยตัวเต็มวัย (รูปที่ 93)

ปมประสาท Pleuropedal (ตารางที่ 4)

ปมประสาท pleuropedal ปรากฏเป็นรูปผีเสื้อ (butterfly shape) ชัดเจนเมื่อหอยมีอายุ 1 เดือน โดยแยกเป็น 4 แฉกที่เชื่อมต่อกันโดยแถบกลาง ปมประสาทมีขนาดตามแนวยาวและกว้าง (ดูตารางที่ 4) โดยเฉลี่ย 189 x 418 μm ด้าน ventral และ lateral มักมีจำนวนชั้นของเซลล์มากกว่าด้าน dorsal และ medial ในช่วงอายุนี้มีเซลล์ NS อยู่น้อยมากและเริ่มปรากฏในบริเวณ dorsal เซลล์ NS ทั้งหมดเป็นแบบ NS_1 ที่ยังไม่แสดงปฏิกิริยาติดสีต่อ paraldehyde fuchsin (PF) หรือ chrome-alum (CA) เซลล์ NS เริ่มปรากฏในแถบ dorsal sulcus ส่วนเซลล์ NR เกือบทั้งหมดเป็น NR_2, NR_3 และ NR_4 โดยมี NR_1 อยู่น้อยมากและถ้ามีก็มักจะปรากฏในแถบ dorso-medial (รูปที่ 94)

ในระหว่างช่วงอายุ 2-3 เดือน ปมประสาท pleuropedal ค่อย ๆ มีขนาดใหญ่ขึ้นแต่ยังคงรูปผีเสื้อตามเดิม ลักษณะโดยทั่วไปคล้ายกับในช่วง 1 เดือน ชั้น cortex โดยทั่วไปหนาขึ้นเล็กน้อย และจำนวน NS มีมากกว่าในช่วง 1 เดือน แต่ไม่แตกต่างอย่างชัดเจน โดยเริ่มมีการกระจายในส่วนอื่น ๆ มากขึ้น ได้แก่ บริเวณ dorso-medial และ lateral sulcus เซลล์ประสาท NR ส่วนใหญ่ประกอบด้วย NR_2, NR_3 และ NR_4 ส่วน NR_1 ยังคงมีจำนวนน้อยและเริ่มปรากฏในส่วนอื่นเพิ่มเติมจากด้าน dorso-medial ได้แก่ ด้าน dorsal และ dorso-lateral

ในช่วงอายุ 4 เดือน ปมประสาท pleuropedal มีการเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจน กล่าวคือ ปมประสาทมีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีขนาดเฉลี่ย 337 x 556 µm ชั้น cortex บริเวณด้านต่าง ๆ มีความหนามากขึ้น และจำนวน NS เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยมีจำนวนเฉลี่ยประมาณ 20 เซลล์ต่อ section นอกจากส่วนต่าง ๆ ที่กล่าวมาแล้ว NS ยังปรากฏในแถบ dorso-lateral และ ventro-lateral เซลล์ NS ส่วนใหญ่เป็น NS_1 แต่ก็มี NS_2 และ NS_3 เพิ่มขึ้น ซึ่งแสดงการติดสี CA และ PF ชัดเจนขึ้น เซลล์ประสาทส่วนมากยังคงเป็นพวก NR_2, NR_3 และ NR_4 และมี NR_1 เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับระยะต้น โดยเริ่มปรากฏในส่วนอื่น ๆ เช่น dorso-lateral, dorsal, ventro-medial, ventro-lateral และventral sulcus (รูปที่ 95)

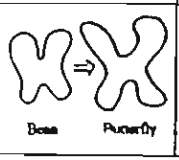
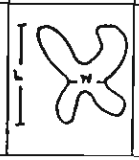
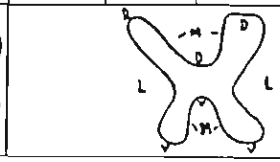
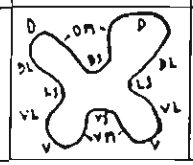
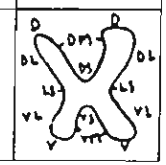
ในช่วงอายุ 5-6 เดือน ปมประสาท pleuropedal มีรูปร่างและลักษณะคล้ายคลึงกับในช่วง 4 เดือน แต่มีขนาดใหญ่ขึ้น เซลล์ NS และ NR มีจำนวนใกล้เคียงกับช่วง 4 เดือน แต่ปรากฏในแถบอื่น ๆ ด้วย เช่น NS เซลล์เริ่มปรากฏในแถบ ventral และ แถบ dorsal มากขึ้น ส่วนเซลล์ NR มีจำนวนและการกระจายคล้ายคลึงกับในช่วง 4 เดือน

ในช่วงอายุ 7 เดือน ปมประสาท pleuropedal มีลักษณะแตกต่างจากช่วง 4-6 เดือนชัดเจน กล่าวคือมีส่วนขา dorsal และ ventral ที่ยืดยาวออกไปและมีความยาวเท่า ๆ กัน จนทำให้ปมประสาทมีรูปร่างคล้ายอักษร H ปมประสาทมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 544 x 1615 µm ชั้น cortex ในบริเวณต่าง ๆ มีความหนาขึ้น เซลล์ NS มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และมีจำนวนโดยเฉลี่ยประมาณ 30-40 เซลล์ต่อ section เซลล์ NS กระจายอยู่แทบทุกบริเวณของปมประสาท โดยมีเซลล์ NS_1 จำนวนมากที่สุด เซลล์ประสาท NR_1 เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และปรากฏตัวอยู่ในแทบทุกด้านของปมประสาท (รูปที่ 96)

ในช่วงอายุ 8 ถึง 10 เดือน ปมประสาท pleuropedal มีขนาดและรูปร่างใกล้เคียงกับในช่วง 7 เดือน ชั้น cortex ก็มีความหนาใกล้เคียงกัน NS เซลล์มีจำนวนเฉลี่ยเท่าเดิม แต่มีการกระจายอยู่ในแทบทุกบริเวณของชั้น cortex เซลล์ประสาท NR_2, NR_3, NR_4 มีจำนวนและการกระจายคล้ายคลึงกับในช่วง 7 เดือน แต่ NR_1 มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และกระจายอยู่ในเกือบทุกส่วนของชั้น cortex

ช่วงอายุ 11 เดือน เป็นช่วงที่ปมประสาท pleuropedal มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน โดยมีขนาดใหญ่ขึ้น อีกทั้งมีกิ่งบนและล่างที่ยืดออกมากกว่าเดิม ปมประสาทมีขนาดโดยเฉลี่ยประมาณ 589 X 2508 µm ชั้น cortex ด้านต่าง ๆ มีความหนาขึ้นชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับช่วงก่อน จำนวนของ NS เซลล์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด โดยมีประมาณ 60 เซลล์ต่อ section และกระจายอยู่ในทุกส่วนของชั้น cortex เซลล์ประสาททุกชนิดมีจำนวนเพิ่มขึ้นมากโดยเฉพาะเซลล์ NR_1 เมื่อเปรียบเทียบกับช่วงก่อน (รูปที่ 97, 98)

Table 4 Key Events During the Development of Pleuropedal ganglion in *Haliotis asinina*

Month	Shape	Size (μm) WxL	Number of cell layers				Number of NS /section	Location of NS	Relative number of NS			Chrome -alum	PAF	Relative Number of NR				Location of NR1
			Ventral (V)	Dorsal (D)	Medial (M)	Lateral (L)			NS1	NS2	NS3			NR1	NR2	NR3	NR4	
1	Butterfly shape	189x418	2-4	0-3	1-3	0-5	1-2	DS	+	-	-	-	-	+	+++	++	++	DM
2	Butterfly shape	273x491	2-4	1-5	1-2	1-5	2-3	DS, DM, LS	+	+	-	+	-	+	+++	++	++	DM
3	Butterfly shape	269x522	4	1-5	1-3	2-4	2-3	DS, DM, LS	+	+	-	+	-	+	+++	++	++	DM, DL, D
4	Butterfly shape	337x556	5	2-5	2-3	2-7	20	DS, DM,LS, DL, VL	++	+	+	+	+	++	+++	+++	++	DM, DL, D, VM, VL, VS
5	Butterfly shape	455x572	5	2-5	2-3	1-7	20	DS, DM, LS, DL, VL, V	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	DM, DL, D, VM, VL, VS
6	Butterfly shape	488x707	5	2-5	2-3	1-7	20	DS, DM, LS, DL, VL, V, D	++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	same
7	H shape	544xi615	4-6	2-5	5	3-10	30-40	in all area	+++	++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
8	H shape	546x1352	3-5	5	2-3	4-7	30-40	"	+++	++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
9	H shape	572x1061	4-5	2-5	3-4	1-8	30-40	"	+++	+++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
10	H shape	580x1300	4-5	2-5	3-4	2-7	30-50	"	++++	+++	++	+	+	+++	++++	++++	++	"
11	H shape,highly elongated and enlarged	589x2508	5-6	4-6	5	3-10	60	"	++++	++++	+++	+	+	+++	++++	++++	+++	"
12	H shape,similar	589x2943	5	5-6	3-4	7	60	"	++++	++++	+++	+	+	+++	++++	++++	+++	"
									-=0 cell/section +=1-5 cells/section ++=6-10 cells/section +++=11-15cells/section ++++=>15 cells/section			-= nonreactive += reactive		-=0 cell/section +=1-10 cells/section ++=11-20 cells/section +++=21-30 cells/section ++++ = >30 cells/section				

Significant changes were observed at 4,7,11months:

4 month : significant increase in numbers of cell layers and NS cells,NS become chrome alum positive

7 month : ganglion are much enlarged, cell layers increase, and number of NS cells increase even further.

11 month : NS reach maximal number and the ganglion become adult like.

Abbreviations : NS = Neurosecretory cell (consisting of 3 types ; NS1, NS2, NS3)

NR = Neuron (consisting of 4 types ; NR1, NR2, NR3, NR4)

The numbers in the table represent means of the number estimated from examming 20 slides from at least 3 animals

เมื่อหอยมีอายุได้ 12 เดือน ปมประสาท pleuropedal พัฒนาสมบูรณ์โดยมีขนาด ลักษณะ จำนวนเซลล์ และการกระจายของเซลล์เช่นเดียวกับที่พบในปมประสาทของหอยตัวเต็มวัย

ปมประสาท Visceral (ตารางที่ 5)

ในหอยอายุ 1 เดือน ปมประสาท visceral มีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับปมประสาท cerebral และ pleuropedal โดยมีขนาดเฉลี่ยประมาณ 37 x 72 μm และมีรูปร่างคล้ายเม็ดถั่ว (bean shape) cortex มีเซลล์เพียง 1 ชั้น หรือบางด้านโดยเฉพาะด้าน dorsal ไม่มีเลย เซลล์ NS ยังไม่ปรากฏ ส่วนเซลล์ NR มีเฉพาะ NR_2, NR_3 และ NR_4 จำนวนไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับปมประสาท cerebral และ pleuropedal (รูปที่ 99)

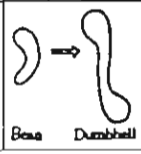
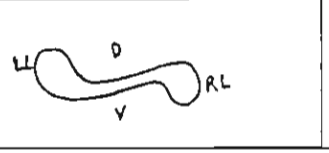
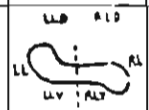
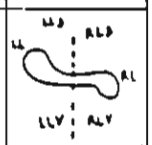
ในช่วง 2 ถึง 3 เดือน ปมประสาท visceral มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ และรูปร่างเปลี่ยนเป็น dumbbell shape ชั้น cortex ยังประกอบด้วย เซลล์เพียง 1-2 ชั้น โดยด้าน lateral มักจะมีจำนวนชั้นของเซลล์มากกว่าบริเวณอื่น NS เริ่มปรากฏแต่ยังมีจำนวนน้อยมากและมักพบในด้าน left lateral รวมถึง left latero-dorsal และ left latero-ventral เซลล์ประสาท NR ส่วนใหญ่คือ NR_2, NR_3 และ NR_4 ซึ่งยังคงมีจำนวนไม่มากนักเมื่อเปรียบเทียบกับปมประสาทอื่น ๆ NR_1 มีจำนวนน้อยมาก และมักพบในด้าน left lateral และ left latero-ventral (รูปที่ 100)

ช่วงอายุ 4 เดือน เป็นช่วงที่ปมประสาท visceral มีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดเนื่องจากมีขนาดใหญ่ขึ้นโดยเฉลี่ย 123 x 454 μm cortex มีชั้นของเซลล์มากขึ้น และมีจำนวน NS เซลล์มากขึ้น ซึ่งเริ่มกระจายไปสู่ด้าน right lateral ด้วย โดยทั่วไปเซลล์ประสาทยังมีจำนวนและการกระจายเหมือนในช่วง 2-3 เดือน

ช่วงอายุ 5-8 เดือน ปมประสาท visceral มีรูปร่าง ขนาด ลักษณะ จำนวนเซลล์ NS, NR และการกระจายของเซลล์เหล่านี้คล้ายคลึงกับในช่วง 4 เดือน และเมื่อถึงช่วง 9-10 เดือน ปมประสาทมีขนาดใหญ่ขึ้นแต่ลักษณะอื่น ๆ ยังคงเดิม

ช่วงอายุ 11 เดือน เป็นช่วงที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน โดยปมประสาทมีความยาวมากขึ้นทั้ง ๆ ที่ความกว้างยังคงเดิม สิ่งที่สังเกตเห็นได้ชัดคือจำนวน NS เซลล์ โดยเฉพาะ NS_1 มีปริมาณเพิ่มขึ้นมากและกระจายอยู่ใน cortex เกือบทุกด้าน โดยมักมีการรวมตัวอยู่มากทางด้าน left lateral เมื่อหอยอายุได้ 12 เดือน ปมประสาท visceral ก็จะมีขนาด ลักษณะ และปริมาณของเซลล์ NS และ NR ใกล้เคียงกับที่พบในหอยตัวเต็มวัย (รูปที่ 101)

Table 5 Key Events During the Development of Visceral ganglion in *Haliotis asinina*

Month	Shape	Size (μm) WxL	Number of cell layers				Number of NS /section	Location of NS	Relative number of NS			Chrome -alum	PAF	Relative Number of NR				Location of NR1
			Ventral (V)	Dorsal (D)	Right (RL) Lateral	Left(LL) Lateral			NS1	NS2	NS3			NR1	NR2	NR3	NR4	
1	Bean shape	37x72	1	0-1	1	1-2	-	-	-	-	-	-	-	-	++	++	+	-
2	Bean shape	48x74	1-2	1-2	1	1-3	1-2	LL	+	-	-	-	-	+	++	++	+	LL, LLV
3	Dumbbell shape	118x488	1-2	1-2	1	1-4	2-3	LL, LLV, LLD	+	+	-	-	-	+	++	++	+	LL, LLV,
4	Dumbbell shape	123x494	1-2	1-2	1	2	10	LL, LLV, LLD	+	+	-	-	-	+	++	++	+	LL, LLV, LLD
5	Dumbbell shape	151x607	1-2	1-2	1	1-3	10	LL, LLV, LLD,RL	++	+	+	-	-	+	++	++	+	LL, LLV, LLD, RL
6	Dumbbell shape	155x923	1-3	1-2	1-2	1-3	10	same	++	+	+	+	+	++	++	++	+	same
7	Dumbbell shape	168x640	1-3	1-2	1-2	1-3	10	"	++	+	+	+	+	++	++	++	+	"
8	Dumbbell shape	161x640	1-3	1-2	1	1-3	10	"	++	+	+	+	+	++	++	++	+	"
9	Dumbbell shape	160x700	1-3	1-2	1-2	1-3	10	in all area	++	+	+	+	+	++	+++	++	+	"
11	Dumbbell shape	160x889	1-3	1-2	1-2	1-3	20	"	+++	+	+	+	+	++	++++	+++	++	in all area
12	Dumbbell shape	165x939	1-3	1-2	1-2	1-3	20	"	+++	++	+	+	+	++	++++	+++	++	"
									- = 0 cell/section + = 1-5 cells/section ++ = 6-10 cells/section +++ = 11-15 cells/section ++++ = >15 cells/section			- = nonreactive + = reactive		- = 0 cell/section + = 1-10 cells/section ++ = 11-20 cells/section +++ = 21-30 cells/section ++++ = >30 cells/section				

Significant changes were observed at 4,11 months :
at 4 month : number of neurosecretory cells(NS) are significantly increased
at 11 month : NS are increased further in number and become both PAF and chrome-alum positive
Abbrevations : NS = Neurosecretory cell (consisting of 3 types : NS1, NS2, NS3)
NR = Neuron (consisting of 4 types : NR1, NR2, NR3, NR4)
The numbers in the table represent means of the numbers estimated from examming 20 slides from at least 3 animals

รูปที่ 90 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท cerebral เมื่อหอยมีอายุได้ 4 เดือน

รูปที่ 91 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท cerebral เมื่อหอยมีอายุได้ 5 เดือน

รูปที่ 92 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท cerebral เมื่อหอยมีอายุได้ 10 เดือน

รูปที่ 93 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท cerebral เมื่อหอยมีอายุได้ 12 เดือน

รูปที่ 94 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท pleuropedal เมื่อหอยมีอายุได้ 1 เดือน

รูปที่ 95 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท pleuropedal เมื่อหอยมีอายุได้ 4 เดือน

รูปที่ 96 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท pleuropedal เมื่อหอยมีอายุได้ 7 เดือน

รูปที่ 97 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท pleuropedal เมื่อหอยมีอายุได้ 11 เดือน

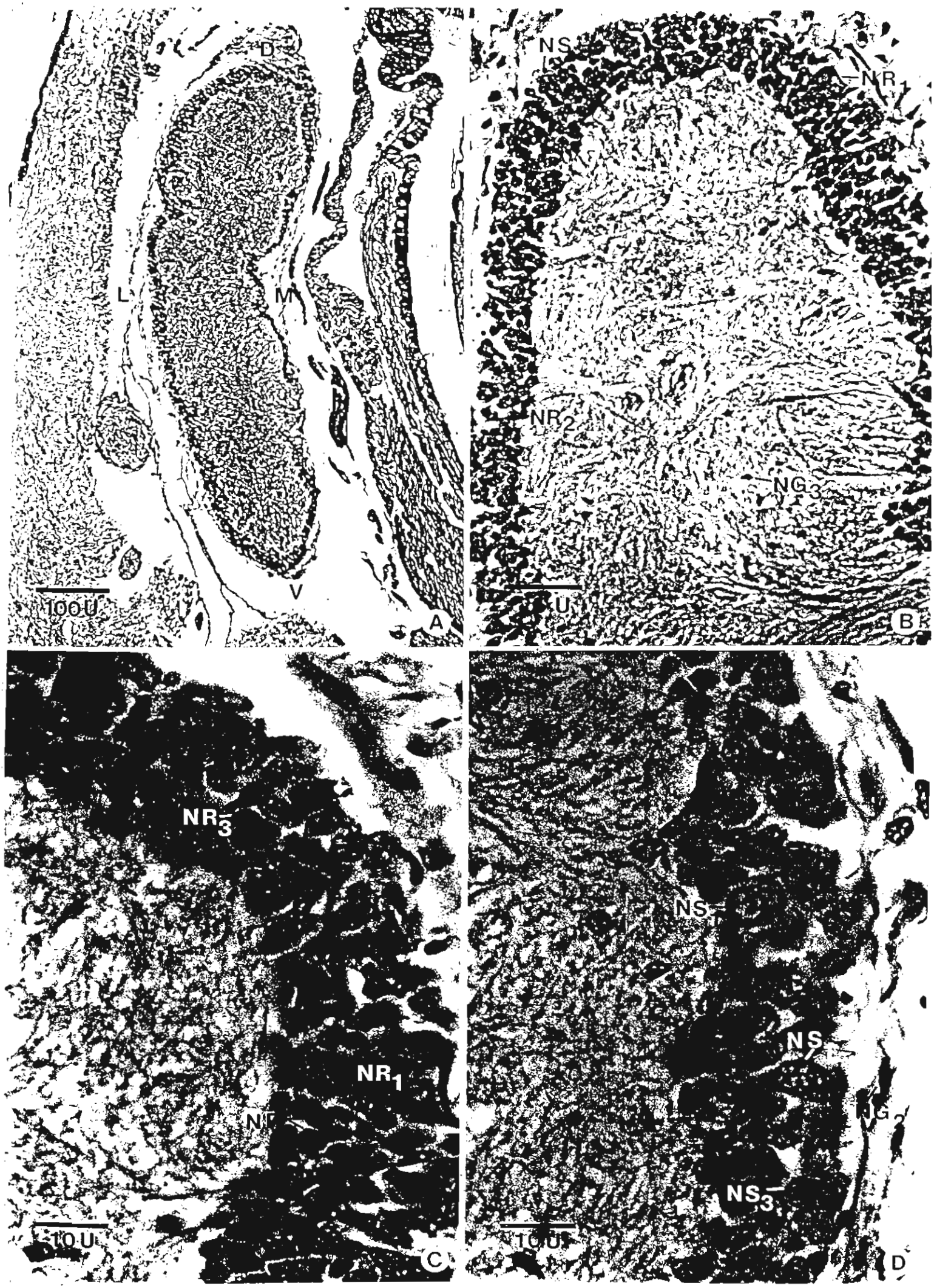
รูปที่ 98 ภาพ LM ของ sections ของปมประสาท pleuropedal ที่ย้อมด้วยสี paraldehyde-fuchsin stain (A,B) และ chrome-alum stain (C,D) แสดงชั้น cortex ในปมประสาท pleuropedal เมื่อหอยมีอายุได้ 12 เดือน

รูปที่ 99 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท visceral เมื่อหอยมีอายุได้ 1 เดือน

รูปที่ 100 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท visceral เมื่อหอยมีอายุได้ 3 เดือน

รูปที่ 101 ภาพ LM (H & E stain) ของปมประสาท visceral เมื่อหอยมีอายุได้ 11 เดือน

Figure 90




M
L
A


NG
NR
NS
B


N
NS2
NS2
C


NS1
NS1
D

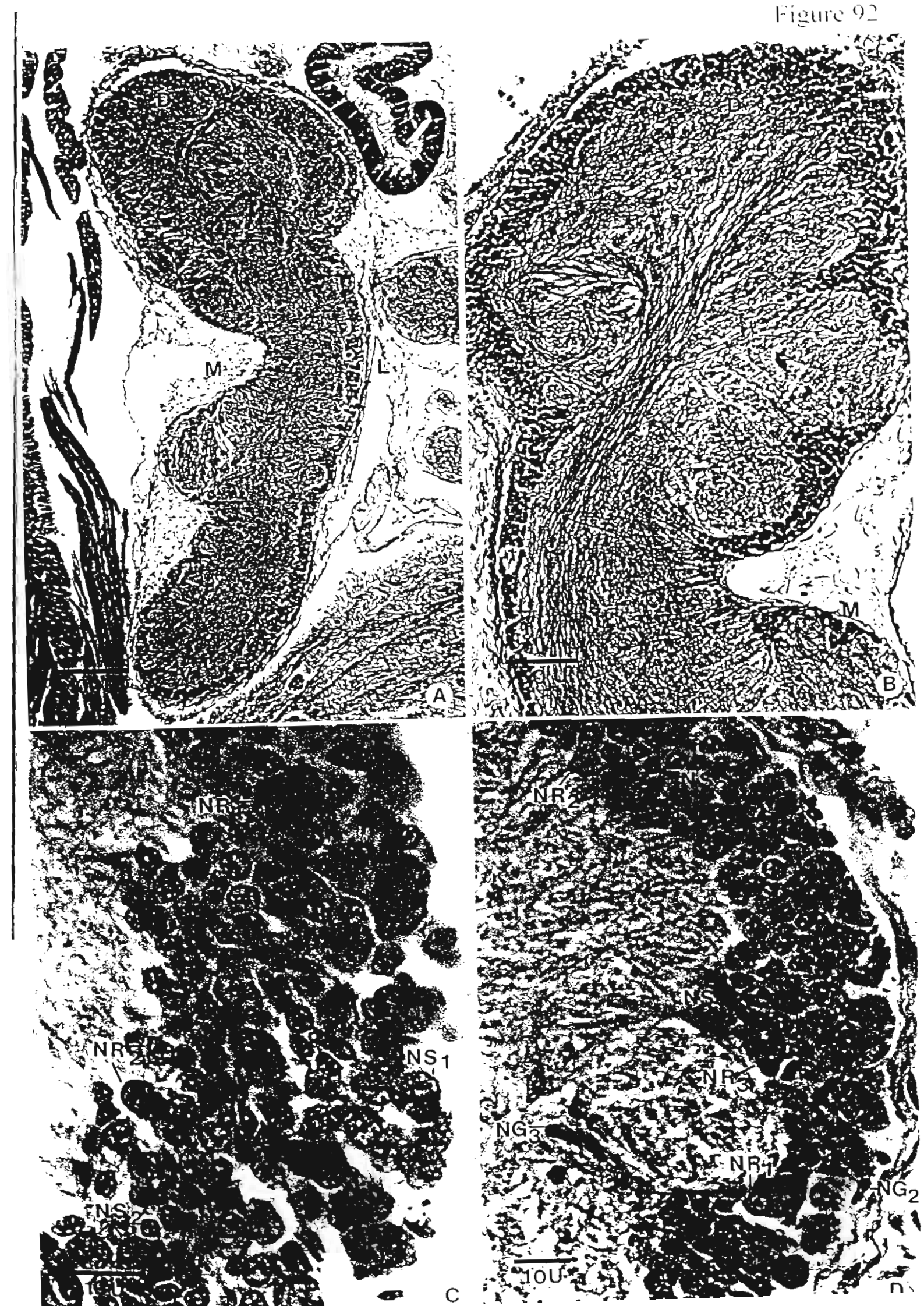
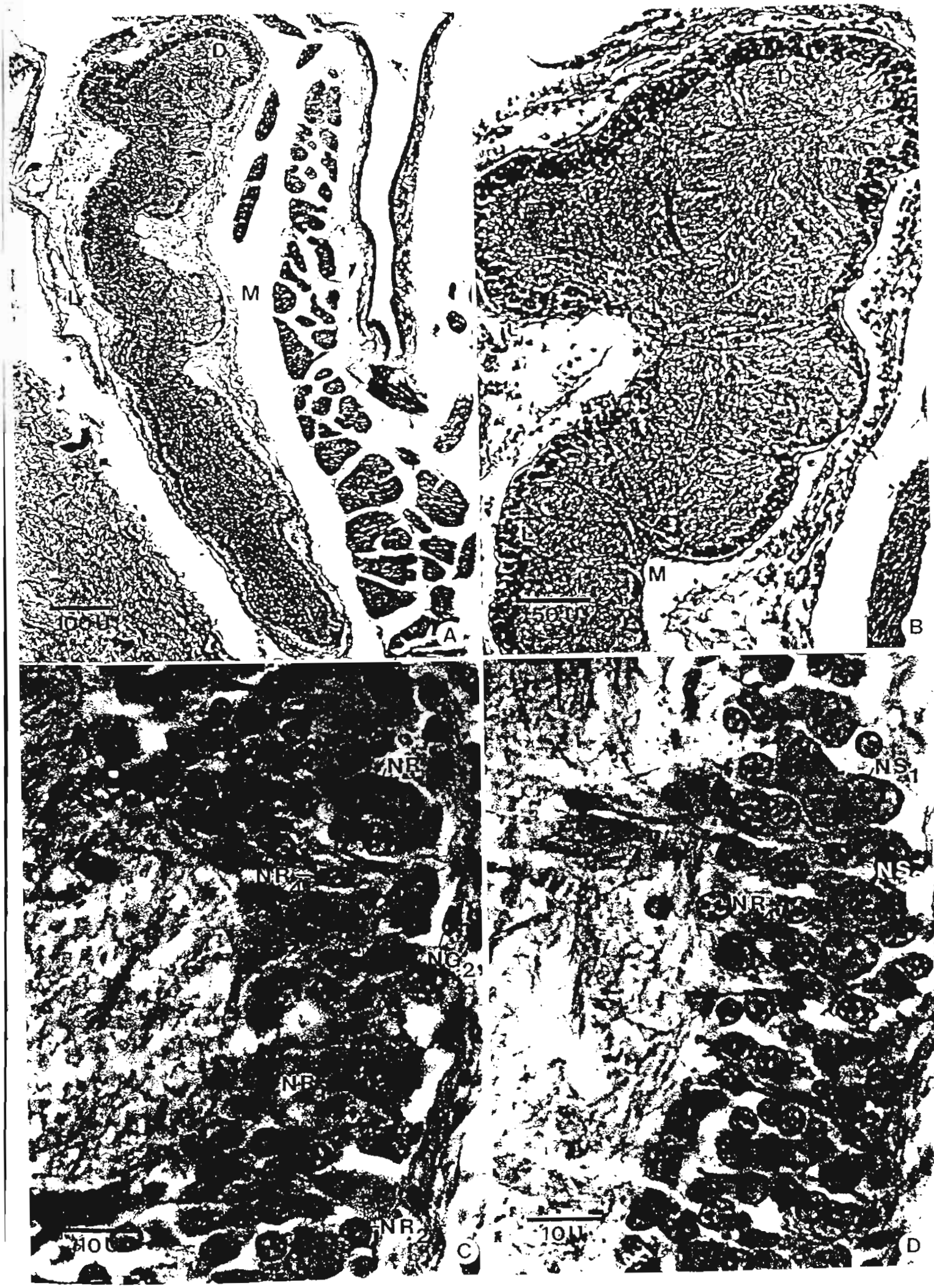

D
M
L
A
D
M
B
NR1
NR2
NS1
NS2
C
NR2
NS
NS
NR3
NG3
NR1
NG2
D

Figure 93



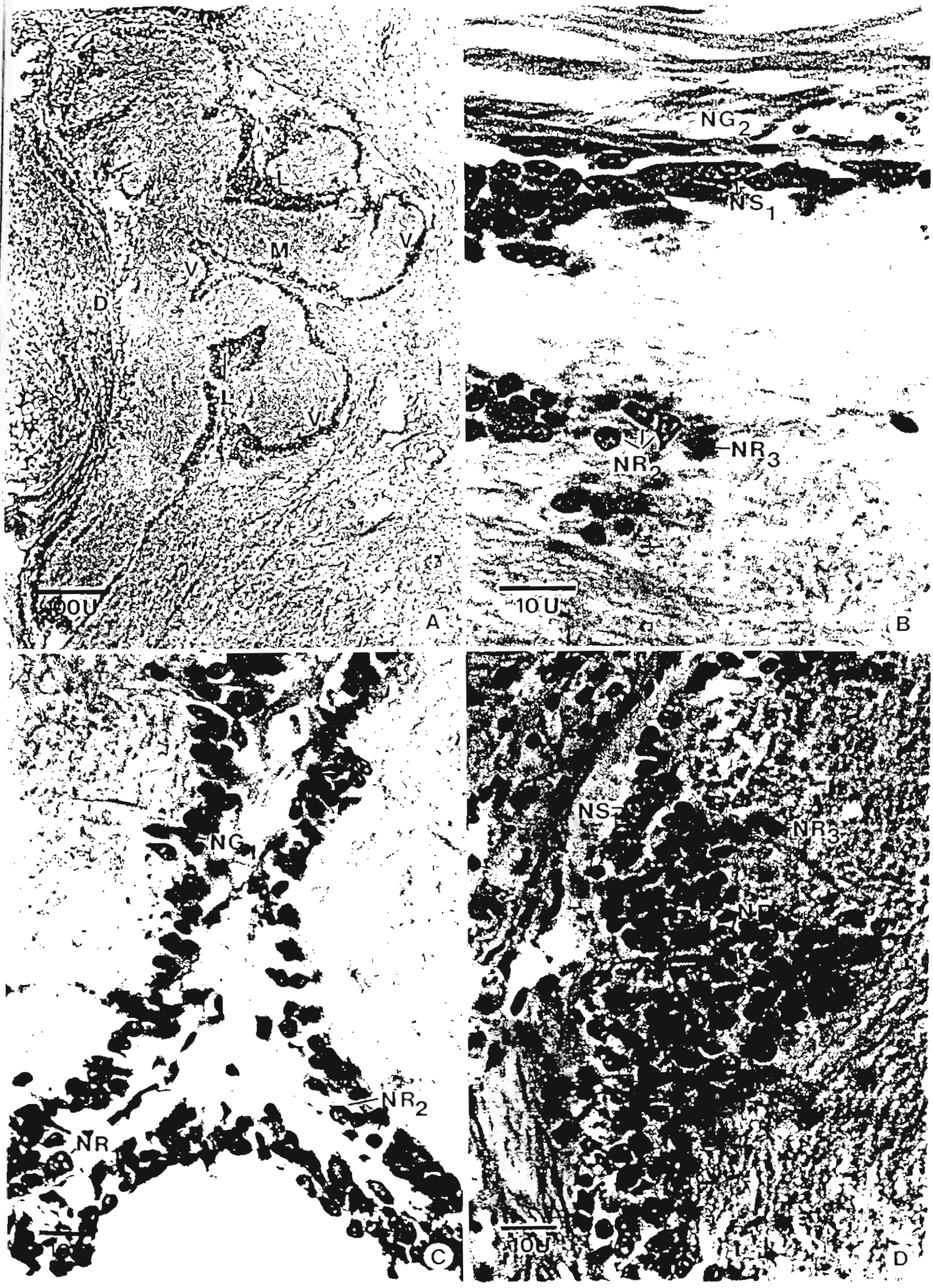
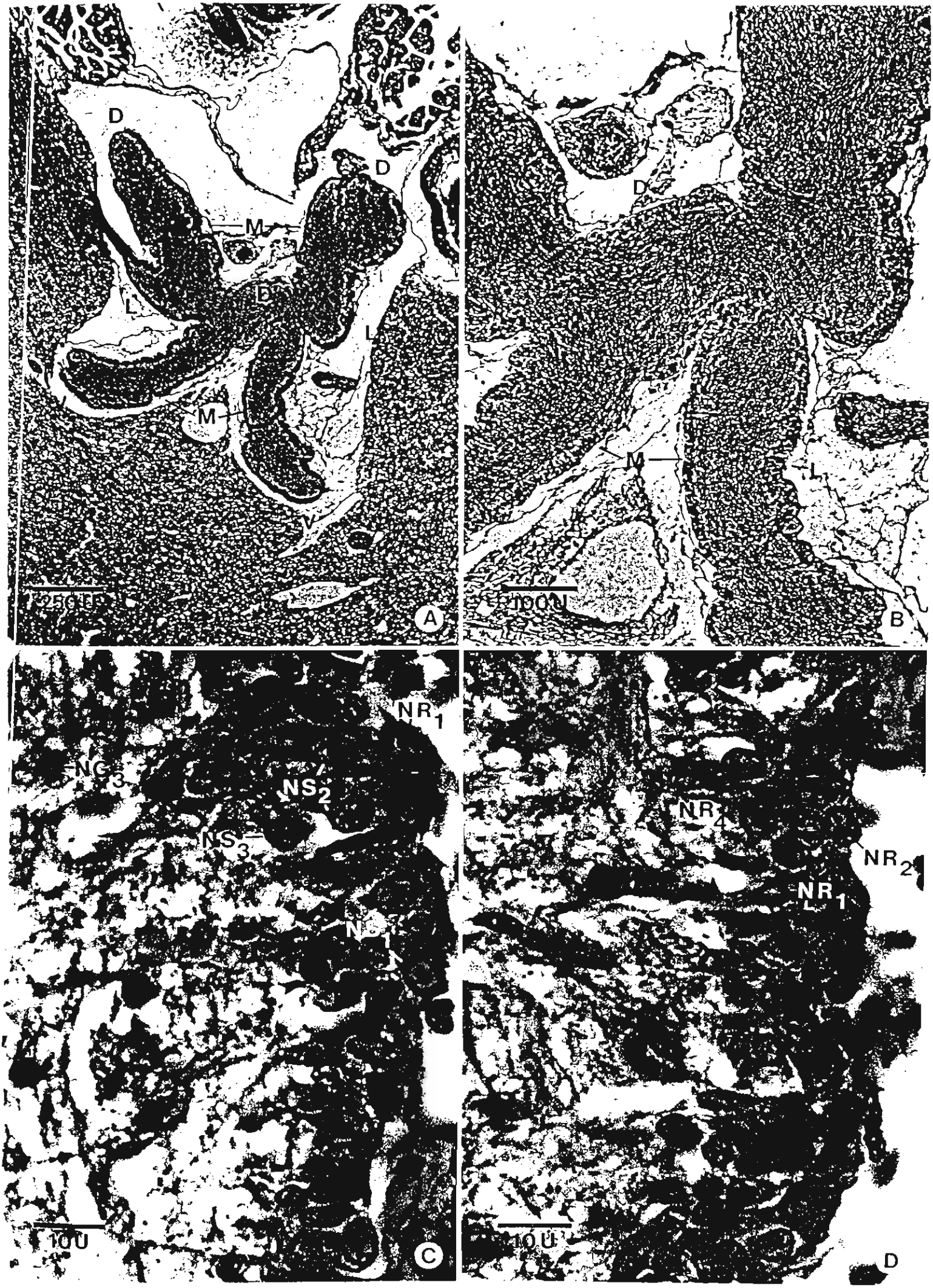
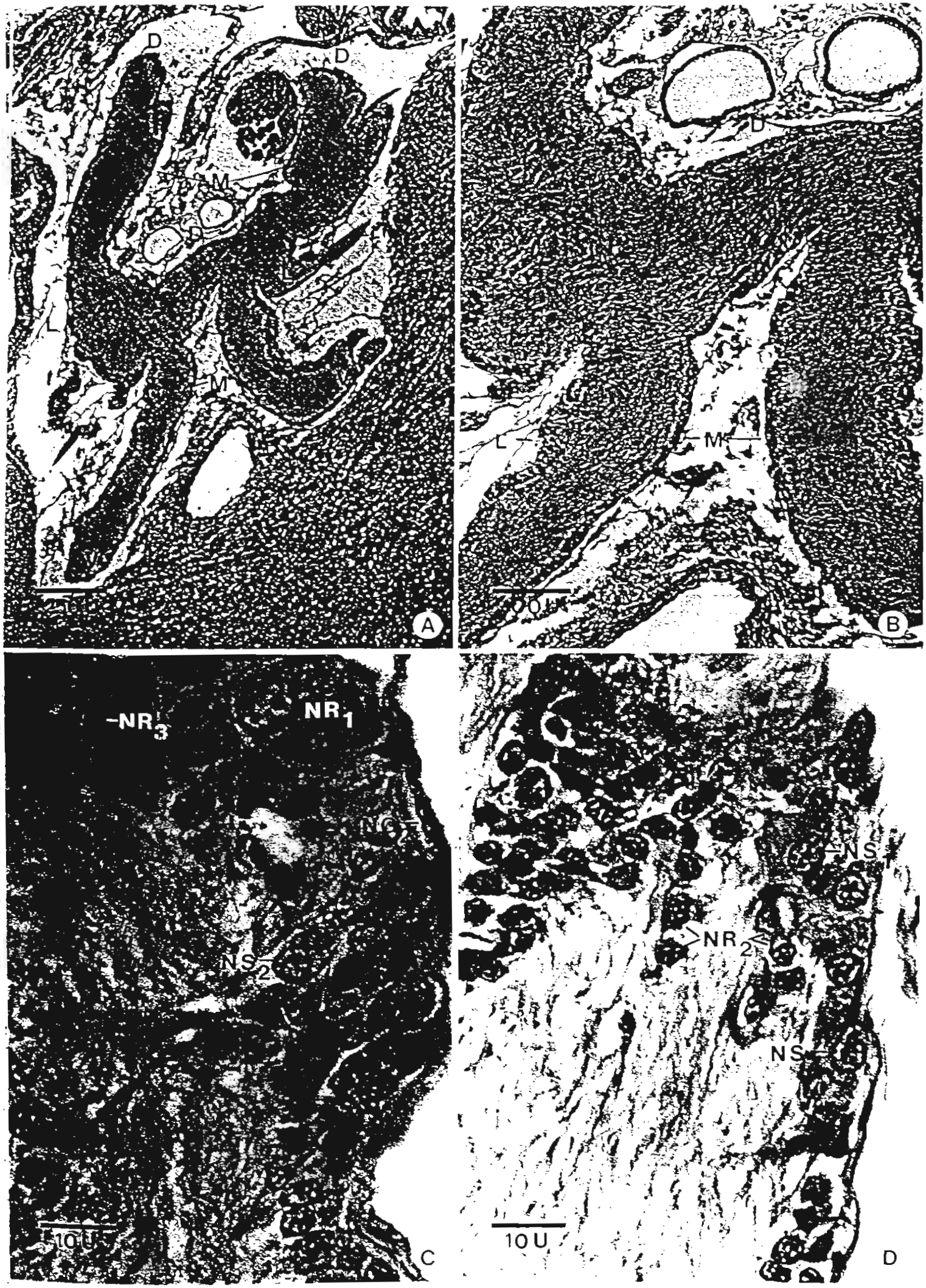
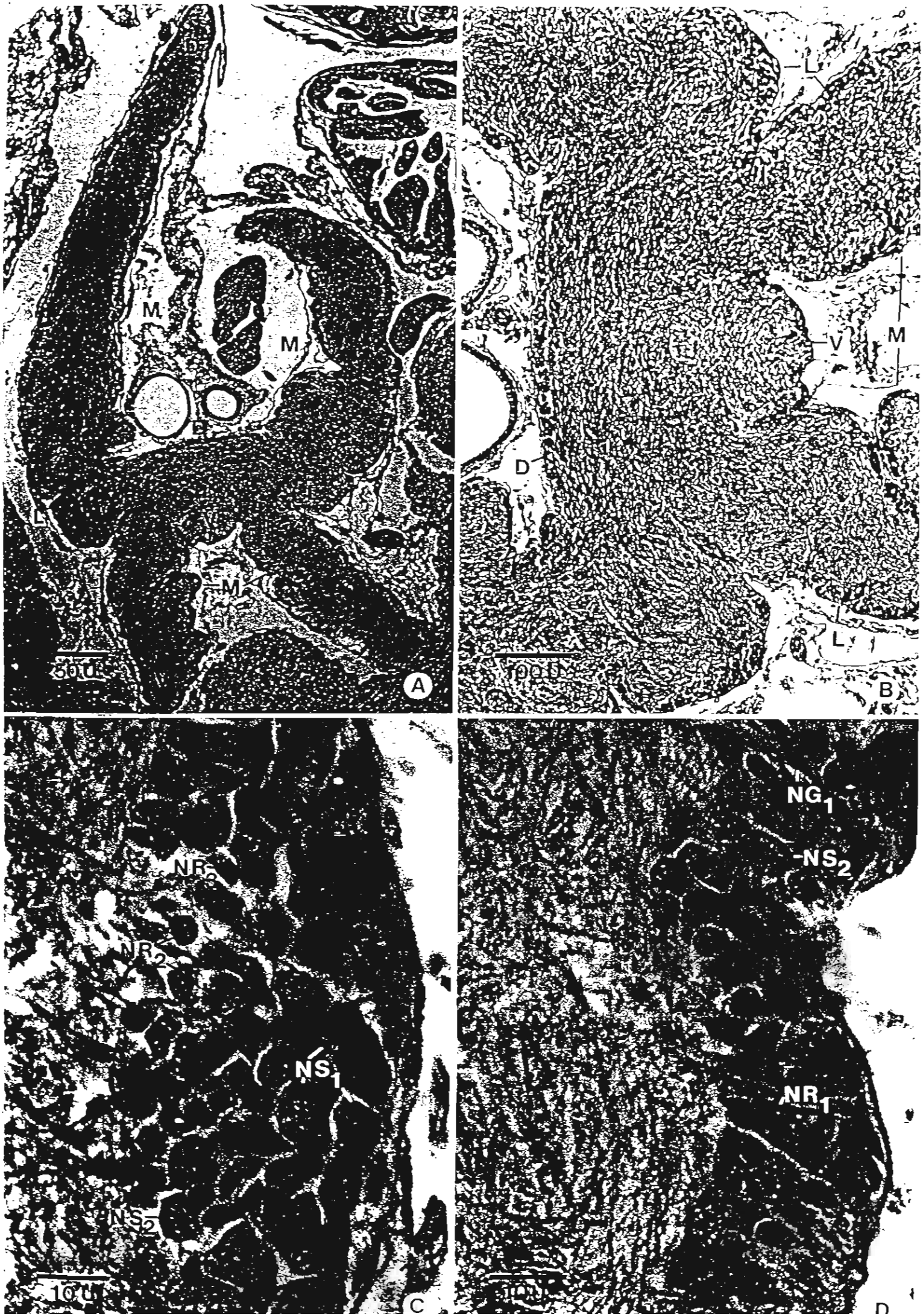
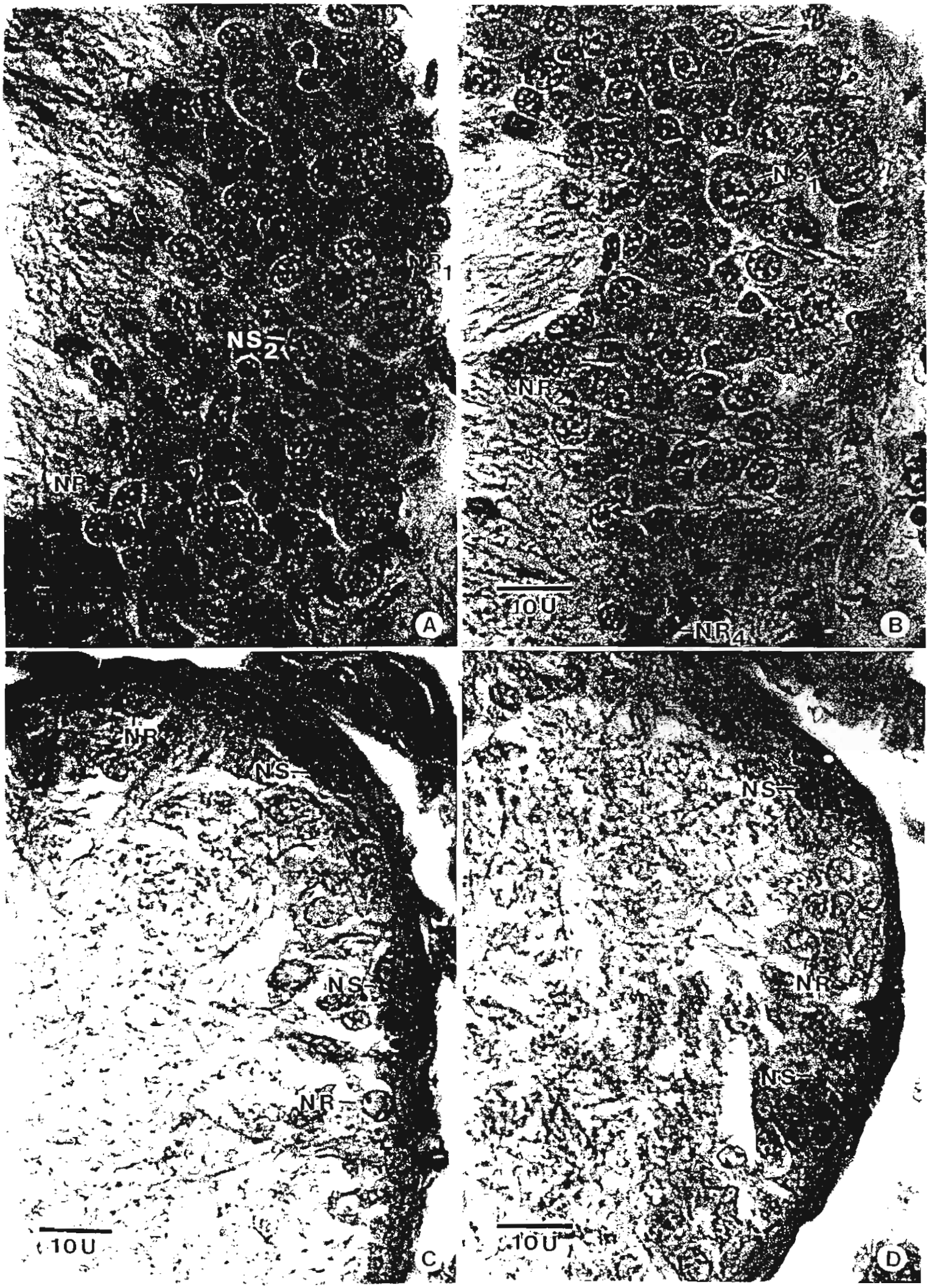

L
M
V
V
D
L
V
100U
A
NG2
NS1
NR2
NR3
10 U
B
NG1
NR2
NR
C
NS1
NR3
NR
10U
D

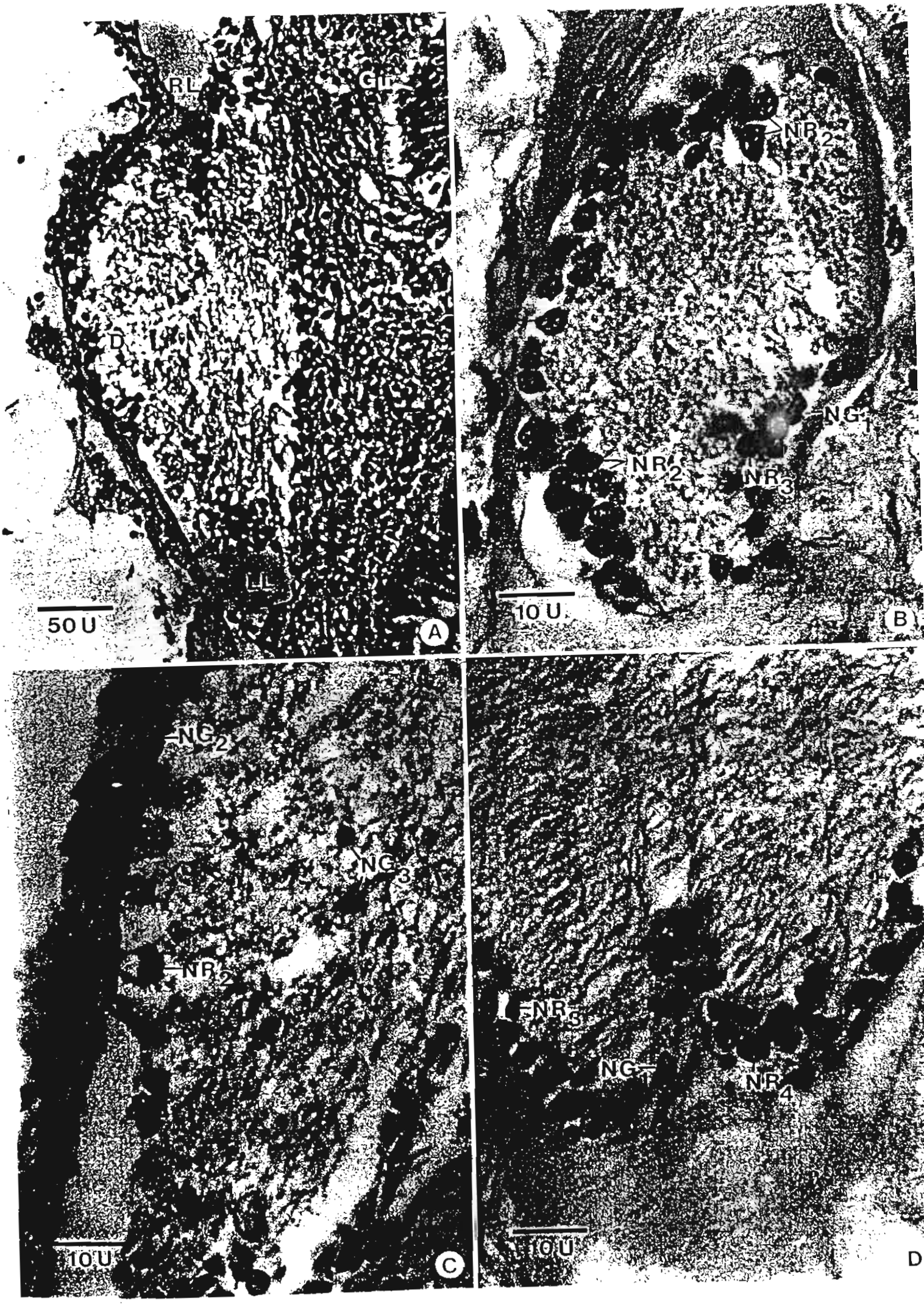
Figure 95

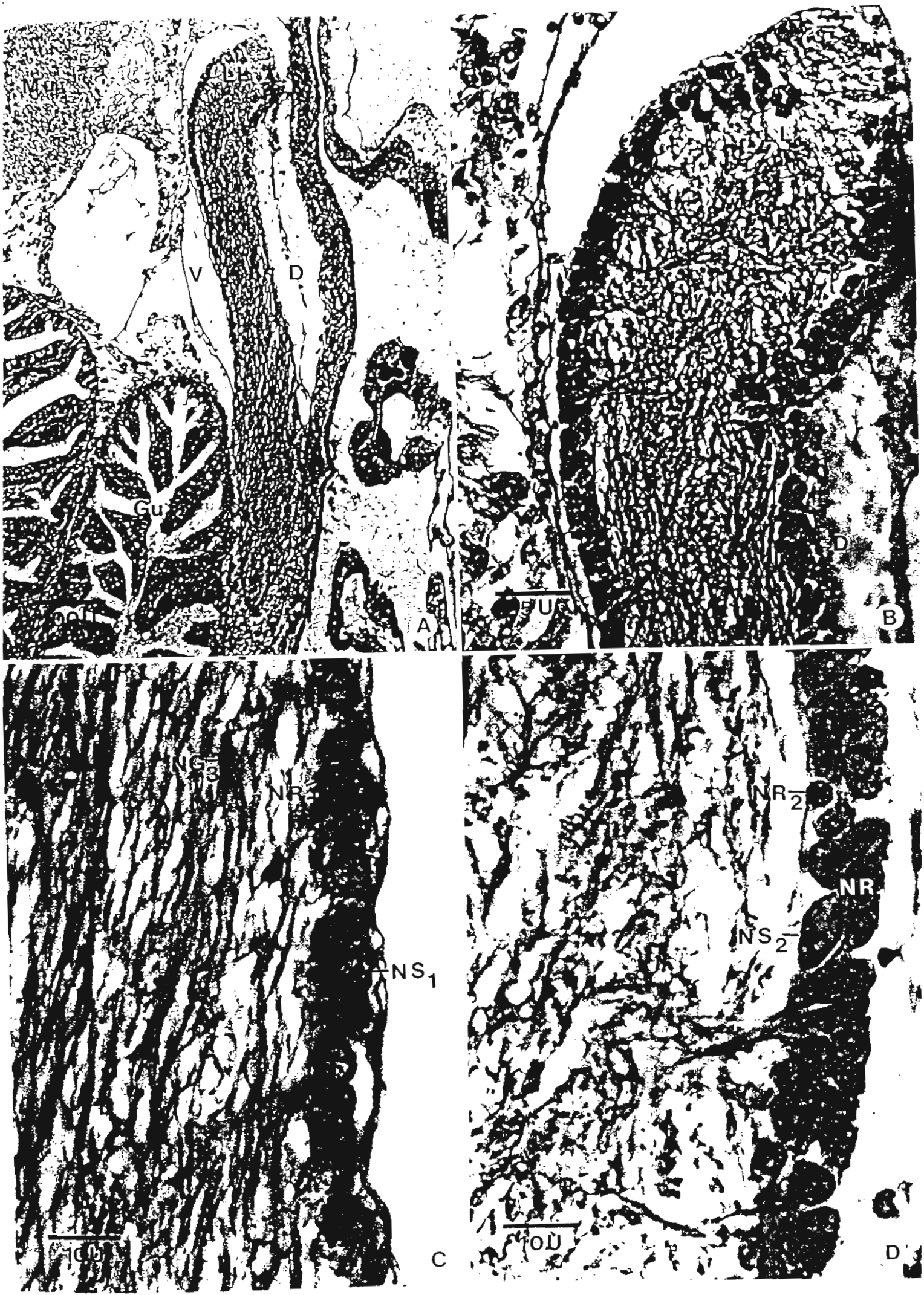


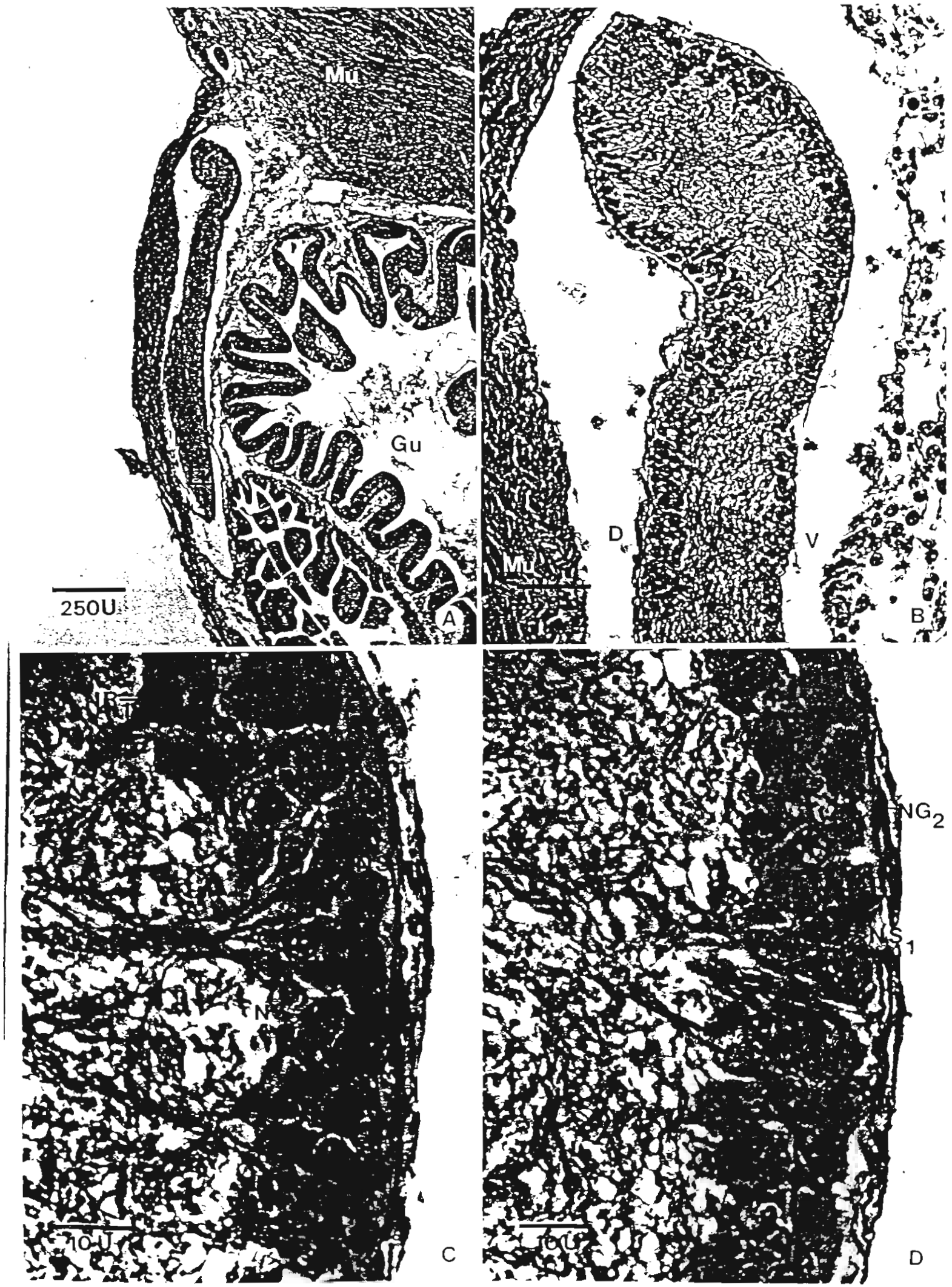

D
D
M
L
L
M
10 U
A
D
L
M
100 U
B
NR3
NR1
NS2
10 U
C
NS
NR2
NS
10 U
D


M
M
M
L
300 μ
A
L
V
M
D
L
100 μ
B
NR3
NR2
NS1
NS2
10 μ
C
NG1
NS2
NR1
10 μ
D


NR1
NS2
NR
A
NS1
NR
10U
NR4
B
NR
NS
NS
NR
10U
C
NS
NR
NS
10U
D


RL
GL
D
50 U
A
NR2
NG1
NR2
NR3
10 U
B
NG2
NG3
NR2
10 U
C
NR3
NG1
NR4
10 U
D


Mu
L
V
D
Gu
100
A
L
D
100
B
NG
NR
NS1
100
C
NR2
NR
NS2
100
D


Mu
Gu
250U
A
Mu
D
V
B
N
10U
C
NG2
NS1
10U
D

6.16 การพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ (ตารางที่ 6)

gonads ของหอยเป๋าฮื้อเริ่มปรากฏเป็นอวัยวะชัดเจนเมื่อหอยมีอายุได้ 2 เดือน (รูปที่ 102) โดยเริ่มจากการแยกของถุงหุ้ม (capsule) ของ hepatopancreas ออกเป็นสองส่วน ในช่องว่างที่เกิดขึ้นจะมีกลุ่มเซลล์ gonia เกาะติดอยู่กับถุงหุ้มทั้งสองด้านโดยเฉพาะทางด้านนอก ในช่วงนี้ยังไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น spermatogonia หรือ oogonia จึงยังไม่สามารถจำแนกเพศของหอยได้ ในขณะเดียวกันแผ่นถุงหุ้มชั้นนอกหรือ gonadal capsule เริ่มมีการพัฒนาของเซลล์กล้ามเนื้อแทรกอยู่ระหว่างเซลล์เยื่อเกี่ยวพันเป็นระยะ ๆ ในช่วง 3 เดือนลักษณะของ gonad คล้ายคลึงกับช่วง 2 เดือน

เมื่อหอยมีอายุได้ 4 เดือน (รูปที่ 103) มีการแยกเพศอย่างชัดเจน โดยในหอยเพศผู้มีเนื้อเยื่อพัฒนาขึ้นในระหว่างถุงหุ้ม 2 ชั้น ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อของอัณฑะชัดเจนและครอบคลุม hepatopancreas อยู่ประมาณ ¼ ของบริเวณผิว spermatogenic unit เริ่มปรากฏขึ้นรอบ ๆ trabeculae แต่ยังไม่พัฒนาเต็มที่ เซลล์สืบพันธุ์ที่พบใน spermatogenic unit คือ spermatogonia (Sg), primary spermatocytes (PrSc), secondary spermatocyte (SSc), spermatid ทั้ง 4 ระยะ (St_{1-4}), spermatozoa I (Sz_1) จึงนับได้ว่าเนื้อเยื่ออัณฑะอยู่ในช่วง proliferative phase ในเพศเมียรังไข่มีการพัฒนาที่ช้ากว่า โดยมีลักษณะทั่วไปคล้ายกับในช่วงอายุ 2-3 เดือน

ในช่วงอายุ 6 เดือน อัณฑะขยายใหญ่และคลุมรอบประมาณครึ่งหนึ่งของบริเวณผิวของ hepatopancreas spermatogenic units มีจำนวนมากขึ้น และแต่ละอันพัฒนาเกือบสมบูรณ์โดยมีเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต่าง ๆ ได้แก่ Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_1 (รูปที่ 104) อัณฑะในช่วงนี้จึงเข้าสู่ premature phase รังไข่มีการพัฒนาเพิ่มขึ้นเล็กน้อย แต่ก็ยังมีขนาดเล็กมากเมื่อเทียบกับอัณฑะ oogenetic unit ยังไม่พัฒนา และเซลล์ในรังไข่ที่ยังกระจายอยู่ห่าง ๆ กัน ประกอบด้วยเซลล์ oogonia (Og), oocyte I (Oc_1) (รูปที่ 105)

ในช่วงอายุ 7 เดือน อัณฑะขยายขนาดขึ้นและคลุม hepatopancreas มากกว่าครึ่งของบริเวณผิว spermatogenic unit พัฒนาอยู่ในขั้นสมบูรณ์ โดยมีเซลล์สืบพันธุ์ครบทุกขั้น โดยเฉพาะเซลล์อสุจิที่พัฒนาแล้วทั้งในขั้น Sz_1 และ Sz_2 (รูปที่ 106) ส่วนรังไข่ยังมีขนาดเล็กและเริ่มมีการแตกกิ่งของเยื่อเกี่ยวพันจากถุงหุ้มเป็น trabeculae oogenetic unit เริ่มก่อตัวและประกอบด้วยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต้น ๆ คือ Og, Oc_1, Oc_2 ซึ่งมีจำนวนมากขึ้น (รูปที่ 107) ซึ่งอาจจะนับได้ว่าเนื้อเยื่อรังไข่เข้าสู่ช่วงต้น ๆ ของ proliferative phase

ในช่วงอายุ 8 เดือน อัณฑะขยายขนาดขึ้นมาก และคลุม hepatopancreas เกือบทั่วทั้งบริเวณผิว spermatogenic unit มีจำนวนมากและพัฒนาอยู่ในขั้นสมบูรณ์โดยมี

เซลล์สืบพันธุ์ทุกขั้น และมีเซลล์อสุจิที่พัฒนาแล้วจำนวนมาก จึงนับได้ว่าอัณฑะอยู่ในช่วง mature phase ส่วนเนื้อเยื่อรังไข่คลุมรอบประมาณ ¼ ของบริเวณผิว hepatopancreas oogenetic unit ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์และส่วนมากประกอบด้วยเซลล์ระยะต้นๆ คือ Og, Oc_1, Oc_2, และ Oc_3 ซึ่งอาจจะนับได้ว่ารังไข่เริ่มเข้าสู่ช่วงต้นของ proliferative phase

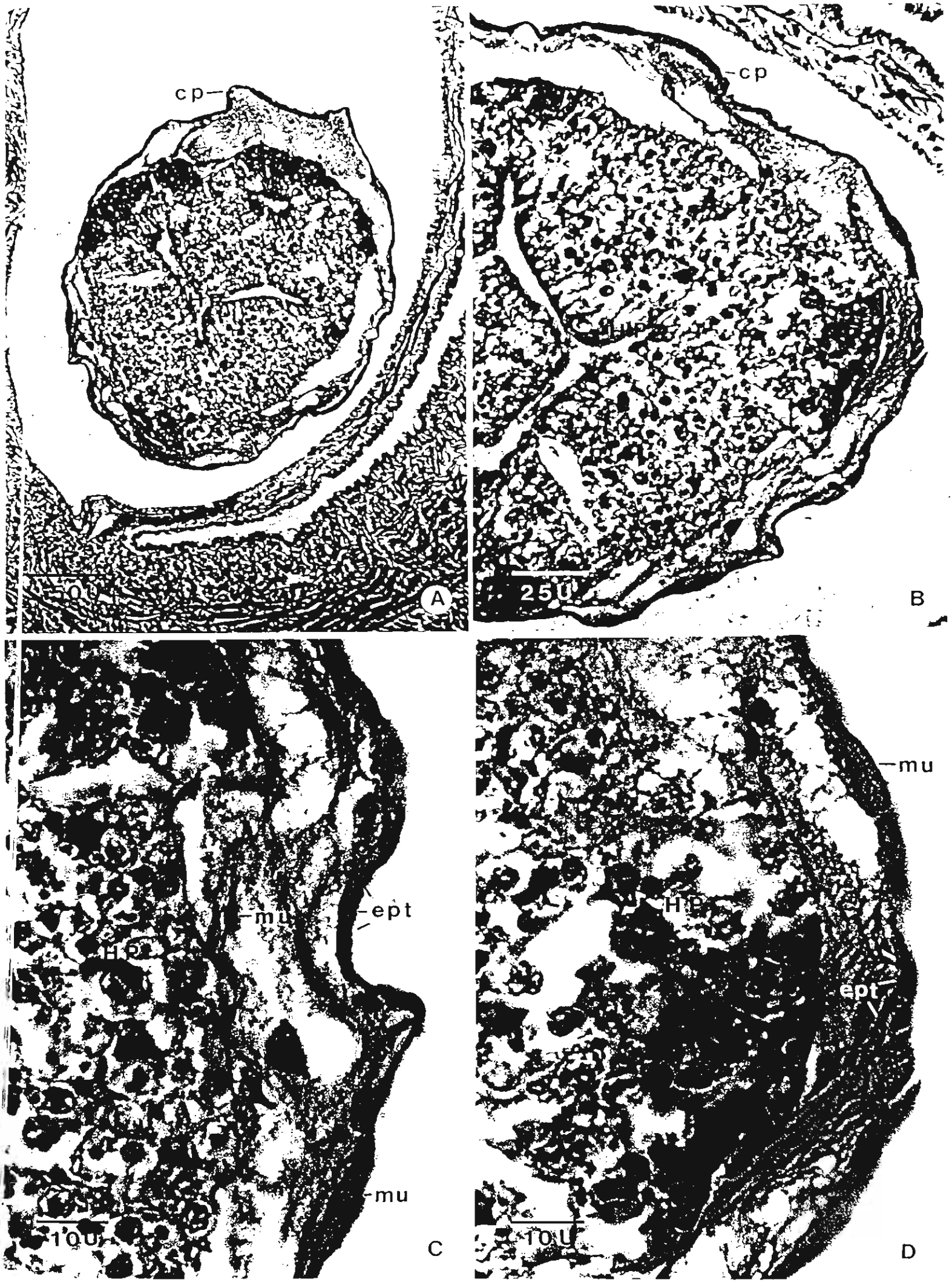
ในช่วงอายุ 9 เดือน อัณฑะพัฒนาเต็มที่และคลุมรอบบริเวณผิวทั้งหมดของ hepatopancreas spermatogenic units มีจำนวนเพิ่มขึ้นมากและอัดแน่นด้วยเซลล์สืบพันธุ์ทุกระยะ อัณฑะเข้าสู่ช่วง mature phase โดยสมบูรณ์ รังไข่คลุมรอบครึ่งหนึ่งของบริเวณผิวของ hepatopancreas ooganetic unit ยังมีจำนวนไม่มากนัก และแต่ละ unit มีจำนวนเซลล์ขั้น Og, Oc_1, Oc_2, Oc_3 มากขึ้นและอัดกันอยู่แน่น จึงนับได้ว่ารังไข่เข้าสู่ช่วง premature phase

เมื่อหอยอายุครบ 11 เดือน อัณฑะจะพัฒนาสมบูรณ์เต็มที่ในสภาพที่คล้ายคลึงกับของหอยตัวเต็มวัย และอัณฑะอยู่ในช่วงปลายของ mature phase ซึ่งพร้อมจะเข้าสู่ช่วง spawning phase (รูปที่ 108) รังไข่มีขนาดขยายใหญ่ขึ้นมาก และคลุมรอบเกินครึ่งของบริเวณผิว hepatopancreas oogenetic units พัฒนาเต็มที่และประกอบด้วยเซลล์ตั้งแต่ Og ถึง Oc_5 รังไข่จึงเข้าสู่ mature phase (รูปที่ 109)

โดยสรุปแล้วพบว่า หอยเพศผู้มีการพัฒนาของอัณฑะเร็วกว่ารังไข่ โดยอัณฑะมีเซลล์สืบพันธุ์ครบทุกขั้นตั้งแต่เมื่อหอยมีอายุได้ 7 เดือน เมื่ออัณฑะเริ่มเข้าสู่ช่วง mature phase ส่วนในหอยเพศเมีย รังไข่เริ่มมีเซลล์ oocyte ขั้นสุดท้าย (Oc_4, Oc_5) และเข้าสู่ช่วง mature phase เมื่อหอยมีอายุได้ 11 เดือน

Table 6 Summary of the Key Features During the Course of Development of Gonads in ***Haliotis asinina***

Age (months)	General Structure	Gametogenic Unit	Cell Types	Phases of Cycle
2	-Separation of gonadal capsule from hepato-pancreatic (HP) capsule. -Development of few muscle cells in gonadal capsule. -sexually indistinguishable.	none	only few undifferentiated gonial cells attached to capsules	none
4	-**male**: testicular tissue covering a quarter of HP capsule. -**female**: ovary shows no further development. -sexually distinguishable.	incomplete none	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_1 undifferentiated gonial cell	proliferative none
6	-**male**: testis covering half of HP capsule. -**female**: ovary still small and not well developed.	complete none	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_1 Og, Oc_1, Oc_2	premature none
7	-**male**: testis covering half of HP capsule. -**female**: ovary still small.	complete begin to develop from sprouting trabeculae	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_{1-2} Og, Oc_1, Oc_2	mature very early proliferative
8	-**male**: testis covering slightly over half of HP capsule. -**female**: ovary covering about a quarter of HP capsule.	complete incomplete	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_{1-2} Og, Oc_1, Oc_2, Oc_3	mature early proliferative
9	-**male**: testis covering all HP capsule. -**female**: ovary covering half of HP capsule.	complete incomplete	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_{1-2}, Og, Oc_1, Oc_2, Oc_3	mature proliferative /premature
11	-**male**: testis covering all HP capsule and much thickened. -**female**: ovary covering slightly over half	complete and numerous complete and	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_{1-2} Og, Oc_1, Oc_2, Oc_3, Oc_4, Oc_5	mature mature


cp
A
cp
250
B
mu
ept
HP
mu
10
C
mu
HP
ept
10
D

รูปที่ 102 ภาพ LM (H & E stain) แสดงการพัฒนาของ gonads เมื่อหอยมีอายุได้ 2 เดือน

รูปที่ 103 ภาพ LM (H & E stain) แสดงการพัฒนาของอัณฑะ เมื่อหอยมีอายุได้ 4 เดือน

รูปที่ 104 ภาพ LM (H & E stain) แสดงการพัฒนาของอัณฑะ เมื่อหอยมีอายุได้ 6 เดือน

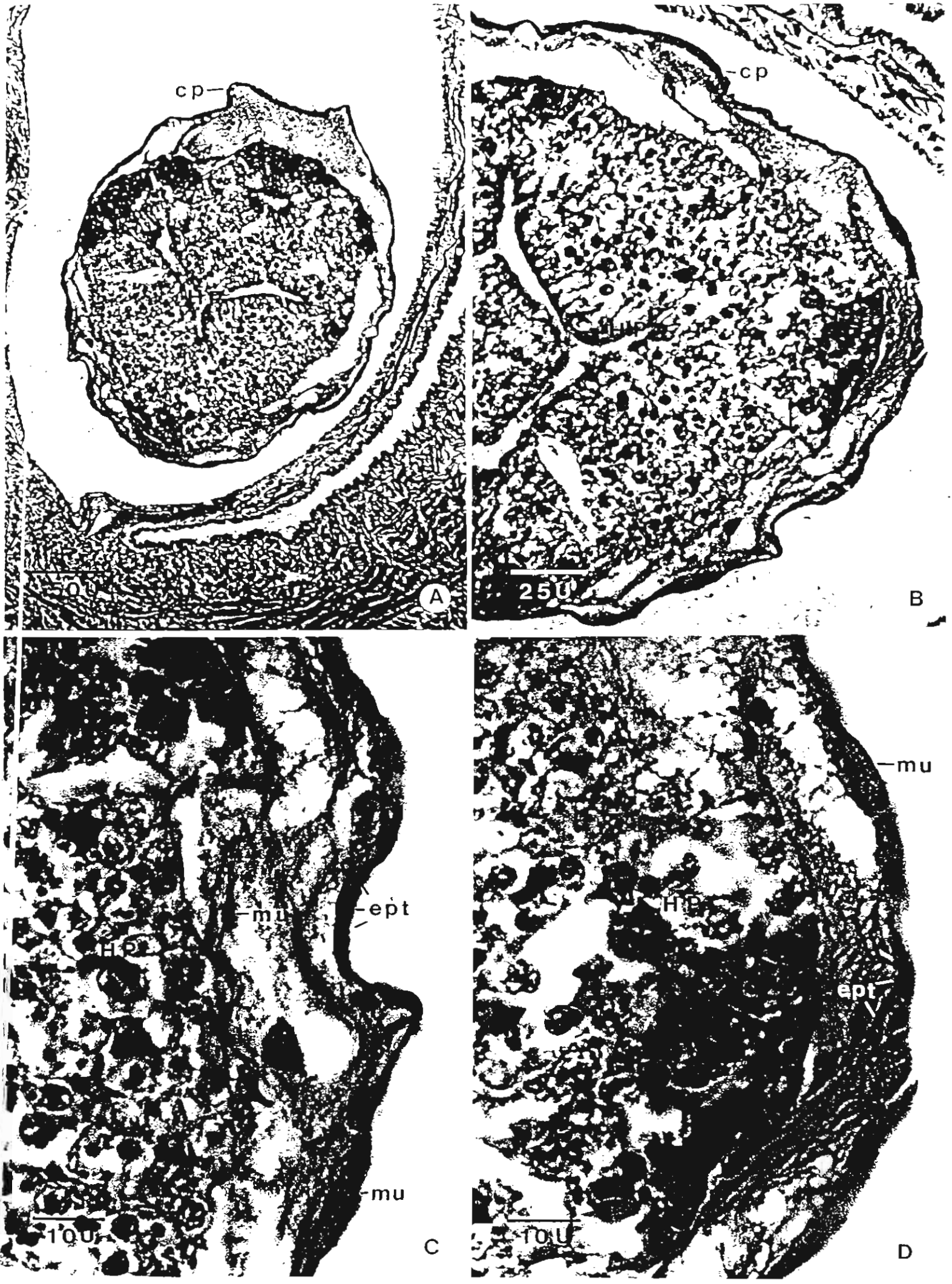
รูปที่ 105 ภาพ LM (H & E stain) แสดงการพัฒนาของรังไข่ เมื่อหอยมีอายุได้ 6 เดือน

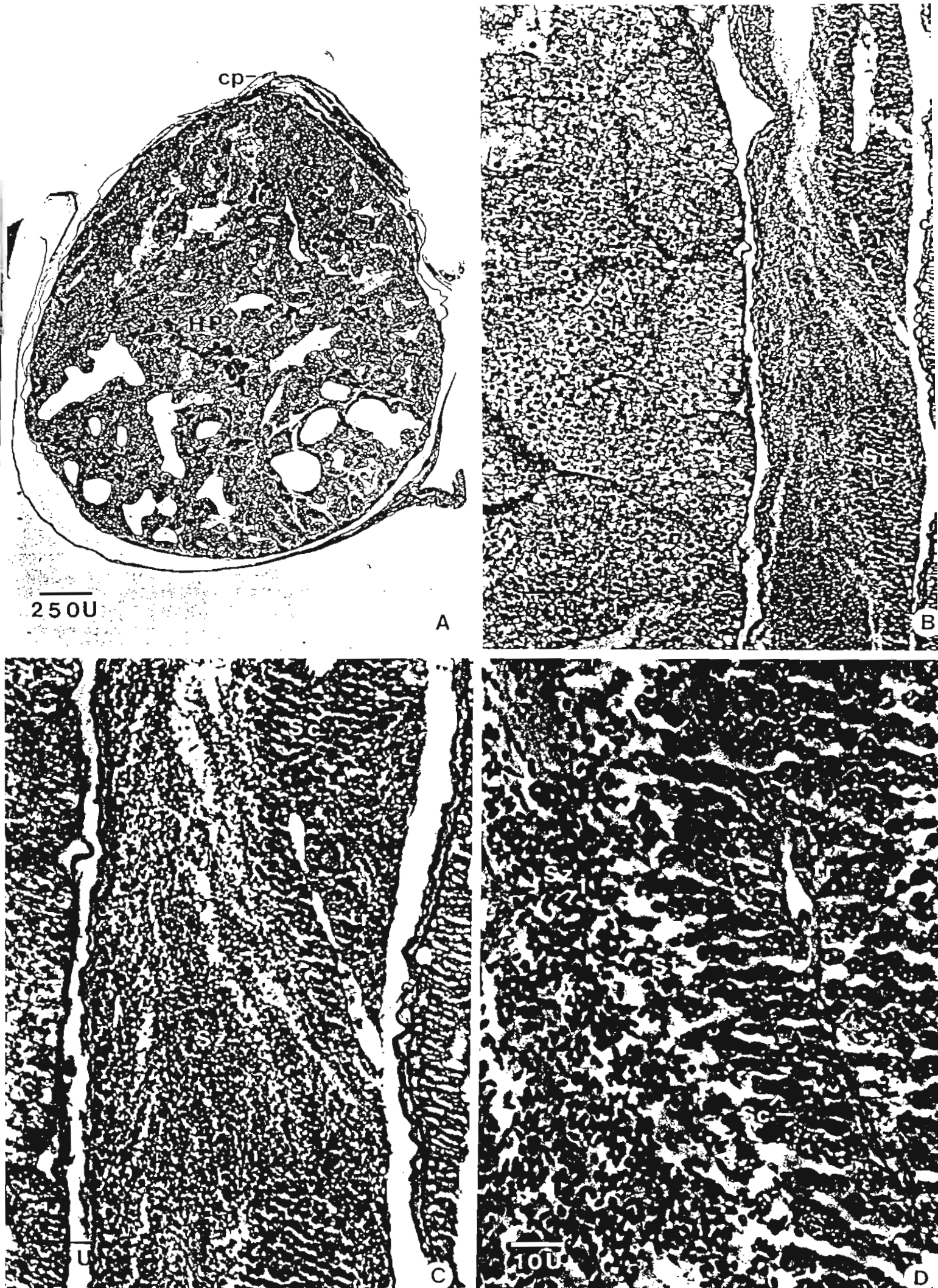
รูปที่ 106 ภาพ LM (H & E stain) แสดงการพัฒนาของอัณฑะ เมื่อหอยมีอายุได้ 7 เดือน

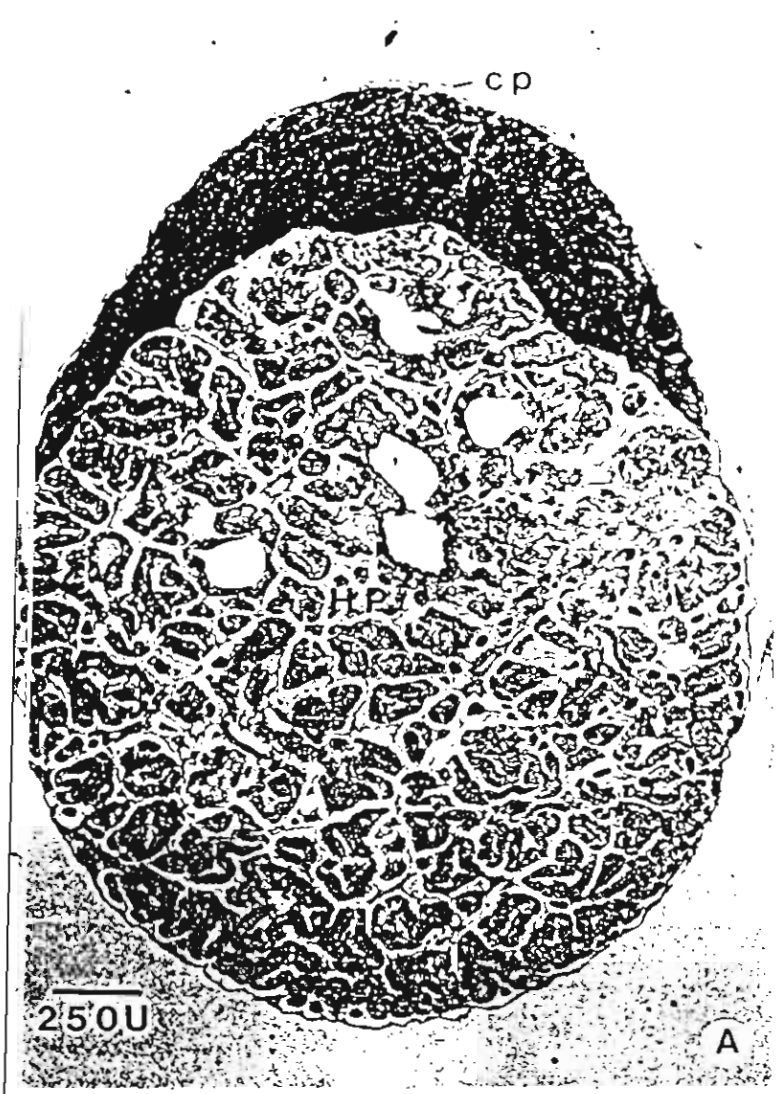
รูปที่ 107 ภาพ LM (H & E stain) แสดงการพัฒนาของรังไข่ เมื่อหอยมีอายุได้ 7 เดือน

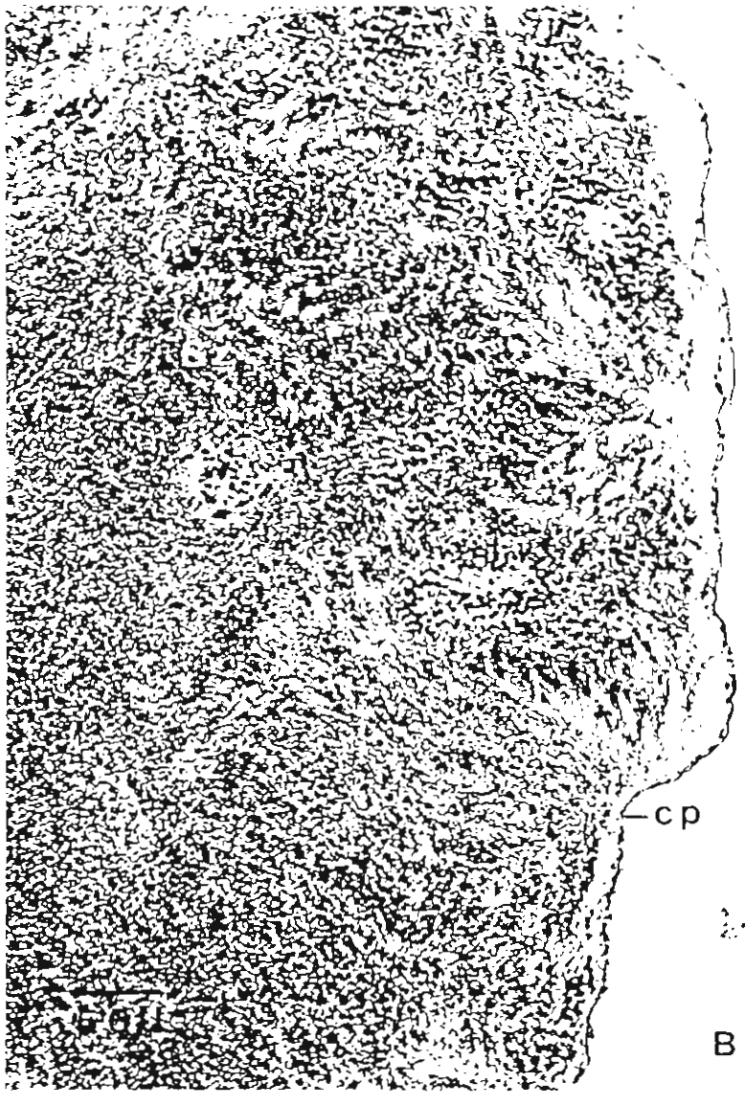
รูปที่ 108 ภาพ LM (H & E stain) แสดงการพัฒนาของอัณฑะ เมื่อหอยมีอายุได้ 11 เดือน

รูปที่ 109 ภาพ LM (H & E stain) แสดงการพัฒนาของรังไข่ เมื่อหอยมีอายุได้ 11 เดือน

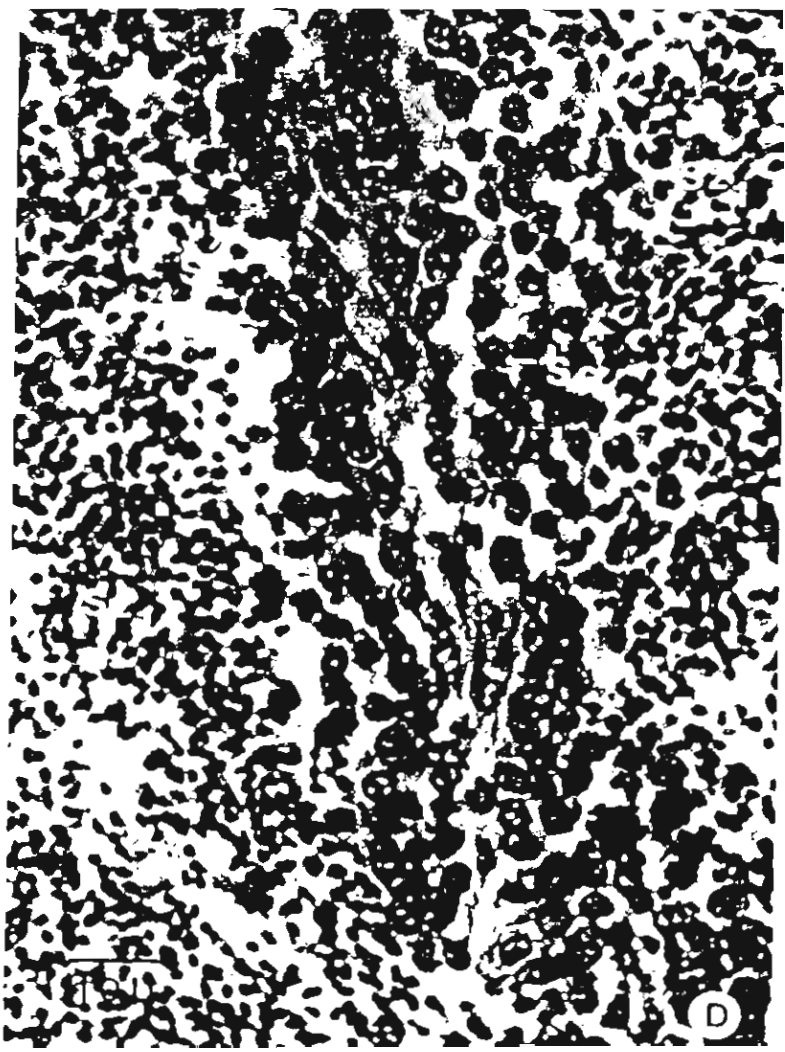

cp
A
cp
25U
B
mu
ept
HP
mu
100
C
mu
HP
ept
100
D

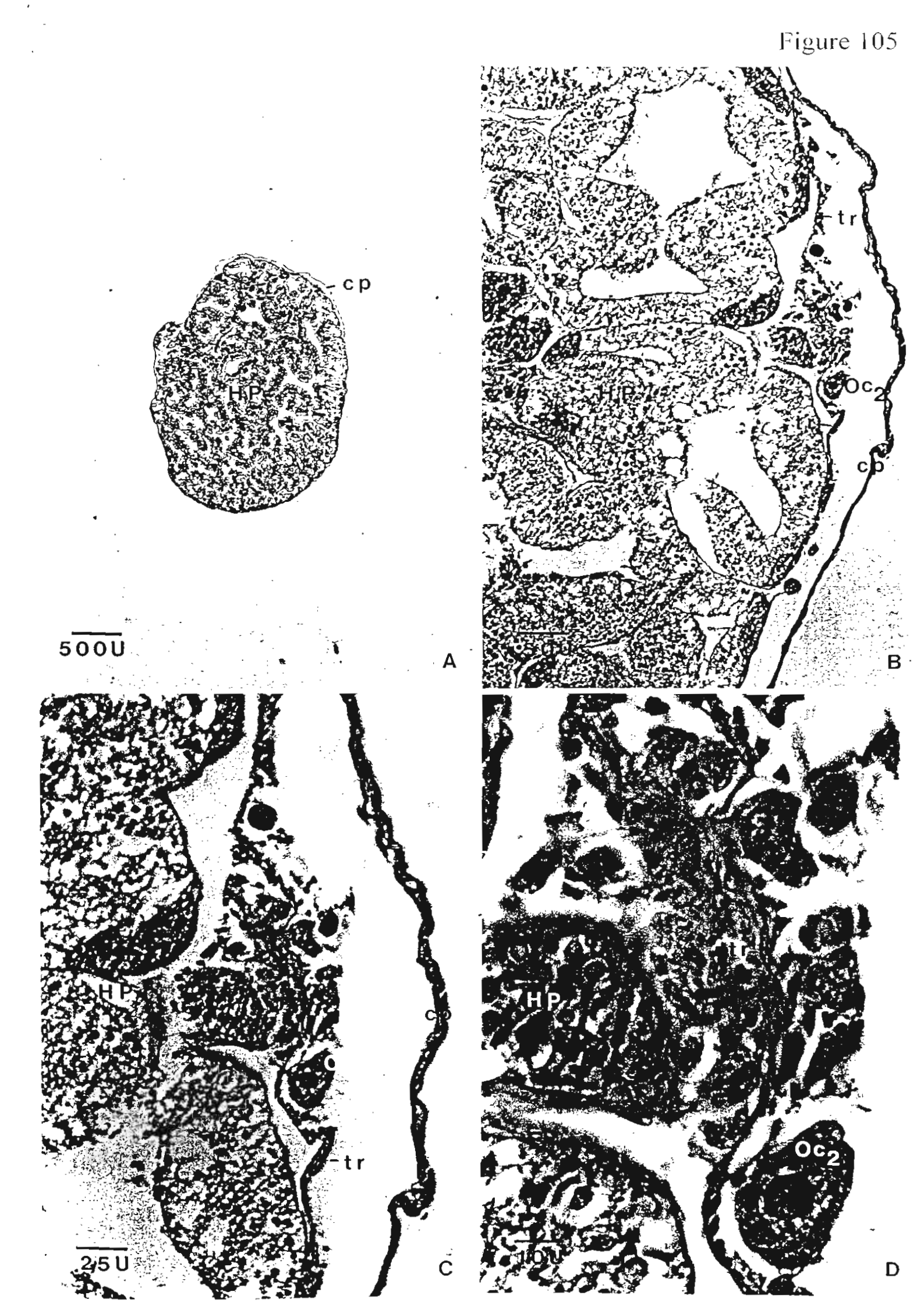

cp
HP
250U
A
HP
Sc
B
Sc
S
U
C
Sz
St
Sc
10U
D

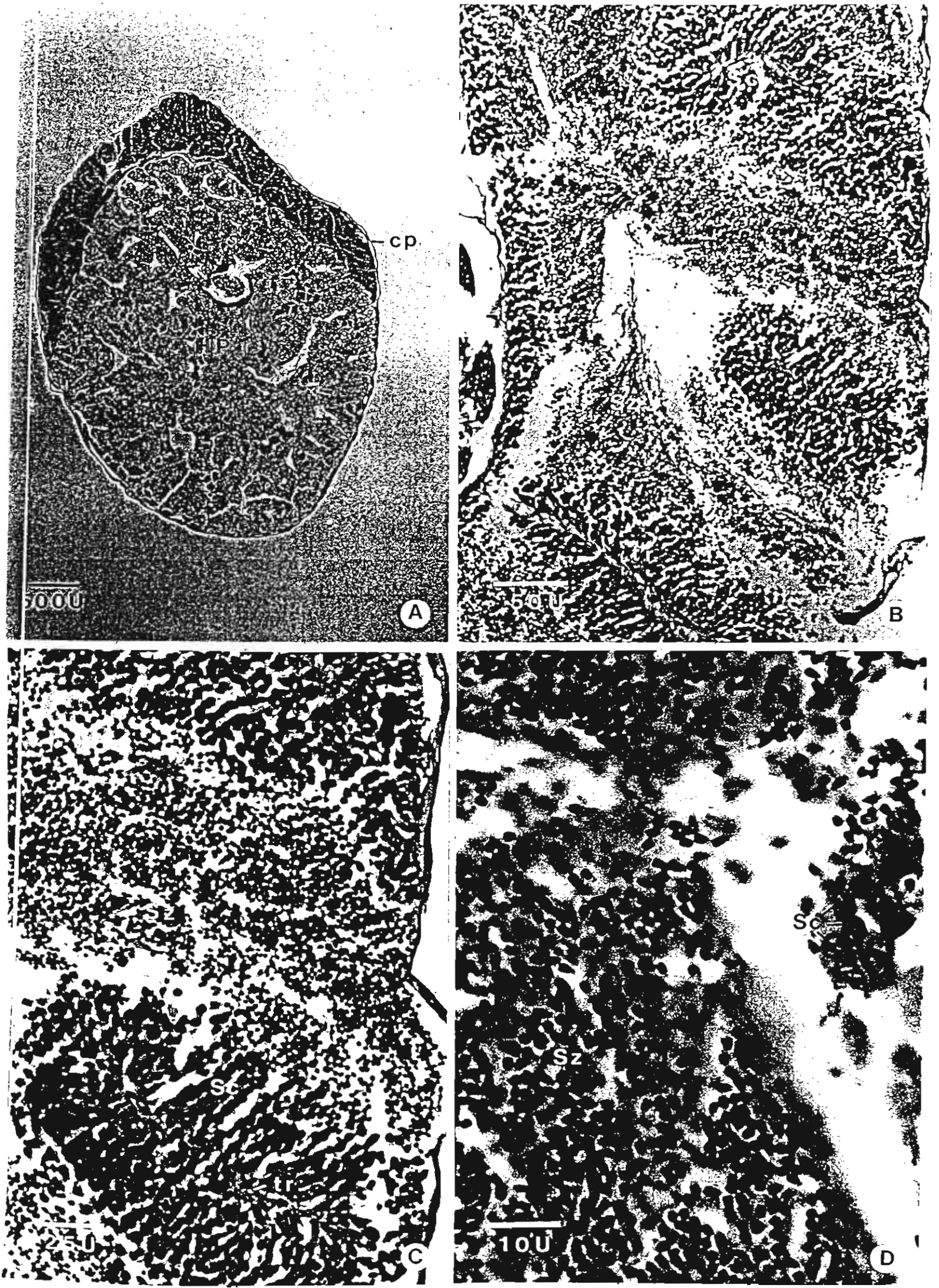

cp
HP
250U
A

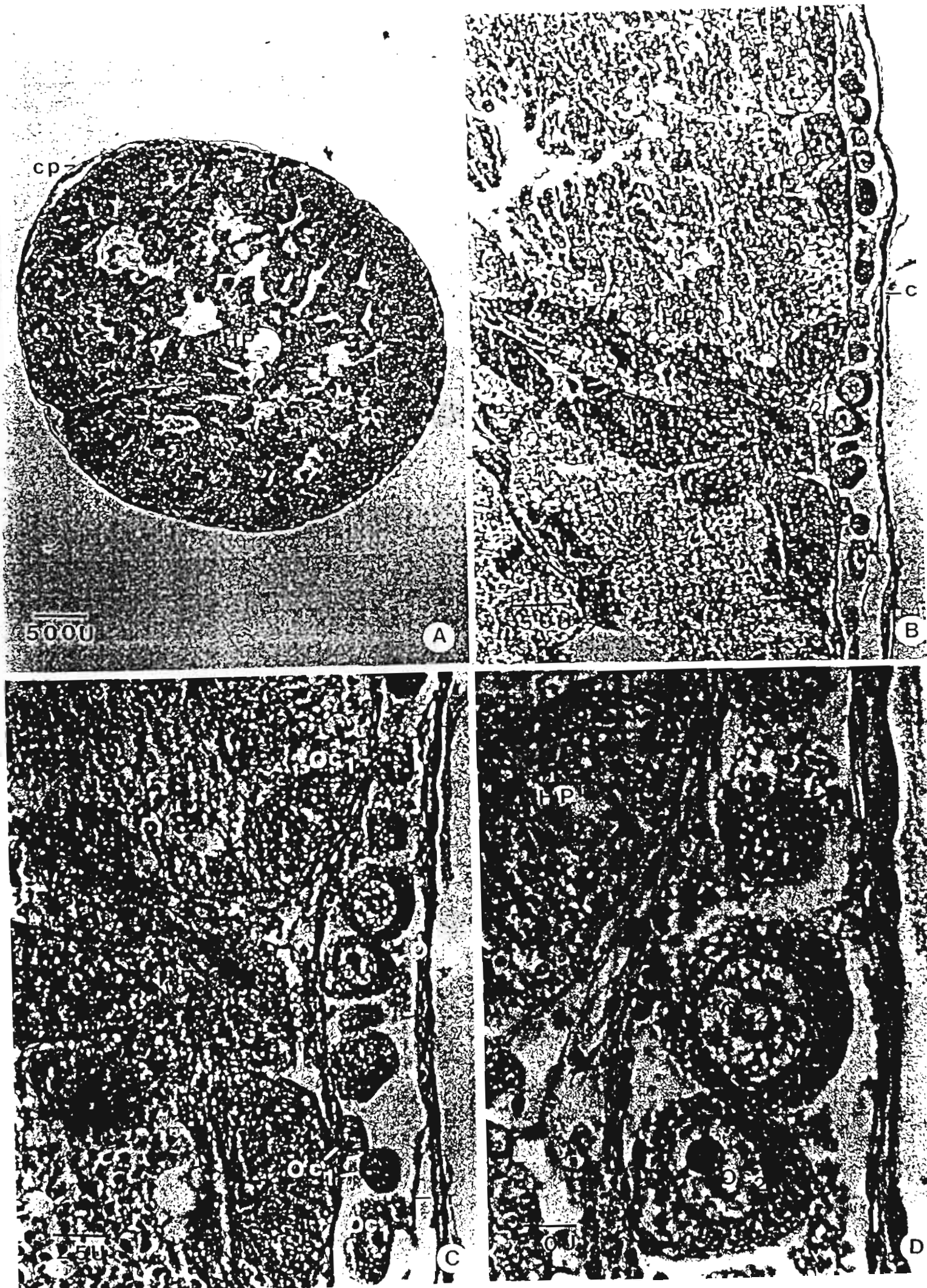

cp
B

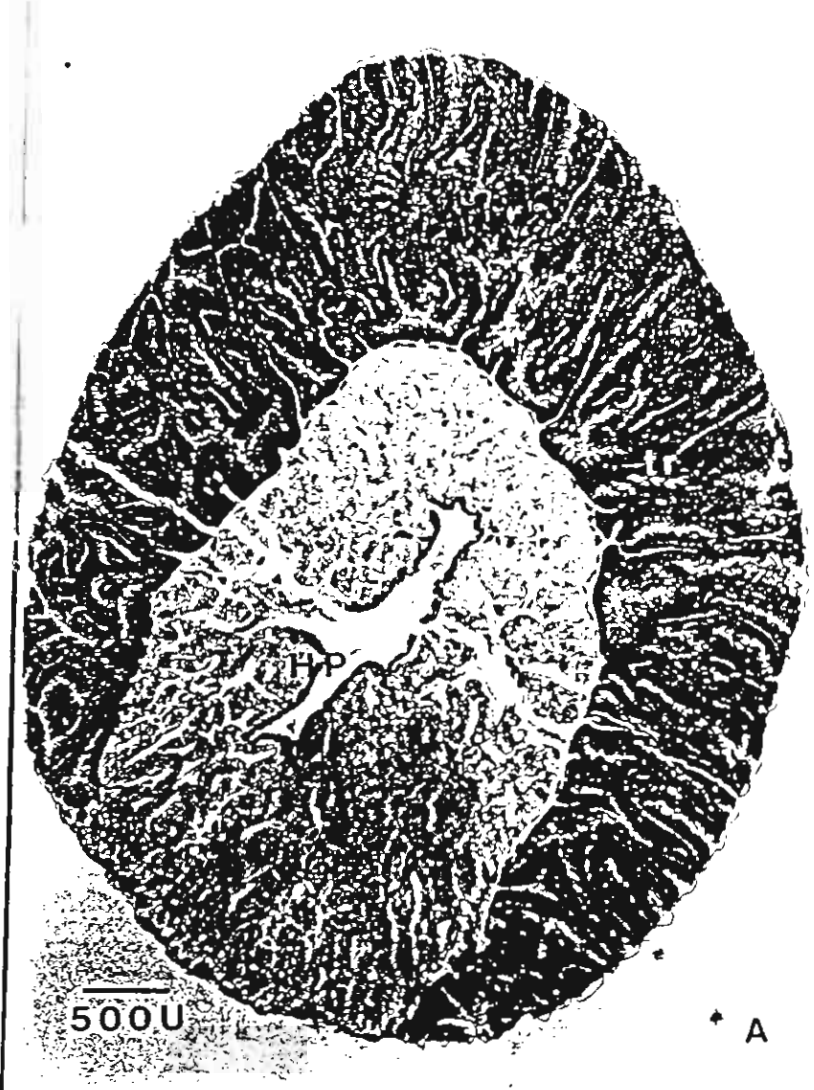

cp
Sc
C


D

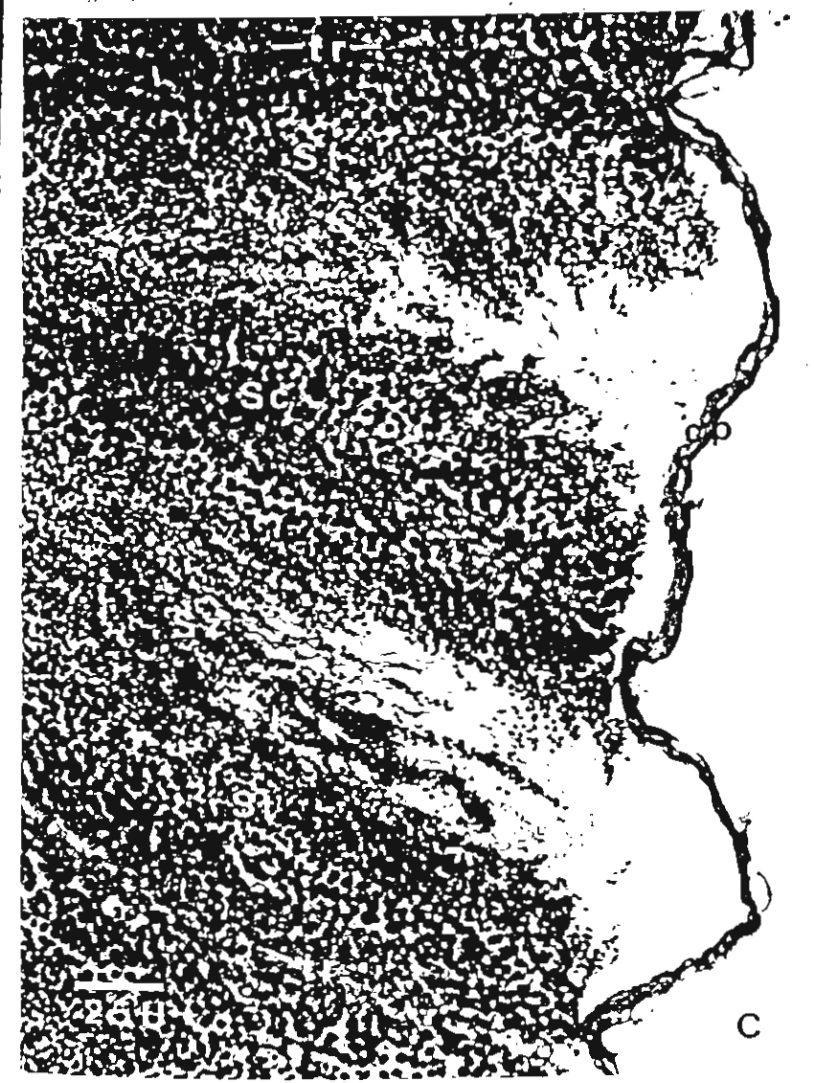

cp
HP
500U
A
tr
HP
Oc2
cp
B
HP
cp
tr
25U
C
HP
Oc2
50U
D

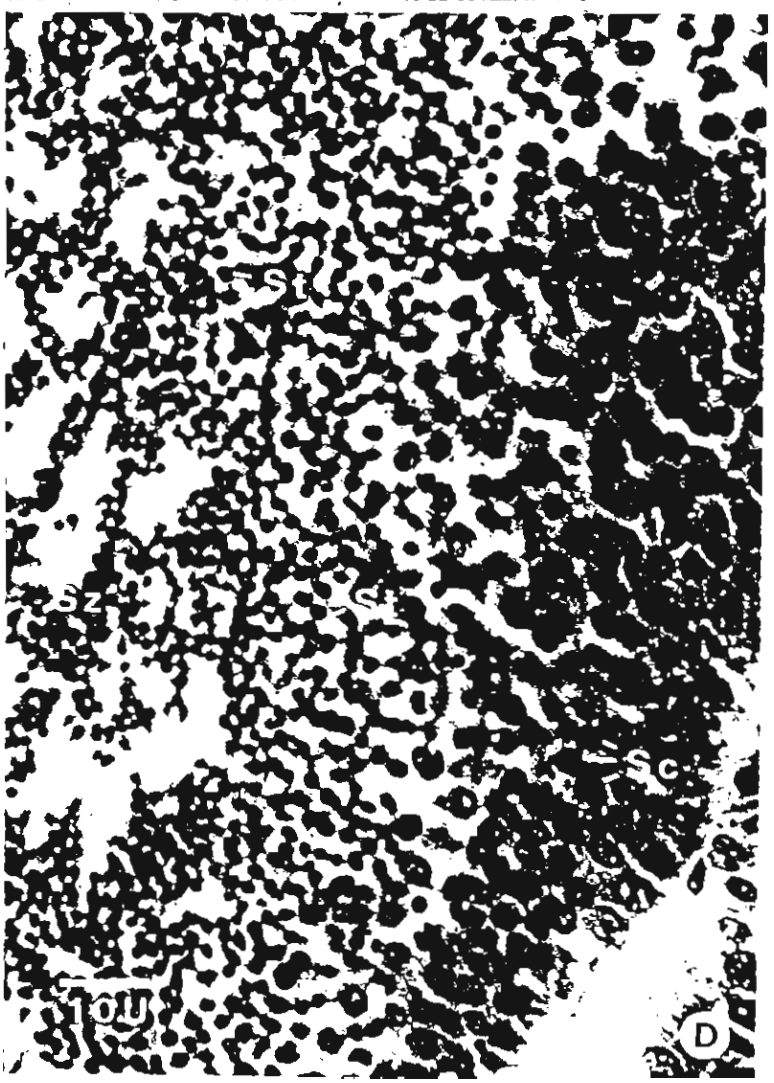

cp
HP
500U
A
50 U
B
Sz
C
Sz
Sc
10 U
D

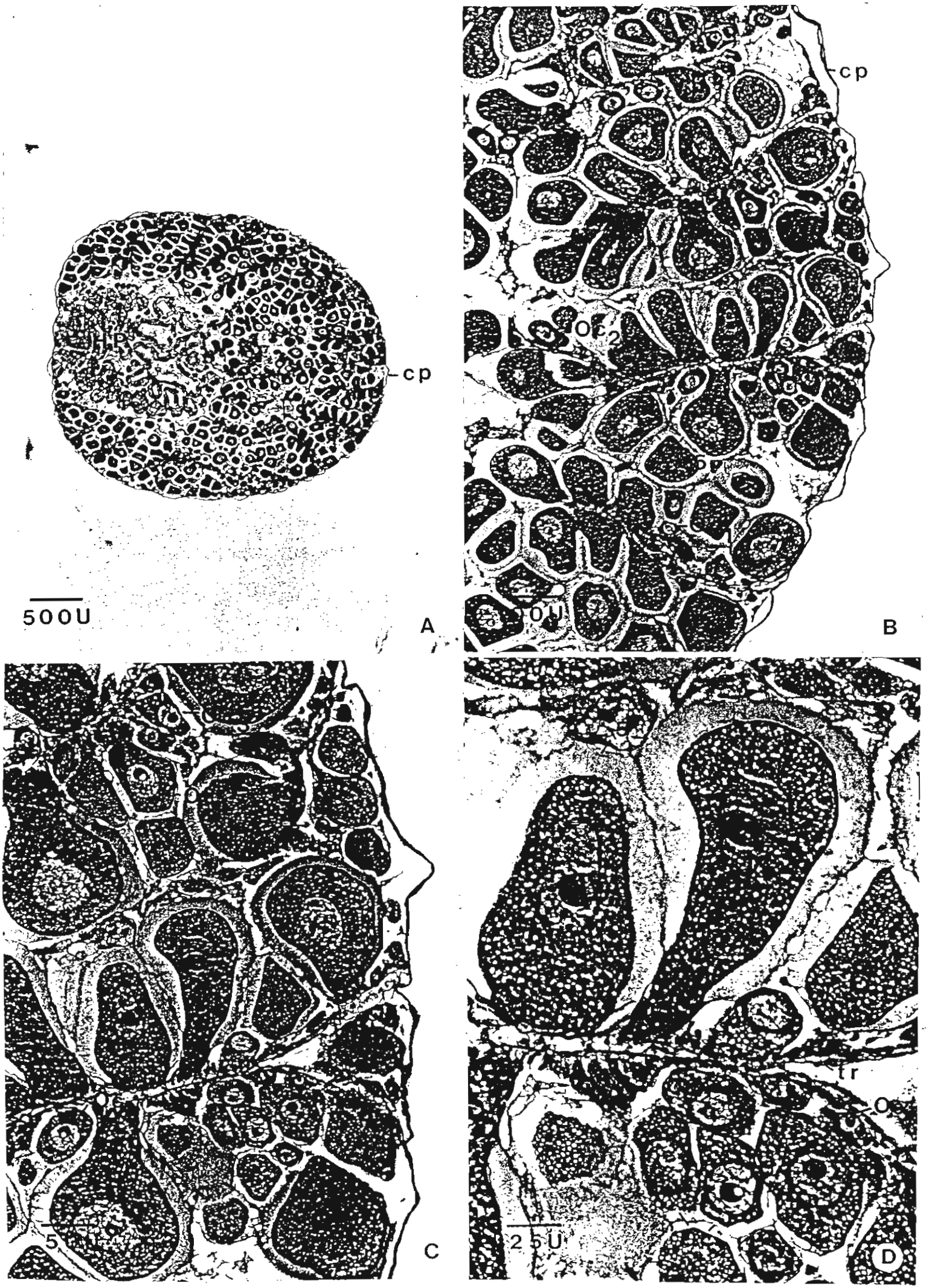

cp
5000
A
c
B
OC1
OC1
OC1
C
P
D


HP
500U
A


B


C


100U
D


cp
HP
500U
A
cp
OP
OU
B
5
C
tr
O
25U
D

7 บทวิจารณ์

7.1 มหกายวิภาคของระบบประสาทและปมประสาท

ระบบประสาทของ *H. asinina* มีลักษณะเช่นเดียวกับระบบประสาทในหอยเป๋าฮื้อ species อื่น ๆ (Croft, 1929) ซึ่งถ้ากล่าวโดยรวมแล้วยังถือว่าเป็นแบบดั้งเดิม (primitive nervous system) ที่ยังไม่มีกระบวนการ centralization และ cephalization กล่าวคือ ยังไม่มีการจัดเป็นระบบประสาทกลาง (central nervous system) ที่ต่อเนื่องกันและไม่มีสมองกับไขสันหลังที่เป็นเอกลักษณ์ของระบบประสาทอย่างเช่นในสัตว์มีกระดูกสันหลัง อย่างไรก็ตามมีการจัดระเบียบของระบบประสาทโดยมีเซลล์รวมอยู่เป็นกลุ่ม ๆ ได้แก่ ปมประสาท (ganglia) ที่เป็นจุดรวมของเซลล์ประสาท (NR) และเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (NS) ซึ่งอาจจะถือว่าเป็นจุดเริ่มต้นของระบบประสาทกลาง ปมประสาทที่อาจนับได้ว่าเป็นจุดเริ่มต้นของสมอง คือ ปมประสาท cerebral ซึ่งเป็นปมประสาทที่มีเส้นประสาทไปเลี้ยงอวัยวะรับสัมผัสพิเศษ (special sensory receptors) ได้แก่ ตาโดยผ่าน optic tentacle และหนวด (tentacle) อีก 2 คู่คือ คู่ยาวและคู่สั้นที่อยู่กลางต่อ optic tentacle cerebral ganglia จึงเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีการรับสัญญาณความรู้สึก (sensory input) มากที่สุด จึงน่าจะมีบทบาทในการควบคุม ปมประสาทที่อยู่ถัดไปทางด้านหลัง คือ pleuropedal ganglia และที่อยู่ด้านล่าง คือ buccal ganglia ซึ่งต่อเนื่องกันโดย nerve trunk (nerve connectives) ปมประสาท pleuropedal เป็นปมประสาทที่ใหญ่ที่สุด เนื่องจากมันอยู่กึ่งกลางของลำตัวหอย ซึ่งต้องส่งเส้นประสาทไปเลี้ยงกล้ามเนื้อ pedal muscle โดยผ่าน pedal nerve cord และ ganglia นอกจากนี้มันยังมีเส้นประสาทไปเลี้ยงอวัยวะภายในต่าง ๆ อีกด้วย เช่น mantle layer และ gill จากปมประสาท pleuropedal มี pedal nerve cord 2 แท่ง ทอดออกไปด้านหลังของลำตัว โดยแท่งประสาททั้งสองแท่งมี nerve commissures เชื่อมต่อกันเป็นระยะ ๆ จาก pedal cord มีเส้นประสาทเล็ก ๆ จำนวนมากแผ่ออกไปเลี้ยงกล้ามเนื้อ pedal muscle ดังนั้น pedal cord จึงเป็นเสมือนหนึ่งจุดเริ่มต้นของ spinal cord ที่พบในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ปมประสาท visceral และ visceral cord เป็นส่วนของระบบประสาทที่ส่งกิ่งประสาทจำนวนมากออกไปเลี้ยงอวัยวะภายใน เช่น ระบบย่อยอาหาร และระบบสืบพันธุ์ มันจึงเปรียบเสมือนระบบประสาทอัตโนมัติ (automatic nervous system) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ที่ควบคุมการทำงานของอวัยวะภายในของร่างกาย

เป๋าฮื้อเป็นหอยที่อยู่ในกลุ่ม prosobranch ของ Class Gastropod จึงนับว่าเป็นหอยฝาเดียวที่มีลักษณะดั้งเดิม (primitive) มากที่สุด ระบบประสาทของหอยเป๋าฮื้อ

มีลักษณะคล้าย ๆ กับของ mollusc ชั้นต่ำชนิดอื่น ๆ เช่น Class Scaphopoda และ Bivalvia ส่วนใน Gastropod ชั้นสูง เช่น opisthobranch และ pulmonate ระบบประสาทกลางพัฒนามากขึ้น ซึ่งจะเห็นได้จากมีกระบวนการ centralization และ cephalization มากขึ้น โดยเฉพาะในพวก pulmonate จะมีปมประสาท cerebral ที่ใหญ่มาก คล้าย ๆ กับสมองซึ่งประกอบด้วย nuclei หรือกลุ่มของเซลล์ประสาทจำนวนมากมารวมตัวกันเป็นปมประสาทเดียว (Kay *et al.*, 1998) ระบบประสาทของ mollusc ที่พัฒนามากที่สุดโดยมีกระบวนการ centralization และ cephalization มากที่สุดคือ ระบบประสาทในสัตว์พวกปลาหมึก ซึ่งจัดอยู่ใน Class Cephalopoda (Beesley *et al.*, 1998)

7.2 จุลกายวิภาคของปมประสาท

ปมประสาทที่เราได้ทำการศึกษาในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาคือ cerebral, pleuropedal, visceral และ pedal cord ganglia ปมประสาทเหล่านี้มีลักษณะจุลกายวิภาคคล้ายกัน กล่าวคือ ต่างก็ประกอบด้วยขอบนอกหรือชั้น cortex ซึ่งเป็นชั้นของเซลล์ประสาท (neuron-NR) และเซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (neuroglia-NG) ปะปนอยู่กับเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell-NS) ชั้น cortex เปรียบเทียบได้กับ gray mater ของสมองในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ความหนาของ cortex ซึ่งหมายถึงจำนวนชั้นของเซลล์ประสาท มีปริมาณที่แตกต่างกันในบริเวณต่าง ๆ ของปมประสาทอันเดียวกัน และแตกต่างกันระหว่างปมประสาทต่างกันด้วย โดยทั่วไปปมประสาท pleuropedal ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุดมีความหนาของชั้น cortex มากที่สุด รองลงมาคือปมประสาท cerebral และ pedal cord ganglia ปมประสาท visceral มีชั้น cortex บางที่สุด โดยมีเซลล์ประสาทเรียงเป็น cortex เพียงชั้นเดียวหรือบางบริเวณไม่มีเลย โดยแถบ cortex ที่มีจำนวนชั้นของเซลล์มากกว่า 1 ชั้นมีเพียงทางด้านข้างของปมประสาท ภายในปมประสาท (medulla หรือ neuropil) มีมัดของใยประสาทสานกันไปมา โดยคาดว่าใยประสาทเหล่านี้ส่วนมากคงเป็นกิ่งของเซลล์ NR ซึ่งส่งไปยังเส้นประสาทต่าง ๆ และที่โยงต่อกับปมประสาทอื่น ๆ นอกจากนั้นยังมีกิ่งของเซลล์ NS แทรกอยู่ทั่ว ๆ ไปที่อาจโยงไปยังปมประสาทอื่น ๆ และอวัยวะเป้าหมายต่าง ๆ ซึ่งสังเกตได้จากการศึกษาในระดับจุลทรรศน์อิเลกตรอน ซึ่งแสดงกิ่งประสาทที่มีแกรนูลคล้าย ๆ กับที่พบในเซลล์ NS สอดแทรกอยู่ใน neuropil ในปริมาณค่อนข้างมาก

7.3 การจำแนกชนิดของเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน

ในชั้น cortex ของปมประสาททั้งหมดที่ได้ทำการศึกษา พบว่ามีเซลล์อยู่ 3 กลุ่ม คือ เซลล์ประสาท (neuron-NR) เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell-NS) และเซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (neuroglia-NG)

เซลล์ประสาท (neuron) ในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา เราสามารถแยกเซลล์ประสาทแต่ละกลุ่มออกเป็นชนิดต่าง ๆ โดยสังเกตความแตกต่างของลักษณะโครมาตินในนิวเคลียสเป็นหลัก ปรากฏว่ากลุ่ม NR มีเซลล์ 4 ชนิด คือ NR_1, NR_2, NR_3 และ NR_4 NR_1 เป็นเซลล์ประสาทขนาดยักษ์ (giant neurons) ที่พบในปมประสาททุกอันแต่มีปริมาณแตกต่างกันไป โดยทั่วไปจะมี NR_1 ในปมประสาท pleuropedal มากที่สุดและพบในทุกส่วนของชั้น cortex รองลงมาตามลำดับคือใน pedal cord ganglia และ cerebral ganglia และมีน้อยมากใน visceral ganglia เราคาดว่า NR_1 คือ motor neuron ที่ส่งกิ่งประสาทไปควบคุมเซลล์กล้ามเนื้อในบริเวณต่าง ๆ โดยเฉพาะกล้ามเนื้อมัดใหญ่ที่สุดคือ pedal muscle ซึ่งทำให้อธิบายได้ว่าทำไมจึงมี NR_1 จำนวนมากที่สุดใน pleuropedal และ pedal cord ganglia ส่วน visceral ganglia นั้นคงจะมีจำนวน NR_1 น้อยมาก เนื่องจากว่ากล้ามเนื้อรอบอวัยวะภายในมีขนาดเล็กและบาง ตัว motor neuron จึงอาจจะไม่จำเป็นต้องเป็นเซลล์ขนาดใหญ่และมีจำนวนมากอย่างที่พบในปมประสาทอื่น ๆ ส่วนเซลล์ NR_2, NR_3 เป็นองค์ประกอบหลักของชั้น cortex ในปมประสาททั่ว ๆ ไป และมีจำนวนมากที่สุดในกลุ่ม NR มันจึงอาจจะเป็นส่วนหนึ่งของระบบเซลล์ประสาทประสานงาน (association neurons) NR_4 เป็นเซลล์ประสาทที่มีจำนวนน้อยกว่า NR_2 และ NR_3 โดยมีปริมาณแตกต่างกันไปในปมประสาทต่าง ๆ โดยทั่วไปแล้ว NR_4 จะมีปริมาณมากที่สุดในปมประสาท pleuropedal และ pedal cord ganglia และมีจำนวนน้อยที่สุดในปมประสาท visceral

เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (neurosecretory cell) เมื่อสังเกตลักษณะของนิวเคลียสโดยจุลทรรศน์ธรรมดา เราสามารถแยก NS ออกเป็น 3 ชนิดคือ NS_1, NS_2, NS_3 NS_1 มีนิวเคลียสแบบ vesicular pattern เนื่องจากมี euchromatin มากที่สุด และมีเพียง heterochromatin เป็นแถบบาง ๆ ฉาบด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส กับท่อน heterochromatin ขนาดเล็ก ๆ ที่ไม่เข้มนักกระจายอยู่ภายในนิวเคลียส ลักษณะเช่นนี้แสดงว่า transcription activities โดยเฉพาะการ transcribe mRNA น่าจะอยู่ในระดับสูง ส่วน NS_2 มีการกระจายของ heterochromatin ที่ปรากฏเป็นก้อนกลมอยู่ติดกับถุงหุ้มนิวเคลียส และบางก้อนอยู่กลางนิวเคลียสจึงทำให้นิวเคลียสดูคล้ายหน้าปัทม์นาฬิกา (clock-faced pattern) ลักษณะเช่นนี้มักแสดงว่า transcription activities ลดลงไป ส่วน NS_3 มี heterochromatin ปริมาณมากที่สุดโดยปรากฏเป็นแถบที่ต่อเนื่องกันจนเกือบทั่วทั้งนิวเคลียส และมี euchromatin เหลืออยู่น้อย ลักษณะเช่นนี้แสดงว่า transcription activities น่าจะมีอยู่ในระดับต่ำมาก

เป็นที่น่าสังเกตว่าในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา เซลล์ NS_1, NS_2, NS_3 ที่ปรากฏในปมประสาททุกปมมีลักษณะของนิวเคลียสคล้ายคลึงกัน ส่วนไซโตปลาสซึมนั้นใช้แยกชนิด

ของเซลล์ NS ไม่ได้ เนื่องจากลักษณะแกรนูลที่ถึงแม้จะติดสี PF แล้ว แต่ก็ยังมีความแตกต่างกันไม่มากพอที่จะใช้เป็นดรรชนีบอกได้ว่าเซลล์นั้นเป็นเซลล์ NS ชนิดใด

เซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (neuroglia-NG) จากการสังเกตในระดับจุลทรรศน์ธรรมดา เซลล์ NG มีอยู่ 3 ชนิดคือ NG_1, NG_2 และ NG_3 โดย NG_1 เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสเรียวยาว แต่มี euchromatin เป็นส่วนมาก มีลักษณะคล้ายกับเซลล์ astroglia ที่พบในเนื้อเยื่อระบบประสาทกลางของสัตว์มีกระดูกสันหลัง NG_2 มีนิวเคลียสเรียวยาวเช่นกัน แต่โครมาตินทึบแสงเนื่องจากเป็นแบบ heterochromatin เกือบทั่วทั้งนิวเคลียส NG_2 มักเรียงตัวเป็นแถวต่อเนื่องกัน กลายเป็นชั้นถัดเข้ามาจากถุงหุ้มปมประสาท (capsule) ที่ประกอบด้วยใยเยื่อเกี่ยวพันขนาดต่าง ๆ จึงคาดว่าแนว NG_2 น่าจะเป็นแนวกั้นระหว่างหลอดเลือดที่อยู่รอบ ๆ ปมประสาทกับเนื้อเยื่อประสาท และคาดว่ามันคงทำหน้าที่คล้าย ๆ ชั้น blood-brain barrier ที่มีอยู่ในเนื้อเยื่อประสาทของสัตว์มีกระดูกสันหลัง ส่วน NG_3 เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสขนาดเล็กรูปรี และมี heterochromatin เกือบทั่วทั้งนิวเคลียส ทำให้นิวเคลียสทึบแสง เซลล์เหล่านี้กระจายอยู่ระหว่างมัดของกิ่งประสาทในส่วน neuropil จึงอาจจะทำหน้าที่คล้าย ๆ เซลล์ oligodendroglia ที่พบในเนื้อเยื่อของระบบประสาทกลางของสัตว์มีกระดูกสันหลัง

7.4 การศึกษาลักษณะโครงสร้างละเอียดของเซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เราได้ศึกษาเซลล์ NS เฉพาะที่อยู่ในปมประสาท 2 ปม ที่นับได้ว่ามีจำนวน NS มากที่สุด คือ cerebral และ pleuropedal ganglia ซึ่งเป็นปมประสาทขนาดใหญ่ที่ตัดออกมาแช่ในน้ำยาแล้วเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาได้โดยสะดวก เราคิดว่าข้อมูลที่ได้น่าจะแสดงถึงลักษณะโดยทั่วไปของโครงสร้างละเอียดของเซลล์ NS ในปมประสาทอื่น ๆ ด้วย กล่าวโดยสรุปคือ เซลล์ NS_1, NS_2, NS_3 ในปมประสาททั้งสอง มีลักษณะของโครมาตินในนิวเคลียสคล้ายคลึงกัน แต่ลักษณะของไซโตปลาสซึม โดยเฉพาะขนาดและลักษณะของแกรนูล (granules) ซึ่งน่าจะเป็นแกรนูลที่บรรจุสารฮอร์โมนมีความแตกต่างกัน (ดูตารางที่ 2) กล่าวคือ NS_1 ของปมประสาท cerebral มีแกรนูล 2 แบบ ขนาดใหญ่ (500-800 nm) มีลักษณะกลมมีเนื้อที่ทึบแสงอิเล็กตรอนพอประมาณ กับแกรนูลขนาดเล็ก (60 nm) รูปร่างกลมและมีเนื้อทึบแสงอิเล็กตรอน ในขณะที่ NS_1 ของปมประสาท pleuropedal มีแกรนูลแบบเดียวคือ แกรนูลกลมขนาด 120 nm ที่มักมีเนื้อทึบแสงอิเล็กตรอน เซลล์ NS_2 ในปมประสาท cerebral มีแกรนูลกลมขนาดใหญ่ (500-800 nm) อยู่เพียงชนิดเดียวที่มีผลึกฝังอยู่ในเนื้อของแกรนูล ในขณะที่ NS_2 ของปมประสาท pleuropedal มีแกรนูลชนิดเดียวเช่นกัน แต่เป็นแกรนูลกลมขนาดเล็กกว่ามาก (240 nm) ที่มีเนื้อทึบแสงอิเล็กตรอน ทั้งเซลล์ NS_1 และ NS_2 ในปมประสาททั้งสองปม เป็นเซลล์ที่มี organelles

ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแกรนูล เช่น RER และ Golgi complexes กับ mitochondria มากมายและซับซ้อน ในขณะที่เซลล์ NS_3 ในปมประสาททั้งสองมีกลุ่มของแกรนูลที่เกาะกันอยู่เป็นพวงและมีรูปร่างไม่แน่นอนคล้ายคลึงกัน โดยแกรนูลเหล่านี้ส่วนมากดูคล้าย ๆ กับก้อน pigment ที่อัดอยู่เต็มไซโตปลาสซึมของเซลล์ NS_3 คล้าย ๆ กับลักษณะของ aging pigment ที่พบในเซลล์ประสาทของสัตว์มีกระดูกสันหลัง จึงอาจเป็นไปได้ว่า NS_3 คือเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมนที่ transcriptional activities ปิดลงและเซลล์กำลังสลายตัว แต่ก็ยังอาจมีผลิตภัณฑ์ของสารฮอร์โมนเหลืออยู่ในก้อนทึบแสงอิเล็กตรอนที่สะสมอยู่ในไซโตปลาสซึมของเซลล์

7.5 การศึกษาลักษณะการกระจายของฮอร์โมนที่คล้ายฮอร์โมน GH, insulin, FSH และ LH ของสัตว์มีกระดูกสันหลังในปมประสาทโดยวิธี immunohistochemistry

จากการย้อม paraffin และ frozen sections ของปมประสาทด้วย antibodies ต่อ human GH, FSH และ LH และแอนติบอดีต่อ frog FSH และ LH พบว่า cortex ของปมประสาท cerebral ติด anti-GH เข้มที่สุด โดยติดทั้งในเซลล์ NS_1 และ NS_3 และในมัดประสาทที่อยู่ตรงกลาง neuropil ส่วนการติด anti-insulin และ anti-FSH มีเพียงประปรายเฉพาะในเซลล์ NS ซึ่งยังจำแนกไม่ได้ว่าเป็นชนิดใด ส่วนปมประสาท pleuropedal ไม่ติด anti-GH หรือ anti-insulin เลย แต่ติด anti-FSH และ anti-LH เพียงประปราย โดยจุดที่ติดน่าจะเป็นเซลล์ NS ที่ยังจำแนกไม่ได้ว่าเป็นชนิดใด ส่วนปมประสาท visceral นั้นติดเฉพาะ anti-LH ซึ่งก็จางมากและมีจุดที่ติดสีเพียงประปราย

อย่างไรก็ตาม จากข้อมูลที่จำกัดดังกล่าวทำให้เราสรุปได้ว่า น่าจะมีฮอร์โมนที่คล้าย GH อยู่ในปมประสาท cerebral อยู่ในปริมาณสูง และฮอร์โมน GH ของหอยกับของมนุษย์น่าจะมีส่วนอนุรักษ์ (conserved part) ที่เหมือนกันอยู่มาก

ส่วนฮอร์โมนชนิดอื่น (insulin, LH, FSH) ติดสีจางมาก ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากส่วนอนุรักษ์ของฮอร์โมนเหล่านี้ในหอยและในมนุษย์มีเหลืออยู่น้อยมาก ในการทดลองที่ใช้หอยชนิดอื่น ๆ เช่น *Aplysia* และ *Lymnaea* ได้รายงานว่ามี insulin-liked hormones ในปมประสาทของหอยเหล่านี้ (Joose, 1988; Roovers *et al.*, 1995; Jonas *et al.*, 1996; Smit *et al.*, 1996) แต่ยังไม่เคยมีรายงานในหอยเป๋าฮื้อ ส่วนการแสดงฮอร์โมนที่เหมือน LH กับ FSH นั้นยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อน แต่ Yahata (1973) ได้แสดงว่าถ้าหากนำ homogenate ของปมประสาท cerebral ฉีดเข้าไปในหอยเป๋าฮื้อกลุ่มทดลองจะทำให้หอยมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น แต่ถ้าหากฉีด homogenate ของปมประสาท visceral และ pleuropedal จะทำให้มีการพัฒนาของ gonads ได้ดีขึ้น จึงได้ตั้งสมมุติฐานว่า cerebral ganglia น่าจะเกี่ยวกับการควบคุมกระบวน

การเจริญเติบโต ซึ่งก็ตรงกับการพบ GH-liked hormones ในปริมาณสูงในการทดลองของเรา และ pleuropedal, visceral ganglia น่าจะเกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ และพฤติกรรมการสืบพันธุ์ของหอย ในการทดลองของเราส่อว่าอาจจะมี FSH-liked และ LH-liked hormones อยู่ในปมประสาททั้งสอง แต่สัญญาณจากการติดสีค่อนข้างอ่อน ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากส่วนอนุรักษ์ของฮอร์โมนที่คล้ายกันในหอยเหลืออยู่น้อยมาก ซึ่งเป็นประเด็นที่น่าติดตามต่อไป นอกจากนั้นแล้วการศึกษาว่าเซลล์ NS ชนิดใดในปมประสาท cerebral, pleuropedal และ visceral ผลิตฮอร์โมนชนิดใด โดยกรรมวิธี immunoelectron microscopy ก็น่าจะกระทำด้วย แต่ติดปัญหาที่ binding ของ antibodies ต่อ insulin, LH และ FSH ฮอร์โมนของสัตว์มีกระดูกสันหลังต่อเซลล์ NS ของปมประสาทในหอยที่เตรียมโดยวิธี LR white และ Lowicryl embedding ค่อนข้างต่ำมากจึงยังทำไม่ได้ผล ส่วนการใช้ anti-GH ย้อมหา NS เซลล์ที่ผลิต GH-liked hormones น่าจะมีความเป็นไปได้มากที่สุด ซึ่งเราจะทำการทดลองต่อไป

7.6 การศึกษา GH-like ฮอร์โมนในปมประสาท cerebral ด้วยวิธี immunoblotting

การใช้ primary antibody ต่อ human GH ย้อมแผ่น electroblot ของโปรตีนจากปมประสาท cerebral ที่แยกโดย 12.5% SDS-PAGE แสดงให้เห็นแถบ GH-liked hormones ชัดเจนมากโดยเฉพาะแถบซึ่งมีระดับโมเลกุลอยู่ที่ 130 และ 95 kD ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าที่พบ GH-liked hormones ในหอยเป๋าฮื้อซึ่งมีอยู่ที่ระดับน้ำหนักโมเลกุล 2 ระดับนั้น เนื่องจากแถบ 95 kD เป็นส่วนหนึ่งของแถบ 130 kD ที่มีส่วนหนึ่งของโมเลกุลถูกตัด (spliced) ออกไป

การใช้วิธีแบบเดียวกันในการวิเคราะห์หา insulin-liked, LH-liked และ FSH-liked hormones ในปมประสาท cerebral และ pleuropedal ยังไม่ได้ผล ซึ่งอาจจะเป็นเพราะมีการเกาะ (binding) ของแอนติบอดีต่อฮอร์โมนที่คล้ายกันในหอยเป๋าฮื้อในระดับต่ำมาก เนื่องจากส่วนอนุรักษ์ของฮอร์โมนหอยที่คล้ายกับส่วนอนุรักษ์ที่พบในฮอร์โมนของสัตว์ชั้นสูงคงมีเหลืออยู่น้อยมาก

การใช้วิธี molecular cloning เช่น RT-PCR ซึ่งใช้ primers ที่เหมาะสม น่าจะเป็นวิธีที่ค้นหาฮอร์โมนดังกล่าวรวมทั้ง GH-liked hormone ได้ดีกว่าวิธี immunoblotting ซึ่งขณะนี้ก็ได้มีผู้ที่ทำการ cloning ของ cDNA ที่ควบคุมการสร้างฮอร์โมน ELH (egg laying hormones) ของหอย *Aplysia*, *Lymnaea* และหอยเป๋าฮื้อสำเร็จแล้ว (Mahon *et al.*, 1985; Shyamala *et al.*, 1986; Joose, 1988; Vreugdenhil *et al.*, 1988; van Minnen *et al.*, 1989) รวมทั้งการสังเคราะห์ recombinant ELH ที่มีผลทางสรีรวิทยาคล้ายกับ native ELH ซึ่งเราได้นำมาทดลองหาการกระจายตัวของฮอร์โมนชนิดนี้บ้างแล้ว (ดูข้อ 6.14.2)

7.7 มหกายวิภาคของรังไข่และอัณฑะ

เนื้อเยื่อทั้งรังไข่และอัณฑะล้อมรอบ hepatopancreas โดยรวมจึงเรียกว่า conical organ ในทางปฏิบัติการตรวจดูสภาพความสมบูรณ์ของต่อมอัณฑะและรังไข่ทำได้โดยการตรวจดูสี อัณฑะมีสีเหลืองอ่อนเมื่อพัฒนาเต็มที่และก่อนเข้าสู่ช่วง spawning ส่วนรังไข่มีสีเขียวขี้ม้าเมื่อพัฒนาเต็มที่และก่อนเข้าสู่ช่วง spawning เมื่อตรวจดูในระดับจุลทรรศน์พบว่าปริมาณของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์และ hepatopancreas มีความสัมพันธ์แบบผกผัน กล่าวคือในช่วง proliferative phase hepatopancreas จะมีขนาดใหญ่กว่า gonad tissue มาก ส่วนในระยะ mature phase เนื้อเยื่อ gonad จะมีปริมาณมากกว่า hepatopancreas มาก อาจเป็นไปได้ว่าในช่วง proliferative phase hepatopancreas ต้องเป็นแหล่งสะสมอาหารไว้ให้เพียงพอกับการแบ่งตัวและการพัฒนาของเซลล์ในระยะต้น ที่มีอัตราการแบ่งตัวสูงมาก และเมื่อถึงระยะ mature phase อาหารก็ได้ถูกใช้ไปมาก ทำให้ gonads ขยายตัวเต็มที่ ส่วน hepatopancreas มีขนาดลดลง

7.8 ลักษณะจุลกายวิภาคของอัณฑะและรังไข่

อัณฑะและรังไข่แบ่งออกห้องเล็กๆ (compartment) โดยเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่า trabeculae เซลล์ spermatogonia (Sg) ส่วนใหญ่เกาะอยู่ตามฐานของ trabeculae ด้านที่ติดกับถุงหุ้ม ในอัณฑะเซลล์ Sg คงแบ่งตัวและค่อย ๆ เคลื่อนขึ้นไปตามขอบของแผ่น trabeculae ทั้งสองด้าน แล้วแบ่งตัวและปรับสภาพเป็น primary spermatocytes (PrSc) ขั้นต่าง ๆ ที่ค่อย ๆ เคลื่อนเป็นแถวออกไปจากขอบของแผ่น trabeculae จนกระทั่งกลายเป็นแถวสุดท้าย คือ secondary spermatocyte (SSc) ก่อนที่จะกลายเป็นเซลล์ spermatids (St) ซึ่งเริ่มหลุดออกจากกัน และในที่สุดกลายเป็นเซลล์ spermatozoa ที่หลุดออกสู่ช่องกลางของ compartment แต่ละอัน ส่วนในรังไข่เซลล์ oogonia คงค่อย ๆ เคลื่อนขึ้นไปตามขอบ trabeculae เช่นเดียวกันกับ Sg และแบ่งตัวกับปรับสภาพกลายเป็นเซลล์ Oc_1 ถึง Oc_3 ที่ขยายขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ และเปลี่ยนรูปร่างจากรูปกลม (spherical) ใน Oc_1 และ Oc_2 เป็นรูปแท่ง (columnar) หรือรูปแก้วไวน์ (goblet) ใน Oc_3 ซึ่งยังมีด้านฐานติดอยู่กับแผ่น trabeculae จนในที่สุดกลายเป็นรูปหลายเหลี่ยมในเซลล์ขั้น Oc_4 และ Oc_5 ซึ่งหลุดออกจากแผ่น trabeculae เข้าไปรวมตัวและอัดแน่นอยู่ในช่องว่างของ compartment แต่ละอัน เซลล์ Oc_{1-3} มีเซลล์พี่เลี้ยง (follicular cells) หุ้มอยู่โดยรอบ follicular cells คงเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่มีกำเนิดมาจากแผ่น trabeculae ซึ่งมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับ Og และพัฒนาไปเป็น follicular cells ที่ล้อมรอบเซลล์ oocytes จากขั้น Oc_1 ถึง Oc_4 ในอัณฑะเซลล์ที่เป็นตระกูลเดียวกับ follicular cells อาจจะพัฒนาไปเป็น

supporting cells ที่แทรกอยู่ระหว่าง PrSc โดยเป็นเซลล์ที่มีเอกลักษณ์พิเศษคือมีไมโตคอนเดรียอัดแน่นในไซโตปลาสซึม ซึ่งสังเกตได้ชัดในการศึกษาด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ในเชิงของจุลกายวิภาคเปรียบเทียบ จะเห็นว่าการพัฒนาของอัณฑะและรังไข่ของเป้าฮื้อยังเป็นแบบ primitive ที่หน่วยสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ได้แก่ spermatogenic unit และ oogenetic unit ยังคงมีลักษณะคล้ายกัน โดยมี trabeculae เป็นแกนกลาง และแต่ละหน่วยก็ไม่ได้แยกจากกันโดยเด็ดขาด ในขณะที่อัณฑะของสัตว์ชั้นสูง เช่น พวกมีกระดูกสันหลังมีการแยกหน่วยผลิตเซลล์อสุจิออกเป็นหลอดสร้างอสุจิ (seminiferous tubules) ที่แยกจากกันโดยเด็ดขาด โดยเริ่มต้นการพัฒนาจาก sex cords ในอัณฑะ ส่วนรังไข่นั้น sex cord สลายตัว (degenerate) และเนื้อในของรังไข่กลายเป็นองค์เดียวกันซึ่งมีเซลล์ Og และ Oc ระยะต่าง ๆ กระจายอยู่ตามขอบของรังไข่โดยไม่มีการแยกเป็น oogenetic units

7.9 การศึกษาลักษณะและการจำแนกขั้นของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเพศผู้โดยจุลทรรศน์ธรรมดา

จากการศึกษาลักษณะของโครมาตินในนิวเคลียสเป็นหลัก ทำให้เราสามารถแยกขั้นของเซลล์เพศผู้ออกได้เป็น 13 ขั้นคือ เซลล์ spermatogonia (Sg) primary spermatocytes (PrSc) 5 ขั้น secondary spermatocyte (SSc) 1 ขั้น spermatids (St) 4 ขั้น และ spermatozoa (Sz) 2 ขั้น เซลล์เหล่านี้มีลักษณะและปริมาณของ euchromatin ต่อ heterochromatin และการจัดรูปแบบของ heterochromatin ที่แตกต่างกัน เริ่มจาก Sg ซึ่งนอกจากจะเป็นเซลล์ขนาดเล็กแล้ว ยังมี heterochromatin เป็นแถบหรือก้อนเล็ก ๆ เกาะอยู่ตามขอบในของนิวเคลียส ส่วนตรงกลางของนิวเคลียสมีก้อน heterochromatin อยู่น้อยมาก นิวคลีโอลัสเด่นพอประมาณ เมื่อถึงระยะ PrSc เซลล์ค่อย ๆ ขยายขนาดขึ้นจนใหญ่ที่สุดในขั้น pachytene spermatocyte (PSc) จากนั้นเซลล์มีขนาดเล็กลงจนถึงขั้น diplotene spermatocyte (DSc) และจะขยายใหญ่อีกครั้งในขั้น metaphase spermatocyte (MSc) กับ secondary spermatocyte (SSc) heterochromatin ก่อตัวเป็นท่อนบาง ๆ ใน leptotene spermatocyte (LSc) และมีความหนาขึ้นกับทีบแสงขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงขั้น PSc และ DSc ซึ่งกลายเป็นท่อนขนาดใหญ่ที่ไขว้กันไปมา มีลักษณะคล้ายช่อดอกไม้จึงเรียกว่า bouguet pattern นิวคลีโอลัสปรากฏเด่นชัดใน LSc และหายไปในระยะ PSc และ DSc ถุงหุ้มนิวเคลียสหายไปในระยะ MSc เมื่อถึงระยะ SSc ท่อนของ heterochromatin ไขว้กันเป็นรูปตาข่ายหรือรูปตัวอักษร Y ต่อเนื่องกัน

เซลล์ที่มีอยู่มากที่สุดในกลุ่ม PrSc คือ PSc ซึ่งน่าจะเป็นขั้นที่ใช้เวลานานที่สุดและที่มีจำนวนน้อยที่สุดคือ MSc ซึ่งคงจะเป็นช่วงที่สั้นที่สุด SSc มีจำนวนมากกว่าที่พบ

ในสัตว์ชั้นสูง เช่น ในหนู ซึ่งทำให้เราคิดว่าช่วง SSc ก็คงจะใช้เวลาค่อนข้างนานเช่นกัน จึงได้ปรากฏว่ามีเซลล์ขั้นนี้จำนวนมาก ณ ที่ใดที่หนึ่งและ ณ ช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งใน spermatogenic unit เซลล์ spermatids แยกเป็น 4 ขั้น การกระจายของโครมาตินอย่างสม่ำเสมอทำให้นิวเคลียสของ round spermatid ขั้นที่ 1 (St_1) ไม่ทึบแสงมาก ต่อจากนั้นนิวเคลียสลดปริมาตรลงไป แต่ยังเป็นทรงกลม จึงทำให้ไยโครมาตินกระชับเข้า เป็นเหตุให้นิวเคลียสของ St_2 ทึบแสงมากขึ้น ส่วนนิวเคลียสของ St_3 เริ่มเป็นรูปรีและยาวออกเรื่อย ๆ ในขณะที่โครมาตินเริ่มขดตัวเป็นก้อน heterochromatin อีกครั้ง ซึ่งทำให้เกิดช่องว่างระหว่างก้อน heterochromatin ในขั้น St_3 และเมื่อถึงเซลล์ St_4 นิวเคลียสลดขนาดลงมากและเรียวออกโดยเฉพาะทางด้านหน้า ทำให้โครมาตินกระชับเข้า และนิวเคลียสทึบแสงขึ้นโดยมีช่องว่างระหว่างก้อน heterochromatin เหลืออยู่น้อยมาก จนในที่สุดกลายเป็น spermatozoa ที่มีอยู่ 2 ขั้น ใน Sz_1 โครมาตินยังไม่เข้มเต็มที่ และเพิ่งเริ่มมีก้อนใส ๆ ของ acrosome ก่อตัวที่ด้านหน้านิวเคลียส พอถึงระยะ Sz_2 นิวเคลียสทึบแสงเต็มที่ acrosome และหางพัฒนาสมบูรณ์

7.10 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้โดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

จากการสังเกตด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ทำให้เราสังเกตเห็นโครงสร้างละเอียด (ultrastructure) ของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ซึ่งทำให้เราเข้าใจการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในกระบวนการ spermatogenesis และ spermiogenesis ได้ดีขึ้น โดยเฉพาะใน 3 ประเด็นหลักคือ

ประการแรก คือการขดเรียงตัวของไยโครมาตินจากระยะ Sg จนถึงระยะ Sz เราได้ข้อสรุปว่าไยโครมาตินในเซลล์ Sg, PrSc มีอยู่เพียง 2 ขนาดคือ ไยระดับที่ 1 มีขนาดเล็กสุดและมีความหนาประมาณ 10-15 nm ซึ่งน่าจะเกิดจากการคลี่ของไยระดับ 2 ที่มีขนาด 30 nm ซึ่งเรียกว่าไยโครมาตินพื้นฐาน (fundamental chromatin fibers) ซึ่งพบทั่วไปใน somatic cells และเซลล์ขั้น Sg และ PrSc ไยระดับ 1 น่าจะเป็น euchromatin ในสภาพที่กำลังคลี่ออกและมี transcriptional activities อยู่ ในเซลล์ขั้น Sg และ LSc ยังมีไยระดับ 1 และระดับ 2 เดี่ยว ๆ อยู่มาก โดยในเซลล์ LSc ไยระดับ 2 บางแห่งอาจจะอยู่ชิดกันหรือพันกันเข้าจนกลายเป็นก้อนหรือท่อน heterochromatin ที่ไม่หนานัก ในระยะ PSc ไยระดับ 2 ขดพันกันแน่นเข้าจนกลายเป็นท่อน heterochromatin ขนาดใหญ่ยาวและทึบแสงขึ้นตามลักษณะที่ได้กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามยังสามารถสังเกตเห็นไยระดับ 2 เดี่ยว ๆ ที่ประกอบเป็นก้อน heterochromatin ได้ใน DSc การชิดหรือขดแน่นของไยระดับ 2 ในก้อน heterochromatin มีมากขึ้นเรื่อย ๆ จนเข้าสู่ระยะ MSc พอเซลล์ผ่านเข้าสู่ระยะ SSc ไยระดับ 2 ในท่อน heterochromatin กลับเริ่มกระจายออกจากกันอีกครั้ง จนทำให้ท่อน heterochromatin ดูหลวม

ขึ้น ดังนั้นจึงอาจจะกล่าวได้ว่าใยระดับ 2 (30 nm) เป็นใยโครมาตินหลักที่เป็นระดับกลางระหว่างสภาพที่เป็นระดับ 1 และสภาพที่เรียงติดกันหรือขดแน่นจนกลายเป็นก้อน heterochromatin (ระดับ 3) ขนาดต่าง ๆ ถึงแม้เมื่อผ่านการแบ่งเซลล์รอบแรก (mitosis I) ไปแล้ว ใยระดับ 2 ก็ยังคงเป็นใยพื้นฐานหลักทั้งในเซลล์ขั้น SSc, St_1 และ St_2

เมื่อเข้าสู่ spermiogenesis ช่วงแรกในเซลล์ St_1 ใย 30 nm ที่เคยพันกันในก้อน heterochromatin ใน SSc ก็จะคลี่ออกจากกัน แล้วกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียส ต่อจากนั้นในช่วง St_2 มีการจัดระเบียบใหม่ โดยใย 30 nm เริ่มขดตัวแน่นขึ้น ณ บริเวณที่มี condensation axis ซึ่งปรากฏเป็นแถบที่มีลักษณะคล้าย ๆ กับ synaptonemal complex แถบดังกล่าวอาจจะเป็นตัวจัดระเบียบ (organizer) ที่เริ่มกระตุ้นให้ใย 30 nm เริ่มขดตัวพันกันแน่นเป็นหย่อม ๆ พอเข้าขั้น St_3 หย่อมของการขดตัวที่มี condensation axis เป็นแกนกลางเริ่มกลายเป็นก้อน heterochromatin อีกครั้ง ก้อน heterochromatin เหล่านี้ขดแน่นขึ้นเรื่อย ๆ จนทำให้เกิดช่องว่างระหว่างก้อน heterochromatin ขึ้นในนิวเคลียส เมื่อเข้าระยะ St_4 นิวเคลียสมีขนาดเล็กลงและเรียวออก จึงทำให้ก้อน heterochromatin กระชับเข้า จนทำให้นิวเคลียสทึบแสงอิเล็กตรอนและช่องว่างในนิวเคลียสหายไป ใยโครมาตินส่วนใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบของก้อน heterochromatin มีความหนาขึ้นถึง 40 nm ในขั้น St_3 และเมื่อเข้าสู่ระยะ St_4 และ Sz_1 ใยโครมาตินมีความหนาถึง 60 nm และประกบติดกันแน่นจนไม่อาจจะสังเกตเห็นขอบเขตของใยเดี่ยวในระยะ Sz_2 ซึ่งนิวเคลียสพัฒนาเต็มที่

การขดตัวของใยโครมาตินที่พบในนิวเคลียสของเซลล์ St และ Sz ของหอยเป๋าฮื้อนับได้ว่าเป็นแบบ fibrous to granular type กล่าวคือ จากใย 30 nm ที่มีความหนาสม่ำเสมอ (fibrous type) กลายเป็นใยที่มีปม (granular) เกิดขึ้นตลอดความยาวเป็นระยะ โดยปมบนใยเหล่านี้ขยายขนาดขึ้นเรื่อย ๆ จาก 40 nm ใน St_3 ไปเป็น 60 nm ใน St_4 และ Sz_1 ปมเหล่านี้อาจจะเกิดจากการที่มีโปรตีนโปรตามีน (protamines) เข้ามาพอกโดยการแทนที่โปรตีนฮีสโตน (histones) ซึ่งอาจเป็นผลให้ใย DNA ขมวดเข้าเป็นปมที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ และในที่สุดปมเหล่านี้ก็เข้ามาชิดกันจนกลายเป็นก้อนทึบอย่างที่ปรากฏใน Sz_2 การขดตัวของใยโครมาตินแบบนี้พบได้ใน mollusc ที่เป็นพวกค่อนข้าง primitive เช่น Scaphopoda และ Bivalvia รวมทั้ง abalone ซึ่งเป็น archeogastropod ด้วย (Bozzo *et al.*, 1983; Dufresne-Dube *et al.*, 1983; Healy, 1989; Hodgson *et al.*, 1990; Cacas and Subirana, 1994; Johnson *et al.*, 1996) สัตว์เหล่านี้มีการปฏิสนธิของเซลล์อสุจิกับไข่ภายนอกร่างกาย (external fertilization) การขดตัวของใยโครมาตินอีกแบบหนึ่งคือแบบ fibrous to lamellar type พบใน mollusc ที่มีการปฏิสนธิระหว่างเซลล์อสุจิกับไข่ภายในร่างกาย (internal fertilization) เช่น

ในพวก opisthobranch เช่น *Aplysia* neogastropods และ pulmonate gastropods (Jaramillo *et al.*, 1986; Healy, 1987; 1988; Gallardo and Garrido, 1989; Amor and Durfart, 1990; Sretarugsa, *et al.*, 1991; Caceres *et al.*, 1994) เราคิดว่าสิ่งที่เกิดขึ้นในการขดตัวแบบนี้คือ ใย 30 nm มีการเพิ่มขนาดโดยสม่ำเสมอจนกลายเป็นแผ่น ซึ่งอาจเกิดจากการที่โปรตีน protamines เข้ามาแทนที่ histones โดยเกาะอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งความยาวของเส้นใย DNA แล้วใย nucleoprotamines ที่อยู่เคียงข้างกันเข้ามาประกบกันจนกลายเป็นแผ่น (lamellar) โดยการยึดของ intermolecular disulfide bondings และในที่สุดแผ่นเหล่านี้จะเรียงซ้อนกันและประกบกันแน่นคล้าย ๆ กับการเรียงตัวของเยื่อ myelin

การขดตัวของใยโครมาตินทั้ง 2 แบบ (model) ที่พบใน mollusc นี้น่าจะได้รับการศึกษาในรายละเอียดมากยิ่งขึ้น เนื่องจากมันอาจจะเป็นต้นแบบของการขดตัวของโครมาตินที่เกิดในเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์ชั้นสูงรวมทั้งของมนุษย์ด้วย การศึกษาคุณลักษณะของเบสิกโปรตีนได้แก่ histones และ protamines ที่มีการเกาะและการแทนที่ซึ่งกันและกัน ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่อาจจะใช้อธิบายการขดของใยโครมาตินแบบใดแบบหนึ่งได้ นอกจากนั้นแล้วการศึกษาลักษณะโครมาตินของหอย โดยการทำ chromatin decondensation และหยด chromatin spread ลงบนแผ่น grid แล้วตรวจดูโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนหรือ atomic force microscope ก็จะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้พิสูจน์การขดตัวของใยโครมาตินแบบใดแบบหนึ่งดังที่กล่าวมาแล้วได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ซึ่งจะทำให้เราเข้าใจกระบวนการขดตัวของใยโครมาตินใน mollusc และในสัตว์ชั้นสูงได้ดียิ่งขึ้น

ประการที่สอง การสังเกตด้วย TEM ทำให้เราเข้าใจการพัฒนาของ acrosome ได้ดียิ่งขึ้น โดยพบว่า proacrosomal granules อาจจะถูกสร้างขึ้นตั้งแต่ในระยะ PSc ที่สังเกตเห็นแกรนูลทึบแสงอิเล็กตรอนกระจายอยู่อย่างประปราย แกรนูลเหล่านี้มีการเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยไปจนถึงขั้น SSc ซึ่งมีจำนวนต่อเซลล์มากขึ้นอย่างชัดเจน proacrosomal granules เริ่มจับตัวเป็นก้อนใหญ่ขึ้นในระยะ St_1 และ St_2 จนกลายเป็นก้อนใหญ่เพียงก้อนเดียว ที่เคลื่อนไปประกบอยู่ด้านหน้าของนิวเคลียสในขั้น St_3 และ St_4 ในที่สุดก้อน acrosomal granule เริ่มเว้าเข้าจนกลายเป็น acrosome ที่สมบูรณ์ใน Sz_1 และ Sz_2 ซึ่งเกิดช่องว่างใต้ acrosome ที่เรียกว่า subacrosomal space ซึ่งบรรจุแท่งผลึกของโปรตีนที่เป็นส่วน acrosomal core มีผู้พบว่าในหอยเป๋าฮื้อที่พบในเขตอบอุ่นมี acrosomal core ที่ยาวและประกอบด้วยโปรตีนแอกติน (actin) ที่อาจจะเกี่ยวข้องกับการเกิด acrosomal reaction (Baccetti, 1979; Lewis *et al.*, 1980; Shiroya *et al.*, 1986; Tilney, 1987; Hodgson *et al.*, 1990)

ประการที่สาม การสังเกตด้วย TEM ทำให้เราเข้าใจกระบวนการพัฒนาของระบบหางของ Sz เซลล์ได้ดีขึ้น โดยพบว่าเริ่มมี centriole ตั้งแต่ระยะ St_1 และเริ่มมีการสร้างท่อนหางในไซโตปลาสซึมใน St_2 ซึ่งเป็นระยะที่ centriole เคลื่อนมาอยู่ทางด้านท้ายของนิวเคลียส centriole นี้จะกลายเป็นจุดที่กระตุ้นให้ axoneme ของหางเริ่มยาวออกเรื่อย ๆ โดยมีไมโตคอนเดรียกลม ๆ 5 ก้อนเคลื่อนมาอยู่รอบ centriole ซึ่งจะกลายเป็นแหล่งผลิตพลังงานให้กับหาง เมื่อเปรียบเทียบลักษณะหางของเซลล์อสุจิของหอยเป๋าฮื้อกับหางเซลล์อสุจิใน mollusc ที่มีการปฏิสนธิแบบ internal fertilization และในสัตว์ชั้นสูงแล้ว หางของเซลล์อสุจิในหอยเป๋าฮื้อมีลักษณะไม่ซับซ้อน มีเยื่อหุ้ม axoneme ตลอดความยาวของหางโดยไม่มี fibrous shealth หุ้ม axoneme อยู่ จึงทำให้เราคิดว่าหางของเซลล์อสุจิในหอยเป๋าฮื้อน่าจะมีแรงโบกพัดได้น้อย

7.11 การสังเกตลักษณะและการจำแนกขั้นของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียโดยจุลทรรศน์ธรรมดา

การแยกเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในรังไข่ กระทำโดยการใช้ลักษณะของนิวเคลียสโดยเฉพาะการขดของโครมาตินเป็นท่อน lampbrush chromosomes ความเด่นของนิวคลีโอลัส ความทึบแสงของเนื้อนิวคลีโอปลาสซึม และลักษณะของไซโตปลาสซึม ได้แก่ การปรากฏของก้อนไขมัน (lipid droplets) และก้อนไข่ (yolk platelets) จากเกณฑ์ดังกล่าว ทำให้สามารถแยกเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียออกได้เป็น 6 ขั้น คือ oogonia (Og) และ primary oocytes 5 ขั้น (Oc_1-Oc_5) ระยะ Og มีลักษณะเช่นเดียวกับ Sg และมักอยู่เป็นกลุ่ม ๆ ที่ด้านฐานของ trabeculae ใน Oc_1 นิวเคลียสมี lampbrush chromosomes อยู่เป็นจำนวนมาก และนิวคลีโอลัสยังเป็นก้อนขนาดเล็กทึบ เนื้อนิวคลีโอปลาสซึมค่อนข้างทึบ จึงทำให้สังเกตเห็นแนวถุงหุ้มนิวเคลียสไม่ชัด ในระยะ Oc_2 นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น lampbrush chromosomes กระจายออกจากกัน ทำให้เนื้อนิวคลีโอปลาสซึมใสขึ้น ทำให้เห็นแนวของเยื่อหุ้มนิวเคลียสชัดเจนขึ้น นิวคลีโอลัสขยายใหญ่และจางลง ในระยะ Oc_3 lampbrush chromosomes กลายเป็นท่อนสั้น ๆ และมีอยู่จำนวนน้อย โครมาตินส่วนมากกลายเป็น euchromatin เนื้อนิวคลีโอปลาสซึมจึงใสขึ้น ส่วนนิวคลีโอลัสขยายขนาดและโปร่งแสงขึ้น ในระยะ Oc_4 และ Oc_5 นิวเคลียสขยายขนาดขึ้นเต็มที่ โครมาตินทั้งหมดกลายเป็น euchromatin โดยมีเพียงแถบ heterochromatin บาง ๆ ฉาบอยู่ตามด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส นิวคลีโอปลาสซึมโปร่งแสงเต็มที่ ส่วนนิวคลีโอลัสขยายขนาดใหญ่ภายในโปร่งแสงเต็มที่และอาจจะติดสี eosin ออกแดง ๆ มากขึ้น

ในไซโตปลาสซึมมีการติดสีน้ำเงินของ hematoxylin และ methylene blue ค่อนข้างเข้มใน Oc_1, Oc_2 และสีน้ำเงินเริ่มจางลงใน Oc_3, Oc_4 และ Oc_5 เนื่องจากสีเหล่านี้

แสดงคุณสมบัติ basophilia ของไซโตปลาสซึม จึงสามารถใช้เป็นดรรชนีแสดงปริมาณของไรโบโซม ทำให้เราแปลผลว่าไซโตปลาสซึมมีการสร้างไรโบโซมในอัตราสูงในระยะ Oc_1 และ Oc_2 และมีอัตราการสร้างลดน้อยลงในระยะ Oc_3 ถึง Oc_5 ลักษณะการติดสีน้ำเงินที่เปลี่ยนแปลงไปอีกประการหนึ่งคือ ใน Oc_4 และ Oc_5 ขณะที่สีน้ำเงินในไซโตปลาสซึมส่วนใหญ่ลดลง แต่กลับไปปรากฏมีแถบสีน้ำเงินเข้มอยู่ใต้ชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเมื่อศึกษาโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแล้วพบว่าแถบสีน้ำเงินดังกล่าว เกิดจากการสะสมของ cortical granules ก้อนเล็ก ๆ ละเอียดจำนวนมาก ซึ่งก้อนเหล่านี้ติดสีน้ำเงินเช่นเดียวกับไรโบโซม จึงทำให้ปรากฏแถบสีน้ำเงินอยู่ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ดังกล่าวแล้ว ก้อน lipid droplets เริ่มปรากฏเป็นหย่อม ๆ ใน Oc_2 และมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระจายอยู่ทั่วทั้งไซโตปลาสซึมใน Oc_4 และ Oc_5 ส่วนก้อน yolk platelets เริ่มปรากฏใน Oc_3 และมีปริมาณมากขึ้นเรื่อย ๆ จนอาจอัดอยู่เต็มไซโตปลาสซึมในขั้น Oc_4 และ Oc_5 โดยแทรกอยู่ระหว่าง lipid droplets

7.12 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การศึกษาโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM ทำให้เราสังเกตเห็นรายละเอียดของเซลล์ในระยะ Og, Oc_1 ถึง Oc_5 และเข้าใจกระบวนการพัฒนาของเซลล์เหล่านี้ได้ดีขึ้น เราพบว่าในนิวเคลียสของ Oc_1 ถึง Oc_3 lampbrush chromosomes ประกอบด้วยใยขนาดต่าง ๆ 4 ระดับคือ ระดับ 7-12 nm, ระดับ 30 nm, ระดับ 40-60 nm และระดับ 100-120 nm โดยใยระดับที่ 4 (100-120 nm) เป็นระดับที่ใหญ่ที่สุด ใยระดับที่ 3 (ขนาด 40-60 nm) มีขนาดใกล้เคียงกับใยโครมาตินที่ปรากฏในเซลล์ St_{3-4} แต่อาจจะแตกต่างกันในเชิงองค์ประกอบของสารโปรตีน โดยใน St_{3-4} มีโปรตีนประจุบวกโปรตามีนเป็นโปรตีนโครงสร้าง ซึ่งทำให้ DNA ขดตัวเข้าไปสู่ขนาด 40-60 nm ดังกล่าว ส่วนในนิวเคลียสของเซลล์ Oc ไม่ปรากฏว่ามีโปรตามีนอยู่เลย ดังนั้นการขดตัวของใยโครมาตินเป็นขนาด 40-60 nm จึงคงใช้กลยุทธ์อย่างอื่น ใยระดับ 2 ขนาด 30 nm ที่พบในเซลล์ Oc ทุกระยะก็เป็นใยพื้นฐานคล้ายกับที่พบในเซลล์ Sg, PrSc, SSc และ somatic cells ทั่วไป ซึ่งคงเป็นใยที่ประกอบขึ้นจากการรวมตัวของ nucleosomes ส่วนใยระดับที่ 1 (ขนาด 7-12 nm) เป็นขนาดที่ใกล้เคียงกับใยโครมาตินระดับที่ 1 (10-15 nm) ที่ปรากฏในนิวเคลียสของเซลล์ Sg, PrSc, SSc และ somatic cells โดยทั่วไป ซึ่งน่าจะเป็นใยโครมาตินที่กำลังคลี่ออกจากใยขนาด 30 nm กลายเป็น euchromatin และมี transcriptional activities จากการสังเกตใน LM และ TEM พบว่า lampbrush chromosomes มีขนาดและจำนวนลดลงเรื่อย ๆ จาก Oc_1 ถึง Oc_3 และหายไปใน Oc_4 และ Oc_5 ซึ่งเป็นช่วงที่ใยของโครมาตินได้เปลี่ยนสภาพจากระดับ 3 และ 4 ลงมาจนส่วนมากกลายเป็นระดับ 1 โดยมีใยระดับ 2 ปะปน

อยู่บ้าง จากปรากฏการณ์ดังกล่าวทำให้เราคิดว่า transcriptional activities ในนิวเคลียสน่าจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จาก Oc_2 ถึง Oc_5

นิวคลีโอลัสก็มีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดทั้งใน LM และ TEM โดยมันขยายขนาดและโปร่งแสงขึ้นเรื่อย ๆ จากระยะ Oc_2 ถึง Oc_5 นอกจากนั้นใน TEM เรายังสังเกตเห็นการคลี่ของใยนิวคลีโอลัสที่อยู่ส่วนในสุดออกก่อน ทำให้ส่วนนอกของนิวคลีโอลัสปรากฏเป็นวงแหวนทึบล้อมรอบส่วนในที่ค่อนข้างโปร่งแสงอิเล็กตรอน โดยเริ่มปรากฏขึ้นในเซลล์ขั้น Oc_1 ตอนปลาย นอกจากนั้นในระยะ Oc_3 ถึง Oc_5 ตามขอบ ของนิวคลีโอลัสมักมีเส้นใยโครมาตินบาง ๆ ยื่นตรงออกมาจากขอบ จึงทำให้เราคิดว่า nucleolar activities ในเซลล์ขั้นต่าง ๆ เหล่านี้ก็คงมีเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

การสังเกตด้วย TEM ทำให้สามารถเห็นการเพิ่มของ ribosome ในไซโตปลาสซึม ซึ่งเกาะกันเป็นก้อนหรือผลึก RMM อยู่ในไซโตปลาสซึมรอบ ๆ นิวเคลียสของเซลล์ขั้น Oc_1 และ Oc_2 ผลึกเหล่านี้ค่อย ๆ สลายไปใน Oc_3 และไม่พบใน Oc_{4-5} จึงทำให้เราคาดว่าในระยะ Oc_1 คงมีการสร้างไรโบโซมที่ถูกส่งออกมาจากนิวเคลียสในอัตราสูงมาก จนกระทั่งสะสมเป็นก้อนหรือผลึกอยู่รวมกัน ต่อจากนั้นในเซลล์ Oc ขั้นถัดไปไรโบโซมก็จะค่อย ๆ กระจายออกไปสู่ส่วนอื่นของไซโตปลาสซึม เราจึงเรียกเซลล์ขั้น Oc_1 ว่าเป็น Ribosomal phase

ในระยะ Oc_2 มีจำนวน Golgi complex เพิ่มขึ้นมากมายทั้ง ๆ ที่มี secretory granules ปรากฏอยู่น้อยมาก เราจึงเชื่อว่าหลังจากช่วง ribosomal phase แล้วไซโตปลาสซึมของ Oc_2 เตรียมตัวสร้าง secretory granules โดยการพัฒนา Golgi complex และ RER ขึ้นเป็นจำนวนมากกว่าที่พบในเซลล์ขั้นอื่น ๆ เราจึงเรียกเซลล์ขั้น Oc_2 ว่าเป็น Golgi-RER phase

ในระยะ Oc_3 มี secretory granules เกิดขึ้นและสะสมอยู่ใกล้บริเวณ Golgi complex โดยมีแกรนูล 3 ชนิด สองชนิดแรกมีขนาดเล็กคือ SG_1 มีขนาด 400-450 nm และเนื้อทึบแสงอิเล็กตรอน ชนิดที่สองคือ SG_2 มีขนาด 330-370 nm และเนื้อค่อนข้างโปร่งแสงอิเล็กตรอน ส่วนแกรนูลชนิดที่สามคือ yolk platelets ที่เริ่มปรากฏขึ้นแต่ยังมีจำนวนน้อย ในขณะเดียวกัน lipid droplets ก็มีปริมาณมากขึ้น เราจึงเรียกเซลล์ขั้นนี้ว่า SG-synthetic phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์กำลังสร้างแกรนูลแบบ SG_1 และ SG_2 เป็นหลัก

ในระยะ Oc_4 นอกจากการเปลี่ยนแปลงในนิวเคลียสตามที่กล่าวมาแล้ว ในเซลล์ขั้นนี้มีการสร้าง yolk platelets ขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งอัดอยู่เต็มไซโตปลาสซึมโดยปะปนอยู่กับ lipid droplets SG_1, SG_2 เคลื่อนไปสะสมอยู่ตามขอบของเซลล์ ในเซลล์ขั้นนี้มีการปล่อยสารใน SG_1 ออกไปสู่ด้านนอกของเซลล์โดยกระบวน exocytosis ซึ่งสารดังกล่าวกลายไปเป็นส่วน

ของ vitelline และ jelly coat เราจึงเรียกเซลล์ขั้นนี้ว่า vitelline-jelly coat phase ซึ่งน่าเป็นขั้นที่มีการสร้างสารเคลือบเซลล์ที่กลายเป็น vitelline-jelly coat เป็นหลัก

ในระยะ Oc_5 เป็นระยะ mature phase เนื่องจากมีการเพิ่ม yolk platelets และ lipid droplets เต็มไซโตปลาสซึม อีกทั้งมีการพัฒนา vitelline-jelly coat จนหนาเต็มที่ โดย vitelline-jelly coat ปรากฏเป็น 2 ลักษณะ คือแบบ homogeneous และแบบ fibrous เราพบว่าเมื่อมีการ exocytosis ของสารใน SG, ออกไปสู่ vitelline-jelly coat มากขึ้น ทำให้มันเปลี่ยนสภาพจาก homogeneous เป็น fibrous และเป็นที่น่าสังเกตว่า vitelline และ jelly coat ไม่มีการแยกออกเป็น 2 ชั้นชัดเจนอย่างที่สังเกตเห็นในหอยเป๋าฮื้อ species อื่น ๆ

7.13 การศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของอัณฑะและรังไข่ของหอยในระบบปิดซึ่งเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลในรอบ 1 ปี

จากการสังเกตลักษณะจุลกายวิภาคในช่วงต่าง ๆ ของปี เราพบว่าวงจรสืบพันธุ์ของ gonads แบ่งออกเป็น 5 ช่วงใน 1 รอบปีคือ ช่วง proliferative, premature, mature spawning และ spent โดยช่วง spawning มักเกิดขึ้น 2 ครั้งในหอยตัวเมียคือ ช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน และสิงหาคมถึงตุลาคม ตัวผู้มีช่วง spawning ที่ยาวกว่าถึงแม้ว่าจะเกิดในระหว่างเดือนที่ใกล้เคียงกัน แต่มีตัวผู้บางตัวที่สามารถ spawn ได้เกือบทุกช่วงของปี การค้นพบข้อมูลดังกล่าวทำให้เราทราบว่า สามารถทำการปฏิสนธิระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ได้สองครั้งในรอบปี และอาจจะทำการเพาะเลี้ยงลูกหอยได้สองชุดต่อปี ในการเก็บเซลล์สืบพันธุ์นั้นช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการใช้สารเคมี เช่น egg laying hormones กระตุ้นให้มีการตกไข่และอสุจิได้มากที่สุดน่าจะเป็นช่วง mature phase ซึ่งเกิดก่อนหน้า spawning phase ซึ่งถ้ากระทำเช่นนั้นได้ก็จะสะดวกต่อการเก็บเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเพศมาผสมกันโดยขบวนการ artificial fertilization ซึ่งเราสามารถควบคุมได้ง่ายกว่าการผสมตามธรรมชาติ อีกประการหนึ่งการศึกษาวิจัยและพัฒนาวิธีเก็บเซลล์อสุจิและเซลล์ไข่โดยกระบวนการแช่แข็ง (cryopreservation) ก็น่าจะเป็นอีกแนวหนึ่งที่จะช่วยควบคุมการเก็บเซลล์สืบพันธุ์และการปฏิสนธิได้สะดวกขึ้น ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตลูกหอยให้ตรงกับช่วงความต้องการของเกษตรกรได้ดียิ่งขึ้น

7.14 การศึกษาการกระจายของ FSH-liked, LH-liked Hormones และ Egg Laying Hormones (ELH) ในรังไข่และอัณฑะของหอยเป๋าฮื้อ

ถึงแม้ว่าจะไม่ได้กำหนดไว้ในแผนการวิจัย แต่เราก็ได้ทำการศึกษาการกระจายของฮอร์โมนดังกล่าวในเนื้อเยื่อของอัณฑะและรังไข่ โดยการตั้งสมมุติฐานว่า น่าจะมีฮอร์โมนที่ควบคุมการพัฒนาและการปล่อยเซลล์ไข่กับเซลล์อสุจิอยู่ในเนื้อเยื่อของ gonads โดยฮอร์โมน

เหล่านี้อาจจะถูกส่งมาจากปมประสาทต่าง ๆ แล้วไปเกาะในเนื้อเยื่อของ gonads หรือ gonads เองอาจจะมีกลุ่มเซลล์ที่สร้างฮอร์โมนเหล่านี้ก็ได้

การทดลองในเบื้องต้นพบว่า มีการกระจายของ LH-liked hormones ในรังไข่ในปริมาณค่อนข้างสูง โดยพบว่ามีฮอร์โมนชนิดนี้อยู่ใน oocytes ขั้นต่าง ๆ โดยเฉพาะ oocytes ขั้นต้น ๆ เช่น Oc_2, Oc_3 และในแกนของ trabeculae ส่วนหลักฐานของการมี FSH-liked hormones ไม่ค่อยหนักแน่น เนื่องจากมีการติดสีค่อนข้างจางทั้งในเซลล์สืบพันธุ์และในแกน trabeculae ในทางตรงกันข้ามพบว่าแอนติบอดีต่อ ELH (ที่ได้รับจากการบริจาคโดย Professor Peter Hanna แห่งมหาวิทยาลัย Deakin ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งเป็นที่ปรึกษาของโครงการ) ติดเซลล์ใน trabeculae และ capsule ของรังไข่เข้มมาก จึงแสดงว่ามี ELH กระจายอยู่ในแผ่น trabeculae และ capsule ในปริมาณที่สูง และมีความเป็นไปได้มากที่จะค้นพบเซลล์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งใน trabeculae ซึ่งเป็นตัวสร้างฮอร์โมนชนิดนี้ จากการศึกษาระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนในเบื้องต้น เราคาดว่าน่าจะเป็นกลุ่ม granulated cells ที่เกาะอยู่เป็นกระจุก ๆ ในส่วนกลางของ trabeculae นอกจากนั้นแล้วอาจจะตั้งคำถามต่อไปว่าฮอร์โมน LH กับ ELH เหมือนกันหรือไม่ เนื่องจากฮอร์โมนทั้งสองชนิดควบคุมการตกไข่ในสัตว์ซึ่งถึงแม้จะอยู่ใน phylum ต่างกันก็ตาม ฮอร์โมนทั้งสองชนิดก็มีบทบาทในการกระตุ้นการพัฒนาของไข่กับการปล่อยเซลล์ไข่ที่พัฒนาเต็มที่แล้วออกจากรังไข่เช่นเดียวกัน คำถามเหล่านี้ล้วนแต่เป็นประเด็นที่น่าสนใจ ซึ่งน่าจะได้รับการศึกษาต่อไป

7.15 การพัฒนาของระบบประสาท

การศึกษาการพัฒนาของปมประสาทในหอยอายุต่าง ๆ กัน พบว่าการพัฒนาของปมประสาท cerebral มีจุดเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนเมื่อหอยมีอายุได้ 5 เดือน โดยปรากฏว่ามีจำนวน NS เซลล์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และเริ่มมีการผลิตแกรนูลที่แสดงออกโดยการติดสี CA และ PF จำนวน NR_1 ก็เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนด้วย จุดเปลี่ยนแปลงจุดที่ 2 คือเมื่อหอยมีอายุได้ 10 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ NS และ NR_1 เพิ่มจำนวนขึ้นมากอีกครั้ง และขนาดของปมประสาทเกือบเท่ากับที่พบในหอยตัวเต็มวัย

ในปมประสาท pleuropedal และ visceral ก็มีช่วงเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกับปมประสาท cerebral คือเมื่อหอยมีอายุได้ 4 เดือน และ 11 เดือน ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าการพัฒนาของระบบประสาทแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ ระยะ juvenile ระหว่าง 1-5 เดือน ซึ่งเป็นช่วงที่ไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ NS และ NR_1 มาก ทั้ง ๆ ที่มหกายวิภาคของระบบประสาทได้พัฒนาเกือบเต็มที่แล้ว และระยะ premature จาก 5-11 เดือน ซึ่งเป็นช่วงที่ระบบ

8 หนังสืออ้างอิง

Amor, M.J. and Durfort, M. (1990) Changes in nuclear structure during eupyrene spermatogenesis in *Murex brandaris*. *Mol Reprod Dev*, **25**: 348-356.

Baccetti, B. (1979) The spermatozoon. In: Fawcett, D.W. and Bedford, J.M. (eds.), Urban-Schwarzenberg: Baltimore, pp.305-329.

Beesley, P.L., Ross, G.J.B. and Wells, A. (1998). Phylum Mollusca. In: Mollusca the southern synthesis, part A. Beesley, P.L., Ross, G.J.B. and Wells, A. (eds.), CSIRO Publishing: Victoria, pp.1-144.

Bozzo, M.G., Ribes, E., Sagrista, E., Poquet, M. and Durfort, M. (1993) Fine structure of the spermatozoa of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Mol Reprod Dev*, **34**: 206-211.

Cacas, M.T. and Subirana, J.A. (1994) Chromatin condensation and acrosome development during spermiogenesis of *Ensis ensis* (Mollusca, Bivalve). *Mol Reprod Dev*, **37**: 223-228.

Caceres, C., Ribes, E., Muller, S., Comudella, L. and Chiva, M. (1994) Characterization of chromatin-condensing proteins during spermiogenesis in a neogastropoda mollusc (*Murex brandaris*). *Mol Reprod Dev*, **38**: 440-452.

Childs, G.V. (1983) The application of the avidin-biotin peroxidase complex technique to the localization of anterior pituitary hormones on plastic sections and cell monolayers. In: Techniques in Immuno-cytochemistry, Vol 2, Bullock, G.R. and Petrusz, P. (eds.), Academic Press: New York, pp.85-102.

Cox, K.W. (1962) Review of the abalones of California. *Calif. Fish Game*, **46**: 381-406.

Croft, DR (1929) Haliotis. L.M.B.C. mem: Liverpool University Press, 174p.

Dufresne-Dube, L., Picheral, B. and Guerrier, P. (1983) An ultrastructure analysis of *Dentalium vulgare* (Mollusca, Scaphopoda) gametes with special reference to early events at fertilization. *J Ultrastruc Res*. **83**: 242-257.

Fallu, R. (1991) Abalone Farming, Fishing News Books: Blackwell Scientific, 195p.

Gallardo, C.S. and Garrido, O A. (1989) Spermiogenesis and sperm morphology in the marine gastropod *Nucella crassilabrum* with an account of morphometric patterns of spermatozoa variation in the family Muricidae. *Invert Reprod Dev*, **15**: 163-170.

Hahn, K.O. (1989) Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods, In: Hahn, K.O. (ed.), CRC Press: Florida, 348p.

Healy, J.M. (1987) Spermatozoan ultrastructure and its bearing on gastropod classification and evolution. *Aust Zool*, **24**: 108-113.

Healy, J.M. (1988) Sperm morphology and its systemic importance in the gastropoda. *Malacol Rev [Suppl]*, **4**: 251-266.

Healy, J.M. (1989) Ultrastructure of spermiogenesis in the gastropod *Calliotropis glyptus* Watson (Prosobranchia: Trochidae) with special reference to the embedded acrosome. *Gamete Res*, **24**: 9-19.

Hodgson, A.N., Heller, J. and Bernard, R.T.F. (1990) Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis in five South African species of the *trochid* genus *oxystele* (Mollusca, Prosobranchia). *Mol Reprod Dev*. 25: 263-271.

Ino, T. (1980) Abalones and their industry in Japan. In: Fisheries in Japan, Abalone and Oyster, Ino, T. (ed.), Japan Marine Products Photo Materials Association: Tokyo, 165p.

Jaramillo, R., Garrido, O. and Jorquera, B. (1986) Ultrastructural analysis of spermiogenesis and sperm morphology in *Chorus giganteus* (Lesson, 1829) (Prosobranchia: Muricidae). *The Veliger*, **29**: 217-225.

Jarayabhand, P., Jew, N., Manasveta, P. and Choonhabandit, S. (1994) Gametogenic cycle of abalone *Haliotis ovina* Gmelin 1791 at Khangkao Island, Chon-buri Province. *Thai J Aqua Sci*, **1**: 34-42.

Johnson, M.J., Casse, N. and Le Pennec, M. (1996) Spermatogenesis in the endosymbionet-bearing bivalve *Loripes lucinalis* (Veneroida: Lucinidae). *Mol Reprod Dev*, **45**: 476-484.

Jonas, E.A., Knox, R.J., Kaczmarek, L.K., Schwartz, J.H. and Solomon, D.H. (1996) Insulin receptor in Aplysia neurons: characterization, molecular cloning, and modulation of ion currents. *J Neurosci*, **16**: 1645-1658.

Joose, J. (1988) The hormones of molluscs. In: Endocrinology of Selected Invertebrate Types, Laufer, H. and Downer, R.G.H. (eds.), A.R. Liss: New York, pp.89-140.

Joshi, H.C. (1993) Immunogold electron microscopy: Mapping tubulin isotypes on neurite microtubules. In: Methods in Cell Biology, Asai, D.J. (ed.), Academic Press: New York, pp.260-280.

Kakhai, N. and Petjamrat, K. (1992) Survey on species and broodstock collection of abalone (*Haliotis* spp.) in Chonburi, Rayong and Trad provinces. Technical Paper No. 6/1992, Rayong Coastal Agriculture and Cooperatives, Thailand. 31p.

Kay, E.A., Wells, F.E. and Ponder, W.F. (1998) Class Gastropoda. In: Mollusca the southern synthesis, part B, Beesley, P.L., Ross, G.J.B. and Wells, A. (eds.), CSIRO Publishing: Victoria, pp.565-604.

Kiss, J.Z. and McDonald, K. (1993) Electron microscopic immunocytochemistry following cryofixation and freeze substitution. In: Methods in Cell Biology, Asai, D.J. (ed.), Academic Press: New York, pp.312-337.

Legocki, R.P. and Verma, D.D.S. (1981) Multiple immunoreplica technique. Screening for specific proteins with a series of different antibodies using one polyacrylamide gel. *Anal Biochem*, **111**: 385-392.

Lewis, C.A., Leighton, D.L. and Vacquier, V.D. (1980) Morphology of abalone spermatozoa before and after the acrosome reaction. *J Ultrastruc Res*, **72**: 39-46.

Mahon, A.C., Nambu, J. R., Taussig, R., Shyamala, M., Roach, A. and Scheller, R.H. (1985) Structure and expression of the egg-laying hormone gene family in *Aplysia*. *J Neurosci*, **5**: 1872-1880.

Mathieu, M., Robbins, I. and Lubet, P. (1991) The neuroendocrinology of *Mytilus edulis*. *Aquaculture*, **94**: 213-223.

Morse, D.E. (1984) Biochemical and genetic engineering for improved production of abalones and other valuable molluscs. *Aquaculture*, **39**: 263-282.

Nateewathana, A. and Hylleberge, J. (1986) A survey on Thai abalone around Phuket Island and feasibility study of abalone culture in Thailand. *Thai Fish Gazette*, **39**: 177-190.

Nateewathana, A. and Bussarawit, S. (1988) Abundance and distribution of abalones along the Andaman sea coast of Thailand. *Kasetsart J (Nat Sci)*, **22**: 8-15.

Paynter, K.T. and Chen, T.T. (1991) Biological activities of biosynthetic rainbow trout growth hormone in eastern oyster, *Crassostrea virginica. Biol Bull*, **181**: 459-462.

Roovers, E., Vincent, M.E., van Kesteren, E., Geraerts, W.P., Planta, R.J., Vreugdenhil, E. and van Heerikhuizen, H. (1995) Characterization of a putative molluscan insulin-related peptide receptor. *Gene*, **162**: 181-188.

Shepherd, S.A. and Steinberg, P.D. (1992) Food preferences of three Australian abalone species with a review of the algal food of abalone. In: Abalone of the World, Biology, Fisheries and Cultures, Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzman del Proo, S.A., (eds.), Fishing News Books: Blackwell Scientific, pp.169-181.

Shiroya, Y., Hosoya, H., Mabuchi, I. and Sakai, Y.T. (1986) Actin filament bundle in the acrosome of abalone spermatozoa. *J Exp Zoo*, **239**: 105-115.

Shyamala, M., Nambu, J.R. and Scheller, R.H. (1986) Expression of the egg-laying hormone gene family in the head ganglia of *Aplysia*. *Brain Res*, **371**: 49-57.

Singhagraiwan, T. (1989) The experiment on breeding and nursing of donkey's ear abalone (*Haliotis asinina* Linne). EMDEC Technical Paper No. 21, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. 26p.

Singhagraiwan, T. and Sasaki, M. (1991) Breeding and early development of the donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linne. *Thai Mar Fish Res Bull*, **2**: 83-94.

Smit, A.B., Spijker, S., Van Minnen, J., Burke, J.F., De Winter, F., Van Elk, R. and Geraerts, W.P. (1996) Expression and characterization of molluscan insulin-related peptide VII from the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Neurosci*, **70**: 589-596.

Sretarugsa, P., Ngowsiri, U., Kruatrachue, M., Sobhon, P., Chavadej, J. and Upatham, E.S. (1991) Spermiogenesis in *Achatina fulica* as revealed by electron microscopy. *J Med Appl Malacol*, 3: 7-18.

Tilney, L.G., Fukui, Y. and DeRosier, D.J. (1987) Movement of the actin filament bundle in *Mytilus* sperm: a new mechanism is proposed. *J Cell Bio*, 104: 981-993.

Tookwinas, S., Leknim, W., Donyadol, Y., Preeda-Lampabutra, Y. and Perngmak, P. (1986) Survey on species and distribution of abalone (*Haliotis* spp.) in Surajthani, Nakornsri-thammaraj and Songkhla provinces. Technical Paper No.1/1986, National Institute of Coastal Aquaculture, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. 16p.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Nat Acad Sci U.S.A*, 76: 4350-4354.

Uki, N. (1989) Abalone seedling production and its theory. *Int J Aq Fish Technol*, 1: 3-15.

van Minnen, J., Dirks, R.W., Vreugdenhil, E. and van Diepen, J. (1989) Expression of the egg-laying hormone genes in peripheral neurons and exocrine cells in the reproductive tract of the mollusc *Lymnaea stagnalis*. *Neuroscience*, 33: 35-46.

Vreugdenhil, E., Jackson, J.F., Bouwmeester, T., Smit, A.B., van Minnen, J., van Heerikhuizen, H., Klootwijk, J. and Joosse, J. (1988) Isolation, characterization, and evolutionary aspects of a cDNA clone encoding multiple neuropeptides involved in the stereotyped egg-laying behavior of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *J Neurosci*, 8: 4184-4191.

Yahata, T. (1973) Induced spawning of abalone (*Haliotis discus* Reeve) injected with ganglional suspensions. *Bull Japanese Soc Sci Fish*, 39: 1117-1122.

9 ผลลัพธ์

9.1 การเผยแพร่ผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการระดับประเทศและนานาชาติ

ระดับประเทศ

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

9.1.1 Thongkukiatkul, A., **Sobhon**, P., Apisawetakan, S., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. and Pumthong, T. Identification and classification of neurosecretory cells, neurons and neuroglia in cerebral and pleuropedal ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 20-22 October 1997, Chiang Mai. pp.434-435.

9.1.2 Apisawetakan, S., **Sobhon**, P., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. and Nugranad, J. The gametogenic processes in a Thai abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 20-22 October 1997, Chiang Mai. pp.436-437.

9.1.3 Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. and **Sobhon**, P. Reproductive cycle and development of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at 24th Congress on Science and Technology of Thailand, 19-20 October 1998, Bangkok. pp.682-683.

ระดับนานาชาติ

Mollusc's 97

9.1.4 Thongkukiatkul, A., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., **Sobhon**, P. and Chitramvong, Y.P. Histological studies of neurons in cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Mollusc's 97 Symposium on the Molluscs of the Indo-West Pacific and Australian Region, 1-4 February 1997, Rottnest Island, Western Australia. pp.43.

9.1.5 Apisawetakan, S., Sobhon, P., Upatham, E.S., Kruatrachue, M. and Chitramvong, Y.P. Oogenesis in *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Mollusc's 97 Symposium on the Molluscs of the Indo-West Pacific and Australian Region, 1-4 February 1997, Rottnest Island, Western Australia. pp.45.

Third International Abalone Symposium

9.1.6 Thongkukiatkul, A., **Sobhon**, P., Upatham, E.S., **Kruatrachue, M.**, Wanichanon, C. and Sahavacharin, S. Classification and distribution of various neuronal cells in cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at 3rd International Abalone Symposium, 26-31 October 1997, Monterey, California, USA. pp.90.

The 5th Asian Fisheries Forum

9.1.7 **Sobhon**, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M. and Upatham, E.S. Gametogenesis, reproductive cycle and development of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at The 5th Asian Fisheries Forum International Conference on Fisheries and Food Security Beyond the Year 2000, 11-14 November 1998, Chiang Mai. pp.6.

9.1.8 Linthong, V., **Sobhon**, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M. and Upatham, E.S. Ultrastructure of male germ cells in the testis of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at The 5th Asian Fisheries Forum International Conference on Fisheries and Food Security Beyond the Year 2000, 11-14 November 1998, Chiang Mai. pp.21.

Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology

9.1.9 Thongkukiatkul, A., Upatham, E.S., **Sobhon**, P., Wanichanon, C., Kruatrachue, M. and Pumthong, T. Histological studies of pleuro-pedal ganglion, visceral ganglion and pedal cord ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus (Gastropoda: Haliotidae). Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.29.

9.1.10 **Sobhon**, P., Apisawetakan, S., Linthong, V., Wanichanon, C., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Chanpoo, M. and Jarayabhand, P. Ultrastructure of gamete cells in the ovary of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.34.

9.1.11 Kruatrachue, M., Apisawetakan, S., Upatham, E.S., **Sobhon**, P., Singhakaew, S., Sawatpreera, S., Ingsrisawang, V. and Singhagriwan, T. Reproductive cycle and development of gonads in the Thai abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.35.

9.1.12 Kruatrachue, M., Thongkukiatkul, A., **Sobhon, P.**, Upatham, E.S., Wanichanon, C. and Linthong, V. Ultrastructural study of the cerebral ganglion of Thai abalone *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.48.

9.1.13 Upatham, E.S., Thongkukiatkul, A., Chitramvong, Y.P., **Sobhon**, P., Linthong, V., Kruatrachue, M., Wanichanon, C. and Nugranad, J. The fine structure of cells in the pleuropedal ganglion of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.51.

9.1.14 **Sobhon**, P., Thongkukiatkul, A., Laimek, P., Anupunpisith, V., Upatham, E.S., Kruatrachue, M. and Wanichanon, C. Cross reactions to human GH, insulin, FSH and LH in neurosecretory cells of the cerebral, pleuro-pedal and visceral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.52.

9.1.15 Apisawetakan, S., **Sobhon**, P., Wanichanon, C., Linthong, V., Upatham, E.S., Kruatrachue, M. and Jarayabhand, P. Ultrastructure of spermatozoa in the testis of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.60.

9.1.16 **Sobhon**, P., Apisawetakan, S., Linthong, V., Wanichanon, C., Sretarugsa, P., Chavadej, J. and Upatham, E.S. Condensation of chromatin in male germ cells of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.61.

9.2 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

9.2.1 Apisawetakan, S., Thongkukiatkul, A., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pumthong, T. and **Sobhon**, P. (1997) The gamatogenic processes in a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Sci Soc Thailand*, **23**: 225-240.

9.2.2 Upatham, E.S., Thongkukiatkul, A., Kruatrachue, M., Wanichanon, C., Chitramvong, Y.P., Sahavacharin, S., and **Sobhon**, P. (1998) Classification of neurosecretory cells, neurons and neuroglia in the cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus by light microscopy. *J Shellfish Res*, (in press).

9.2.3 Thongkukiatkul, A., Upatham, E.S., **Sobhon**, P., Kruatrachue, M., Wanichanon, C., Pumthong, T. and Nugranad, J. (1999) Histological studies of the pleuro-pedal, visceral and pedal cord ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Med Appl Malacol*, (in press).

9.2.4 **Sobhon**, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. and Pumthong, T. (1999) Classification of germ cells, reproductive cycle and maturation of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Sci Soc Thailand*, (in press).

9.2.5 Kruatrachue, M., Apisawetakan, S., Upatham, E.S., **Sobhon**, P., Sawatpreera, S., Singhakaew, S., Ingsrisawang, V., Singhagriwan, T. (1999) The reproductive cycle and development of the gonad in the Thai abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Med Appl Malacol*, (in press).

9.2.6 Kruatrachue, M., Thongkukiatkul, A., **Sobhon**, P., Uphatham, E.S., Wanichanon, C., Sretarugsa, P. and Linthong, V. (1999) The ultrastructure of neurons and neuroglia in the cerebral and pleuro-pedal ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Sci Soc Thailand*, (in press).

9.2.7 Apisawetakan, S., **Sobhon**, P., Wanichanon, C., Linthong, V., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Jarayabhand, P. and Pumthong, T. (1999) Ultrastructure of spermatozoa in the testis of *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Med Appl Malacol*, (in press).

9.3 วิทยานิพนธ์ของนักศึกษาปริญญาโทและเอก

9.3.1 นางสาวอัมพร ทองกู้เกียรติกุล, Ph.D. Thesis, บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล (ปี 2541)

Thesis title: Study on structure and function of nervous system and nerve ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus.

9.3.2 นางสาวสมใจ อภิเศวตกานต์, M.Sc Thesis, บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล (ปี 2541)

Thesis title: The gametogenic processes of a Thai abalone *Haliotis asinina* Linnaeus

9.3.3 นางสาวประภาพร ลายเมฆ, M.Sc Thesis, บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล (ปี 2542)

Thesis title: Development of the nervous system and sensory appendages in *Haliotis asinina* Linnaeus

9.3.4 นางมาลี จันทร์ภู่, M.Sc Thesis, บัณฑิตวิทยาลัย ม.มหิดล (ปี 2542)

Thesis title: Development of the reproductive system and localization of LH-like hormone and egg laying hormone (ELH) in the gonads of *Haliotis asinina* Linnaeus

9.4 เครือข่ายงานวิจัยที่ได้พัฒนาขึ้น

โครงการวิจัยนี้ได้มีร่วมงานวิจัยในสถานภาพต่าง ๆ ซึ่งรวมกันแล้วทำให้สามารถสร้างเครือข่ายงานวิจัยด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ (Reproductive Biology) ของหอยเป๋าฮื้อจากหน่วยงานต่าง ๆ คือ

9.4.1 ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

รศ.ดร. ชัยทิพย์ วนิชานนท์

9.4.2 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

ศ.ดร. สุชาติ อุปถัมภ์

ศ.ดร. มาลียา เครือตราชู

รศ.ดร. เยาวลักษณ์ จิตรามวงค์

9.4.3 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รศ.ดร. เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์

9.4.4 ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ม.ศรีนครินทรวิโรฒ

ผศ.ดร. วิภาวี อนุพันธ์พิศิฐ

9.4.5 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา

อ.ดร. อัมพร ทองกู้เกียรติกุล

9.4.6 ศูนย์พัฒนาประมงชายฝั่งทะเลตะวันตก จ.ประจวบคีรีขันธ์ กรมประมง

นาย ธเนศ พุ่มทอง

นางสาว จินตนา นักระนาด

- 9.4.7 Deakin University, Geelong, Victoria, Australia

Associate Professor Dr. Peter Hanna

School of Biological and Chemical Sciences

Faculty of Science and Technology

Deakin University

10 ภาคผนวก

10.1 การเผยแพร่ผลงานวิจัยในที่ประชุมวิชาการระดับประเทศและนานาชาติ ระดับประเทศ

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

10.1.1 Thongkukiatkul, A., **Sobhon**, P., Apisawetakan, S., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. and Pumthong, T. Identification and classification of neurosecretory cells, neurons and neuroglia in cerebral and pleuropedal ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 20-22 October 1997, Chiang Mai. pp.434-435.

10.1.2 Apisawetakan, S., **Sobhon**, P., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. and Nugranad, J. The gametogenic processes in a Thai abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at 23rd Congress on Science and Technology of Thailand, 20-22 October 1997, Chiang Mai. pp.436-437.

10.1.3 Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. and **Sobhon**, P. Reproductive cycle and development of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at 24th Congress on Science and Technology of Thailand, 19-20 October 1998, Bangkok. pp.682-683.

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 23

20-22 ตุลาคม 2540

ณ โรงแรมโลตัส ปางสวนแก้ว

เชียงใหม่

กำหนดการและบทคัดย่อ
PROGRAMME AND ABSTRACTS

ISBN 974-7576-80-5

23rd Congress on Science and Technology of Thailand

20-22 October 1997

at The Lotus Hotel Pang Suan Kaew

Chiang Mai

STT - The Best Domestic Convention Award 1993

เอกสารหมายเลข 10.1.1

ชื่อ-สกุล ผู้อธิบายงานวิจัย อัมพร ทองกู้เกียรติกูล

☐นาย ■น.ส. ☐นาง ☐ดร. ☐อ. ☐ผศ. ☐รศ. ☐ศ.

ที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โทร. 038-390060

สาขาวิชา:
☐กายภาพ ☐เกษตร
■ชีวภาพ ☐วิศวะ-เทคโน
☐วิทย์-ศึกษา ☐ทรัพย์-แวดล้อม
☐แพทย์ ☐ทั่วไป

IDENTIFICATION AND CLASSIFICATION OF NEUROSECRETORY CELLS, NEURONS, AND NEUROGLIA IN CEREBRAL AND PLEURO-PEDAL GANGLIA OF *Haliotis asinina* LINNEAUS.

A. Thongkukiatkul, P. Sobhon, S. Apisawetakan, C. Wanichanon, V. Linthong, M. Kruatrachue , E.S. Upatham and T. Poomtong.*
Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400 and Coastal Aquaculture Development Center, Prachuabkirikan 77000.*

Various types of cells in cerebral and pleuro-pedal ganglia of *Haliotis asinina* Linneaus were identified and classified by light microscopy using special stainings. There are 3 groups of cells : neurosecretory cells (NS), neurons (NR) and neuroglia (NG). NS cells consists of 3 types, ie, NS_1 with round or oval cell soma and nucleus (about 20 µm and 10 µm, respectively). The nucleus contain mostly euchromatin and prominent nucleolus, with only a thin rim of heterochromatin along nuclear envelope. NS_2 is about 12 µm in size. Its heterochromatin increases and turns into blocks that are distributed in a clock-face pattern. NS_3 is the smallest NS with cell and nuclear diameters about 10 µm and 6 µm. Its increasing heterochromatin assumes a lace-like appearance. The cytoplasm of all NS are intensely stained with special stainings : hematoxylin-eosin, chrome hematoxylin-phloxine, paraldehyde-fuschin. While $NS_1$and NS_2 are numerous in the cortex of the two ganglia, NS_3 could be observed only in pleuro-pedal ganglion. Neurons consists of 3 types of cells which are distributed mainly in the cortex layer of the ganglia. NR_1 is the giant neuron about 40 µm in size. They are more numerous and larger in pleuro-pedal ganglia. NR_2, NR_3, NR_4 are round to oval-shaped cell with much smaller sizes, ranging from 6 µm to 3 µm. Their nuclei contain increasing amount of heterochromatin and appear completely dense in NR_3. NR_4 could only be observed in pleuro-pedal ganglia. Neuroglia consists of 3 types of cells : NG_1, NG_2 and NG_3 which are spindle-shaped cells with nuclei about 3-6 µm. Their heterochromatin ranges from fairly dense in NG_1 to dense in NG_3. NG_1 and NG_2 could provide parts of blood-brain barrier and general support for NS and NR in the cortex ; while NG_3 which is the smallest and completely dense cells, are confined to the neuropil of medulla region of the ganglia.

This study was supported by the Thailand Research Fund (Contract no. BRG/04/2540)

การจำแนกชนิดของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน เซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทพี่เลี้ยงในปมประสาท cerebral และ pleuro-pedal ของหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina*, Linneaus.

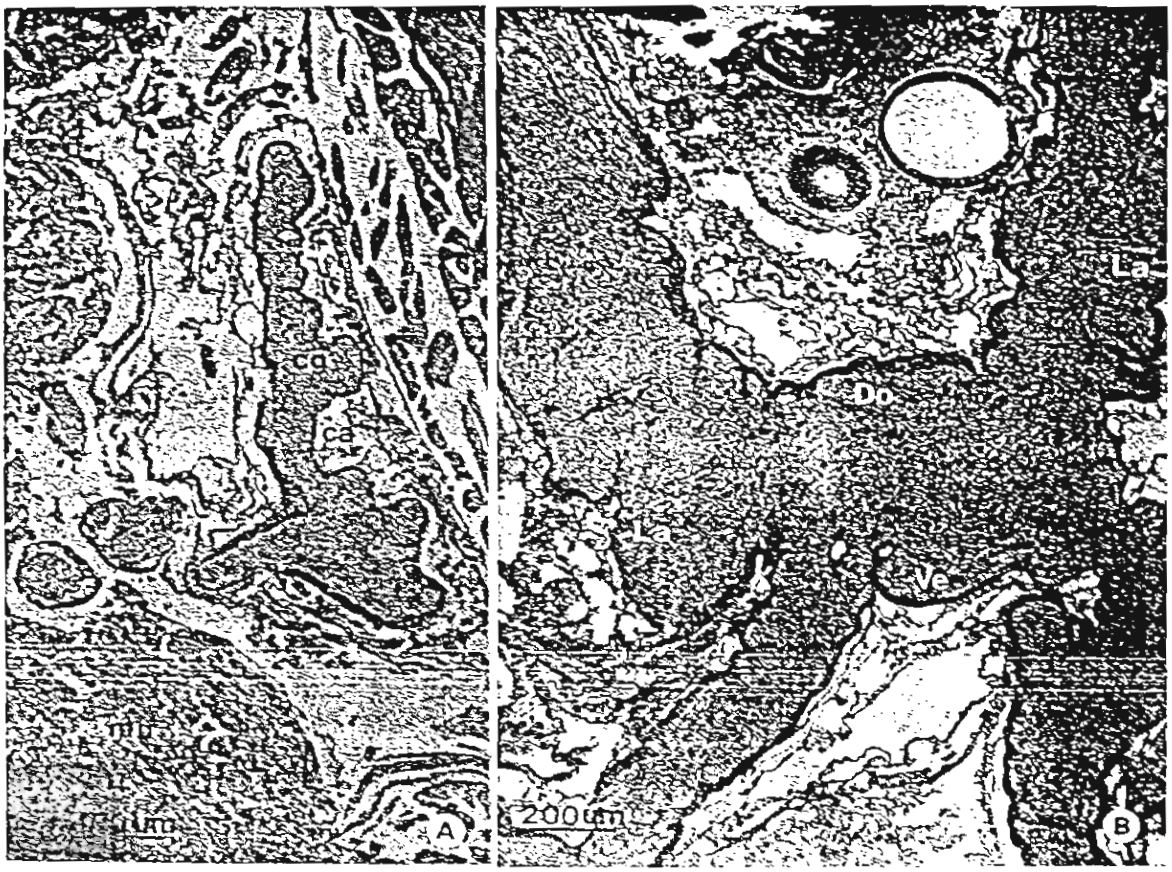
อัมพร ทองกู้เกียรติกูล ประเสริฐ โสภณ สมใจ อภิเศวตกานต์ ชัชทิพย์ วนิชานนท์ วิชัย ลิ้นทอง มาลิยา เครือตราชู สุชาติ อุปถัมภ์ และ สเนห์ พุ่มทอง*
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพมหานคร 10400 และศูนย์ประมงชายฝั่ง จ.ประจวบคีรีขันธ์ 77000*

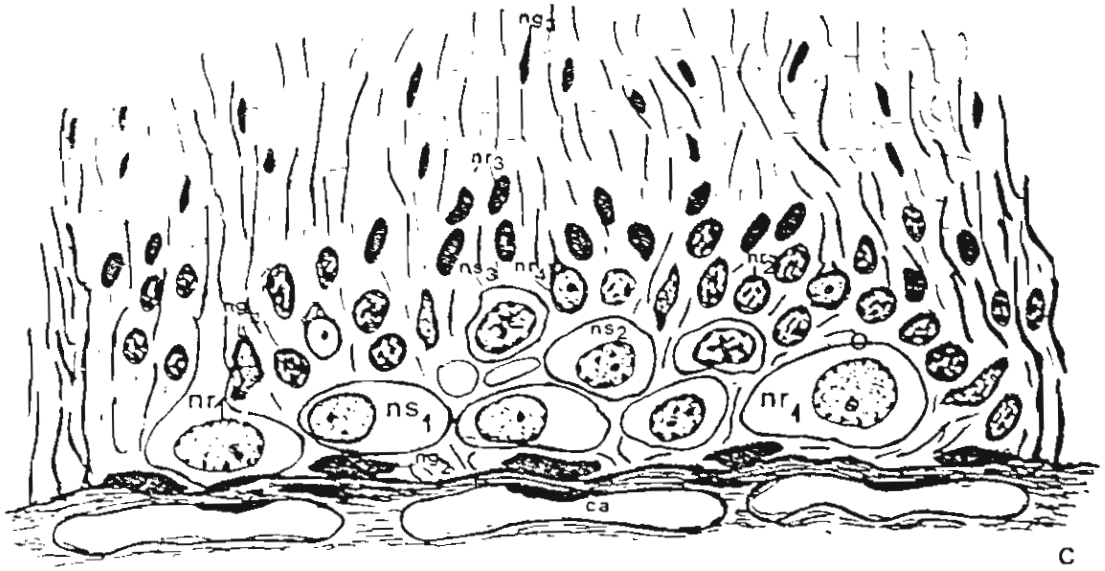
เซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน (Neurosecretory cell - NS) เซลล์ประสาท (Neurons - NR) และเซลล์ประสาทพี่เลี้ยง (Neuroglia - NG_1) เป็นเซลล์หลักของชั้น cortex ของปมประสาท cerebral และ pleuro pedal. จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาโดยการย้อมสีพิเศษ เราสามารถแยกเซลล์ NS ออกได้เป็น 3 ชนิด เซลล์ NR 4 ชนิด และ NG 3 ชนิด ตามขนาดของเซลล์ ลักษณะการจัดตัวของไฮโครมาตินในนิวเคลียสและการติดสีของไซโตปลาสซึม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สัญญาเลขที่ BRG/04/2540)

INDEX KEY WORDS: Abalone, Nerve ganglia, Neurosecretory Cells, Neuron, Neuroglia, Histology

รื่องเรื่อง (ไทย) การจำแนกชนิดของเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน เซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทพี่เลี้ยงในปมประสาท cerebral และ pleuro-pedal ของหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina*, Linneaus.





รูป A ภาพตัดขวางของปมประสาท cerebral ที่ระดับที่แสดงในภาพที่ 1 cg - cerebral ganglia ms - muscles ca - หลอดเลือด

รูป B ภาพตัดตามยาวของปมประสาท pleuro-pedal ที่ระดับที่ระบุ Gemon แสดงระบบของ La ระบบ Do และระบบล่าง Ve ชั้น cortex ที่ระบบรอบนอกจะหนากว่า cortex ที่ระบบล่าง

รูป C ภาพขยายของชั้น cortex และ medulla ของปมประสาท cerebral และ pleuro-pedal แสดงเซลล์ประสาทผลิตฮอร์โมน 3 ชนิด คือ ns_1, ns_2, ns_3 เซลล์ประสาท 4 ชนิด คือ nr_1, nr_2, nr_3, nr_4 กับเซลล์ neuroglia 3 ชนิด คือ ng_1, ng_2, ng_3

B-021

ชื่อ-สกุล ผู้อธิบายงานวิจัย สมใจ อภิเศวตกานต์

☐นาย ■น.ส. ☐นาง ☐ดร. ☐อ. ☐ผศ. ☐รศ. ☐ศ.

ที่ทำงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
โทร. 2460063 ต่อ 2202

สาขาวิชา:
☐กายภาพ ☐เกษตร
■ชีวภาพ ☐วิศวะ-เทคโน
☐วิทย์-ศึกษา ☐ทรัพย์-แวดล้อม
☐แพทย์ ☐ทั่วไป

THE GAMETOGENIC PROCESSES IN A THAI ABALONE, *Haliotis asinina* LINNAEUS.

S. Apisawetakan, P. Sobhon, A. Thongkukiatkul, C. Wanichanon, V. Linthong, M. Kruatrachue, E.S. Upatham and J. Nugranad*
Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400. Thailand, and Coastal Aquaculture Development Center, Prachuabkirikan 77000.*

The gonad histology and gametogenic processes of a species of Thai abalones, *Haliotis asinina*, were studied by light microscopy using special stainings. The outer gonadal wall is similar in both sexes, and consists of fibro-muscular tissue forming a capsule-like structure. This capsule forms connective tissue trabeculae that partition the gonads into compartments, where gonial and early germ cells are attached to each trabeula to form oogenetic or spermatogenic unit. Within the connectives of trabeculae are vessels that contain haemolymph. Cells in oogenetic process could be classified into six stages according to their histological characteristics: oogonium, and five stages of oocytes, ie, with light basophilia (I), with intense basophilia and oil droplets (II), with primary yolk granules (III), with secondary yolk granules and thin jelly coat (IV), and mature ovum with 2 types of yolk granules and fully formed jelly coat (V). The cells in spermatogenetic process could be classified into thirteen stages : spermatogonium, five stages of primary spermatocytes, secondary spermatocyte, four stages of spermatids and two stages of spermatozoa.

The gonads exhibit five phases of histological patterns, depending on the seasons of the year .These phases are proliferative, premature, mature, spawning and spent phases. Gonads in proliferative and premature phases contain primarily gonial cells, spermatocytes or early stage oocytes (I, II, III), while mature and spawning phases contain primarily late stages germ cells, ie., spermatids and spermatozoa in the testis, and stages IV and V oocytes in the ovary. The spent period is characterized by a complete discharge of mature cells and the break down of connective tissue stroma, with remaining gonial cells still attached to connective tissue on the capsular part of the gonadal compartment. The spawning and spent period occur around August to September, while it takes from October to June for the gonads to regenerate their connective tissue stroma and germ cells population, and finally become repleted with mature cells again.

This study was supported by the Thailand Research Fund (Contract no. BRG/04/2540)

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina* Linneaus

สมใจ อภิเศวตกานต์ ประเสริฐ โสภณ อัมพร ทองกู่เกียรติกูล ชัยทิพย์ วนิชานนท์ วิชัย ลิ้นทอง มาลียา เครือคราฐ สุชาติ อุปถัมภ์ และ จินตนา นักระนาด*
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพมหานคร 10400 และศูนย์ประมงชายฝั่ง จ.ประจวบคีรีขันธ์ 77000*

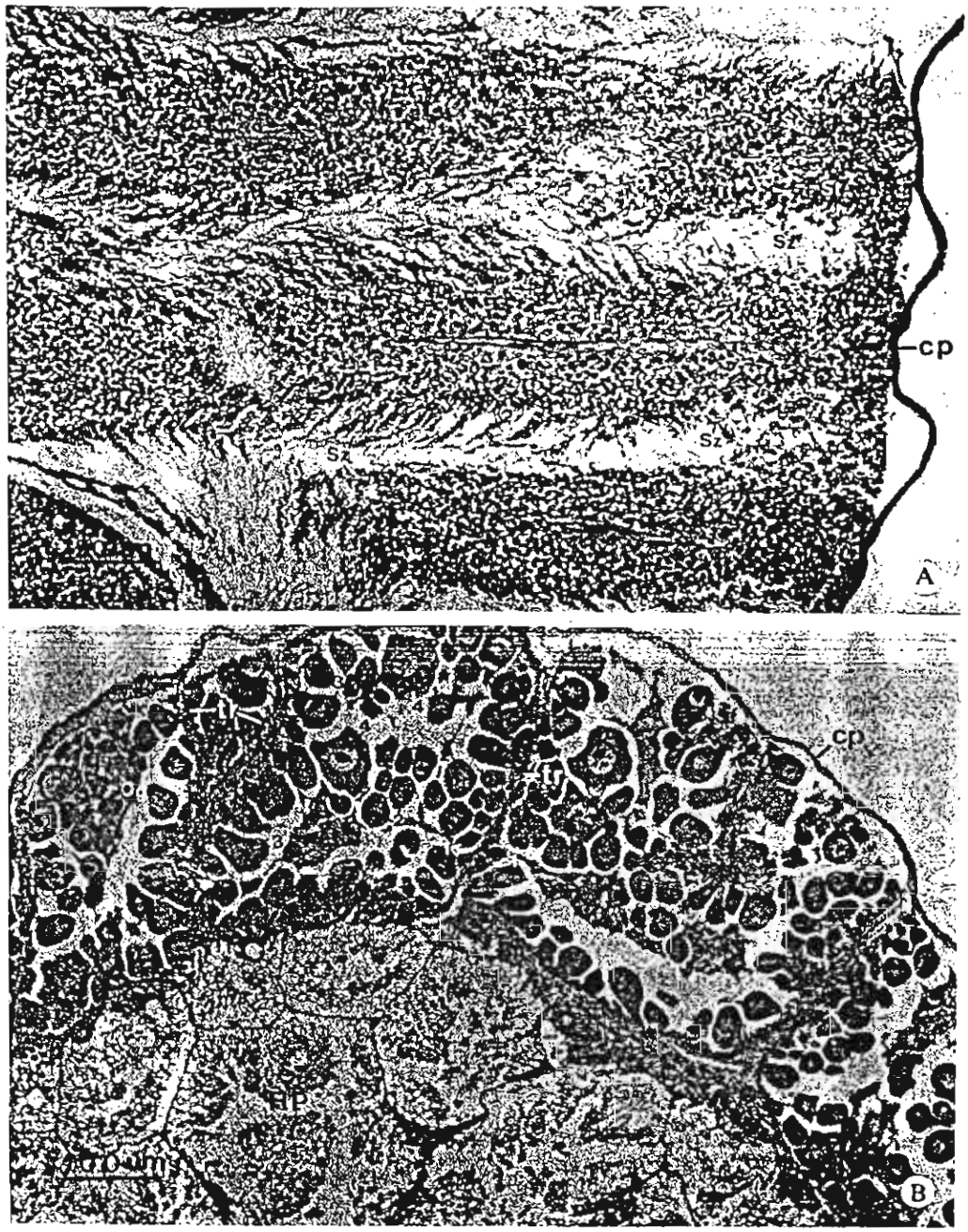
อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อที่ผลิตเซลล์สืบพันธุ์ คือ รังไข่และอัณฑะซึ่งมีถุงหุ้ม เยื่อเกี่ยวพันจากถุงหุ้มแทรกเข้าไปในรังไข่และอัณฑะเป็นแผง trabeculae ที่มีเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต้นและขั้นปลายหุ้มอยู่รอบ ๆ ในรังไข่เซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วย 6 ระยะ คือ oogonium, primary oocytes ขั้นที่ I, II, III, IV และ V ซึ่งมีความแตกต่างกันตามปริมาณก้อนไขมันและสารไข่ (yolk) ที่เซลล์แต่ละขั้นสร้างขึ้น ในอัณฑะเซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วย 13 ระยะ คือ spermatogonia, primary spermatocytes 5 ระยะ, secondary spermatocyte, spermatids 4 ระยะ และ spermatozoa 2 ระยะ

ปริมาณ ชนิดของเซลล์สืบพันธุ์และลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์เปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล โดยแบ่งออกเป็น 5 ช่วง (phases) คือ proliferative, premature, mature, spawning และ spent phases ในช่วง proliferative และ premature phases เซลล์สืบพันธุ์ในอัณฑะและรังไข่ประกอบด้วย gonial cells และ spermatocytes หรือ oocytes ขั้นที่ I, II และ III ในช่วง mature และ spawning phases เซลล์สืบพันธุ์ในอัณฑะประกอบด้วย spermatogonia, spermatids และ spermatozoa เป็นหลัก ส่วนในรังไข่ประกอบด้วย oogonia และเซลล์ oocyte ขั้นที่ IV และ V เป็นหลัก ในช่วง spent phase เซลล์สืบพันธุ์ขั้นปลายจะถูกปล่อยออกมาพร้อมกับการสลายตัวของเยื่อเกี่ยวพันภายในรังไข่และอัณฑะ คงเหลือเฉพาะ gonia cells ที่ยังติดอยู่กับผนังของถุงหุ้ม ช่วง spawning และ spent phase เกิดราวเดือนสิงหาคมถึง กันยายน ส่วนช่วง proliferative ถึง mature phase ดำเนินไประหว่างเดือนตุลาคม ถึง มิถุนายน

รายงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สัญญาเลขที่ BRG/04/2540)

INDEX KEY WORDS: Abalone, *Haliotis asinina*, gonad histology, gametogenesis

ชื่อเรื่อง (ไทย) กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina* Linneaus



รูปA ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะ ซึ่งมีถุงหุ้ม (capsule - cp) trabeculac (tr) มีเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย ระยะต่าง ๆ ห่อหุ้ม trabecula แต่ละอัน ซึ่งเรียกว่า spermatogenic unit

รูป B ลักษณะทางจุลกายวิภาคของรังไข่ ซึ่งมีถุงหุ้ม (cp) trabeculae (tr) รังไข่หุ้มรอบ hepatopancreas (hp) เช่นเดียวกับอัณฑะ มีเซลล์ oogonia และ oocyte ระยะต่าง ๆ หุ้มรอบ trabecula แต่ละอัน ซึ่งเรียกว่า oogenetic unit

การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 24

19-21 ตุลาคม 2541

ณ ศูนย์การประชุมแห่งชาติสิริกิติ์

กรุงเทพมหานคร

กำหนดการและบทคัดย่อ
PROGRAMME AND ABSTRACTS

ISBN 974-86505-5-3

24th Congress on Science and Technology of Thailand

19-21 October 1998

at Queen Sirikit National Convention Center

Bangkok

วทท.-STT : The Best Domestic Convention Award 1993

เอกสารหมายเลข 10.1.3

ชื่อ สกุล ผู้ขอรับรายงานวิจัย สมใจ อภิเศวตกานต์

คำนำ ■ น.ส. ☐ นาง ☐ นาย ☐ อื่นๆ

ที่ทำงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหิดล
ถนนพระราม 6 พญาไท กทม 10400 โทร 2460063 ต่อ 2202

สาขาวิชา
[illegible] ■ ชีววิทยา
[illegible] ☐ ทรัพยากรธรรมชาติ
[illegible] ☐ วิทยาศาสตร์ทั่วไป
วิทยานิพนธ์ ☐ ปริญญา

REPRODUCTIVE CYCLE AND DEVELOPMENT OF GONADS IN *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

Somjai Apisawetakan[1], Malee Chanpoo[1], Chartip Wanichanon[1], Vichai Linthong[1], Padermsak Jarayabhand[1], Maleeya Kruatrachue[2], Suchart Upatham[2] and Prasert Sobhon[1].
Departments of Anatomy[1] and Biology[2], Faculty of Science, Mahidol University and Department of Marine Science[3], Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

The gonads of *H. asinina* reared in land-based culture system exhibit five phases of histological pattern during the year these are proliferative, premature, mature, spawning and spent phases. Gonads in proliferative and premature phases contain primarily gonial cells, oocytes (I, II, III) and spermatocytes, while mature phase contains mainly late stage cells, i.e., stage IV and V oocytes in ovary and spermatids and spermatozoa in testis. The spawning phase occurs at least twice during each year from March to April and August to October in females, and with similar intervals but slightly prolonged durations in males. Spent phase is characterized by a complete discharge of gamete cells and the breakdown of connective tissue stroma, which occurs after the period of spawning. It takes approximately 5 to 6 months of the year for gonads to regenerate their connective tissue stroma and germ cell population, and finally become repleted with mature cells again.

In developing *H. asinina* definitive gonads appear during 3 months. Histologically, gonia cells appear at 5 months. Spermatocytes and early oocytes (Oc_{1-3}) occur at 5-7 months, while spermatids, spermatozoa and mature oocytes (Oc_{4-5}) occur at 10 to 11 months. The animals reach full sexual maturity and start normal reproductive cycle after 11 to 12 months.

This investigation was supported by the Thailand Research Fund (contract BRG4080004)

วงจรการสืบพันธุ์และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina* Linnaeus

สมใจ อภิเศวตกานต์[1], มาลี จันทร์ภู่[1], ชัยทิพย์ วนิชานนท์[1], วิชัย ลิ้นทอง[1], เผดิมศักดิ์ จารยะพันธุ์[1], มาลียา เครือตราชู[2], สุชาติ อุปถัมภ์[2] และ ประเสริฐ โสภณ[1]
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์[1]และชีววิทยา[2] คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ 10400,
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล[3] คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท กรุงเทพฯ 10330

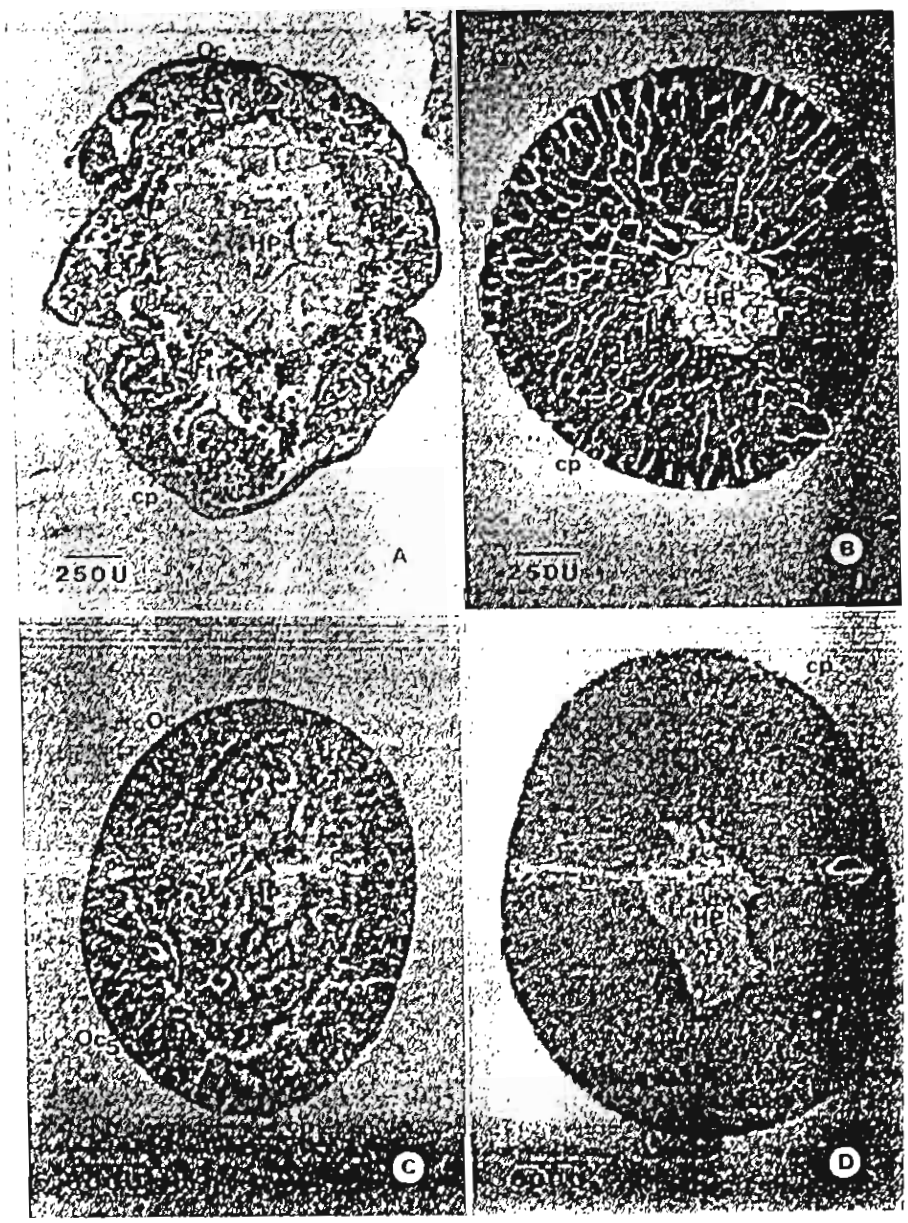
ในระหว่างระยะเวลา 1 ปี ปริมาณและชนิดของเซลล์สืบพันธุ์ รวมทั้งลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อ *H. asinina* ที่เลี้ยงในระบบ land-based จะเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงของวงจรการสืบพันธุ์ (reproductive cycle) ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 5 ช่วง (phases) คือ proliferative, premature, mature, spawning และ spent phases ในช่วง proliferative และ premature phases เซลล์สืบพันธุ์ในรังไข่ประกอบด้วย oogonia และ oocytes ขั้นที่ I, II และ III ส่วนในอัณฑะประกอบด้วย spermatogonia และ spermatocytes ในช่วง mature phase จะพบเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปลายเป็นส่วนใหญ่คือ oocytes ขั้นที่ IV และ V ในรังไข่ spermatids และ spermatozoa ในอัณฑะ ในช่วง spawning phase จะมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ที่โตเต็มที่แล้วออกสู่ภายนอก พบว่า spawning phase ของหอย *H. asinina* ที่เลี้ยงในระบบปิดเกิดขึ้น 2 ครั้ง คือในช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน และช่วงเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม โดยพบว่าตัวผู้มักมีการขยายเวลา spawn ออกไปได้อีกเล็กน้อย และบางครั้งพบการปล่อยของเซลล์สืบพันธุ์อย่างสมบูรณ์พร้อมกับการสลายตัวของเยื่อเกี่ยวพันภายในรังไข่และอัณฑะ โดยเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า spent phase หลังจากช่วง spawning และ spent phase แล้ว การสร้างและพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์รอบใหม่จะเกิดขึ้นและดำเนินต่อไปทันที โดยพบว่าแต่ละรอบจะใช้เวลาประมาณ 5 ถึง 6 เดือน

อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยจะเริ่มปรากฏตั้งแต่อายุประมาณ 4 เดือน เซลล์สืบพันธุ์ระยะต้นได้แก่ oocytes (Oc_{1-3}) และ spermatocytes พบได้เมื่ออายุ 5ถึง 7 เดือน ในขณะที่เซลล์สืบพันธุ์ระยะปลายคือ mature oocytes (Oc_{4-5}), spermatids และ spermatozoa เกิดขึ้นเมื่ออายุ 10 ถึง 11 เดือน ในที่สุดหอยจะเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์และพัฒนาเข้าสู่วงจรการสืบพันธุ์อย่างสมบูรณ์เมื่ออายุประมาณ 1 ปี

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สัญญาเลขที่ BRG4080004)

INDEX KEY WORDS: Reprodctive cycle, *Haliotis asinina*, gonads, development

ชื่อเรื่อง (ไทย) วงจรการฝืบพันธุ์และการพัฒนาของเซลล์ฝืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮือ *Haliotis asinina* Linnaeus



คำอธิบาย แสดงวงจรการสืบพันธุ์ reproductive cycle ของหอยเป๋าฮือ *Haliotis asinina* (Sc spermatocyte, Sz spermatozoa, Oc oocyte, Oc, stage V oocyte, HP hepatopancreas, n nucleolus, cp capsule)

รูป A แสดงรังไข่ในระยะ premature phase

รูป B แสดงอัณฑะในระยะ premature phase

รูป C แสดงรังไข่ในระยะ mature phase

รูป D แสดงอัณฑะในระยะ mature phase

ระดับนานาชาติ

Mollusc's 97

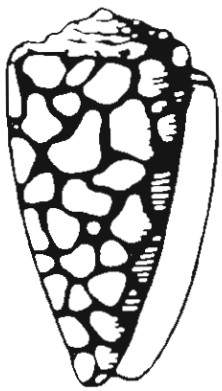
10.1.4 Thongkukiatkul, A., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Sobhon, P. and Chitramvong, Y.P. Histological studies of neurons in cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Mollusc's 97 Symposium on the Molluscs of the Indo-West Pacific and Australian Region, 1-4 February 1997, Rottnest Island, Western Australia. pp.43.

10.1.5 Apisawetakan, S., Sobhon, P., Upatham, E.S., Kruatrachue, M. and Chitramvong, Y.P. Oogenesis in *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Mollusc's 97 Symposium on the Molluscs of the Indo-West Pacific and Australian Region, 1-4 February 1997, Rottnest Island, Western Australia. pp.45.

MOLLUSCS 97

Symposium on the Molluscs of the Indo-West Pacific and Australasian Region

Rottnest Island, Western Australia
1-4 February 1997



Organised by:

The Malacological Society of Australasia Ltd.
ACN 067894848

Organising committee:

Fred Wells (Chair)
Anne Brearley
Lindsay Joll
David Macey

HISTOLOGICAL STUDIES OF NEURONS IN THE CEREBRAL GANGLIA OF *Haliotis asinina* Linnaeus

A. Thongkukiatkul, Department of Biology, **E.S. Upatham** Department of Biology, M. Kruatrachue, Department of Biology, P. Sobhon, Department of and Anatomy, and **Y.P. Chitramvong**, Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

The cerebral ganglion of the abalone *Haliotis asinina* is composed of four types of nerve cells: (a) large cells with dense nuclei (8 μm in diameter); (b) medium cells with light nuclei (6 μm in diameter); (c) small cells with light nuclei (5 μm in diameter); (d) very small pyriform cells with dense nuclei (4-7 μm in diameter). Type A cells are located at the periphery of the cerebral ganglia. They are characterized by acentric nucleus with dense heterochromatin and acentric nucleolus; and granular cytoplasm. Type B cells are found next to Type A cells. They are characterized by nuclei with peripheral heterochromatin. There are some small granules in the cytoplasm. Type C cells are round and mostly found in clusters of 8-10. They are characterized by large heterochromatic nuclei and little peripheral cytoplasm. Type D cells are scattered near the heuropile. They show a cometary shape with elliptical nuclei and with tail-like axons. Most of the axons extend inwards to the medulla of the ganglion. Type A and B cells are neurosecretory cells.

This investigation is supported by a grant from the Thailand Research Fund.

OOGENESIS IN *Haliotis asinina* Linnaeus

S. Apisewatakan, Department of Anatomy, P. Sobhon, Department of Anatomy, **E.S. Upatham**, Department of Biology, M. Kruatrachue, Department of Biology, and **Y.P. Chitramvong**, Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

Different stages of oogenesis were observed by light microscope. The oogonia were polygonal in shape with round nuclei containing 1-2 nucleoli. Growing oocytes were categorized into 5 stages according to their internal characteristics. Stage I oocytes were polygonal in shape. The contained round nucleus with very distinct nucleolus. Stage II oocytes were characterized by the deposition of oil droplets in the cytoplasm. Stage III oocytes were characterized by the accumulation of yolk granules in the cytoplasm. Stage IV oocytes were slightly roundish in shape. There was a synthesis of jelly substance which formed the vitelline membrane. At this stage, the oocytes had undergone a very rapid growth to become mature oocytes. Stage V or mature oocytes were completely round in shape. The cytoplasm was filled with yolk granules and was surrounded by a vitelline membrane. During the growth phase, the ova were attached to the trabeculae by delicate stalks.

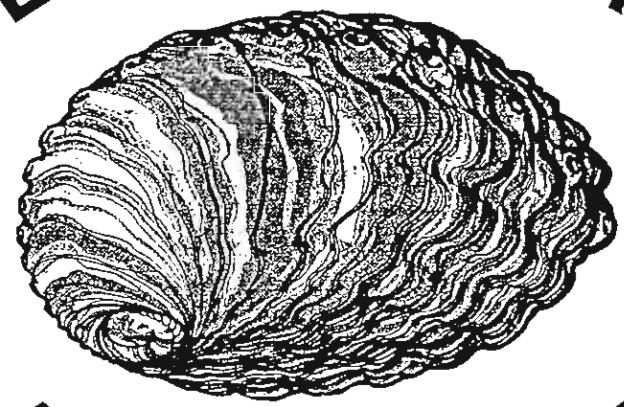
This investigation is supported by a grant from the Thailand Research Fund.

Third International Abalone Symposium

10.1.6 Thongkukiatkul, A., **Sobhon**, P., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Wanichanon, C. and Sahavacharin, S. Classification and distribution of various neuronal cells in cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at 3rd International Abalone Symposium, 26-31 October 1997, Monterey, California, USA. pp.90.

THIRD INTERNATIONAL ABALONE SYMPOSIUM

BIOLOGY, FISHERIES AND CULTURE



October 26 - 31, 1997

Monterey, California USA

139. CLASSIFICATION AND DISTRIBUTION OF VARIOUS NEURONAL CELLS IN CEREBRAL GANGLIA OF *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

Amporn Thongkukiatkul*, P. Sobhon, E. S . Suchart, M. Kruatrachue, Chaitip Wanichanon and S. Sahavacharin

Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

There are four types of cells in the cerebral ganglia of adult *Haliotis asinina*. Type A cell is oval-shaped, about 20-25 µm in size, and with an eccentric nucleus (diameter about 8 µm). Under light microscopy, the cytoplasm is stained reddish-purple with chrome hematoxylin pholxine and green with paradehyde fuschin. Under the transmission electron microscope the cytoplasm exhibits abundant RER, mitochondria, Golgi complexes, and granules about 60-160 mm in diameter. The nucleus contains mostly euchromatin, and a prominent nucleolus. Type B cell has a round shape about 10-15 µm in size, and an eccentric nucleus (6 µm in diameter). Its cytoplasm is similar to Type A cell, with fewer granules, and its nucleus exhibits more heterochromatin and less a prominent nucleus. Type C is a small spherical shaped cell about 5-7 µm in size, with nucleus about 4-5 µm in diameter. The cytoplasm is scanty and unstained with only free ribosomes, and limited amount of RER. The nucleus has an increasing amount of heterochromatin. Type D is a small stellate-shaped cell about 6 µm in size. The cytoplasm is unstained with most branches extending into the neuropil. The nucleus is elongate and exhibits mostly heterochromatin without a nucleolus. Type A and B should be neurosecretory cells and type C and D are neurons. All four types of cells are localized along both the medial and lateral border. However, type A cells are concentrated on the medial border of the dorsal half and lateral border of the ventral half of the ganglion. Type B cells concentrate within the same areas but tend to lie deeper towards the neuropils. Type C and D are found evenly scattered along the margin of the ganglion, with some lying deep in the neuropil.

This investigation was supported by the Thailand Research Fund.

KEYWORDS: *Haliotis asinina*, cerebral ganglia

The 5th Asian Fisheries Forum

10.1.7 **Sobhon**, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M. and Upatham, E.S. Gametogenesis, reproductive cycle and development of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at The 5th Asian Fisheries Forum International Conference on Fisheries and Food Security Beyond the Year 2000, 11-14 November 1998, Chiang Mai. pp.6.

10.1.8 Linthong, V., **Sobhon**, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M. and Upatham, E.S. Ultrastructure of male germ cells in the testis of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at The 5th Asian Fisheries Forum International Conference on Fisheries and Food Security Beyond the Year 2000, 11-14 November 1998, Chiang Mai. pp.21.

The 5th ASIAN FISHERIES FORUM

INTERNATIONAL CONFERENCE ON
FISHERIES AND FOOD SECURITY BEYOND THE YEAR 2000

AT

LOTUS HOTEL PANG SUAN KAEW, CHIANG MAI, THAILAND
NOVEMBER 11-14, 1998

SPECIAL SESSION

ON

MOLLUSCS RESEARCH IN ASIA

THURSDAY, NOVEMBER 12, 1998

ORGANIZED BY

AQUATIC ANIMAL INDUSTRY PROGRAME
THE THAILAND RESEARCH FUND

•

ASIAN FISHERIES SOCIETY

•

AQUATIC RESOURCES RESEARCH INSTITUTE
CHULALONGKORN UNIVERSITY

GAMETOGENESIS, REPRODUCTIVE CYCLE AND DEVELOPMENT OF GONADS IN *Haliotis asinina* Linnaeus

Prasert Sobhon,[1] Somjai Apisawetakan[1], Malee Chanpoo[1], Chaitip Wanichanon[1], Vichai Linthong[1], Amporn Thongkukiatkul[3], Padermsak Jarayabhand[4], Maleeya Kruatrachue[2] and Suchart Upatham[3].
Departments of Anatomy[1] and Biology[2], Faculty of Science, Mahidol University, Department of Biology[3], Faculty of Science, Burapha University, and Department of Marine Science[4], Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

The gonad histology, ultrastructure and gametogenic processes of *Haliotis asinina*, a species of abalone found along the coast of Thailand, were studied by light and electron microscopies. The outer gonadal wall consists of fibro-muscular tissue forming a capsule with connective tissue septa or trabeculae that partition the gonad into compartments, where gonial and germ cells are attached to and surround each trabecula forming oogenetic or spermatogenic unit. Within the connectives of trabeculae are vessels containing haemolymph surrounded by muscle cells, fibroblasts, and granulated endocrine-like cells. Germ cells in oogenetic units could be classified into six stages according to their histological and ultrastructural characteristics: oogonium and five stages of oocytes, i.e., Oc_1 with light to intense basophilia and abundant polyribosomes, with some in large aggregates; Oc_2 with intense basophilia, oil droplets, numerous well developed Golgi complexes and rough endoplasmic reticulum, but little secretory granules; Oc_3 with a few primary yolk granules and 2 types of cortical granules; Oc_4 with increasing number of secondary yolk granules, numerous cortical granules and thin jelly coat; and Oc_5 is the mature ovum with 2 types of yolk granules, numerous cortical granules and fully formed jelly coat. The cells in spermatogenetic process could be classified according to the pattern of chromatin condensation into thirteen stages: spermatogonium, five stages of primary spermatocytes, secondary spermatocyte, four stages of spermatids and two stages of spermatozoa.

The gonads of *H. asinina* reared in land-based culture system exhibit five phases of reproductive cycle during the year: these are proliferative, premature, mature, spawning and spent phases. Gonads in proliferative and premature phases contain primarily gonial cells, early $oocytes_{1-3}$ and spermatocytes, while mature phase contains mainly late stage cells, i.e., $oocytes_{4-5}$ in ovary and spermatids and spermatozoa in testis. The spawning phase occurs at least twice during each year: from March to April and August to October in females, and with similar intervals but slightly prolonged duration in males. Spent phase, occurring after the period of spawning, is characterized by a complete discharge of gamete cells and the breakdown of connective tissue stroma. It takes approximately 5 to 6 months of the year for gonads to regenerate their connective tissue stroma and germ cell population, and finally become repleted with mature cells again.

In developing *H. asinina* definitive gonads appear to be clearly separated from hepatopancreas at the 4th month. Histologically, gonial cells appear at 5 months, when sexual differentiation could be distinguished. Early spermatocytes and oocytes (Oc_{1-2}) occur in the developing gonads at 6-7 months. While spermatids, spermatozoa could also arise in the gonads as early as 6-7 months, mature oocytes (Oc_{4-5}) occur much later at 10 to 11 months. The male animals tend to reach full sexual maturity and start normal reproductive cycle as early as 8 to 9 months, while female animals reach sexual maturity and start reproduce cycle around 11 to 12 months.

This investigation was supported by The Thailand Research Fund (Contract BRG4080004 and Senior Research Scholar Fellowship to Prasert Sobhon).

KEYWORDS: *Haliotis asinina*, gametogenesis, reproductive cycle, gonad development.

ULTRASTRUCTURE OF MALE GERM CELLS IN THE TESTIS OF *Haliotis asinina* Linnaeus

Vichai Linthong[1], Prasert Sobhon,[1], Somjai Apisawetakan[1], Malee Chanpoo[1], Chaitip Wanichanon[1], Amporn Thongkukiatkul[3], Padermsak Jarayabhand[4], Maleeya Kruatrachue[2] and Suchart Upatham[3].
Departments of Anatomy[1] and Biology[2], Faculty of Science, Mahidol University, Department of Biology[3], Faculty of Science, Burapha University, and Department of Marine Science[4], Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand.

When studied by transmission electron microscopy, male germ cells in the testis of *H. asinina* could be divided into 13 stages, based on the patterns and degrees of chromatin condensation. Spermatogonium is a spherical or oval-shaped cell with diameter about 7-8 μm. Its nucleus contains mostly euchromatin with only a thin rim of heterochromatin along the inner facet of the nuclear envelope. Primary spermatocytes are divided into 5 stages, i.e., leptotene (LSc), zygotene (ZSc), pachytene (PSc), diplotene (DSc), and metaphase (MSc). The early cells are round and become increasingly larger, ranging in size from 12-15 μm from LSc to PSc; then their sizes gradually decrease from 10-7 μm from DSc to MSc. LSc contains small blocks of heterochromatin that are scattered throughout the nucleus. The heterochromatin blocks are lengthened and increasingly thickened and become attached by synaptonemal complexes in ZSc; the heterochromatin blocks achieve their maximum sizes in PSc. DSc decreases in size, therefore, chromatin blocks are clumping closer together, while in MSc long and large blocks of heterochromatin are aligned along the equatorial region. Regardless of their sizes in different stages, each of individual chromatin fibers that are packed into heterochromatin blocks is about 30 nm thick. By contrast to their nuclei, the cytoplasm of these cells contain only mitochondria and polyribosomes with few rough endoplasmic reticulum. These organelles show little changes during primary spermatocyte stages. Secondary spermatocyte (SSc) is a round cell about 6 μm in diameter. They are aligned in rows separating spermatids from primary spermatocytes. Their nuclei contain crisscrossing chromatin cords whose individual 30 nm fibers are loosened up. Spermatids are the stages that become free from the germinal epithelium, and they could be divided into 4 stages: St_1 is a large round cell (about 6 μm), and its nucleus contains evenly dispersed 30 nm chromatin fibers. In St_2 the nucleus decreases in size and becomes oval, thus the chromatin fibers are aligned more closely together, with some blocks of loosely packed chromatin fiber become apparent. In St_3 the nucleus becomes elongated with individual chromatin fibers enlarged to 40 nm and packed tightly together. In St_4 (about 3 μm) the nucleus is increasingly elongated with acrosome covering the anterior pole. Individual chromatin fibers, which in cross-section, appearing as closely aligned granules, are enlarged to 60 nm. The cytoplasm of spermatids exhibit increasing amount of microtubules, which in later stages become instrumental in modulating the change in shape of spermatids from round to oval and finally to highly elongated form. They may be involved also in the realignment of mitochondria to be located at the posterior end of the nucleus. Centrioles are also formed and become the seed of tail formation. Spermatozoa (about 3x1-1.5 μm) have completely condensed chromatin, but the outlines of 60 nm individual fibers could still be discerned. They are covered anteriorly by cup-shaped acrosomes, and each has 3-5 globular mitochondria surrounding a pair of centriole at the neck region. The tail consists of axoneme of 9+2 doublet microtubules surrounded by the plasma membrane.

This investigation was supported by The Thailand Research Fund (Contract BRG4080004 and Senior Research Scholar Fellowship to Prasert Sobhon).

KEYWORDS : *Haliotis asinina*, ultrastructure, male germ cells.

10.1.9 Thongkukiatkul, A., Upatham, E.S., **Sobhon**, P., Wanichanon, C., Kruatrachue, M. and Pumthong, T. Histological studies of pleuro-pedal ganglion, visceral ganglion and pedal cord ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus (Gastropoda: Haliotidae). Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.29.

10.1.10 **Sobhon**, P., Apisawetakan, S., Linthong, V., Wanichanon, C., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Chanpoo, M. and Jarayabhand, P. Ultrastructure of gamete cells in the ovary of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.34.

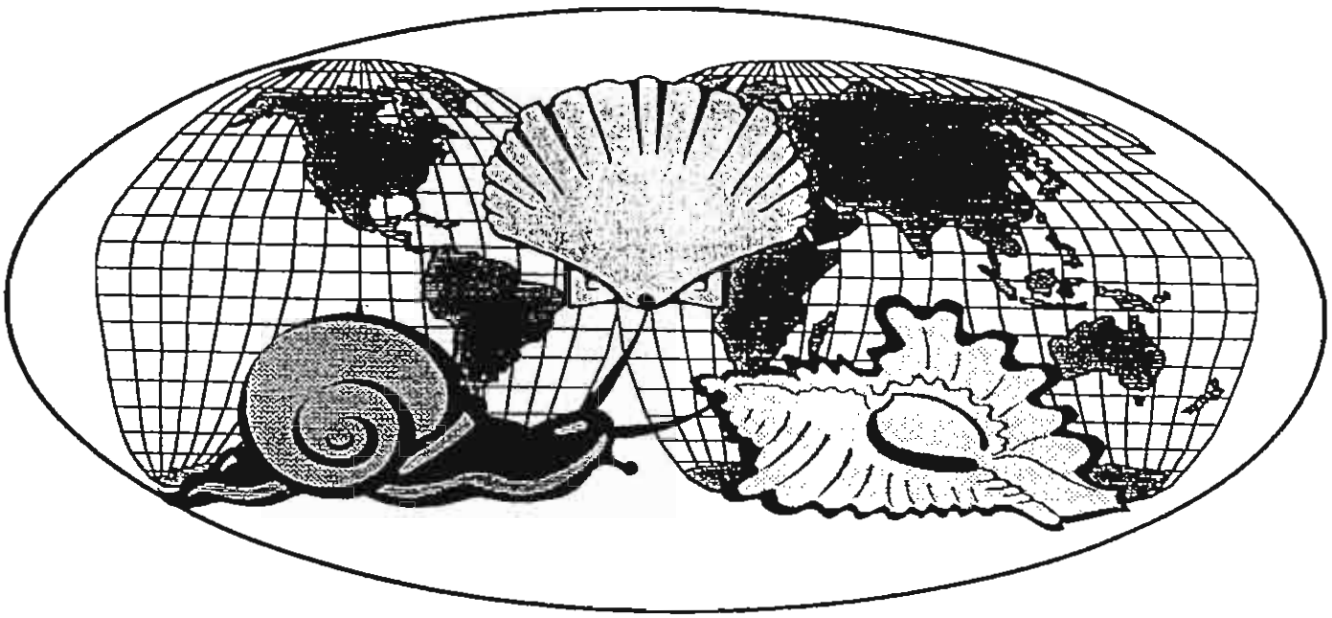
10.1.11 Kruatrachue, M., Apisawetakan, S., Upatham, E.S., **Sobhon**, P., Singhakaew, S., Sawatpreera, S., Ingsrisawang, V. and Singhagriwan, T. Reproductive cycle and development of gonads in the Thai abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.35.

10.1.12 Kruatrachue, M., Thongkukiatkul, A., **Sobhon**, P., Upatham, E.S., Wanichanon, C. and Linthong, V. Ultrastructural study of the cerebral ganglion of Thai abalone *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.48.

10.1.13 Upatham, E.S., Thongkukiatkul, A., Chitramvong, Y.P., **Sobhon**, P., Linthong, V., Kruatrachue, M., Wanichanon, C. and Nugranad, J. The fine structure of cells in the pleuropedal ganglion of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.51.

10.1.14 **Sobhon**, P., Thongkukiatkul, A., Laimek, P., Anupunpisith, V., Upatham, E.S., Kruatrachue, M. and Wanichanon, C. Cross reactions to human GH, insulin, FSH and LH in neurosecretory cells of the cerebral, pleuro-pedal and visceral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang Mai, Thailand. pp.52.

FIFTH INTERNATIONAL CONGRESS ON MEDICAL AND APPLIED MALACOLOGY



27-30 December 1998

Chiangmai , Thailand

HISTOLOGICAL STUDIES OF PLEURO-PEDAL GANGLION, VISCERAL GANGLION AND PEDAL CORD GANGLIA OF *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS (GASTROPODA : HALIOTIDAE)

A. Thongkukiatkul[1], E.S.Upatham,[2] P. Sobhon[3], C. Wanichanon[3], M. Kruatrachue[2] and T. Pumthong[4]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand
[2]Departments of Biology and [3]Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
[4]Coastal Aquaculture Development Center, Prachuap Khiri Khan 77000, Thailand

The pleuro-pedal, visceral and pedal cord ganglia of *Haliotis asinina* were studied by light microscopy using hematoxylin-eosin, Gomori's, and paradehyde-fuchsin stains. These ganglia contain ten types of cells : three types of neurosecretory cells (NS_{1-3}), four types of neurons (NR_{1-4}) and three types of neuroglia (NG_{1-3}). NS_{1-3} contain round nuclei with three different patterns of heterochromatization and neurosecretory granules in the cytoplasm. NR_{1-4} do not have neurosecretory granules. NR_1 are giant neurons with oval or pyramidal shape. NR_{2-4} are small neurons with oval bodies and nuclei, and they are the majority of neuronal cells in the cortex of the ganglia. NG_{1-3} are spindle-shaped cells containing similar shaped nuclei. NG_1 and NG_3 are the main neuroglia of the cortex and medulla of the ganglia, respectively, while NG_2 are a part of the blood-nerve barrier that borders the connective tissue capsule of the ganglia.

This investigation was supported by the Thailand Rescarch Fund (contracts BRG 4080004 and PG2/015/2539).

ULTRASTRUCTURE OF GAMETE CELLS IN THE OVARY OF *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

P. Sobhon[1], S. Apisawetakan[1], V. Linthong[1], C. Wanichanon[1], M. Kruatrachue[2], E.S. Upatham[2], M. Chanpoo[1] and P. Jarayabhand[3]

[1]Departments of Anatomy and [2]Biology, Faculty of Science, Mahidol University Bangkok 10400, Thailand
[3]Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10300, Thailand

Gamete cells in the ovary of *Haliotis asinina* are divided into six stages : oogonia (Og) and five stages of oocytes (Oc_{1-5}). When examined by TEM, oogonium is a small round cell about 8-10 μm in diameter, closely adhered to the capsular side of a trabecula. The nucleus exhibits thin rim of chromatin with 1 or 2 prominent nucleoli. The cytoplasm is strongly basophilic and contains abundant polysomes but no rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complex (GC). Early Oc_1 is a round cell with 12-25 μm in diameter. The nucleus exhibits densely packed chromatin and numerous lampbrush chromosomes consisting of 100-200 nm fibers. The cytoplasm is intensely basophilic and contains numerous polysomes, newly developed RER, GC and few dense granules about 560 nm in diameter. Late Oc_1 exhibits enlarged nucleoli and lampbrush chromosomes unraveled into thinner fibers (40-60 nm and 7-12 nm). The cytoplasm has numerous mitochondria, increasingly developed RER and GC but still no secretory granules (SG). The unique feature of late Oc_1 is the abundance of ribosomes, some of which are packed tightly in ribosome microtrabecular mass (RMM) around the nuclear envelope. Oc_2 is still a round cell about 25-35 μm in diameter. The nucleus exhibits increasingly decondensed chromatin and nucleoli. The nuclear envelope possesses numerous nucleopores. The cytoplasm contains numerous and well-developed GC, RER, abundant ribosomes but decreasing RMM. There are two types of secretory granules : SG_1 and SG_2 (330 and 450 nm) with electron-lucent and dense matrix; and a significant number of lipid droplets. Oc_3 is a flask-shaped cell that starts to detach from a trabecula, with 35x70 μm in size. Lampbrush chromosomes are almost completely unraveled. SG_1 and SG_2 are increasing in number and cluster around GC. Large and electron-dense yolk granules (YG) start to appear. Oc_4 is a pear -shaped cell with size about 50x80 μm, and is almost completely detached from a trabecula. The nucleus contains completely decondensed euchromatin and highly enlarged nucleoli. The cytoplasm is filled with lipid droplets (1500-3000 nm in diameter) and yolk granules (1500-2500 nm). Vitelline-jelly coat (VJC) starts to develop, and could be derived from SG_1 and SG_2 which are translocated to area underneath the plasma membrane. Oc_5 is similar to Oc_4 except its VJC achieves maximum width and appearing fibrous in comparison to the amorphous appearance in Oc_4.

This investigation was supported by the Thailand Research Fund (contract BRG4080004)

REPRODUCTIVE CYCLE AND DEVELOPMENT OF GONADS IN THE THAI ABALONE, *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

M.Kruatrachue[1], S. Apisawetakan[2], E.S.Upatham[1], P.Sobhon[2], S. Singhakaew[1], S. Sawatpeera[3], V. Ingsrisawang[4] and T. Singhagraiwan[4]

[1]Departments of Biology and [2]Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
[3]Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand
[4]Eastern Marine Fisheries Development Center, Rayong 21160, Thailand

Reproductive cycle and development of the gonads in the Thai abalone, *Haliotis asinina* were studied by light microscopy. Mature abalone were collected monthly from a natural habitat along Samed Island, Rayong Province, and from a land-based culture system, Coastal Aquaculture Development Center, Prachuap Khiri Khan Province, in order to study the productive cycle. The gonads of abalone both from natural habitat and land-based culture exhibit five phases of histological pattern during the year. These are proliferative, premature, mature, spawning and spent phases. Spawning of gamete cells occurs at least twice during the year. In natural habitat, spawning occurs from April to May and August to September in female and from April to May and August to October in male. In land-based culture system, spawning occurs from March to April and August to October in female and from February to April and August to November in male.

Development of the reproductive system of *H. asinina* was histologically studied by collecting monthly juvenile abalone from the land-based system culture at the age of 1-13 months old. Gonads appear in five-month-old abalone and become fully mature in nine-month-old abalone.

This investigation was supported by the Thailand Research Fund (contract PG 2/015/2539)

ULTRASTRUCTURAL STUDY OF THE CEREBRAL GANGLION OF THAI ABALONE, *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

M. Kruatrachue[1], A. Thongkukiatkul[2], P. Sobhon[3], E.S. Upatham,[1], C. Wanichanon[3] and V. Linthong[3]

[1]Departments of Biology and [3]Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

The cerebral ganglia of *Haliotis asinina* was studied by transmission electron microscopy. There are ten types of cells in the cerebral ganglia : three types of neurosecretory cells (NS_{1-3}), four types of neurons (NR_{1-4}) and three types of neuroglia (NG_{1-3}). NS_1 contains two types of secretory granules. Type 1 granules, which are few in number appear as large spherical membrane-bound bodies (~ 800 nm in diameter), containing moderately osmiophilic material. Type 2 granules are much more numerous and appear as small and round (~ 120 nm in diameter), containing electron-dense material. NS_2 possesses large and membrane-bound granules (~ 500-800 nm is diameter). NS_3 contains abundant electron-dense osmiophilic globules in aggregates. NS_1 and NS_2 contain numerous organelles characterizing them as active secretory cells. NR_1 is the giant neuron that contains numerous mitochondria, stacks of rough endoplasmic reticulum and a few small secretory granules, while NR_{2-4}, are small neurons that do not contain many organelles and neurosecretory granules. NG_{1-3} are cells with spindle -shaped bodies and nuclei which contain mostly patches of heterochromatin, with little cytoplasmic organelles.

This investigation was supported by the Thailand Research Fund (contracts BRG 4080004 and PG/2/015/2539).

THE FINE STRUCTURES OF CELLS IN THE PLEURO-PEDAL GANGLION OF *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

E.S. Upatham[1], A. Thongkukiatkul[2], Y. P. Chitramvong[1], P.Sobhon[3], V. Linthong[3], M. Kruatrachue[1], C. Wanichanon[2] and J. Nugranad[4]

[1]Departments of Biology and [3]Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
[2]Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand
4Coastal Aquaculture Development Center, Prachuap Khiri Khan 77000, Thailand

The fine structures of cells in the pleuro-pedal ganglion of *Haiiotis asinina* were studied by transmission electron microscopy. There are ten types of cells in the pleuro-pedal ganglion : three types of neurosecretory cells (NS_{1-3}), four types of neurons (NR_{1-4}) and three types of neuroglia (NG_{1-3}). NS_1 contains small round secretory granules (~ 125 nm in diameter) with moderate to dense matrix. NS_2 contains small spherical secretory granules (~ 165 nm in diameter) with dense matrix, while NS_3 contains large electron-dense osmiophilic globules in large aggregates. These neurosecretory cells contain abundant rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes, mitochondria and polyribosomes. NR_1 is the giant neuron that contains numerous mitochondria, stacks of rough endoplasmic reticulum and a few small secretory granules. NR_{2-4} are smaller oval shaped cells whose cytoplasm is relatively thin with sparing amount of rough endoplasmic reticulum, mitochondria and polyribosomes. NG_{1-3} are spindle-shaped cells with large amount of heterochromatin in the nuclei and small amount of organelles except for ribosomes in the cytoplasm.

This investigation was supported by the Thailand Research Fund (contracts BRG 4080004 and PG/2/015/2539).

CROSS REACTIONS TO HUMAN GH, INSULIN, FSH AND LH IN NEUROSECRETORY CELLS OF THE CEREBRAL, PLEURO-PEDAL AND VISCERAL GANGLIA OF *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

P.Sobhon[1], A. Thongkukiatkul[2] P. Laimek[1], V. Anupunpisith[3], E.S.Upatham[2], M. Kruatrachue[2] and C. Wanichanon[1]

[1]Departments of Anatomy and [2]Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
[3]Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakrarinthrawirote University, Bangkok 10110, Thailand

The cerebral, pleuro-pedal and visceral ganglia of *Haliotis asinina* were stained with anti-human growth hormone (GH), anti-human insulin hormone, anti-human luteinizing hormone (LH) and anti-human follicle stimulating hormone (FSH). The results showed that there are three types of neurosecretory cells (NS_{1-3}) present in these ganglia. NS_2 and NS_3 of the cerebral ganglia were strongly stained with anti-human GH, while NS_1 was lightly stained. The immuno-reactivity toward GH is not found in the nerve cells of pleuro-pedal and visceral ganglia. The neurosecretory cells of cerebral ganglia showed weak reaction to anti-human insulin while those of pleuro-pedal and visceral ganglia did not show any reaction. The neurosecetory cells in the cerebral ganglia were not stained with anti-human LH, whereas those in the pleuro-pedal and visceral ganglia showed a weak raction. The NS_1 of the pleuro-pedal ganglion were stained with anti-human FSH whereas those in the cerebral ganglia were lightly stained. The NS_2 in the pleuropedal and visceral ganglia gave a weak reaction to anti-human LH.

This investigation was supported by the Thailand Research Fund (Contracts BRG 4080004 and PG2/015/2539)

ULTRASTRUCTURE OF SPERMATOZOA IN THE TESTIS OF *HALIOTIS ASININA* LINAEUS

S. Apisawetakan [1], P. Sobhon[1], C. Wanichanon[1], V. Linthong[1], E.S.Upatham, [2], M. Kruatrachue[2] and P. Jarayabhand[3]

[1]Departments of Anatomy and [2]Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand
[3]Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

When studied by TEM and SEM, the head of spermatozoa of *Haliotis asinina* appears as a cone-shaped cell with a long tail, whose size is about 3x1-1.5 µm. The acrosome is an inverted cup-like structure covering the anterior end of the head and contains homogeneously dense matrix. There is an acrosomal core with crystalline structure filling in the concavity of the acrosomal cap with its base resting on the anterior tip of the nucleus. The nucleus contains chromatin granules (60 nm in diameter) which are densely packed together, and a few nuclear vacuoles. Attached to the postrior end of the nuclear are 3-5 globular-shaped mitochondria that are adhered to the nucleus by dense plaques of outer membranes, and linked to the posterior sperm membrane by zig-zag microtubule-like structures. The tail starts from a pair of centriole located in the middle of mitochondria, with the vertical centriole tightly attached to the nucleus by thickened double plates. Axoneme of 9+2 doublets of microtubules make up the entire core of the tail, whose membrane in the proximal part is crenulated while that in the remaining distal part is tightly-fitted with the axomeme.

This investigation was supported by the Thailand Research Fund (contract BRG4080004) and Senior Research Scholar Fellowship to P. Sobhon.

CONDENSATION OF CHROMATIN IN MALE GERM CELLS OF *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

P. Sobhon[1], S. Apisawetakan[1], V. Linthong[1], C. Wanichanon[1], P. Sretarugsa[1], J. Chavadej[1] and E.S. Upatham[2]

[1]Departments of Anatomy and [2]Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

The dimension and packing of chromatin fibers in male germ cells of *Haliotis asinina* were studied by TEM. In spermatogonia (Sg) and spermatocytes (Sc) all fundamental chromatin fibers are about 30 nm in thickness, but exhibiting different patterns of packaging. In Sg chromatin fibers are condensed into small blocks that are scattered throughout the nucleus, and a thin rim of heterochromatin along the nuclear envelope. In Sc chromatin fibers are packed into increasingly thick and condensed cords from leptotene to diplotene stages. Based on the pattern of chromatin condensation and nuclear shape and size, spermatids could be divided into four stages(St_{1-4}). In St_1 the nucleus is round and contains evenly dispersed chromatin with individual fiber still measured about 30 nm in thickness. Condensation starts to appear in the form of intertwining fibers around thin axes that are anchored to the nuclear envelope and scattered in the nucleus interior. Acrosomal granules start to form and accumulate on one site of the nucleus. In St_2 the nucleus is still round or slightly oval, with thicker cords of more condensed chromatin fibers around the axes. Acrosomal granules coalesce into one large vesicle. In St_3 the nucleus is round or oval, with individual chromatin fibers enlarge to about 40 nm and are packed into large blocks with intervening light areas of nucleoplasm. In St_4 the nucleus is increasingly elongated with acrosomal cap covering the anterior pole. Individual chromatin granules enlarge to 60 nm and are closely packed together. This pattern of packing is maintained into spermatozoa.

This investigation was supported by the Thailand Research Fund (Senior Research Scholar Fellowship to P. Sobhon)

10.2 ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

10.2.1 Apisawetakan, S., Thongkukiatkul, A., Wanichanon, C., Linthong, V., Kruatrachue, M., Upatham, E.S., Pumthong, T. and **Sobhon**, P. (1997) The gamatogenic processes in a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Sci Soc Thailand*, **23**: 225-240.

10.2.2 Upatham, E.S., Thongkukiatkul, A., Kruatrachue, M., Wanichanon, C., Chitramvong, Y.P., Sahavacharin, S., and **Sobhon**, P. (1998) Classification of neurosecretory cells, neurons and neuroglia in the cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus by light microscopy. *J Shellfish Res*, (in press).

10.2.3 Thongkukiatkul, A., Upatham, E.S., **Sobhon**, P., Kruatrachue, M., Wanichanon, C., Pumthong, T. and Nugranad, J. (1999) Histological studies of the pleuro-pedal, visceral and pedal cord ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Med Appl Malacol*, (in press).

10.2.4 **Sobhon**, P., Apisawetakan, S., Chanpoo, M., Wanichanon, C., Linthong, V., Thongkukiatkul, A., Jarayabhand, P., Kruatrachue, M., Upatham, E.S. and Pumthong, T. (1999) Classification of germ cells, reproductive cycle and maturation of gonads in *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Sci Soc Thailand*, (in press).

10.2.5 Kruatrachue, M., Apisawetakan, S., Upatham, E.S., **Sobhon**, P., Sawatpreera, S., Singhakaew, S., Ingsrisawang, V., Singhagriwan, T. (1999) The reproductive cycle and development of the gonad in the Thai abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Med Appl Malacol*, (in press).

10.2.6 Kruatrachue, M., Thongkukiatkul, A., **Sobhon**, P., Uphatham, E.S., Wanichanon, C., Sretarugsa, P. and Linthong, V. (1999) The ultrastructure of neurons and neuroglia in the cerebral and pleuro-pedal ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Sci Soc Thailand*, (in press).

10.2.7 Apisawetakan, S., **Sobhon**, P., Wanichanon, C., Linthong, V., Upatham, E.S., Kruatrachue, M., Jarayabhand, P. and Pumthong, T. (1999) Ultrastructure of spermatozoa in the testis of *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Med Appl Malacol*, (in press).

เอกสารหมายเลข 10.2.1

J. Sci. Soc. Thailand, 23(1997) 225-240

THE GAMETOGENIC PROCESSES IN A TROPICAL ABALONE, *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

SOMJAI APISAWETAKAN[a], AMPORN THONGKUKIATKUL[b], CHAITIP WANICHANON[a], VICHAI LINTHONG[a], MALEEYA KRUATRACHUE[b], E. SUCHART UPATHAM[b], TANATE POOMTHONG[c] AND PRASERT SOBHON[a, 1]

[a] *Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.*

[b] *Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.*

[c] *Coastal Aquaculture Development Center, Department of Fishery, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Klong Wan, Prachuapkhirikhun 77000.*

(Received 10 September 1997)

ABSTRACT

The gonad histology and gametogenic processes of a species of abalones found along the coast of Thailand, Haliotis asinina, were studied by light microscopy using special stainings. The outer gonadal wall is similar in both sexes, and consists of fibro-muscular tissue forming a capsule-like structure. This capsule forms connective tissue trabeculae that partition the gonad into compartments, where gonial and early germ cells are attached to each trabecula to form oogenetic or spermatogenic unit. Within the connectives of trabeculae are vessels that contain haemolymph. Cells in oogenetic process could be classified into six stages according to their histological characteristics: oogonium, and five stages of oocytes, ie., with light basophilia (I), with intense basophilia and oil droplets (II), with primary yolk granules (III), with secondary yolk granules and thin jelly coat (IV), and mature ovum with 2 types of yolk granules and fully formed jelly coat (V). The cells in spermatogenetic process could be classified into thirteen stages: spermatogonium, five stages of primary spermatocytes, secondary spermatocyte, four stages of spermatids and two stages of spermatozoa.

INTRODUCTION

Abalones are important economic animals in many countries, such as Japan, America, Mexico and Australia where commercial abalone farms are well established. In Thailand, there are three species of abalones along the coast, which are *Haliotis asinina, Haliotis ovina* and *Haliotis varia*[1,2]. Among the three species. *Haliotis asinina* has the largest size and the most economic potential because of their maximum proportion of flesh. In 1991, the Coastal Development Centre in Rayong Province had been successful in increasing the fecundity of this species and the production of larvae by artificial fertilization, however the induction of artificial spawning had not been successful[3]. The histology of the genital organ and gametogenic processes have been studied in other temperate species, such as *Haliotis discus hannai* Ino, in Rebun Island, Hokkaido, Japan[4,5], *Haliotis diversicolor diversicolor* Reeve[6]. By contrast, similar information on *Haliotis asinina,* which is a tropical abalone, is still lacking. The basic knowledge concerning the cellular details in the gonads, particularly with regard to the optimal time that the gonads exhibit full maturation and readiness to be artificially spawned, will contribute to the improvement of the spawning efficiency that could be applied in the aquaculture system

1 All correspondences should be addressed to Professor Prasert Sobhon Ph.D., Department of Anatomy, Faculty of Science. Mahidol University. Rama 6 Rd.. Bangkok 10400. Thailand.

Both testis and ovary are surrounded by thin capsules made of dense collagenous fibers mixed with muscle cells. The connective tissue from capsule extends into the interior of the gonads to form flat sheets of trabeculae that are connected at their innermost ends to the thin loose capsule of hepatopancreas (Fig.1B,C). As a result the gonads are divided into small compartments. Within the connectives of trabeculae, there are small vessels running through their whole course (Fig.2A). These may be capillaries that are branching out from the larger subcapsular vessles. Around the capillaries, there are loosely packed collagen fibers mixed with numerous small cells exhibiting dense ellipsoid nuclei. Some of them may be fibroblasts while others may be follicular or supporting cells that surround the early stage germ cells (Fig.4A,B,D).

Each trabecula forms the axis on which germ cells are attached. Early stage cells, such as spermatogonia and oogonia, are seen closely bound to the connectives of trabeculae. Middle stage germ cells, such as spermatocytes and oocytes, are more detached and appear further from trabeculae; while mature cells, such as spermatozoa and stage V oocytes, are completely detached and appear in the lumen of the compartments. Such appearance give rises to a discrete gametogenic unit, representing perhaps a single clone of germ cells that may arise from a single group of gonial cells. These clones are termed spermatogenic or oogenetic unit (Fig.2B,C).

Classification of germ cells

Spermatogenic cells: Male germ cells, as observed by light microscopy, in both paraffin and plastic-embedded semithin sections could be classified into 13 stages (Fig.3A-D; TextFig.1).

Spermatogonium (Sg): Sg is a spherical or oval-shaped cell with diameter around 10-12 mm. Its nucleus is round or slightly indented with diameter about 6-7 mm. The nucleus contains mostly euchromatin with only a thin rim of heterochromatin attached to the inner surface of nuclear envelope. The nucleolus is prominent and stands out from the rather transparent nucleoplasm.

Primary spermatocytes (PrSc): PrSc consists of 5 stages, *ie*., leptotene (LSc), zygotene (ZSc), pachytene (PSc), diplotene (DSc) and metaphase (MSc) stages. The early cells are round and become increasingly larger ranging from 12-15 mm. Then they are gradually decreased in size from DSc to MSc, which are about 7-10 mm, with nuclear size about 4-6 mm. Another distinctive difference among various stages of PrSc is the pattern of chromatin condensation and the relative amount of euchromatin versus heterochromatin. In LSc heterochromatin appears as small blocks that are evenly scattered throughout the nucleus. The nucleolus is still present but not as prominent as in Sg. In ZSc blocks of heterochromatin increase in size and density, and the nucleolus disappears. In PSc heterochromatin appears as long threads that are entwined into "bouquet pattern". In DSc these strands become increasingly thicker and the nucleoplasm appears denser than in earlier stages. In MSc pairs of chromatids become aligned along the equatorial region, and the nuclear membrane completely disappears.

Secondary spermatocyte (SSc): SSc is a small round cell about 6 mm in diameter, with a nucleus about 4 mm. However, they are rarely observed , and when present they exhibit thick cords of heterochromatin that are crossing one another, appearing as X and Y figures.

Spermatids (St): There are 4 stages of spermatids, depending on the size, chromatin granulation and condensation. All stages are round and ranging in size from 6 mm in St_1 to 3 mm in St_4. St_1 is larger than St_2, however their chromatin appear similar in density and consist of fine granules that are uniformly distributed throughout the nucleus. As a result the whole nuclei appear moderately dense without any intervening transparent area of nucleoplasm.

In St_3 the cell becomes smaller and the chromatin is condensed into dark blocks with intervening light areas of nucleoplasm. In St_4 the cell becomes smallest but still appears round. Its chromatin becomes completely dense, thus the nucleus appears opaque.

Spermatozoa (Sz): There are 2 stages of Sz: Sz_1 is an immature spermatozoon that begins to show elongated nucleus whose chromatin is completely dense like in St_4. There is a clear cap-like structure apposing on one side of the nucleus, which could be maturing acrosome. The tail is short and still forming. In mature spermatozoa (Sz_2) the nucleus is fully elongated, with the size about 1.5 x 3 mm, and the chromatin is completely dense. The heads of Sz_2 are embedded in the cytoplasm of supporting cells while their long tails are pointing outwards and mingled with those from another spermatogenic unit.

Oogenetic cells: There are 6 stages of female germ cells, including one stage of oogonium and 5 stages of oocytes (Fig.4, 5; TextFig 1).

Oogonium (Og): Og is a round or oval-shaped cell (Fig.4A,B,C), whose size is about 10-12 mm. Its nucleus is round and about 7 mm in diameter. It contains small blocks of heterochromatin attached to the inner surface of nuclear envelope, with the remaining majority appearing as euchromatin. The nucleolus is present but may not be as prominent as in Sg. The cytoplasm is stained light blue by H&E and methylene blue, which implies its basophilic property. Og are attached to the capsular side of trabeculae, and usually are concentrated in groups (Fig.4A,B,C). Each Og is surrounded by flat, squamous-shaped follicular cells.

Stage 1 oocyte (Oc_1): Oc_1 is a round or scallop-shaped cell that is closely adhered to the trabecula. It is about 24 mm in size, with a round nucleus about 12 mm in diameter. The nucleolus is present but tends to be obscured by the rather dense chromatin and nucleoplasm. Similarly, the boundary of the nuclear envelope is not clearly discernible. The cytoplasm is stained deep blue with H&E in paraffin and methylene blue in semithin sections, which indicates its intense basophilic property (Fig.4A,B,D; 5A,B,C; 6B). Each Oc_1 is surrounded by few follicular cells.

Stage 2 oocyte (Oc_2): Oc_2 becomes larger and transforms into columnar or flask-shape, with the cell size around 30 x 55 mm, and nuclear size about 22 mm. It is still attached to the connective of trabecula by the narrow part, and each Oc_2 is surrounded by several follicular cells. The nucleolus and nuclear membrane boundary are clearly distinct due to the more transparent nucleoplasm and the presence of mostly euchromatin. In some cells the chromatin appear as long intertwined and zig-zag strands (Fig.4C,D). The cytoplasm is stained light blue similar to Og, and contains clusters of clear lipid droplets (Fig.4B,D).

Stage 3 oocyte (Oc_3): This cell becomes increasingly larger and assumes a pear shape, with the narrow side or base still attached to the connective of trabecula. The cell size is about 35-70 mm, with the nuclear size about 20 mm. The nucleus contains mostly euchromatin, and the nucleoplasm is quite transparent. The nucleolus is distinct and becomes enlarged due to the uncoiling of nucleolar chromatin. In addition to clear lipid droplets, the cytoplasm also contains reddish yolk platelets (in H&E stained sections). Fine blue granules are evenly distributed between lipid droplets and yolk platelets (Fig.5A; 6A). Follicular cells surround both the cell body and its base near trabecula.

Stage 4 oocyte (Oc_4): This cell is large and assumes a polygonal shape. Some are still attached to trabeculae by slender cytoplasmic processes. The cell size is about 60-80 mm, with nuclear size about 35 mm. The nucleus contains mostly euchromatin and transparent nucleoplasm. Hence the nucleolus is clearly visible, and it also becomes enlarged and more transparent in comparison to earlier stages. The cytoplasm is filled with reddish yolk platelets

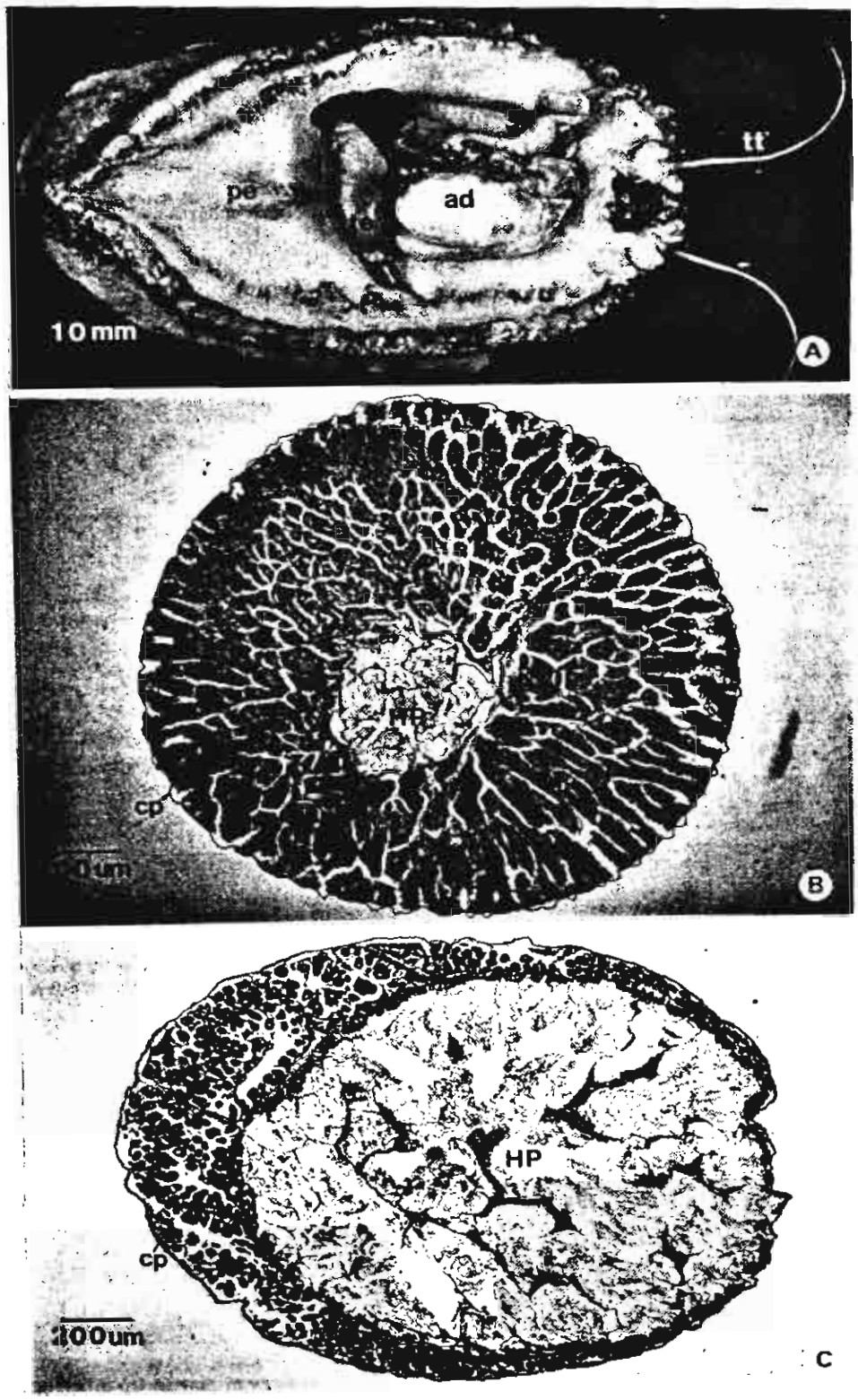


Fig.1 A) The dorsal view of a shell-freed male abalone, showing testis (te), adductor muscle (ad), pedal muscle (pe), and tentacle (tt).

B) Cross section of the testis, showing hepatopancreas (HP) surrounded by testicular tissue which is, in turn, surrounded by thin connective tissue capsule (cp).

C) Cross section of the ovary, showing hepatopancreas (HP) surrounded by ovarian tissue and fibrous capsule (cp).

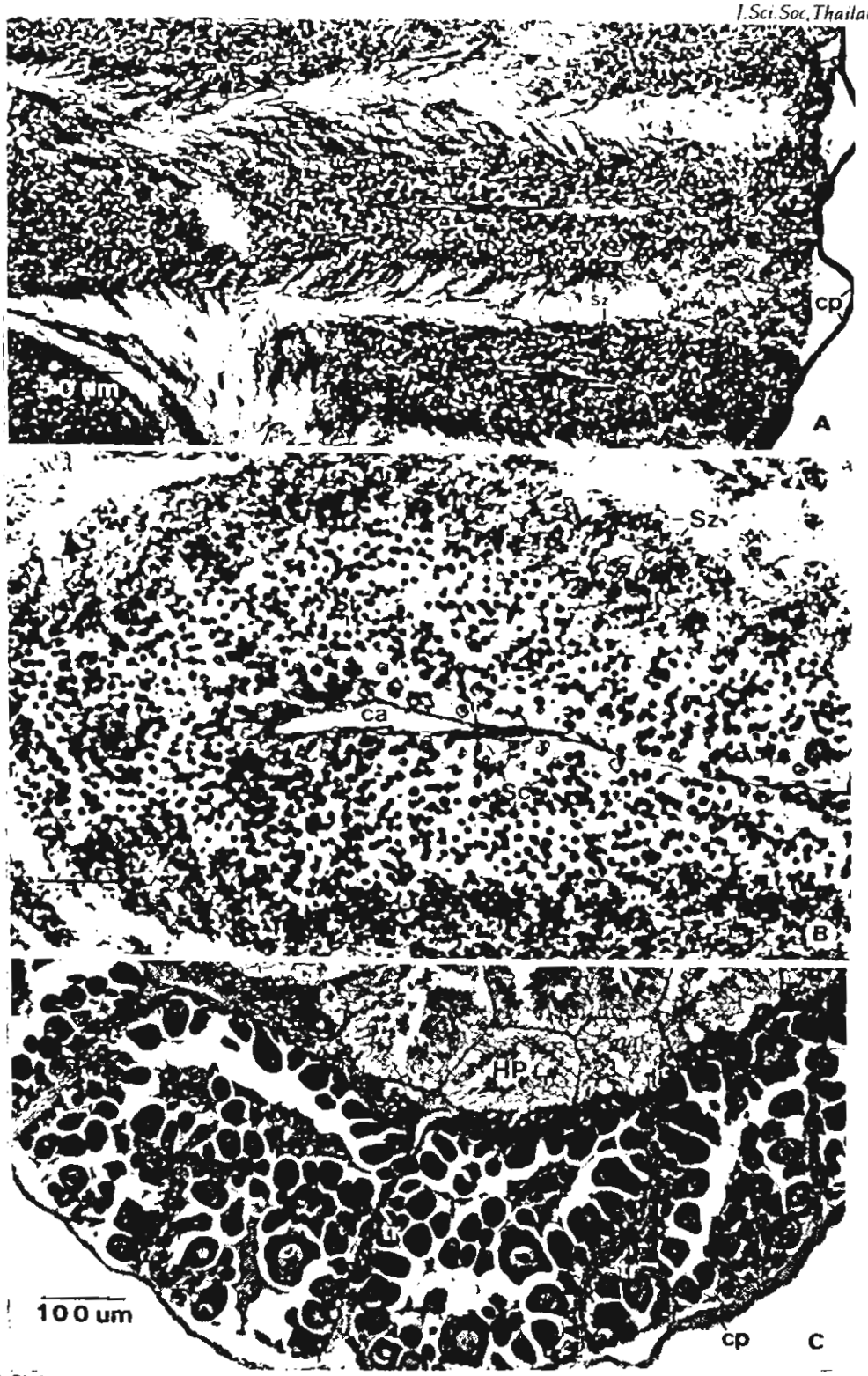


Fig.2 A,B) A spermatogenic unit consists of a central trabecula (tr) arising from capsule (cp-in A), surrounded by various stages of germ cells. A capillary (ca) is present inside each trabecula, and successive maturing stages of germ cells lie at different distance from the connective of trabecula (Sc-spermatocyte, St-spermatid, Sz-spermatozoa).

C) An oogenetic unit also consists of an axis of trabecula (tr) surrounded by early stages of oocytes (I-III). Late stages oocytes (IV, V) are released into the central area of the compartment partitioned off by adjacent trabeculae.

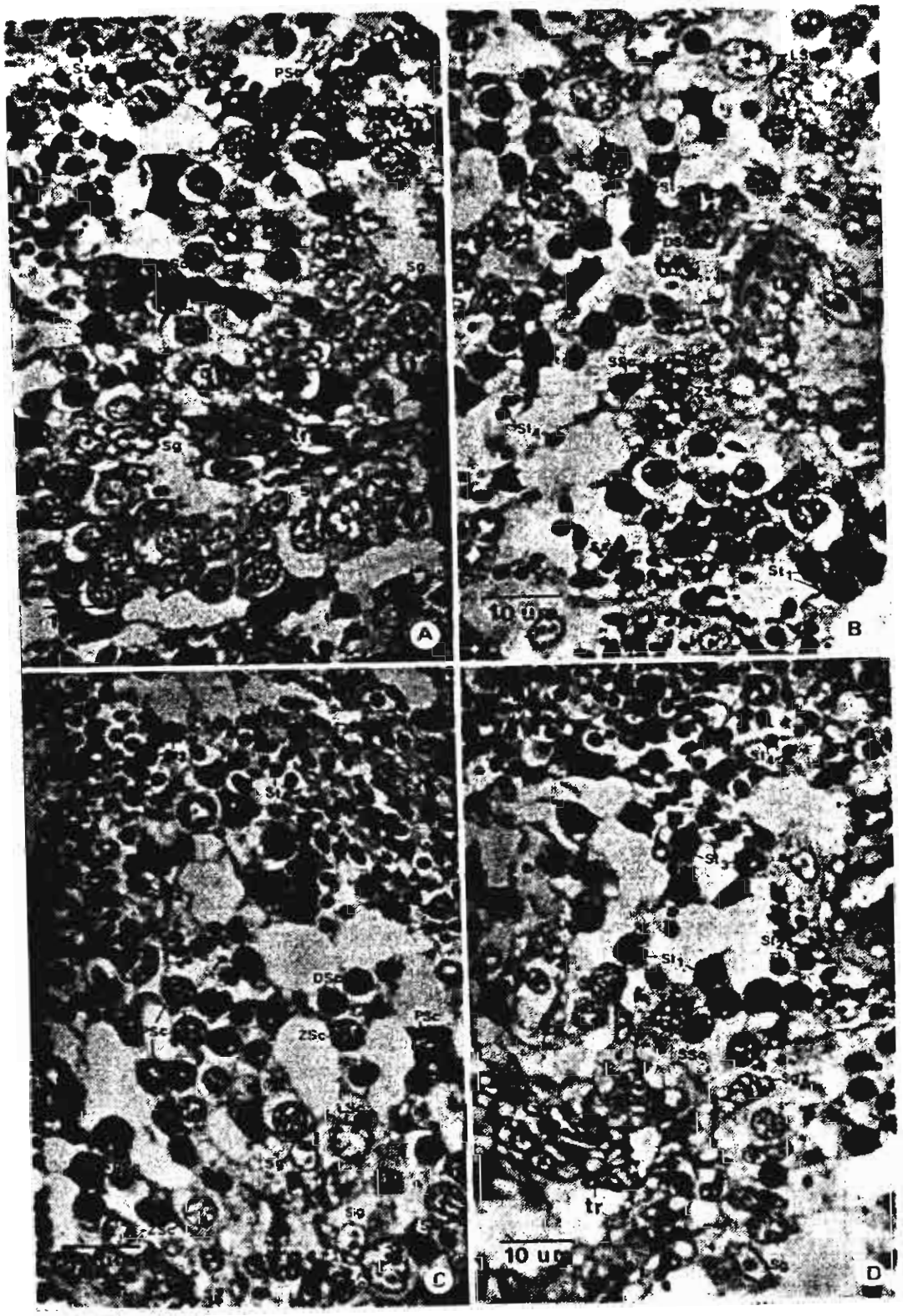


Fig.3 A-D) Semithin sections demonstrating various stages of male germ cells. Lying closest to each trabecula (tr) are spermatogonia (Sg), different stages of primary spermatocytes (LSc-leptotene; ZSc-zygotene; PSc-pachytene; DSc-diplotene; MSc-metaphase), and further away are secondary spermatocytes (SSc), various stages of spermatids (St_{1-4}), and on the outermost periphery of a spermatogenic unit are spermatozoa (Sz_{1-2})

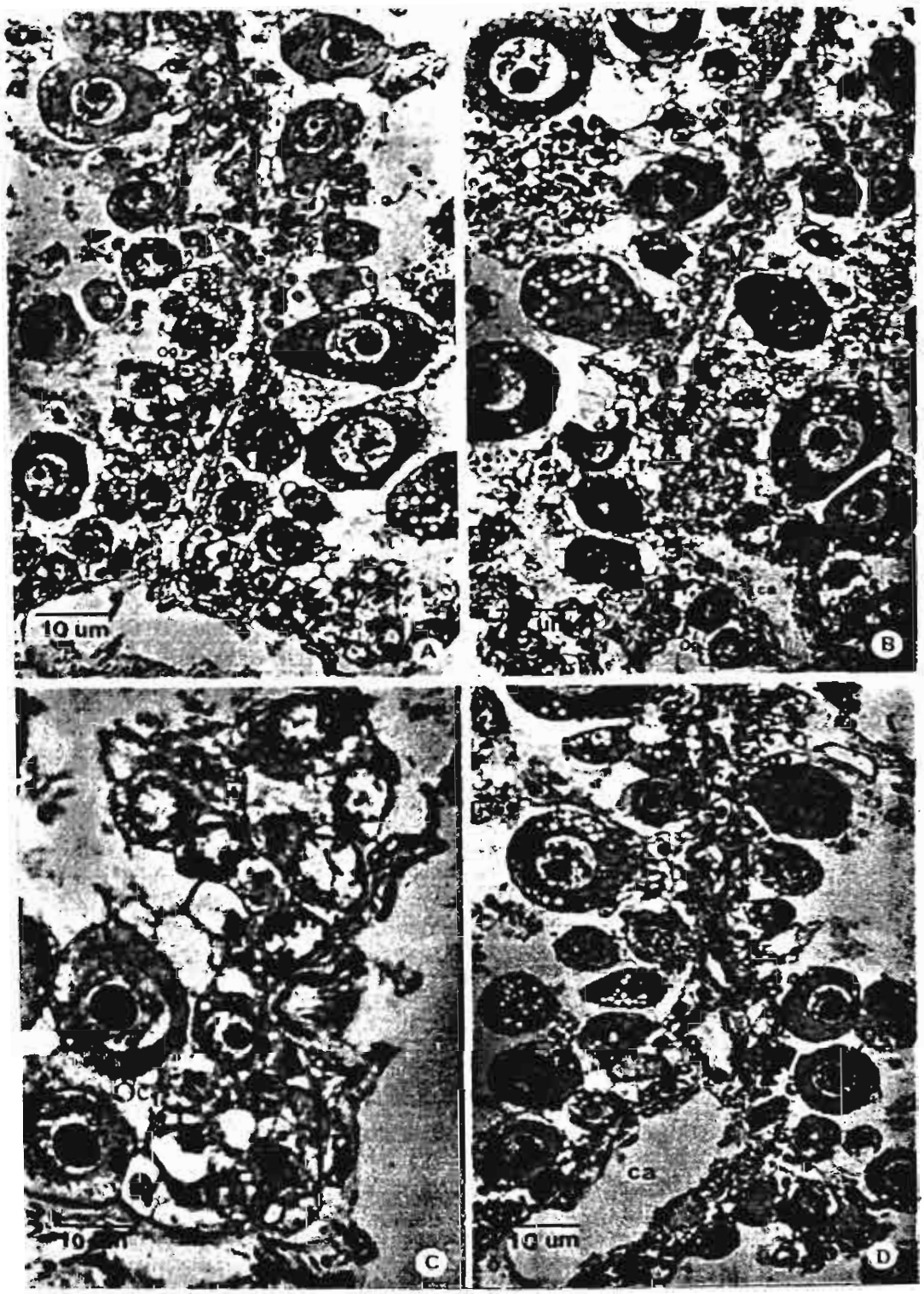


Fig.4 A-D) Semithin sections demonstrating various stages of oocytes surrounding each trabecula (tr), which contains a capillary (ca) in the center. Closely attached to the connective of trabecula are oogonia (Og), stage I-III oocytes (Oc_1-Oc_3) In A and D there are clusters of oogonia lying close in the areas where trabeculae arise from the capsule

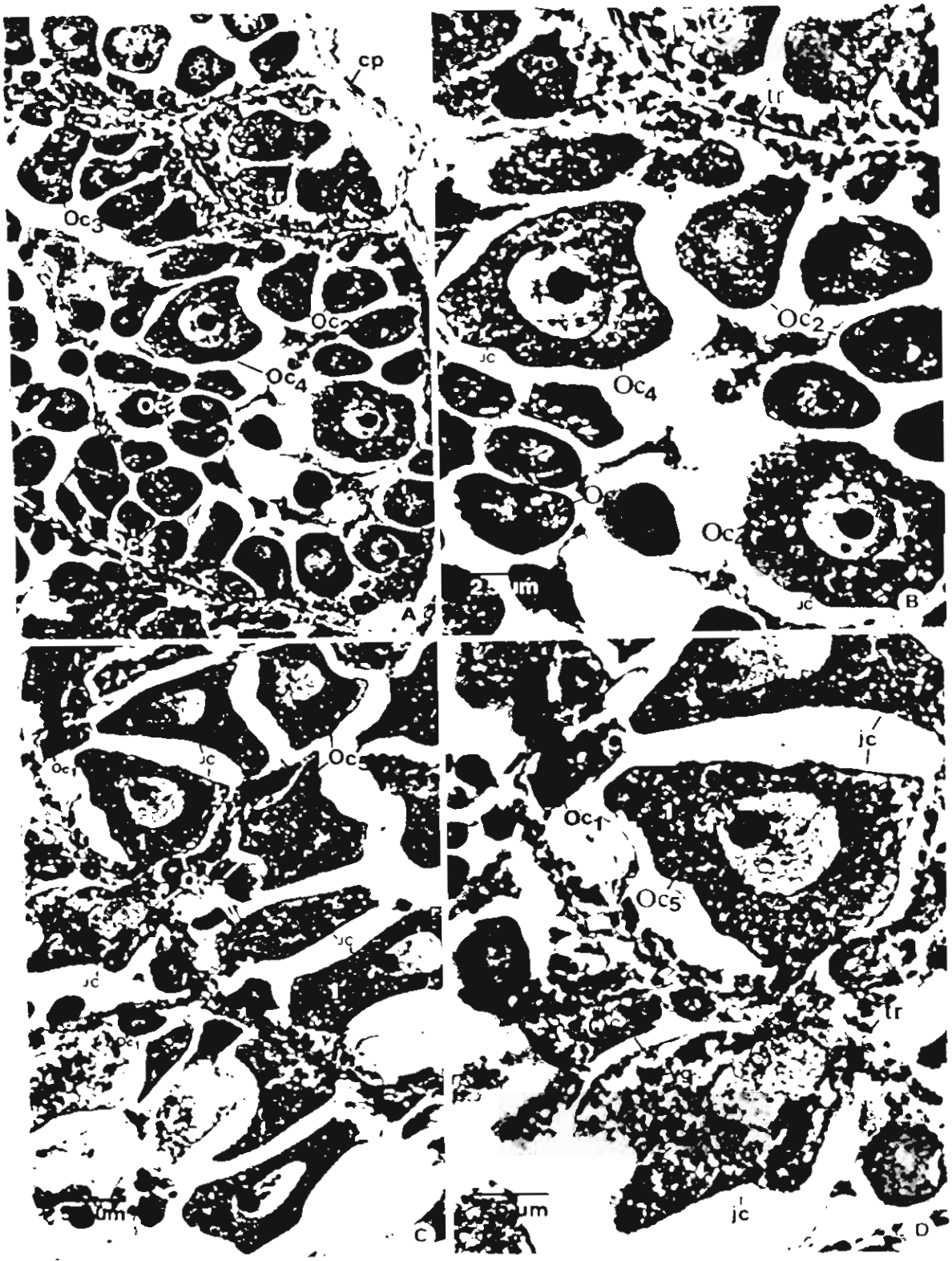


Fig.5 A-D) Paraffin sections showing stages I and II oocytes (Oc_1, Oc_2) which are abundant in A, and these cells exhibit intensely basophilic cytoplasm. In B there are two stage IV oocytes (Oc_4) showing abundant yolk platelets in the cytoplasm, and very thin jelly coat (jc). In C there are numerous stage V oocytes (Oc_5) which show intensely eosinophilic cytoplasm and thick jelly coat. In D there are two subtypes of stage V cells: the upper cell (1) shows small and evenly distributed eosinophilic yolk granules, and the lower cell (2) shows large platelets of yolk.

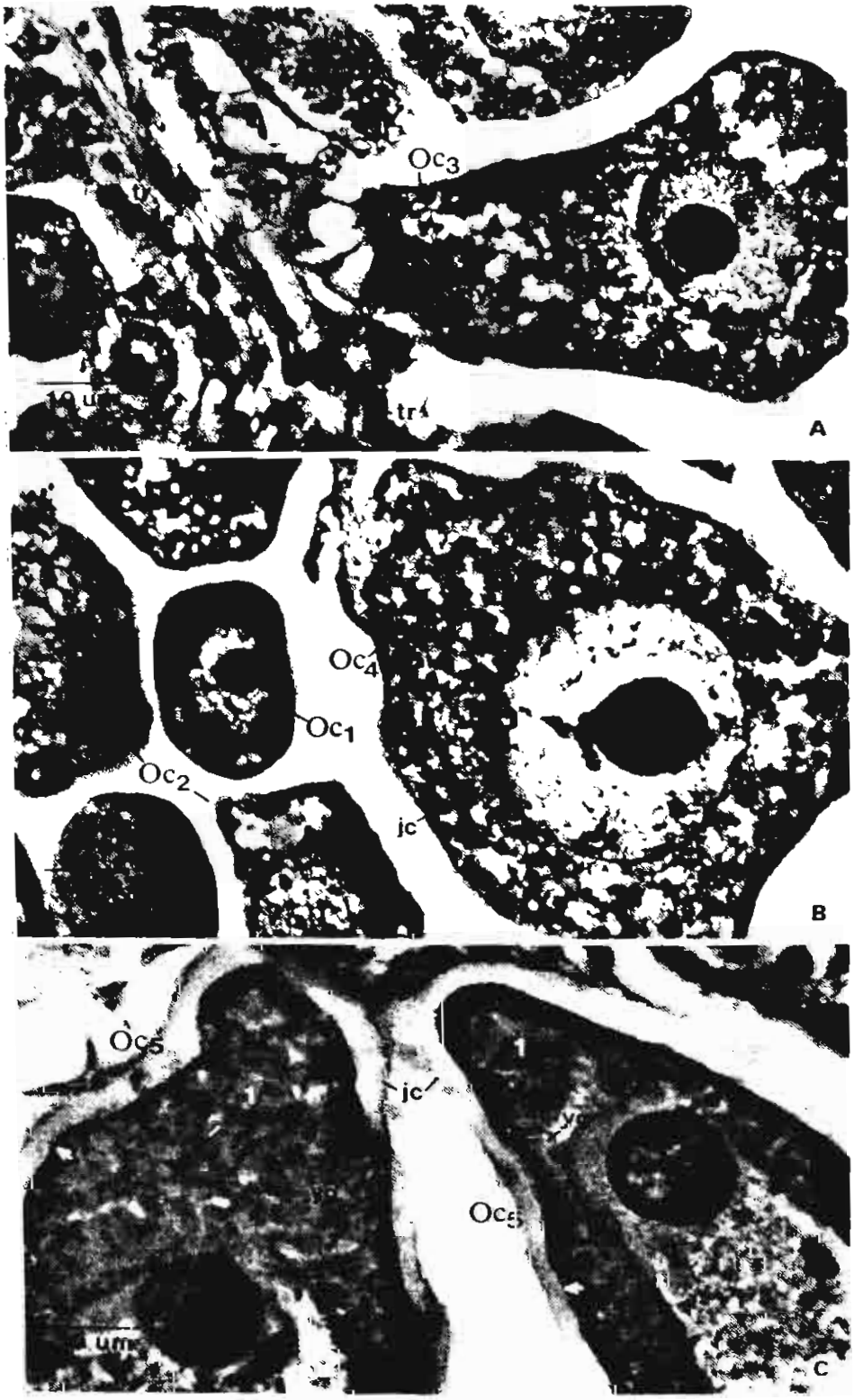
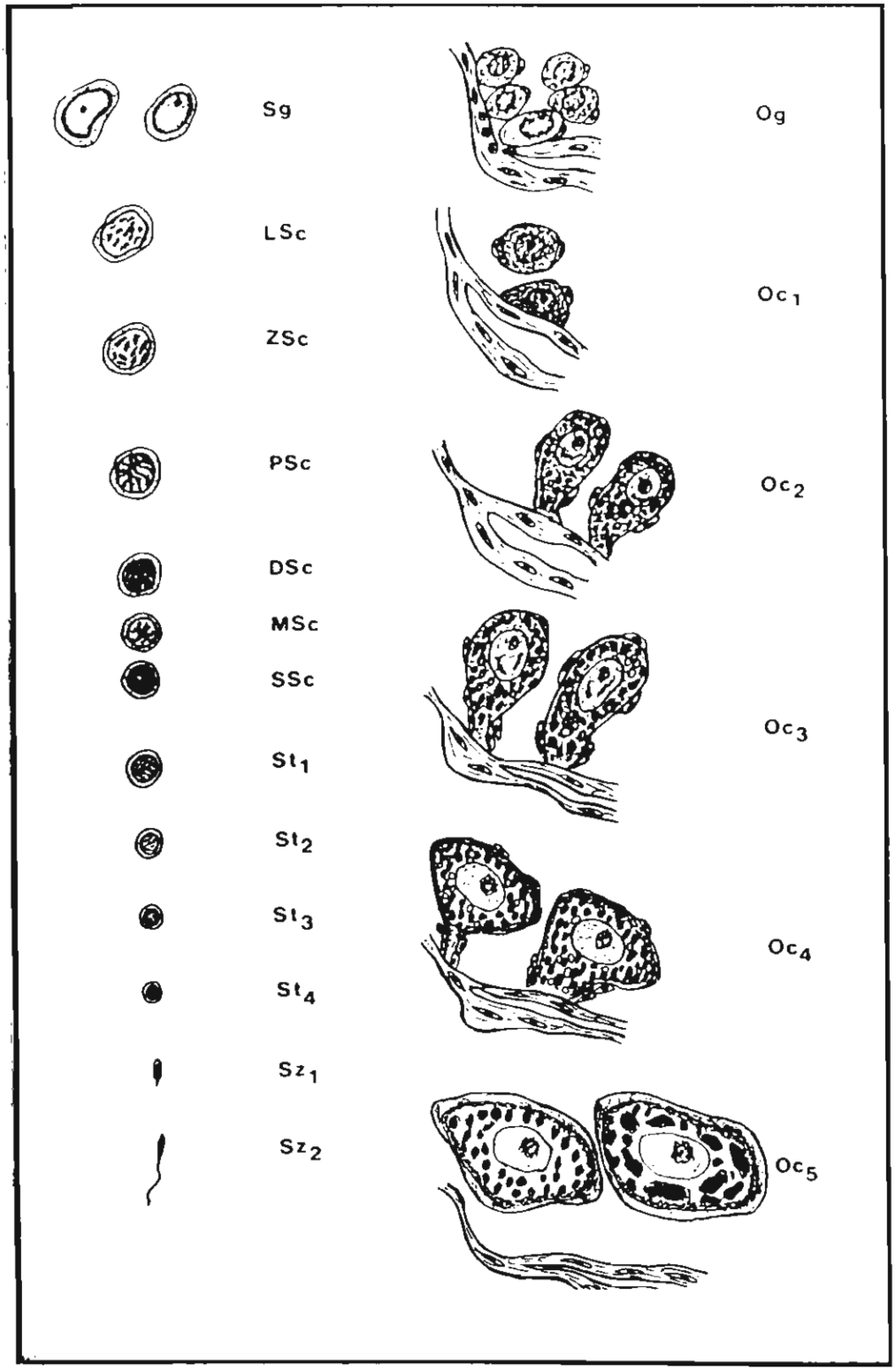


Fig.6 Paraffin sections showing stage III oocytes (Oc_3) in A, stage IV (Oc_4) in B, and stage V (Oc_5) in C. Notice the first appearance of jelly coat in stage IV, and increasing number of yolk platelets in stage IV and V. The increasing amount of euchromatin, which is pale stained, and the enlargement and vesiculation of nucleolus are also noticeable from III to V. Blue stripe underneath the oocyte's plasma membrane is present in stages IV and V.



TextFig. 1 A schematic drawing summerizes various stages of male and female germ cells with associated characteristics. In male line there are spermatogonia (Sg), five stages of primary spermatocytes (LSc-leptotene; ZSc-zygotene; PSc-pachytene; DSc-diplotene; Msc-metaphase), secondary spermatocyte (SSc), four stages of spermatids (St_{1-4}), and two stages of spermatozoa (Sz_{1-2}). In female line there are oogonia (Og), and five stages of primary oocytes (Oc_1-Oc_5).

and a few lipid droplets. Fine blue-stained granules are decreased in central area of the cytoplasm, but the remainings are translocated to concentrate as a stripe underneath the plasma membrane (Fig.5B; 6B). A thin layer of jelly coat begins to form on the outer surface of the cell membrane. This coat is PAS positive, and it is in turn surrounded by follicular cells.

Stage 5 oocyte (Oc_5): This is the fully mature oocyte before being released from the adult female. Oc_5 is the largest cells with polygonal shape (Fig.5C,D; 6C). The cell size is about 80-140 mm, with nuclear size about 40 mm. The nucleus exihibits similar characteristics as that of Oc_4, but with completely enlarged nucleolus (Fig.6C). Oc_5 could be divided into 2 subgroups based on the characteristics of yolk platelets. The first subgroup contains small and similar size yolk platelets that are scattered evenly throughout the cytoplasm. In the second subgroup, the yolk platelets are variable in size, and most are large bodies that could be formed by the coalescence of the smaller yolk platelets (Fig.5D). Stripe of fine blue granules are also located underneath the cell membrane as in Oc_4. There is a thick PAS positive jelly coat on the outer surface of the cell membrane without the surrounding layer of follicular cells. All Oc_5 are completely detached from the connectives of trabeculae.

DISCUSSION

There have been serveral studies on the gonadal histology and germ cell classification of temperate species of abalones because of the benefit that could be gained from applying the knowledge of reproductive biology, especially the reproductive cycle and spawning of mature gamete cells, to increase the yeild in aquaculture systems. Croft[7] was the first person who performed detailed morphologic studies on an abalone species, *H. tuberculata*, and showed the basic histology of the gonads being composed of fibrous capsular and trabecular arrangement, from which germ cells are generated. Similar histological studies in other species were later performed by many investigators[4-6,8-14]. A fine structural study of the ovarian cells in the red abalone, *H. rufescence*, was also undertaken by Martin *et al.*[15]. All these studies confirmed similar pattern of structural organization of the gonads. However, there are some disagreements on the classification of germ cells in the oogenetic and spermatogenic processes. Tomita[4,5] classified female germ cells into 7 stages (oogonium and 6 stages of oocytes), based on elaborate consideration of sizes and histological features; while classifying male germ cells into 4 stages (spermatogonium, spermatocytes, spermatid and spermatozoa). On the other extreme Takashima *et al.*[6] had suggested that there are up to 9 stages of female germ cells and 5 stages of male germ cells (2 stages of spermatogonia in addition to others) in *H. diversicolor diversicolor*. On the other hand, Young & DeMartini[11] suggested that there are only 4 stages of female germ cells and 4 stages of male germ cells, with ill-defined cell stages in spermiogenesis during which spermatids are transformed to spermatozoa. Utilizing the high resolution TEM to study the relative abundance of various organelles particularly ribosomes, and the developement of rough endoplasmic reticulum and Golgi complexes in the cells, Martin *et al.*[15] suggested that there are 5 stages of female germ cells in *H. rufescens*, which they termed oogonium, presynthetic oocyte, synthetic oocyte, early postsynthetic oocyte and fully developed postsynthetic oocyte. We feel that the classification based on size alone, as adopted by many investigators, is not a good criterion for dividing cells in a single line of differentiation into various stages, because in reality these cells are undergoing continuous development. A better criterion would be to divide the cells according to the changings in histological features which exhibit definite landmarks for distinctive developmental stages. In our study of *H. asinina*, we have used the following characteristics for dividing the stages of female germ cells: (1) the appearance of chromatin and nucleolus; (2) the clarity of nuclear membrane which is the result of the density

and a few lipid droplets. Fine blue-stained granules are decreased in central area of the cytoplasm, but the remainings are translocated to concentrate as a stripe underneath the plasma membrane (Fig.5B; 6B). A thin layer of jelly coat begins to form on the outer surface of the cell membrane. This coat is PAS positive, and it is in turn surrounded by follicular cells.

Stage 5 oocyte (Oc_5): This is the fully mature oocyte before being released from the adult female. Oc_5 is the largest cells with polygonal shape (Fig.5C,D; 6C). The cell size is about 80-140 mm, with nuclear size about 40 mm. The nucleus exihibits similar characteristics as that of Oc_4, but with completely enlarged nucleolus (Fig.6C). Oc_5 could be divided into 2 subgroups based on the characteristics of yolk platelets. The first subgroup contains small and similar size yolk platelets that are scattered evenly throughout the cytoplasm. In the second subgroup, the yolk platelets are variable in size, and most are large bodies that could be formed by the coalescence of the smaller yolk platelets (Fig.5D). Stripe of fine blue granules are also located underneath the cell membrane as in Oc_4. There is a thick PAS positive jelly coat on the outer surface of the cell membrane without the surrounding layer of follicular cells. All Oc_5 are completely detached from the connectives of trabeculae.

DISCUSSION

There have been serveral studies on the gonadal histology and germ cell classification of temperate species of abalones because of the benefit that could be gained from applying the knowledge of reproductive biology, especially the reproductive cycle and spawning of mature gamete cells, to increase the yeild in aquaculture systems. Croft[7] was the first person who performed detailed morphologic studies on an abalone species, *H. tuberculata*, and showed the basic histology of the gonads being composed of fibrous capsular and trabecular arrangement, from which germ cells are generated. Similar histological studies in other species were later performed by many investigators[4-6,8-14]. A fine structural study of the ovarian cells in the red abalone, *H. rufescence*, was also undertaken by Martin *et al.*[15]. All these studies confirmed similar pattern of structural organization of the gonads. However, there are some disagreements on the classification of germ cells in the oogenetic and spermatogenic processes. Tomita[4,5] classified female germ cells into 7 stages (oogonium and 6 stages of oocytes), based on elaborate consideration of sizes and histological features; while classifying male germ cells into 4 stages (spermatogonium, spermatocytes, spermatid and spermatozoa). On the other extreme Takashima *et al.*[6] had suggested that there are up to 9 stages of female germ cells and 5 stages of male germ cells (2 stages of spermatogonia in addition to others) in *H. diversicolor diversicolor*. On the other hand, Young & DeMartini[11] suggested that there are only 4 stages of female germ cells and 4 stages of male germ cells, with ill-defined cell stages in spermiogenesis during which spermatids are transformed to spermatozoa. Utilizing the high resolution TEM to study the relative abundance of various organelles particularly ribosomes, and the developement of rough endoplasmic reticulum and Golgi complexes in the cells, Martin *et al.*[15] suggested that there are 5 stages of female germ cells in *H. rufescens*, which they termed oogonium, presynthetic oocyte, synthetic oocyte, early postsynthetic oocyte and fully developed postsynthetic oocyte. We feel that the classification based on size alone, as adopted by many investigators, is not a good criterion for dividing cells in a single line of differentiation into various stages, because in reality these cells are undergoing continuous development. A better criterion would be to divide the cells according to the changings in histological features which exhibit definite landmarks for distinctive developmental stages. In our study of *H. asinina*, we have used the following characteristics for dividing the stages of female germ cells: (1) the appearance of chromatin and nucleolus; (2) the clarity of nuclear membrane which is the result of the density

difference between the condensed chromatin in the nucleus and the surrounding cytoplasm; (3) the basophilia or the bluishness imparted to the cytoplasm of the cells by basophilic dyes; (4) the presence of lipid droplets; (5) the occurrence of eosinophilic yolk granules and their relative abundance; and (6) the presence of jelly coat surrounding the egg cells. By using these rather stringent morphological criteria, we have identified 5 stages of egg cells, starting from oogonia which are the smallest cells closely attached to the trabecula connectives (TextFig.1). These cells could maintain a constant pool of early stem cells, particularly those that are clustered towards the capsular side of trabeculae. During the spent period when most mature oocytes are released from the ovary and the connective tissues of trabeculae are breaking down, these cells are the only remaining group of germ cells. The restoration of gonadal structure during proliferative phase is carried out by the regeneration of connective tissues of trabeculae and the proliferation of this pool of oogonia.

The first stage of oocytes include cells of different sizes ranging from 20-24 mm. The most pronounced characteristics that they exhibit is the increasing basophilia or bluishness of their cytoplasm. And because of similar degree of density between the cytoplasm on one hand, and the partially condensed chromatin and dense nucleoplasm on the other, the outline of nuclear membrane could not be easily discerned. The nucleolus, while present, is not outstanding (TextFig.1). All Oc_1 are surrounded by a single layer of flat follicular cells. We believe that the cytoplasmic basophilia reflects the increasing amount of ribosomes which will equip the cells to start synthesizing yolk proteins, much like the basophilic erythroblasts preparing themselves for synthesizing hemoglobin during the process of erythroid cell differentiation in vertebrates[16].

Oc_2 is the stage that first show the presence of lipid droplets in the less intense basophilic cytoplasm. Due to the decondensation of most chromatin, and the increased translucence of the nucleoplasm, the nuclear membrane could be clearly observed. For similar reasons the nucleolus also becomes more distinct, and because of its enlargement the nucleolar activities for ribosomal synthesis is believed to be on the increase. Contrary to the notion put foward by Martin *et al.* (15), we believe that Oc_1 and Oc_2 are actively synthetic cells, readying themselves for making yolk protein. The quiescent or presynthetic stage, if at all present, could occupy only a very short interval during the transition of oogonium to small Oc_1 cells.

Oc_3 is the stage where yolk granules, the product of synthetic activities during Oc_1 and Oc_2 stages, make their first appearance. The yolk granules or platelets are eosinophilic, hence rendering the cytoplasm of Oc_3 more reddish in contrast to that of Oc_2. We believe that this is the stage where yolk proteins start to accumulate as a result of the intense synthetic activity. Oc_3 is still surrounded by a single layer of follicular cells, which by this time consists of serveral cells because of the increase in size of Oc_3. In addition, Oc_3 is further detached from the connectives of trabeculae and assumes a pear or even tear-drop shape. The chromatin becomes completely euchromatin and the nucleolus is enlarged further, which implies the active transcriptional activities.

Oc_4 is the stage where a thin jelly coat becomes detectable, and it is sandwiched inbetween the egg's cell membrane and the surrounding layer of follicular cells. The cytoplasm of Oc_4 becomes increasingly eosinophilic and appears more reddish due to the binding of numerous yolk granules to eosin. While the jelly coat is intensely PAS positive, the yolk granules are completely PAS negative. This contrasting feature implies that there may be very little or no carbohydrate moieties in the yolk granules, while these are the major constituent of the jelly coat. The chromatin of Oc_4, like that of Oc_3, is completely in euchromatic state and the

nucleolus is fully enlarged and even appears eosinophilic. These indicate very high levels of both nuclear and nucleolar transcriptional activities.

Another remarkable feature of Oc_4 is the appearance of a narrow bluish stripe of cytoplasm just underneath the cell membrane, while the bluishness of the main body of cytoplasm is much decreased in comparison to Oc_2 and Oc_3. This could be due either to the break down of most ribosomes and the reaggregation of the residual mass into bluish clumps underneath the membrane, much like the remaining basophilic reticulum of degraded ribosomes in the cytoplasm of reticulocytes during erythroid cell differentiation[16]. Alternatively, the narrow bluish stripe could be the zone that contains a high concentration of basophilic granules, like the cortical granules which appear in late stage of egg cells as reported in many species. Observation at electron microscopic level will help to clarify this controversy.

Oc_5 is the stage where the jelly coat becomes uniformly thick and deprived of surrounding layer of follicular cells. The cell appears completely mature and is fully detached from the trabeculae. The absence of follicular cells might allow the detachment of Oc_5 into space between trabeculae and ready to be released from the ovary. From this appearance it could be speculated that the major roles of follicular cells are protective and helping to maintain the adherence between oocytes and trabecula connective tissue, while the latter is undergoing maturation. In addition, follicular cells could be involved in nutritive function for oocytes, and its role in synthesizing the jelly coat could be envisaged by electron microscopic and labelling studies.

The cytoplasm of Oc_5 is laden with reddish yolk granules. Based on the size of the yolk granules there could be 2 subgroups of Oc_5: one containing small granules of uniform size while another contains very large granules. It is still not possible to confirm whether these are two separate stages of Oc_5, or that the latter merely represent the final stage in which small yolk granules are coalesced to form large granules. In any cases these two subgroups of Oc_5 should represent fully mature cells.

Up to now most studies have not rigorously catagorize various spermatogenic cells of *Haliotis*, apart from suggesting broadly that there are 4 stages, *ie.*, spermatogonium, spermatocytes, spermatids and spermatozoa. In our study, we could classify the male germ cells in *H. asinina* into 13 specific stages according to size, the appearance of chromatin and the presence or absence of nucleolus. Spermatogonium is the earliest cell whose nucleus contains almost all euchromatin which results in the nucleus being very clear and nucleolus is prominent. Gonial cells divided mitotically to give rise to primary spermatocytes, which pass through 5 stages as in the first meiotic division of vertebrates' germ cells (TextFig.1). These prophase cells exhibit different forms of chromatin condensation, starting from small to larger blocks of heterochromatin that are evenly scattered throughout nucleus in LSc and ZSc. Heterochromatin blocks transform to thread-like pattern that are increasing in thickness and become more entwined in PSc and DSc. Finally in MSc stage chromatin appears as pairs of chromatids that are arranged on the equatorial region. Secondary spermatocytes are rare since they probably transit quickly to the next stage similar to the cases of vertebrates' male germ cells.

Four stages of spermatids could be identified in *H. asinina*. The first two stages exhibit finely granulated chromatin that appears homogeneous and evenly stained throughout the nucleus. St_1 and St_2 is thus distinguished mainly by the difference in size (St_1 about 6 mm versus St_2 about 4 mm). In the third stage (St_3) the granulated chromatin begins to clump together, particularly along the nuclear envelope, leaving clear areas between blocks of dense

chromatin. The decrease in volume of the nucleus results in the total clumping and condensing of chromatin mass in St_4. The two stages of spermatozoa are distinguished by their ellipsoid nuclei. Sz_1 also shows the initial formation of acrosome as a clear cap-like structure on one end of the nucleus, while exhibiting only short tail. In Sz_2 the nucleus is elongated further and chromatin appears completely dense. They also exhibit long tails that point outwards from each trabecula. The application of TEM will resolve the state of chromatin condensation better, and help to confirm the above classification scheme. This work is currently in progress in our laboratory.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study received financial support from the Thailand Research Fund (Contract BRG/04/2540).

REFERENCES

1. Tookwinas, S., Leknim, W., Donyadol, Y., Preeda-Lampabutra, Y., Perngmak, P. (1986) Survey on species and distribution of abalone *(Haliotis* spp.) in Surajthani, Nakornsrithammaraj and Songkhla provinces. Technical Paper No.1/1986, National Institute of Coastal Aquaculture, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. 16p.
2. Nateewathana, A., Hylleberge, J. (1986) A survey on Thai abalone around Phuket Island and feasibility study of abalone culture in Thailand. *Thai Fish. Gazette* **39**, 177-190.
3. Singhagraiwan, T., Sasaki, M. (1991) Breeding and early development of the donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linne. *Thai Mar. Fish. Res. Bull.* **2**, 83-94.
4. Tomita, K. (1967) The maturation of the ovaries of the abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, in Rebun Island, Hokkaido, Japan. *Sci. Rep. Hokkaido Fish. Exp. Sta.* **7**, 1-7.
5. Tomita, K. (1968) The testis maturation of the abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, in Rebun Island, Hokkaido, Japan. *Sci. Rep. Hokkaido Fish. Exp. Sta.* **9**, 56-61.
6. Takashima, F., Okuno, M., Nishimura, K., Nomura, M. (1978) Gemetogenesis and reproductive cycle in *Haliotis diversicolor diversicolor* Reeve. *J. Tokyo Univ. Fish.* **1**, 1-8.
7. Crofts, D.R. (1929) *Haliotis*. Liverpool Mar. Biol. Comm. Mem. **29**, 1-174.
8. Boolootian, R.A.,Farmanfarmaian, A., Giese, A.C. (1962) On the reproductive cycle and breeding habits of two western species of *Haliotis*. *Biol. Bull.* **122**, 183-193.
9. Newman, G.G. (1967) Reproduction of the South African abalone *Haliotis midae*. Investigational Report. Division of Sea Fisheries, Republic of South Africa, No.64, 24p.
10. Webber, H.H., Giese, A.C. (1969) Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone *Haliotis cracherodii* (Gastropoda: Prosobranchiata). *Mar. Biol.* **4**, 152-159.
11. Young, J.S., DeMartini, J.D. (1970) The reproductive cycle, gonadal histology, and gametogenesis of the red abalone, *Haliotis rufescens* (Swainson). *Calif. Fish and Game* **56**, 298-309.
12. Harrison, A.J., Grant, J.F. (1971) Progress in abalone research. *Tasm. Fish. Res.* **5**, 1-10.
13. Brickey, B.E. (1979) The histological and cytological aspects of oogenesis in the California abalones. M.A. Thesis, California State University, Long Beach, California.
14. Tutschultz, T., Connell, J.H. (1981) Reproductive biology of three species of abalone *(Haliotis)* in Southern California. *The Veliger*. **23**, 195-206.
15. Martin, G.G., Romero, K. Miller-Walker, C. (1983) Fine Structure of the Ovary in the Red Abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca: Gastropoda). *Zoomorphology*. **103**, 89-102.
16. Weiss, L. (1988) The life cycle of blood cells. In: Cell and Tissue Biology: A Textbook of Histology (edited by L. Weiss), Sixth edition, Urban & Schwarzenberg, p.449-452.

บทคัดย่อ

อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อที่ผลิตเซลล์สืบพันธุ์ คือ รังไข่และอัณฑะซึ่งมีถุงหุ้ม เยื่อเกี่ยวพันจากถุงหุ้มแทรกเข้าไปในรังไข่และอัณฑะเป็นแผง trabeculae ที่มีเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต้นและขั้นปลายหุ้มอยู่รอบๆ ในรังไข่เซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วย 6 ระยะ คือ oogonium, primary oocytes ขั้นที่ I, II, III, IV และ V ซึ่งมีความแตกต่างกันตามปริมาณสาร basophilia ก้อนไขมันและสารไข่ (yolk) ที่เซลล์แต่ละขั้นสร้างขึ้น ในอัณฑะเซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วย 13 ระยะ คือ spermatogonium, primary spermatocytes 5 ระยะ, secondary spermatocyte, spermatids 4 ระยะ และ spermatozoa 2 ระยะ

DUPLICATE เอกสารหมายเลข 10.2.2

.urnal of Shellfish Research, Vol. 17, No. 3, 000–000, 1998.

CLASSIFICATION OF NEUROSECRETORY CELLS, NEURONS, AND NEUROGLIA IN THE CEREBRAL GANGLIA OF *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS BY LIGHT MICROSCOPY

E. S. UPATHAM,[1] A. THONGKUKIATKUL,[1] M. KRUATRACHUE,[1] C. WANICHANON,[2] Y. P. CHITRAMVONG,[1] S. SAHAVACHARIN,[3] AND P. SOBHON[2]

[1]*Department of Biology*
Faculty of Science
Mahidol University
Bangkok 10400, Thailand
[2]*Department of Anatomy*
Faculty of Science
Mahidol University
Bangkok 10400, Thailand
[3]*Coastal Aquaculture Development Center*
Prachuap Khiri Khan 77000, Thailand

ABSTRACT The gross anatomical study of the nervous system of *Haliotis asinina* reveals that it comprises a pair of cerebral ganglia, a buccal ganglion, a pleuropedal ganglion mass, and a visceral ganglion, connected together by nerve commissures and connectives. There are eight types of nerve cells in the cerebral ganglia on the basis of their histological characteristics and stain affinity: two types of neurosecretory cells, three types of neurons, and three types of neuroglia. The neurosecretory cells are large and occur along the periphery of the ganglia. They contain neurosecretory granules in the cytoplasm that stained deep violet with paraldehyde-fuchsin. The neurons are the most numerous cell type and occur in various parts of the cortex. The neuroglia are small cells and contain spindle-shaped nuclei.

KEY WORDS: abalone, cerebral ganglia, *Haliotis asinina*, histological study

INTRODUCTION

The abalone is one of the most primitive gastropods in form and structure. The central nervous system of abalone is of the streptoneurous type, with no concentration of neuronal mass, and it consists of several ganglia connected by connectives and commissures (Bullock 1965, Joosse 1979). Most ganglia are elongated and flattened, and sheaths of ganglion cells usually extend to form flat commissures and connectives linking ganglia together (Crofts 1929).

The cerebral ganglia are the most anterior ganglia in the head. They are paired, lie above the esophagus or buccal mass, and are connected by a long commissure (Dorsett 1986). The cerebral ganglia have connectives to the buccal, pleural, and pedal ganglia, and they send nerves to innervate the eyes, statocysts, and head tentacles (Crofts 1929, Bullock 1965), thus playing an important role in guiding the animals around their habitat.

The cerebral ganglia of several temperate abalone species have been extensively studied., e.g., *Haliotis tuberculata* Linnaeus, *Haliotis lamellosa* Lamarck, *Haliotis cracherodii* Leach, *Haliotis rufescens* Swainson, *Haliotis discus hannai* Ino, and *Nordotis discus* Reeve (Crofts 1929, Miller et al. 1973, Hahn 1994a, Yahata 1971). Several types of neurons and neurosecretory cells have been described in the ganglia (Miller et al. 1973, Yahata 1971, Hahn 1994a). Yahata (1971) and Hahn (1994a) reported that there were four types of neurons in the cerebral ganglia of *N. discus* and *H. discus hannai*, which were designated as types A, B, C, and D. Type A and Type B cells were believed to be neurosecretory cells. This article reports on the gross anatomy of the nervous system and the classification, based on the histological characteristics of neurons and other cell types in the cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus, which is a tropical abalone species native to Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Anatomical Study

Mature abalone, *H. asinina*, with a shell length of 4–5 cm were obtained from the Coastal Aquaculture Development Center, Klong Wan, Prachuap Khiri Khan Province, Thailand. These animals were reared in a land-based aquaculture system in well-circulated and aerated seawater. They were given appropriate algal food *ad libitum* and kept under normal daylight. Abalone were anesthesized with 5% MgCl, after which their shells were removed. They were then placed on a layer of paraffin wax poured on an enamel pan and immersed in 70% alcohol. The dissections were made under a stereomicroscope, which was also used to make drawings with the aid of a camera lucida.

Histological Study

The cerebral ganglia were dissected out and fixed in Bouin's fluid in 0.14 NaCl for 12 h. Tissues were dehydrated through a graded series of ethanol, infiltrated with dioxane, and embedded in paraffin. Sections were cut at 5–6 μm thickness and stained with hematoxylin-eosin (H&E), chrome-hematoxylin-phloxine (CH-P) (Gomori 1941), and paraldehyde-fuchsin (PF) (Gomori 1950). Neurons and cells in the cerebral ganglia were observed and evaluated for their cell size and shape, nuclear size and shape, and staining affinity under an Olympus Vanox light microscope.

RESULTS

Anatomical Study

The nervous system of *H. asinina* consists of a pair of cerebral ganglia, a buccal ganglion, a pleuropedal ganglion mass, and a visceral or abdominal ganglion. These ganglia are connected by nerve commissures and connectives (Fig. 1). The cerebral ganglia are connected by dorsal and ventral cerebral commissures. Thus, the ganglia and commissures surround the anterior esophagus. The middle part of the ventral cerebral commissure swells into a small buccal ganglion. Two major nerves, i.e., the optic and tentacle nerves, join the cerebral ganglia separately (Fig. 1). Optic nerves innervate the eyes, whereas tentacle nerves innervate the tentacles. The cerebropleural and cerebropedal connectives leave the ventroposterior part of the cerebral ganglia and merge into a pleuropedal ganglion mass. Arising from this mass are two loops of nerve cords: the visceral cord and the paired pedal nerve cords. The visceral cord twists into a figure 8 around the visceral mass. At its posterior end is a single visceral ganglion that gives off many nerves going to digestive and reproductive organs. The paired pedal nerve cords run parallel along the midline of the foot muscle (Fig. 1). The two pedal cords are connected at several intervals by pedal cord commissures. From each pedal cord, many nerves arise to innervate the foot muscles (Fig. 1).

Histological Study

The paired cerebral ganglia are elongated and flattened (Fig. 2A). The ganglia are composed of two parts: the outer cortex and the inner medulla (Fig. 3A). Each ganglion is surrounded by a loose connective tissue rich in collagen-like fibers and capillaries (Fig. 2B). In the cortex, there are numerous neurons, neurosecretory cells, and neuroglia. The outermost cell layer of the cortex is in close contact with the basement membrane of the ganglion capsule. Most of the medial part of the cortex is relatively thin and contains only two to three layers of cells, with only a few neurosecretory cells. In contrast, the dorsal, ventral, and lateral parts of the cortex of each ganglion are thick and contain four to five cell layers (Fig. 3A, see Fig. 5A). Although more neurosecretory cells are dispersed throughout these regions, there are especially high concentrations of these cells in the dorsal and ventral parts, or "horns" of the ganglion (Fig. 3A).

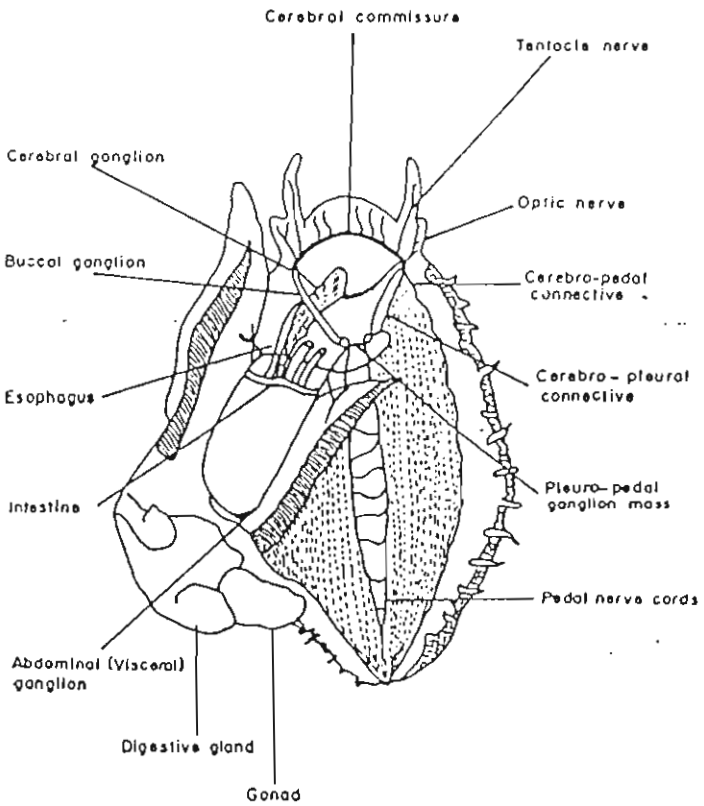


Figure 1. A diagram of the nervous system of *H. asinina*, showing various nerve ganglia linked together by nerve cords and connectives.

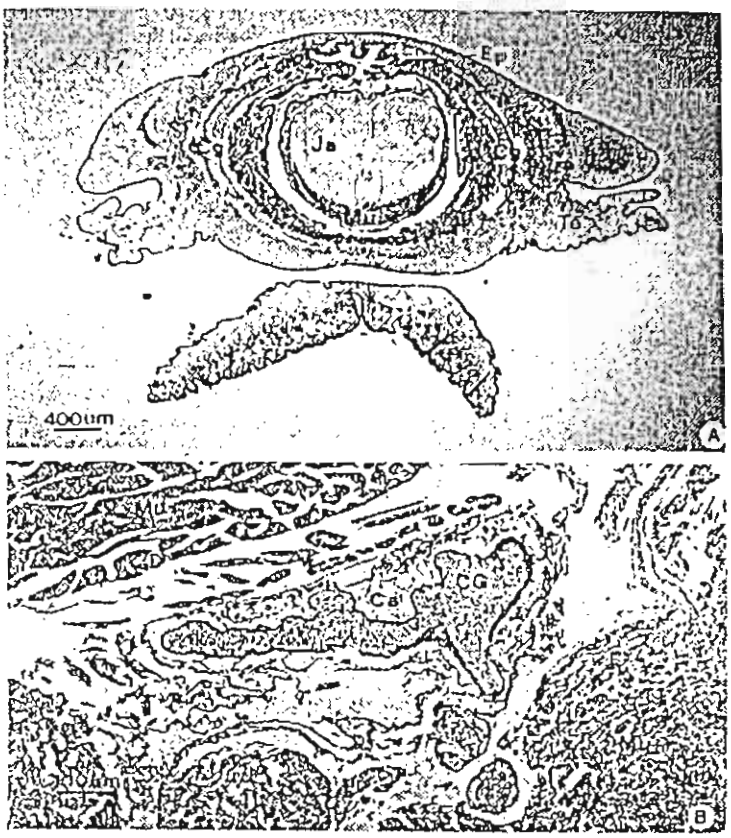


Figure 2. (A) Photomicrograph of longitudinal section showing location of cerebral ganglia (Cg) lying on both sides of jaw (Ja) and jaw muscle (Mu). Ep, epidermis; Te, tentacle. (B) A high magnification of longitudinal section of cerebral ganglion (CG). Ca, capillary.

The cells in the cerebral ganglia can be classified into eight types on the basis of their histological characteristics and stain affinity to dyes (H&E, CH-P, and PF). There are two types of neurosecretory cells (NS_1 and NS_2), three types of neurons (NR_1, NR_2, and NR_3), and three types of neuroglia (NG_1, NG_2, and NG_3).

Type 1 Neurosecretory Cell (NS_1)

These cells are very large in size (10 × 20 μm), with an oval shape. Most cells occur along the periphery of the cortex, resting on the basement membrane (Fig. 3D, see Fig. 6). The nucleus is round (8 μm in diameter) and is located toward one side of the cell. It contains mostly pale-stained euchromatin with only a thin rim of heterochromatin binding to the internal surface of the nuclear envelope (Figs. 3C and D and 4B). The nucleolus, which is round in

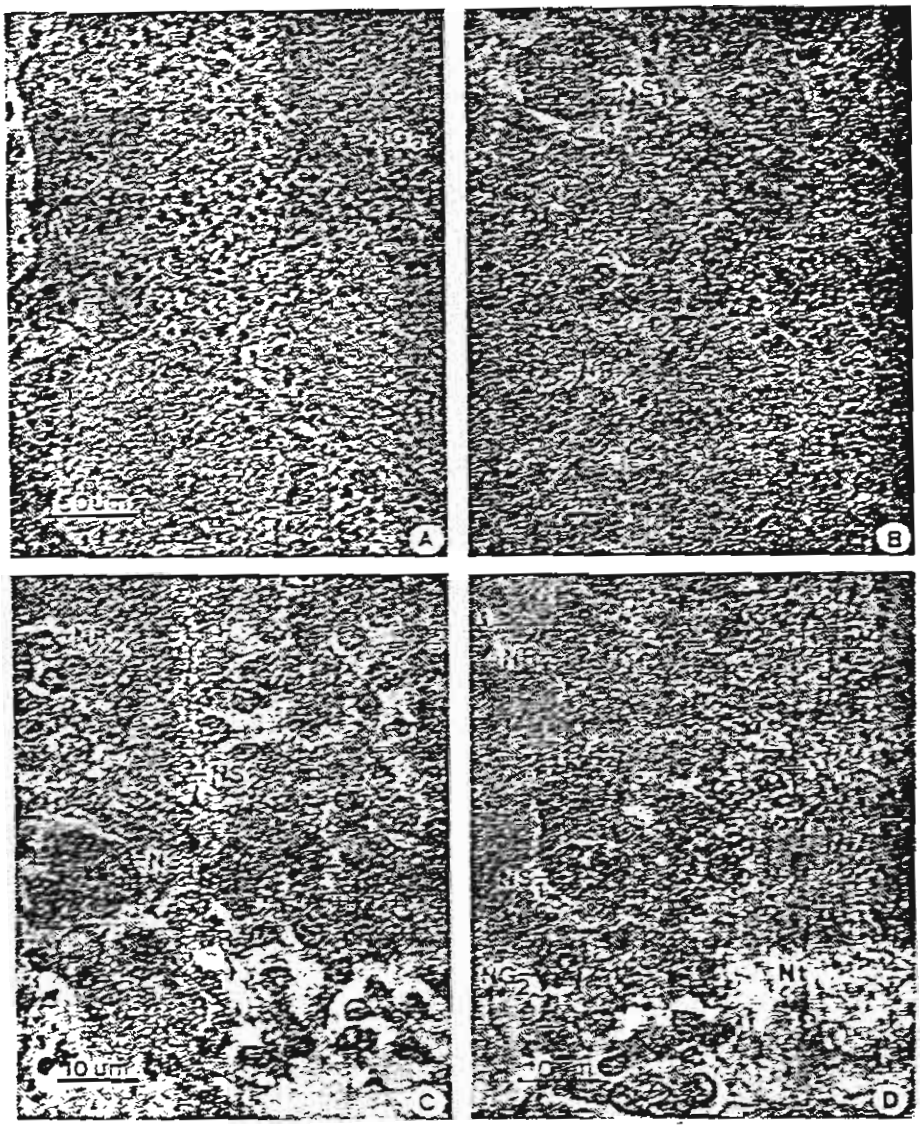


Figure 4. Medium-power (A) and high-power (B–D) micrographs showing various types of nerve cells in the cortex stained with H&E. NS_1, Type 1 neurosecretory cell; NS_2, Type 2 neurosecretory cell; NR_1, Type 1 neuron; NR_2, Type 2 neuron; NG_1, Type 1 neuroglia; NG_2, Type 2 neuroglia; NG_3, Type 3 neuroglia; Nt, nerve tract.

and contain round nuclei (4–6 µm in diameter) with patchy heterochromatin. The cytoplasm is extremely thin and does not contain neurosecretory granules (Figs. 3D and 4B and C).

Type 3 Neuron (NR_3)

These cells are a little smaller than NR_2, about 4 µm in diameter. They occur in the innermost cell layer of the cortex (Figs. 3D and 6). The nucleus is elliptical (3 µm in diameter) and contains completely dense heterochromatin (Fig. 3D). There are no neurosecretory granules in the cytoplasm.

Type 1 Neuroglia (NG_1)

These cells are scattered throughout the cortical region of the ganglion (Figs. 4B and 6). They are small (3–6 µm in diameter) and contain a spindle-shaped nucleus (Fig. 4B). The nuclear membrane is a little crenated, with a thin rim of heterochromatin attached to its inner surface, whereas most of the remaining chromatin is euchromatic (Fig. 4B).

Type 2 Neuroglia (NG_2)

The cell body and nuclear size of these cells are similar to those of NG_1, but they show completely dense chromatin (Figs. 3C and 4D). NG_2 lie in a single row on the basement membrane (Figs. 4D and 6).

Type 3 Neuroglia (NG_3)

These are small cells with spindle-shaped nuclei (2–3 µm) that contain completely dense heterochromatin. They are scattered among nerve bundles of the medulla (Figs. 3B, 4A, 5D, and 6).

DISCUSSION

The anatomy of the nervous system of the tropical abalone, *H. asinina*, is similar to those of primitive prosobranchs and other species of abalone described by Crofts (1929) and Fretter and Graham (1962). Crofts (1929) reported that in *H. tuberculata*, *H. lamellosa*, and *H. cracherodii*, the cerebral ganglia sent the nerves to supply the epipodia, tentacles, eyes, and statocysts. Through

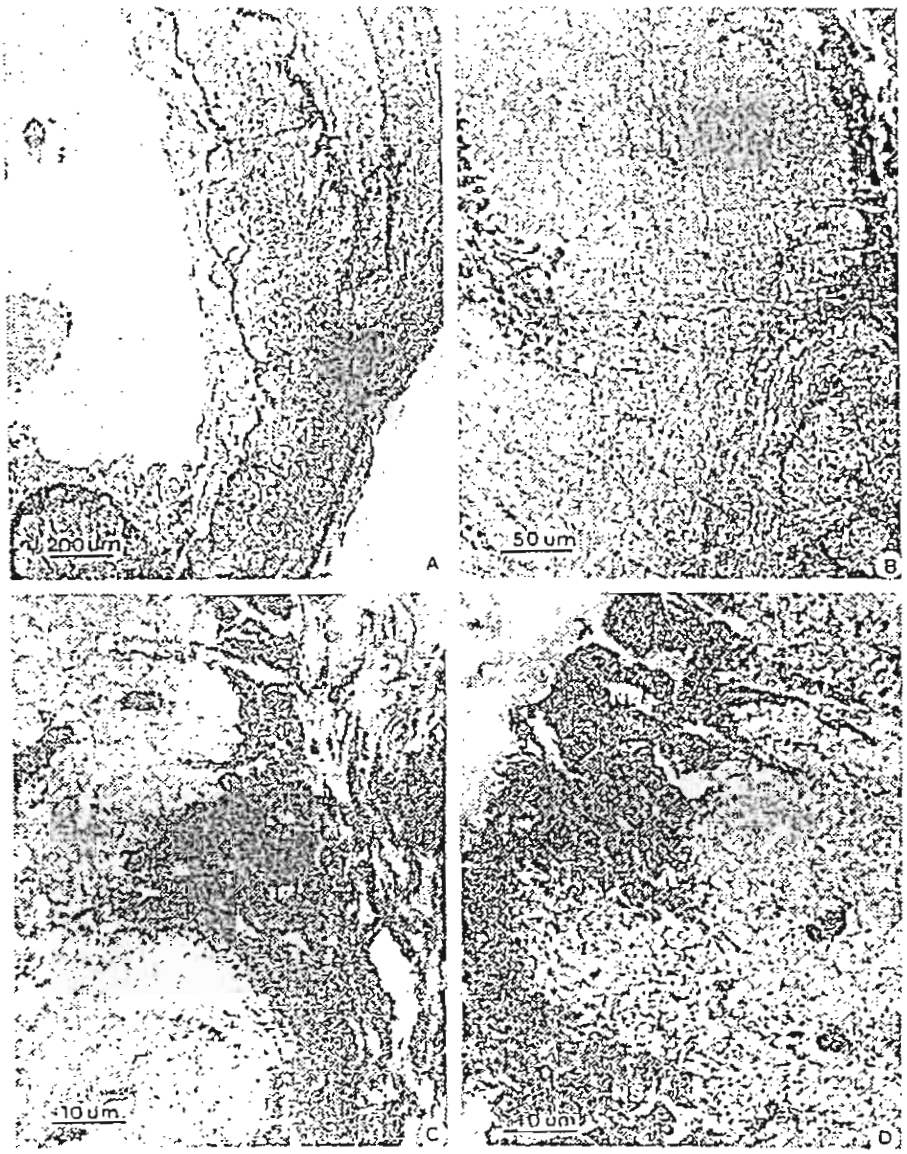


Figure 5. A low-power micrograph showing longitudinal section of cerebral ganglion stained with CH-P. Do, dorsal; La, lateral; Ve, ventral. (B–D) Medium-power (B) and high-power (C and D) micrographs showing longitudinal sections of cerebral ganglion stained with CH-P. Co, cortex; Np, neuropil; NG_3, Type 3 neuroglia; NS_1, Type 1 neurosecretory cell; NS_2, Type 2 neurosecretory cell; NR_1, Type 1 neuron; NR_2, Type 2 neuron; NG_3, Type 3 neuroglia.

these nerves, the animals receive chemosensory, mechanosensory, and visual input from their environment. Hence, the cerebral ganglia are probably the most important center for nervous integration, comparable to the brain in higher animals. The cerebral ganglia in *H. asinina* are also connected with the buccal ganglion and pleuropedal ganglion mass. It was, therefore, suggested that the cerebral ganglia could serve as a center for coordinating and modulating various functions mediated by the rest of the nervous system (Jahan-Parwar and Fredman 1976).

The cerebral ganglia of *H. asinina* are surrounded by a loose connective tissue that is rich in collagen-like fibers, threaded with capillary plexuses. This connective tissue sheath is quite different from that of *Helix aspersa* Muller, which is composed of two layers, the outer layer being packed with globuli cells and the inner being dense and lamellated (Fernandez 1966). The histological study presented here of the cerebral ganglia of *H. asinina* revealed that they contain eight cell types: two types of neurosecretory cells, three types of neurons, and three types of neuroglia. Yahata (1971) and Hahn (1994a) described four types of neurons in *N. discus* and *H. discus hannai*. They are called Type A, Type B, Type C, and Type D cells. Type A and Type B cells are neurosecretory cells. On the basis of the similarities in size and shape and their nuclear characteristics, distribution, and staining affinity, the neurosecretory cells Type 1 (NS_1) and Type 2 (NS_2) in this study should correspond to Type A and Type B cells, respectively, as reported by Yahata (1971) and Hahn (1994a). In *N. discus*, Type A cells were further divided into Type A-I cells, which contain neurosecretory granules stained with PF and CH-P, and Type A-II cells, the secretory granules of which stained with phloxine but not CH-P. Type A-II cells of *H. discus hannai* appear to be larger (20–32 μm) than the NS_1 of *H. asinina* (20 μm). However, the cell bodies of both Type A cells (Hahn 1994a) and NS_1 stained with PF.

Neurosecretory cells are found in large quantities and variety in molluscan ganglia, which are the principal source of hormones. The functions of neurosecretory cells in the cerebral ganglia are

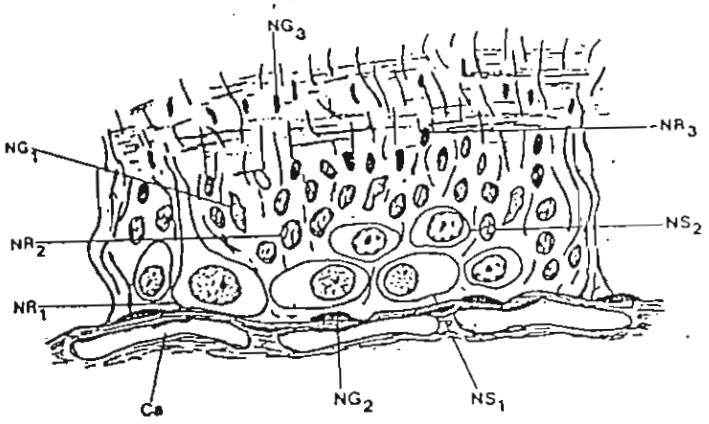


Figure 6. A diagram illustrating structure and cellular composition of the cortex and medulla of cerebral ganglion. NS_1, Type 1 neurosecretory cell; NS_2, Type 2 neurosecretory cell; NR_1, Type 1 neuron; NR_2, Type 2 neuron; NR_3, Type 3 neuron; NG_1, Type 1 neuroglia; NG_2, Type 2 neuroglia; NG_3, Type 3 neuroglia; Ca, capillary.

thought to be related to reproduction (Yahata 1971, Yahata 1973, Hahn 1994a, Hahn 1994b). Yahata (1971) found that Type A and Type B cells in the cerebral ganglia of *N. discus* showed seasonal changes in the staining intensity of PF. These cells began to accumulate PF granules in June, when the gonads started to mature, and the PF stain intensity continued to increase until it reached a maximum in September, which was the month of spawning. Hence, the rise and fall of the neurosecretory material coincided with gonadal maturation (Yahata 1971). However, the injection of crude homogenate of the cerebral ganglia into ripe females, *N. discus*, did not induce spawning, but there was a considerable gain in the mean body weight from the increase in water uptake (Yahata 1973).

Hahn (1994a) reported that the neurosecretory activities in Type A and Type B cells in the cerebral ganglia of *H. discus hannai*, as reflected by the staining intensity of cytoplasmic material, varied with the reproductive cycles. The neurosecretory activity of Type A cells was correlated with vitellogenesis in the ovaries of females, but not with gonad maturation and spermatogenesis in males. The neurosecretory activity in Type B cells in both sexes did not show any correlation with gametogenesis, vitellogenesis, or spawning. Further studies are clearly needed on the neuroendocrine activities and functions of neurosecretory cells of cerebral ganglia in abalone, including NS_1 and NS_2 cells in *H. asinina*.

There are three types of neurons in the cerebral ganglia of *H. asinina*, whereas only two types of neurons (Type C and Type D cells) were described in *N. discus* and *H. discus hannai* (Yahata 1971, Hahn 1994a). On the basis of the size and shape of cells and their nuclei, NR_2 are quite similar to Type C cells, whereas NR_3 probably correspond to Type D cells. These cells did not have any neurosecretory granules in their cytoplasm. NR_1 cells have not been reported in *N. discus* or *H. discus hannai* (Yahata 1971, Hahn 1994a). These cells are the largest neurons in the cerebral ganglia of *H. asinina*. They are pyramidal and multipolar in shape with a round nucleus, and no neurosecretory granules are observed in the cytoplasm. Compared with the classification of neurons in the nervous systems of higher vertebrates, it is possible that NR_1 may be concerned with motor activities because of their large size and multipolarity, whereas NR_2 and NR_3 are most likely to be associated neurons.

Three types of neuroglia were observed in the cerebral ganglia of *H. asinina*. To the best of our knowledge, there has not yet been any classification of neuroglia in any species of abalone. NG_1 are probably the general glia cells of the cortex because of their uniform distribution in all cell layers of the cortex. NG_2, because of their unique lining of the basement membrane, could be a part of the blood–nerve barrier that gates out the undesirable factors from the blood supplied by the capillaries. NG_3, on the other hand, are glia cells of the neuropil of the medullary region. It remains to be proved whether they are involved in the synthesis of the myelin-like structure surrounding the nerve fibers in the neuropil.

ACKNOWLEDGMENT

This study received financial support from the Thailand Research Fund. TF BRG 4080004 and PG 2/015/2539

BRG 4080004 and PG 2/015/2539

LITERATURE CITED

Bullock, T. H. 1965. Mollusca: Gastropoda. pp. 1283–1386. *In:* T. H. Bullock and G. A. Horridge (eds.). Structure and Function in the Nervous System of Invertebrates. Freeman, San Francisco.

Crofts, D. R. 1929. Haliotis. *Liverpool Mar. Biol. Committee Memoirs* 29:1–174.

Dorsett, D. A. 1986. Brains to cells: the neuroanatomy of selected gastropod species. pp. 101–187. *In:* The Mollusca. A. O. D. Willows (ed.). vol. 9. Academic Press, New York.

Fernandez, J. 1966. Nervous system of the snail *Helix aspersa* I. Structure and histochemistry of ganglionic sheath and neuroglia. *J. Comp. Neurol.* 127:157–181.

Fretter, V. & A. Graham. 1962. British Prosobranch Molluscs. Bartholomew Press, Dorking. pp. 299–320.

Gomori, G. 1941. Observations with differential stains on human Islets of Langerhans. *Am. J. Pathol.* 17:395–406.

Gomori, G. 1950. Aldehyde-fuchsin: a new stain for elastic tissue. *Am. J. Clin. Pathol.* 20:665–666.

Hahn, K. O. 1994a. The neurosecretory staining in the cerebral ganglia of the Japanese abalone (ezoawabi), *Haliotis discus hannai*, and its relationship to reproduction. *Gen. Comp. Endocrinol.* 93:295–303.

Hahn, K. O. 1994b. Gametogenic cycle of the Japanese abalone (ezoawabi), *Haliotis discus hannai*, during conditioning with effective accumulative temperature. *Aquaculture.* 122:227–236.

Jahan-Parwar, B. & S. Fredman. 1976. Cerebral ganglion of *Aplysia*—cellular organization and origin of nerves. *Comp. Biochem. Physiol.* 54A:347–357.

Joosse, J. 1979. Evolutionary aspects of the endocrine system and of the hormonal control of reproduction of molluscs. pp. 119–157. *In:* E. J. W. Barrington (ed.). Hormones and Evolution. vol. 1. Academic Press, New York.

Miller, W., R. S. Nishioka & H. A. Bern 1973. The "juxtaganglionic" tissue and the brain of the abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Veliger.* 16:125–129.

Yahata, T. 1971. Demonstration of neurosecretory cells in the cerebral ganglion of the abalone, *Nordotis discus* Reeve. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* 22:207–214.

Yahata, T. 1973. Demonstration of neurosecretory cells in the cerebral ganglion of the abalone, *Nordotis discus* Reeve infected with ganglional suspensions. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 39:1117–1122.

HISTOLOGICAL STUDIES OF THE PLEURO-PEDAL GANGLION, VISCERAL GANGLION AND PEDAL CORD GANGLIA OF *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

A. Thongkukiatkul, E.S. Upatham, P. Sobhon, M. Kruatrachue, C. Wanichanon, T. Pumthong and J. Nugranad

ABSTRACT

The pleuro-pedal, visceral and pedal cord ganglia of *Haliotis asinina* were studied by light microscopy using hematoxylin-eosin, chrome-hematoxylin-phloxine and paradehyde-fuchsin stains. These ganglia contain ten types of cells : three types of neurosecretory cells (NS_{1-3}), four types of neurons (NR_{1-4}) and three types of neuroglia (NG_{1-3}). NS_{1-3} contain round nuclei with three different patterns of heterochromatization and neurosecretory granules in the cytoplasm. NR_{1-4} do not have neurosecretory granules. NR_1 are giant neurons with oval or pyramidal shape. NR_{2-4} are small neurons with oval bodies and nuclei, and they are the majority of neuronal cells in the cortex of the ganglia. NG_{1-3} are spindle-shaped cells containing similar shaped nuclei. NG_1 and NG_3 are the main neuroglia of the cortex and medulla of the ganglia, respectively, while NG_2 are a part of the blood-nerve barrier that borders the connective tissue capsule of the ganglia.

KEY WORDS *Haliotis asinina*, histological studies, pleuro-pedal ganglion, visceral ganglion, pedal cord ganglia

INTRODUCTION

The nervous system of *Haliotis asinina* Linnaeus consists of a pair of cerebral ganglia, a pleuro-pedal ganglion mass, and a visceral ganglion and a pair of pedal cord ganglia (Upatham *et al.*, 1998). Arising from the pleuro-pedal ganglion are two loops of nerve cords : the visceral cord and the paired pedal nerve cords. The visceral cord twists into a figure 8 around the visceral mass. At its posterior end is a single visceral ganglion that gives off many nerves going to digestive and reproductive organs (Upatham *et al.*, 1998). The paired pedal cords run parallel along the midline of the foot muscle and send off many nerves to innervate the foot muscles (Upatham *et al.*, 1998).

Hahn (1992) described several cell types in the cerebral and pleuro-pedal ganglia of *Haliotis discus hannai* Ino. Two types of neurosecretory cells had been described in these ganglia (Hahn, 1992, 1994). Yahata (1971) also demonstrated two types of neurosecretory cells in the cerebral ganglia of *Nordotis discus* Reeve. Upatham *et al.* (1998) reported on the classification

and histology of cells in the cerebral ganglia of *H. asinina*. There were eight types of nerve cells in the cerebral ganglia : two types of neurosecretory cells, three types of neurons, and three types of neuroglia (Upatham *et al.*, 1998). However, there is virtually no information on the histology of nerve cells in the pleuro-pedal, visceral, and pedal cord ganglia of *H. asinina*. Hence, the objective of the present study is to study the histology and classification of cell types, and their characteristics in the pleuro-pedal, visceral, and pedal cord ganglia of *H. asinina*.

MATERIALS AND METHODS

Mature abalone, *H. asinina*, with a shell length of 4-5 cm were obtained from the Coastal Aquaculture Development Center, Klong Wan, Prachuap Khiri Khan Province, Thailand. These animals were reared in a land-based aquaculture system with well circulated and aerated sea water. They were given appropriate algal food *ad libitum*, and kept under normal daylight. Abalone were anesthetized with 5% MgCl, after which their shells were removed. The pleuro-pedal, visceral, and pedal cord ganglia were dissected out and fixed in Bouin's fluid in 0.14 M NaCl for 12 hours. Tissues were dehydrated through a graded series of ethanol, infiltrated with dioxane, and embedded in paraffin. Sections were cut at 5-6 μm thickness and stained with hematoxylin eosin (H&E), chrome-hematoxylin-phloxine (CH-P) (Gomori, 1941) and paraldehyde-fuchsin (PF) (Gomori, 1950). Neurons and cells in the pleuro-pedal, visceral and pedal cord ganglia were observed and evaluated for their cell size and shape, nuclear size and shape, and staining affinity under an Olympus Vanox light microscope.

RESULTS

Histological study

Pleuro-pedal ganglion This is a large ganglion. Each ganglion is surrounded by a loose connective tissue rich in collagen-like fibers and capillaries in close contact with the ganglion capsule. The ganglion is composed of two parts : the outer cortex and the inner medulla. In the cortex, there are numerous neurosecretory cells, neurons and neuroglia. The dorsal and lateral edges of the ganglion's cortex are relatively thick, and contains 4-6 cell layers. In contrast, the ventral edges of the cortex of the ganglion are thin and contain only 2-3 layers of cells. There are many layers of cells where the nerve branches out. There are many bundles of nerve tracts in the medullary region

Visceral ganglion. This ganglion appears like a dumb-bell, with both sides of the ganglion form a bulb-like structure. Most of the lateral and ventro-medial parts of the ganglion have thick cortex that contains 2-3 layers of cells. In contrast, the remaining parts are relatively thin, and contain only a single layer of ganglionic cells. The neuropil of the ganglion consists of both longitudinal and cross sectional nerve tracts.

Pedal cord ganglia. These are the enlarged portions of the two parallel pedal cords, which are paired along the elongated strands of the cords; the pairs are linked by irregular commissures. Each ganglion is composed of two parts : the outer cortex and inner medulla. The ganglion is surrounded by a loose connective tissue and capillaries. In the cortex, there are numerous neurosecretory cells, neurons and neuroglia. The ventral part of the ganglion's cortex is relatively thick, and contains 4-5 layers of cells. In contrast, the dorsal and lateral parts of the cortex of the ganglion are thin and contain only 2-3 layers of cells. There are many bundles of nerves intersecting in the medullary region of the ganglion. The ganglionic cells in the pedal cord ganglia are generally more numerous than those in the visceral ganglion.

Classification of cell types

The cells in the pleuro-pedal, visceral and pedal cord ganglia can be classified into ten types based on their histological characteristics and staining affinities to H&E, CH-P and PF. These include three types of neurosecretory cells (NS_1, NS_2, NS_3), four types of neurons (NR_1, NR_2, NR_3 and NR_4) and three types of neuroglia (NG_1, NG_2 and NG_3).

Type 1 neurosecretory cell (NS_1). These cells are the largest neurosecretory cells. Most cells occur along the periphery of the cortex, resting on the basement membrane of the ganglion capsule. The cell body is round or oval (10x20 μm). The nucleus is round (7 μm in diameter), which contains mostly pale-stained euchromatin with only a thin rim of heterochromatin binding to the internal surface of the nuclear envelope. The nucleolus is small but very distinct. The cytoplasm shows a clear boundary. It is stained reddish pink with H&E, and pinkish purple with CH-P. There are numerous neurosecretory granules which are stained deep violet with PF and fill the entire cytoplasm.

Type 2 neurosecretory cell (NS_2). These cells are smaller than NS_1. They are located in the inner cell layer. The cell body is round or oval and of medium size (10x12 μm). The nucleus is round (7 μm in diameter) with most blocks of heterochromatin attached to its periphery with some in the center. Together, they resemble a clock-face pattern. The nucleolus is denser than that of NS_1. The stainings of NS_2 are similar to those of NS_1. The cytoplasm

contains fewer neurosecretory granules than does NS_1, and they stained deep violet with PF.

Type 3 neurosecretory cell (NS_3). These cells are the smallest neurosecretory cells. They are medium in size (8x10 μm). The nucleus is round (6 μm in diameter) and located on one side of the cell. The nucleus contains a thick rim of heterochromatin attached to the periphery, and some thick heterochromatin cords in the center. The cytoplasm does not show a clear boundary but contains abundant granular material.

Type 1 neuron (NR_1). These cells are the largest neurons and have a pyramidal shape (25x40 μm). Their long axons extend inwardly into the medulla of the ganglion. The nucleus is round (13 μm in diameter), and contains almost entirely euchromatin, with large and eccentrically located nucleolus. The cytoplasm stained homogeneously pink with H&E and CH-P. There are no neurosecretory granules in the cytoplasm.

Type 2 neuron (NR_2). These cells are the most numerous among neuronal cells. They are concentrated mostly in the middle cell layer of the cortex. They have a round to oval shape (4-6 μm in diameter), and contain oval nuclei (4 μm in diameter) with patchy heterochromatin. The cytoplasm is extremely thin and does not contain neurosecretory granules.

Type 3 neuron (NR_3). These cells are slightly smaller than NR_2 (4 μm in diameter), while having similar shape. They occur in the innermost cell layer of the cortex. The nucleus is elliptical (3 μm in diameter) and contains completely dense heterochromatin. There are no neurosecretory granules in the cytoplasm.

Type 4 neuron (NR_4). These cells occur in small number. The nucleus is round or oval (4-6 μm in diameter) with a thick rim of heterochromatin attached to the periphery, while the central area is clear. The nucleolus, with round shape, is very distinct. There are no neurosecretory granules in the cytoplasm. These cells are fewest in number among neurons.

Type 1 neuroglia (NG_1). These cells are scattered throughout the cortical region of the ganglion. They are small spindle-shaped cells (3x6 μm) that contain similar shaped nuclei. The nuclear membrane is a little crenated, with a thin rim of heterochromatin attached to its inner surface, whereas most of the remaining chromatin is euchromatic. There is only a thin rim of cytoplasm around the nucleus .

Type 2 neuroglia (NG_2). The cell body and nuclear size of these cells are similar to those of NG_1 but they show completely dense chromatin. NG_2 lie in a single row on the basement membrane.

Type 3 neuroglia (NG_3). These are the smallest cells with spindle-shaped nuclei (2-3 μm) that contain completely dense heterochromatin. They are scattered among nerve bundles of the medulla.

DISCUSSION

Histological studies of the pleuro-pedal, visceral and pedal cord ganglia of *H. asinina* revealed that they contain ten cell types: three types of neurosecretory cells, four types of neurons and three types of neuroglia.

Neurosecretory cells are found in the pleural ganglion of many gastropods such as *Bithynia tentaculata* (Linnaeus)(Andrews, 1968), *Lymnaea stagnalis* Linnaeus (Wendelaar Bonga, 1970), *Bulinus truncatus* (Audouin) (Boer *et al.*, 1977) and *Haliotis* spp. (Hahn 1992). Hahn (1992) described several cell types found in *H. discus hannai*, but only two cell types, #1 -and #7-cells are thought to be neurosecretory cells. Cell type #1 has oblong shape about 8-20 μm in diameter and contains a large nucleus (5-10 μm in diameter). Cells type #7 is large (16 μm) with a small nucleus (4 μm). Their secretory granules were stained with PF. Based on the similarities in size and shape, and staining affinity, the neurosecretory cells type 1 (NS_1) and type 2 (NS_2) in the present study should correspond to cells type #1 and #7 as reported by Hahn (1992). The neurosecretory activities of cells type #1 were correlated with gametogenesis, while cells type #7 show a strong correlation with the induction of spawning (Hahn, 1992). The histological characteristics of NS_1 and NS_2 in the pleuro-pedal ganglion are quite similar to those in the cerebral ganglia (Upatham *et al.*, 1998).

There are also three types of neurosecretory cells in the visceral ganglia of other mollusks such as *L. stagnalis* (Wendelaar Bonga, 1970) and *Australorbis glabratus* Pilsbry (Lever, 1965). Lever (1965) described only one type of neurosecretory cells in *A. glabratus*. These cells are large, ranging between 50-70 μm, with a nucleus of 13-48 μm. The cytoplasm contains large violet-black droplets. It is different from those reported in *H. asinina*. The functions of neurosecretory cells in the visceral ganglion are thought to be related to reproduction (Yahata, 1973), inducing spawning (Hahn, 1992) and stimulating diuresis (Wendelaar Bonga, 1972).

The pedal cord ganglia consist of ganglionic cells, arranged peripherally in a thick layer, which is similar to the situation reported in *Haliotis tuberculata* Linnaeus (Crofts, 1929). The large cells tend to be situated on the outside of the ganglion, while the smaller cells towards the center. The histological study of the pedal cord ganglia of *H. asinina* revealed that they also contains three types of neurosecretory cells. Boer *et*

al. (1977) described three types of neurosecretory cells in the pedal ganglion of *B. truncatus*. They are called dark green cells, yellow green cells and yellow cells. Based on similarity in size, the NS_1 in the present study should correspond to the dark green cells of *B. truncatus*. However, the functions of these neurosecretory cells of pedal ganglia have not yet been demonstrated.

There are four types of neurons in the pleuro-pedal, visceral and pedal cord ganglia of *H. asinina* whereas only one type of neurons is described in *B. tentaculata*. It is noticeable that the giant neurons (NR_1) are more abundant in the pleuro-pedal ganglia than in the cerebral ganglia (Upatham *et al.*, 1998). These cells are multipolar and possess characteristics similar to large motor cells such as ventral horn motor cells of spinal cord and Pukinje cells of cerebellum in vertebrates. As such, they may be involved in controlling and co-ordinating motor activities, especially that of pedal muscle. Other neurons (NR_{2-4}) are small and appear like ordinary neurons and globuli cells described in *Aplysia californica* (Cooper), which could be association neurons (Bullock & Horridge, 1965). However, there is a paucity of giant neurons (NR_1) in the visceral ganglion in comparison to those in the pleuro-pedal and pedal cord ganglia. Thus rather than having a control over substantial motor activities, the neurons of the visceral ganglion are thought to be related to the control of functions of the visceral organs (Crofts, 1929).

The present study also demonstrated the presence of three types of neuroglia in the pleuro-pedal, visceral and pedal cord ganglia of *H. asinina*. Upatham *et al.* (1998) reported that the cerebral ganglia of *H. asinina* also contained three types of neuroglia. These neuroglia in the pleuro-pedal, visceral and pedal cord ganglia have similar characteristics to the NG_{1-3} described in the cerebral ganglia of *H. asinina* (Upatham *et al.*, 1998).

ACKNOWLEGEMENTS

This study received financial support from the Thailand Research Fund BRG #408004 and PG 2/015/2539.

LITERATURE CITED

ANDREWS, E.B. 1968. The fine structure of the nervous system of *Bithynia tentaculata* (Prosobranchia) in relation to possible neurosecretory activity. *The Veliger*, 14: 13-20.

BOER, H.H., ROUBOS, E.W., VAN DALEN, H. & GROESBEEK, J.R.F. TH. 1977. Neurosecretion in the basommatophoran snail *Bulinus truncatus* (Gastropoda, Pulmonata). *Cell and Tissue Research*,176: 57-67.

BULLOCK, T.H. & HORRIDGE, G.A. 1965. *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrate*. Vol.2. Freeman, San Francisco.

CROFTS, D.R. 1929. *Haliotis*. In *Liverpool Marine Biology Committee Memoirs on Typical British Marine Plants and Animals*. (Edited by Johnstone, J.). The University Press of Liverpool. 174 pp.

GOMORI, G. 1941. Observations with differential stains on human Islets of Langerhans. *American Journal of Pathology*, 17: 395-406.

GOMORI, G. 1950. Aldehyde-funchsin : A new stain for elastic tissue. *American Journal of Clinical Pathology*, 20: 665-666.

HAHN, K.O. 1992. Review of endocrine regulation of reproduction in abalone *Haliotis* spp. In *Abalone of the World : Biology, Fisheries and Culture*. (Edited by Shepherd, S.A., Tagner, M.J. & Guzman Del Proo, S.A.), pp. 49-58. Fishing News Books, London.

HAHN, K.O. 1994. The neurosecretory staining in the cerebral ganglia of the Japanese abalone (ezoawabi), *Haliotis discus hannai* and its relationship to reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, 93: 295-303.

LEVER, J., DE VRIES, C.M., & JAGER, J.C. 1965. On the anatomy of the central nervous system and on the location of neurosecretory cells in *Australorbis glabratus*. *Malacologia*, 2: 219-230.

UPATHAM, E.S., THONGKUKIATKUL, A., KRUATRACHUE, M., WANICHANON, C., CHITRAMVONG, Y.P., SAHAVACHARIN, S. & SOBHON, P. 1998. Classification of neurosecretory cells, neurons and neuroglia in the cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus by light microscopy. *Journal of Shellfish Research*, 17. (In press).

WENDELAAR BONGA, S.E. 1970. Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohaemal areas in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Zeitschriff fuer Zellforschung und Mikroskopische Anatomie*, 108: 190-224.

WENDELAAR BONGA, S.E. 1972. Neuroendocrine involvement in osmoregulation in freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *General Comparative Endocrinology Supplement*, 3: 308-316.

YAHATA, T. 1973. Induced spawning of abalone (*Nordotis discus* Reeve) injected with ganglional suspensions. *Bulletin of the Japanese Society of Science and Fisheries*, 39: 1117-1122.

Amporn THONGKUKIATKUL[1], E.Suchart UPATHAM[2], Prasert SOBHON[3], Maleeya KRUATRACHUE[2], Chaitip WANICHANON[3], Tanate PUMTHONG[4] and Jintana NUGRANAD[4]

[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand*

[2]*Departments of Biology and* [3]*Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*

[4]*Coastal Aquaculture Development Center, Prachuap Khiri Khan 77000, Thailand*

FIG. 1

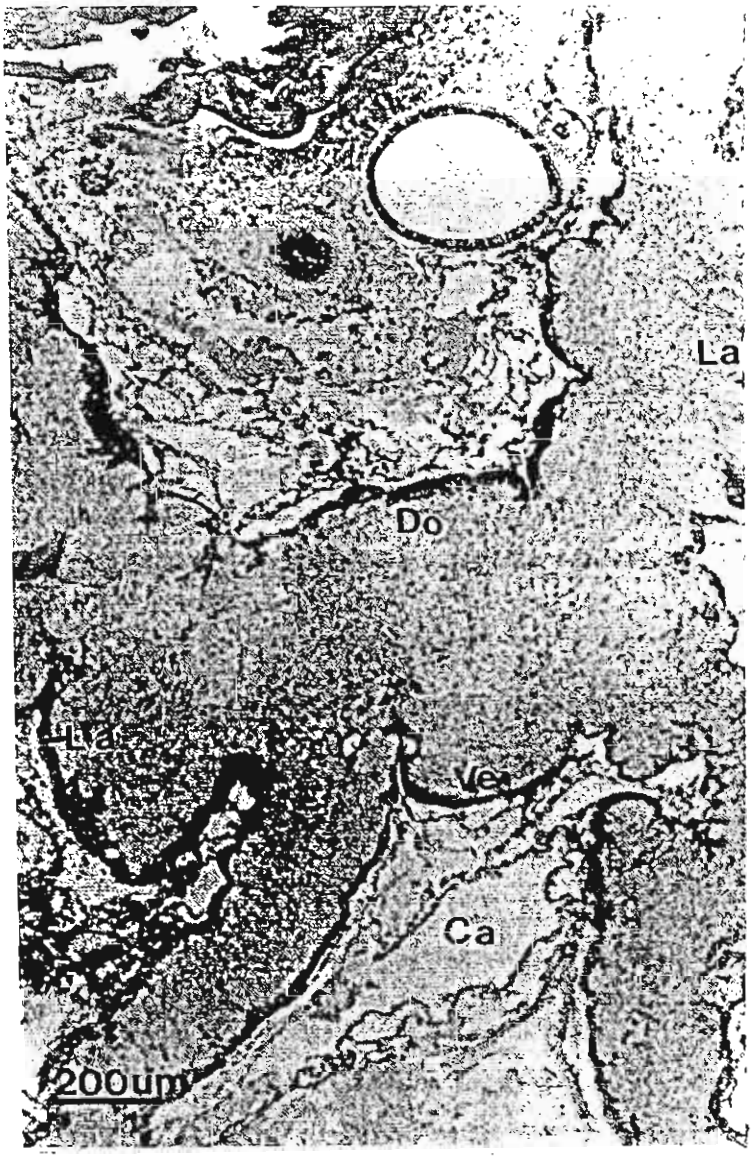


FIG.

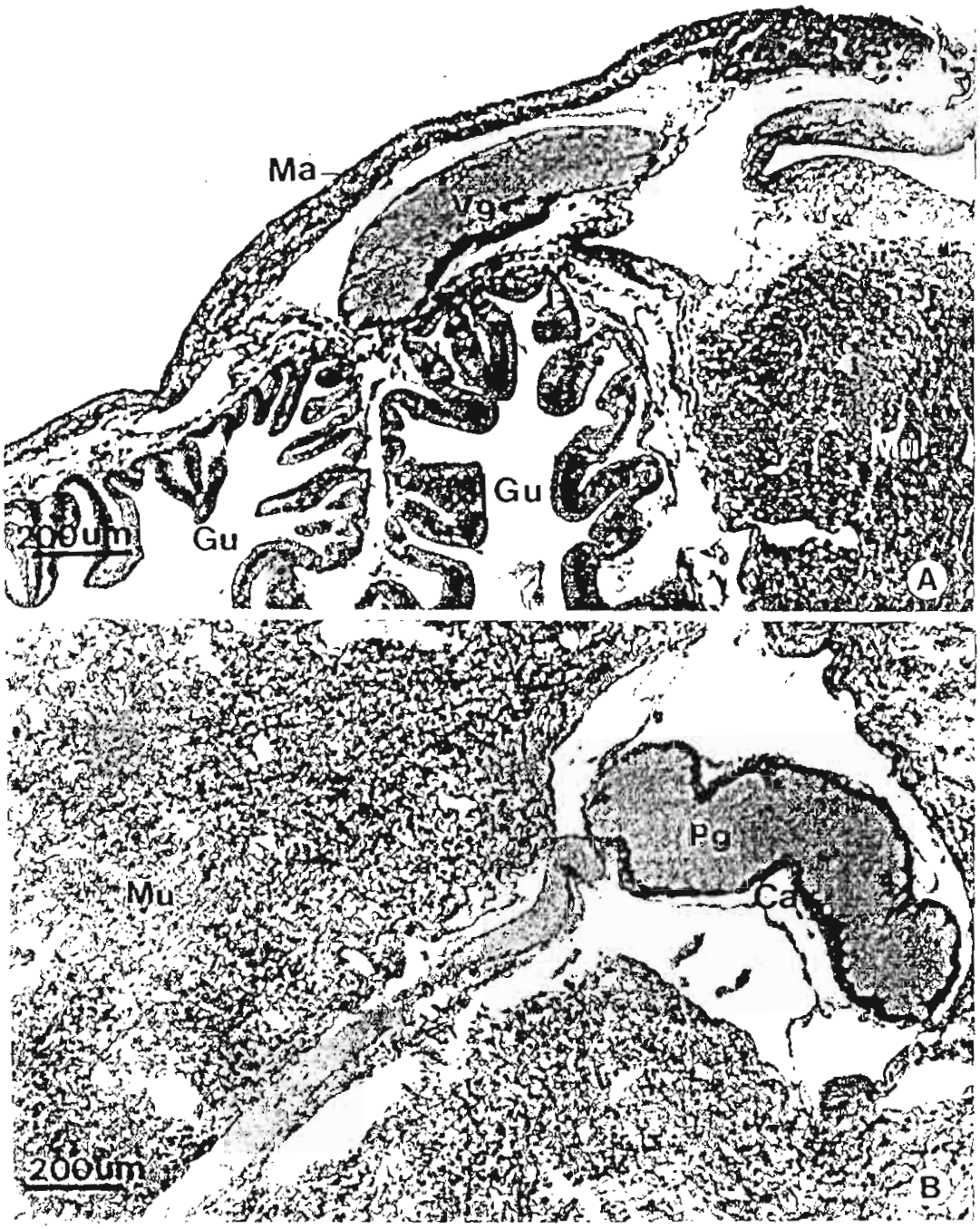
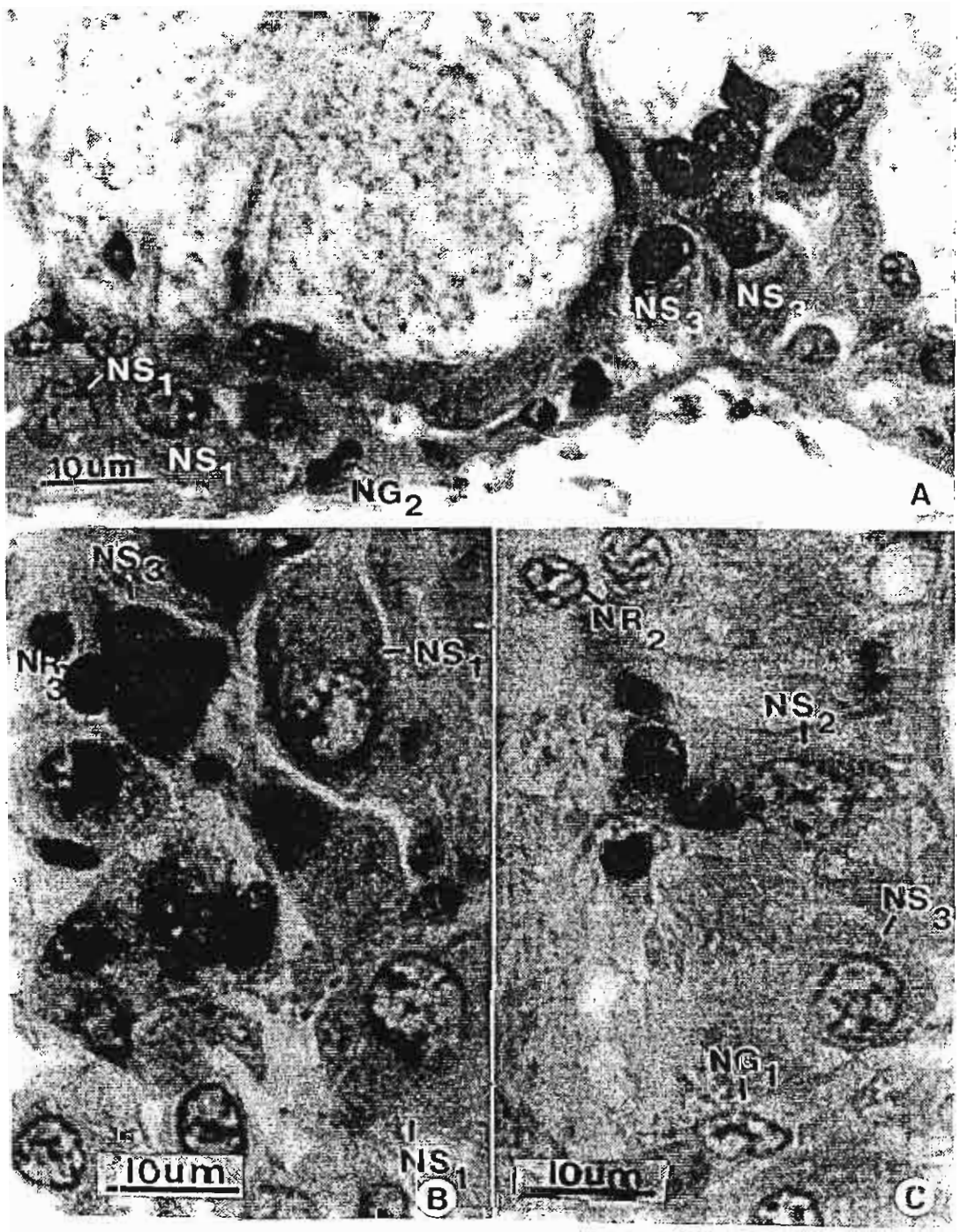
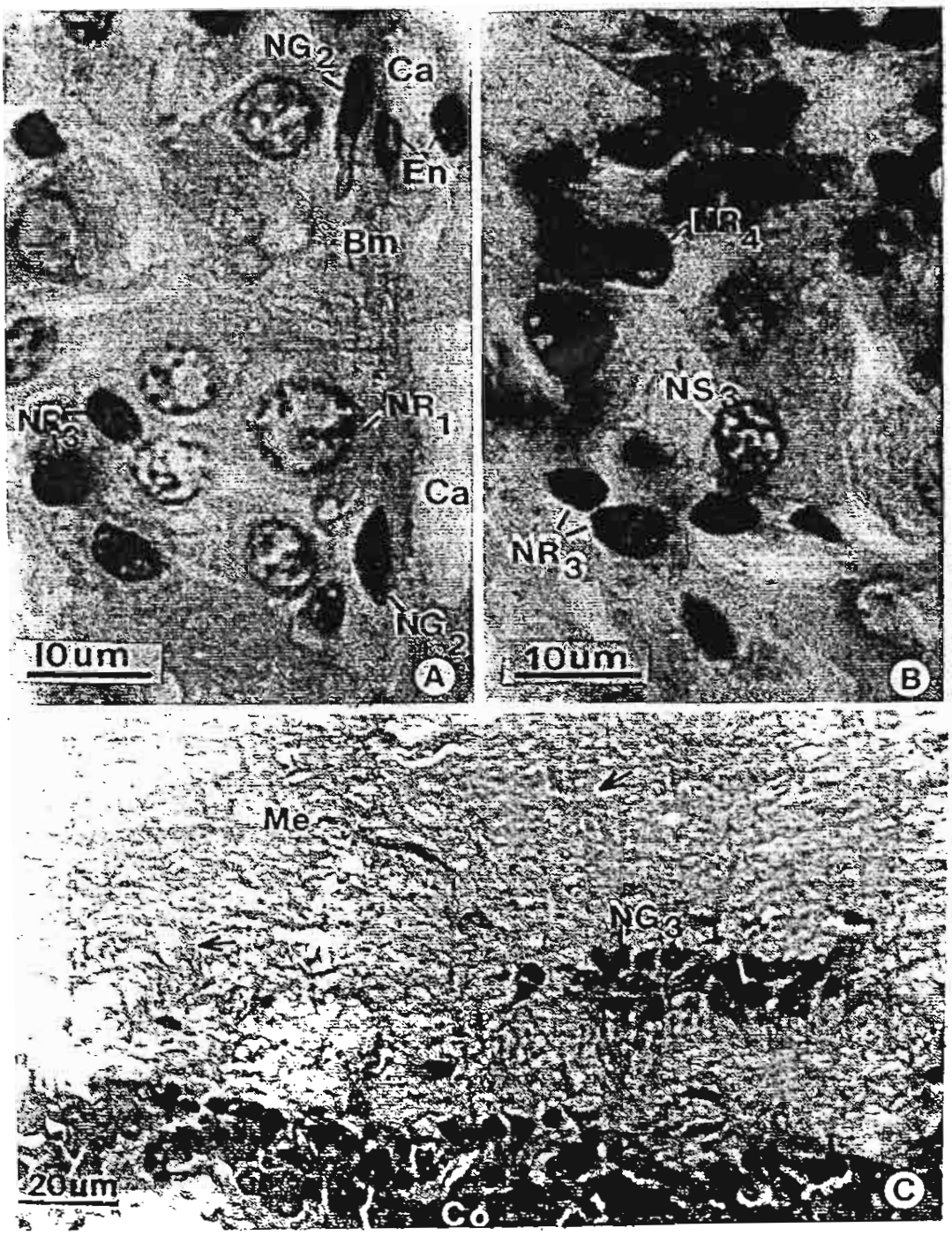


FIG. 3


NS3
NS2
NS1
10um
NS1
NG2
A
NS3
NR3
NS1
NS1
10um
B
NR2
NS2
NS3
NG1
10um
C


NG2
Ca
En
Bm
NR1
NR3
Ca
NG2
10um
A
NR4
NS3
NR3
10um
B
Me
NG3
20um
Co
C

ScienceAsia
Journal of the Science Society of Thailand
วารสารของสมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทย

March 16 , 1999

Dr.Prasert Sobhon
Department of Anatomy
Faculty of Science
Mahidol University

Dear Dr.Prasert

Thank you very much for submitting the manuscript entitled Classification of Germ Cells, Reproductive Cycle and Maturation of Gonads in *Haliotis Asinina* Linnaeus (Code 9901-005, received 29 January 1999) for consideration for publication in ScienceAsia.

The manuscript has been read by two independent referees, whose reports are enclosed for your information. Although the referees have recommended acceptance of your manuscript, there are a number of queries and comments which require clarification from you. In addition, the manuscript needs to be revised in light of their comments. Please reply to every point of the referees' comments or queries, and send 3 copies of the revised manuscript, together with the diskette, back to me as soon as possible, preferably within 3 months.

Looking forward to receiving the revised manuscript and reply to the referees from you soon. Thank you again for your interest in contributing to our journal.

Sincerely

Prof.Dr.Yongyuth Yuthavong
Editor
ScienceAsia

EDITORIAL OFFICE : Public Information Department, Thailand's National Science and Technology Development Agency, 73/1 Rama VI Road, Rajdhevee, Bangkok 10400, Thailand.
Tel: +66-2-644 8150-4 ext. 101, 107 Fax: +66-2-644 8215

CLASSIFICATION OF GERM CELLS, REPRODUCTIVE CYCLE AND MATURATION OF GONADS IN HALIOTIS ASININA LINNAEUS

PRASERT SOBHON[a], SOMJAI APISAWETAKAN[a], MALEE CHANPOO[a], CHAITIP WANICHANON[a], VICHAI LINTHONG[a], AMPORN THONGKUKIATKUL[c], PADERMSAK JARAYABHAND[d], MALEEYA KRUATRACHUE[b], SUCHART UPATHAM[c] AND TANATE POOMTHONG[e].

[a] *Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.*
[b] *Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.*
[c] *Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi,20131.*
[d] *Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.*
[e] *Coastal Aquaculture Development Center, Department of Fishery, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Klong Wan, Prachuabkirikhu, 77000.*

ABSTRACT

Germ cells in the gonads of Haliotis asinina, a species of abalone found along the coast of Thailand, were classified by light and electron microscopies. Germ cells in oogenetic units could be classified into six stages according to their histological and ultrastructural characteristics: oogonium and five stages of oocytes, i.e., Oc_1 with light to intense basophilia and abundant polyribosomes, with some in large aggregates; Oc_2 with intense basophilia, oil droplets, numerous well developed Golgi complexes and rough endoplasmic reticulum, but little secretory granules; Oc_3 with a few yolk granules and 2 types of cortical granules; Oc_4 with increasing number of yolk granules, numerous cortical granules and thin jelly coat; and Oc_5 is the mature ovum with 2 types of yolk granules, numerous cortical granules and fully formed jelly coat. The cells in spermatogenetic units could be classified according to the pattern of chromatin condensation into thirteen stages: spermatogonium, five stages of primary spermatocytes, secondary spermatocyte, four stages of spermatids and two stages of spermatozoa.

The gonads of adult H. asinina reared in land-based culture system exhibit five phases of reproductive cycle during the year: these are proliferative, premature, mature, spawning and spent phases. Gonads in proliferative and premature phases contain primarily gonial cells, early oocytes$_{1-3}$ and spermatocytes, while mature phase contains mainly late stage cells, i.e., oocytes$_{4-5}$ in ovary and spermatids and spermatozoa in testis. The spawning phase occurs at least twice during each year: from March to April and August to October in females, and with similar intervals but slightly prolonged duration in males. Spent phase, occurring after the period of spawning, is characterized by a complete discharge of gamete cells and the breakdown of connective tissue stroma. It takes approximately 5 to 6 months for gonads to regenerate their connective tissue stroma and germ cell population, and finally become repleted with mature cells again.

In developing H. asinina definitive gonads appear to be clearly separated from hepatopancreas at 2 months. Histologically, gonial cells appear at 2 months, early spermatocytes and spermatids at 4 months; early oocytes (Oc_{1-2}) at 6 to 7 months. While completely mature spermatozoa could arise in the gonads as early as 6 to 7 months, mature oocytes (Oc_{4-5}) occur much later at 10 to 11 months. The male animals tend to reach full sexual maturity and start normal reproductive cycle as early as 7 to 8 months, while female animals reach sexual maturity and start reproductive cycle around 11 to 12 months.

KEYWORDS: *Haliotis asinina*, gametogenesis, germ cells, reproductive cycle, gonad development

INTRODUCTION

There are three species of abalone along the Thai coasts, namely, *H. asinina*, *H. ovina*, *H. varia*[1-3], which are also distributed generally over the Indo-western Pacific area, especially in coastal reef zones of Southeast Asia[4-5]. These abalone species are found along the Thai Gulf and Andaman Sea, usually in the crevices on coral and rocky reefs, at the depth of 1 to 7 m of water[1-3,6]. Among the three species, *H. asinina* has the largest size and the most economic potential because of their maximum proportion of flesh[7] and good taste. *H.asinina* is primarily found off the eastern coast of the Gulf of Thailand around Chonburi, Rayong and Trad provinces[6,8]. Since collection from natural habitat could not keep pace with market demand, an efficient aquaculture system for this abalone is required. However, there are still lack of certain aspects of knowledge that could aid the large scale production of larvae for aquaculture. These are: 1) the probable spawning periods and the frequencies of spawning of land-cultured broodstocks during the year; 2) the age when the abalone reach full sexual maturity and can be used as broodstocks; and 3) the possibility of using artificial means to induce spawning when the gonads are fully developed, so that mature gamete cells from both sexes could be obtained simultaneously.

Among abalone species found in Thailand, preliminary study in *H. varia* around Bon Island, Phuket, showed that spawning occurred at several intervals throughout the year during January-February, April-May, June-July and November-December[9]. Gametogenic cycle was also studied in another species, *H. ovina*, at Khangkao Island, Chonburi province[10], in which the spawning period occurred between June and November. So far there has not yet been any studies of the gametogenic cycle as well as the development and structure of reproductive organs in *H. asinina*. Therefore, the aims of the present study are to investigate the reproduction of *H. asinina* that have been reared in land-based culture system with respect to 1) the gonadal histology and the gametogenic processes, especially the classification of various stages of germ cells in the testis and ovary of this abalone based on light and electron microscopic observations; 2) possible cyclical pattern of gonadal histology during different months of the year; and 3) the development of the gonads and the ages that abalone of both sexes reach full sexual maturity. The knowledge gained could be applied in determining the appropriate time for induction of spawning, and to increase gamete production, for the improvement of aquaculture system of this abalone species.

MATERIALS AND METHODS

Collection of abalone specimens

Abalone from land-based culture system are provided by the Coastal Aquaculture Development Center, Prachaubkirikhun province, and Marine Biological Station, Chulalongkorn University, Angsila, Chonburi province. They are kept in concrete tanks housed in the shade, which are well flushed with mechanically circulated filtered sea water and air delivery system to maintain the controlled environment. The optimum level of salinity is about 22.5-32.5 ppt. and the temperature is about 22-26°C[7]. They are fed with a diet of macroalgae (usually *Gracilaria* spp. and *Laminaria* spp.), supplemented with artificial food for abalone.

For studies of the gonadal histology, ultrastructure and the cyclical changes during the year, adult abalone, aged at least 24 months, were collected monthly for a period of one year. The fixed gonads were prepared for light and electron microscopic observations by the paraffin, semithin, and conventional TEM methods.

For development of the gonads, samples of juvenile abalone reared in the closed-culture system as mentioned above were collected monthly from the age of 1 to 12 months, and the gonads were processed for light microscopic observations.

Light Microscopy

Abalone were anesthetized in 5% magnesium chloride ($MgCl_2$) for one hour, for paraffin sections the gonads were cut and fixed in either Bouin's solution, or 3% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer pH 7.4, at 4°C, for overnight. The tissue blocks were then washed in 70% ethyl alcohol for removal of the Bouin's fixative, and glutaraldehyde fixative was removed by washing with phosphate buffer three times. Then, the specimens were dehydrated in graded series of ethyl alcohol (70-100%) for 30 minutes each, cleared with dioxane, infiltrated and embedded in paraffin wax. Blocks of specimens were sectioned at 5-micron thick, and finally stained with heamatoxylin-eosin, or PAS-heamatoxylin, and observed in an Olympus Vanox light microscope.

Transmission Electron Microscopy

For semithin sections and TEM studies, gonads were cut into very small pieces and fixed in a solution of 3% glutaraldehyde in 0.1M sodium cacodylate buffer pH 7.4, at 4°C, for overnight. The specimens were post-fixed in 1% osmium tetroxide in 0.1M sodium cacodylate buffer, at 4^0C, for 2 hours. Then, they were dehydrated in graded series of ethanol (50-100%) for 30 minutes each, cleared in two changes of propylene oxide, infiltrated in a mixture of propylene oxide and Araldite 502 resin at the ratios of 3:1 for 1 hour, 2:1 for 2 hours and 1:2 for overnight, then embedded in pure Araldite 502 resin for at least 6 hours, and finally polymerized at 30^0C, 45^0C and 60^0C for 24, 48 and 48 hours, respectively. Blocks of specimens were sectioned at 1-micron thickness by ultramicrotome and stained with Methylene blue for light microscopic observations, and ultrathin sections were cut and stained with lead citrate-uranyl acetate and viewed under a Hitachi TEM H-300 at 75 kV.

RESULTS

1. Gonadal Histology

The conical organ consists of the hepatopancreas surrounded by the testis or ovary (Fig.1C,D). At the base of the organ, the hepatopancreas appears large and occupies most of the cross-sectional profile (Fig.1C); while it becomes smaller towards the tapered end of the organ where most of the tissue belongs to the gonads (Fig.1D). Both testis and ovary are surrounded by a capsule which is composed of the outer single layer of epithelial cells, and the inner layer of dense collagenous fibers mixed with smooth muscle cells (Fig.1K,2D). The thickness of this capsule varies according to the gonadal cycle during the year.

The connective tissue from the capsule extends perpendicularly into the interior of the gonad to form septa or trabeculae that are branched, and connected at the innermost ends with the thin loose capsule of hepatopancreas. As a result the gonads are partitioned into small compartments, each containing various stages of maturing germ cells (Fig.1E,1J). Within the connective tissue of each trabecula, there are small vessels running through its whole course (Fig.1F,1L,M), which may be capillaries that branch out from the larger subcapsular vessels. Around the capillaries, parallel to the long axis of the trabeculae, there are packs of smooth muscle cells and collagen fibers that are intermingled with small cells exhibiting dense ellipsoid nuclei (Fig.1K,1M). Some of the latter may be fibroblasts, while others may be follicular or supporting cells that surround oogonia and developing oocytes. Some small cells contain granules that show similar characteristics as endocrine cells.

Each trabecula acts as the axis on which growing germ cells are attached (Fig.1E,F,1J,M). Early stage cells, such as spermatogonia, initial stages of primary spermatocytes and oogonia, are closely adhered to the trabeculae. Middle stage germ cells, such as secondary spermatocytes and developing oocytes, are more detached and appear further away from the trabeculae; while late stage cells, such as spermatids, spermatozoa and mature oocytes, are completely detached and move to the outermost region from the axis. Such an appearance gives rise to a discrete group of germ cells surrounding each trabecula, which is termed spermatogenic or oogenic unit.

2. Classification of Germ Cells

Germ cells appearing in the gonads could be classified, according to their structural features as observed under the light and transmission electron microscopes, as follows:

2.1 Spermatogenic cells Based on the nuclear characteristics and the cell sizes, the male germ cells of *H. asinina* can be classified into 13 stages.

Spermatogonium (Sg) (Fig.1G) Sg is a spherical or oval-shaped cell with diameter about 8-10 μm. Its nucleus is round or slightly indented with diameter about 6-7 μm. The nucleus contains mostly euchromatin with only small chromatin blocks attached to the inner surface of nuclear envelope. The nucleolus is prominent and stands out from the rather transparent nucleoplasm. Sg are bounded to trabeculae.

Primary spermatocytes (PrSc) (Fig.1G-H,4A-C) PrSc consists of 5 stages, *i.e.*, leptotene (LSc), zygotene (ZSc), pachytene (PSc), diplotene (DSc), and diakinetic or metaphase (MSc) stages. The early cells (from LSc to PSc) are round and become increasingly larger, then they (from DSc to MSc) are gradually decreased in size. Another distinctive differences among various stages of PrSc is the pattern of chromatin condensation and the relative amount of euchromatin versus heterochromatin.

Leptotene spermatocyte (LSc) (Fig.1G,H,4A) These round-shaped cells are larger than Sg with diameter about 10-12 μm and also contain large round nuclei, each with diameter about 8 μm. There is a thin rim of heterochromatin along the nuclear envelope and small blocks of heterochromatin scattered evenly throughout the nucleus. The nucleolus is still present but not as prominent as in Sg.

Zygotene spermatocyte (ZSc) (Fig.1G,H,4A) ZSc has approximately the same size as LSc. The distinguishing features of ZSc is the heterochromatin blocks which are increasing in size and density, and they are coupled at many points by synaptonemal complexes. The nucleolus disappears completely.

Pachytene spermatocyte (PSc) PSc still shows round shape with slightly smaller size than those of LSc (about 8 μm in size and 5 μm in nuclear diameter). Under LM (Fig.1G,H) it is characterized by the heterochromatin which appears as long threads or thick fibers that are entwined into "bouquet pattern", and becoming visible throughout the nucleus. Under TEM (Fig.4A-C) these chromatin "threads" are actually thick blocks consisting of tightly packed 30 nm fundamental chromatin fibers.

Diplotene spermatocyte (DSc) (Fig.1G,H,4A-C) This cell resembles PSc, except the nucleus becomes smaller (about 4 μm), and the chromatin blocks become increasingly thicker and packed closer together in the denser nucleoplasm than in earlier stages.

Diakinetic and Metaphase spermatocytes (MSc) (Fig.1H,4B,C) These stages exhibit thick chromosomes that move to the equatorial region, while the nuclear membrane disintegrates and completely disappears in MSc.

Secondary spermatocyte (SSc) (Fig.4B,C) SSc is a small round cell about 7 μm in diameter with the nucleus about 4 μm. They show thick chromatin blocks that are crisscrossing one another, thus appearing as checker-board or XY figures. The individual chromatin fibers in the block are loosened up, and each still maintains the size of 30 nm.

Spermatids (St) (Fig.1F-H,4B,C) There are 4 stages of spermatids, *i.e.*, spermatid I (St_1), spermatid II (St_2), spermatid III (St_3) and spermatid IV (St_4) depending on the size, chromatin granulation and condensation. All stages are round or oval, and ranging in size from 6 μm in St_1 to 3 μm in St_4.

Spermatid I (St_1) (Fig.1G) St_1 can be distinguished by their chromatin which appears as fine granules under LM, that are uniformly spread throughout the nucleus. As a result the whole nuclei appear moderately dense without any intervening transparent areas of nucleoplasm. Under TEM the 30 nm chromatin fibers becomes loosely packed and uniformly distributed throughout the nucleus.

Spermatid II (St_2) (Fig.1G,H) The general features of St_2 are similar to those of St_1 but the nucleus, which remains round, decreases in size and is located eccentrically within the cell. As a result the chromatin fibers become more closely packed, and the nucleus appears denser but still uniform.

Spermatid III (St_3) (Fig.1G,H,4B,C) The cell becomes smaller and assumes more oval shape with eccentrically-located and elongated nucleus. The chromatin begins to condense into dark blocks with intervening light area of nucleoplasm, individual chromatin fiber is enlarged to 40 nm.

Spermatid IV (St_4) (Fig.1H) The cell becomes smallest but still appears oval. Its chromatin becomes completely condensed, thus the nucleus appears rather opaque; however, the outlines of individual chromatin fibers could still be observed, and each is enlarged to 60 nm.

Spermatozoa (Sz) (Fig.1F-I,4D) There are 2 stages of spermatozoa: Sz_1 is the immature spermatozoon that begins to show highly elongated nucleus with completely dense chromatin, thus the outlines of chromatin granules are barely discernible. There is a cap-like structure apposing on one side of the ellipsoid nucleus, which is the maturing acrosome. The tail is short with a pair of centrioles moving to the neck region, from which the axonemal microtubules start to form.

In mature spermatozoa (Sz_2) (Fig.1I,4D) the nucleus is fully elongated and slightly tapered at the anterior end, with the size about 1x3 μm. The chromatin is completely dense and the anterior portion of the head is covered by acrosome with central core element (Fig.4D). Five globular mitochondria surround the centrioles in the neck region. Zig-zag microtubules link mitochondria to the plasma membrane covering the distal half of the nucleus. The tail is lengthened, and consists of 9+2 axonemal microtubule doublets surrounded by plasma membrane. Both immature and mature sperm are completely detached from the germinal epithelium and come to lie in the space between adjacent spermatogenic units (Fig.1I,4B,D).

2.2 Oogenetic cells There are 6 stages of female germ cells of *H. asinina*, including oogonium and five stages of growing oocytes.

Oogonium (Og) (Fig.1K,L) Og is a round or oval-shaped cell, whose size is about 10-12 μm. Its nucleus is round and about 7 μm in diameter. It contains small blocks of heterochromatin attached to the inner surface of nuclear envelope, with the remaining majority appearing as euchromatin. The nucleolus is present but may not be as prominent as in Sg. The cytoplasm is stained light blue by heamatoxylin-eosin and methylene blue, which implies its basophilic property due to the presence of moderate amount of ribosomes. Og are attached to the capsular side of trabeculae and usually are concentrated in groups (Fig.1K,L). Each Og is surrounded by flat, squamous-shaped follicular cells.

Stage I Oocyte (Oc_1) (Fig.1K,L,5A-C) Oc_1 is a round or scallop-shaped cell that is closely adhered to the trabecula. It is about 15-24 μm in size, with a round nucleus about 12 μm in diameter. The nucleus exhibits densely packed chromatin in the form of numerous lampbrush chromosomes. The nucleolus is present but tends to be obscured by the rather dense chromatin and nucleoplasm. The cytoplasm is stained deep blue with heamatoxylin-eosin and methylene blue, which indicates its intense basophilic property, reflecting the presence of numerous polysomes, newly developed rough endoplasmic reticulum (RER) and Golgi complexes (Gc) as observed in TEM (Fig.5C). Newly released ribosomes are packed into large mass around nuclear envelope (Fig.5B). There is very few secretory granules. Due to its enlarged size each Oc_1 is surrounded by few follicular cells.

Stage II Oocyte (Oc_2) (Fig.1K,L,5D,6A) Oc_2 becomes larger and transforms into columnar shape, with the cell size around 30x55 μm, and nuclear size about 22 μm. It is still attached to the connective tissue of trabecula by the narrow part, and each Oc_2 is surrounded by several follicular cells. The nucleus exhibits increasingly decondensed chromatin and nucleolus. Thus the nucleolus and nuclear membrane are clearly distinct due to the more transparent nucleoplasm and the presence of mostly euchromatin. The cytoplasm is stained light blue similar to Og, and contains cluster of clear lipid droplets (Fig.5D). At TEM level it was observed to contain numerous well-developed Gc, RER and still abundant ribosomes. There are 2 types of secretory granules: SG_1 and SG_2 (~330 and 450 nm in diameter) with electron lucent and electron dense matrix, respectively (Fig.6A,B).

Stage III Oocyte (Oc_3) (Fig.1M,6B) This cell becomes increasingly larger and assumes flask or pear shape, with the narrow side or base still attached to the connective tissue of trabecula. The cell size is about 35-70 μm, with the nuclear size about 20 μm. The nucleus contains mostly euchromatin, as most of the lampbrush chromosomes become almost completely unraveled, and the nucleoplasm is

quite transparent. The nucleolus is distinct and becomes enlarged due to the uncoiling of nucleolar chromatin. In addition to increasing number of clear lipid droplets, the cytoplasm begins to show reddish yolk platelets (Fig.1M) which are electron dense under TEM. Fine blue granules representing SG_1 and SG_2 are evenly distributed between lipid droplets and yolk platelets. At TEM these granules are seen concentrated around Gc (Fig.6B). Follicular cells surround both the cell body and its base near trabecula.

Stage IV Oocyte (Oc_4) (Fig.2A,C,6C) This cell is large and assumes a pear or polygonal shape, but still attached to trabecula by slender cytoplasmic process. The cell size is about 60-80 μm, with nuclear size about 35 μm. The nucleus contains mostly euchromatin and completely transparent nucleoplasm (Fig.2A,C,6C). Hence the nucleolus is clearly visible, and it also becomes enlarged due to the complete uncoiling of its chromatin. The cytoplasm is filled with reddish and electron dense yolk platelets (each about 1500-2500 nm in diameter) mixed with numerous lipid droplets (each about 1500-3000 nm in diameter) (Fig.6C). Fine blue-stained granules which represent SG_1 and SG_2 are decreased in central area of the cytoplasm, since most are probably translocated to the area underneath the plasma membrane. A thin layer of jelly coat begins to form on the outer surface of the cell membrane (Fig.2C). This coat is PAS positive and may be formed by the released content of SG_1, which were seen exocytosed at the oocyte's plasma membrane (Fig.6D). The coat is in turn surrounded by follicular cells.

Stage V Oocyte (Oc_5) (Fig.2B-D) This is the fully mature oocyte before being released from the adult female. Oc_5 is the largest cells with polygonal or round shape, with the cell size about 80-140 μm and the nuclear size about 40 μm. The nucleus exhibits similar characteristics as that of Oc_4, but with completely enlarged and clear nucleolus. Oc_5 could be divided into 2 subgroups based on the characteristics of yolk platelets observed under LM (Fig.2D). The first subgroup contains small and similar size yolk platelets that are scattered evenly throughout the cytoplasm. In the second subgroup, the yolk platelets are variable in size, and most are large bodies that could be formed by the coalescence of the smaller yolk platelets. Stripe of fine blue granules are also located underneath the cell membrane as in Oc_4 (Fig.2C,D). The thick PAS positive jelly coat attains its maximum thickness and is uniform around the outer surface of the cell membrane, but without the surrounding layer of follicular cells. Under TEM jelly coat appears fibrous in comparison to the amorphous appearance in Oc_4 (Fig.6D). All Oc_5 are completely detached from the connective tissue of trabeculae.

3. Reproductive Cycle

The reproductive cycle of *H. asinina* was assessed by observing the changes in the gonad histology, especially the characteristics of cellular association during one year period. The stages of gonad maturation during one reproductive cycle of the abalone cultured in a closed land-based system could be classified into 5 distinct phases as follows.

Proliferative phase (Fig.2E-I) This is a period in which gamete cells begin to regenerate to commence a new reproductive cycle. At the initiation of this phase, the gonads contain mainly early stage cells, and all of them are closely attached to the trabeculae. The ovary (Fig.2E,F) contains primarily Og, which usually form clusters near the capsular side, and Oc_1 and Oc_2 which are rapidly increased in number. In the testis (Fig.2G-I) there are mostly Sg and PrSc, but neither St nor Sz are present. The clusters of these early stage cells are located around the short and dilated trabeculae. The hepatopancreas is quite large in size and occupies most of the cross sectional profile of the conical organ when compared to the total gonad area. This phase usually occurs immediately after the spawning, and lasts for 2 months around April to May and October to November.

Premature phase (Fig.2J-M) This phase is the period when gametogenesis proceeds at full speed with rapid increase in numbers and sizes of various cells, while hepatopancreas is slowly reduced in its relative size; the gonads become enlarged in volume and trabeculae become thinner. At the beginning, the ovary (Fig.2J,K) contains Og, Oc_1, Oc_2 and predominantly Oc_3, most of which are still attached to the trabeculae; and later Oc_4 and Oc_5 cells occur. The testis (Fig.2L,M) contains mainly Sg, PrSc, increasing number of St and a few of Sz, all of which aggregate around the trabeculae. This

phase lasts about 1 months following the proliferative phase, usually around May to June and January to February in female; and it takes place around April to May and December to January in male.

Mature phase (Fig.3A-E) This phase is a period of rapid growth of gonads which are reflected by striking differences in color between the two sexes. The rates of cells proliferation start to diminish, and the gonads contain primarily late stage germ cells, while only a few of the early stage cells are still present and restricted to area immediately around trabeculae. Hepatopancreas is further decreased in size, and trabeculae become slimmer. In the ovary (Fig.3A,B) there are abundant Oc_5, but only few remaining and widely scattered Oc_1. All of Oc_5 appear fully mature and are liberated into the lumen of oogenetic compartment. In the testis (Fig.3C-E) there are mostly late stage male germ cells, i.e., St and Sz. The most noticeable characteristics of the testis in this phase is the vast number of Sz_2 which lie in rows that in turn surround the earlier cell stages which are still closely attached to the trabeculae (Fig.3D). As a result the testis appears to have maximum density of late stage cells. Prior to spawning, all of Sz_2 are dispersed into gonadal lumen and intermingled with other late stage cells (Fig.3E). Thin bands of Sg and PrSc surrounding the trabeculae are still evident. This phase lasts for 2 months usually from June to July and February to March in both sexes.

Spawning phase (Fig.3F-J) This is the period when abalone are ready for breeding, during which the completely mature and viable eggs or sperm are released from the gonads. The gonads are significantly decreased in size, and the gonadal wall becomes wrinkle when compared with the former phase (Fig.3H). Mostly ripen sperm or eggs are discharged while the earlier stages of gamete cells are still attached to the dilated trabeculae. After spawning, the yellowish granular substances (Fig.3G) remain in the lumen of gonadal compartments in both sexes. Spawning phase occurs at least twice during the one year period of observation, usually from August to October and March to April in female, and around August to November and February to April in male. In addition, partial spawning could be observed throughout the year in some males.

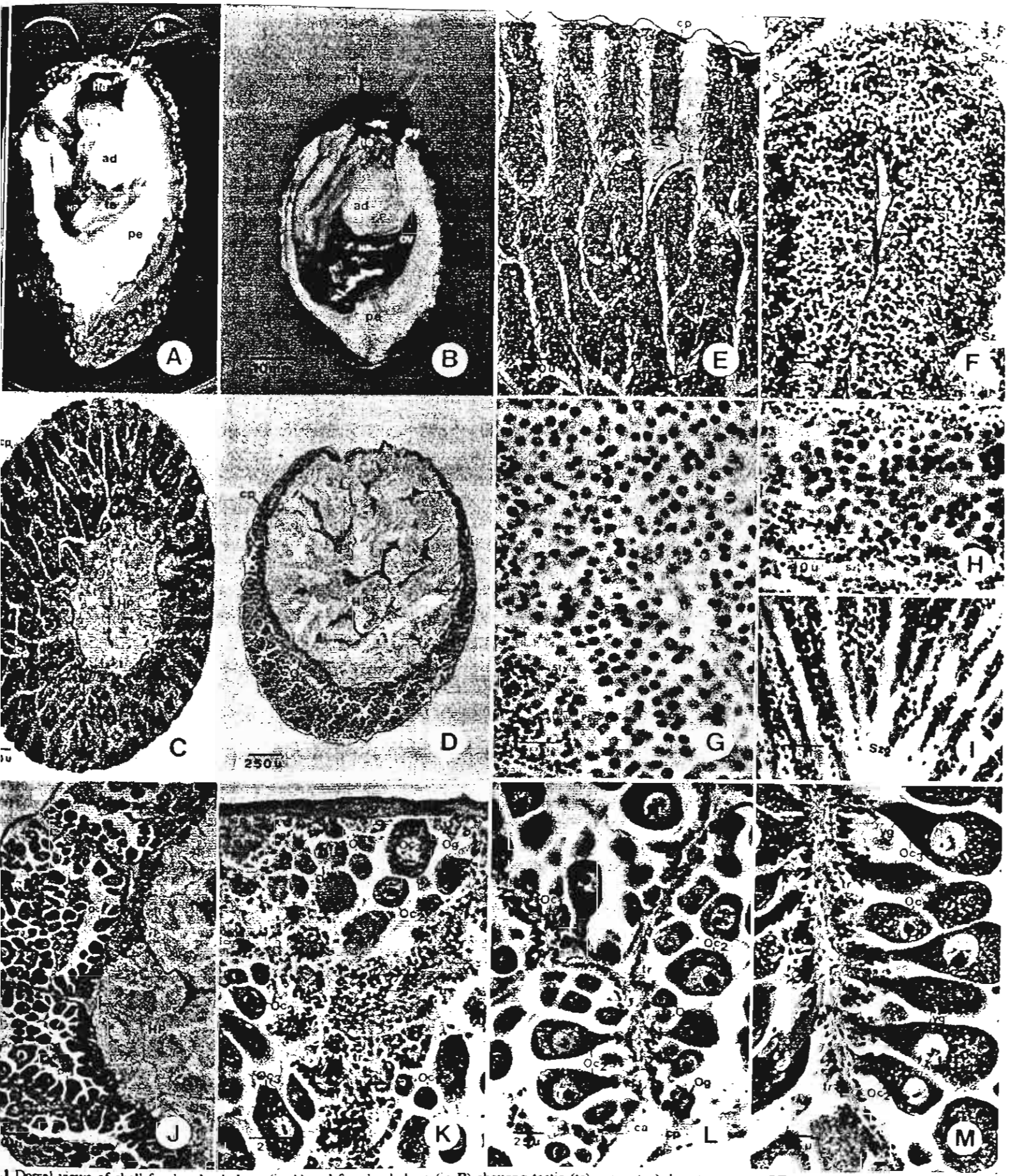
Spent phase (Fig.3K-N) This is the period after spawning when fully mature gamete cells are completely discharged. The gonads exhibit the breaking down of connective tissue stroma, and gametogenic activity momentarily cease. However, there are still clusters of gonial cells remain attached to parts of the gonads' capsule. As a result the gonads are greatly decreased in size and become creamy in color in both sexes. These quiescence gonads show small cross-sectional profiles in contrast to those of the hepatopancreas, which becomes very large in relative size (Fig.3M). This phase occurs after spawning around September to November and February to April in both sexes.

4. Maturation of Gonads

In developing *H.asinina*, definitive gonads appear during 2 months. The initial sign is the separation of hepatopancreatic capsule into 2 separate layers with clusters of gonial cells start to appear in the space between the two layers of capsules. Early spermatocytes (PrSc, SSc) and spermatids (St_{1-4}) could be detected at 4 months, while the ovary could be distinguished from the testis by the presence of few Og in contrast to fairly numerous primary spermatocytes. Spermatocytes, spermatids and mature spermatozoa are increasing in number during 6 to 7 months. While testis are rapidly enlarging and surrounding almost half of the circumference of the conical organ, ovary is much less developed and contains only oogonia and early oocytes ($Oc_{1,2}$). By 8 to 9 month the testis becomes enlarged to almost completely surround the hepatopancreas, and it already contains fully mature spermatozoa; while the ovary tends to be delayed in development and contains only early oocytes (Oc_{1-3}). By 10 to 11 month the testis appears fully developed, while the ovary starts to enlarge substantially and mature oocytes (Oc_{4-5}) begin to appear. Thus the male animals tend to reach full sexual maturity and start normal reproductive cycle as early as 7 to 8 months, while female animals reach sexual maturity and start reproductive cycle around 11 to 12 months (see Table I, Fig.7).

Table I Summary of the Key Features During the Course of Development of Gonads in ***Haliotis asinina***

Age (months)	General Structure	Gametogenic Unit	Cell Types	Phases of Cycle
2	-Separation of gonadal capsule from hepato-pancreatic (HP) capsule. -Development of few muscle cells in gonadal capsule. -sexually indistinguishable.	none	only few undifferentiated gonial cells attached to capsules	none
4	-**male**: testicular tissue covering a quarter of HP capsule. -**female**: ovary shows no further development. -sexually distinguishable.	incomplete none	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4} Og	proliferative none
6	-**male**: testis covering half of HP capsule. -**female**: ovary still small and not well developed.	complete none	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_1 Og, Oc_1	premature none
7	-**male**: testis covering half of HP capsule. -**female**: ovary still small.	complete begin to develop from sprouting trabeculae	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_{1-2} Og, Oc_1, Oc_2	mature very early proliferative
8	-**male**: testis covering slightly over half of HP capsule. -**female**: ovary covering about a quarter of HP capsule.	complete incomplete	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_{1-2} Og, Oc_1, Oc_2, Oc_3	mature early proliferative
9	-**male**: testis covering all HP capsule. -**female**: ovary covering half of HP capsule.	complete incomplete	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_{1-2}, Og, Oc_1, Oc_2, Oc_3	mature proliferative /premature
11	-**male**: testis covering all HP capsule and much thickened. -**female**: ovary covering slightly over half of HP capsule.	complete and numerous complete and increasing in number	Sg, PrSc, SSc, St_{1-4}, Sz_{1-2} Og, Oc_1, Oc_2, Oc_3, Oc_4, Oc_5	mature mature



.1 Dorsal views of shell-freed male abalone (in **A**) and female abalone (in **B**) showing testis (te), ovary (ov), hepatopancreas (HP), adductor muscle (ad), pedal muscle (pe), head (he), eyes (ey), and tentacle (tt). **C)** A cross-section of the testis showing hepatopancreas (HP) surrounded by testicular tissue which is, in turn, surrounded by a thin connective tissue capsule (cp). **D)** a cross-section of the ovary showing hepatopancreas (HP) surrounded by ovarian tissue and fibrous capsule; **E,F)** a spermatogenic unit consists of a central trabeculae (tr) arising from capsule (cp), surrounded by various stages of germ cells; in **F** a capillary (ca) is present inside each trabeculae, and successive maturing stages of germ cells lie at different distance from the connective trabecula (Sc-spermatocyte, St-spermatid and Sz-spermatozoa); **G-I)** sections showing various stages of male germ cells surrounding each trabecula, they are spermatogonia (Sg), primary spermatocytes (LSc-leptotene; ZSc-zygotene, PSc-pachytene, DSc-diplotene; MSc-metaphase stage), spermatid ($St_{1,2}$), and spermatozoa ($Sz_{1,2}$), in **I** there are rows of fully mature spermatozoa (Sz_1), which are the most typical characteristic in mature phase of male abalone; **J)** an oogenic unit also consists of an axis of trabecula (tr) with closely attached early stage oocytes ($Oc_{1,2}$). The fully mature oocytes (Oc_3) are released into the central area of the compartment partitioned off by adjacent trabeculae; **K-M)** sections showing stage I, II and III oocytes ($Oc_{1,3}$) which exhibit intensely basophilic cytoplasm , in **M** there are stage III oocytes (Oc_3) showing the presence of eosinophilic yolk granules (arrows) in the cytoplasm when compared with the former stage oocytes

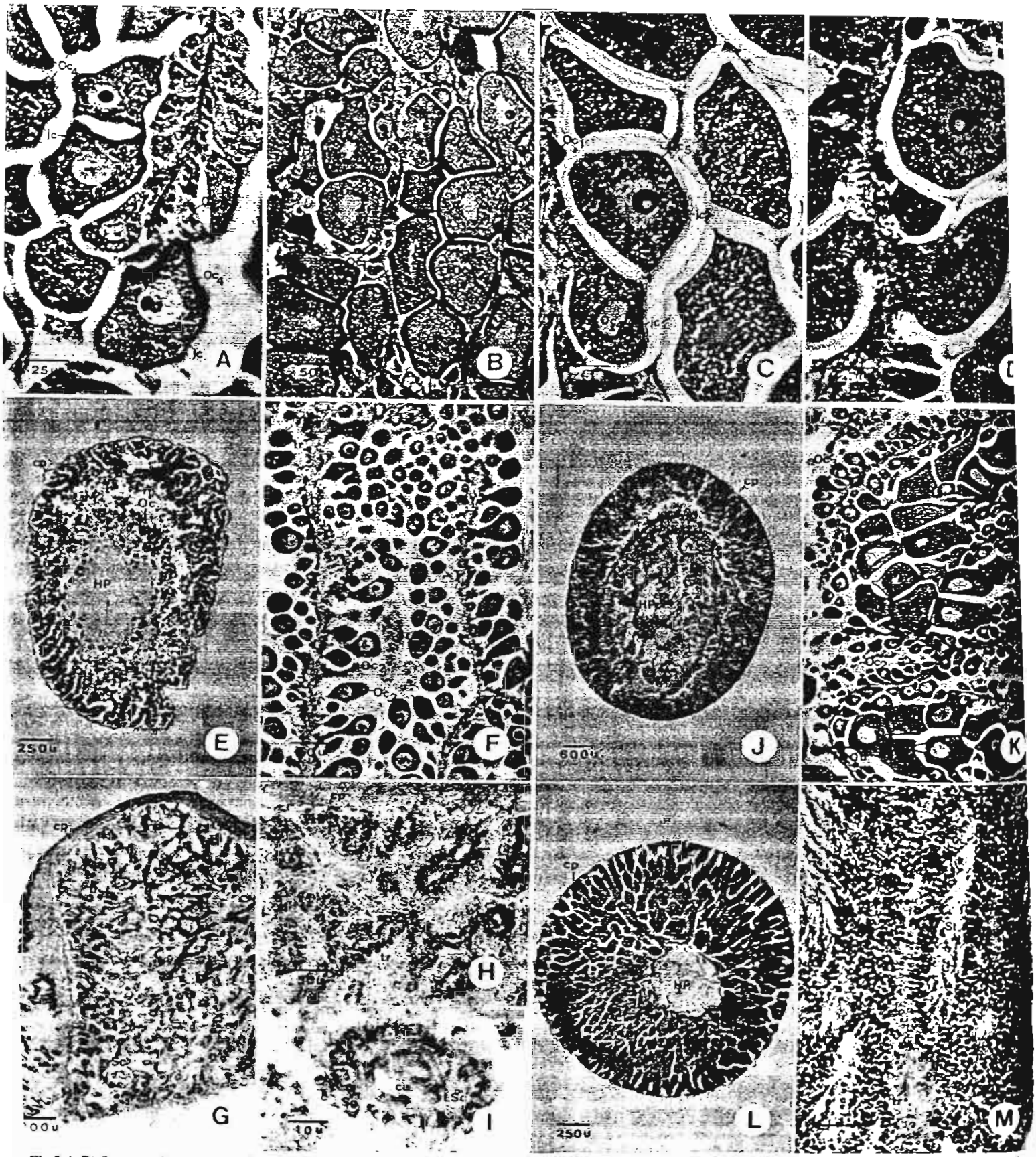


Fig.2 A-D) Sections showing stage IV and V ($Oc_{4,5}$), notice the first appearance of a thin jelly coat (jc), which is PAS positive, and increasing number of eosinophilic volk granules (vg) in $Oc_{4,5}$. The increasing amount of euchromatin, which is pale stained, and the enlargement and vesiculation of nucleolus are also noticeable. Blue stripe underneath the oocyte's plasma membrane (arrow) is present in $Oc_{4,5}$. In D there are two subtypes of stage V cells: the upper cell (1) shows small and evenly distributed eosinophilic yolk granules, and the lower cell (2) shows large platelet of yolks. E-I) Sections of "proliferative phase", showing the regeneration of gamete cells after spawning and spent phases. The ovary (E,F) contains only $Oc_{1,2}$, which are rapidly increased in numbers. The testis (G-I) contains mostly Sg and LSc. Trabeculae, which are depleted of cells and breaking down in spent phase, start to regenerate and appear short and dilated. J-M) Sections of "premature phase", showing rapid increase in numbers and sizes of various cells. The ovary (J,K) contains mostly early stage oocytes ($Oc_{1,2}$) and late stage oocytes ($Oc_{4,5}$) start to appear and gradually increase in numbers. The testis (L,M) contains various stage of primary spermatocytes (PrSc), spermatid (St) together and a few spermatozoa (Sz), all of which are located close to the trabeculae.

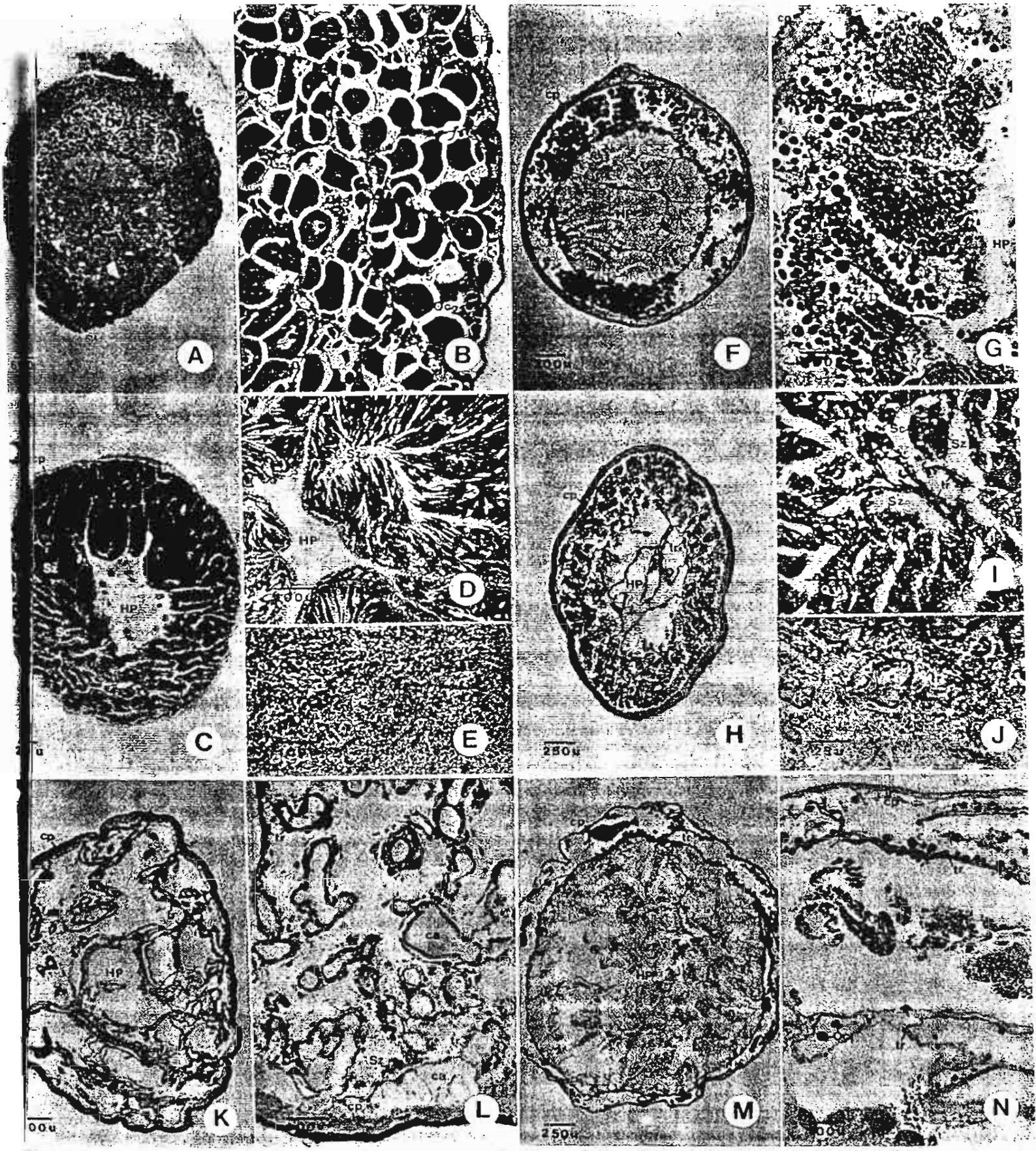


Fig.3 A-E) Sections of "mature phase", showing rapid growth of the gonads. The ovary **(A,B)** contains primarily fully mature Oc_5 with only a few widely scattered early stage cells (Oc_{1-2}). The testis **(C-E)** contains mostly late spermatids (St) and spermatozoa (Sz), which lie in rows and at low power appear streaky **(D)**. Finally they become dispersed and released into luminal area of the testis. **F-J)** Sections of "spawning phase", showing the period when abalone release the viable sperm or eggs from the gonads. The ovary **(F,G)** contains only the earlier stage oocytes which are still attached to the dilated trabeculae. Some yellowish granular substances (arrow) is present in the ovarian lumen. The testis **(H-J)** contains only early stage of male germ cells with a few of spermatozoa (Sz). **K-N)** Sections of "spent phase", showing the complete discharge of gamete cells, and the breaking down of trabeculae and associated connective tissues in both sexes. Notice the hepatopancreas which becomes larger in relative size.

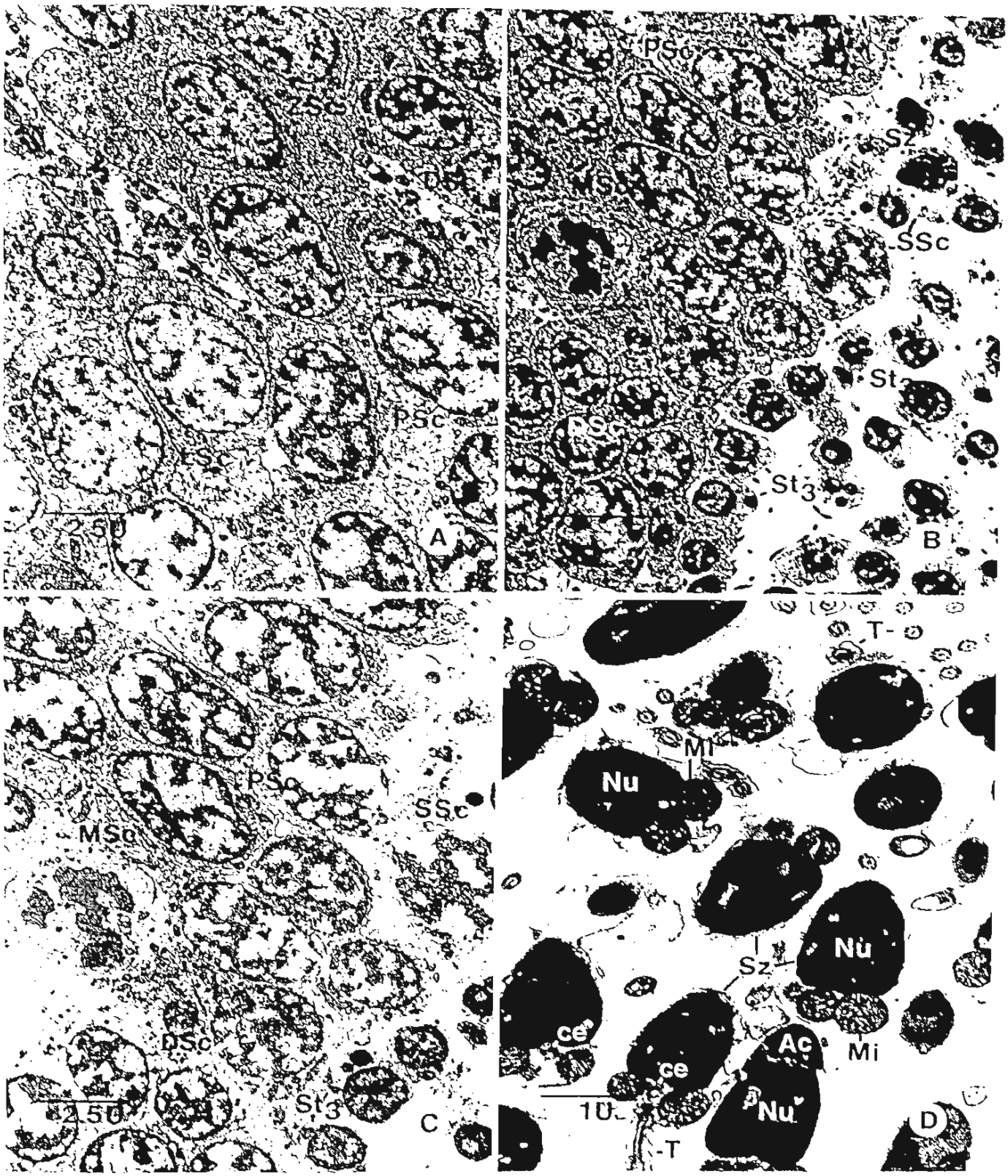


Fig.4 A-C) Electron micrographs showing various stages of male germ cells, including leptotene (LSc), zygotene (ZSc), pachytene (PSc), diplotene (DSc), secondary spermatocyte (SSc), spermarids (St). **D)** Spermatozoa exhibiting dense nucleus (Nu), acrosome (Ac), globular mitochondria (Mi), centriole (ce), and tails (T) with axonemal complexes.

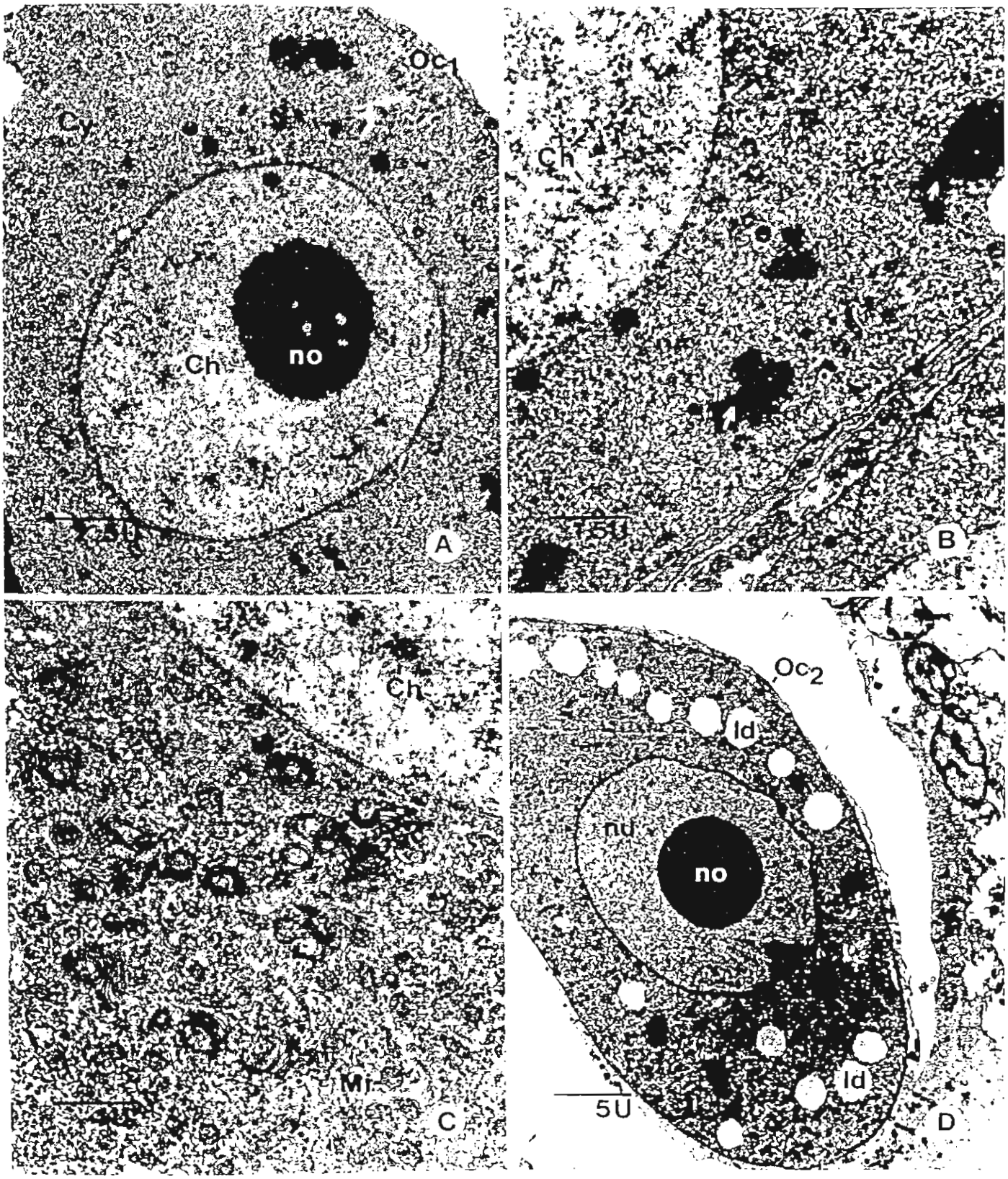


Fig.5 A,B) Early stage I oocyte (Oc_1), exhibiting nucleus with lampbrush chromosomes (Ch), dense nucleolus (no), and cytoplasm (Cy) with abundant ribosomes, some of which are aggregated in crystal-like bodies (arrows) **C)** Late Oc_1, exhibiting the extensive development of Golgi complexes (Gc) and mitochondria (Mi). **D)** Stage II oocyte (Oc_2), exhibiting lipid droplets (ld), nucleus with uncoiled and clear chromatin and nucleolus (no)

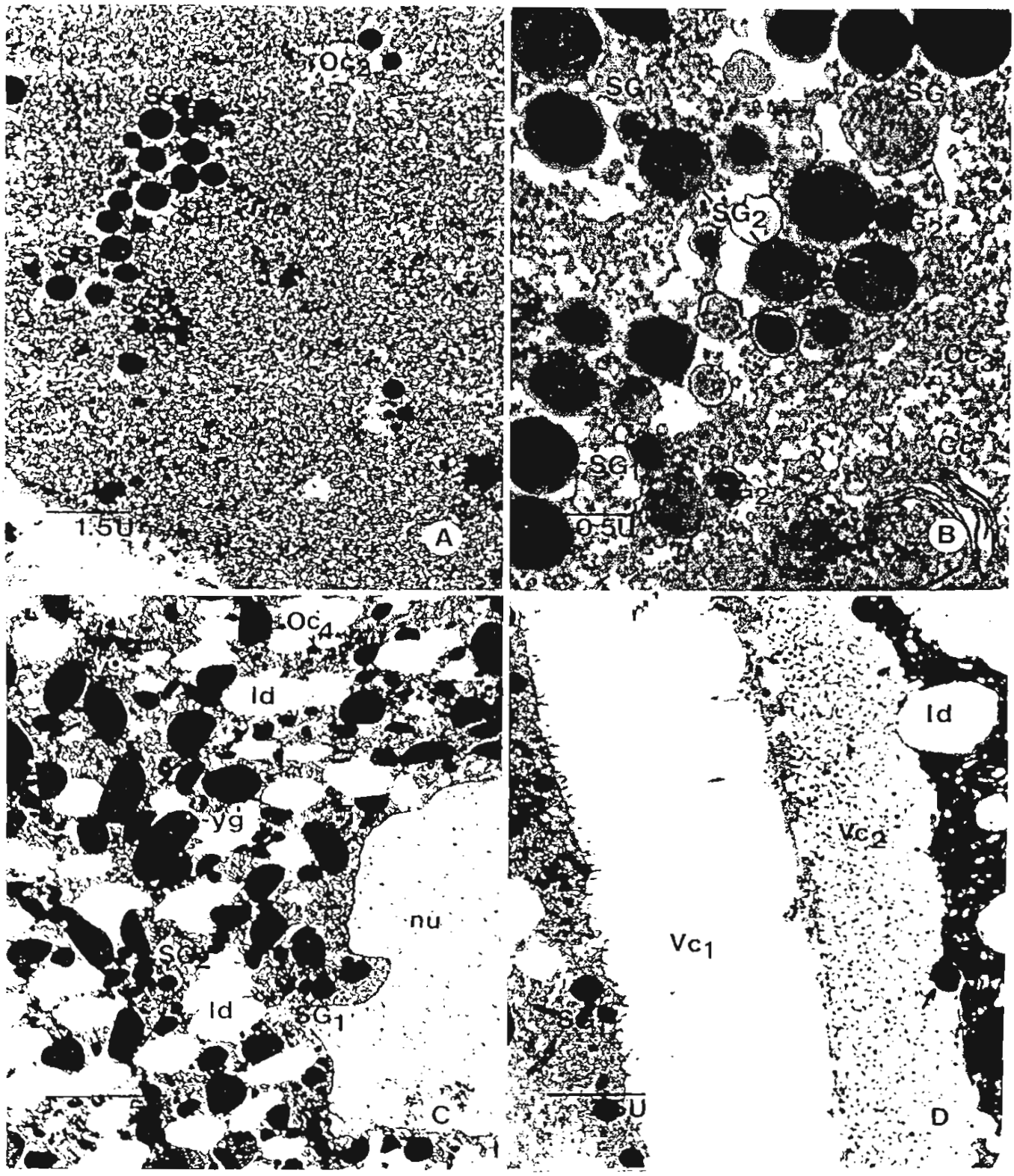


Fig.6 A,B) The cytoplasm of Oc_2 (A) and Oc_3 (B) exhibiting high concentration of dense jelly coat granules (SG_1) and lighter cortical granules (SG_2) around Golgi complexes (Gc). **C)** Fourth stage oocyte (Oc_4) exhibiting very light nucleus (nu) due to completely uncoiled chromatin. The cytoplasm contains numerous large yolk granules (yg), small SG_1 and SG_2 granules. **D)** The homogeneous jelly coat of Oc_4 (Vc_1) and fibrous jelly coat of Oc_5 (Vc_2). Notice the exocytosis of SG_1 into jelly coat Vc_1 (arrow).

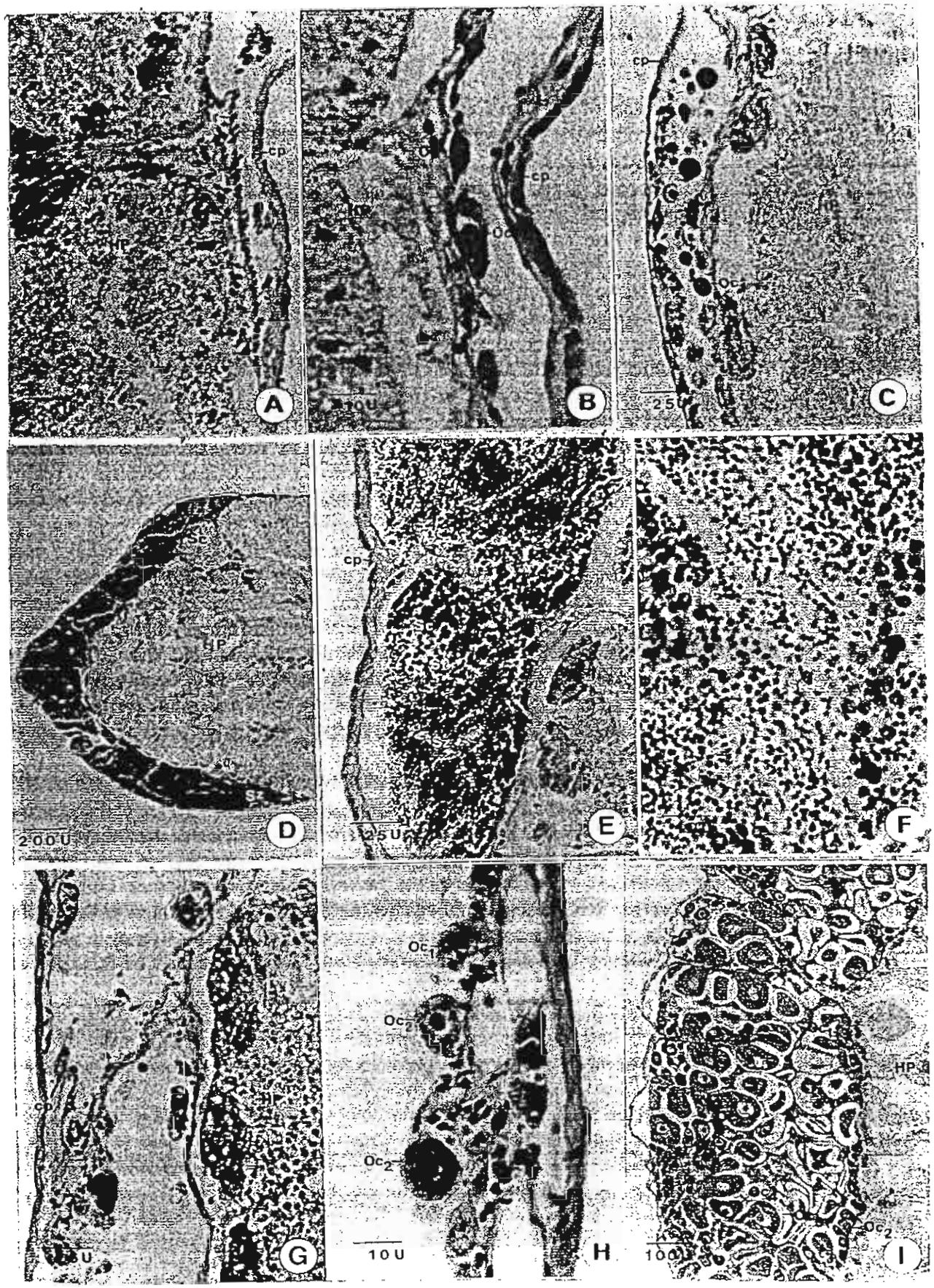


Fig.7 The development of gonads: **A)** the separation of gonadal capsule (cp) from hepatopancreas (HP) at 2 months; **B)** the presence of oogonia (Og) and possibly Oc_1 on the gonadal capsule bordering the hepatopancreas (HP); **C)** the ovary at 6 months showing the presence of early oocytes, mostly Oc_1; **D,E,F)** the testis at 4 months (in **D**) and 6 months (in **E**) showing full range of spermatocytes (Sc), spermatids (St) and some spermatozoa (Sz); **G,H)** ovary at 7 months showing the formation of trabecula (tr) and the presence of early oocytes, mostly Oc_1 and Oc_2; **I)** ovary at 11 months in mature phase, containing mostly $Oc_{4,5}$ and a few $Oc_{1,2}$.

DISCUSSION

Gonadal Structure and Classification of Cells in Gametogenesis

The first accounts of reproductive biology on an abalone species, *H. tuberculata*, was published by Stephenson[11] since 1924, and Croft[12] in 1929, who showed that the basic framework of the gonads is composed of fibrous capsular and trabecular supports, from which germ cells appear to generate. Similar histological studies in other species were later performed by many investigators[13-22]. More recently, a fine structural study of the ovarian cells in the red abalone, *H. rufescens*, was also undertaken by Martin *et al.*[23]. All these studies confirmed similar pattern of structural organization of the gonads; however, there are some disagreements on the classification of the stages of germ cells in the oogenetic and spermatogenic processes[15,16,18,20]. Utilizing a high resolution TEM to study the relative abundance of various organelles, particularly ribosomes and the development of rough endoplasmic reticulum and Golgi complexes in the cells, Martin *et al.*[23] suggested that there are 5 stages of female germ cells in *H. rufescens*, which they termed oogonium, presynthetic oocyte, synthetic oocyte, early postsynthetic oocyte and fully developed postsynthetic oocyte. We feel that the classification based on size alone, as adopted by many investigators, is not a good criterion for dividing cells in a single line of differentiation into various stages, because in reality these cells are undergoing continuous development. A better criterion would be to divide the cells according to the changes in histological and ultrastructural features which reflect the beginning of different synthetic activities in various developmental stages. In our study of *H.asinina*, we have used the following light and electron microscopic characteristics for dividing the stages of female germ cells: 1) the appearance of nucleus and nucleolus especially with regard to the uncoiling of chromatin, as reflected by the clarity of the two structures; 2) the clarity of nuclear membrane which is the result of the density difference between the condensed chromatin in the nucleus and the surrounding cytoplasm; 3) the basophilia or the bluishness imparted to the cytoplasm of the cells by basophilic dyes which reflect the abundance of ribosomes in the cytoplasm; 4) the presence of lipid droplets; 5) the development of secretory organelles particularly rough endoplasmic reticulum and Golgi complexes; 6) the occurrence of basophilic secretory granules including cortical granules, and eosinophilic yolk granules, and their relative abundance; and 7) the presence of jelly coat surrounding the egg cells. By using these rather stringent morphological criteria, we have identified 5 stages of egg cells, starting from oogonia (Og) which are the smallest cells closely attached to the connective tissue trabecula. These cells could maintain a constant pool of early stem cells, particularly those that are clustered towards the capsular side of trabeculae. During the spent period when most mature oocytes are released from the ovary and the connective tissues of trabeculae are breaking down, these cells are the only remaining group of germ cells. The restoration of gonadal structure during proliferative phase is carried out by the regeneration of connective tissues of trabeculae and the proliferation of this pool of oogonia.

The first stage of oocytes (Oc_1) including cells of different sizes ranging from 20-24 μm. The most pronounced characteristics that they exhibit is the increasing basophilia or bluishness of their cytoplasm. And because of the similar degree of density between the cytoplasm on one hand, and the partially condensed chromatin and dense nucleoplasm on the other, the outline of nuclear membrane could not be easily discerned under LM. The nucleolus, while present, is not outstanding. All Oc_1 are surrounded by a single layer of flat follicular cells. Under TEM we found that there is increasing amount of ribosomes which reflects the intense cytoplasmic basophilia. While ribosomes are rapidly synthesized during the early stage of Oc_1, definite surge in the number and degree of development of Golgi complexes and RER are observed only in late Oc_1. These two subgroups of Oc_1 do not yet exhibit any secretory granules. Thus they may correspond to the presynthetic oocytes as described by Martin *et al.*[23], when cells are preparing themselves for the onset of synthetic activities.

Oc_2 is the stage that first shows the presence of lipid droplets in the less intense basophilic cytoplasm. Due to the decondensation of most chromatin, and the increased translucence of the nucleoplasm, the nuclear boundary could be clearly observed under LM. For similar reasons the

nucleolus also becomes more distinct; and because of its enlargement the nucleolar activities for ribosomal synthesis is believed to be on the increase[24]. Under TEM, a few definite SG_1 and SG_2 granules start to appear in this stage, by clustering around Golgi complexes. Thus Oc_2 could represent the initial phase of synthetic activities when jelly coat (SG_1) and cortical granules (SG_2) are first synthesized.

Oc_3 is the stage which eosinophilic yolk granules first appear, and later is increasing in number; hence rendering the cytoplasm of Oc_3 more reddish in contrast to that of Oc_2, while the basophilic or bluish SG granules are seen scattered evenly between yolk granules and lipid droplets. We believed, therefore, that this is the stage where there is intense synthetic activities, since under TEM numerous SG_1 and SG_2 as well as yolk granules appear in large numbers; particularly SG_1 and SG_2 were seen concentrating around Golgi complexes. Oc_3 is still surrounded by a single layer of follicular cells, which by this time consists of several cells because of the increase in size of the cell. In addition, Oc_3 is further detached from the connectives of trabeculae and assumes a pear or even tear-drop shape. The chromatin becomes completely euchromatic and the nucleolus is enlarged further as its chromatin are almost completely uncoiled; this implies the active transcriptional as well as translational activities.

Oc_4 is the stage where a thin jelly coat is first detectable, and it is sandwiched inbetween the egg's cell membrane and the surrounding layer of follicular cells. Under LM the cytoplasm of Oc_4 becomes increasingly eosinophilic and appears more reddish due to the staining of numerous yolk granules by eosin. While the jelly coat is intensely PAS positive, the yolk granules are completely PAS negative. The contrasting feature implies that there may be very little or no carbohydrate moieties in the yolk granules, while these are the major constituent of the jelly coat. Under TEM the cytoplasm of Oc_4 is filled with SG_1, SG_2 and yolk granules, which reflect the near saturation of synthetic activities. The chromatin of Oc_4, like that of Oc_3, is completely in euchromatic state and the nucleolus is fully enlarged due to the complete uncoiling of its chromatin, and under LM it even appears eosinophilic. These indicate still high levels of both nuclear and nucleolar transcriptional activities. Another remarkable feature of Oc_4 under LM is the appearance of a narrow bluish stripe in the cytoplasm just underneath the cell membrane, while the bluishness of the remaining mass of cytoplasm is much decreased in comparison to Oc_2 and Oc_3. This could be due to the high concentration of basophilic SG_1 and SG_2 granules which are translocated to this area as observed under TEM. Some of the more electron SG_1 granules are also seen exocytosed to the cell's periphery, and thus is believed to contribute material to the formation of the jelly coat. In contrast, SG_2 contains more electron lucent material than SG_1. They may be the actual cortical granules that are concentrated in the narrow cytoplasmic zone underneath the plasma membrane, and thus are kept in reserve for cortical reaction upon fertilization of the egg by the sperm.

Oc_5 is the stage where the jelly coat becomes uniformly thick and deprived of surrounding layer of follicular cells. Under TEM the jelly coat is transformed from homogeneous in Oc_4 to fibrous structure in Oc_5. There is no division of this cell coat into jelly and vitelline layers as reported in other species[25]. Thus Oc_5 appears completely mature and is fully detached from the trabeculae. The absence of follicular cells might allow the detachment of Oc_5 into space between trabeculae and ready them for release from the ovary. From this appearance it could be speculated that the major roles of follicular cells are protective and helping to maintain the adherence between oocytes and trabecula connective tissue, while the former are undergoing maturation. In addition, follicular cells could be involved in nutritive function for oocytes, and their roles in synthesizing the jelly coat could not yet be ruled out. Under LM the cytoplasm of Oc_5 is laden with reddish yolk granules. Based on the size of these yolk granules there could be 2 subgroups of Oc_5: one containing small granules of uniform size while the other contains very large granules, both of which appear very electron opaque under TEM. It is still not possible to confirm whether these are two separate stages of Oc_5, or that the latter merely represent the final stage in which small yolk granules are coalesced to form larger ones. In any cases these two subgroups of Oc_5 should represent fully mature cells. In comparison to the work of Martin *et al.*[23], Oc_4 could represented the early postsynthetic cells and Oc_5 late postsynthetic cells; even though, judging from ultrastructural features certain degree of synthetic activities must still be carried out in these cells.

Up to now most studies have not rigorously categorize various spermatogenic cells of *Haliotis*, apart from suggesting broadly that there are 4 stages, *i.e.*, spermatogonia, spermatocytes, spermatids and spermatozoa[16,18,20]. In the present study, the male germ cells in *H. asinina* could be classified into 13 specific stages according to the size, shape, appearance of chromatin and the presence or absence of nucleolus. Spermatogonium is the earliest cell whose nucleus contains almost all euchromatin which results in the nucleus being very clear and nucleolus is prominent. Spermatogonia divided mitotically to give rise to primary spermatocytes, which pass through 5 stages as in the first meiotic division of vertebrates' germ cells[26]. These prophase cells exhibit different forms of chromatin condensation, beginning with small to larger blocks of heterochromatin that are evenly scattered throughout the nucleus in LSc and ZSc. Heterochromatin blocks transform to thread-like pattern that are increasing in thickness and length, and become more entwined in PSc and DSc. Finally in diakinetic and MSc stages chromatin appears as pairs of chromatids that are translocated to the equatorial region. Secondary spermatocytes are quite numerous in comparison to those in vertebrates and they have heterochromatin that exhibit checker-board or XY-figure pattern.

Four stages of spermatids could be identified in *H.asinina* based on the nuclear size, shape and chromatin condensation. Under LM the first two stages exhibit finely granulated chromatin that appears homogeneous and evenly stained throughout the nuclei. Thus St_1 and St_2 could be distinguished by the difference in size (St_1 about 6 μm versus St_2 about 4 μm), and by the denser nuclear material in St_2. The latter is due to the reduction of nuclear volume which results in the closer packing of chromatin fibers, even though each fibers still maintain their width of 30 nm. In the third stage (St_3) the chromatin fibers begins to be tightly wound together into large dense blocks, particularly along the nuclear envelope, leaving clear areas between the blocks. At this stage individual fiber increases in size to 40 nm. Eventually, the decrease in volume of nucleus and its more ellipsoid shape results in the total condensation of chromatin mass in St_4, and individual chromatin fiber is enlarged to 60 nm.

The two stages of spermatozoa are distinguished by their ellipsoid nuclei. Sz_1 also shows the initial formation of acrosome as a clear cap-like structure on one end of the nucleus, while exhibiting only short tail. Under TEM, there is the formation of axonemal complexes from centriolar pair that move to the neck area just distal to the nucleus. Later, three to five globular mitochondria become localized around the centrioles. In Sz_2 the nucleus is elongated further and chromatin appears completely dense with the outline of 60 nm fibers (or granules) barely discernible. Sz_2 exhibits a completely formed tail that is long and point outwards from each trabecula.

Reproductive Cycle

There have been a number of studies on the course of reproductive cycle in various abalone species by many investigators. The two methods that are frequently used for determining a reproductive cycle of a population are: 1) the measuring of the relative size of gonads with respect to the size of conical organ which is termed gonad indices (GI); and 2) the assessing of histological changes in the gonads[17,27-30]. GI is not always a valid index for development of the gonads because GI only relates gonad area to constant parameters (e.g. the size of conical organ) of the animal, and it does not take variation in hepatopancreas size into account[18,31]. The more precise index that can define of reproductive cycle better is the use of histological examination of gonad sections, which can give considerable details of cellular association and the time interval between successive phases[17]. Many investigators, including Tomita[15-16], Lee[32], Giorgi & DeMartini[33], Ault[30], classified the reproductive stages in various temperate species of *Haliotis* into 5 to 6 distinct phases which are more clearly defined in females. In the present study, these various phases were also observed in *H. asinina*. Histological examination of monthly samplings of the brooding stocks cultured in the land-based culture system reveal 5 distinctive gonadal patterns during the year, *i.e.*, proliferative, premature, mature, spawning and spent phase.

Proliferative phase is characterized by the regeneration of gamete cells for the new cycle. The gonads contain mostly early stage germ cells in both sexes, such as Og, Oc_1, Oc_2 in the ovary, and

mainly Sg, PrSc without St and Sz in the testis. Giorgi & DeMartini[44] and Ault[30], on studying *H. rufescens*, found that the ovary contained primarily small oocytes usually lesser than 50 μm in diameter; while Tomita[15], on studying *H. discus hannai*, reported that there are mainly oogonia, yolkless and oil drop oocytes in this stage. Another remarkable features during this phase is the reciprocal relationship between the sizes of the gonads to the hepatopancreas, which is similar to that found in other *Haliotid*[13,17]. That is the hepatopancreas is relatively large when compared to the total area of conical organ. Booloottan *et al*.[13] also reported that, in *H. cracherodii* and *H. rufescens*, the size of hepatopancreas exhibits an inverse relationship to gonadal activity. During this phase, the hepatopancreas attains maximum size while the gonad activity is relatively quiescent. The precipitous drop in the size of hepatopancreas will occur during the subsequent phase when there is a rapid growth of the gonads. This implies that hepatopancreas may act as a nutrient storage that is necessary for gamete cells development; it becomes relatively depleted when the proliferation of gonad cells start to surge. Another remarkable histological features observed during this phase is the dilatation of the trabecular vessels which contain large amount of granular materials. This may represent the turgid state of the vessels that are supplying nutrients to the rapidly proliferating and growing gamete cells.

Premature phase is the period of rapid increase in numbers and sizes of gamete cells. The ovary contains predominantly Og, Oc_1, Oc_2, Oc_3 and few Oc_4 which is similar to those reported in the premature stage of *H. discus hannai*[15,34], while Sg, Sc and only few of St and Sz are evident in the testis during this phase. Ault[30], in studying *H. rufescens*, also reported that there were numerous developing early germ cells in this stage. Hence the major events of development in this phase involve the rapid growth of the gonads due to fast proliferation of early germ cells.

Mature phase is characterized by a notable enlargement of the gonads which exhibit striking differences of color between both sexes: greenish in female and yellowish in male. The ovary contains mostly late stage germ cells, *i.e.*, Oc_5 with widely scattered Oc_1; and the testis is mostly filled with St and Sz. Before spawning occurs, Oc_5 are detached from trabeculae and released into the gonadal lumen. During the rapid development of the testis, each trabecula is surrounded successively by a few rows of Sg, PrSc which are closely bound to trabecular connectives, and middle Sc, St appear further away, and Sz are completely detached from trabeculae. In comparison, during the differentiation of Oc_1 to Oc_5 from Og, the cells move along the trabeculae from capsular side towards the hepatopancreas side, until Oc_5 become detached from trabeculae.

Spawning phase is the time when gravid abalone start to release their ripened gametes. The period of spawning is the most important criterion for success of reproduction of various abalone species reared in close aquaculture system[13-19,29,33,35-37]. From many previous studies, spawning periods have been found to vary considerably among various species of abalone, and from year to year according to geographical locations, and local environment, such as food supply, temperature and the day length[17,34,38-41]. Thus, some investigators[13,36] have classified various *Haliotid* spp. into 3 groups according to their spawning season: those spawn during summer, those spawn during seasons other than summer, and those that exhibit year-round spawning. Earlier, Singhagraiwan & Doi[42] reported the spawning period of some wild broodstocks of *H. asinina* to peak around October, while the pond-reared broodstocks could spawning throughout the year with several minor peaks during March through September. In contrast, the spawning period of *H. asinina* kept in land-based closed culture system in the present study occurs twice a year: around August to October and March to April in female, and around August to November and February to April in male. While this is the general pattern of spawning for most members of the population, some individual may show irregular periodic spawning throughout the year, especially in males animals.

Spent phase is characterized by the lacking of gamete cells and the breakdown of connective tissue in the gonads, which is similar to that previously finding in *H. rufescens*[33]. According to Shepherd & Laws[36], spent phase is expressed when there is a complete discharge of gamete cells following spawning. Giese[28] defined spent phase in marine invertebrates as a postspawning quiescent stage which is indistinguishable between male and female. In present study, it was observed that during the spent phase the gonads of *H. asinina* are greatly reduced in size and become creamy in

color, and the sexes of animals cannot be distinguished. In contrast, hepatopancreas is relatively increased in size which may be filled up with food reserve.

From the data collected during one year period, it could be concluded that the spawning of *H. asinina* reared in the closed culture system can occur at least twice yearly providing that the culturing condition and food supply are optimal. And that each reproductive cycle, consisting of 5 phases of development needs at least 5 to 6 months to complete itself.

Maturation of Gonads

In previous studies of the gonadal development in *H. asinina*, fecundity was observed in females with the shell length of at least 48 mm for the wild broodstock, and 44 mm of the hatchery-reared broodstock, which was about nine months old[43-44]. On the other hand, the mature gonad of males become obvious in animals with the shell length of at least 31 mm, which was about seven and a half months old[42-44]. The data collected in the present study indicate the same trend. Furthermore, detailed histological study indicated that definitive gonads become clearly separated from the hepatopancreas at 2 month. Testis and ovary could be distinguished by the present of their initial stages of germ cells as early as 4 month. Testis tends to reach maturity quicker than ovary at 7 to 8 months, the time at which St and Sz are found to be abundant. Ovary tends to mature later at 10 to 11 months when it starts to contain mature oocytes (Oc_4 and Oc_5). Thus males tend to reach maturity and assume reproductive cycle much earlier than females.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by the Thailand Research Fund (Contract BRG4080004 and Senior Research Scholar Fellowship to Prasert Sobhon).

REFERENCES

1. Nateewathana A, Hylleberge J. (1986) A survey on Thai abalone around Phuket Island and feasibility study of abalone culture in Thailand. *Thai Fish. Gazette* **39**, 177-190.
2. Tookvinart S, Leknim W, Donyadol Y, Preeda-Lampabutra Y, Perng mak P. (1986) Survey on species and distribution of abalone (*Haliotis* spp.) in Surajthani, Nakornsrithammaraj and Songkhla provinces. Technical Paper No.1/1986, National Institute of Coastal Aquaculture, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. 16p.
3. Nateewathana A, Bussarawit S. (1988) Abundance and distribution of abalones along the Andaman Sea Coast of Thailand. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* **22**, 8-15.
4. Singhagraiwan T, Sasaki M. (1991a) Breeding and early development of the donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linne. *Thai Mar. Fish. Res. Bull.* **2**, 83-94.
5. Singhagraiwan T, Sasaki M. (1991b) Growth rate of donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linne, cultured in tank. *Thai Mar. Fish. Res. Bull.* **2**, 95-100.
6. Kakhai N, Petjamrat K. (1992) Survey on species and broodstock collection of abalone (*Haliotis* spp.) in Chon-buri, Rayong and Trad provinces. Technical Paper No.6/1992, Aquaculture Station, Coastal Aquaculture Division, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand.
7. Singhagraiwan T, Doi M. (1993) Seed production and culture of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linne. The Eastern Marine Fisheries Development Center, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. 33p.
8. Sungthong S, Ingsrisawang V, Fujiwara S. (1991) Study on the relative growth of abalone, *Haliotis asinina* Linne, off Samet Island. *Thai Mar. Fish. Res. Bull.* **2**, 120.
9. Bussarawit S, Kawintertwathana P, Nateewathana A. (1990) Preliminary study on reproductive biology of the balone (*Haliotis varia*) at Phuket, Andaman Sea Coast of Thailand. *Kasetsart J. (Nat. Sci.)* **24**, 529-39.
10. Jarayabnand P, Jew N, Manasveta P, Choonhabandit S. (1994) Gametogenic cycle of abalone *Haliotis* ovina Gmelin 1791 at Khangkao Island, Chon-buri province. *Thai J. Aqua. Sci.* **1**, 43-42.
11. Stephenson TA. (1924) Notes on *Haliotis tuberculata*. *J. Marin. Biol. Assoc. UK* **13**, 480-495.

12. Croft DR. (1929) *Haliotis*. L.M.B.C. mem, Liverpool University Press, **29**, 174p.
13. Boolootian RA, Farmanfarmaian A, Giese AC. (1962) On the reproductive cycle and breeding habits of two western species of *Haliotis*. *Biol. Bull.* **122**, 183-93.
14. Newman GG. (1967) Reproduction of the South African abalone *Haliotis midae*. Division of Sea Fisheries, Republic of South Africa, Investigational Report No.64, 24p.
15. Tomita K. (1967) The maturation of the ovaries of the abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, in the Rebun Island, Hokkaido, Japan. *Sci. Rep. Hokkaido Fish. Exp. Sta.* **7**, 1-7.
16. Tomita K. (1968) The testis maturation of the abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, in the Rebun Island, Hokkaido, Japan. *Sci. Rep. Hokkaido Fish. Exp. Sta.* **9**, 56-61.
17. Webber HH, Giese AC. (1969) Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone *Haliotis cracherodii* (gastropoda: prosobranchiata). *Mar. Biol.* **4**, 152-9.
18. Young JS, DeMartini JD. (1970) The reproductive cycle, gonadal histology and gametogenesis of the red abalone, *Haliotis rufescens* (Swainson). *Calif. Fish and Game* **56**, 298-309.
19. Harrison AJ, Grant JF. (1971) Progress in abalone research. *Tasm. Fish. Res.* **5**, 1-10.
20. Takashima F, Okuno M, Nichimura K, Nomura M. (1978) Gametogenesis and reproductive cycle in *Haliotis diversicolor diversicolor* Reeve. *J. Tokyo Univ. Fish.* **1**, 1-8.
21. Brickey BE. (1979) The histological and cytological aspects of oogenesis in the California abalones. (M.S. Thesis) California State University, Long Beach, California.
22. Tutschultz T, Connell JH. (1981) Reproductive biology of three species of abalone (*Haliotis*) in southern California. *The Veliger* **23**, 195-206.
23. Martin GG, Romero K, Miller-Walker C. (1983) Fine structure of the ovary in the red abalone *Haliotis rufescens* (Mollusca: gastropoda). *Zoomorphology* **103**, 89-102.
24. Schwarzacher HG, Wachtler F. (1993) The nucleolus. *Anat. Embryol.* **188**, 515-36.
25. Monzingo NM, Vacquier VD, Chandler DE. (1995) Structural features of the abalone egg extracellular matrix and its role in gamete interaction during fertilization. *Mol. Reprod. Dev.* **41**, 493-502.
26. Courot M, Hochereau-de Reviers M-T, Ortavant R. (1970) The testis. Johnson AD. (ed.) (1970). Academic Press, New York, 399p.
27 Hahn KO. (1989) Handbook of culture of abalone and other marine gastropods. Hahn KO. (ed.)(1989). CRC Press, Boca Raton, Florida, p.13-39.
28. Giese AC. (1959) Comparative physiology: annual reproductive cycle of marine invertebrates. *Ann. Rev. Physiol.* **21**, 547-76.
29. Grant A, Tyler PA. (1983) The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *Int. J. Invertebr. Reprod.* **6**, 259.
30. Ault J. (1985) Some quantitative aspects of reproduction and growth of red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *J. World Maricult. Soc.* **16**, 398-425.
31. Hahn KO. (1981) The reproductive cycle and gonadal histology of the pinto abalone, *Haliotis kamtschatkana* Jonas, and the flat abalone, *Haliotis walallensis* Stearns. *Adv. Invertebr. Reprod.* **2**, 387.
32. Lee TY. (1974) Histological study on gametogenesis and reproductive cycle of the Korean Coasts. *Bull. Pusan. Fish. Coll.* **14**, 55.
33. Giorgi AE, DeMartini JD. (1977) A study of the reproductive biology of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson, near Mendocino, California. *Calif. Fish and Game* **63**, 80-94.
34. Mugiya Y, Kobayashi J, Nishikawa N, Motoya S. (1980) Gonadal maturation in the abalone, *Haliotis discus hannai* at Taisei, Hokkaido. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido Univ.* **31**, 306-13.
35. Poore GCB. (1973) Ecology of New Zealand abalones, *Haliotis* species (mollusca: gastropoda). *New Zealand J. Mar. Freshwat. Res.* **6**, 534-59.
36. Shepherd SA, Laws HM. (1974) Studies on southern Australian abalone (Genus *Haliotis*). II. Reproduction of five species. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* **35**, 49-62.
37. Girard A. (1972) La reproduction de l'ormeau Haliotis tuberculata L. *Rev. Trav. Inst. Peches. Marit.* **36**, 163-84.
38. Cox KW. (1962) Review of the abalone of California. *Calif. Fish and Game* **46**, 381-406.
39. Uki N, Kikuchi S. (1984) Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. *Aquaculture* **39**, 247-61.
40. Kinne O. (1970) Marine ecology: A comprehensive integrated treatise on life in oceans and coastal waters. Vol.1, Kinne O. (ed.) (1970). Wiley-Interscience, London, p 407-514.

41. Shepherd SA. (1973) Studies on southern Australian abalone (Genus *Haliotis*). I. The ecology of five sympatric species. *Aust. J. Mar. Freshwat. Res.* **24**, 217-57.
42. Singhagraiwan T, Doi M. (1992) Spawning pattern and fecundity of the donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linne, observed in captivity. *Thai Mar. Fish. Res. Bull.* **3**, 61-9.
43. Singhagraiwan T. (1989a) The experiment on breeding and nursing of Donkey's ear abalone (*Haliotis asinina* Linne). Technical Paper No.21/1989a, The Eastern Marine Fisheries Development Center, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand.
44. Singhagraiwan T. (1991) Study on growth rate of donkey's ear abalone (*Haliotis asinina* Linne). Technical Paper No.28/1991, The Eastern Marine Fisheries Development Center, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand.

บทคัดย่อ

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในอัณฑะของหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina* ประกอบด้วยเซลล์ 13 ขั้น ได้แก่ spermatogonia, primary spermatocytes 5 ขั้น, secondary spermatocyte, spermatids 4 ขั้น, spermatozoa 2 ขั้น ในรังไข่ประกอบด้วยเซลล์ 6 ขั้น คือ oogonia และ primary oocytes 5 ขั้น พ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในระบบปิดแสดงวงจรการสืบพันธุ์ในหนึ่งปีที่แบ่งออกได้เป็น 5 ช่วง ตามชนิดและปริมาณของเซลล์สืบพันธุ์ที่ปรากฏในช่วงต่าง ๆ คือ ช่วง proliferative, premature, mature, spawning และ spent ช่วง spawning เป็นช่วงที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ที่พัฒนาเต็มที่แล้วออกมาจากหอย ซึ่งในหอยตัวเมียมักเกิดขึ้นได้ใน 2 ระยะ คือประมาณเดือนมีนาคมถึงเมษายน และสิงหาคมถึงตุลาคม ส่วนในตัวผู้เกิดได้ 2 ระยะเช่นกัน แต่มักจะกินเวลานานกว่า นอกจากนั้นหอยตัวผู้บางตัวยังสามารถปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้เกือบตลอดทั้งปี ในหอยวัยเยาว์อัณฑะและรังไข่แยกจากตับเมื่ออายุ 2 เดือน อัณฑะพัฒนาเต็มที่เมื่อ 7-8 เดือน ในขณะที่รังไข่พัฒนาเต็มที่เมื่อ 11-12 เดือน

THE REPRODUCTIVE CYCLE AND THE DEVELOPMENT OF THE GONAD IN THE THAI ABALONE, *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

M. Kruatrachue, S. Apisawetakan, E.S. Upatham, P.Sobhon, S. Sawatpeera, S. Singhakaew, V. Ingsrisawang and T. Singhagraiwan

ABSTRACT

The reproductive cycle and development of the gonad in the Thai abalone, *Haliotis asinina* were studied by light microscopy. Mature *H. asinina* were collected monthly from a natural habitat along Samed Island, Rayong Province, and from a land-based culture system, in order to study the reproductive cycle. The gonads of abalone both from natural habitat and land-based culture exhibit five phases of histological pattern during the year: proliferative, premature, mature, spawning and spent. Spawning occurs at least twice during the year. In the natural habitat, spawning occurs from April to May and August to September in females and from April to May and August to October in males. In the land-based culture system, spawning occurs from March to April and August to October in females and from February to April and August to November in males.

The development of the gonad of *H. asinina* was histologically studied by collecting monthly one- to thirteen-month-old juvenile abalone from the land-based culture system. Gonads appear in six-month-old abalones and become fully mature in nine-month-old animals.

KEY WORDS *Haliotis asinina*, reproductive cycle, development, gonad.

INTRODUCTION

Like most marine invertebrates, abalone are seasonal in their reproduction (Webber & Giese, 1969). The entire reproductive cycle can be divided into a reproductive period, during which the gonads show activity from their first initiation until spawning, and a vegetative period that follows reproduction and corresponds to the acquiescing period of the gonads, during which the reserve stem cells start to proliferate. Gametogenesis is again initiated in preparation for the next reproductive cycle (Giese, 1959).

Seasonal changes of gonad and stages of gametogenesis in temperate abalone species have been studied intensively. According to Cox (1962) and Uki & Kikuchi (1984), the actual spawning period for different abalone species can vary according to geographical location and

environmental conditions. Reproductive studies of haliotids from around the world have shown a wide range of reproductive patterns both between and within species (Hahn, 1992). Reviews of spawning seasons by Boolootian *et al.* (1962), Shepherd & Laws (1974) and Hahn (1989) show great variability of spawning season. The temperate abalone *Haliotis rufescens* Swainson, was found to be filled with mature gametes and capable of spawning throughout the year in the southern part of its geographical range, while spawning only occurred in the warmest summer months in the northern part of its range (Boolootian *et al.*, 1962; Young & DeMartini, 1970; Giorgi & DeMartini, 1977). *Haliotis cracherodii* Leach around Pacific Grove, California, had a spawning period from June to October (Boolootian *et al.*, 1962), whereas in *Haliotis discus hannai* Ino in Japan, spawning period took place around August to late September (Tomita, 1967, 1968; Mugiya *et al*, 1980; Yahata & Takano, 1970). *Haliotis iris* Gmelin in New Zealand exhibits spatial variability in its reproductive cycle. Studies by Poore (1973), Sainsbury (1982) and Wilson & Schiel (1995) in the South Island demonstrated variability between localities and years, but with a general pattern of spawning in late summer to autumn (February or March to April). Hooker & Creese (1995) reported two major spawnings in *H. iris* in the North Island, June-July and September-October, with a minor spawning in February-March. In *Haliotis diversicolor diversicolor* Reeve from Taiwan, the spawning period occurred during September to October (Takashima *et al.*, 1978).

Among abalone species found in Thailand, a preliminary study of *Haliotis varia* Linnaeus around Bon Island, Phuket Province showed that spawning occurred at several intervals throughout the year during January-February, April-May, June-July and November-December (Bussarawit *et al.*, 1990). The gametogenic cycle was also studied in another species, *Haliotis ovina* Gmelin, at Khangkao Island, Chonburi Province (Jarayabhand *et al.*, 1994), in which the spawning period occurred between June and November. Singhagraiwan & Doi (1992) studied the spawning pattern of *Haliotis asinina* Linnaeus in captivity. Based on observations of the monthly spawning frequency, the major spawning period of wild broodstock, *H. asinina* occurred in October, while the pond-reared broodstock could spawn from September to November and January. However, they did not study the gametogenic processes or reproductive cycle. Therefore one of the aims of the present study was to investigate the gametogenic processes and their possible cyclical pattern during different months of the year in *H. asinina* from their natural habitat at Samed Island, Rayong Province and from a land-based culture system. In addition, the development of the gonad was also studied. The knowledge gained from the present study could be applied in the induction

of spawning and seed production for the possible improvement of the aquaculture system of this abalone species.

MATERIALS AND METHODS

Collection of abalone

Adult *H. asinina* were collected by SCUBA diving from the coral reefs at Tien Bay, Samed Island, Rayong Province. The abalone from a land-based culture system were provided by the Coastal Aquacultrue Development Center, Prachuap Khiri Khan Province and by the Marine Biological Station, Chulalongkorn University, Chonburi Province. They were reared in raceways or concrete tanks which were well flushed with mechanically circulated water and an air delivery system to maintain a stable and controlled environment. Sea water was pumped directly from nearby bays and filtered before use. The optimum level of salinity was about 22.5-32.5 ppt. They were fed with a diet of macroalgae, *Gracilaria fisheri* (Xia et Abbot) Abbott, Zhang et Xia, and supplemented with artificial food for abalone.

The abalone were collected monthly for a period of one year (January - December 1997). Shell length, total live weight, and sex of these abalone were recorded individually. In order to determine the reproductive stages of the gonad, two techniques were used : determination of gonad index and histological study.

Determination of gonad index

The gonad index was based on the following equation (Poore, 1973).

$$GI = (GA \times 100) / TA$$

where GI was gonad index; GA was gonad area measured by a planimeter; and TA was the total area of the section (also measured by planimeter).

Histological study

Abalone were anesthetized in 5% magnesium chloride for one hour before the gonads were cut and fixed in Bouin's fluid overnight. They were washed in 70% ethanol and dehydrated in a graded series of ethanol. Then they were cleared with dioxane, infiltrated and embedded in paraffin. Specimens were sectioned at 5 μm in thickness, and stained with hematoxylin-eosin and Periodic Acid Schiff (PAS) and hematoxylin. They were observed under an Olympus Vanox light microscope.

Developmental study

Juvenile abalone aged 1-13 months were obtained from the land-based culture system. At least ten abalone (five males and five females) from each age group were used. They were anasthesized and the tissues of hepatopancreas and gonads were separated and processed for light microscopy as previously described.

RESULTS

Size range of male and female

A total of 173 *H. asinina* were collected from their natural habitat. There were 100 males and 73 females (Table 1). Among males, the size range in shell length was 58.1 ± 18.6 - 85.0 ± 7.6 mm, and that in total weight was 78.1 ± 35.4 - 147.5 ± 33.0 g (Table 1). Among females, the size range in shell length was 60.4 ± 17.1 - 82.6 ± 6.1 mm, and that in total weight was 64.4 ± 32.4-134.9 ± 25.3g (Table 1).

From the land-based culture system, a total of 189 *H. asinina* were collected. There were 116 males and 73 females (Table 2). Among males, the size range in shell length was 49.3 ± 4.4 - 61.4 ± 8.3 mm (Table 2), and that in total weight was 53.4 ± 1.0 - 61.6 ± 2.9g (Table 2). Among females, the size range in shell length was 51.2 ± 8.6 - 61.3 ± 12.0 mm, and that in total weight was 53.2 ± 1.0 - 61.4 ± 3.6 g (Table 2).

Gonad index

Monthly means (± S.D.) of the gonad index of *H. asinina* collected from their natural habitat are shown in Figure 1. In males, the lowest gonad indices were in May (28.5 ± 10.3) and October (26.5 ± 2.9). In females, the lowest gonad index was in October (15.2 ± 6.8). However, in May and September, the animals also showed a relatively poor gonad condition (30.4 ± 10.0 in May, 28.3 ± 8.8 in September).

Monthly means (± S.D.) of the gonad index of *H. asinina* from the land-based culture system are shown in Figure 2. In males, the lowest gonad index was in September (22.1 ± 4.0). In the females, the lowest gonad index was in October (18.5 ± 3.1).

Histology of gonad and reproductive stages

Our findings confirmed the description of cells in oogenesis and spermatogenesis by Apisawetakan *et* al. (1997). The cells in the oogenetic process can be classified into six stages : oogonium (Og), and five stages of oocytes, *i.e.*, with light basophilia (Oc_1), with intense basophilia and oil droplets (Oc_2), with primay yolk granules (Oc_3), with secondary yolk

granules and thin jelly coat (Oc_4), and mature ovum with fully formed jelly coat (Oc_5). The cells in the spermatogenetic process can be classified into 13 stages : spermatogonium (Sg), five stages of primary spermatocytes (PrSc), secondary spermatocyte (Ssc), four stages of spermatids (St) and two stages of spermatozoa (Sz).

The reproductive stages of *H. asmina* collected from their natural habitat and the land-based culture system were assessed by observing changes in gonad histology, especially the characteristics of cellular association. The stages of gonad maturation during one reproductive cycle can be classified into five distinct phases: proliferative, premature, mature, spawning and spent.

1. *Proliferative phase.* In this phase, the gamete cells begin to reappear to commence a new reproductive cycle. At the initiation of this phase, the gonads contain mainly early-stage cells, and all of them are attached to the trabeculae (connective tissue in the gonads). The ovary contains primarily Og, which usually form clusters near the capsule (Fig.3A). Oc_1 and Oc_2 are rapidly increased in number (Fig.3C). In the testis, there are mostly newly produced Sg and PrSc, but no Sz (Figs.3B,3D). The clusters of these early-stage cells are located around the short and dilated trabeculae. The hepatopancreas is large and occupies most of the cross sectional profile of the conical organ when compared to the total gonad area.

2. *Premature phase.* In this phase, gametogenesis proceeds with a rapid increase in numbers and sizes of various gamete cells. The gonads become enlarged in volume, and the trabeculae become thinner. The ovary contains Og, Oc_1, Oc_2 and predominantly Oc_3 (Figs.4A,4C). At the beginning, there are abundant teardrop shaped Oc_3,which are still attached to the trabeculae, and Oc_4 and Oc_5 cells occur later (Fig.4C). The testis contains mainly Sg, PrSc and a few of St and Sz, all of which aggregate around the trabeculae (Figs.4B,4D).

3. *Mature phase.* This phase is a period of rapid growth of gonads which are reflected by striking differences in color between the two sexes (yellow in male and dark green in female). The rates of cell proliferation start to diminish, and the gonads contain primarily late-stage germ cells, while the few of early-stage cells are still present and are restricted to area immediately around the trabeculae, which become thinner. In the ovary, there are abundant Oc_5, but there are only few remaining and widely scattered Oc_1 (Figs.5A,5C). All of the Oc_5 appear fully mature and are liberated into the lumen of the oogenetic compartment. In the testis, there are mostly late-stage male germ cells, *viz.*, St and Sz (Figs.5B,5D). The most noticeable characteristic of the testis in this phase is the vast number of Sz_2 that lie in rows that surround the earlier cell stages which are still

closely attached to the trabeculae. As a result the testis appears to have a maximum density of late-stage cells. Prior to spawning, all of Sz_2 are dispersed into the gonad lumen and intermingled with other late-stage cells. The thin band of Sg and PrSc surrounding the trabeculae is still evident.

4. *Spawning phase.* This spawning phase is the period when abalone are ready for breeding, during which the completely mature and viable eggs or sperm are released from the gonads. The gonads are significantly decreased in size during spawning, and the gonadal wall becomes wrinkle when compared with the former phase (Figs.6A,6B). Only mature sperm or eggs are discharged and the earlier stages of gamete cells are still attached to the dilated trabeculae (Figs, 6C,6D). The spawning phase occurs at least twice during the one year period of observation; partial spawning could be observed during the year in most males. The recovery of gametogenesis is initiated immediately after spawning.

5. *Spent phase.* This phase is the period after spawning when fully mature gamete cells are completely discharged (Figs.7A,7B). This phase is also indicative of complete spawning, during which the gonads exhibit the breaking down of connective tissue stroma, and gametogenic activity momentarily ceases (Figs.7C,7D). The gonads are greatly decreased in size and become creamy in color in both sexes. The quiescent gonads show small cross sectional profiles in contrast to that of the hepatopancreas.

Reproductive cycle

The reproductive cycles of adult *H. asinina* from the natural habitat and land-based culture system are shown in Figures 8 and 9, respectively. *H. asinina* in both populations spawn twice during the year. In the natural habitat, the first spawning occurs from April to May in both males and females. In a land-based culture, the first spawning occurs from February to April in males and from March to April in females. Hence, spawning occurs later in *H. asinina* from the natural habitat. The second spawning begins in August in both males and females *H. asinina* from both the natural habitat and in the culture. But, *H. asinina* reared in the culture appears to spawn longer (August to November in males and August to October in females) than those from the natural habitat (August to October in males and August to September in females).

Each gonadal cycle of *H. asinina* both from the natural habitat and the land-based culture requires 5-8 months (Table 3). In *H. asinina* from the natural habitat, the gonadal cycles start from June to October and November to June in males, and from June to November and December to

June in females (Table 3). In *H. asinina* from the land-based culture, the gonadal cycles start from April to November and October to April in males, and from April to November and November to April in females (Table 3).

Development of the gonad

It was found that there was no gonad development in *H. asinina* from one month up to the age of four months (Fig.10A). In the three- to four-month-old abalone, the gonad capsule was observed around the hepatopancreas (Fig.10B). The gonads first appeared around the hepatopancreas when the abalone reached the age of five months (Figs.10C, 10D) and became fully mature in the nine-month-old abalone (Figs.10E,10F).

DISCUSSION

There have been a number of studies on the course of reproductive cycle in various abalone species by many investigators. The two methods that are frequently used for determining an entire reproductive cycle of a population are : 1) measurement of the relative size of the gonads or gonad indices (GI), and 2) assessment of histological changes in the gonads (Hahn, 1989; Webber & Giese, 1969; Giese, 1959; Grant & Tyler, 1983; Ault, 1985). The gonad index (GI) is simple and a well-defined method for characterizing the reproductive cycle in many marine invertebrates (Giese, 1959). GI involves the comparison between gonad size and body size, and spawning is assumed to occur when GI drops rapidly. However, GI is not always a valid index for reproductive organ development in all species of abalone because gonad size is not actually proportional to animal size, especially in very large or small animals (Shepherd & Laws, 1974). In addition, GI only relates gonad area to a constant parameter (e.g. shell length) of the animal (Young & DeMartini, 1970; Hahn, 1981).

A more precise index that can define the reproductive cycle better is the use of histological examination of gonadal sections, which can give considerable details of cellular association and the time interval between successive spawning (Webber & Giese, 1969). Tomita (1967, 1968), Giorgi & DeMartini (1977) and Ault (1985) classified the reproductive stages in various temperate species of *Haliotis* into 5 - 6 distinct phases that are most clearly defined in females (activation, gametogenesis, proliferation of gametes, ripeness, spawning and resting). Generally, the names of these phases differ depending on the researchers, but they usually refer to the same phenomena (Hahn, 1989). In the present study, histological examination of monthly samplings of *H. asinina* both from the

natural habitat and from a land-based culture system revealed five distinctive reproductive stages during the year, *viz.*, proliferative, premature, mature, spawning and spent phases.

The proliferative phase is characterized by the regeneration of gametes for a new cycle. The gonads contain mostly early-stage germ cells in both sexes. Giorgi & DeMartini (1977) and Ault (1985) in studying *H. rufescens*, found that the ovary contained primarily small oocytes usually less than 50 μm in diameter, while Tomita (1967), in studying *H. discus hannai* reported that there were mainly oogonium, and yolkless and oil drop-oocytes in this stage.

Another remarkable feature during this phase is the reciprocal relationship between the sizes of gonads and hepatopancreas (Boolootian *et al.*, 1962; Webber & Giese, 1969). Hepatopancreas is relatively large when compared to the total area of conical organ. Boolootian *et al.* (1962) reported that, in *H. cracherodii* and *H. rufescens*, the size of hepatopancreas exhibited an inverse relation to that of the gonad. During this phase, the hepatopancreas attains a maximum growth while the gonad activity is relatively quiescent. The precipitous drop in the size of hepatopancreas will occur during the rapid growth period of gonads. Boolootian *et al.* (1962) suggested that materials were mobilized from the hepatopancreas for the growth of the gonad.

The premature phase is the period of rapid increases in numbers and sizes of gamete cells. The ovary contains predominantly Og, Oc_1, Oc_2, and Oc_3 which is similar to those reported in the premature stage of *H. discus hannai* (Tomita, 1967; Mugiya *et al.*, 1980); while Sg, Sc and a few of Sz are evident in the testis during this phase. Ault (1985), in studying *H. rufescens*, also indicated that there were numerous developing germ cells in this stage. Hence the major events of development in this phase involve the rapid growth of gonads and notably the initiation of vitellogenesis in the ovary.

The mature phase is characterized by a notable enlargement of the gonads which exhibit striking differences of color between both sexes. The ovary contains mostly late-stage germ cells (*i.e.*, Oc_5) with widely scatterred Oc_1, and the testis is mostly filled with Sz. Before spawning occurs, Oc_5 are detached from trabeculae and released into the ovarian lumen, while spermatogenic cells differentiate rapidly into Sz, which are concentrated around the partially degraded and thinner trabeculae. Finally, the cells of the testis are dispersed and become completely displaced by fully mature Sz.

The spawning phase is the time when sexually mature abalone start to release their mature gametes. The period of spawning is the most important criterion for success of reproduction of various abalone species

reared in close aquaculture systems (Boolootian *et al.*, 1962; Webber & Geise, 1969; Young & DeMartini, 1970; Giorgi & DeMartini, 1977; Tomita, 1967, 1968; Mugiya *et al.*, 1980; Poore, 1973; Newman, 1967; Harrison & Grant, 1971; Shepherd & Laws, 1974). From many previous studies, spawning periods have been found to vary considerably among various species of abalone, and from year to year according to geographical locations, and such local conditions as food supply, temperature and day length (Cox, 1962; Webber & Giese, 1969; Mugiya *et al.*, 1980; Uki & Kikuchi, 1984; Kinne, 1970; Shepherd, 1973). Thus, some investigators (Boolootian *et al.*, 1962; Shepherd & Laws, 1974) have classified various *Haliotis* spp. into three groups according to their spawning season : those which spawn during summer, those which spawn during seasons other than summer, and those that exhibit year-round spawning.

In Thailand, Jarayabhand *et al.* (1994) reported that there were two peaks of spawning in *H. ovina* (June and November). Singhagraiwan & Doi (1992) reported the spawning period of wild broodstock of *H. asinina* to be around October, while the pond-reared broodstock could spawn from September to November and January. In contrast, the spawning period of *H. asinina* from the natural habitat and from the land-based culture system in the present study occurs twice a year. While this is the general pattern of spawning for most members of the population during the spawning periods, individuals with different stages of the gonadal cycle can be observed most frequently in males. Some are in mature phase, some are ready to spawn, and some are already spent. This is the extended breeding season which occurs in many marine invertebrates (Giese, 1959).

The spent phase is characterized by the lack of gamete cells and the breakdown of trabeculae or connective tissue in the gonads, which is similar to that previously found in *H. rufescens* (Giorgi & DeMartini, 1979). According to Shepherd & Laws (1974), the spent phase is expressed when there is a complete discharge of gamete cells. Giese (1959) defined the spent phase in marine invertebrates as a post-spawning quiescent stage that is indistinguishable between male and female. In the present study, during the spent period the gonads of *H. asinina* are greatly reduced in size and become creamy in color and the sexes of animals cannot be distinguished from each other.

From the data collected from a one year period, it could be concluded that spawning of *H. asinina* both from the natural habitat and those reared in the closed culture system can occur at least twice yearly provided that environmental condition and food supply are optimal. Each gonadal cycle consisting of five phases of development needs 5-8 months.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study received financial support from the Thailand Research Fund #BRG 408004 and PG 2/015/2539.

Table 1 Sample size and gonad index of male and female *H. asinina* collected monthly from a natural habitat (January - December, 1997).

Month sampled	Sample size		Size (mean ± S.D.)			
			Male		Female	
	Male	Female	Shell length (mm)	Total weight (g)	Shell length (mm)	Total weight (g)
Jan.	5	5	72.2 ± 13.1	99.3± 46.6	78.7 ± 14.5	124.1 ± 49.6
Feb.	6	4	61.3 ± 29.3	106.0 ± 65.5	77.8 ± 12.6	119.3 ± 37.2
Mar.	7	5	65.4 ± 15.4	88.4 ± 29.4	82.6 ± 6.1	134.9 ± 25.3
Apr.	12	9	58.1 ± 18.6	78.1 ± 35.4	79.1 ± 13.7	125.8 ± 39.6
May	11	9	67.5 ± 17.0	94.5 ± 44.2	72.2 ± 12.1	101.4 ± 39.2
June	12	6	70.9 ± 17.8	105.3 ± 51.4	60.4 ± 17.1	79.5 ± 43.8
July	14	7	62.5 ± 17.3	83.5 ± 26.9	61.2 ± 18.7	83.7 ± 39.2
Aug.	9	8	85.0 ± 7.6	147.5 ± 33.0	61.2 ± 13.5	73.1 ± 41.6
Sept.	8	5	66.7 ± 18.6	91.3 ± 50.0	55.3 ± 15.7	64.4 ± 32.4
Oct.	5	5	65.5 ± 24.0	93.2 ± 68.3	68.3 ± 25.0	96.7 ± 66.7
Nov.	6	5	63.1 ± 16.1	81.0 ± 33.1	65.5 ± 19.8	89.0 ± 54.4
Dec.	5	5	60.4 ± 25.4	91.3 ± 63.9	67.8 ± 11.0	71.6 ± 47.6

Table 2 Sample size and gonad index of male and female *H. asinina* collected monthly from a land-based culture system (January - December, 1997).

Month sampled	Sample size		Size (mean ± S.D.)			
			Male		Female	
	Male	Female	Shell length (mm)	Total weight (g)	Shell length (mm)	Total weight (g)
Jan.	10	6	57.8 ± 9.1	60.3± 3.1	51.2 ± 8.6	57.8 ± 2.0
Feb.	9	6	55.5 ± 5.7	59.5 ± 1.9	59.1 ± 5.3	60.8 ± 3.0
Mar.	10	5	49.3 ± 4.4	61.6 ± 2.9	47.6 ± 7.8	56.5 ± 2.8
Apr.	9	7	61.4 ± 8.3	53.4 ± 1.0	39.5 ± 5.0	53.2 ± 1.0
May	8	8	41.9 ± 4.2	54.2 ± 1.8	44.4 ± 8.7	55.3 ± 2.5
June	9	7	52.6 ± 9.3	58.3 ± 3.9	59.8 ± 7.6	61.0 ± 3.3
July	11	5	55.8 ± 6.5	59.6 ± 2.4	57.5 ± 2.8	60.2 ± 3.3
Aug.	10	6	53.0 ± 3.1	58.7 ± 1.1	54.6 ± 6.9	59.3 ± 1.8
Sept.	11	6	58.6 ± 6.4	60.6 ± 2.2	53.5 ± 11.0	58.8 ± 3.3
Oct.	8	6	56.0 ± 4.2	59.7 ± 1.5	61.3 ± 12.0	61.4 ± 3.6
Nov.	10	5	60.8 ± 8.4	61.3 ± 2.8	51.3 ± 9.0	57.9 ± 2.6
Dec.	11	6	58.6 ± 5.4	60.6 ± 1.9	53.2 ± 4.6	58.6 ± 3.7

LITERATURE CITED

APISAWETAKAN, S., THONGKUKIATKUL, A., WANICHANON, C., LINTHONG, V., KRUATRACHUE, M., UPATHAM, E.S., PUMTHONG, T. & SOBHON, P. 1997. The gametogenic processes in a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linnaeus. *Journal of the Science Society of Thailand*, 23: 225-240.

AULT, J. 1985. Some quantitative aspects of reproduction and growth of red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson. *Journal of the World Mariculture Society*, 16: 398-425.

BOOLOOTIAN, R.A., FARMANFARMAIAN, A. & GIESE, A.C. 1962. On the reproductive cycle and breeding habits of two western species of *Haliotis*. *Biological Bulletin* (Woods Hole), 122: 183-193.

BUSSARAWIT,S., KAWINTERTWATHANA,P & NATEEWATHANA, A. 1990. Preliminary study on reproductive biology of the abalone (*Haliotis varia*) at Phuket, Andaman Sea Coast of Thailand. *Kasetsart Journal (Natural Science)*, 24: 529-539.

COX, K.W. 1962. Review of the abalone of California. *California Fish and Game*, 46: 381-406.

GIESE, A.C. 1959. Comparative physiology : annual reproductive cycle of marine invertebrates. *Annual Review of Physiology*, 21: 547-576.

GIORGI, A.E. & DEMARTINI, J.D. 1977. A study of the reproductive biology of the red abalone, *Haliotis rufescens* Swainson, near Mendocino, California. *California Fish and Game*, 63: 80-94.

GRANT, A. & TYLER, P.A. 1983. The analysis of data in studies of invertebrate reproduction. I. Introduction and statistical analysis of gonad indices and maturity indices. *International Journal of Invertebrate Reproduction*, 6: 259-269.

HAHN, K.O. 1981. The reproductive cycle and gonadal histology of the pinto abalone, *Haliotis kamtschatkana* Jonas, and the flat abalone, *Haliotis walallensis* Stearns. *Advances in Invertebrate Reproduction*, 2: 387.

HAHN, K.O. 1989. Gonad reproductive cycle. In *Handbook of Culture of Abalone and Other Marine Gastropods*. (Edited by Hahn, K.O.), pp. 13-39. CRC Press, Boca Raton.

HAHN, K.O. 1992. Review of endocrine regulation of reproduction in abalone *Haliotis* spp. In *Abalone of the World : Biology, Fisheries and Culture*. (Edited by Shepherd, S.A., Tegner, M.J. and Guzman del Proo, S.A.), pp. 49-58. Blackwell Scientific, Oxford.

HARRISON, A.J. & GRANT, J.F. 1971. Progress in abalone research. *Tasmanian Fisheries Research*, 5: 1-10.

HOOKER, S.H. & CREESE, R.G. 1995. Reproduction of paua, *Haliotis iris* Gmelin 1791 (Mollusca : Gastropoda), in north-eastern New Zealand. *Marine and Freshwater Research* 46, 617-622.

JARAYABHAND, P., JEW, N., MANASVETA, P. & CHOONHABANDIT, S. 1994. Gametogenic cycle of abalone *Haliotis ovina* Gmelin 1791 at Khangkao Island, Chon-buri Province. *Thai Journal of Aquatic Science*, 1: 34-42.

KINNE, O. 1970. Temperature. In *Marine Ecology : A Comprehensive Integrated Treatise on Life in Oceans and Coastal Waters*. Vol.1. (Edited by Kinne, O.), pp. 407-514. Wiley -Interscience, London.

MUGIYA, Y., KOBAYASHI, J., NISHIKAWA, N. & MOTOYA, S. 1980. Gonadal maturation in the abalone, *Haliotis discus hannai* at Taisei, Hokkaido. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*, 31: 306-313.

NEWMAN, G.G. 1967. Reproduction of the South African abalone *Haliotis midae*. Investigational Report No. 64 Division of Sea Fisheries, Republic of South Africa. 24 pages.

POORE, G.C.B. 1973. Ecology of New Zealand abalones, *Haliotis* species (Mollusca: Gastropoda). *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 6: 534-559.

SAINSBURY, K.J. 1982. Population dynamics and fisheries management of the paua *Haliotis iris*. 1. Population structure, growth, reproduction, and mortality. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 16, 147-161.

SHEPHERD, S.A. 1973. Studies on southern Australian abalone (Genus *Haliotis*) I. The ecology of five sympatric species. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*,24: 217-257.

SHEPHERD, S.A. & LAWS, H.M. 1974. Studies on southern Australian abalone (Genus *Haliotis*) II. Reproduction of five species. *Australian Journal of Marine and Freshwater Research*, 35: 49-62.

SINGHAGRAIWAN, T. & DOI, M. 1992. Spawning pattern and fecundity of the donkey's ear abalone, *Haliotis asinina* Linne, observed in captivity. *Thai Marine Fisheries Research Bulletin*, 3: 61-69.

TAKASHIMA, F., OKUNO, M, NISHIMURA, K. & NOMURA, M. 1978. Gametogenesis and reproductive cycle in *Haliotis diversicolor diversicolor* Reeve. *Journal of the Tokyo University of Fisheries*, 1: 1-8.

TOMITA, K. 1967. The maturation of the ovaries of the abaone, *Haliotis discus hannai* Ino, in Rebun Island, Hokkaido, Japan. *Scientific Report of Hokkaido Fisheries Experimental Station*, 7: 1-7.

TOMITA, K. 1968. The testis maturation of the abalone, *Haliotis discus hannai* Ino, in Rebun Island, Hokkaido Japan. *Scientific Report of Hokkaido Fisheries Experimental Station*, 9: 56-61.

UKI, N. & KIKUCHI, S. 1984. Regulation of maturation and spawning of an abalone, *Haliotis* (Gastropoda) by external environmental factors. *Aquaculture*, 39: 247-261.

WEBBER, H.H. & GIESE, A.C. 1969. Reproductive cycle and gametogenesis in the black abalone *Haliotis cracherodii* (Gastropoda : Prosobranchiata). *Marine Biology* (Berlin), 4: 152-159.

WILSON, N.H.F. & SCHIEL, D.R. 1995. Reproduction in two species of abalone (*Haliotis iris* and *H. australis*) in southern New Zealand. *Marine and Freshwater Research* 46, 629-637.

YAHATA, T. & TAKANO, K. 1970. On the maturation of the gonad of the abalone, *Haliotis discus hannai*: I A comparison of the gondal maturation of the abalones from Matsumae and Rebun in Hokkaido. *Bulletin of the Faculty of Fisheries, Hokkaido University*, 21: 193.

YOUNG, J.S. & DEMARTINI, J.D. 1970. The reproductive cycle, gonadal histology and gametogenesis of the red abalone, *Haliotis rufescens* (Swainson). *California Fish and Game*, 56: 298-309.

Maleeya KRUATRACHUE[1], Somjai APISAWETAKAN[2], E.Suchart UPATHAM[1], Prasert SOBHON[2], Saowapa SAWATPEERA[3], Vicharn INGSRISAWANG[4] and Tanin SINGHAGRAIWAN

[1]*Department of Biology and* [2]*Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand*
[3]*Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20130, Thailand*
[4]*Eastern Marine Fisheries Development Center, Rayong 21160, Thailand*

EXPLANATION OF FIGURES

FIG 1 Seasonal changes in the mean gonad indices of male and female *H. asinina* from a natural habitat.

FIG 2 Seasonal changes in the gonad indices of male and female *H. asinina* from a land-based culture system.

FIG 3 Photomicrographs of paraffin sections of the proliferative phase showing regeneration of gamete cells after the spawning and spent phases. The ovary (A, C) contains mainly stage I and II oocytes ($Oc_{I,II}$), which are rapidly increased in number. The testis (B, D) contains mostly spermatogonia and primary spermatocytes (PrSc). Trabeculae (tr), which are depleted of cells and breaking down in spent phase, start to regenerate and appear short and dilated. ca, capillary; cp, gonad capsule; HP, hepatopancreas; Sc, spermatocyte.

FIG 4 Paraffin sections of premature phase showing rapid increases in the number and size of various cells. The ovary (A, C) contains mostly early-stage oocytes (Oc_{I-II}), and late-stage oocytes (Oc_{I-V}) start to appear and gradually increase in number. The testis (B, D) contains various stages of primary spermatocytes (Sc) and spermatids (St) together with a few spermatozoa (Sz), all of which are located close to the trabeculae (tr). je, jelly coat; HP, hepatopancreas.

FIG 5 Paraffin sections of the mature phase showing rapid growth of gonads. The ovary (A, C) contains primarily fully mature Oc_V with only a few widely scattered early-stage cells (Oc_I and Oc_{II}). The testis (B, D) contains mostly late spermatids (St) and spermatozoa (Sz), which lie in rows. Finally, they become dispersed and displaced into the luminal area of the testis. HP, hepatopancreas; Sc, spermatocyte; tr, trabeculae.

FIG 6 Paraffin sections of the spawning phase showing the period when abalone release viable sperm or eggs from the gonads. The ovary (A, C) contains only earlier stage oocytes (Oc_I) which are still attached to dilated trabeculae (tr). The testis (B, D) contains only early-stage male germ cells with a few spermatozoa (Sz). cp, gonad capsule; HP, hepatopancreas.

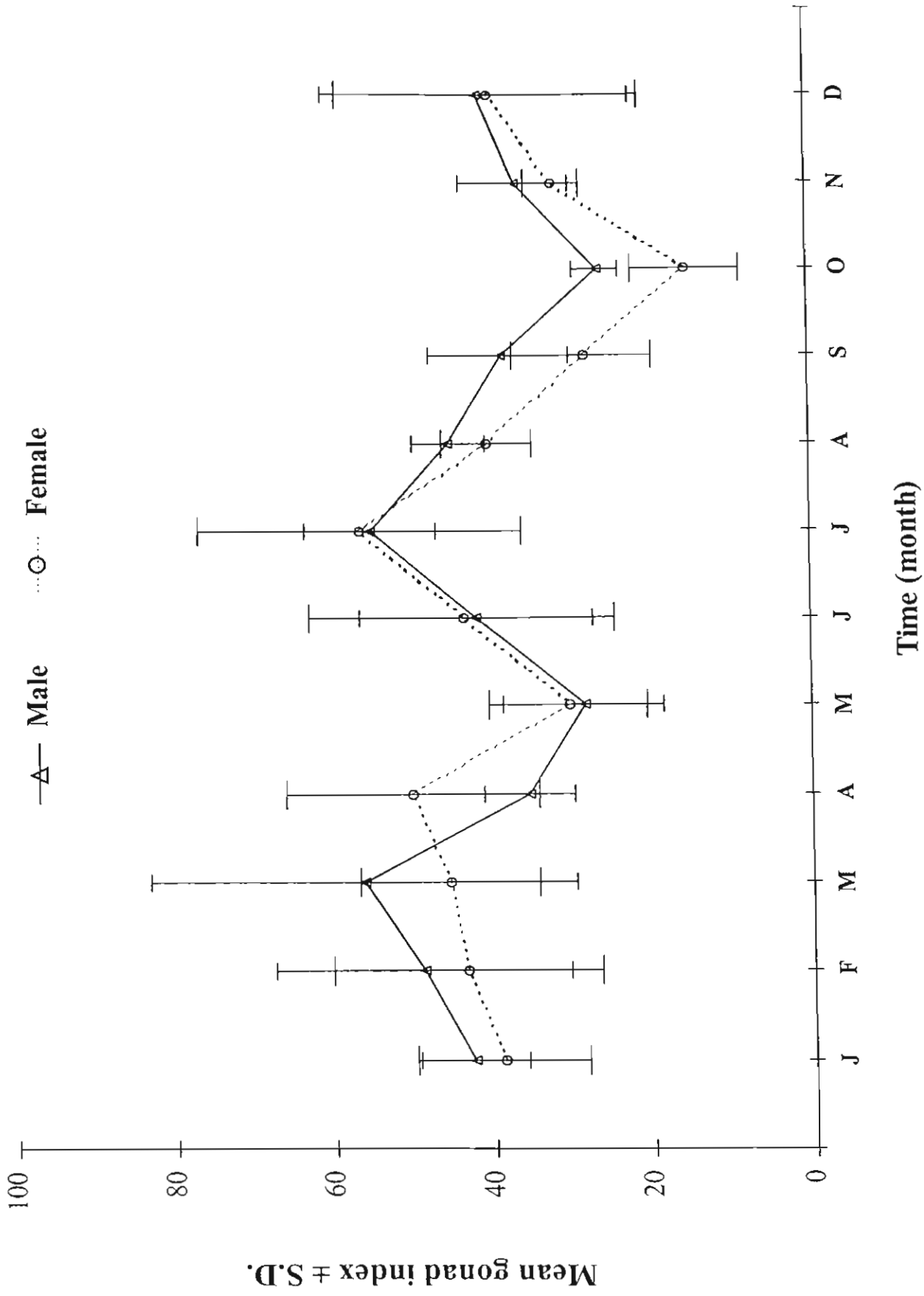
FIG.7 Paraffin sections of the spent phase showing the complete discharge of gamete cells, and the breaking down of trabeculae (tr) and associated connective tissues in both sexes (female in A and C, male in B and D). ca, capillary; cp, gonad capsule; HP, hepatopancreas; Oc_1, oocyte stage 1; Sz, spermatozoa.

FIG.8 The reproductive cycle of adult *H. asinina* from a natural habitat during a one-year period : (1) the proliferative phase occurs around June to July and November to December in males, and around June to July and December to January in females. (2) The premature phase occurs around June to July and December to January in males, and around June to July and February to March in females, (3) The mature phase occurs around August to September and February to March in males, and around July to August and April to May in females, (4) the spawning phase occurs around August to October and April to May in males, and around August to September and April to May in females, (5) the spent phase occurs around September to October and May to June in males, and around October to November and May to June in females.

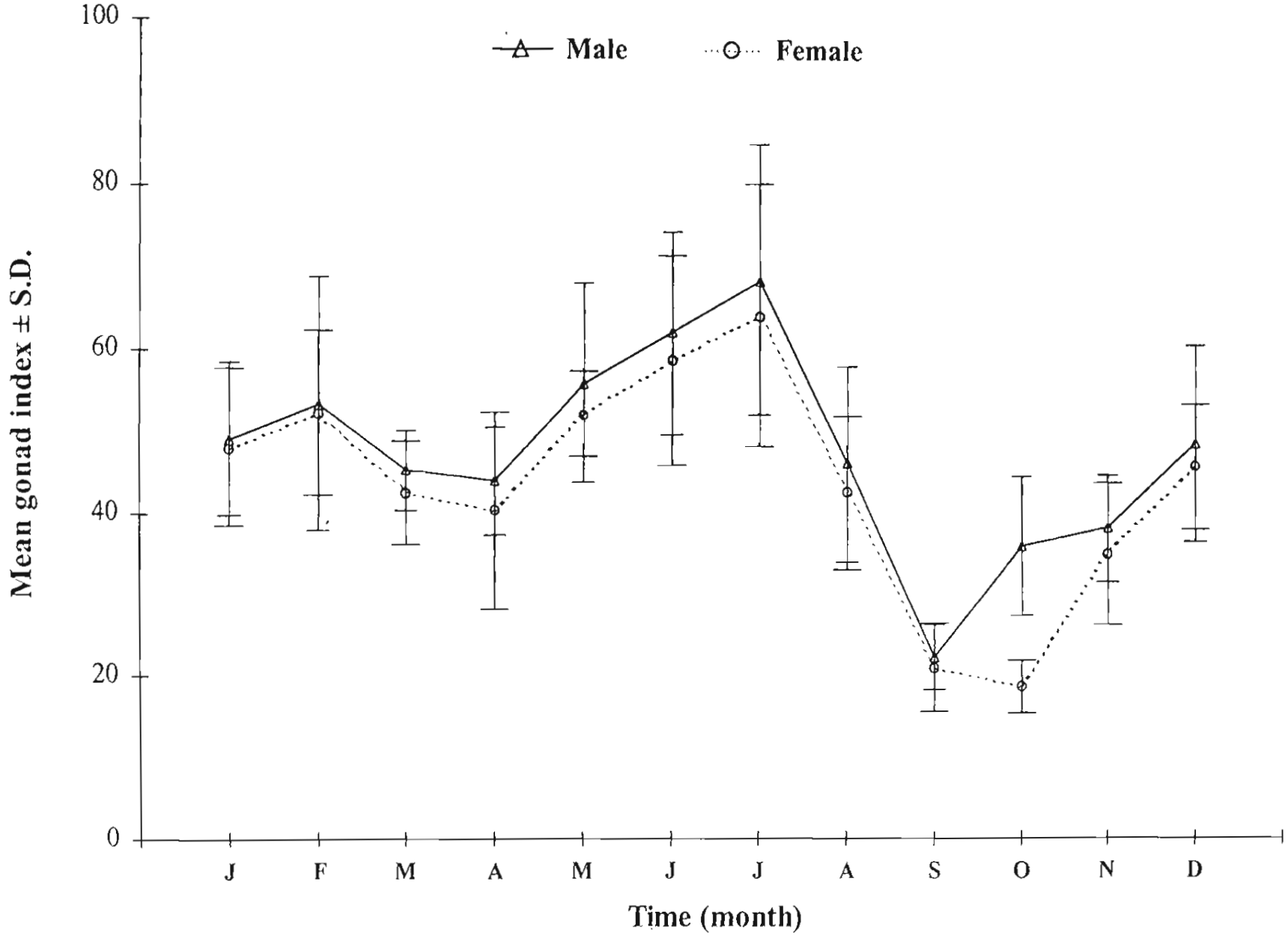
FIG.9 Reproductive cycle of adult *H. asinina* reared in a land-based culture system during a one-year period : (1) the proliferative phase occurs around April to May and October to November in males, and around April to May and November to December in females, (2) the premature phase occurs around April to May and December to January in males, and around May to June and January to February in females, (3) the mature phase occurs around June to August and February to April in both sexes, (4) the spawning phase occurs around August to November and February to April in males, and around August to October and March to April in females, (5) the spent phase occurs around September to November and March to April in both sexes.

FIG.10 A. Hepatopancreas (HP) of one- to four-month-old abalone. Gonad development was not observed. B. Higher magnification of the hepatopancreas (HP) capsule. Notice the formation of gonad capsule (arrow) and trabeculae (tr). C. The ovary of a five-month-old female abalone around hepatopancreas (HP). Early-stage oocytes (Oc) could be observed. D. The testis of a five-month-old male abalone around the hepatopancreas (HP). Various stages of spermatogenesis, spermatocytes (Sc) and spermatozoa (Sz) could be observed. E-F. Ovary (E) and testis (F) of a nine-month-old abalone. The gonads had become fully mature. cp, gonad capsule; HP, hepatopancreas; Oc, oocyte; Sz, spermatozoa.

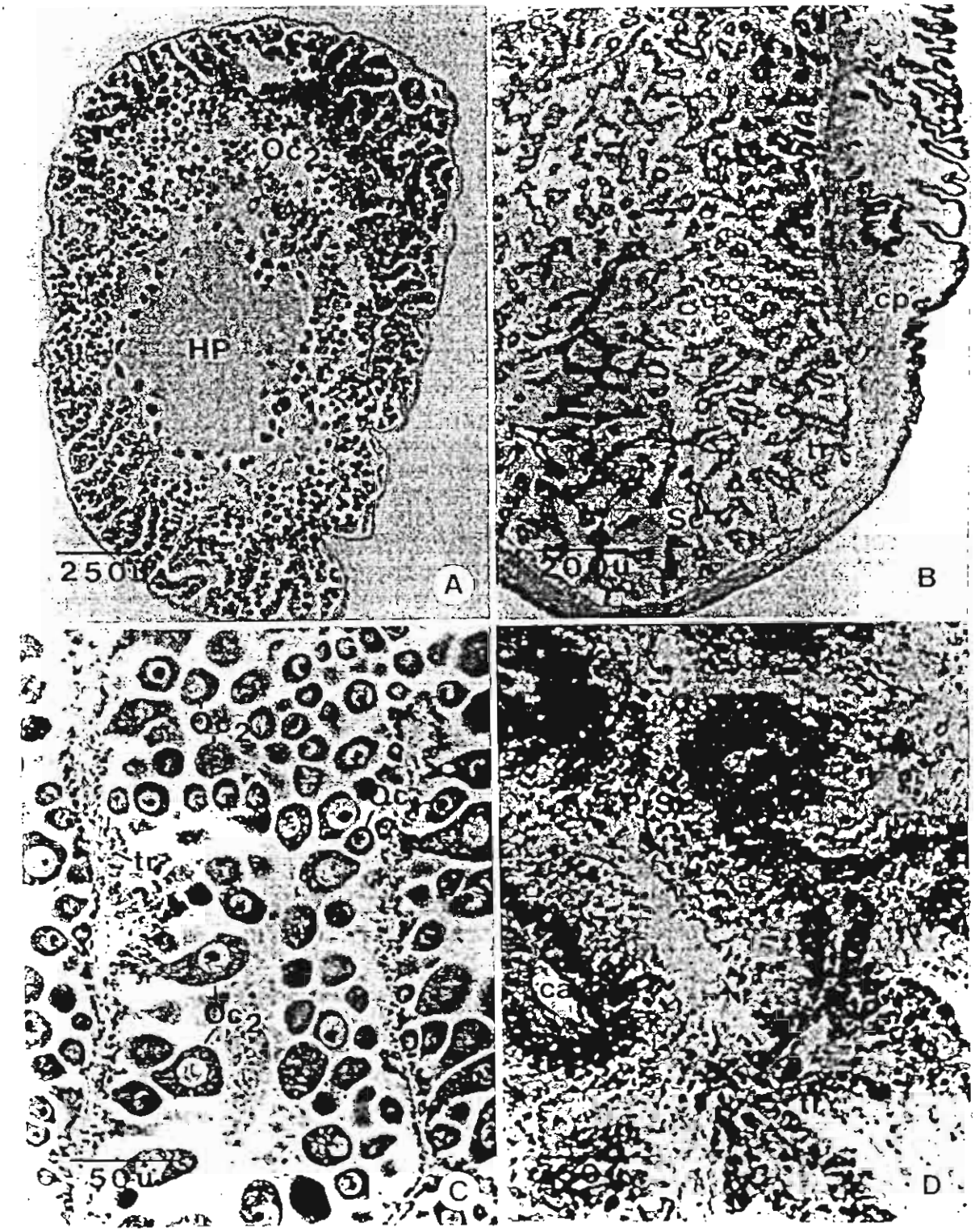
Fig. 1

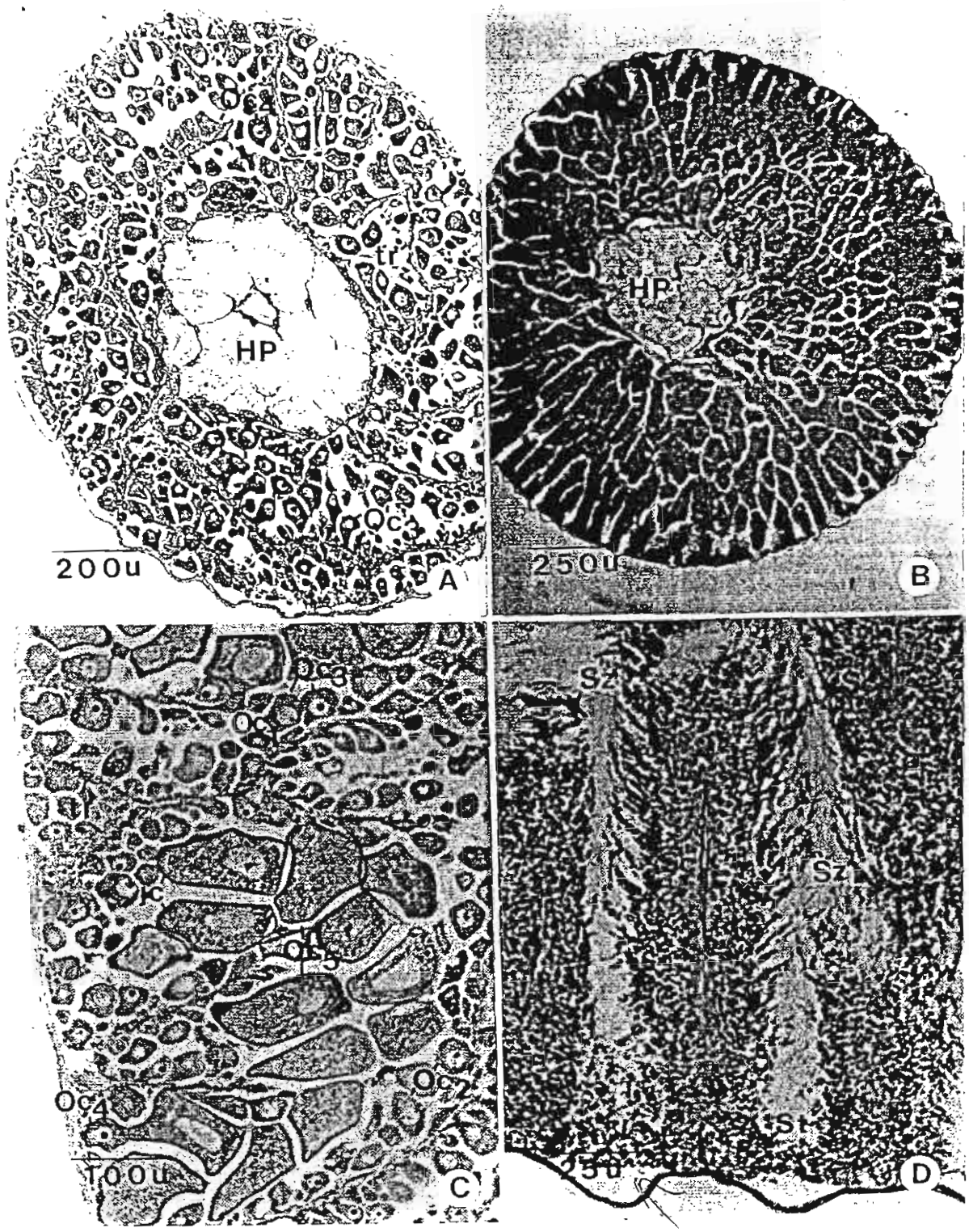


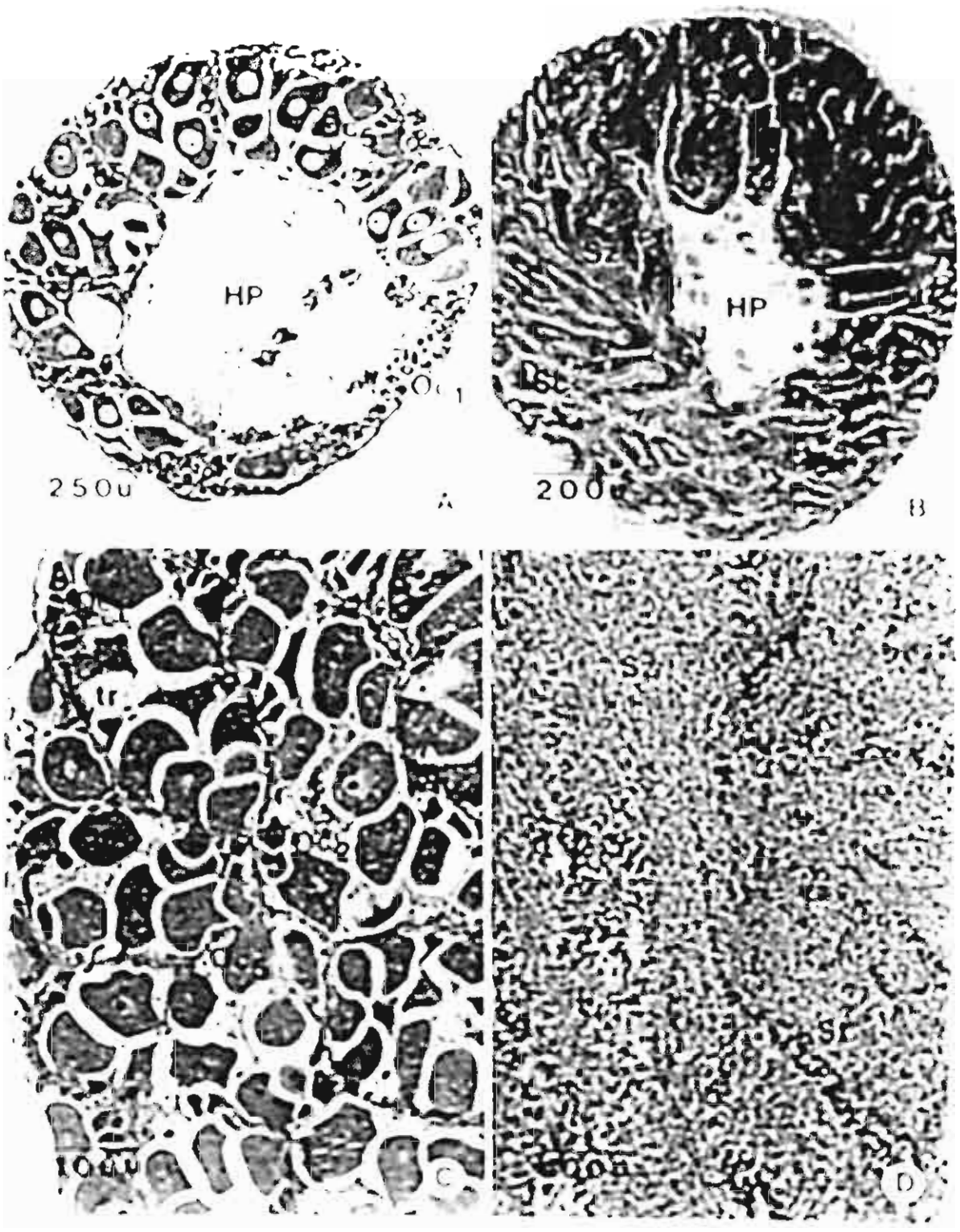
GATEWAY NATURAL TRACING PAPER 90/95 gm² SIZE A3

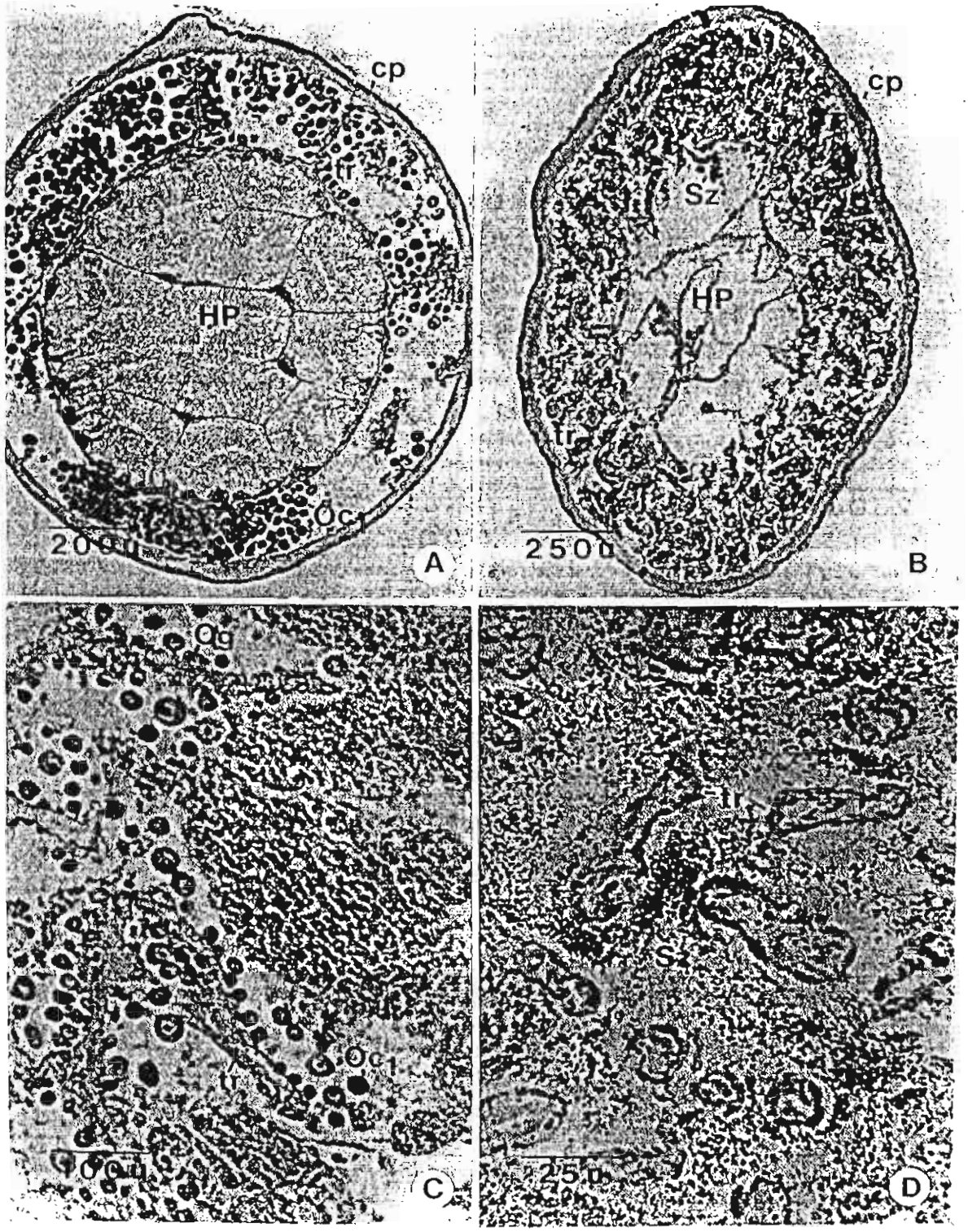


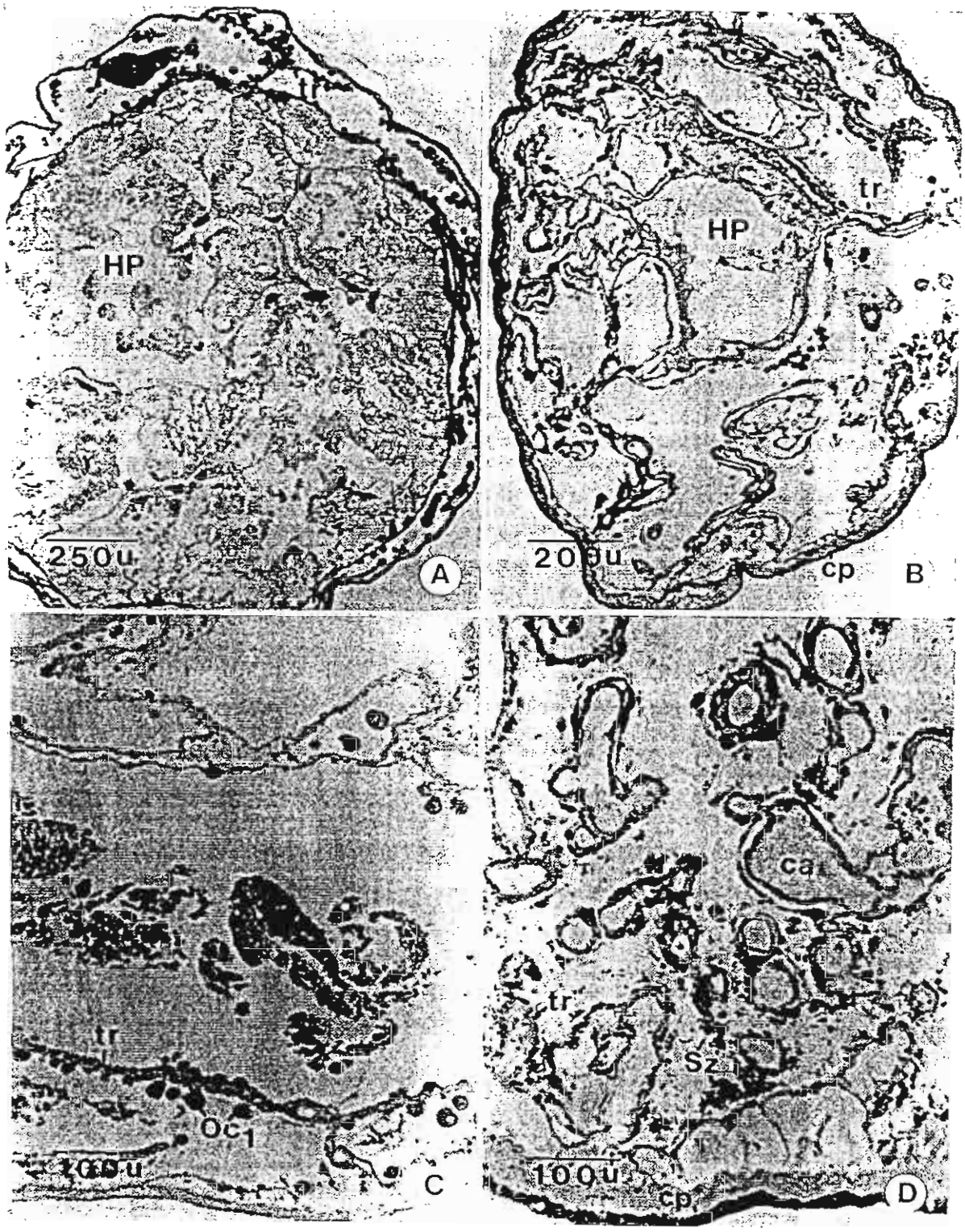
British Made

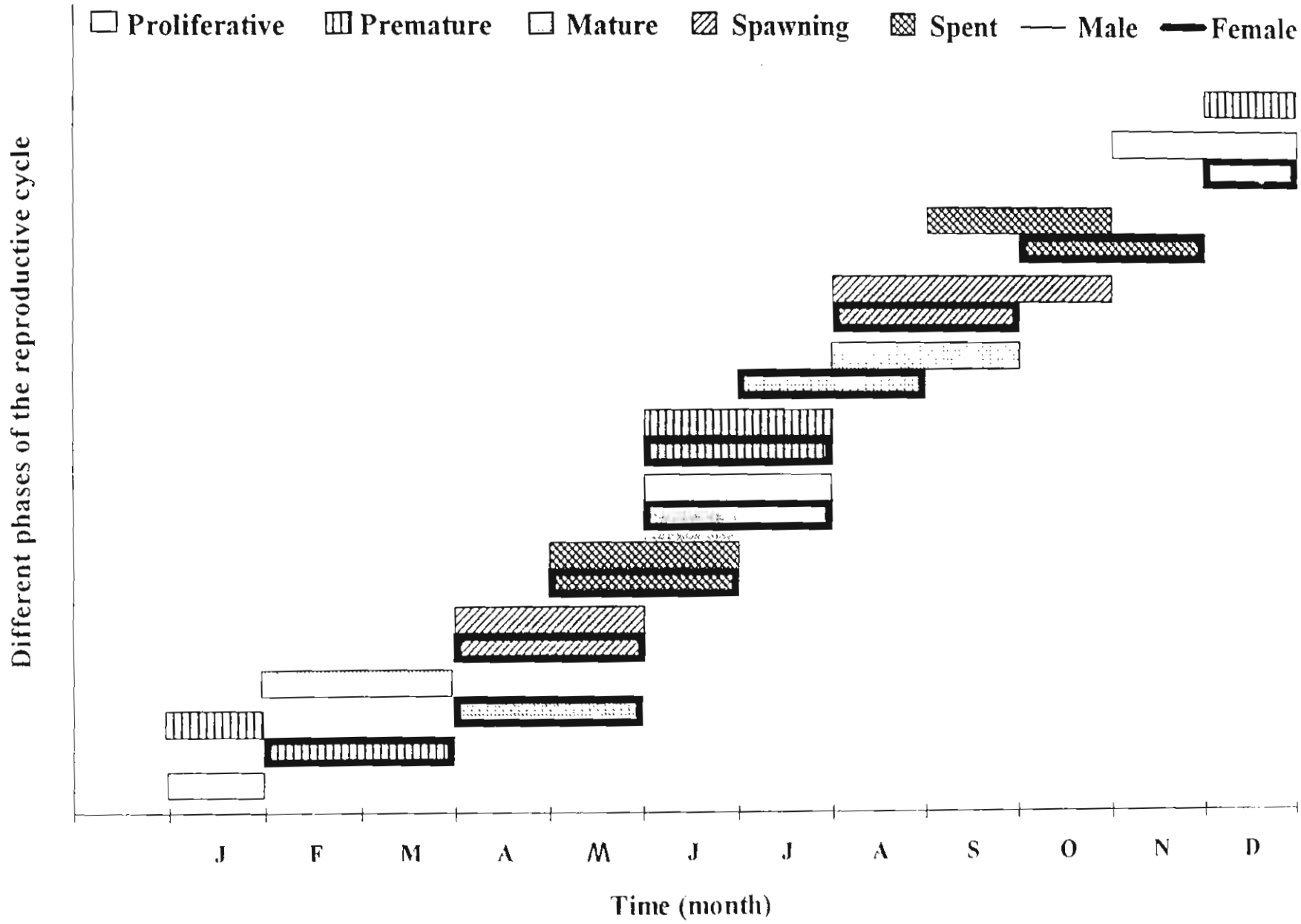

Oc2
HP
250u
A
cp
tr
Sc
500u
B
Oc2
tr
Oc2
50u
C
ca
tl
D

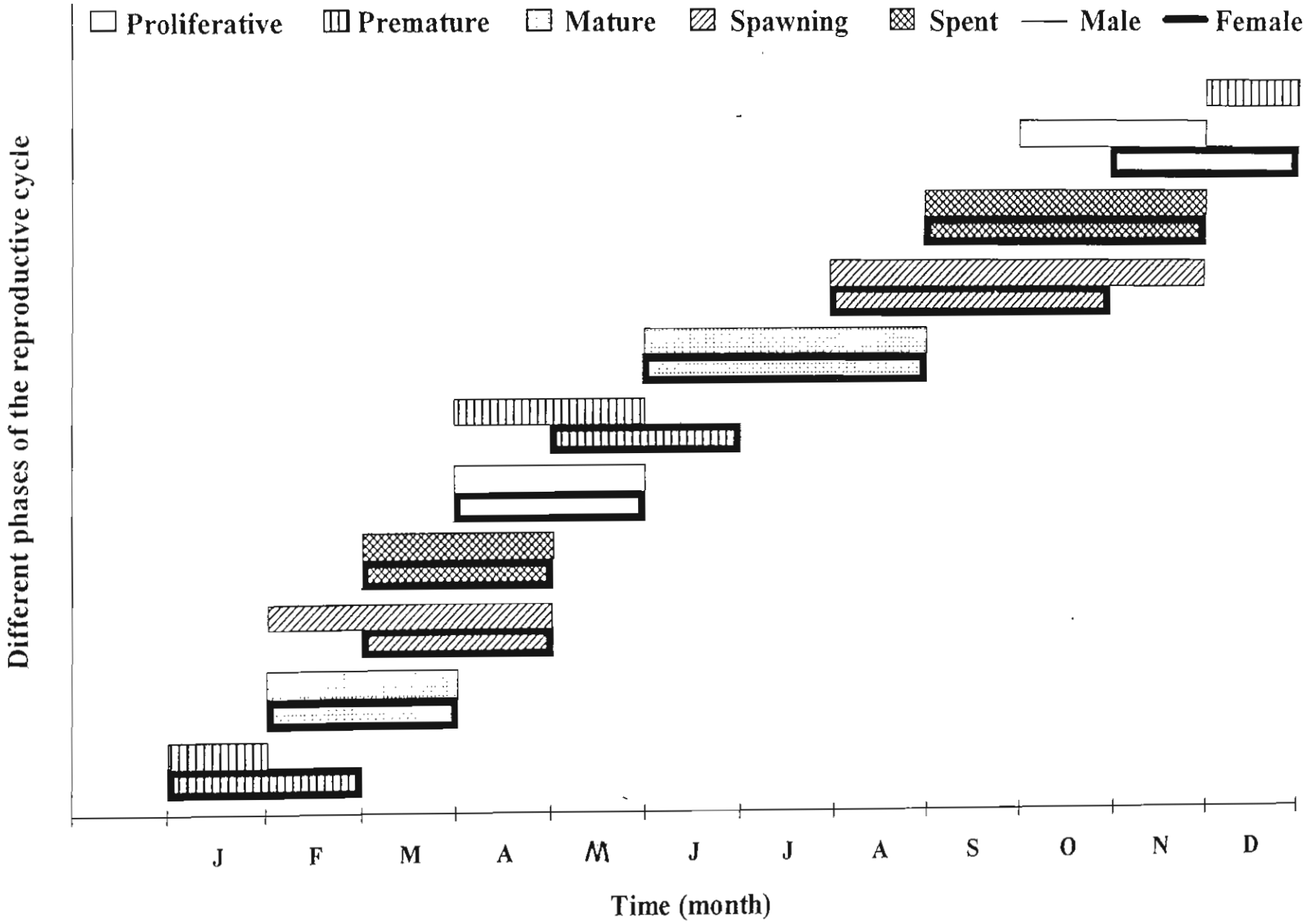

HP
tr
Oc3
200u
A
HP
250u
B
Oc3
Oc
Oc
Oc5
Oc4
Oc2
100u
C
Sz
Sz
St
250u
D


HP
250u
A
HP
200
B
10
C
D


cp
tr
HP
Oc1
200 µ
A
cp
Sz
HP
tr
250 µ
B
Og
Oc1
tr
100 µ
C
tr
Sz
25 µ
D


tr
HP
250u
A
tr
HP
200u
cp
B
tr
Oc1
100u
C
ca
tr
Sz
100u
cp
D


Proliferative
Premature
Mature
Spawning
Spent
Male
Female
Different phases of the reproductive cycle
J
F
M
A
M
J
J
A
S
O
N
D
Time (month)


Proliferative
Premature
Mature
Spawning
Spent
Male
Female
Different phases of the reproductive cycle
J
F
M
A
M
J
J
A
S
O
N
D
Time (month)


cp
HP
100u
A
tr
100u
HP
B
cp
Oc
100u
HP
C
cp
Sz
50u
HP
D
cp
Oc
HP
100u
E
cp
Sz
HP
Sz
100u
F

THE ULTRASTRUCTURE OF NEURONS AND NEUROGLIA IN THE CEREBRAL AND PLEURO-PEDAL GANGLIA OF *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS

MALEEYA KRUATRACHUE[a], AMPORN THONGKUKIATKUL[b], PRASERT SOBHON[c], E.SUCHART UPATHAM[a], CHAITIP WANICHANON[c], PRAPEE SRETARUGSA[c] AND VICHAI LINTHONG[c]

[a]*Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.*

[b]*Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand.*

[c]*Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.*

ABSTRACT

The ultrastructure of neurons and neuroglia in the cerebral and pleuro-pedal ganglia of Haliotis asinina *are described. There are four types of neurons (NR_{1-4}) and three types of neuroglia. (NG_{1-3}). The NR_1, which is the largest nerve cell, has a round nucleus with a thin rim of heterochromatin attached to the nuclear envelope. The cytoplasm contains numerous rough endoplasmic*

reticulum, mitochondria, but only a few small elementary granules. The nuclei of NR_2 , NR_3 and NR_4 have increasingly condensed heterochromatin. The cytoplasm of these cells contain relatively few organelles such as rough endoplasmic reticulum, mitochondria and elementary granules. The NG_1 is spindle-shaped with little perinuclear cytoplasm. The NG_2 and NG_3 are highly ellipsoid in shape. The cytoplasm of NG_1 and NG_3 is very thin and contains ribosomes, a few rough endoplasmic reticulum and mitochondria. The cytoplasm of NG_2 is extremely thin and contains only ribosomes. There are no elementary granules in the neuroglia.

KEY WORDS *Haliotis asinina*, neuron, neuroglia, ultrastructure

INTRODUCTION

Bullock and Horridge[1] classified the neurons in the ganglia of gastropods on the basis of morphology (size and nuclear - cytoplasmic ratio of the cell body and perikaryon). In the pulmonate snails such as *Achatina fulica* Bowdich, *Helix pomatia* Linnaeus, *Arion ater* Linnaeus and *Limax maximus* Linnaeus, the classification of neurons is based on cell size[2-4]. They are giant neurons, ordinary neurons and globuli cells. The giant neurons are characterized by their large size and irregularly-shaped nucleus[4]. The nuclei are often flattened or lobated[5]. The nucleoli are usually large and annular[6]. The surface of the giant neuron is often deeply indented by processes of glial cells[7-8]. The ordinary neurons are divided into large, medium and small cells[1-4]. They are similar to the giant neurons in having large clear nuclei with one or several nucleoli, abundant cytoplasm and thick processes[1]. The ultrastructure of ordinary neurons has been described in many gastropod species such as *Aplysia californica* Cooper[7], *Lymnaea stagnalis* Lamarck[8]. *Archachatina marginata* Lamarck[9], *Helix aspersa* Muller[10], *A. fulica*[11], *Bithynia tentaculata* (Linnaeus)[12] and *Haliotis rufescens* Swainson[13]. The cytoplasm contains a large number of small mitochondria, innumerable cisternae of rough endoplasmic reticulum, free ribosomes, polyribosomes, lysosomes, numerous Golgi complexes and elementary granules. The free ribosomes and cisternae of the rough endoplasmic reticulum are especially concentrated near the nucleus and in the region of the axon hillock[1]. The globuli

cells contain chromatin-rich nuclei. The cytoplasm is scant and contains organelles similar to those found in the ordinary neurons[11].

Glial cells are distributed between the neurons and their sheath cells and along the outer surfaces of blood vessels[7,14,15]. The nuclei are round or oval. There are two types of glial cells in *L. stagnalis*[8,14]. The first type of neuroglia indents into the perikaryon and into the axon of the large neurons. Cell organelles are scarce in the cytoplasm of those glial cells except for mitochondria. Usually some glycogen is present. A second type of glial cells (filamentous glial cells) is characterized by a large number of thin filaments (50 A°) which are comparable to tonofilaments. Moreover, these cells contain abundant mitochondria, a rather extensive rough endoplasmic reticulum, numerous Golgi complexes, and lysosome-like structures[8]. The ultrastructure of glial cells of *L. stagnalis* is similar to those of *A. marginata*[9] and *A. californica*[7].

From the previous reports on the ultrastructure of neurons and neuroglia in the ganglia of various species of gastropods, it is apparent that the knowledge of ultrastructure of neurons and neuroglia is still lacking in *Haliotis asinina* Linnaeus. Therefore, the present study reports on the fine structure of neurons and neuroglia in the cerebral and pleuro-pedal ganglia of *H. asinina*.

MATERIALS AND METHODS

The adult abalone *H. asinina*, with a shell length of 4-5 cm, were obtained from the Coastal Aquaculture Development Center, Klong Wan, Prachuap Khiri Khan Province, Thailand. Abalone were anesthesized with 5% MgCl, after which their shells were removed. The cerebral and pleuro-pedal ganglia were dissected out and fixed in a mixture of 4% glutaraldehyde and 2% paraformaldehyde in 0.1M Millonig buffer (pH 7.8) at 4°C for 24 hours. Specimens were washed six times with 0.1 M Millonig buffer. They were postifixed in 1% OsO_4 in 0.1 M Millonig buffer for 2 hours, then dehydrated through a graded series of ethanol. They were embedded in Spurr's resin. The sections were stained with uranyl acetate in 70% ethanol and lead citrate and examined with a Hitachi H-300 transmission electron microscope operating at 75 KV.

RESULTS

From the histological observation, , there are four types of neurons (NR_{1-4}) and three types of neuroglia (NG_{1-3}) in the cerebral and pleuro-pedal ganglia[16,17].

Type I neuron (NR_1). The cell body is round or oval with very large size (14x28 μm). The nucelus is round (9 μm in diameter) with a thin rim of heterochromatin attached to the nuclear envelope. Most of the remaining

chromatin is finely dispersed euchromatin that is scattered uniformly throughout the nucleus (Fig.1A). The cytoplasm contains numerous mitochondria and stacks of rough endoplasmic reticulum (Fig.1A). Only few small elementary granules are present.

Type 2 neuron (NR_2). The cell body is oval and about 4-6 μm in diameter. The nucleus also has an oval shape (4-6 μm in diameter), with thick patches of heterochromatin along the periphery and in the central area (Fig.1B). The cytoplasm is very thin and contains a few rough endoplasmic reticulum, mitochondria, polyribosomes and some elementary granules (Fig.1B).

Type 3 neuron (NR_3). The cell body and nuclear size of these cells are similar to those of NR_2. However, in the nucleus, the heterochromatin is increased greatly in comparison to NR_2 (Fig.1C). The cytoplasm is relatively thin comparing to the size of the nucleus, and contains sparing amount of rough endoplasmic reticulum and mitochondria, a few polyribosomes and small elementary granules.

Type 4 neuron (NR_4). These cells are round in shape and about 4-6 μm in diameter. The nucleus contains thin patches of heterochromatin along the nuclear embrane, while most of the nucleoplasm in the central area is clear (Fig.1D). The cytoplasm is thin and contains the usual organelles such as, rough endoplasmic reticulum, mitochondria, ribosomes, along with some elementary

granules (Fig.1D). These cells are rarely observed in the cerebral ganglia, while they are more numerous in the pleuro-pedal ganglia.

Type 1 neuroglia (NG_1). The cell body is spindle-shaped with little perinuclear cytoplasm. The nucleus is also spindle-shaped with patches of heterochromatin attached to the periphery of the nuclear membrane, and few large blocks of heterochromatin occur in the central area (Fig.2A). The cytoplasm contains a few rough endoplasmic reticulum, mitochondria and ribosomes (Fig.2A). No elementary granules were observed. These neuroglia are intermingled with neurons in all layers of the cortex.

Type 2 neuroglia (NG_2). The cell body (3x8 μm in diameter) and nucleus (3x5 μm in diameter) are highly ellipsoid in shape. The nucleus contains a dense heterochromatin strip along the nuclear envelope, continuing into large blocks in the central region (Fig. 2B). The cytoplasm is extremely thin and contains only ribosomes (Fig.2B). These neuroglia form a single sheet of continuous cell layer adjacent to the basement membrane, which is surrounded in turn by ganglionic connective tissue capsule.

Type 3 neuroglia (NG_3). The cell body and nuclear characteristic of these neuroglia are similar to those of NG_2, but they are smaller in size and the nuclear membrane is more indented (Fig.2C). The nucleus contains dense heterochromatin (Fig.2C). The cytoplasm is very thin and contains ribosomes, a

few rough endoplasmic reticulum and mitochondria (Fig.2C). These neuroglia are interspersed amongst the nerve tracts in the neuropil.

DISCUSSION

The neurons in the cerebral and pleuro-pedal ganglia of *H. asinina* can be divided into 4 types (NR_{1-4}) based on the nuclear characteristic. NR_1 is the largest neuron and exhibit the ultrastructural features similar to typical motor neurons of vertebrates such as ventral horn motor cells of the spinal cord and Purkinje cells in the cerebellum. Their chromatin is completely euchromatic with a prominent nucleolus, while the cytoplasm contains abundant rough endoplasmic reticulum and mitochondria, but only a few typical elementary or neurotransmitter granules.

Other types of neurons (NR_2, NR_3, NR_4) may belong to the same group. They are characterized by increasing condensation of heterochromatin. The cytoplasm is small but contains sizable numbers of organelles particularly polyribosomes and mitochondria. These features are similar to association neurons in the vertebrate nervous system, such as small neurons in the molecular layer of cerebellum of mammals.

The ultrastructure of ordinary neurons had been studied extensively in the ganglia of several pulmonates such as *L. stagnalis*[18], *Helisoma tenue* (Phillippi)[19], *A. californica*[7], *H. pomatia*[3], *H. aspersa*[10], *A. marginata*[9] and *A.*

fulica[11]. The studies on the neurons of prosobranchs were reported in *H. rufescens*[13] and *B. tentaculata*[12]. The ultrastructure of the ordinary neurons in *H. asinina* is rather simple compared with those in the pulmonates. They contain the usual cytoplasmic organelles such as rough endoplasmic reticulum, mitochondria, ribosomes, polyribosomes, similar to the neurons of pulmonates but in smaller numbers. Their Golgi bodies and lysosomes are not observed as frequent as those of the pulmonate neurons. In addition, the ordinary neurons of pulmonates usually contain a large number of elementary granules. There are only a few elementary granules in *H. asinina* neurons. These granules are not stained by chrome-hematoxylin and paraldehyde-fuchsin. It is possible that the small vesicles of the neurons might incorporate neurotransmitters, which are non-peptides or glycoprotein[18]. Similar granules, thought to contain neurotransmitters have been described in the neurons of *L. stagnalis*[18] and *A. marginata*[9].

Special types of inclusions and secretory granules have been reported in the neurons of *H. rufescens* and *B. tentaculata*[12,13]. In *H. rufescens*, the cerebral neurons contain large membrane-bound inclusions showing various degrees of organization such as packed membranes or filaments, clumps of strongly osmiophilic material, and homogeneous pale material. Frequently, a single inclusion shows all three features[13]. No such inclusions were observed in *H. asinina* neurons. Andrews[12] reported the presence of lipofuscin spherules in *B.*

tentaculata neurons. We did not observe these spherules in the neurons of *H. asinina*.

The neuroglia of the cerebral and pleuro-pedal ganglia of *H. asinina* which contain spindle-shaped nuclei and little perinuclear cytoplasm are different from those described in *B. tentaculata*[12], *L. stagnalis*[14] and *A. marginata*[9] which have several mitochondria, rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes and lysosome-like structures. Furthermore, they are interspersed amongst the neurons, but do not indent into the cytoplasm of the neurons like those described for the neuroglia of pulmonates[1].

REFERENCES

1. Bullock TH and Horridge GA (1965) *Structure and Function in the Nervous System of Invertebrate*, Vol 2. W.H. Freeman and Company, San Francisco.

2. Smith BJ (1967) Correlation between neurosecretory changes and maturation of the reproductive tract of *Arion ater* (Stylommatophora : Arionidae). *Malacologia* 5, 285-298.

3. Pentreath W, Osborne NN and Cottrell GA (1973) Anatomy of giant serotonin-contain neurons in the cerebral ganglia of *Helix pomatia* and *Limax maximus*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 143, 1-20.

4. Kruatrachue M, Upatham ES, Seehabutr V, Chavadej J, Sretarugsa P and Sobhon P (1993) General anatomy and histology of the nervous system in *Achatina fulica*. *J Sci Soc Thailand* 19, 1-24.

5. Dorsett DA (1983) The neuroanatomy of selected gastropod species. In: *The Molluscs* (Edited by Saleuddin ASM and Wilbur KM), pp 101-187. Academic Press, New York

6. Benjamin PR and Window W (1981) The distribution of three wide acting synaptic input to the identified neurons in the isolated brain of *Lymnaea stagnalis*. *Comp Biochem Physiol* 70A, 293-307.

7. Coggeshall RE (1967) A light and electron microscope study of the abdominal ganglion of *Aplysia californica*. *J Neurophysiol* 30, 1263-1287

8. Joosse J (1964) Dorsal bodies and dorsal neurosecretory cells of the cerebral ganglia of *Lymnaea stagnalis*. *Arch Neerl Zool* 15, 1-103.

9. Amoroso El, Margaret I, Baxter FRS, Chiquoine AD and Nisbet RH (1964) The fine structure of neurons and other elements in the nervous system of the giant African land sail *Archachatina marginata*. *Proc Roy Soc Lond* 160, 167-180.

10. Fernandez J and Fernandez MS (1972) Nervous system of the snail *Helix aspersa*. 3. Electron microscopic study of neurosecretory nerves and endings in the ganglionic sheath. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 135, 473-482.

11. Kruatrachue M, Sretarugsa P, Seehabutr V, Chavadej J, Upatham ES and Sobhon P The fine structure of neurons in the nervous system of the giant African snail *Achatina fulica* (Gastropoda : Achatinidae). *J Med Appl Malacol* (in press).

12. Andrews EB (1971) The fine structure of the nervous system of *Bithynia tentaculata* (Prosobranchia) in relation to possible neurosecretory activity. *The Veliger* 14, 13-23.

13. Miller W, Nishioka RS and Bern HA (1973) The "juxtaganglionic" tissue and the brain of the abalone *Haliotis rufescens* Swainson. *The Veliger* 16, 125-129.

14. Wendelaar Bonga SE (1970) Ultrastructure and histochemistry of neurosecretory cells and neurohaemal areas in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Z Zellforsch Mikrosk Anat* 108, 190-224.

15. Fernandez J (1963) Nervous system of the snail *Helix aspersa*. 1. Structure and function of ganglionic sheath and neuroglia. *J Comp Neurol* 127, 157-182.

16. Upatham ES, Thongkukiatkul A, Kruatrachue M, Wanichanon C, Chitramvong YP, Sahavacharin S and Sobhon P (1998) Classification of neurosecretory cells, neurons, and neuroglia in the cerebral ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus by light microscopy. *J Shellfish Res* 17 (in press).

17. Thongkukiatkul A, Upatham ES, Sobhon P, Kruatrachue M, Wanichanon C, Pumthong T and Nugranad J (1999) Histological studies of the pleuro-pedal ganglion, visceral ganglion and pedal cord ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus. *J Med & Appl Malacol* (in press).

18. Boer HH, Douma E and Koksma JMA Electron microscope study of neurosecretory cells and neurohemal organs in the pond snail *Lymnaea stagnalis*. *Symp Zool Soc Lond* 22, 237-256.

EXPLANATION OF FIGURES

Fig. 1 A. A low power micrograph of type 1 neuron (NR_1) in the cerebral ganglia showing a round nucleus (Nu) with a prominent nucleolus (No). The cytoplasm contains numerous mitochondria (Mt) and stacks of rough endoplasmic reticulum (RER).

B. A medium power micrograph of type 2 neuron (NR_2) in the cerebral ganglia showing an oval nucleus (Nu) with patches of heterochromatin (He) along the nuclear envelope and in the central area. C. A medium power micrograph of type 3 neuron (NR_3) in the cerebral ganglia showing an oval nucleus (Nu) with completely dense heterochromatin (He) and a thin rim of cytoplasm. D. A medium power micrograph of type 4 neuron (NR_4) in the pleuro-pedal ganglia showing a round nucleus (Nu) with thin patches of heterochromatin (He) along the nuclear membrane. The cytoplasm contains a few rough endoplasmic reticulum (RER), mitochondria (Mt) and elementary granules (EG).

Fig.2 A. A medium power micrograph of type 1 neuroglia (NG_1) in the pleuro-pedal ganglia showing a spindle-shaped nucleus (Nu) with patches of heterochromatin (He) in the peripheral and central regions. The cytoplasm contains a few rough endoplasmic reticulum (RER) and mitochondria (Mt). B. A medium power micrograph of type 2 neuroglia (NG_2) in the pleuro-pedal ganglia showing a nucleus (Nu) with very dense heterochromatin (He). The cytoplasm is extremely thin and contains only ribosomes. C. A medium power micrograph of type 3 neuroglia (NG_3) in the pleuro-pedal ganglia showing a nucleus (Nu) with dense heterochromatin (He). The cytoplasm contains a few rough endoplasmic reticulum (RER) and mitochondria (Mt).

Fig 1

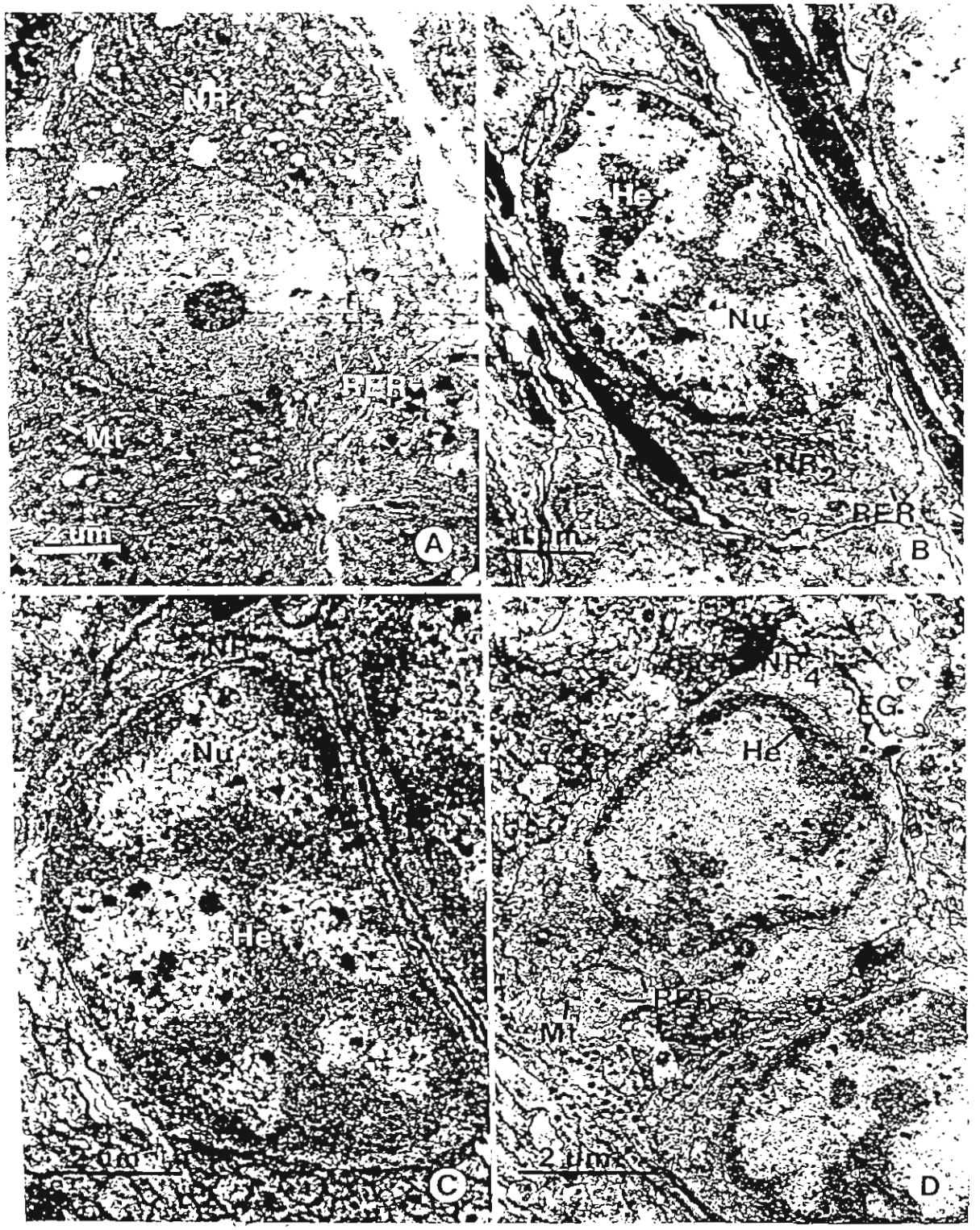


Fig 2



เอกสารหมายเลข 10.2.7

ULTRASTRUCTURE OF SPERMATOZOA IN THE TESTIS OF HALIOTIS ASININA LINNAEUS

Somjai Apisawetakan[1], Prasert Sobhon[1,*], Chaitip Wanichanon[1], Vichai Linthong[1], Maleeya Kruatrachue[2], Suchart Upatham[2,3], Padermsak Jarayabhand[4], Tanate Pumthong[5] and Jintana Nugranard[5]

ABSTRACT

When studied by TEM and SEM, the head of a spermatozoa of *H. asinina* Linnaeus appears as a cone-shaped cell whose size is about 3x1-1.5 μm, with a long tail. The acrosome is an inverted cup-shaped structure, covering the indented anterior end of the head, and containing homogeneously dense matrix. There is an acrosomal core with crystalline structure occupying the concave subacrosomal space with its base resting in the indention of the anterior tip of the nucleus. The nucleus contains chromatin granules about 60 nm in diameter which are densely packed together, and a few nuclear vacuoles. At the posterior end of the nucleus there are 3-5 globular-shaped mitochondria that are adhered to the nucleus by dense plaques of outer membranes, and linked to the posterior half of the sperm membrane by zig-zag filaments. A pair of centriole located in the middle of mitochondria, with the proximal horizontal centriole tightly attached to the nucleus by thickened double plates, and the distal vertical centriole gives rise to a long tail. Axoneme of 9+2 doublets of microtubules makes up the entire core of the tail, whose membrane in the proximal part is crenulated while that in the remaining distal part is tightly-fitted around the axoneme.

KEY WORDS - Spermatozoa, ultrastructure, *Haliotis asinina*

INTRODUCTION

Like in mammalian species mollusc sperm are either cone-shaped or highly elongated with some appearing spiral; all of which conform to the typical architecture of flagellated animal sperm in possessing an acrosome, a head, a mid piece and a tail. In spite of the general similarity, however, there are unique features in the sperm of various mollusc species. By and large, sperm of externally-fertilizing molluscs are considered primitive, by virtue of having cone-shaped heads and long tails that do not have middle pieces. Instead, their mitochondria are located at the base of the nucleus (Franzen, 1955). In contrast, sperm of the

[1] Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand.
[*] Corresponding author and reprint request.
[2] Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand.
[3] Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi, 20131.
[4] Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
[5] Coastal Aquaculture Development Center, Department of Fishery, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Klong Wan, Prachuapkhirikun, 77000.

internally-fertilizing molluscs, especially among neogastropods of fresh water, marine and even terrestrial species, possess long slender heads, and elongated middle pieces where helical or long straight mitochondria are concentrically arranged around the axonemes (Walker & MacGregor, 1968; Walker, 1970; Franzen, 1970; Kitajima & Paraense, 1976; Huaquin & Bustos-Obregon, 1981; Healy, 1983; Healy & Willian, 1984; Azevedo & Corral, 1985; Jaramillo *et al.*, 1986; Hodgson, 1986; Gallardo & Garrido, 1989; Sretarugsa *et al.*, 1991; Al-Hajj & Attiga, 1995; Pastisson & Lacorre, 1996). Abalone belong to prosobranch group of gastropods which are considered to be rather primitive, and reproduce by external fertilization. Thus their sperm belong to the first type as described earlier. However, even within their own genus, spermatozoa of abalone exhibit specie-specific characteristics. In the present study, we report the ultrastructure of spermatozoa in *Haliotis asinina*, a species commonly found in the coastal water of tropical region, including Thailand.

MATERIALS AND METHODS

Collection of *H. asinina* specimens

Abalone from land-based culture system are provided by the Coastal Aquaculture Development Center, Prachaubkirikhun Province, and Marine Biological Station, Chulalongkorn University, Angsila, Chonburi Province. They are kept in concrete tanks housed in the shade, which are well flushed with mechanically circulated filtered sea water and aerated by air delivery system to maintain the controlled environment. The optimum level of salinity is about 22.5-32.5 ppt. and the temperature is about 22-26°C (Singhagraiwan & Doi, 1993). They are fed with a diet of macroalgae (usually *Gracilaria* spp. and *Laminaria* spp.), supplemented with artificial food for abalone.

Electron Microscopic Study

Small pieces of the testis were prefixed with 3% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.4, at 4^0C, for overnight, then prepared for electron microscopic observations by conventional TEM and SEM methods.

For TEM studies, the specimens were post-fixed in 1% osmium tetroxide in the same buffer, at 4^0C, for 2 hours, then dehydrated in a graded series of ethanol, and embedded in Araldite 502 resin. Ultrathin sections were cut and stained with lead citrate-uranyl acetate and viewed under a Hitachi TEM H-300 at 75 kV.

For SEM studies, the specimens were post-fixed, ethanol-dehydrated, and critical-point dried in liquid CO_2, and coated with Platinum-Paladium in an ion-sputtering apparatus. Finally, they were examined with a Hitachi S-2500 scanning electron microscope at 15 kV.

RESULTS

Scanning Electron Microscopy (SEM)

Under SEM, a testicular sperm exhibits cone-shaped head, whose size is about 3 μm in length, 1.5 μm in width at the base of the nucleus and 1 μm at the acrosomal-nuclear junction (Fig.1A-D). Compared to earlier stages of germ cells, the surface of spermatozoa appears smooth (Fig.1B,C). The anterior end is covered by a cup-shaped acrosome, while the posterior end by five spherical mitochondria of similar size. Projecting from the middle of mitochondria is a long, slender, and uniform tail (Fig.1B,C,D).

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Under TEM acrosome appears as an inverted cup, whose concavity separating it from the anterior border of the nucleus, which is also indented. This subacrosomal space contains crystalline acrosomal core embedded in a more homogeneous material (Fig.2B,E,F). The acrosomal matrix itself appears homogeneous with varying degree of electron opacity (Fig.2E,F).

The nuclei of most spermatozoa contain completely condensed chromatin which appear electron opaque, except for clear areas of intranuclear vacuoles where there seems to be little chromatin material. Vacuoles are varying in size and distributed randomly throughout the nucleus. In a few spermatozoa, the nuclear chromatin still appear granular with numerous round granules tightly packed together, with each "granule" about 60 nm in diameter (Fig.3B,D). These granules are of similar size and characteristics as those observed in earlier stage spermatids where chromatin is not yet completely condensed.

The posterior border of the nucleus are flanked by spherical mitochondria. In a longitudinal thin section of the nucleus, usually two to three mitochondria could be observed (Fig.2A,B,C). However, in fortuitous cross sections at the level of mitochondria, there appear to be five of these bodies arranged in circle surrounding the centriole (Fig.2A,B). Each mitochondria is tightly apposed to the nucleus at which the nuclear membrane appears thickened (Fig.3B,E,F). Mitochondria contain shelf-like cristae, with some stretching from one side to the opposite side (Fig.3B,E,F).

In the posterior corner of cytoplasm between the nucleus and mitochondria (Fig.3A,B,E,F), there are bundle of thin zig-zag filaments, whose width is about 15-20 nm. These filaments link mitochondria to the adjacent cell membrane, and some filaments appear attached to the latter at specific location (Fig.3B,E,F). These filaments also surround the entire lower half of the nucleus.

The tail piece commences from a pair of centriole whose proximal member is embedded in the socket at the middle region of the slightly indented posterior border of the nucleus (Fig.3A,B,D). The nuclear membrane at this region is also visibly thickened (Fig.3B,D). Long axoneme stretching backwards from the distal centriole that is surrounded by mitochondria (Fig.2C,3A). In cross sections (Fig.3C) axoneme appears as 9+2 doublets of microtubules, and this pattern appears to exist along the whole length of the tail (Fig.2D,3F). Axoneme is covered directly by partially wavy plasma membrane at the proximal end close to the centriole (Fig.2C), while on the rest of the tail it appears fairly smooth and fits snugly around the axoneme (Fig.3F).

DISCUSSION

The shape and general morphology of *H. asinina* sperm is typical of the "primitive type" or "ect-aquasperm" described for mollusc which reproduce by external fertilization, which include chitons, bivalves (Frazen, 1970; Baccetti, 1979) and scaphopoda (Dufresne-Dube *et al.*, 1983). Spermatozoa of these mollusc usually possess short, cone-shaped heads and simple tails that lack mid pieces. In contrast, mollusc whose sperm fertilize the eggs internally tend to have elongated and sometimes also spiraling heads, and the tails that have definitive mid pieces containing mitochondria or their derivertives; and frequently glycogen particles in residual cytoplasmic masses still remaining around parts of the tails (Franzen, 1956; 1983; Anderson & Personne, 1976; Baccetti & Afzelius, 1976; Healy, 1996).

The heads of sperm in *H. asinina* appear to be shorter and more globular in comparison to those of other temperate abalone species, such as *H. rufescens* (Lewis *et al.*, 1980), whose sperm tend to have elongate bullet-shaped heads. There also appear to be more clear areas or intranuclear vacuoles within the nucleus where chromatin mass is lacking. The chromatin in *H. asinina* appear to be "granular type" where large chromatin granules of 50-60 nm are packed tightly side-by-side. During spermiogenesis these large chromatin granules are derived from the periodic thickening of formerly uniform chromatin fibers whose original size in the earliest round spermatid stage is about 20-30 nm (unpublished observation). These granular pattern of chromatin condensation could also be perceived in other primitive gastropods, such as *trochid* genus (Healy 1989; Hodgson *et al.*, 1990), scaphopoda (Dufresne-Dube *et al.*, 1983), and bivalves (Bozzo *et al.*, 1993; Cacas & Subirana, 1994; Johnson *et al.*, 1996). By contrast, in the internally fertilized sperm of most meso- and all neogastropods, opisthobranchs and pulmonates, the chromatin condensation is of "fibrillar-lamellar" type; where the pattern of chromatin condensation goes through three successive phases: granular, fibrillar and lamellar structures, that finally become tightly packed in myelin like whorls (Healy, 1987; 1988; Jaramillo *et al.*, 1986; Gallardo & Garrido, 1989; Amor & Durfort, 1990; Sretarugsa *et al.*, 1991; Caceres *et al.*, 1994). It is possible that these two different patterns of chromatin condensation may be linked to the qualitative difference of basic nuclear proteins, especially protamines, which appear to be more variable among primitive, externally fertilized molluscs and the more modern, internally fertilized molluscs; while histones appear to be more conserved (Subirana *et al.*, 1973; Balhorn *et al.*, 1979; Van Helden *et al.*, 1979; Chiva *et al.*, 1991; Daban *et al.*, 1991a; Caceres *et al*, 1994). Much work remains to be done in mollusc in characterizing and correlating the variation of protamines with the above-mentioned patterns of chromatin condensation.

The acrosome of *H. asinina* has cup-shaped with much less elongation and invagination from nuclear side, in comparison to those of temperate abalone species (Lewis *et al.*, 1980) and other primitive gastropods (Hodgson *et al.*, 1990). The acrosomal material is uniformly homogeneous in contrast to the two clearly separated areas shown in *H. rufescens* (Lewis *et al.*, 1980). The acrosomal core is composed of short thick crystalline-like axis embedded within moderately dense matrix that occupies the whole subacrosomal space. In comparison to other primitive gastropods and temperate abalone species, the core is much shorter. The crystalline material is probably consisted of actin and its associated proteins as reported in other molluscs (Baccetti, 1979; Shiroya *et al.*, 1986; Tilney *et al.*, 1987). This acrosomal core may participate in the extension of acrosomal process during acrosomal reaction and fertilization.

The tail of *H. asinina* sperm consists of an axonemal core of 9+2 doublets of microtubules surrounded directly by plasma membrane. This type of simple tail is also observed in other primitive gastropods (Healy 1989; Hodgson *et al.*, 1990), scaphopoda (Dufresne-Dube *et al.*, 1983) and bivalves (Bozzo *et al.*, 1993; Casas & Subirana, 1994; Johnson *et al.*, 1996), all of which reproduce by external fertilization. In contrast, the mollusc that reproduce by internal fertilization possess tails akin to those of mammalian sperm (Jaramillo *et al.*, 1986; Gallardo & Garrido 1989; Amor & Durfort, 1990; Sretarugsa *et al.*, 1991, Caceres *et al.*, 1994). Such tails usually have mid pieces which contain large cylindrical or helical mitochondria. Fibrous sheathes often surround the axoneme to provide sturdy support that could serve stronger movement than the simple tails found in abalone and other primitive gastropods. Indeed, in the latter there are only five small globular mitochondria located at the posterior end of the nucleus, surrounding proximal and distal centrioles. These mitochondria could probably generate smaller quantity of energy for the less motile sperm of these species.

Another remarkable feature in the sperm of *H. asinina*, which have not been reported in sperm of other molluscs, is the presence of zig-zag filaments in the cytoplasm at the posterior corner of the head. It appears that these filaments link mitochondria to the posterior part of the plasma membrane, and some are surrounding the lower half of the nucleus. Because of their zig-zag nature and solid core structure they are probably not microtubules, but their exact component have not yet been identified. We speculate that these filaments could play some roles in controlling the shape of the nucleus as well as the position of mitochondria.

ACKNOWLEDGEMENTS

This investigation was supported by The Thailand Research Fund (Contract BRG4080004 and Senior Research Scholar Fellowship to Prasert Sobhon).

REFERENCES

AL-HAJJ, H.A. & ATTIGA, F.A. 1995. Ultrastructural observations of euspermiogenesis in *Cerithium caeruleum* (Prosobrachia: Cerithiidae) from the Jordan Gulf of Aqaba. *Invertebrate Reproduction and Development*, 28: 113-124.

AMOR, M.J. & DURFORT, M. 1990. Changes in nuclear structure during eupyrene spermatogenesis in *Murex brandaris*. *Molecular Reproduction and Development*, 25: 348-356.

ANDERSON, W.A. & PERSONNE, P. 1976. The molluscan spermatozoon: dynamic aspects of its structure and function. *American Zoologist*, 16: 293-313.

AZEVEDO, C., & CORRAL, L. 1985. The fine structure of the spermatozoa of *Siphonaria algesirae* (Gastropoda, Pulmonata). *Journal of Morphology*, 186: 107-117.

BACCETTI, B. 1979. The spermatozoon. In: Fawcett, D.W. & Bedford, J.M. (eds.), Urban-Schwarzenberg: Baltimore, pp.305-329.

BACCETTI, B. & AFZELIUS, B.A. 1976. "Biology of the sperm cell" Monographs on Development Biology, vol 10, Basel: Karger, S., 254p.

BALHORN, R., LAKE, S. & GLEDHILL, B.L. 1979. Electrophoretic analysis of nuclear membrane isolated from the sperm of the black abalone *Haliotis crackerodii*. *Experimental Cell Research*, 123: 414-475.

BOZZO, M.G., RIBES, E., SAGRISTA, E., POQUET, M. & DURFORT, M. 1993. Fine structure of the spermatozoa of *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). *Molecular Reproduction and Development*, 34: 206-211.

CACAS, M.T. & SUBIRANA, J.A. 1994. Chromatin condensation and acrosome development during spermiogenesis of *Ensis ensis* (Mollusca, Bivalve). *Molecular Reproduction and Development*, 37: 223-228.

CACERES, C., RIBES, E., MULLER, S., CORNUDELLA, L. & CHIVA, M. 1994. Characterization of chromatin-condensing proteins during spermiogenesis in a neogastropoda mollusc (*Murex brandaris*). *Molecular Reproduction and Development*, 38: 440-452.

CHIVA, M., DABAN, M., ROSENBERG, E. & KASINSKY, H.E. 1991. Protamines in polyplacophors and gastropods as a model for evolutional changes in molluscan sperm basic proteins. In: Comparative Spermatology 20 years after, Vol 75, Baccetti, B. (ed.), Seina, Italy: Raven Press, pp.27-30.

KITAJIMA, E.W. & PARAENSE W.L. 1976. The ultrastructure of mature sperm of the fresh-water snail *Biomphalaria glabrata* (Mollusca Gastropoda). *Transactions of the American Microscopical Society*, 95: 1-10.

LEWIS, C.A., LEIGHTON, D.L. & VACQUIER, V.D. 1980. Morphology of abalone spermatozoa before and after the acrosome reaction. *Journal of Ultrastructure Research*, 72: 39-46.

PASTISSON, C. & LACORRE, I. 1996. Fine structure of the germinating cells during the spermiogenesis of *Arion rufus* (Mollusca, Pulmonate Gastropoda). *Molecular Reproduction and Development*, 43: 484-494.

SHIROYA, Y., HOSOYA, H., MABUCHI, I. & SAKAI, Y.T. 1986. Actin filament bundle in the acrsome of abalone spermatozoa. *Journal of Experimental Zoology*, 239: 105-115.

SINGHAGRAIWAN, T. & DOI, M. 1993. Seed production and culture of a tropical abalone, *Haliotis asinina* Linne. The Eastern Marine Fisheries Development Center, Department of Fisheries, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Thailand. 33p.

SRETARUGSA, P., NGOWSIRI, U., KRUATRACHUE, M., SOBHON, P., CHAVADEJ, J. & UPATHAM, E.S. 1991. Spermiogenesis in *Achatina fulica* as revealed by electron microscopy. *Journal of Medical and Applied Malacology*, 3: 7-18.

SUBIRANA, J.A., COZCOLLUELA, C., PALAU, J. & UNZETA, M. 1973. Protamines and other basic proteins from spermatozoa of molluscs. *Biochimistry et Biophysica Acta*, 317: 364-379.

TILNEY, L.G., FUKUI, Y. & DEROSIER, D.J. 1987. Movement of the actin filament bundle in Mytilus sperm: a new mechanism is proposed. *The Journal of Cell Biology*, 104: 981-993.

VAN HELDEN, P.D., STRICKLAND, V.N., BRANDT, W.F. & VON HOLT, C. 1979. The complete amino acid sequence of histone H2B from the mollusc *Patella granatina*. *European Journal of Biochemistry*, 93: 71-78.

WALKER, M. 1970. Some unusual features of the sperm of *Nucella lapillus* (L.). In: Comparative Spermatology, Bacetti, B. (ed.), Academic Press: New York, pp.383-392.

WALKER, M. & MACGREGOR, H.C. 1968. Spermatogenesis and the structure of the mature sperm in *Nucella lapillus* (L). *Jounal of Cell Science*, 3: 95-104.

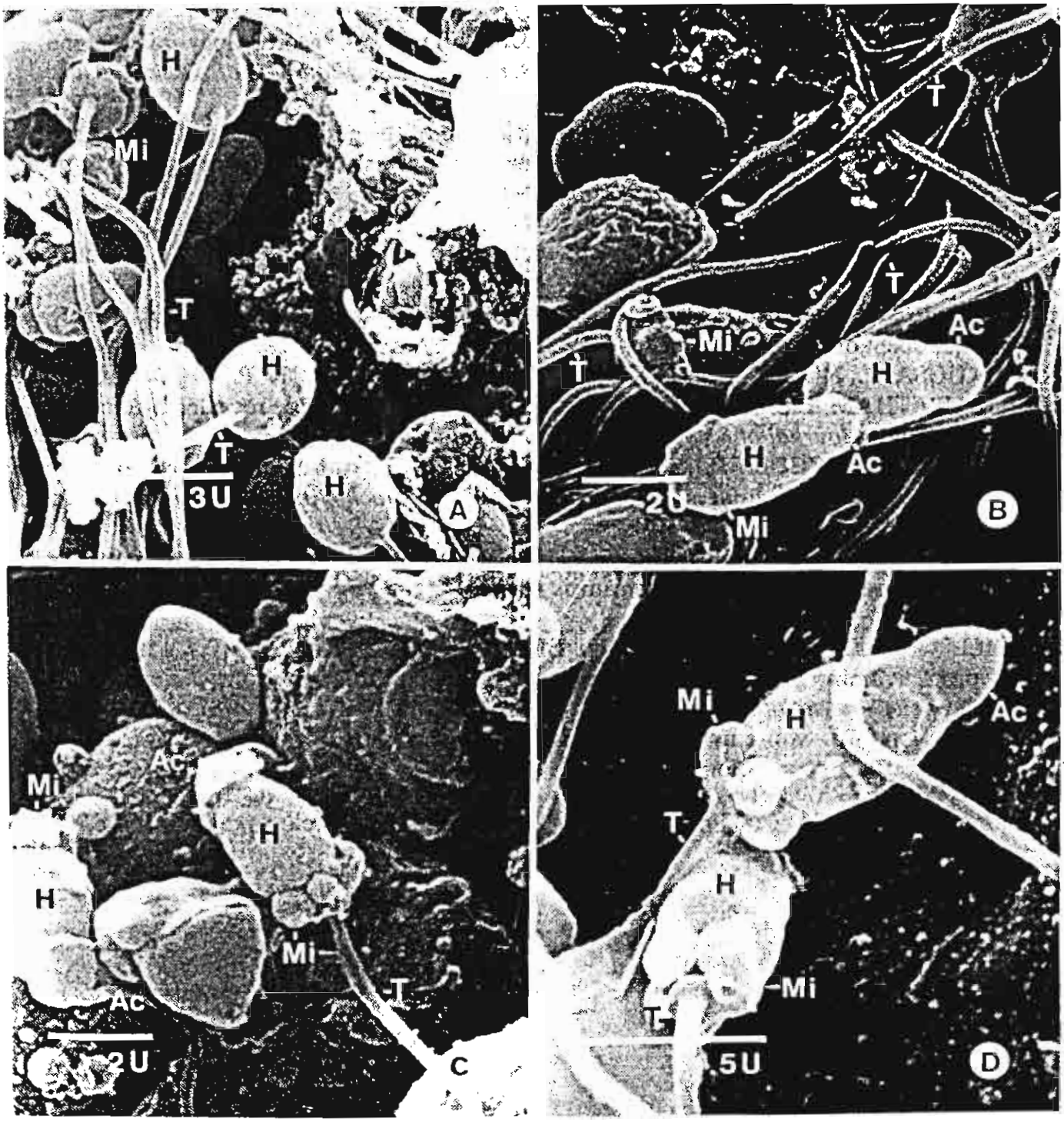


Fig.1 Scanning electron micrographs of spermatozoa in the testis showing cone-shaped heads (H), rod-shaped tails (T) (**A,B**). Five globular mitochondria (Mi)at the base of the head surrounding the proximal region of the tail (**C,D**), and cup-liked acrosome (Ac) covering the anterior end of the head (**C,D**).

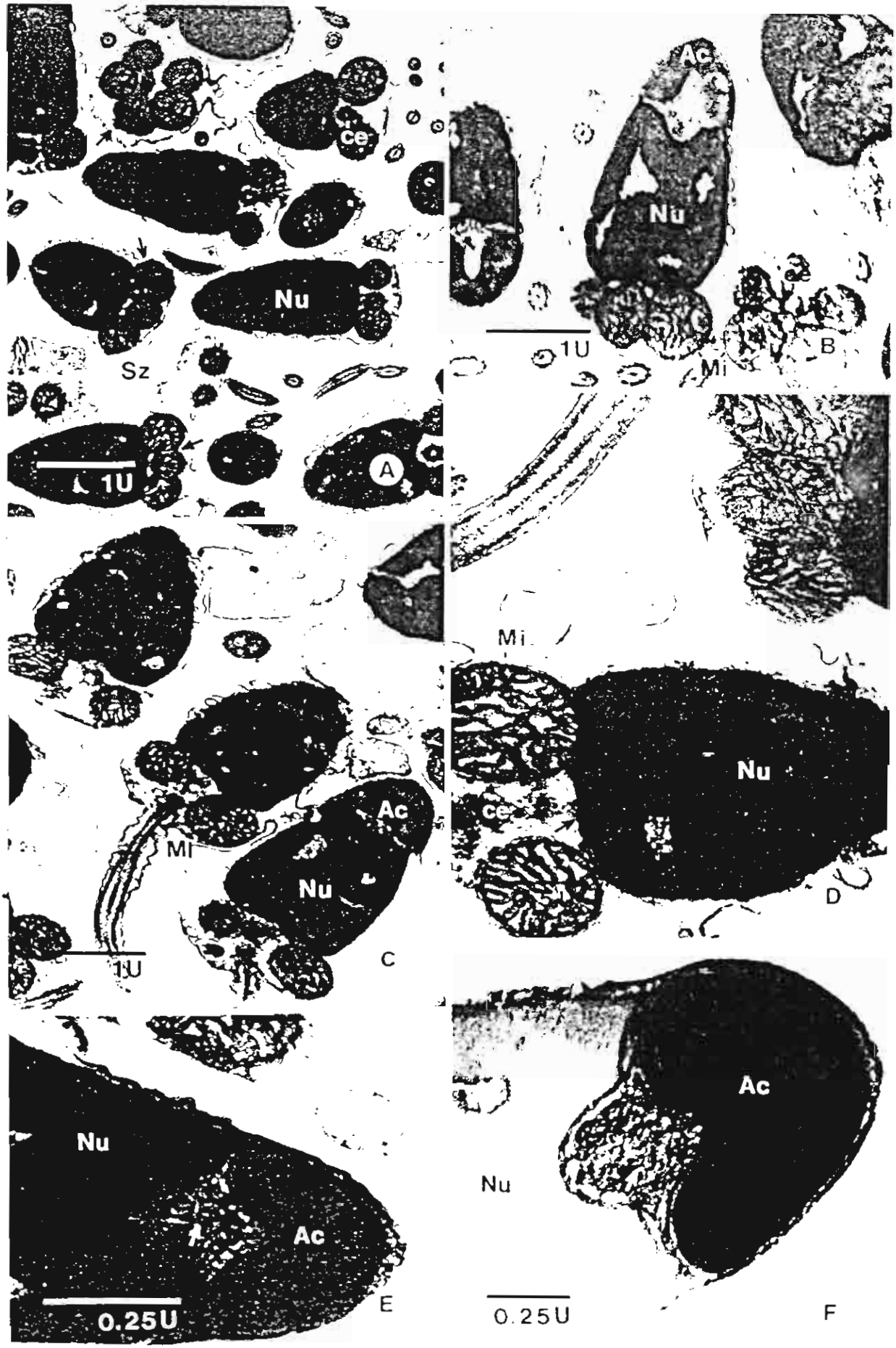


Fig.2 Transmission electron micrographs of mature spermatozoa (Sz) showing nucleus (Nu), acrosome (Ac), plasma membrane (pm) mitochondria (Mi) and vacuoles (va) in the nucleus. Five globular mitochondria (arrows in A,B) surrounding a pair of centriole (ce), which is tightly attached to the nucleus by thickened double plates (arrow in D) at the neck region. An acrosomal core with crystalline structure filling in the concavity of the subacrosomal space at the anterior tip of the nucleus (arrows in E,F)

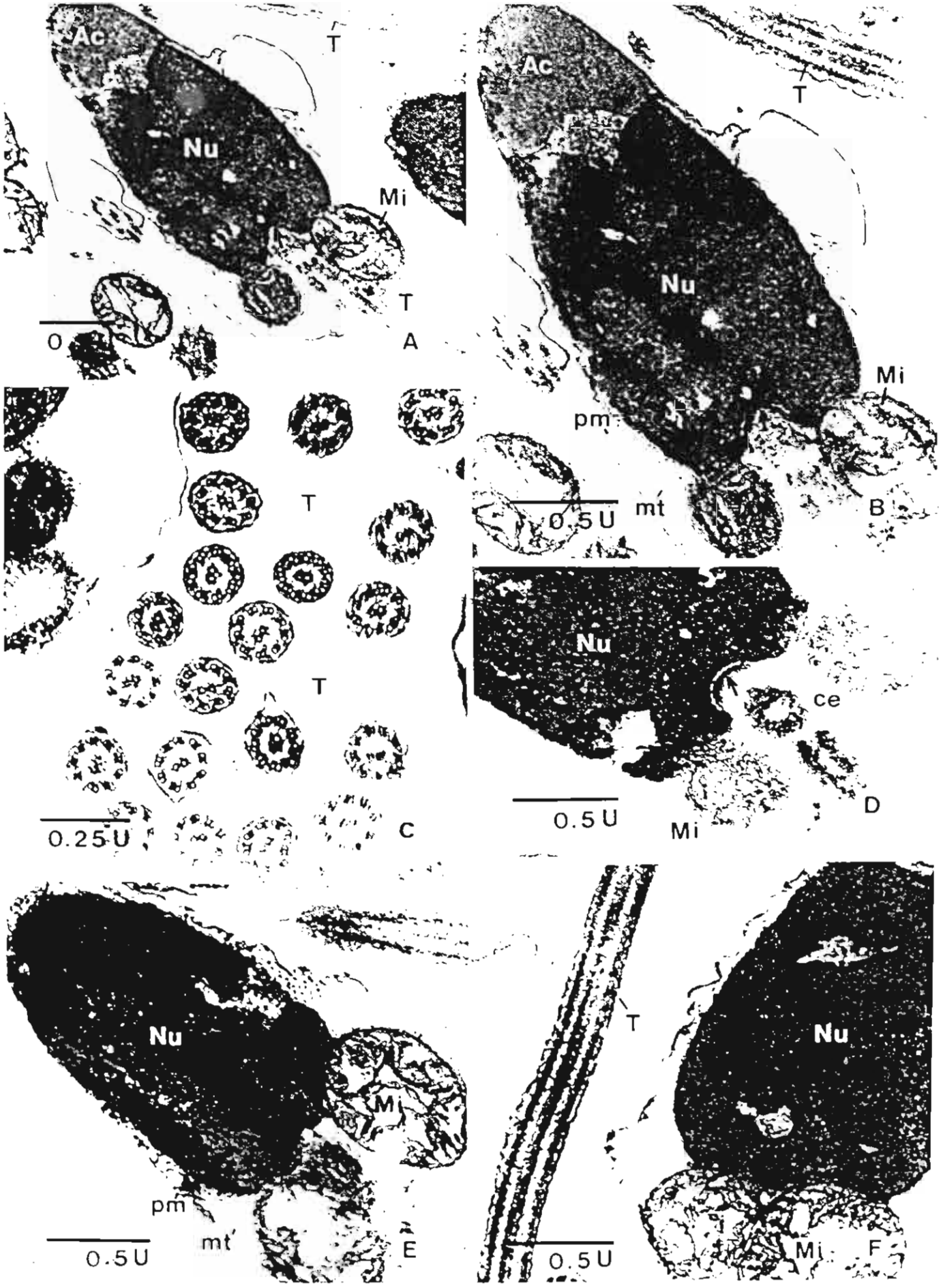


Fig.3 Transmission electron micrographs showing the nuclei (Nu), and tails (T) of spermatozoa consisting of centrioles (ce), the proximal one attached to the nucleus by the thickened plates (arrows in A,B,D). The zig-zag filaments (mt) in the cytoplasm link the nucleus and mitochondria to the posterior sperm membrane (pm) (B,E). The tail consists of axoneme of 9+2 doublets of microtubules surrounded by plasma membrane (cross-section in C, long-section in F). Chromatin in the nuclei of cells in B and D still show incomplete condensation, where individual chromatin granules with 60 nm in diameter are closely packed together, yet the outline of each granules is still visible.