

## 7.7 มหกายวิภาคของรังไข่และอณฑะ

เนื้อเยื่อทั้งรังไข่และอณฑะล้อมรอบ hepatopancreas โดยรวมจึงเรียกว่า conical organ ในทางปฏิบัติการตรวจดูสภาพความสมบูรณ์ของต่อมอณฑะและรังไข่ทำได้โดยการตรวจดูสี อณฑะมีสีเหลืองอ่อนเมื่อพัฒนาเต็มที่และก่อนเข้าสู่ช่วง spawning ส่วนรังไข่มีสีเขียวเข้มเมื่อพัฒนาเต็มที่และก่อนเข้าสู่ช่วง spawning เมื่อตรวจดูในระดับจุลทรรศน์พบว่าปริมาณของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์และ hepatopancreas มีความสัมพันธ์แบบผกผัน กล่าวคือในช่วง proliferative phase hepatopancreas จะมีขนาดใหญ่กว่า gonad tissue มาก ส่วนในระยะ mature phase เนื้อเยื่อ gonad จะมีปริมาณมากกว่า hepatopancreas มาก อาจเป็นไปได้ว่าในช่วง proliferative phase hepatopancreas ต้องเป็นแหล่งสะสมอาหารไว้ให้เพียงพอต่อการแบ่งตัวและการพัฒนาของเซลล์ในระยะต้น ที่มีอัตราการแบ่งตัวสูงมาก และเมื่อถึงระยะ mature phase อาหารก็ได้ถูกใช้ไปมาก ทำให้ gonads ขยายตัวเต็มที่ ส่วน hepatopancreas มีขนาดลดลง

## 7.8 ลักษณะจุลกายวิภาคของอณฑะและรังไข่

อณฑะและรังไข่แบ่งออกห้องเล็กๆ (compartment) โดยเยื่อเกี่ยวพันที่เรียกว่า trabeculae เซลล์ spermatogonia (Sg) ส่วนใหญ่เกาะอยู่ตามฐานของ trabeculae ด้านที่ติดกับถุงหุ้ม ในอณฑะเซลล์ Sg คงแบ่งตัวและค่อย ๆ เคลื่อนขึ้นไปตามขอบของแผ่น trabeculae ทั้งสองด้าน แล้วแบ่งตัวและปรับสภาพเป็น primary spermatocytes (PrSc) ขึ้นต่าง ๆ ที่ค่อย ๆ เคลื่อนเป็นแถวออกไปจากขอบของแผ่น trabeculae จนกระทั่งกลายเป็นแถวสุดท้ายคือ secondary spermatocyte (SSc) ก่อนที่จะกลายเป็นเซลล์ spermatids (St) ซึ่งเริ่มหลุดออกจากกัน และในที่สุดกลายเป็นเซลล์ spermatozoa ที่หลุดออกสู่ช่องกลางของ compartment แต่ละอัน ส่วนในรังไข่เซลล์ oogonia คงค่อย ๆ เคลื่อนขึ้นไปตามขอบ trabeculae เช่นเดียวกันกับ Sg และแบ่งตัวกับปรับสภาพกลายเป็นเซลล์ Oc<sub>1</sub> ถึง Oc<sub>3</sub> ที่ขยายขนาดใหญ่มากขึ้นเรื่อย ๆ และเปลี่ยนรูปร่างจากรูปกลม (spherical) ใน Oc<sub>1</sub> และ Oc<sub>2</sub> เป็นรูปแท่ง (columnar) หรือรูปแก้วไวน์ (goblet) ใน Oc<sub>3</sub> ซึ่งยังมีด้านฐานติดอยู่กับแผ่น trabeculae จนในที่สุดกลายเป็นรูปหลายเหลี่ยมในเซลล์ชั้น Oc<sub>4</sub> และ Oc<sub>5</sub> ซึ่งหลุดออกจากแผ่น trabeculae เข้าไปรวมตัวและอัดแน่นอยู่ในช่องว่างของ compartment แต่ละอัน เซลล์ Oc<sub>1-3</sub> มีเซลล์ที่เลี้ยง (follicular cells) หุ้มอยู่โดยรอบ follicular cells คงเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่มีกำเนิดมาจากแผ่น trabeculae ซึ่งมีความสัมพันธ์ที่ใกล้ชิดกับ Og และพัฒนาไปเป็น follicular cells ที่ล้อมรอบเซลล์ oocytes จากชั้น Oc<sub>1</sub> ถึง Oc<sub>4</sub> ในอณฑะเซลล์ที่เป็นตระกูลเดียวกับ follicular cells อาจจะพัฒนาไปเป็น

supporting cells ที่แทรกอยู่ระหว่าง PrSc โดยเป็นเซลล์ที่มีเอกลักษณ์พิเศษคือ มีไมโทคอนเดรียอัดแน่นในไซโตพลาสซึม ซึ่งสังเกตได้ชัดในการศึกษาด้วยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

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

## 7.9 การศึกษาลักษณะและการจำแนกชั้นของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเพศผู้โดยจุลทรรศน์ธรรมดา

จากการศึกษาลักษณะของโครมาตินในนิวเคลียสเป็นหลัก ทำให้เราสามารถแยกชั้นของเซลล์เพศผู้ออกได้เป็น 13 ชั้นคือ เซลล์ spermatogonia (Sg) primary spermatocytes (PrSc) 5 ชั้น secondary spermatocyte (SSc) 1 ชั้น spermatids (St) 4 ชั้น และ spermatozoa (Sz) 2 ชั้น เซลล์เหล่านี้มีลักษณะและปริมาณของ euchromatin ต่อ heterochromatin และการจัดรูปแบบของ heterochromatin ที่แตกต่างกัน เริ่มจาก Sg ซึ่งนอกจากจะเป็นเซลล์ขนาดเล็กแล้ว ยังมี heterochromatin เป็นแถบหรือก้อนเล็ก ๆ เกาะอยู่ตามขอบในของนิวเคลียส ส่วนตรงกลางของนิวเคลียสมีก้อน heterochromatin อยู่เล็กน้อย นิวคลีโอไลต์เด่นพอประมาณ เมื่อถึงระยะ PrSc เซลล์ค่อย ๆ ขยายขนาดขึ้นจนใหญ่ที่สุดในชั้น pachytene spermatocyte (PSc) จากนั้นเซลล์มีขนาดเล็กลงจนถึงชั้น diplotene spermatocyte (DSc) และจะขยายใหญ่อีกครั้งในชั้น metaphase spermatocyte (MSc) กับ secondary spermatocyte (SSc) heterochromatin ก่อตัวเป็นท่อนบาง ๆ ใน leptotene spermatocyte (LSc) และมีความหนาขึ้นกับทึบแสงขึ้นเรื่อย ๆ จนถึงชั้น PSc และ DSc ซึ่งกลายเป็นท่อนขนาดใหญ่ที่ไขว้กันไปมา มีลักษณะคล้ายช่อดอกไม้จึงเรียกว่า bouquet pattern นิวคลีโอไลต์ปรากฏเด่นชัดใน LSc และหายไปในระยะ PSc และ DSc ทุ่งหุ้มนิวเคลียสหายไปในระยะ MSc เมื่อถึงระยะ SSc ท่อนของ heterochromatin ไขว้กันเป็นรูปตาข่ายหรือรูปตัวอักษร Y ต่อเนื่องกัน

เซลล์ที่มีอยู่มากที่สุดในกลุ่ม PrSc คือ PSc ซึ่งน่าจะเป็นชั้นที่ให้อายุมากที่สุด และที่มีจำนวนน้อยที่สุดคือ MSc ซึ่งคงจะเป็นช่วงที่สั้นที่สุด SSc มีจำนวนมากกว่าที่พบ

ในสัตว์ชั้นสูง เช่น ในหนู ซึ่งทำให้เราคิดว่าช่วง SSC ก็คงจะใช้เวลาค่อนข้างนานเช่นกัน จึงได้ปรากฏว่ามีเซลล์ชั้นนี้จำนวนมาก ณ ที่ใดที่หนึ่งและ ณ ช่วงเวลาใดเวลาหนึ่งใน spermatogenic unit เซลล์ spermatids แยกเป็น 4 ชั้น การกระจายของโครมาตินอย่างสม่ำเสมอทำให้นิวเคลียสของ round spermatid ชั้นที่ 1 ( $St_1$ ) ไม่ทึบแสงมาก ต่อจากนั้นนิวเคลียสลดปริมาตรลงไปแต่ยังเป็นทรงกลม จึงทำให้ไฮโครมาตินกระชับเข้า เป็นเหตุให้นิวเคลียสของ  $St_2$  ทึบแสงมากขึ้น ส่วนนิวเคลียสของ  $St_3$  เริ่มเป็นรูปรีและยาวออกเรื่อย ๆ ในขณะที่โครมาตินเริ่มหดตัวเป็นก้อน heterochromatin อีกครั้ง ซึ่งทำให้เกิดช่องว่างระหว่างก้อน heterochromatin ในชั้น  $St_3$  และเมื่อถึงเซลล์  $St_4$  นิวเคลียสลดขนาดลงมากและเรียวออกโดยเฉพาะทางด้านหน้า ทำให้โครมาตินกระชับเข้า และนิวเคลียสทึบแสงขึ้นโดยมีช่องว่างระหว่างก้อน heterochromatin เหลืออยู่น้อยมาก จนในที่สุดกลายเป็น spermatozoa ที่มีอยู่ 2 ชั้น ใน  $Sz_1$  โครมาตินยังไม่เข้มเต็มที่และเพิ่งเริ่มมีกอนไอโอของ acrosome ก่อตัวที่ด้านหน้านิวเคลียส พอถึงระยะ  $Sz_2$  นิวเคลียสทึบแสงเต็มที่ acrosome และหางพัฒนาสมบูรณ์

## 7.10 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้โดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

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

ประการแรก คือการหดเรียงตัวของไฮโครมาตินจากระยะ Sg จนถึงระยะ Sz เราได้ข้อสรุปว่าไฮโครมาตินในเซลล์ Sg, PrSc มีอยู่เพียง 2 ขนาดคือ โยระดับที่ 1 มีขนาดเล็กที่สุดและมีความหนาประมาณ 10-15 nm ซึ่งน่าจะเกิดจากการคลี่ของโยระดับ 2 ที่มีขนาด 30 nm ซึ่งเรียกว่าไฮโครมาตินพื้นฐาน (fundamental chromatin fibers) ซึ่งพบทั่วไปใน somatic cells และเซลล์ชั้น Sg และ PrSc โยระดับ 1 น่าจะเป็น euchromatin ในสภาพที่กำลังคลี่ออกและมี transcriptional activities อยู่ ในเซลล์ชั้น Sg และ LSc ยังมีโยระดับ 1 และระดับ 2 เดี่ยว ๆ อยู่มาก โดยในเซลล์ LSc โยระดับ 2 บางแห่งอาจจะอยู่ชิดกันหรือพันกันเข้าจนกลายเป็นก้อนหรือท่อน heterochromatin ที่ไม่หนาแน่น ในระยะ PSc โยระดับ 2 หดพันกันแน่นเข้าจนกลายเป็นท่อน heterochromatin ขนาดใหญ่ยาวและทึบแสงขึ้นตามลักษณะที่ได้กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามยังสามารถสังเกตเห็นโยระดับ 2 เดี่ยว ๆ ที่ประกอบเป็นก้อน heterochromatin ได้ใน DSc การหดหรือหดแน่นของโยระดับ 2 ในก้อน heterochromatin มีมากขึ้นเรื่อย ๆ จนเข้าสู่ระยะ MSc พอเซลล์ผ่านเข้าสู่ระยะ SSC โยระดับ 2 ในท่อน heterochromatin กลับเริ่มกระจายออกจากกันอีกครั้ง จนทำให้ท่อน heterochromatin ดูหลวม

ขึ้น ดังนั้นจึงอาจจะกล่าวได้ว่าใยระดับ 2 (30 nm) เป็นใยโครมาตินหลักที่เป็นระดับกลางระหว่างสภาพที่เป็นระดับ 1 และสภาพที่เรียงติดกันหรืออัดแน่นจนกลายเป็นก้อน heterochromatin (ระดับ 3) ขนาดต่าง ๆ ถึงแม้เมื่อผ่านการแบ่งเซลล์รอบแรก (mitosis I) ไปแล้ว ใยระดับ 2 ก็ยังคงเป็นใยพื้นฐานหลักทั้งในเซลล์ชั้น SSc, St<sub>1</sub> และ St<sub>2</sub>

เมื่อเข้าสู่ spermiogenesis ช่วงแรกในเซลล์ St<sub>1</sub> ใย 30 nm ที่เคยพันกันในก้อน heterochromatin ใน SSc ก็จะคลี่ออกจากกัน แล้วกระจายอยู่อย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งนิวเคลียส ต่อจากนั้นในช่วง St<sub>2</sub> มีการจัดระเบียบใหม่ โดยใย 30 nm เริ่มขดตัวแน่นขึ้น ณ บริเวณที่มี condensation axis ซึ่งปรากฏเป็นแถบที่มีลักษณะคล้าย ๆ กับ synaptonemal complex แถบดังกล่าวอาจจะเป็นตัวจัดระเบียบ (organizer) ที่เริ่มกระตุ้นให้ใย 30 nm เริ่มขดตัวพันกันแน่นเป็นหย่อม ๆ พอเข้าสู่ St<sub>3</sub> หย่อมของการขดตัวที่มี condensation axis เป็นแกนกลางเริ่มกลายเป็นก้อน heterochromatin อีกครั้ง ก้อน heterochromatin เหล่านี้ขดแน่นขึ้นเรื่อย ๆ จนทำให้เกิดช่องว่างระหว่างก้อน heterochromatin ขึ้นในนิวเคลียส เมื่อเข้าสู่ระยะ St<sub>4</sub> นิวเคลียสมีขนาดเล็กลงและเรียวออก จึงทำให้ก้อน heterochromatin กระชับเข้า จนทำให้นิวเคลียสที่บดแสงอิเล็กตรอนและช่องว่างในนิวเคลียสหายไป ใยโครมาตินส่วนใหญ่ที่เป็นองค์ประกอบของก้อน heterochromatin มีความหนาขึ้นถึง 40 nm ในชั้น St<sub>3</sub> และเมื่อเข้าสู่ระยะ St<sub>4</sub> และ Sz<sub>1</sub> ใยโครมาตินมีความหนาถึง 60 nm และประกอบติดกันแน่นจนไม่อาจจะสังเกตเห็นขอบเขตของใยเดี่ยวในระยะ Sz<sub>2</sub> ซึ่งนิวเคลียสพัฒนาเต็มที่

การขดตัวของใยโครมาตินที่พบในนิวเคลียสของเซลล์ St และ Sz ของหอยเป่าอื้อ นับได้ว่าเป็นแบบ fibrous to granular type กล่าวคือ จากใย 30 nm ที่มีความหนาสม่ำเสมอ (fibrous type) กลายเป็นใยที่มีปม (granular) เกิดขึ้นตลอดความยาวเป็นระยะ โดยปมบนใยเหล่านี้ขยายขนาดขึ้นเรื่อย ๆ จาก 40 nm ใน St<sub>3</sub> ไปเป็น 60 nm ใน St<sub>4</sub> และ Sz<sub>1</sub> ปมเหล่านี้ อาจเกิดจากการที่มีโปรตีนโปรตามีน (protamines) เข้ามาพอกโดยการแทนที่โปรตีนฮิสโตน (histones) ซึ่งอาจเป็นผลให้ใย DNA ชมวดเข้าเป็นปมที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อย ๆ และในที่สุดปมเหล่านี้ก็เข้ามาชิดกันจนกลายเป็นก้อนที่บดอย่างปรากฏใน Sz<sub>2</sub> 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) สัตว์เหล่านี้มีการปฏิสนธิของเซลล์สุจิกับไข่ภายนอกร่างกาย (external fertilization) การขดตัวของใยโครมาตินอีกแบบหนึ่งคือแบบ fibrous to lamellar type พบใน mollusc ที่มีการปฏิสนธิระหว่างเซลล์สุจิกับไข่ภายในร่างกาย (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) เราคิดว่าสิ่งที่เกิดขึ้นในการหดตัวแบบนี้คือ โย 30 nm มีการเพิ่มขนาดโดยสม่ำเสมอจนกลายเป็นแผ่น ซึ่งอาจเกิดจากการที่โปรตีน protamines เข้ามาแทนที่ histones โดยเกาะอย่างสม่ำเสมอทั่วทั้งความยาวของเส้นใย DNA แล้วโย nucleoprotamines ที่อยู่เคียงข้างกันเข้ามาประกบกันจนกลายเป็นแผ่น (lamellar) โดยการยึดของ intermolecular disulfide bondings และในที่สุดแผ่นเหล่านี้จะเรียงซ้อนกันและประกบกันแน่นคล้าย ๆ กับการเรียงตัวของเยื่อ myelin

การหดตัวของโครมาตินทั้ง 2 แบบ (model) ที่พบใน mollusc นี้ น่าจะได้รับการศึกษาในรายละเอียดมากยิ่งขึ้น เนื่องจากมันอาจจะเป็นต้นแบบของการหดตัวของโครมาตินที่เกิดในเซลล์สืบพันธุ์ของสัตว์ชั้นสูงรวมทั้งของมนุษย์ด้วย การศึกษาคุณลักษณะของเบสิกโปรตีน ได้แก่ histones และ protamines ที่มีการเกาะและการแทนที่ซึ่งกันและกัน ก็เป็นอีกวิธีหนึ่ง ที่อาจจะใช้อธิบายการหดตัวของโครมาตินแบบใดแบบหนึ่งได้ นอกจากนั้นแล้วการศึกษาลักษณะโครมาตินของหอย โดยการทำให้ chromatin decondensation และหยุด chromatin spread ลงบนแผ่น grid แล้วตรวจดูโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนหรือ atomic force microscope ก็จะเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สามารถใช้พิสูจน์การหดตัวของโครมาตินแบบใดแบบหนึ่งดังที่กล่าวมาแล้ว ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น ซึ่งจะช่วยให้เราเข้าใจกระบวนการหดตัวของโครมาตินใน mollusc และในสัตว์ชั้นสูงได้ดียิ่งขึ้น

ประการที่สอง การสังเกตด้วย TEM ทำให้เราเข้าใจการพัฒนาของ acrosome ได้ดียิ่งขึ้น โดยพบว่า proacrosomal granules อาจจะถูกสร้างขึ้นตั้งแต่ในระยะ PSc ที่สังเกตเห็นแกรนูลที่บ่งแสงอิเล็กตรอนกระจายอยู่อย่างประปราย แกรนูลเหล่านี้มีการเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยไปจนถึงชั้น SSc ซึ่งมีจำนวนต่อเซลล์มากขึ้นอย่างชัดเจน proacrosomal granules เริ่มจับตัวเป็นก้อนใหญ่ขึ้นในระยะ St<sub>1</sub> และ St<sub>2</sub> จนกลายเป็นก้อนใหญ่เพียงก้อนเดียว ที่เคลื่อนไปประกอบอยู่ด้านหน้าของนิวเคลียสในชั้น St<sub>3</sub> และ St<sub>4</sub> ในที่สุดก้อน acrosomal granule เริ่มเข้าจนกลายเป็น acrosome ที่สมบูรณ์ใน Sz<sub>1</sub> และ Sz<sub>2</sub> ซึ่งเกิดช่องว่างใต้ acrosome ที่เรียกว่า subacrosomal space ซึ่งบรรจุแท่งผลึกของโปรตีนที่เป็นส่วน acrosomal core มีผู้พบว่าในหอยเป่าฮือที่พบในเขตอบอุ่นมี 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 ทำให้เราเข้าใจกระบวนการพัฒนาของระบบทางของ Sz เซลล์ได้ดีขึ้น โดยพบว่าเริ่มมี centriole ตั้งแต่ระยะ St<sub>1</sub> และเริ่มมีการสร้างท่อนางในไซโตพลาสซึมใน St<sub>2</sub> ซึ่งเป็นระยะที่ centriole เคลื่อนมาอยู่ทางด้านท้ายของนิวเคลียส centriole นี้จะกลายเป็นจุดที่กระตุ้นให้ axoneme ของหางเริ่มยาวออกเรื่อย ๆ โดยมีไมโทคอนเดรียกลม ๆ 5 ก้อนเคลื่อนมาอยู่รอบ centriole ซึ่งจะกลายเป็นแหล่งผลิตพลังงานให้กับหาง เมื่อเปรียบเทียบลักษณะหางของเซลล์อสุจิของหอยเป่าอื้อกับหางเซลล์อสุจิใน mollusc ที่มีการปฏิสนธิแบบ internal fertilization และในสัตว์ชั้นสูงแล้ว หางของเซลล์อสุจิในหอยเป่าอื้อมีลักษณะไม่ซับซ้อน มีเยื่อหุ้ม axoneme ตลอดความยาวของหางโดยไม่มี fibrous sheath หุ้ม axoneme อยู่ จึงทำให้เราคิดว่าหางของเซลล์อสุจิในหอยเป่าอื้อน่าจะไม่มีแรงโบกพัดได้น้อย

#### 7.11 การสังเกตลักษณะและการจำแนกชั้นของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียโดยจุลทรรศน์ธรรมดา

การแยกเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในรังไข่ กระทำโดยการใช้ลักษณะของนิวเคลียส โดยเฉพาะการขดของโครมาตินเป็นท่อน lampbrush chromosomes ความเด่นของนิวคลีโอลัส ความทึบแสงของเนื่อนิวคลีโอพลาสซึม และลักษณะของไซโตพลาสซึม ได้แก่ การปรากฏของก้อนไขมัน (lipid droplets) และก้อนไข่ (yolk platelets) จากเกณฑ์ดังกล่าว ทำให้สามารถแยกเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียออกได้เป็น 6 ชั้น คือ oogonia (Og) และ primary oocytes 5 ชั้น (Oc<sub>1</sub>-Oc<sub>5</sub>) ระยะ Og มีลักษณะเช่นเดียวกับ Sg และมักอยู่เป็นกลุ่ม ๆ ที่ด้านฐานของ trabeculae ใน Oc<sub>1</sub> นิวเคลียสมี lampbrush chromosomes อยู่เป็นจำนวนมาก และนิวคลีโอลัสยังเป็นก้อนขนาดเล็กทึบ เนื่อนิวคลีโอพลาสซึมค่อนข้างทึบ จึงทำให้สังเกตเห็นแนวถุงหุ้มนิวเคลียสไม่ชัด ในระยะ Oc<sub>2</sub> นิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น lampbrush chromosomes กระจายออกจากกัน ทำให้เนื่อนิวคลีโอพลาสซึมใสขึ้น ทำให้เห็นแนวของเยื่อหุ้มนิวเคลียสชัดเจนขึ้น นิวคลีโอลัสขยายใหญ่และจางลง ในระยะ Oc<sub>3</sub> lampbrush chromosomes กลายเป็นท่อนสั้น ๆ และมีอยู่จำนวนน้อย โครมาตินส่วนมากกลายเป็น euchromatin เนื่อนิวคลีโอพลาสซึมจึงใสขึ้น ส่วนนิวคลีโอลัสขยายขนาดและโปร่งแสงขึ้น ในระยะ Oc<sub>4</sub> และ Oc<sub>5</sub> นิวเคลียสขยายขนาดขึ้นเต็มที่ โครมาตินทั้งหมดกลายเป็น euchromatin โดยมีเพียงแถบ heterochromatin บาง ๆ ราบอยู่ตามด้านในของถุงหุ้มนิวเคลียส นิวคลีโอพลาสซึมโปร่งแสงเต็มที่ ส่วนนิวคลีโอลัสขยายขนาดใหญ่มากภายในโปร่งแสงเต็มที่และอาจจะติดสี eosin ออกแดง ๆ มากขึ้น

ในไซโตพลาสซึมมีการติดสีน้ำเงินของ hematoxylin และ methylene blue ค่อนข้างเข้มใน Oc<sub>1</sub>, Oc<sub>2</sub> และสีน้ำเงินเริ่มจางลงใน Oc<sub>3</sub>, Oc<sub>4</sub> และ Oc<sub>5</sub> เนื่องจากสีเหล่านี้

แสดงคุณสมบัติ basophilia ของไซโตพลาสซึม จึงสามารถใช้เป็นดัชนีแสดงปริมาณของไรโบโซม ทำให้เราแปลผลว่าไซโตพลาสซึมมีการสร้างไรโบโซมในอัตราสูงในระยะ Oc<sub>1</sub> และ Oc<sub>2</sub> และมีอัตราการสร้างลดน้อยลงในระยะ Oc<sub>3</sub> ถึง Oc<sub>5</sub> ลักษณะการติดสีน้ำเงินที่เปลี่ยนแปลงไปอีกประการหนึ่งคือ ใน Oc<sub>4</sub> และ Oc<sub>5</sub> ขณะที่สีน้ำเงินในไซโตพลาสซึมส่วนใหญ่ลดลง แต่กลับไปปรากฏมีแถบสีน้ำเงินเข้มอยู่ใต้ชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเมื่อศึกษาโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแล้วพบว่าแถบสีน้ำเงินดังกล่าว เกิดจากการสะสมของ cortical granules ก้อนเล็ก ๆ ละเอียดจำนวนมาก ซึ่งก้อนเหล่านี้ติดสีน้ำเงินเช่นเดียวกับไรโบโซม จึงทำให้ปรากฏแถบสีน้ำเงินอยู่ใต้เยื่อหุ้มเซลล์ดังกล่าวแล้ว ก้อน lipid droplets เริ่มปรากฏเป็นหย่อม ๆ ใน Oc<sub>2</sub> และมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ จนกระจายอยู่ทั่วทั้งไซโตพลาสซึมใน Oc<sub>4</sub> และ Oc<sub>5</sub> ส่วนก้อน yolk platelets เริ่มปรากฏใน Oc<sub>3</sub> และมีปริมาณมากขึ้นเรื่อย ๆ จนอาจอัดอยู่เต็มไซโตพลาสซึมในชั้น Oc<sub>4</sub> และ Oc<sub>5</sub> โดยแทรกอยู่ระหว่าง lipid droplets

## 7.12 การศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

การศึกษาโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบ TEM ทำให้เราสังเกตเห็นรายละเอียดของเซลล์ในระยะ Og, Oc<sub>1</sub> ถึง Oc<sub>5</sub> และเข้าใจกระบวนการพัฒนาของเซลล์เหล่านี้ได้ดีขึ้น เราพบว่าในนิวเคลียสของ Oc<sub>1</sub> ถึง Oc<sub>3</sub> 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<sub>3-4</sub> แต่อาจจะแตกต่างกันในเชิงองค์ประกอบของสารโปรตีน โดยใน St<sub>3-4</sub> มีโปรตีนประจุบวกโปรตามีนเป็นโปรตีนโครงสร้าง ซึ่งทำให้ DNA ขดตัวเข้าไปสู่ขนาด 40-60 nm ดังกล่าว ส่วนในนิวเคลียสของเซลล์ Oc ไม่ปรากฏว่ามีโปรตามีนอยู่เลย ดังนั้นการขดตัวของใยโครมาตินเป็นขนาด 40-60 nm จึงคงใช้กลุ่ทร้อยอย่างอื่น 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<sub>1</sub> ถึง Oc<sub>3</sub> และหายไปใน Oc<sub>4</sub> และ Oc<sub>5</sub> ซึ่งเป็นช่วงที่ใยของโครมาตินได้เปลี่ยนสภาพจากระดับ 3 และ 4 ลงมาจนส่วนมากกลายเป็นระดับ 1 โดยมีใยระดับ 2 ปะปน

อยู่บ้าง จากปรากฏการณ์ดังกล่าวทำให้เราคิดว่า transcriptional activities ในนิวเคลียสน่าจะเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ จาก Oc<sub>2</sub> ถึง Oc<sub>5</sub>

นิวคลีโอลัสก็มีการเปลี่ยนแปลงที่เห็นได้ชัดทั้งใน LM และ TEM โดยมันขยายขนาดและโปร่งแสงขึ้นเรื่อย ๆ จากระยะ Oc<sub>2</sub> ถึง Oc<sub>5</sub> นอกจากนั้นใน TEM เรายังสังเกตเห็นการเคลื่อนที่ของนิวคลีโอลัสที่อยู่ส่วนในสุดออกก่อน ทำให้ส่วนนอกของนิวคลีโอลัสปรากฏเป็นวงแหวนที่ล้อมรอบส่วนในที่ค่อนข้างโปร่งแสงอิเล็กตรอน โดยเริ่มปรากฏขึ้นในเซลล์ชั้น Oc<sub>1</sub> ตอนปลาย นอกจากนั้นในระยะ Oc<sub>3</sub> ถึง Oc<sub>5</sub> ตามขอบ ของนิวคลีโอลัสมักมีเส้นใยโครมาตินบาง ๆ ยื่นตรงออกมาจากขอบ จึงทำให้เราคิดว่า nucleolar activities ในเซลล์ชั้นต่าง ๆ เหล่านี้ก็คงมีเพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

การสังเกตด้วย TEM ทำให้สามารถเห็นการเพิ่มของ ribosome ในไซโตพลาสซึมซึ่งเกาะกันเป็นก้อนหรือผลึก RMM อยู่ในไซโตพลาสซึมรอบ ๆ นิวเคลียสของเซลล์ชั้น Oc<sub>1</sub> และ Oc<sub>2</sub> ผลึกเหล่านี้ค่อย ๆ สลายไปใน Oc<sub>3</sub> และไม่พบใน Oc<sub>4,5</sub> จึงทำให้เราคาดว่าในระยะ Oc<sub>1</sub> คงมีการสร้างไรโบโซมที่ถูกส่งออกมาจากนิวเคลียสในอัตราสูงมาก จนกระทั่งสะสมเป็นก้อนหรือผลึกอยู่รวมกัน ต่อจากนั้นในเซลล์ Oc<sub>1</sub> ขึ้นถัดไปไรโบโซมก็จะค่อย ๆ กระจายออกไปสู่ส่วนอื่นของไซโตพลาสซึม เราจึงเรียกเซลล์ชั้น Oc<sub>1</sub> ว่าเป็น Ribosomal phase

ในระยะ Oc<sub>2</sub> มีจำนวน Golgi complex เพิ่มขึ้นมากมายทั้ง ๆ ที่มี secretory granules ปรากฏอยู่น้อยมาก เราจึงเชื่อว่าหลังจากช่วง ribosomal phase แล้วไซโตพลาสซึมของ Oc<sub>2</sub> เตรียมตัวสร้าง secretory granules โดยการพัฒนา Golgi complex และ RER ขึ้นเป็นจำนวนมากกว่าที่พบในเซลล์ชั้นอื่น ๆ เราจึงเรียกเซลล์ชั้น Oc<sub>2</sub> ว่าเป็น Golgi-RER phase

ในระยะ Oc<sub>3</sub> มี secretory granules เกิดขึ้นและสะสมอยู่ใกล้บริเวณ Golgi complex โดยมีแกรนูล 3 ชนิด ชนิดแรกมีขนาดเล็กคือ SG<sub>1</sub> มีขนาด 400-450 nm และเนื้อที่โปร่งแสงอิเล็กตรอน ชนิดที่สองคือ SG<sub>2</sub> มีขนาด 330-370 nm และเนื้อที่ค่อนข้างโปร่งแสงอิเล็กตรอน ส่วนแกรนูลชนิดที่สามคือ yolk platelets ที่เริ่มปรากฏขึ้นแต่ยังมีจำนวนน้อยในขณะเดียวกัน lipid droplets ก็มีปริมาณมากขึ้น เราจึงเรียกเซลล์ชั้นนี้ว่า SG-synthetic phase ซึ่งเป็นช่วงที่เซลล์กำลังสร้างแกรนูลแบบ SG<sub>1</sub> และ SG<sub>2</sub> เป็นหลัก

ในระยะ Oc<sub>4</sub> นอกจากการเปลี่ยนแปลงในนิวเคลียสตามที่กล่าวมาแล้ว ในเซลล์ชั้นนี้มีการสร้าง yolk platelets ขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งอัดอยู่เต็มไซโตพลาสซึมโดยปะปนอยู่กับ lipid droplets SG<sub>1</sub>, SG<sub>2</sub> เคลื่อนไปสะสมอยู่ตามขอบของเซลล์ ในเซลล์ชั้นนี้มีการปล่อยสารใน SG<sub>1</sub> ออกไปสู่ด้านนอกของเซลล์โดยกระบวนการ exocytosis ซึ่งสารดังกล่าวกลายเป็นส่วน



ของ vitelline และ jelly coat เราจึงเรียกเซลล์ชั้นนี้ว่า vitelline-jelly coat phase ซึ่งน่าเป็นชั้นที่มี การสร้างสารเคลือบเซลล์ที่กลายเป็น vitelline-jelly coat เป็นหลัก

ในระยะ Oc<sub>5</sub> เป็นระยะ mature phase เนื่องจากมีการเพิ่ม yolk platelets และ lipid droplets เต็มไซโตพลาซึม 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 ทำให้มัน เปลี่ยนสภาพจาก homogeneous เป็น fibrous และเป็นที่น่าสังเกตว่า vitelline และ jelly coat ไม่มีการแยกออกเป็น 2 ชั้นชัดเจนอย่างที่สังเกตเห็นในหอยเป่าอื้อ species อื่น ๆ

### 7.13 การศึกษาลักษณะจุลกายวิภาคของอวัยวะและรังไข่ของหอยในระบบปิด ซึ่งเปลี่ยนแปลงตามฤดูกาลในรอบ 1 ปี

จากการสังเกตลักษณะจุลกายวิภาคในช่วงต่าง ๆ ของปี เราพบว่าวงจรสืบพันธุ์ ของ gonads แบ่งออกเป็น 5 ช่วงใน 1 รอบปีคือ ช่วง proliferative, premature, mature spawning และ spent โดยช่วง spawning มักเกิดขึ้น 2 ครั้งในหอยตัวเมียคือ ช่วงเดือนมีนาคม ถึงเมษายน และสิงหาคมถึงตุลาคม ตัวผู้มีช่วง spawning ที่ยาวกว่าถึงแม้ว่าจะเกิดในระหว่าง เดือนที่ใกล้เคียงกัน แต่มีตัวผู้บางตัวที่สามารถ spawn ได้เกือบทุกช่วงของปี การค้นพบข้อมูล ดังกล่าวทำให้เราทราบว่า สามารถทำการปฏิสนธิระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ได้สองครั้งในรอบปี และ อาจจะทำการเพาะเลี้ยงลูกหอยได้สองชุดต่อปี ในการเก็บเซลล์สืบพันธุ์นั้นช่วงเวลาที่เหมาะสม สำหรับการให้สารเคมี เช่น egg laying hormones กระตุ้นให้มีการตกไข่และออกไข่ได้มากที่สุด น่าจะเป็นช่วง mature phase ซึ่งเกิดก่อนหน้า spawning phase ซึ่งถ้ากระทำเช่นนั้นได้ก็จะ สะดวกต่อการเก็บเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเพศมาผสมกันโดยขบวนการ artificial fertilization ซึ่งเราสามารถควบคุมได้ง่ายกว่าการผสมตามธรรมชาติ อีกประการหนึ่งการศึกษาวิจัยและพัฒนาวิธี เก็บเซลล์สุจิและเซลล์ไข่โดยกระบวนการแช่แข็ง (cryopreservation) ก็น่าจะเป็นอีกแนวทางหนึ่ง ที่ จะช่วยควบคุมการเก็บเซลล์สืบพันธุ์และการปฏิสนธิได้สะดวกขึ้น ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพ การผลิตลูกหอยให้ตรงกับช่วงความต้องการของเกษตรกรได้ดียิ่งขึ้น

### 7.14 การศึกษาการกระจายของ FSH-like, LH-like Hormones และ Egg Laying Hormones (ELH) ในรังไข่และอวัยวะของหอยเป่าอื้อ

ถึงแม้ว่าจะไม่ได้กำหนดไว้ในแผนการวิจัย แต่เราก็ได้ทำการศึกษาการกระจาย ของฮอร์โมนดังกล่าวในเนื้อเยื่อของอวัยวะและรังไข่ โดยการตั้งสมมุติฐานว่า น่าจะมีฮอร์โมนที่ ควบคุมการพัฒนาและการปล่อยเซลล์ไข่กับเซลล์สุจิอยู่ในเนื้อเยื่อของ gonads โดยฮอร์โมน

เหล่านี้อาจจะถูกส่งมาจากปมประสาทต่าง ๆ แล้วไปเกาะในเนื้อเยื่อของ gonads หรือ gonads เองอาจจะมียูโทรฟินที่สร้างฮอร์โมนเหล่านี้ก็ได้

การทดลองในเบื้องต้นพบว่า มีการกระจายของ LH-like hormones ในรังไข่ ในปริมาณค่อนข้างสูง โดยพบว่ามีฮอร์โมนชนิดนี้อยู่ใน oocytes ขั้นต่าง ๆ โดยเฉพาะ oocytes ขั้นต้น ๆ เช่น Oc<sub>2</sub>, Oc<sub>3</sub> และในแกนของ trabeculae ส่วนหลักฐานของการมี FSH-like hormones ไม่ค่อยหนักแน่น เนื่องจากมีการติดสีค่อนข้างจางทั้งในเซลล์สืบพันธุ์และในแกน trabeculae ในทางตรงกันข้ามพบว่าแอนติบอดีต่อ ELH (ที่ได้รับจากการบริจาคว่า Professor Peter Hanna แห่งมหาวิทยาลัย Deakin ประเทศออสเตรเลีย ซึ่งเป็นที่ปรึกษาของโครงการ) ติดเซลล์ใน trabeculae และ capsule ของรังไข่เข้มมาก จึงแสดงว่ามี ELH กระจายอยู่ในแผ่น trabeculae และ capsule ในปริมาณที่สูง และมีความเป็นไปได้มากที่จะค้นพบเซลล์กลุ่มใดกลุ่มหนึ่งใน trabeculae ซึ่งเป็นตัวสร้างฮอร์โมนชนิดนี้ จากการศึกษาในระดับจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนในเบื้องต้น เราคาดว่าน่าจะเป็นกลุ่ม granulated cells ที่เกาะอยู่เป็นกระจุก ๆ ในส่วนกลางของ trabeculae นอกจากนั้นแล้วอาจจะตั้งคำถามต่อไปว่าฮอร์โมน LH กับ ELH เหมือนกันหรือไม่ เนื่องจากฮอร์โมนทั้งสองชนิดควบคุมการตกไข่ในสัตว์ซึ่งถึงแม้จะอยู่ใน phylum ต่างกันก็ตาม ฮอร์โมนทั้งสองชนิดก็มีบทบาทในการกระตุ้นการพัฒนาของไข่กับการปล่อยเซลล์ไข่ที่พัฒนาเต็มที่แล้วออกจากรังไข่เช่นเดียวกัน คำถามเหล่านี้ล้วนแต่เป็นประเด็นที่น่าสนใจ ซึ่งน่าจะได้รับการศึกษาต่อไป

#### 7.15 การพัฒนาของระบบประสาท

การศึกษากการพัฒนาของปมประสาทในหอยอายุต่าง ๆ กัน พบว่าการพัฒนาของปมประสาท cerebral มีจุดเปลี่ยนแปลงที่ชัดเจนเมื่อหอยมีอายุได้ 5 เดือน โดยปรากฏว่ามีจำนวน NS เซลล์เพิ่มขึ้นอย่างเห็นได้ชัด และเริ่มมีการผลิตแกรนูโลที่แสดงออกโดยการติดสี CA และ PF จำนวน NR<sub>1</sub> ก็เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนด้วย จุดเปลี่ยนแปลงจุดที่ 2 คือเมื่อหอยมีอายุได้ 10 เดือน ซึ่งเป็นระยะที่เซลล์ NS และ NR<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> มาก ทั้ง ๆ ที่มหาวิทยาลัยของระบบประสาทได้พัฒนาเกือบเต็มที่แล้ว 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., Cornudella, 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 Guernier, 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 Hylleberg, 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 Heenkhuizen, 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 ganglionic 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 23<sup>rd</sup> 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 23<sup>rd</sup> 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 24<sup>th</sup> 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 3<sup>rd</sup> International Abalone Symposium, 26-31 October 1997, Monterey, California, USA. pp.90.

### **The 5<sup>th</sup> 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 5<sup>th</sup> 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 5<sup>th</sup> 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 อภิเศกตานต์, 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 จันทร์ภู, 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) ของหอยเป่าฮื้อจากหน่วยงานต่าง ๆ คือ

### 9.4.1 ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

รศ.ดร. ชัยทิพย์ วณิชานนท์

### 9.4.2 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

ศ.ดร. สุชาติ อุปถัมภ์

ศ.ดร. มาลียา เครือตราชู

รศ.ดร. เยาวลักษณ์ จิตรามงคล

### 9.4.3 ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รศ.ดร. เมติศักดิ์ จารยะพันธุ์

### 9.4.4 ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ ม.ศรีนครินทรวิโรฒ

ผศ.ดร. วิภาวี อนุพันธ์พิสิฐ

### 9.4.5 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม.บูรพา

อ.ดร. อัมพร ทองกู่เกียรติกุล

### 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 23<sup>rd</sup> 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 23<sup>rd</sup> 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 24<sup>th</sup> Congress on Science and Technology of Thailand, 19-20 October 1998, Bangkok. pp.682-683.

# การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย 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





ชื่อ-สกุล ผู้เขียนงานวิจัย อัมพร ทองแก้วเกียรติกุล

สาขาวิชา:

☐ นาย ☒ น.ส. ☐ นาง ☐ ดร. ☐ อ. ☐ ผศ. ☐ รศ. ☐ ศ.☐ กายภาพ ☐ เกษตร☒ ชีวภาพ ☐ วิศวกรรม

ที่ทำงาน ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

☐ วิทยาศาสตร์ ☐ ทรัพยากร-แวดล้อม

โทร. 038-390060

☐ แพทย์ ☐ ทัวไปIDENTIFICATION 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, Prachuabkhiran 77000.\*

Various types of cells in cerebral and pleuro-pedal ganglia of *Haliotis asinina* Linnaeus 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<sub>1</sub> with round or oval cell soma and nucleus (about 20  $\mu$ m and 10  $\mu$ m, respectively). The nucleus contain mostly euchromatin and prominent nucleolus, with only a thin rim of heterochromatin along nuclear envelope. NS<sub>2</sub> is about 12  $\mu$ m in size. Its heterochromatin increases and turns into blocks that are distributed in a clock-face pattern. NS<sub>3</sub> is the smallest NS with cell and nuclear diameters about 10  $\mu$ m and 6  $\mu$ m. 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-fuchsin. While NS<sub>1</sub> and NS<sub>2</sub> are numerous in the cortex of the two ganglia, NS<sub>3</sub> 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<sub>1</sub> is the giant neuron about 40  $\mu$ m in size. They are more numerous and larger in pleuro-pedal ganglia. NR<sub>2</sub>, NR<sub>3</sub>, NR<sub>4</sub> are round to oval-shaped cell with much smaller sizes, ranging from 6  $\mu$ m to 3  $\mu$ m. Their nuclei contain increasing amount of heterochromatin and appear completely dense in NR<sub>3</sub>. NR<sub>4</sub> could only be observed in pleuro-pedal ganglia. Neuroglia consists of 3 types of cells : NG<sub>1</sub>, NG<sub>2</sub> and NG<sub>3</sub> which are spindle-shaped cells with nuclei about 3-6  $\mu$ m. Their heterochromatin ranges from fairly dense in NG<sub>1</sub> to dense in NG<sub>3</sub>. NG<sub>1</sub> and NG<sub>2</sub> could provide parts of blood-brain barrier and general support for NS and NR in the cortex ; while NG<sub>3</sub> 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)

การค้นพบชนิดของเซลล์ประสาทชนิดฮอร์โมน เซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทที่เชื่อมในปมประสาท cerebral และ pleuro-pedal ของหอยเปาชื่อ *Haliotis asinina*, Linnaeus.

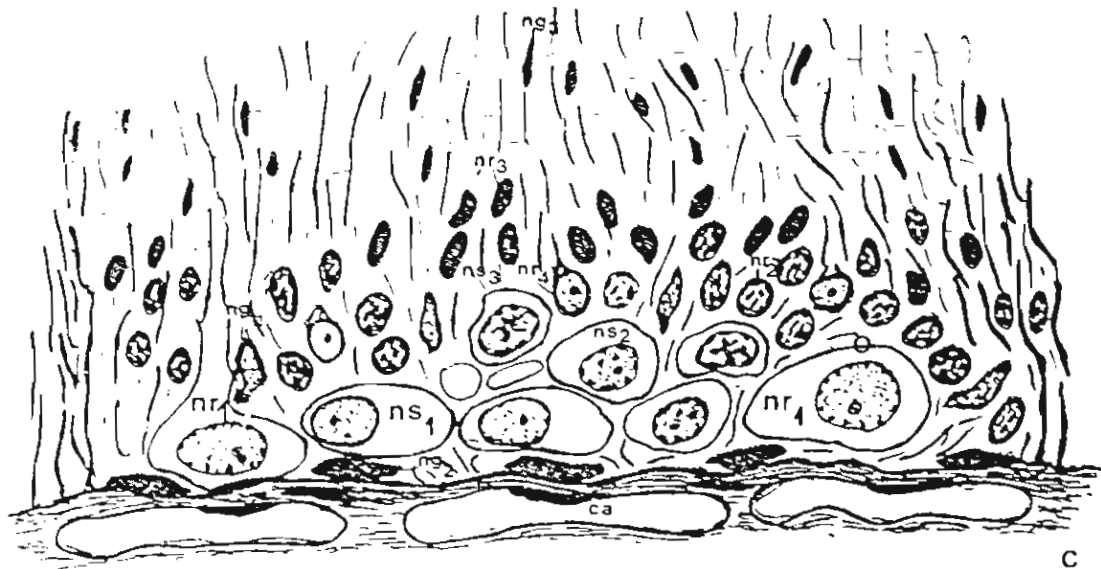
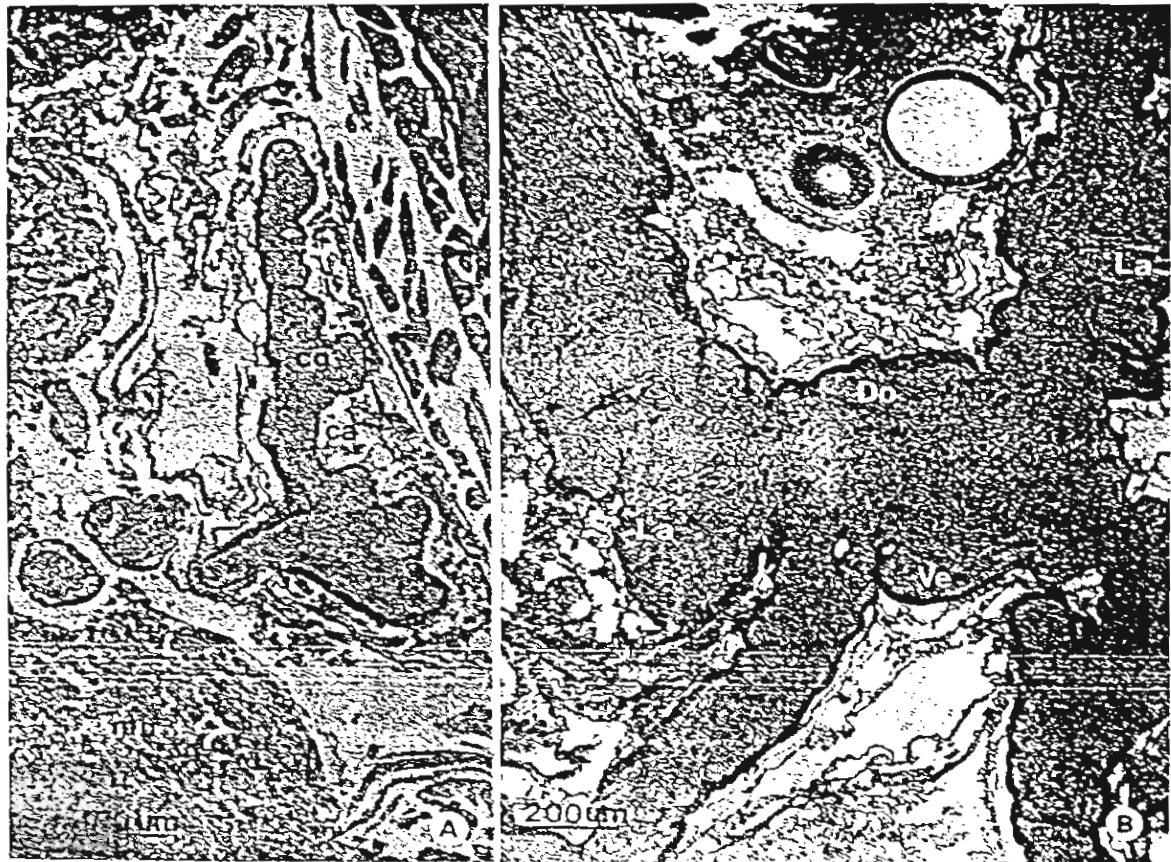
อัมพร ทองแก้วเกียรติกุล ประเสริฐ ไสยกุล สมใจ อภิเศกถนอม ชัยทิพย์ วณิชานนท์ วิชัย ถิ่นทอง นาดิยา เกียรติราช สุชาติ อุปลัมภ์ และ ธนยศ หุ่นทอง\*

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ถนนพระราม 6 กรุงเทพมหานคร 10400 และศูนย์ประมงชายฝั่ง จ.ประจวบคีรีขันธ์ 77000\*

เซลล์ประสาทชนิดฮอร์โมน (Neurosecretory cell - NS) เซลล์ประสาท (Neurons - NR) และเซลล์ประสาทที่เชื่อม (Neuroglia - NG<sub>1</sub>) เป็นเซลล์หลักของชั้น cortex ของปมประสาท cerebral และ pleuro pedal. จากการศึกษาค้นคว้าด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาโดย การย้อมสีพิเศษ เราสามารถแยกเซลล์ NS ออกได้เป็น 3 ชนิด เซลล์ NR 4 ชนิด และ NG 3 ชนิด ตามขนาดของเซลล์ ลักษณะการ จัดตัวของโครมาตินในนิวเคลียสและการจัดตัวของไซโตพลาสซึม

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สัญญาเลขที่ BRG/04/2540)

ชื่อเรื่อง (ไทย) การจำแนกชนิดของเซลล์ประสาทชนิดกอร์โมน เซลล์ประสาทและเซลล์ประสาทที่เลี้ยงในปมประสาท cerebral และ pleuro-pedal ของหอยเปาชื่อ *Haliotis asinina*, Linneaus.



- [1] A. ภาพการผ่าดูเนื้อเยื่อประสาทบริเวณสมองและเส้นประสาทของหอยเปาในปมประสาท cerebral โครงสร้างที่เห็นแสดงในภาพได้แก่ nr - cerebral ganglion, nr - neuron, ca - หลอดเลือด
- [2] B. ภาพการผ่าดูเนื้อเยื่อประสาทของหอยเปาในปมประสาท pleuro-pedal ที่เลี้ยงด้วย Gerson และเซลล์ประสาท (La) รอยบน (Do) และรอยล่าง (Ve) ซึ่ง cortex มีรอยบนและรอยบนหน้า (ca) cortex ที่รอยล่าง
- [3] C. ภาพวาดของชั้น cortex และ medulla ของปมประสาท cerebral และ pleuro-pedal แสดงเซลล์ประสาทชนิดกอร์โมน 3 ชนิด คือ ns, ns<sub>2</sub>, ns<sub>3</sub> เซลล์ประสาท 4 ชนิด คือ nr<sub>1</sub>, nr<sub>2</sub>, nr<sub>3</sub>, nr<sub>4</sub> กับเซลล์ neuroglia 3 ชนิด คือ ns<sub>1</sub>, ns<sub>2</sub>, ns<sub>3</sub>

ชื่อ-สกุล ผู้วิจัยงานวิจัย สมใจ อภิเศกถนาค

สาขาวิชา:

☐ นาย ☒ น.ส. ☐ นาง ☐ ดร. ☐ อ. ☐ ผศ. ☐ รศ. ☐ ศ.☐ กายภาพ ☐ เกษตร☒ ชีวภาพ ☐ วิศวกรรม

ที่ทำงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

☐ วิทยาศาสตร์ ☐ ทรัพยากร-แวดล้อม

โทร. 2460063 คอ 2202

☐ แพทย์ ☐ ทั่วไปTHE 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 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 spermatogenic 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* Linnaeus

สมใจ อภิเศกถนาค ประเสริฐ ไชยอน อัมพร ทองภูเกียรติกุล ชัยสิทธิ์ วณิชานนท์ วิชัย ลันทอง มาลีอา เครือขวาง

สุชาติ อุปลันท์ และ จินตนา นักรณาค\*

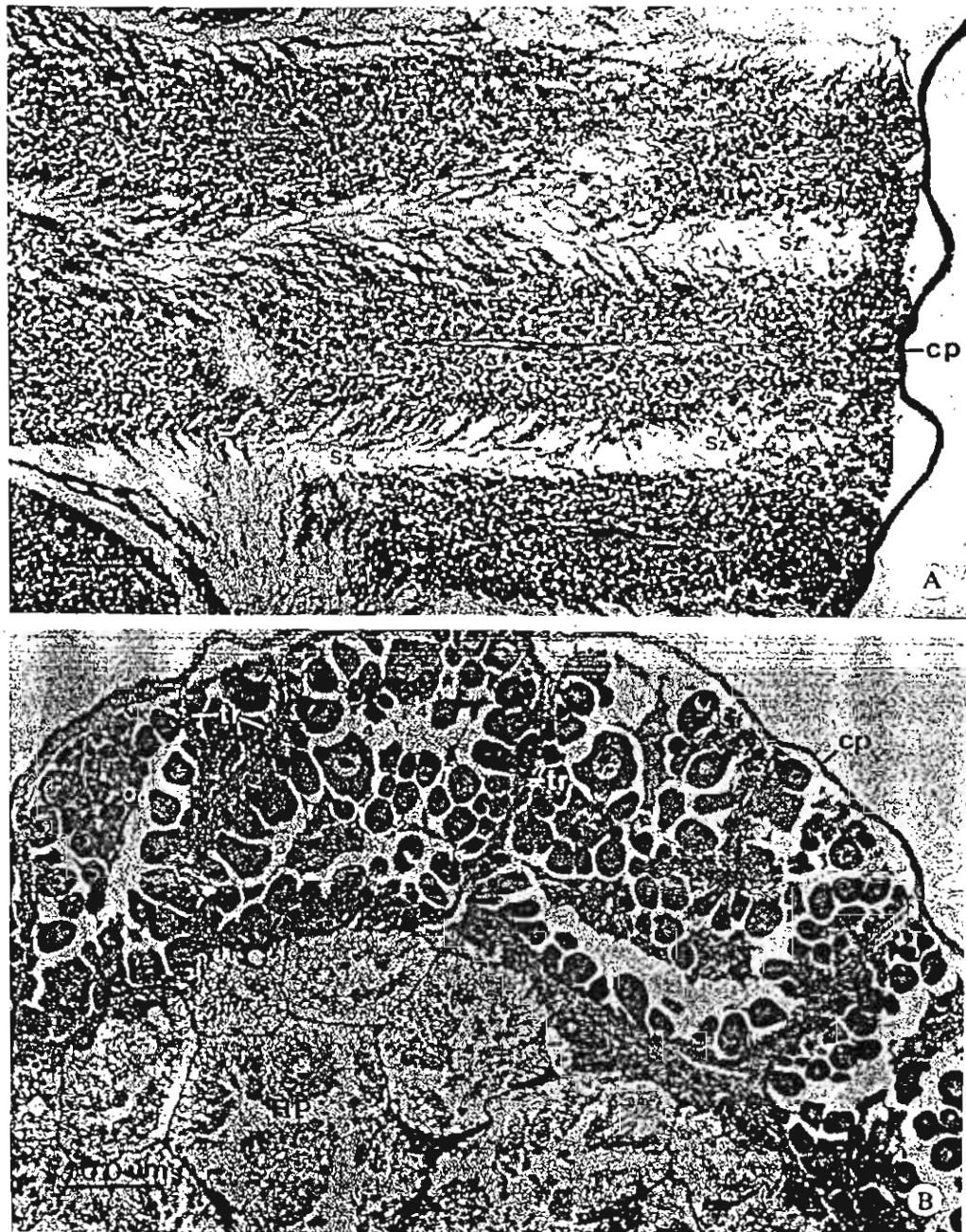
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพมหานคร 10400 และศูนย์ประมงชายฝั่ง จ.ประจวบคีรีขันธ์ 77000\*

อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อที่ผลิตเซลล์สืบพันธุ์ คือ รังไข่และอัณฑะซึ่งมีถุงหุ้ม เมื่อเกี่ยวพันจากถุงหุ้มแทรกเข้าไปในรังไข่ และอัณฑะเป็นแผง trabeculae ที่มีเซลล์สืบพันธุ์ขึ้นต้นและขึ้นปลายหุ้มอยู่รอบ ๆ ในรังไข่เซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วย 6 ระยะ คือ oogonium, primary oocytes ขั้นที่ I, II, III, IV และ V ซึ่งมีความแตกต่างกันตามปริมาณไขมันและสารไข่ (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 เซลล์สืบพันธุ์ขึ้นปลายจะถูกปล่อยออกมาพร้อมกับการสลายตัวของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันภายในรังไข่และอัณฑะ คงเหลือเฉพาะ gonial cells ที่ยังติดอยู่กับผนังของถุงหุ้ม ช่วง spawning และ spent phase เกิดความเคืองหงายจนถึง กันชอน ส่วนช่วง proliferative ถึง mature phase ดำเนินไประหว่างเดือนตุลาคม ถึง มิถุนายน

รายงานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สัญญาเลขที่ BRG/04/2540)

รื้อเรื่อง (ไทย) กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเปาชื่อ *Haliotis asinina* Linnaeus



รูป A ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะ ซึ่งมีถุงหุ้ม (capsule - cp) trabeculae (tr) มีเซลล์สืบพันธุ์เพศชาย ระยะต่าง ๆ ห่อหุ้ม trabecula แต่ละอัน ซึ่งเรียกว่า spermatogenic unit

รูป B ลักษณะทางจุลกายวิภาคของรังไข่ ซึ่งมีถุงหุ้ม (cp) trabeculae (tr) รังไข่ห่อหุ้มรอบ hepatopancreas (hp) เช่นเดียวกับอวัยวะ มีเซลล์ oogonia และ oocyte ระยะต่าง ๆ ห่อหุ้ม trabecula แต่ละอัน ซึ่งเรียกว่า oogenic unit

# การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย 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



ชื่อ สกุล ผู้เขียนงานวิจัย สมใจ อภิเศกทณนที

สาขาวิชา

[ ] นาย [x] นส. [ ] นาย [ ] คร. [ ] อ. [ ] ผศ. [ ] รศ. [ ] ศ.

ประเภทงาน [x] ชิ้นงาน

ที่ทำงาน ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล

ประเภท [x] วิทยานิพนธ์

ถนนพระราม 6 พญาไท กทม 10400 โทร 2460063 คอ 2202

ประเภท [x] วิทยานิพนธ์

วิทยานิพนธ์ [x] วิทยานิพนธ์

REPRODUCTIVE CYCLE AND DEVELOPMENT OF GONADS IN *HALIOTIS ASININA* LINNAEUSSomjai Apisawetakan<sup>1</sup>, Malee Chanpoo<sup>1</sup>, Chaitip Wanichanon<sup>1</sup>, Vichai Linthong<sup>1</sup>, Padermsak Jarayabhand<sup>1</sup>, Maleeya Kruatrachue<sup>2</sup>, Suchart Upatham<sup>2</sup> and Prasert Sobhon<sup>1</sup>.Departments of Anatomy<sup>1</sup> and Biology<sup>2</sup>, Faculty of Science, Mahidol University and Department of Marine Science<sup>3</sup>, 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, gonial cells appear at 5 months. Spermatocytes and early oocytes (Oc<sub>1-3</sub>) occur at 5-7 months, while spermatids, spermatozoa and mature oocytes (Oc<sub>4-5</sub>) 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)

วรรณกรรมสืบพันธุ์และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเปาชื่อ *Haliotis asinina* Linnaeus

สมใจ อภิเศกทณนที<sup>1</sup>, มาลี จันทร์ภู<sup>1</sup>, ชัยทิพย์ วณิชานนท์<sup>1</sup>, วิชัย ลินทอง<sup>1</sup>, เพ็ญศักดิ์ จารยะพันธ์<sup>1</sup>, มาลีเยา เครือศรีราช<sup>2</sup>, สุชาติ อุปัทมภ์<sup>2</sup> และ ประเสริฐ โสภณ<sup>1</sup>

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์และชีววิทยา<sup>1</sup> คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ถนนพระราม 6 กรุงเทพฯ 10400,

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล<sup>2</sup> คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท กรุงเทพฯ 10330

ในระหว่างระยะเวลา 1 ปี ปริมาณและชนิดของเซลล์สืบพันธุ์รวมทั้งลักษณะทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเปาชื่อ *H. asinina* ที่เลี้ยงในระบบ land-based จะเปลี่ยนแปลงไปตามช่วงของวงจรสืบพันธุ์ (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 ส่วนในอวัยวะเพศประกอบด้วย spermatogonia และ spermatocytes ในช่วง mature phase จะพบเซลล์สืบพันธุ์ขั้นปลายเป็นส่วนใหญ่คือ oocytes ขั้นที่ IV และ V ในรังไข่ spermatids และ spermatozoa ในอวัยวะเพศ ในช่วง spawning phase จะมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ที่โตเต็มที่แล้วออกสู่ภายนอก พบว่า spawning phase ของหอย *H. asinina* ที่เลี้ยงในระบบปิดเกิดขึ้น 2 ครั้ง คือในช่วงเดือนมีนาคมถึงเมษายน และช่วงเดือนสิงหาคมถึงตุลาคม โดยพบว่าตัวผู้มีการขยายเวลา spawn ออกไปได้อีกเล็กน้อย และบางครั้งพบการปล่อยของเซลล์สืบพันธุ์อย่างสมบูรณ์พร้อมกับการสลายตัวของเยื่อเกี่ยวพันภายในรังไข่และอวัยวะเพศ โดยเรียกลักษณะเช่นนี้ว่า spent phase หลังจากช่วง spawning และ spent phase แล้ว การสร้างและพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์รอบใหม่จะเกิดขึ้นและดำเนินต่อไปทันที โดยพบว่าแต่ละรอบจะใช้เวลาประมาณ 5 ถึง 6 เดือน

อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยจะเริ่มปรากฏตั้งแต่อายุประมาณ 4 เดือน เซลล์สืบพันธุ์ระยะต้นได้แก่ oocytes (Oc<sub>1-3</sub>) และ spermatocytes พบได้เมื่ออายุถึง 7 เดือน ในขณะที่เซลล์สืบพันธุ์ระยะปลายคือ mature oocytes (Oc<sub>4-5</sub>), spermatids และ spermatozoa เกิดขึ้นเมื่ออายุ 10 ถึง 11 เดือน ในที่สุดหอยจะเข้าสู่วัฏจักรเจริญพันธุ์และพัฒนาเข้าสู่วงจรการสืบพันธุ์อย่างสมบูรณ์เมื่ออายุประมาณ 1 ปี

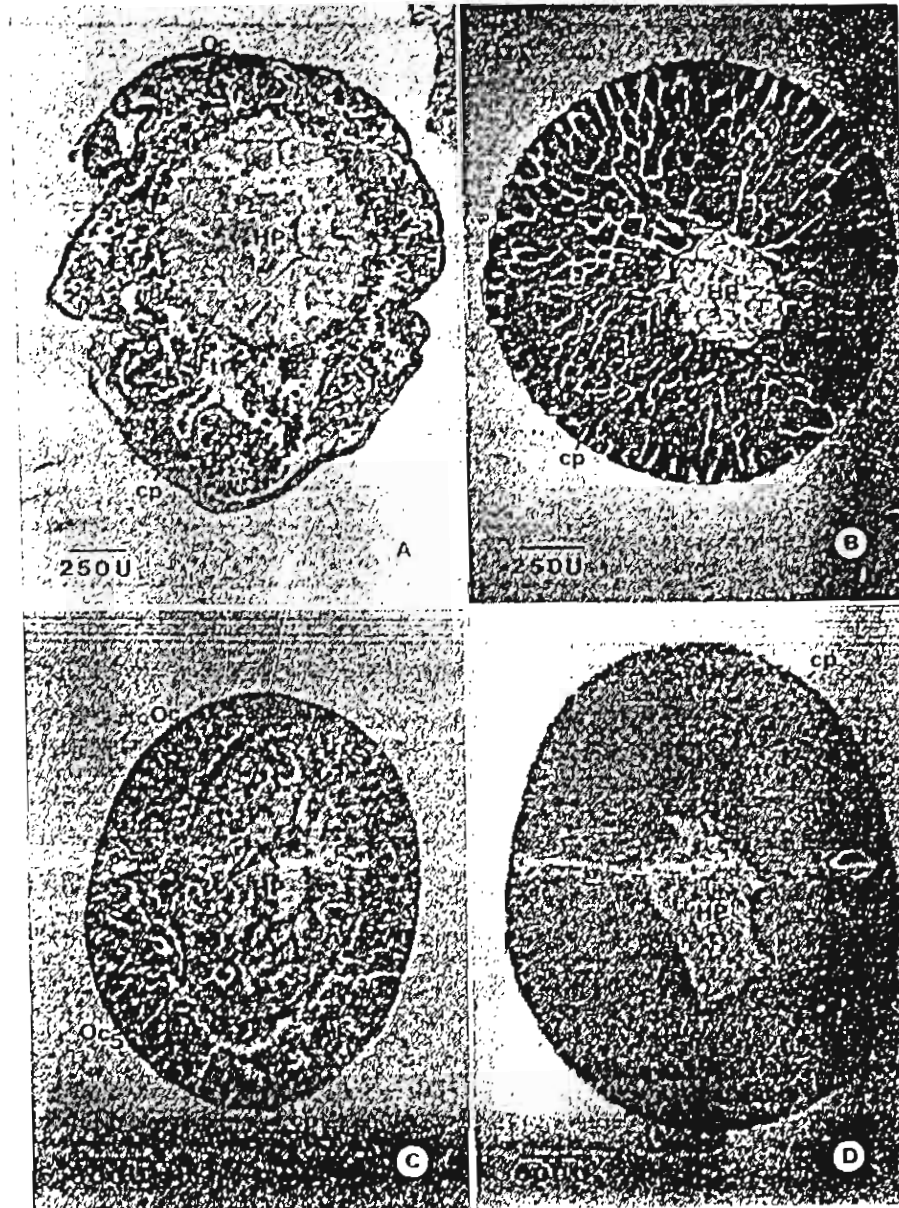
งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สัญญาเลขที่ BRG4080004)

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



ชื่อย่อ: (ไทย)

วงจรการสืบพันธุ์และการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina*  
Linnaeus



คำอธิบาย: ภาพจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (reproductive cycle) ของหอยเป๋าฮื้อ *Haliotis asinina* (Sc, spermatocyte; Sz, spermatozoa; Oc, oocyte; Ck, cap; V, vacuole; HP, hepatopancreas; Tr, trabeculae; cp, caprile)

รูป A: สเปิร์มโทไซต์ในระยะ: premature phase

รูป B: สเปิร์มโทไซต์ในระยะ: premature phase

รูป C: สเปิร์มโทไซต์ในระยะ: mature phase

รูป D: สเปิร์มโทไซต์ในระยะ: 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

Rottneest 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  $\mu\text{m}$  in diameter); (b) medium cells with light nuclei (6  $\mu\text{m}$  in diameter); (c) small cells with light nuclei (5  $\mu\text{m}$  in diameter); (d) very small pyriform cells with dense nuclei (4-7  $\mu\text{m}$  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 neuropile. 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 3<sup>rd</sup> International Abalone Symposium, 26-31 October 1997, Monterey, California, USA. pp.90.

# **THIRD INTERNATIONAL ABALONE SYMPOSIUM**



**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  $\mu\text{m}$  in size, and with an eccentric nucleus (diameter about 8  $\mu\text{m}$ ). Under light microscopy, the cytoplasm is stained reddish-purple with chrome hematoxylin phloxine and green with paradehyde fuschin. Under the transmission electron microscope the cytoplasm exhibits abundant RER, mitochondria, Golgi complexes, and granules about 60-160 nm in diameter. The nucleus contains mostly euchromatin, and a prominent nucleolus. Type B cell has a round shape about 10-15  $\mu\text{m}$  in size, and an eccentric nucleus (6  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  in size, with nucleus about 4-5  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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 5<sup>th</sup> 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 5<sup>th</sup> 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 5<sup>th</sup> Asian Fisheries Forum International Conference on Fisheries and Food Security Beyond the Year 2000, 11-14 November 1998, Chiang Mai. pp.21.

# The 5<sup>th</sup> 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,<sup>1</sup> Somjai Apisawetakan<sup>1</sup>, Malee Chanpoo<sup>1</sup>, Chaitip Wanichanon<sup>1</sup>, Vichai Linthong<sup>1</sup>, Amporn Thongkukiatkul<sup>3</sup>, Padermsak Jarayabhand<sup>4</sup>, Maleeya Kruatrachue<sup>2</sup> and Suchart Upatham<sup>3</sup>.  
Departments of Anatomy<sup>1</sup> and Biology<sup>2</sup>, Faculty of Science, Mahidol University, Department of Biology<sup>3</sup>, Faculty of Science, Burapha University, and Department of Marine Science<sup>4</sup>, 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<sub>1</sub> with light to intense basophilia and abundant polyribosomes, with some in large aggregates; Oc<sub>2</sub> with intense basophilia, oil droplets, numerous well developed Golgi complexes and rough endoplasmic reticulum, but little secretory granules; Oc<sub>3</sub> with a few primary yolk granules and 2 types of cortical granules; Oc<sub>4</sub> with increasing number of secondary yolk granules, numerous cortical granules and thin jelly coat; and Oc<sub>5</sub> is the mature ovum with 2 types of yolk granules, numerous cortical granules and fully formed jelly coat. The cells in spermatogenic 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<sub>1,3</sub> and spermatocytes, while mature phase contains mainly late stage cells, i.e., oocytes<sub>4,5</sub> 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 4<sup>th</sup> month. Histologically, gonial cells appear at 5 months, when sexual differentiation could be distinguished. Early spermatocytes and oocytes (Oc<sub>1,2</sub>) 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<sub>4,5</sub>) 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<sup>1</sup>, Prasert Sobhon<sup>1</sup>, Somjai Apisawetakan<sup>1</sup>, Malee Chanpoo<sup>1</sup>, Chaitip Wanichanon<sup>1</sup>, Amporn Thongkukiatkul<sup>2</sup>, Padermsak Jarayabhand<sup>3</sup>, Maleeya Kruatrachue<sup>2</sup> and Suchart Upatham<sup>1</sup>.

Departments of Anatomy<sup>1</sup> and Biology<sup>2</sup>, Faculty of Science, Mahidol University, Department of Biology<sup>3</sup>, Faculty of Science, Burapha University, and Department of Marine Science<sup>4</sup>, 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  $\mu\text{m}$ . 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  $\mu\text{m}$  from LSc to PSc; then their sizes gradually decrease from 10-7  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{m}$  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<sub>1</sub> is a large round cell (about 6  $\mu\text{m}$ ), and its nucleus contains evenly dispersed 30 nm chromatin fibers. In St<sub>2</sub> 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<sub>3</sub> the nucleus becomes elongated with individual chromatin fibers enlarged to 40 nm and packed tightly together. In St<sub>4</sub> (about 3  $\mu\text{m}$ ) 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  $\mu\text{m}$ ) 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.

## Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology

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.

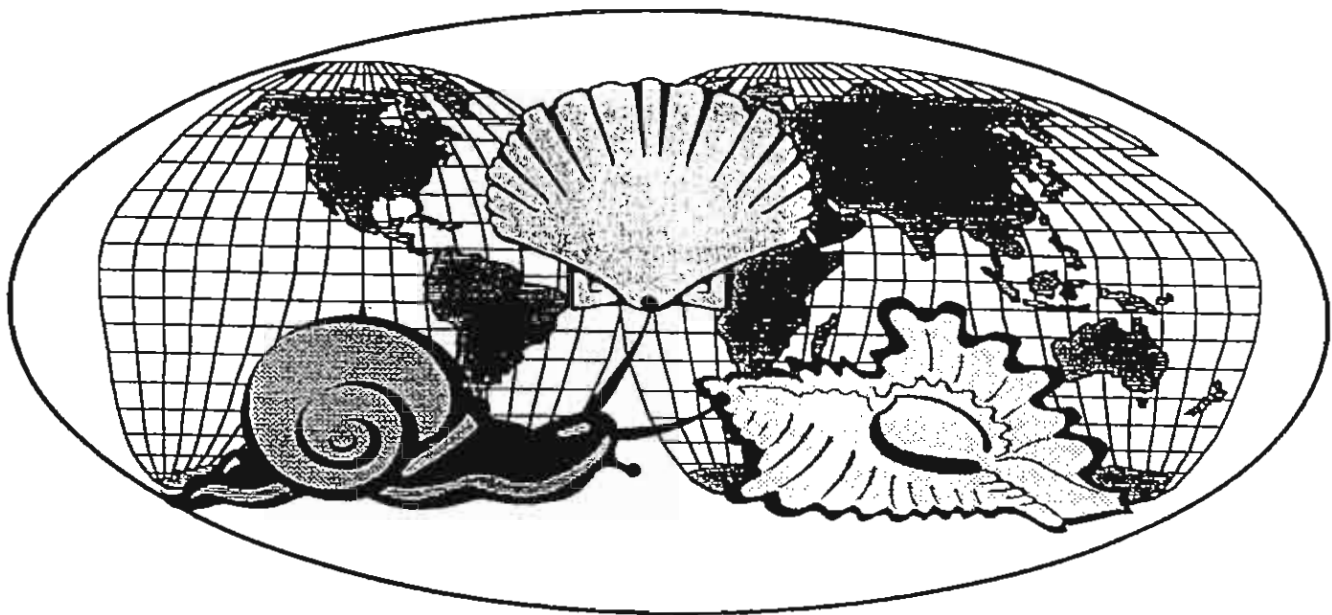
10.1.12 Kruatrachue, M., Thongkukiatkul, A., Sobhon, P., Upatham, E.S., Wanichanon, C. and Linthong, V. Ultrastructural study of the cerebral ganglion of Thai abalone *Haliotis asinina* Linnaeus. Presented at Fifth International Congress on Medical and Applied Malacology, 27-30 December 1998, Chiang 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<sup>1</sup>, E.S.Upatham,<sup>2</sup> P. Sobhon<sup>3</sup>, C. Wanichanon<sup>3</sup>, M. Kruatrachue<sup>2</sup> and T. Punthong<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

<sup>2</sup>Departments of Biology and <sup>3</sup>Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>4</sup>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<sub>1-3</sub>), four types of neurons (NR<sub>1-4</sub>) and three types of neuroglia (NG<sub>1-3</sub>). NS<sub>1-3</sub> contain round nuclei with three different patterns of heterochromatization and neurosecretory granules in the cytoplasm. NR<sub>1-4</sub> do not have neurosecretory granules. NR<sub>1</sub> are giant neurons with oval or pyramidal shape. NR<sub>2-4</sub> are small neurons with oval bodies and nuclei, and they are the majority of neuronal cells in the cortex of the ganglia. NG<sub>1-3</sub> are spindle-shaped cells containing similar shaped nuclei. NG<sub>1</sub> and NG<sub>3</sub> are the main neuroglia of the cortex and medulla of the ganglia, respectively, while NG<sub>2</sub> are a part of the blood-nerve barrier that borders the connective tissue capsule of the ganglia.

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

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

P. Sobhon<sup>1</sup>, S. Apisawetakan<sup>1</sup>, V. Linthong<sup>1</sup>, C. Wanichanon<sup>1</sup>, M. Kruatrachue<sup>2</sup>, E.S. Upatham<sup>2</sup>, M. Chanpoo<sup>1</sup> and P. Jarayabhand<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departments of Anatomy and <sup>2</sup>Biology, Faculty of Science, Mahidol University Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup>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<sub>1-5</sub>). 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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> 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<sub>1</sub> is the abundance of ribosomes, some of which are packed tightly in ribosome microtrabecular mass (RMM) around the nuclear envelope. Oc<sub>2</sub> 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<sub>1</sub> and SG<sub>2</sub> (330 and 450 nm) with electron-lucent and dense matrix; and a significant number of lipid droplets. Oc<sub>3</sub> is a flask-shaped cell that starts to detach from a trabecula, with 35x70 µm in size. Lampbrush chromosomes are almost completely unraveled. SG<sub>1</sub> and SG<sub>2</sub> are increasing in number and cluster around GC. Large and electron-dense yolk granules (YG) start to appear. Oc<sub>4</sub> 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<sub>1</sub> and SG<sub>2</sub> which are translocated to area underneath the plasma membrane. Oc<sub>5</sub> is similar to Oc<sub>4</sub> except its VJC achieves maximum width and appearing fibrous in comparison to the amorphous appearance in Oc<sub>4</sub>.

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<sup>1</sup>, S. Apisawetakan<sup>2</sup>, E.S.Upatham<sup>1</sup>, P.Sobhon<sup>2</sup>, S. Singhakaew<sup>1</sup>, S. Sawatpeera<sup>3</sup>, V. Ingsrisawang<sup>4</sup> and T. Singhagraiwan<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departments of Biology and <sup>2</sup>Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup>Institute of Marine Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

<sup>4</sup>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<sup>1</sup>, A. Thongkukiatkul<sup>2</sup>, P. Sobhon<sup>3</sup>, E.S. Upatham,<sup>1</sup> C. Wanichanon<sup>3</sup> and V. Linthong<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departments of Biology and <sup>3</sup>Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>2</sup>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<sub>1-3</sub>), four types of neurons (NR<sub>1-4</sub>) and three types of neuroglia (NG<sub>1-3</sub>). NS<sub>1</sub> 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<sub>2</sub> possesses large and membrane-bound granules (~ 500-800 nm is diameter). NS<sub>3</sub> contains abundant electron-dense osmiophilic globules in aggregates. NS<sub>1</sub> and NS<sub>2</sub> contain numerous organelles characterizing them as active secretory cells. NR<sub>1</sub> is the giant neuron that contains numerous mitochondria, stacks of rough endoplasmic reticulum and a few small secretory granules, while NR<sub>2-4</sub>, are small neurons that do not contain many organelles and neurosecretory granules. NG<sub>1-3</sub> 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<sup>1</sup>, A. Thongkukiatkul<sup>2</sup>, Y. P. Chitramvong<sup>1</sup>, P.Sobhon<sup>3</sup>, V. Linthong<sup>3</sup>, M. Kruatrachue<sup>1</sup>, C. Wanichanon<sup>2</sup> and J. Nugranad<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Departments of Biology and <sup>3</sup>Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>2</sup>Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

<sup>4</sup>Coastal Aquaculture Development Center, Prachuap Khiri Khan 77000, Thailand

The fine structures of cells in the pleuro-pedal ganglion of *Haliotis asinina* were studied by transmission electron microscopy. There are ten types of cells in the pleuro-pedal ganglion: three types of neurosecretory cells (NS<sub>1-3</sub>), four types of neurons (NR<sub>1-4</sub>) and three types of neuroglia (NG<sub>1-3</sub>). NS<sub>1</sub> contains small round secretory granules (~ 125 nm in diameter) with moderate to dense matrix. NS<sub>2</sub> contains small spherical secretory granules (~ 165 nm in diameter) with dense matrix, while NS<sub>3</sub> contains large electron-dense osmiophilic globules in large aggregates. These neurosecretory cells contain abundant rough endoplasmic reticulum, Golgi complexes, mitochondria and polyribosomes. NR<sub>1</sub> is the giant neuron that contains numerous mitochondria, stacks of rough endoplasmic reticulum and a few small secretory granules. NR<sub>2-4</sub> are smaller oval shaped cells whose cytoplasm is relatively thin with sparing amount of rough endoplasmic reticulum, mitochondria and polyribosomes. NG<sub>1-3</sub> 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<sup>1</sup>, A. Thongkukiatkul<sup>2</sup>, P. Laimek<sup>1</sup>, V. Anupunpisith<sup>3</sup>, E.S.Upatham<sup>2</sup>,  
M. Kruatrachue<sup>2</sup> and C. Wanichanon<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departments of Anatomy and <sup>2</sup>Biology, Faculty of Science, Mahidol  
University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup>Department of Anatomy, Faculty of Medicine, Srinakharinthravit  
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<sub>1,2,3</sub>) present in these ganglia. NS<sub>2</sub> and NS<sub>3</sub> of the cerebral ganglia were strongly stained with anti-human GH, while NS<sub>1</sub> 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 neurosecretory cells in the cerebral ganglia were not stained with anti-human LH, whereas those in the pleuro-pedal and visceral ganglia showed a weak reaction. The NS<sub>1</sub> of the pleuro-pedal ganglion were stained with anti-human FSH whereas those in the cerebral ganglia were lightly stained. The NS<sub>2</sub> 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<sup>1</sup>, P. Sobhon<sup>1</sup>, C. Wanichanon<sup>1</sup>, V. Linthong<sup>1</sup>, E.S. Upatham,<sup>2</sup>  
M. Kruatrachue<sup>2</sup> and P. Jarayabhand<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Departments of Anatomy and <sup>2</sup>Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup>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  $\mu\text{m}$ . 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 posterior end of the nucleus 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 axoneme.

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<sup>1</sup>, S. Apisawetakan<sup>1</sup>, V. Linthong<sup>1</sup>, C. Wanichanon<sup>1</sup>, P. Sretarugsa<sup>1</sup>, J. Chavadej<sup>1</sup> and E.S. Upatham<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Departments of Anatomy and <sup>2</sup>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<sub>1-4</sub>). In St<sub>1</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>3</sub> 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<sub>4</sub> 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).

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

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

<sup>a</sup> Department of Anatomy, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

<sup>b</sup> Department of Biology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand.

<sup>c</sup> Coastal Aquaculture Development Center, Department of Fishery, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Klong Wan, Prachuapkhiriakun 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, i.e., 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 spermatogenic 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*<sup>1,2</sup>. 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<sup>3</sup>. 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<sup>4,5</sup>, *Haliotis diversicolor diversicolor* Reeve<sup>6</sup>. 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

<sup>1</sup> 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 vessels. 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; Text Fig.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<sub>1</sub> to 3 mm in St<sub>4</sub>. St<sub>1</sub> is larger than St<sub>2</sub>, 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  $1.5 \times 3$  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.

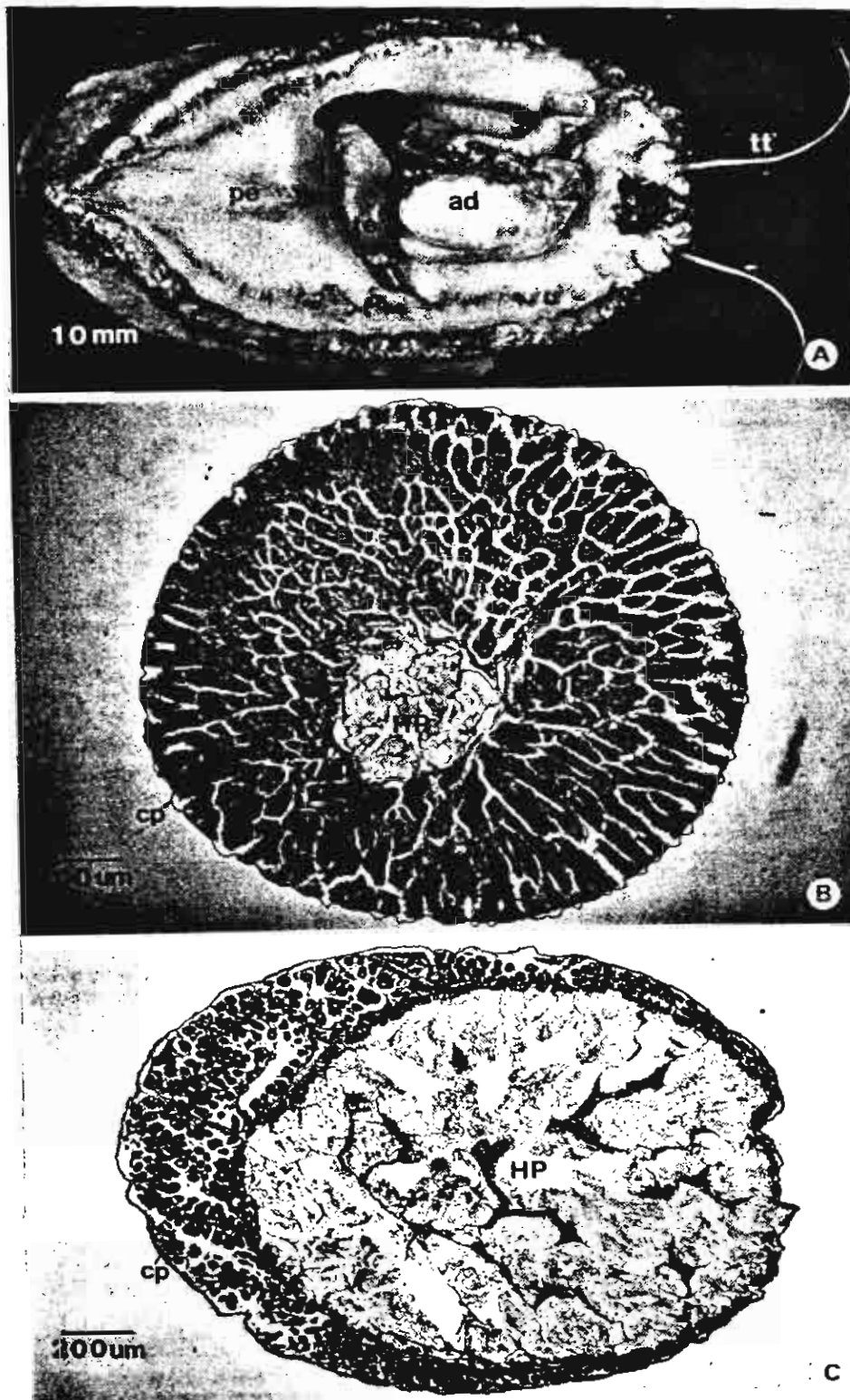
**Stage 1 oocyte ( $Oc_1$ ):**  $Oc_1$  is a round or scallop-shaped cell that is closely adhered to the trabecula. It is about 24 mm in size, with a round nucleus about 12 mm in diameter. The nucleolus is present but tends to be obscured by the rather dense chromatin and nucleoplasm. Similarly, the 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  $30 \times 55$  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).

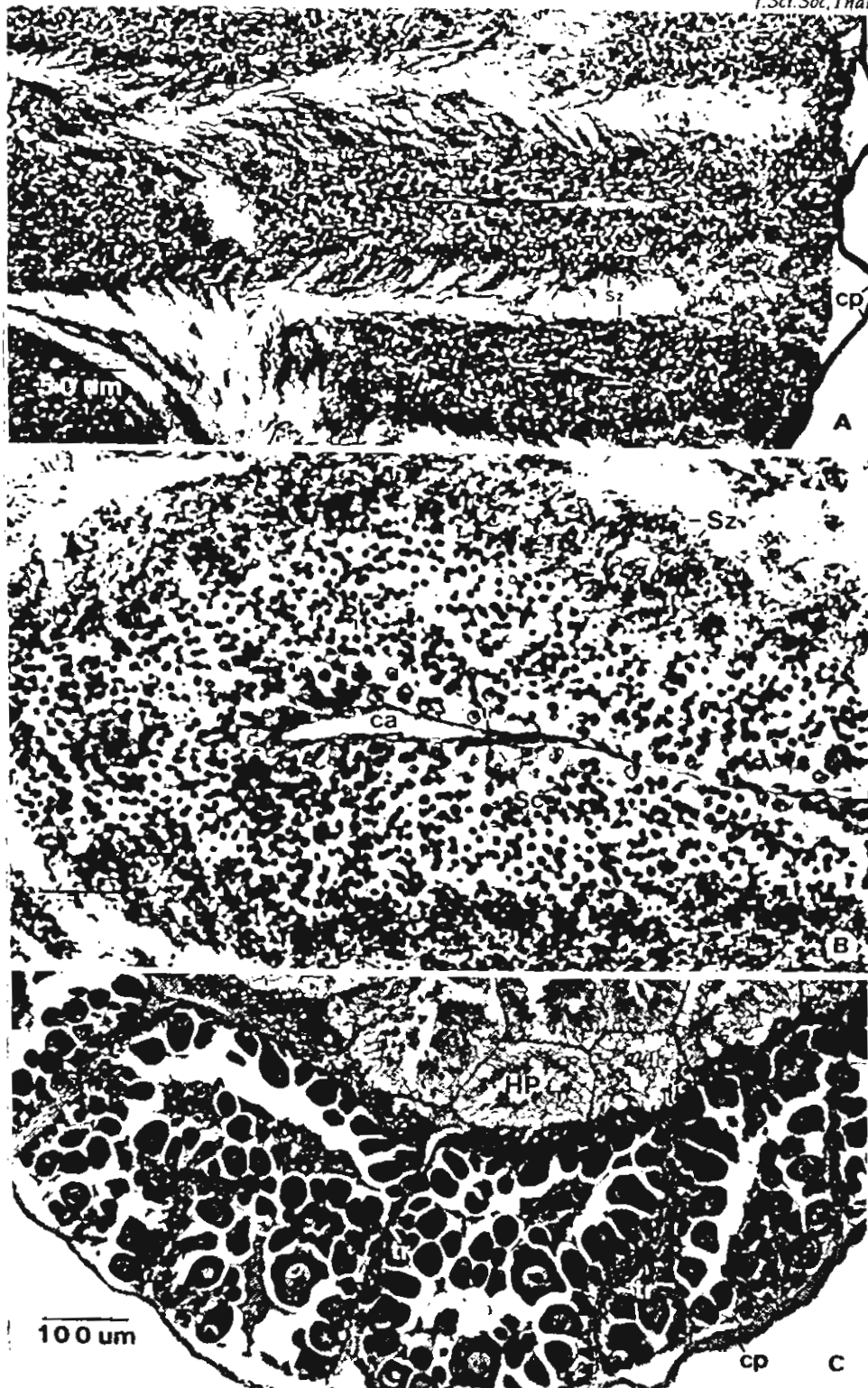
**Stage 3 oocyte ( $Oc_3$ ):** This cell becomes increasingly larger and assumes a pear shape, with the narrow side or base still attached to the connective of trabecula. The cell size is about 35-70 mm, with the nuclear size about 20 mm. The nucleus contains mostly euchromatin, and the nucleoplasm is 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



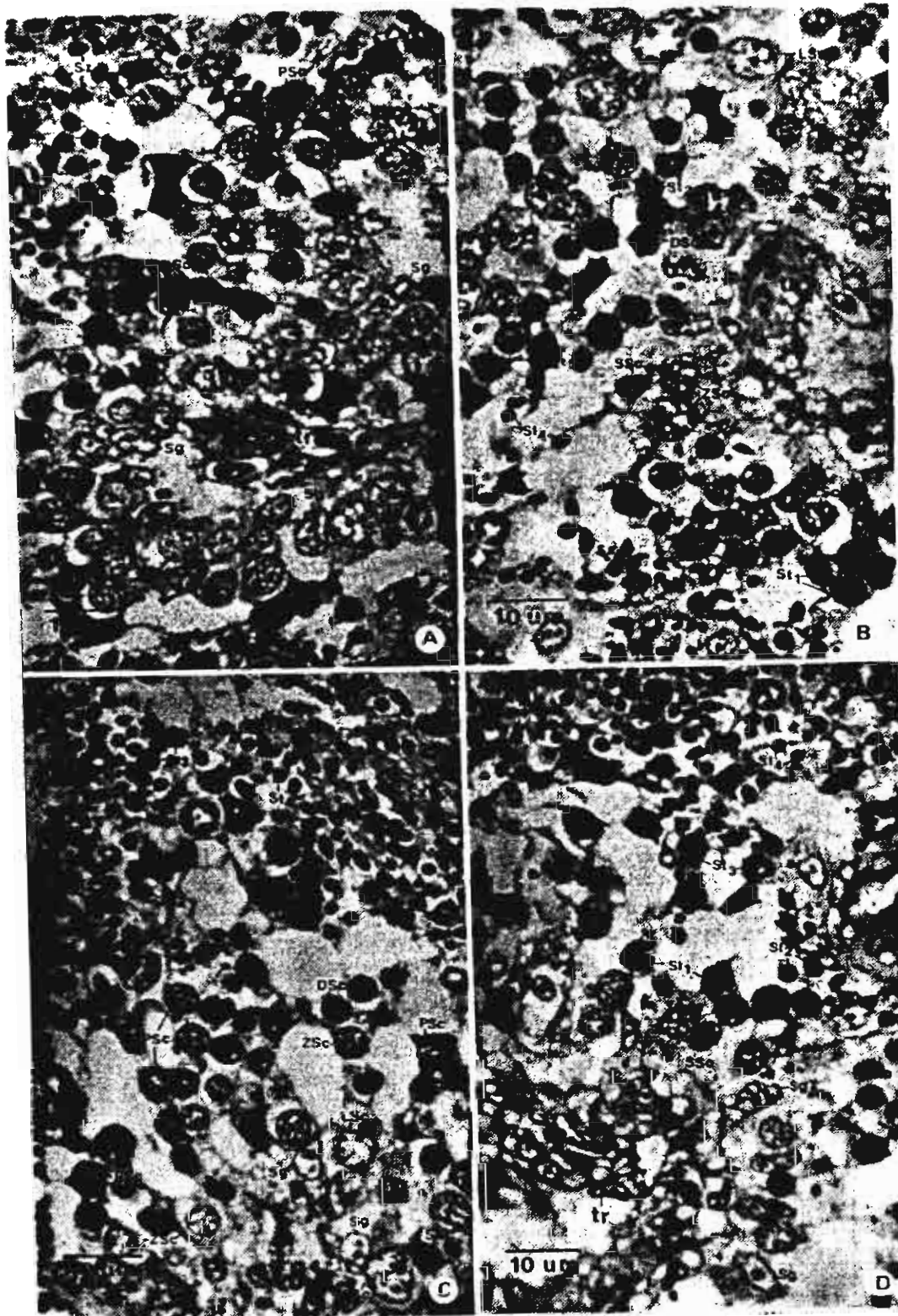


**Fig.1** A) The dorsal view of a shell-free male abalone, showing testis (te), adductor muscle (ad), pedal muscle (pe), and tentacle (tt).  
B) Cross section of the testis, showing hepatopancreas (HP) surrounded by testicular tissue which is, in turn, surrounded by thin connective tissue capsule (cp).  
C) Cross section of the ovary, showing hepatopancreas (HP) surrounded by ovarian tissue and fibrous capsule (cp).

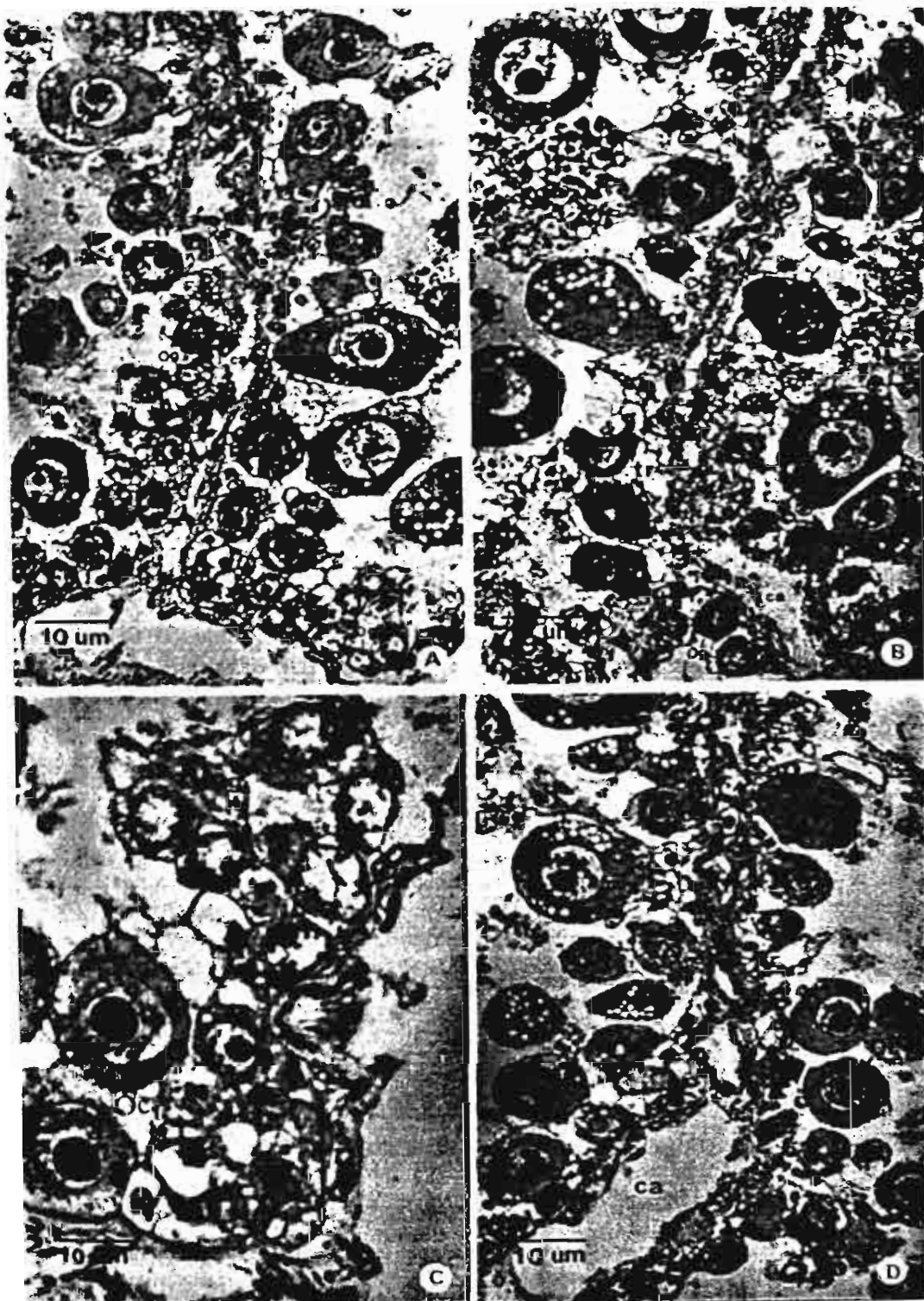


**Fig.2** A,B) A spermatogenic unit consists of a central trabecula (tr) arising from capsule (cp-in A), surrounded by various stages of germ cells. A capillary (ca) is present inside each trabecula, and successive maturing stages of germ cells lie at different distance from the connective of trabecula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

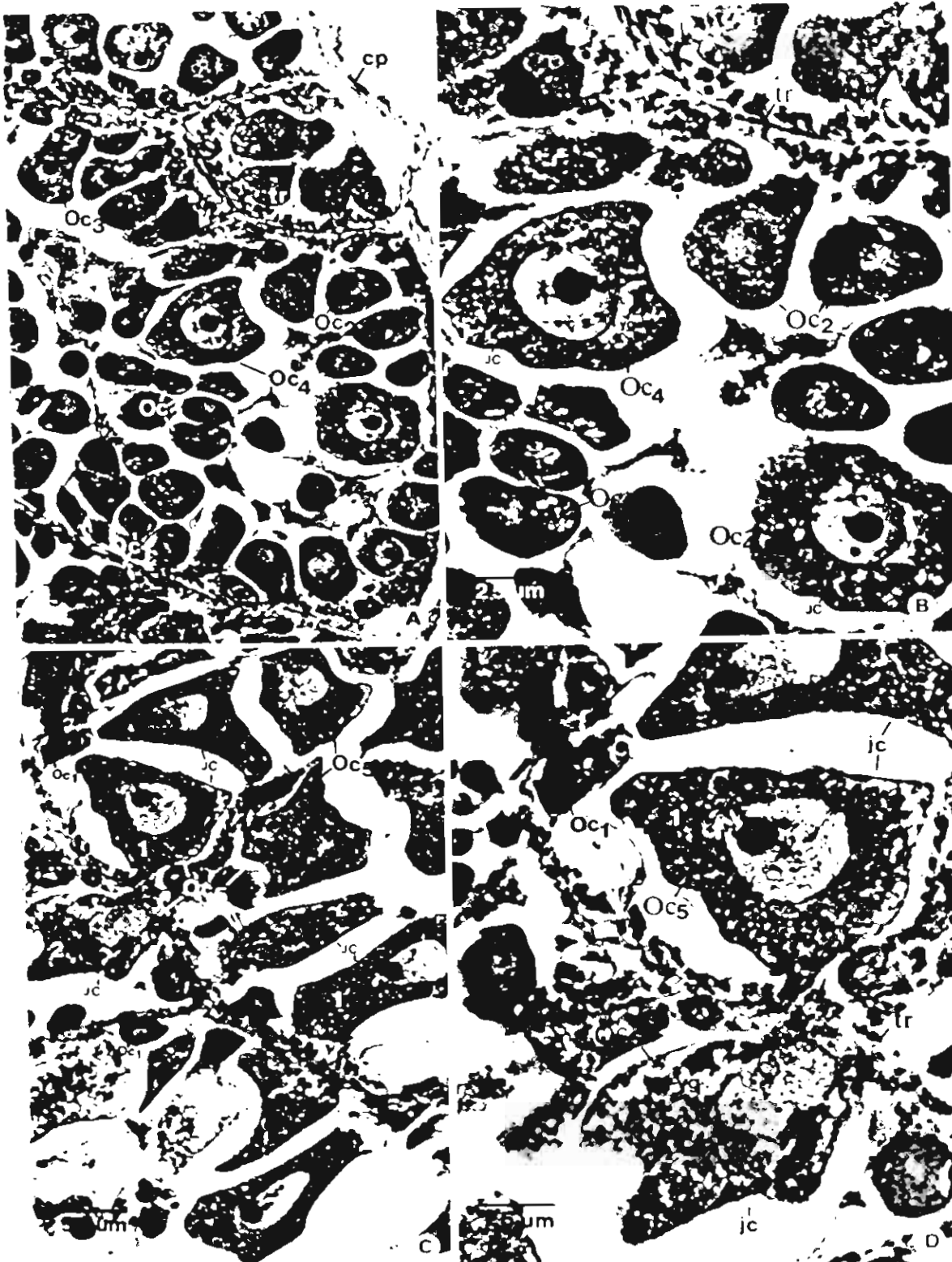


**Fig.3** A-D) Semithin sections demonstrating various stages of male germ cells. Lying closest to each trabecula (tr) are spermatogonia (Sg), different stages of primary spermatocytes (LSc-leptotene; ZSc-zygotene; PSc-pachytene; DSc-diplotene; MSc-metaphase), and further away are secondary spermatocytes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

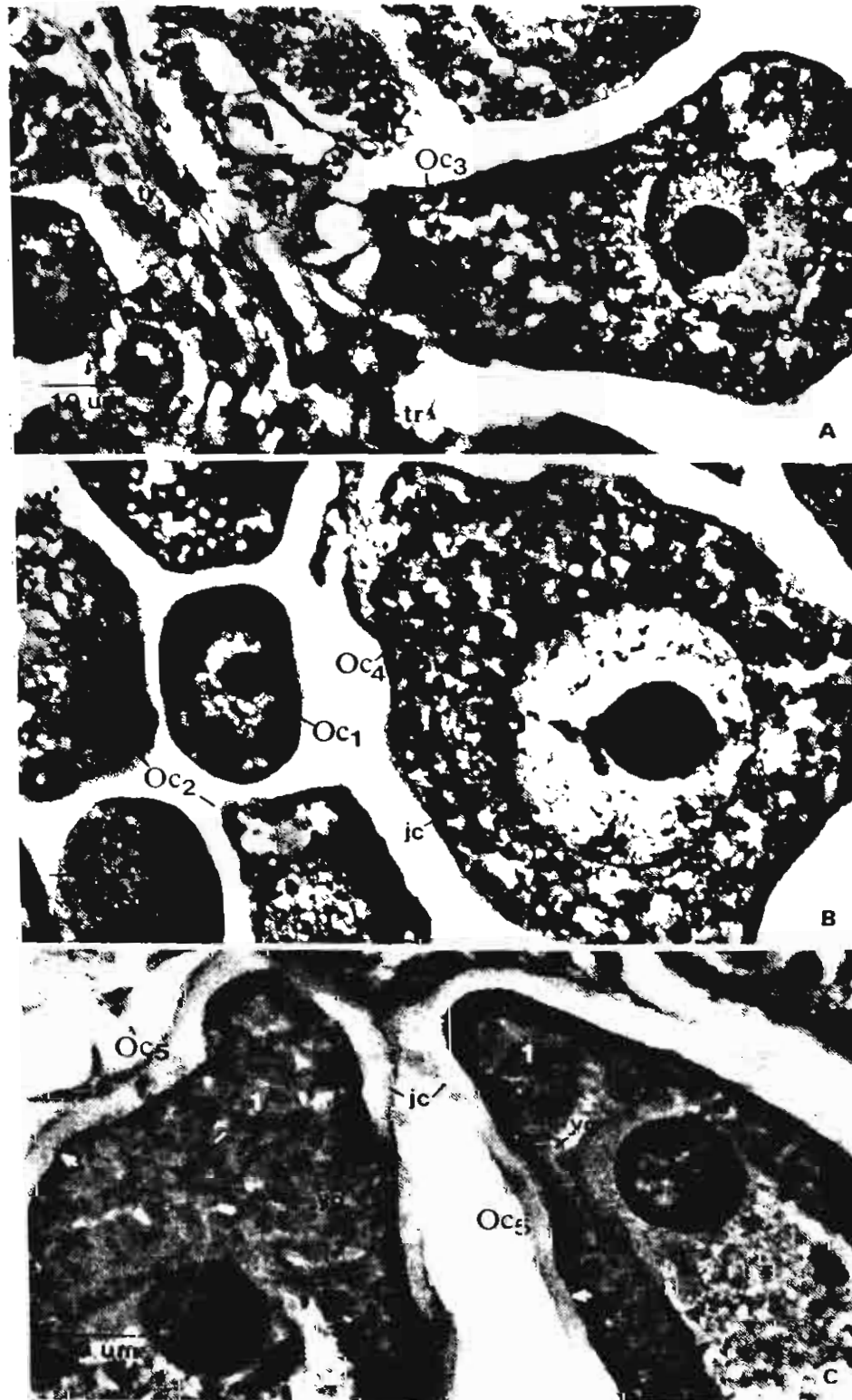


**Fig.4** A-D) Semithin sections demonstrating various stages of oocytes surrounding each trabecula (tr), which contains a capillary (ca) in the center. Closely attached to the connective of trabecula are oogonia (Og), stage I-III oocytes (Oc<sub>1</sub>-Oc<sub>3</sub>). In A and D there are clusters of oogonia lying close in the areas where trabeculae arise from the capsule

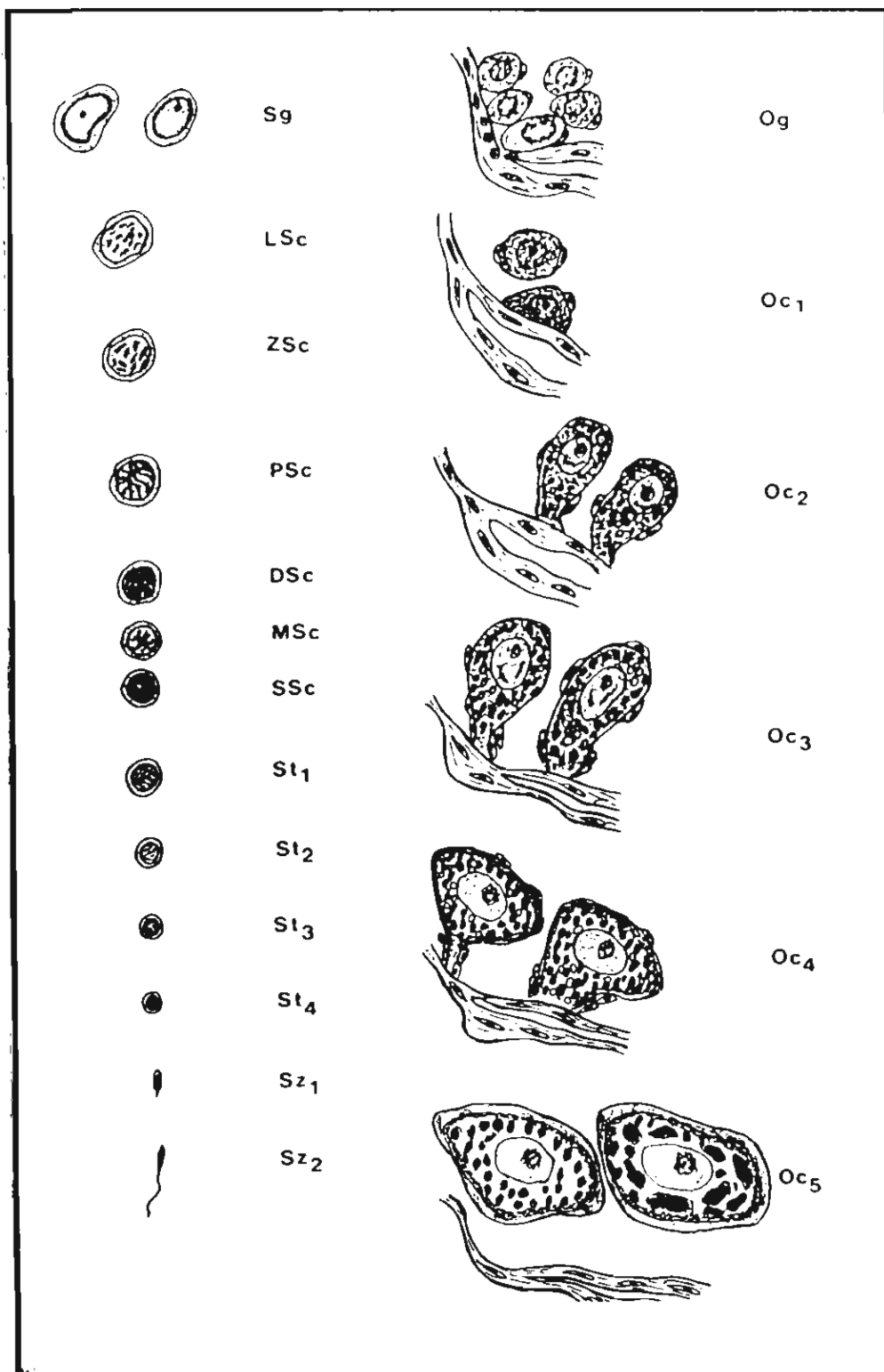




**Fig.5** A-D) Paraffin sections showing stages I and II oocytes ( $Oc_1$ ,  $Oc_2$ ) which are abundant in A, and these cells exhibit intensely basophilic cytoplasm. In B there are two stage IV oocytes ( $Oc_4$ ) showing abundant yolk platelets in the cytoplasm, and very thin jelly coat (jc). In C there 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<sub>3</sub>) in A, stage IV (Oc<sub>4</sub>) in B, and stage V (Oc<sub>5</sub>) 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 summarizes 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<sub>1-4</sub>), and two stages of spermatozoa (Sz<sub>1-2</sub>). In female line there are oogonia (Og), and five stages of primary oocytes (Oc<sub>1-5</sub>).

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<sub>5</sub>):** This is the fully mature oocyte before being released from the adult female. Oc<sub>5</sub> is the largest cells with polygonal shape (Fig.5C,D; 6C). The cell size is about 80-140  $\mu$ m, with nuclear size about 40  $\mu$ m. The nucleus exhibits similar characteristics as that of Oc<sub>4</sub>, but with completely enlarged nucleolus (Fig.6C). Oc<sub>5</sub> 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<sub>4</sub>. 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<sub>5</sub> are completely detached from the connectives of trabeculae.

## DISCUSSION

There have been several 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 yield in aquaculture systems. Croft<sup>7</sup> 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<sup>4,6,8-14</sup>. A fine structural study of the ovarian cells in the red abalone, *H. rufescens*, was also undertaken by Martin *et al.*<sup>15</sup>. 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<sup>4,5</sup> 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.*<sup>6</sup> 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<sup>11</sup> 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 development of rough endoplasmic reticulum and Golgi complexes in the cells, Martin *et al.*<sup>15</sup> 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<sub>5</sub>):** This is the fully mature oocyte before being released from the adult female. Oc<sub>5</sub> is the largest cells with polygonal shape (Fig.5C,D; 6C). The cell size is about 80-140  $\mu$ m, with nuclear size about 40  $\mu$ m. The nucleus exhibits similar characteristics as that of Oc<sub>4</sub>, but with completely enlarged nucleolus (Fig.6C). Oc<sub>5</sub> 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<sub>4</sub>. 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<sub>5</sub> are completely detached from the connectives of trabeculae.

## DISCUSSION

There have been several 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 yield in aquaculture systems. Croft<sup>7</sup> 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<sup>4,6,8-14</sup>. A fine structural study of the ovarian cells in the red abalone, *H. rufescens*, was also undertaken by Martin *et al.*<sup>15</sup>. 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<sup>4,5</sup> 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.*<sup>6</sup> 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<sup>11</sup> 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 development of rough endoplasmic reticulum and Golgi complexes in the cells, Martin *et al.*<sup>15</sup> 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<sup>16</sup>.

$Oc_2$  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 forward 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 several 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<sub>4</sub> 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<sub>2</sub> and Oc<sub>3</sub>. 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<sup>16</sup>. 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<sub>5</sub> 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<sub>5</sub> 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<sub>5</sub> is laden with reddish yolk granules. Based on the size of the yolk granules there could be 2 subgroups of Oc<sub>5</sub>: 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<sub>5</sub>, 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<sub>5</sub> should represent fully mature cells.

Up to now most studies have not rigorously categorize various spermatogenic cells of *Haliois*, 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<sub>1</sub> and St<sub>2</sub> is thus distinguished mainly by the difference in size (St<sub>1</sub> about 6 mm versus St<sub>2</sub> about 4 mm). In the third stage (St<sub>3</sub>) 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<sub>4</sub>. The two stages of spermatozoa are distinguished by their ellipsoid nuclei. Sz<sub>1</sub> 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<sub>2</sub> 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., Hylleberg, 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) Gametogenesis 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**

อวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเปาฮื้อที่ผลิตเซลล์สืบพันธุ์ คือ รังไข่และอัณฑะซึ่งมีถุงหุ้ม เยื่อเกี่ยวพันจากถุงหุ้มแทรกเข้าไปในรังไข่ และอัณฑะเป็นแผง *crabeculae* ที่มีเซลล์สืบพันธุ์ชั้นต้นและชั้นปลายหุ้มอยู่รอบๆ ในรังไข่เซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วย 6 ระยะ คือ oogonium, primary oocytes ชั้นที่ I, II, III, IV และ V ซึ่งมีความแตกต่างกันตามปริมาณสาร basophilia ก้อนไขมันและสารไข่ (yolk) ที่เซลล์แต่ละชั้นสร้างขึ้น ในอัณฑะเซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วย 13 ระยะ คือ spermatogonium, primary spermatocytes 5 ระยะ, secondary spermatocyte, spermatids 4 ระยะ และ spermatozoa 2 ระยะ

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

E. S. UPATHAM,<sup>1</sup> A. THONGKUKIATKUL,<sup>1</sup> M. KRUATRACHUE,<sup>1</sup>  
C. WANICHANON,<sup>2</sup> Y. P. CHITRAMVONG,<sup>1</sup> S. SAHAVACHARIN,<sup>3</sup>  
AND P. SOBHON<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Biology  
Faculty of Science  
Mahidol University  
Bangkok 10400, Thailand

<sup>2</sup>Department of Anatomy  
Faculty of Science  
Mahidol University  
Bangkok 10400, Thailand

<sup>3</sup>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 anesthetized with 5% MgCl<sub>2</sub> 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 ventro-posterior 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

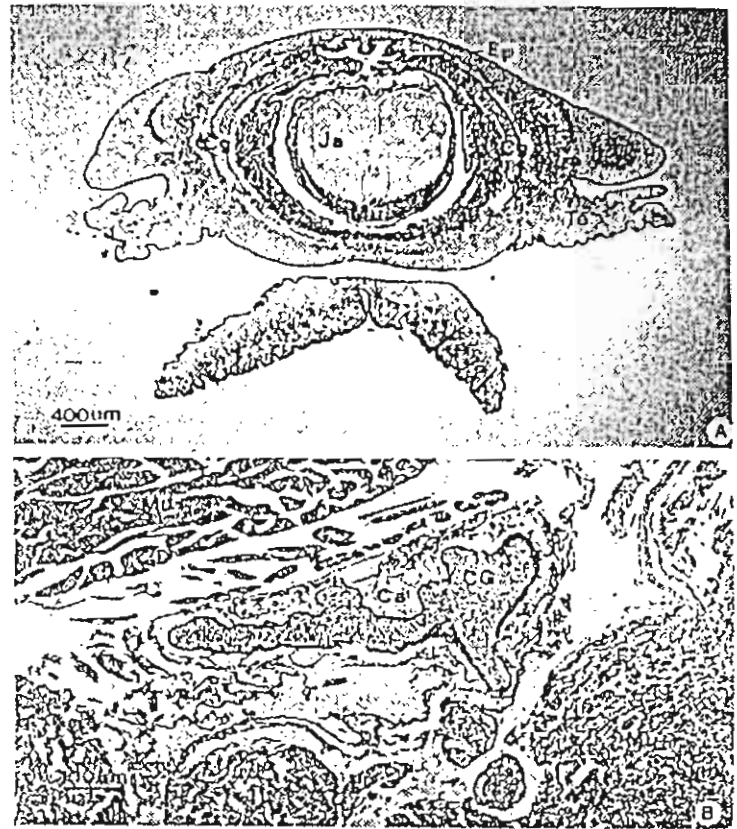


Figure 2. (A) Photomicrograph of longitudinal section showing location of cerebral ganglia (Cg) lying on both sides of jaw (Ja) and jaw muscle (Mu). Ep, epidermis; Te, tentacle. (B) A high magnification of longitudinal section of cerebral ganglion (CG). Ca, capillary.

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).

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<sub>1</sub> and NS<sub>2</sub>), three types of neurons (NR<sub>1</sub>, NR<sub>2</sub>, and NR<sub>3</sub>), and three types of neuroglia (NG<sub>1</sub>, NG<sub>2</sub>, and NG<sub>3</sub>).

*Type 1 Neurosecretory Cell (NS<sub>1</sub>)*

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

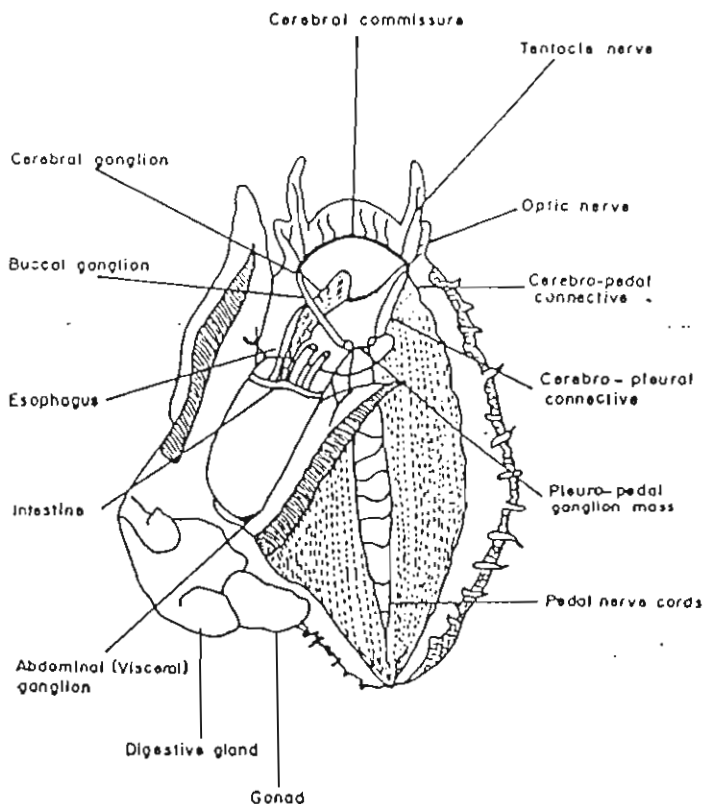


Figure 1. A diagram of the nervous system of *H. asinina*, showing various nerve ganglia linked together by nerve cords and connectives.