



สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

The Thailand Research Fund

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส สกว.)

ชื่อโครงการ

การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการสืบพันธุ์
ของหอยเป่าฮื้อและกุ้งก้ามกราม

**Endocrine manipulation of the reproduction in the
tropical abalone, *Haliotis asinina*, and the giant
freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii***

โดย

ศ. ดร. ประเสริฐ โศภน และคณะ

รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์
โครงการวิทยุทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย (เมธีวิจัยอาวุโส สกว.)
(31 สิงหาคม 2547- 28 กุมภาพันธ์ 2551)

ชื่อโครงการ

การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการสืบพันธุ์
ของหอยเป่าฮื้อและกุ้งก้ามกราม

**Endocrine manipulation of the reproduction in the
tropical abalone, *Haliotis asinina*, and the giant
freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii***

ชื่อ	คณะผู้วิจัย	
	ตำแหน่ง	สังกัด
นายประเสริฐ โสภณ	ศ. ดร.	คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล
นายชัยทิพย์ วนิชานนท์	รศ. ดร.	คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล
นางประไพร์ เสรฐฐรักษ์	รศ. ดร.	คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล
นางจิตติพันธุ์ ขวเดช	รศ. ดร.	คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล
น.ส. พรจันทร์ สายทองดี	รศ. ดร.	คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล
นายวัฒนา วีระชาติยานุกูล	รศ. ดร.	คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล
นายวิชัย ลีนทอง	นักวิทยาศาสตร์	คณะวิทยาศาสตร์ ม.มหิดล
นายธเนศ พุ่มทอง	นักวิชาการประมง	ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมง ชายฝั่ง คลองวาฬ ประจวบคีรีขันธ์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (Abstract).....	5
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร(Executive summary).....	9
เนื้อหาบทวิจัย.....	11
โครงการวิจัย: การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือ.....	11
และกึ่งก้ามกราม (Endocrine manipulation of the reproduction in the tropical abalone, <i>Haliotis asinina</i> , and the giant freshwater prawn, <i>Macrobrachium rosenbergii</i>)	
โครงการที่ 1 หอยเป่าฮือ.....	11
หัวข้อที่ 1 บทนำ.....	11
หัวข้อที่ 2 วงจรชีวิตและระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮือ.....	12
หัวข้อที่ 3 ระบบประสาทและฮอร์โมนที่ควบคุมการสืบพันธุ์และการเจริญเติบโต.....	13
หัวข้อที่ 4 การศึกษาฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (egg-laying hormone-ELH) และยีนที่ควบคุม.....	16
หัวข้อที่ 5 ฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของตัวอ่อน.....	17
หัวข้อที่ 6 การลงเกาะ (settlement) และเมตามอร์โฟซิส (metamorphosis) ในหอยเป่าฮือ.....	19
หัวข้อที่ 7 การศึกษาบทบาทของฮอร์โมน aELH และ GnRH ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการพัฒนาการ.....	21
ของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าฮือตัวอ่อน	
หัวข้อที่ 8 การกระตุ้นการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ในหอยเป่าฮือตัวเต็มวัยด้วยฮอร์โมน aELH และ GnRH.....	32
หัวข้อที่ 9 การทดสอบการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าฮือตัวเต็มวัยด้วยสาร aELH และ GnRH.....	36
โครงการที่ 2 กึ่งก้ามกราม.....	40
หัวข้อที่ 1 บทนำ.....	40
หัวข้อที่ 2 การศึกษาโครงสร้างของต่อมอวัยวะและการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในกึ่งก้ามกรามเปรียบเทียบกับกึ่งกุลาดำ.....	40
หัวข้อที่ 3 การศึกษาโครงสร้างของไข่และการพัฒนาของเซลล์ไข่ในกึ่งก้ามกรามเปรียบเทียบกับกึ่งกุลาดำและ.....	51
กระบวนการปฏิสนธิระหว่างไข่กับอสุจิ	
หัวข้อที่ 4 การวิเคราะห์การกระจายและระดับของสารสื่อประสาทเซโรโทนิน (5-HT) โดปามีน (DA).....	52
ออกโดปามีน (OA) ในระบบประสาทและรังไข่กึ่งโดยวิธี immunocytochemistry (ICC) และ high performance liquid chromatography (HPLC)	
หัวข้อที่ 5. การศึกษาผลกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่กึ่งด้วยสารสื่อประสาท 5-HT และ DA.....	54
หัวข้อที่ 6 การวิเคราะห์การกระจายของฮอร์โมน gonadotropin-releasing hormone (GnRH) และ.....	55
egg-laying hormone (ELH) โดยวิธี immunocytochemistry (ICC)	
หัวข้อที่ 7 การวิเคราะห์คุณสมบัติของฮอร์โมน GnRH และ ELH ของรังไข่กึ่งโดยวิธี high performance.....	60
liquid chromatography (HPLC)	
หัวข้อที่ 8 ทดสอบการกระตุ้นพัฒนาการของรังไข่กึ่งด้วยฮอร์โมน GnRH, ELH และ methyl farnesoate (MF).....	61
หัวข้อที่ 9 การศึกษาโครงสร้างและเซลล์ในต่อมเพศผู้(Androgenic gland) ของกึ่งก้ามกราม.....	62
หัวข้อที่ 10 การศึกษาคุณสมบัติของ Androgenic gland hormone (AGH) และ Insulin –like peptide hormone (ILP).....	66

หน้า

หัวข้อที่ 11 การกระตุ้นการเปลี่ยนเพศกึ่งกำกรวมด้วย 17 α methyltestosterone (17 α MT).....	70
และ สารสกัดรวมจาก androgenic gland	
ผลลัพธ์ที่ได้จากโครงการ.....	72
ผลงานที่ตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ.....	72
การเสนอผลงานในที่ประชุมระดับนานาชาติ.....	75
บทความวิชาการภาษาไทยสำหรับบุคคลทั่วไป.....	77
รหัสพันธุกรรมของฮอร์โมนกึ่งในฐานข้อมูล.....	77
นักวิจัยในโครงการที่ได้รับทุนอื่นในระหว่างรับทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย.....	78
การผลิตบุคลากรและนักวิจัย.....	78
ผลิตภัณฑ์ที่ได้ซึ่งมีโอกาสนำไปประยุกต์ใช้ในเชิงพาณิชย์หรือเชิงสาธารณะ.....	80

ภาคผนวก

ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ

ผลงานที่นำเสนอในที่ประชุมระดับนานาชาติ

บทคัดย่อ (Abstract)

ประเทศไทยได้มีการพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮื้อและกุ้งก้ามกรามที่ก้าวหน้าไปมากแต่การผลิตตัวอ่อนที่สามารถอยู่รอดและพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัยยังมีอัตราเพิ่มขึ้นไม่มากนัก อีกทั้งการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในสภาพที่ไม่เหมือนธรรมชาติทำให้พ่อแม่พันธุ์ลดประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ลงเนื่องจากเกิดความเครียด จึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้สารฮอร์โมนช่วยกระตุ้น แต่จะกระทำเช่นนั้นได้ต้องมีองค์ความรู้พื้นฐานและความเข้าใจเกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการพัฒนาและการทำงานของระบบสืบพันธุ์ซึ่งควบคุมโดยฮอร์โมนจากระบบประสาท ฮอร์โมนที่ควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์เหล่านี้อาจถูกควบคุมอีกต่อหนึ่งโดยสารสื่อประสาท (neurotransmitters-NE) เช่น serotonin (5-HT) และ dopamine (DA) และ/หรือสารปรับสัญญาณประสาท (neuromodulator-NM) เช่น FMRF APGW amides และ GnRH สาร NE และ NM อาจเป็นสารสื่อกลาง (chemical mediators) ตัวแรกที่รับรู้การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายนอก โดยเฉพาะอุณหภูมิ ความยาวของกลางวันต่อกลางคืน (photo period) ปริมาณอาหาร ฯลฯ ทั้งนี้เพื่อจะได้ควบคุมการหลั่งฮอร์โมนเพศและฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตที่กระตุ้นให้หอยหรือกุ้งปรับตัวเข้าสู่ช่วงการเจริญพันธุ์ (reproductive growth) หรือช่วงการเจริญเติบโตของร่างกาย (somatic growth) ที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม

หอยเป่าฮื้อ

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาลักษณะโครงสร้างของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮื้อและการกระจายของสารสื่อประสาท เซโรโตนิน (5-HT) และสารปรับสัญญาณประสาท gonadotropin-releasing hormone (GnRH) ซึ่งเป็นสารที่ผลิตโดยเซลล์ประสาทรับสัมผัสที่รับรู้การเปลี่ยนแปลงภายนอกที่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ พบว่า 5-HT และ GnRH ส่วนใหญ่มีอยู่ในเซลล์ประสาทของปมประสาท cerebral และ pleuropedal โดยเซลล์เหล่านี้ไม่มีการรวมกลุ่มชัดเจน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสาร 5-HT, GnRH และฮอร์โมนที่ควบคุมการสืบพันธุ์ในหอยเป่าฮื้อโดยเฉพาะฮอร์โมนประสาทที่คุมการหลั่งเซลล์สืบพันธุ์ (abalone egg-laying hormone-aELH) ในหอยเป่าฮื้อพันธุ์พื้นเมือง (*Halotis asinina*) โดยได้ทำการสังเคราะห์ aELH ด้วยวิธีพันธุวิศวกรรมแล้วนำไปฉีดกระตุ้นหอยพ่อแม่พันธุ์ พบว่าสารสื่อประสาทเซโรโตนิน (serotonin-5HT), GnRH และ aELH สามารถกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่กับเซลล์ไข่และการตกไข่ได้ ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงแบบกักขังได้ และถ้าหากนำไปฉีดในหอยวัยอ่อนอายุก่อน 4 เดือนทำให้ได้หอยเพศเมียมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสารปรับสัญญาณ APGW สามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สุจิจากพ่อพันธุ์ได้ทั้งหมด ทำให้สะดวกต่อการกำหนดระยะเวลาปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียจากพ่อแม่พันธุ์ที่พร้อมกัน ทำให้สะดวกต่อการเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพื่อนำไปปฏิสนธิโดยวิธี *in vitro* fertilization โดยใช้อัตราส่วนไข่ต่อสุจิที่ได้ผลมากที่สุดคือ 1:100

การศึกษากลไกการลงเกาะ (settlement) ของตัวอ่อนของหอยเป่าฮื้อพบว่า γ aminobutyric acid (GABA) 5 γ aminovaleric acid (SAVA) ที่ความเข้มข้น 1 μ M และ monosodium glutamate (MSG) ที่ความเข้มข้น 5 mM สามารถกระตุ้นการลงเกาะได้มากกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทำให้อัตราการลงเกาะและการอยู่รอดของตัวอ่อนหอยเป่าฮื้อเพิ่มขึ้นมาก โดยกลุ่มควบคุมที่มีการลงเกาะเพียง 10-15% องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยพื้นฐานดังกล่าวแล้วสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮื้อโดยเกษตรกรรายย่อยและการเพาะเลี้ยงระดับเชิงพาณิชย์ได้

กุ้งก้ามกราม

การหลั่งฮอร์โมนที่ควบคุมวงจรการสืบพันธุ์กับการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ และเซลล์สืบพันธุ์ของกุ้งก้ามกรามมีการส่งสัญญาณเป็นทอดๆ ผ่านเซลล์ประสาทลำดับแรกที่อยู่ใน optic lobe ซึ่งสร้างสารสื่อประสาท (neurotransmitters) ในกลุ่ม indolamine ได้แก่ เซโรโตนิน (serotonin or 5-hydroxytryptamine-5-HT) และสารสื่อประสาทในกลุ่ม catecholamines (dopamine-DA และ octopamine-OA) โดย 5-HT และ DA ทำหน้าที่ตรงกันข้าม การฉีด 5-HT ในกุ้งก้ามกรามที่ระดับ 2.5×10^{-6}

$5-2.5 \times 10^{-7}$ mol/ตัว และ DA antagonist (spiperone-SP) ที่ระดับ 5.4×10^{-7} mol/ตัว ทำให้รังไข่พัฒนาเร็วขึ้นกว่าปกติ และมีการปล่อยไข่ออกมาในปริมาณและคุณภาพใกล้เคียงกับปกติ และยังทำให้ระยะการพัฒนารังไข่ของเอมบริโอลดลงด้วย แต่การฉีด DA ในปริมาณใกล้เคียงกัน มีผลตรงกันข้าม พบว่า 5-HT และ DA มีการกระจายอยู่ในเกือบทุกส่วนของสมอง แต่จะมีความเข้มข้นสูงในปมประสาท thoracic และต่อมสืบพันธุ์ ระดับ 5-HT มีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากระยะที่ 1 ของวงจรรังไข่จนมีระดับสูงสุดในระยะที่ 4 ส่วน DA มีระดับความเข้มข้นที่สวนทางกัน

การออกฤทธิ์ของ 5-HT อาจถูกขยายสัญญาณด้วยสารปรับสัญญาณประสาท (neuromodulator) ซึ่งมักเป็นสารเปปไทด์ขนาดเล็กหรือ เอไมด์ โดยเฉพาะ gonadotropin-releasing hormone (GnRH) และ Enkephalin (Enk) ซึ่งพบว่าการฉีด GnRH ที่ระดับ 50-500 ng/gm น้ำหนักตัว หรือ GnRH agonist ที่ระดับ 1000 ng/gm น้ำหนักตัว สามารถกระตุ้นให้วงจรของการพัฒนารังไข่และการตกไข่เร็วขึ้นกว่าปกติ อีกทั้งมีปริมาณและคุณภาพของไข่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม พบว่า GnRH มีการกระจายอยู่ในสมอง ปมประสาท thoracic และต่อมสืบพันธุ์

ฮอร์โมนที่เป็นสารออกฤทธิ์ระดับสุดท้ายคือ gonadotropins ซึ่งแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่กระตุ้นการพัฒนาของต่อมเพศได้แก่ gonad-stimulating hormone (GSH) ซึ่งกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่และเซลล์ไข่, vitellogenin stimulating ovarian hormone (VSOH) ซึ่งกระตุ้นการสร้างสารไข่ในเซลล์ไข่ ส่วนในเพศผู้มี androgenic gland hormone (AGH) ซึ่งกระตุ้นการพัฒนาของต่อมอัณฑะ ส่วนฮอร์โมนที่ห้ามการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ ได้แก่ gonad-inhibiting hormone (GIH) ซึ่งทำหน้าที่ตรงกันข้ามกับฮอร์โมนกลุ่มแรก นอกจากฮอร์โมนดังกล่าวเรายังพบว่าในกุ้งมีฮอร์โมนคล้ายๆกับ abalone egg-laying hormone (aELH) กระจายอยู่ในปมประสาท thoracic และรังไข่ การฉีดฮอร์โมน ELH ที่ระดับ 5-500 ng/gm น้ำหนักตัว ทำให้วงจรของการพัฒนารังไข่และการตกไข่ของกุ้งสั้นลงโดยมีการปล่อยไข่น้ำในปริมาณและคุณภาพที่ปกติ เนื่องจากพบว่า ELH เป็นฮอร์โมนที่มีการอนุรักษ์สูงในกุ้งก้ามกราม กุ้งกุลาดำ และสัตว์พวก crustaceans ชนิดอื่นๆ เราจึงเชื่อว่า ELH เป็น gonadotropin ที่สำคัญมากตัวหนึ่งที่มีบทบาทในการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ ทั้งนี้เป็นไปได้ว่า ELH อาจเป็นหรือทำหน้าที่คล้าย GSH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีผู้เสนอว่ามีการออกฤทธิ์กระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ในกุ้ง แต่ยังไม่เคยมีผู้ใดสามารถสกัดฮอร์โมนดังกล่าวออกมาได้

การเลี้ยงในสภาพกักขังทำให้กุ้งเกิดความเครียดเป็นเหตุให้การพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์และการสืบพันธุ์ของพ่อ-แม่พันธุ์กุ้งลดลงจนกระทั่งอาจจะไม่มีเพศสัมพันธ์เลย ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าความเครียดมีผลกระทบต่อความสมดุลของฮอร์โมน gonadotropins โดยตรง การฉีด 5-HT และ/หรือ GnRH หรือแม้กระทั่งการให้ ELH โดยตรง สามารถกระตุ้นให้ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของพ่อ-แม่พันธุ์เพิ่มขึ้นได้ นอกจากนั้นการฉีดสารห้าม DA เช่น SP ช่วยเป็นปัจจัยเสริมที่ผลักดันให้มีการสร้างและหลั่ง gonadotropin ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการพัฒนาต่อมสืบพันธุ์ และพฤติกรรมสืบพันธุ์เพิ่มขึ้นได้ ในทำนองเดียวกับการกระตุ้นตัวอ่อนทั้งสองเพศด้วยฮอร์โมนกำหนดเพศที่อยู่ในกลุ่ม insulin-like growth factor (IGF) และ/หรือ AGH และ/หรือ testosterone อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนเพศของลูกกุ้งที่เป็นเพศผู้มากขึ้นได้ ซึ่งจะทำให้การเลี้ยงแต่เพศผู้อย่างเดียว (male sex monoculture) เป็นไปได้ และให้ผลตอบแทนแก่เกษตรกรเพิ่มสูงขึ้น

The tropical abalone, *Haliotis asinina*, and the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*, gear their reproductive and growth activities to fit the changing of environmental conditions. The most powerful environmental stimuli are light, photoperiod, lunar cycle, temperature, and availability of food. These cues are perceived by many specialized sense organs concentrating in the eyes and appendages around the head region. Specialized receptor cells and associated neurons in these structures and various neural ganglia are the principal structures that perceive and act in the signaling pathway to mediate the physiological and behavioral changes of these animals in response to the changes of environmental conditions.

Abalone

The anatomical organization and detailed histology of the abalone nervous and reproductive systems together with the distribution of the controlling neurotransmitters (NE), 5-HT, and neuromodulators (NM), GnRH, have been studied. These NE and NM have been localized principally in the cerebral and pleuropedal ganglia. Furthermore, the neurohormone, especially the abalone egg-laying hormone (aELH) have also been detected in these ganglia and the gonads. Recombinant aELH has been synthesized. The administrations of serotonin (5-HT), GnRH, or aELH could shorten the ovarian cycle and the maturation of oocytes in female broodstocks. 5-HT and aELH could also stimulate spawning in female. On the other hand, APGW could stimulate spermiation in mature males. These treatments could stimulate the simultaneous spawning and spermiation which allow expedient collection of the gametes for the *in vitro* fertilization. Administration of 5-HT, aELH and GnRH in juvenile abalone with age less than 4 months could also stimulate the ovarian and testicular maturation at the earlier age. Furthermore, 5-HT and aELH tend to increase the number of females more than males. In addition to the endocrine manipulation of the reproductive processes, we have also studied the factors that could increase the settlement and metamorphosis of the abalone larvae. It was demonstrated that GABA, 5AVA at 1 μ M and MSG at 5 mM could enhance settlement rate of the veliger larvae by 50% when compared to the control which was at 10-15%. This endocrine manipulation could also increase the rate of metamorphosis and survival of the abalone spats. This technique could be used for small as well as large scale aquaculture.

Prawn

Major neurotransmitters that could stimulate the reproduction and growth of the giant freshwater prawn are indolamine (serotonin or 5-hydroxytryptamine-5HT), and catecholamines (dopamine-DA, octopamine-OA). Indolamine and catecholamine are usually antagonistic in their actions; for example, 5-HT was found to stimulate hyperglycemic hormone (CHH) and gonadotrophic hormone (GSH) which stimulate the ovarian maturation, while DA and OA

inhibit the releases and consequently the actions of these hormones. The actions of neurotransmitters may be mediated and modified by groups of neuromodulators, which are usually composed of short peptides or amides, the most prominent of which are enkephalin and GnRH. Gonadotrophic hormones themselves are classified into stimulatory group (GSH/VSH, VSOH, AGH) and inhibitory group (GIH) which inhibit the syntheses and releases of the formers. In addition to these two groups of hormone, we have detected the presence the prawn egg-laying hormone (ELH) which is similar to abalone ELH, in thoracic ganglia and ovary of prawn. The administration of this hormone (aELH) at the dosages of 5 ng/gm BW to 500 ng/gm BW could significantly shortening the ovarian cycle and spawning period. When characterized by HPLC, the prawn ELH is very similar to abalone ELH. Other vertebrate-type hormones is present including insulin-like growth factor (IGF). This hormone was detected in the androgenic gland of the giant freshwater prawn, which is highly similar to that of the closely related species, *Cherax destructor*. This hormone could be male-sex determining factors acting in addition to or in place of AGH, as up to date AGH could not yet be isolated in the freshwater prawn. In addition, the evidence for the presence of vertebrate-type sex steroids (testosterone, estradiol), and their stimulating effects on the prawn gonads has been demonstrated by our group.

When reared in captivity, the fecundity of the broodstocks always decline which is due to the imbalance of gonadotrophins, perhaps caused by unnatural environment and stress. The restoration of stimulatory gonadotrophins by direct supplementation of ELH, and/or by stimulation with 5-HT, and/or neuromediators like GnRH, could improved the gonadal maturation and greater production of gametes. Furthermore, this processes could be enhanced by the inhibition of the inhibitory hormones with DA inhibitor. Likewise, we demonstrated that the male-sex determination of freshwater prawn could be controlled by the antagonistic hormones, ie, IGF and GIH. If such endocrine manipulative strategies are possible, then they could be applied for economic benefit in aquaculture, such as in avoiding eyestalk-ablation in prawn (especially *P. monodon* and *P. vannamei*) which is routinely employed to stimulate the ovarian maturation and spawning, as well as in the sex conversion to obtain and culture only male prawn.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร(Executive Summary)

ประเทศไทยมีชายฝั่งทะเลที่ยาวเกือบตลอดทั้งอ่าวไทยและทางด้านทะเลอันดามันรวมกัน 2,760 กิโลเมตร อีกทั้งยังมีแหล่งน้ำจืดธรรมชาติและที่เกิดขึ้นจากการสร้างเขื่อนเกิดขึ้นอีกมากมาย การประมงจากทะเลและจากแหล่งน้ำจืดจึงมีความสำคัญทั้งในระดับเกษตรกรรมแบบพอเพียงและเกษตรกรรมเชิงพาณิชย์เพื่อการบริโภคภายในประเทศ และเพื่อการส่งออก ตัวอย่างที่เป็นต้นแบบของเกษตรกรรมทั้งสองระดับที่มีความสัมพันธ์กันคือการเลี้ยงกุ้ง โดยเฉพาะกุ้งกุลาดำ (*Penaeus monodon*) และกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ซึ่งสามารถใช้บริโภคภายในประเทศและทำรายได้ให้ประเทศไทยจากการส่งออกไม่ต่ำกว่าปีละ 70,000 ล้านบาท ตั้งแต่ปี 2543 เป็นต้นมา นอกจากกุ้งกุลาดำและกุ้งขาวแล้ว กุ้งก้ามกรามก็เป็นสินค้าซึ่งเป็นที่ต้องการของตลาดทั้งภายในและภายนอกประเทศซึ่งเป็นผู้บริโภคที่มีกำลังซื้อสูง หอยเป่าฮ็อกก็เป็นสัตว์น้ำอีกตัวหนึ่งที่น่าจะมีศักยภาพในการส่งออกและทำรายได้ให้แก่เกษตรกรสูง เนื่องจากเป็นที่นิยมของผู้บริโภคตั้งแต่สมัยโบราณมาแล้ว โดยเฉพาะในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน นอกจากนั้นแล้วค่านิยมในการบริโภคหอยเป่าฮ็อกก็สูงขึ้นอย่างรวดเร็วในประเทศยุโรป ตะวันตก และอเมริกาเหนือเนื่องจากมีประชากรเชื้อสายเอเชียมากขึ้น ตลอดจนมีการแลกเปลี่ยนและคลุกเคล้าวัฒนธรรมการบริโภคอาหารระหว่างตะวันตกและตะวันออกเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ

ประเทศไทยได้มีการพัฒนาระบบเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮ็อกและกุ้งก้ามกรามที่ก้าวหน้าไปมากแต่การผลิตตัวอ่อนที่สามารถอยู่รอดและพัฒนาไปเป็นตัวเต็มวัยยังมีอัตราเพิ่มขึ้นไม่มากนัก อีกทั้งการเลี้ยงพ่อแม่พันธุ์ในสภาพที่ไม่เหมือนธรรมชาติทำให้พ่อแม่พันธุ์ลดประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ลงเนื่องจากความเครียด จึงมีความจำเป็นที่จะต้องใช้สารฮอร์โมนช่วยกระตุ้น แต่จะกระทำเช่นนั้นได้ต้องมีองค์ความรู้พื้นฐานและความเข้าใจเกี่ยวกับการควบคุมกระบวนการพัฒนาและการทำงานของระบบสืบพันธุ์ซึ่งควบคุมโดยระบบประสาทและฮอร์โมนจากระบบประสาท ฮอร์โมนที่ควบคุมการทำงานของระบบสืบพันธุ์เหล่านี้อาจถูกควบคุมอีกต่อหนึ่งโดยสารสื่อประสาท (neurotransmitters-NE) เช่น serotonin และ dopamine และ/หรือสารปรับสัญญาณประสาท (neuromodulator-NM) เช่น FMRF APGW amides และ GnRH สาร NE และ NM อาจเป็นสารสื่อกลาง (chemical mediators) ตัวแรกที่รับรู้การเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมภายนอก โดยเฉพาะอุณหภูมิ ความยาวของกลางวันต่อกลางคืน (photo period) ปริมาณอาหาร ฯลฯ ทั้งนี้เพื่อจะได้ควบคุมการหลั่งฮอร์โมนเพศและฮอร์โมนเร่งการเจริญเติบโตที่กระตุ้นให้สัตว์ทั้งสองชนิดปรับตัวเข้าสู่ช่วงการเจริญพันธุ์ (reproductive growth) หรือช่วงการเจริญเติบโตของร่างกาย (somatic growth) ให้เหมาะสมกับสภาวะแวดล้อม

หอยเป่าฮ็อก

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาลักษณะโครงสร้างของระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าฮ็อกและการกระจายของสารสื่อประสาท เซโรโทนิน (5-HT) และสารปรับสัญญาณประสาท gonadotropin-releasing hormone (GnRH) ซึ่งเป็นสารที่ผลิตโดยเซลล์ประสาทรับสัมผัสที่รับรู้การเปลี่ยนแปลงภายนอกที่มีอิทธิพลต่อการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ พบว่า 5-HT และ GnRH ส่วนใหญ่มีอยู่ในเซลล์ประสาทของปมประสาท cerebral และ pleuropedal โดยเซลล์เหล่านี้ไม่มีการรวมกลุ่มชัดเจน นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสาร 5-HT, GnRH และฮอร์โมนที่ควบคุมการสืบพันธุ์ในหอยเป่าฮ็อก โดยเฉพาะฮอร์โมนประสาทที่คุมการหลั่งเซลล์สืบพันธุ์ (abalone egg-laying hormone-aELH) ในหอยเป่าฮ็อกพันธุ์พื้นเมือง (*Halotis asinina*) โดยได้ทำการสังเคราะห์ aELH ด้วยวิธีพันธุวิศวกรรมแล้วนำไปฉีดกระตุ้นหอยพ่อแม่พันธุ์ พบว่าสารสื่อประสาทเซโรโทนิน (serotonin-5HT), GnRH และ aELH สามารถกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่กับเซลล์ไข่และการตกไข่ได้ ซึ่งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของแม่พันธุ์ที่เลี้ยงแบบกักขังได้ และถ้าหากนำไปฉีดในหอยวัยอ่อนอายุก่อน 4 เดือนทำให้ได้หอยเพศเมียมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสารปรับสัญญาณ APGW สามารถกระตุ้นการปล่อยเซลล์สุจิจากพ่อพันธุ์ได้ทั้งหมด ทำให้สะดวกต่อการกำหนดระยะเวลาปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียจากพ่อแม่พันธุ์ที่พร้อมกัน ทำให้สะดวกต่อการเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพื่อนำไปปฏิสนธิโดยวิธี *in vitro* fertilization โดยใช้อัตราส่วนไข่ต่อสุจิที่ได้ผลมากที่สุดคือ 1:100

การศึกษากลไกการลงเกาะ (settlement) ของตัวอ่อนของหอยเป่าฮ็อกพบว่า γ aminobutyric acid (GABA) 5 γ aminovaleric acid (SAVA) ที่ความเข้มข้น 1 μ M และ monosodium glutamate (MSG) ที่ความเข้มข้น 5 mM สามารถกระตุ้นการลงเกาะได้มากกว่า 50% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทำให้อัตราการลงเกาะและการอยู่รอดของตัวอ่อนหอยเป่าฮ็อก

เพิ่มขึ้นมาก โดยกลุ่มควบคุมที่มีการลงเกาะเพียง 10-15% องค์ความรู้ที่ได้จากงานวิจัยพื้นฐานดังกล่าวแล้วสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพิ่มประสิทธิภาพการเพาะเลี้ยงหอยเป่าฮือโดยเกษตรกรรายย่อยและการเพาะเลี้ยงระดับเชิงพาณิชย์ได้

กึ่งก้ามกราม

การหลังฮอร์โมนที่ควบคุมวงจรการสืบพันธุ์กับการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ และเซลล์สืบพันธุ์ของกึ่งก้ามกรามมีการส่งสัญญาณเป็นทอดๆ ผ่านเซลล์ประสาทลำดับแรกที่อยู่ใน optic lobe ซึ่งสร้างสารสื่อประสาท (neurotransmitters) ในกลุ่ม indolamine ได้แก่ เซโรโทนิน (serotonin or 5-hydroxytryptamine-5-HT) และสารสื่อประสาทในกลุ่ม catecholamines (dopamine-DA และ octopamine-OA) โดย 5-HT และ DA ทำหน้าที่ตรงกันข้าม การฉีด 5-HT ในกึ่งก้ามกรามที่ระดับ 2.5×10^{-5} - 2.5×10^{-7} mol/ตัว และ DA antagonist (spiperone-SP) ที่ระดับ 5.4×10^{-7} mol/ตัว ทำให้รังไข่พัฒนาเร็วขึ้นกว่าปกติ และมีการปล่อยไข่ออกมาในปริมาณและคุณภาพใกล้เคียงกับปกติ และยังทำให้ระยะการพัฒนาของเอมบริโอลดลงด้วย แต่การฉีด DA ในปริมาณใกล้เคียงกัน มีผลตรงกันข้าม พบว่า 5-HT และ DA มีการกระจายอยู่ในเกือบทุกส่วนของสมอง แต่จะมีความเข้มข้นสูงในปมประสาท thoracic และต่อมสืบพันธุ์ ระดับ 5-HT มีเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จากระยะที่ 1 ของวงจรรังไข่จนมีระดับสูงสุดในระยะที่ 4 ส่วน DA มีระดับความเข้มข้นที่สวนทางกัน

การออกฤทธิ์ของ 5-HT อาจถูกขยายสัญญาณด้วยสารปรับสัญญาณประสาท (neuromodulator) ซึ่งมักเป็นสารเปปไทด์ขนาดเล็กหรือ เอไมด์ โดยเฉพาะ gonadotropin-releasing hormone (GnRH) และ Enkephalin (Enk) ซึ่งพบว่าการฉีด GnRH ที่ระดับ 50-500 ng/gm น้ำหนักตัว หรือ GnRH agonist ที่ระดับ 1000 ng/gm น้ำหนักตัว สามารถกระตุ้นให้วงจรของการพัฒนารังไข่และการตกไข่เร็วขึ้นกว่าปกติ อีกทั้งมีปริมาณและคุณภาพของไข่ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม พบว่า GnRH มีการกระจายอยู่ในสมอง ปมประสาท thoracic และต่อมสืบพันธุ์

ฮอร์โมนที่เป็นสารออกฤทธิ์ระดับสุดท้ายคือ gonadotropins ซึ่งแบ่งเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่กระตุ้นการพัฒนาของต่อมเพศได้แก่ gonad-stimulating hormone (GSH) ซึ่งกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่และเซลล์ไข่, vitellogenin-stimulating ovarian hormone (VSOH) ซึ่งกระตุ้นการสร้างไข่ในเซลล์ไข่ ส่วนในเพศผู้มี androgenic gland hormone (AGH) ซึ่งกระตุ้นการพัฒนาของต่อมอัณฑะ ส่วนฮอร์โมนที่ห้ามการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ ได้แก่ gonad-inhibiting hormone (GIH) ซึ่งทำหน้าที่ตรงกันข้ามกับฮอร์โมนกลุ่มแรก นอกจากฮอร์โมนดังกล่าวเรายังพบว่าในกึ่งมีฮอร์โมนคล้ายๆ กับ abalone egg laying hormone (aELH) กระจายอยู่ในปมประสาท thoracic และรังไข่ การฉีดฮอร์โมน ELH ที่ระดับ 5-500 ng/gm น้ำหนักตัว ทำให้วงจรของการพัฒนารังไข่และการตกไข่ของกึ่งสั้นลงโดยมีการปล่อยไข่ในปริมาณและคุณภาพที่ปกติ เนื่องจากพบว่า ELH เป็นฮอร์โมนที่มีการอนุรักษ์สูงในกึ่งก้ามกราม กึ่งกุลาดำ และสัตว์พวก crustaceans ชนิดอื่นๆ เราจึงเชื่อว่า ELH เป็น gonadotropin ที่สำคัญมากตัวหนึ่งที่มีบทบาทในการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ ทั้งนี้เป็นไปได้ว่า ELH อาจเป็นหรือทำหน้าที่คล้าย GSH ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่มีผู้เสนอว่ามีการออกฤทธิ์กระตุ้นการพัฒนาของรังไข่ในกึ่ง แต่ยังไม่เคยมีผู้ใดสามารถสกัดฮอร์โมนดังกล่าวออกมาได้

การเลี้ยงในสภาพกักขังทำให้กึ่งเกิดความเครียดเป็นเหตุให้การพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์และการสืบพันธุ์ของพ่อ-แม่พันธุ์กึ่งลดลงจนกระทั่งอาจจะไม่มีเพศสัมพันธ์เลย ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าความเครียดมีผลกระทบต่อความสมดุลของฮอร์โมน gonadotropins โดยตรง การฉีด 5-HT และ/หรือ GnRH หรือแม้กระทั่งการให้ ELH โดยตรง สามารถกระตุ้นให้ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของพ่อ-แม่พันธุ์เพิ่มขึ้นได้ นอกจากนั้นการฉีดสารห้าม DA เช่น SP ช่วยเป็นปัจจัยเสริมที่ผลักดันให้มีการสร้างและหลัง gonadotropin ที่มีฤทธิ์กระตุ้นการพัฒนาต่อมสืบพันธุ์ และพฤติกรรมสืบพันธุ์เพิ่มขึ้นได้ ในทำนองเดียวกับการกระตุ้นตัวอ่อนทั้งสองเพศด้วยฮอร์โมนกำหนดเพศที่อยู่ในกลุ่ม insulin-like growth factor (IGF) และ/หรือ AGH และ/หรือ testosterone อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนเพศของลูกกึ่งที่เป็นเพศผู้มากขึ้นได้ ซึ่งจะทำให้การเลี้ยงแต่เพศผู้อย่างเดียว (male sex monoculture) เป็นไปได้ และให้ผลตอบแทนแก่เกษตรกรเพิ่มสูงขึ้น

เนื้อหางานวิจัย

โครงการวิจัย: การกระตุ้นด้วยฮอร์โมนเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพกระบวนการสืบพันธุ์ของหอยเป้าฮือและกึ่งก้ามกราม

Endocrine manipulation of the reproduction in the tropical abalone, *Haliotis asinina*, and the giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*

โครงการที่ 1 หอยเป้าฮือ

หัวข้อที่ 1. บทนำ

หอย *H. asinina* (รูปที่ 1A) มีขนาดใหญ่ที่สุดในกลุ่มของหอยเป้าฮือที่พบในฝั่งทะเลของประเทศไทย โดยมีขนาดโตเต็มที่ประมาณ 5x8 ซม. มีอัตราการเจริญเติบโตสูงสุด และมีขนาดเปลือกเล็กและอัตราส่วนเนื้อต่อเปลือกสูงสุด จึงเป็นที่ยอมรับว่าน่าจะเป็นชนิดที่ควรสนับสนุนให้เกษตรกรเลี้ยงทั้งในระดับครัวเรือน ระดับกลาง และระดับใหญ่เชิงพาณิชย์ หอยเป้าฮือชนิดนี้มักอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีน้ำขึ้นน้ำลงที่ระดับ 1-7 เมตร หอยเคลื่อนตัวไปช้า ๆ บนโขดหินหรือปะการังที่ตายแล้ว และมีสาหร่ายเกาะอยู่อย่างหนาแน่นซึ่งสาหร่ายที่หอยกินเป็นอาหารหลักคือสาหร่ายผมนางสกุล *Gracillaria* และ *Laminaria* ขณะนี้ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่ง คลองวาฬ ประจวบคีรีขันธ์ สามารถทำผสมเทียมและออกแบบระบบการเพาะเลี้ยงหอยบนบกแบบปิดที่ได้ผลดี แต่อย่างไรก็ตามการเลี้ยงหอยเป้าฮือโดยเกษตรกรรายย่อยยังไม่แพร่หลายนัก เนื่องจากมีปัญหาหลายอย่างโดยเฉพาะด้านเงินทุนและการตลาด ตลอดจนการแนะนำสินค้าให้ผู้บริโภครู้จักอย่างจริงจังและต่อเนื่อง อย่างไรก็ตามคิดว่าหอยเป้าฮือ *H. asinina* เป็นสินค้าที่มีศักยภาพสูง

การเพาะเลี้ยงหอยในสภาพกักขัง ซึ่งไม่เหมือนสภาพธรรมชาติทำให้พ่อแม่พันธุ์มีความเครียดสูง การเจริญเติบโตและความสมบูรณ์เพศลดลง การผลิตเซลล์สืบพันธุ์และอัตราการปฏิสนธิเพื่อให้กำเนิดตัวอ่อนก็ลดลงอย่างมากด้วย แม้แต่ในสภาพธรรมชาติอัตราการรอดของตัวอ่อนต่ำมาก โดยเฉพาะในช่วงไข่โคตเปลี่ยนเป็นตัวอ่อนระยะ trochophore และตัวอ่อนระยะ veliger และในช่วงการลงเกาะ (settlement) บนพื้นที่มีสาหร่ายปกคลุม และระยะเมตามอร์โฟซิส (metamorphosis) ไปเป็นหอยวัยอ่อน (juvenile) (รูปที่ 1C) โดยทั่วไปหอยวัยอ่อนที่อยู่รอด และมีโอกาสเจริญเติบโตต่อไปมีแค่ 2-5 % (รูปที่ 1D) ถ้าหากเราสามารถหาวิธีทำให้อัตราการลงเกาะ อัตราการเมตามอร์โฟซิส และอัตราการอยู่รอดสูงขึ้นก็จะช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ นอกจากนั้นแล้วการกระตุ้นพ่อแม่พันธุ์ที่เลี้ยงในสภาพกักขังโดยการให้สารอาหารและฮอร์โมนที่ควบคุมการสืบพันธุ์ในปริมาณที่เหมาะสมก็อาจช่วยเพิ่มความสมบูรณ์เพศได้ ซึ่งจะนำไปสู่การเพิ่มปริมาณเซลล์สืบพันธุ์ที่พ่อแม่พันธุ์ผลิตได้ ดังนั้นงานวิจัยพื้นฐานด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ โดยเฉพาะการสร้างองค์ความรู้และความเข้าใจเกี่ยวกับอวัยวะสืบพันธุ์ กระบวนการผลิตเซลล์สืบพันธุ์ การลงเกาะ การเมตามอร์โฟซิส รวมทั้งการควบคุมการสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตของหอยโดยระบบประสาทและฮอร์โมน น่าจะสามารถนำมาประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตหอยเป้าฮือได้



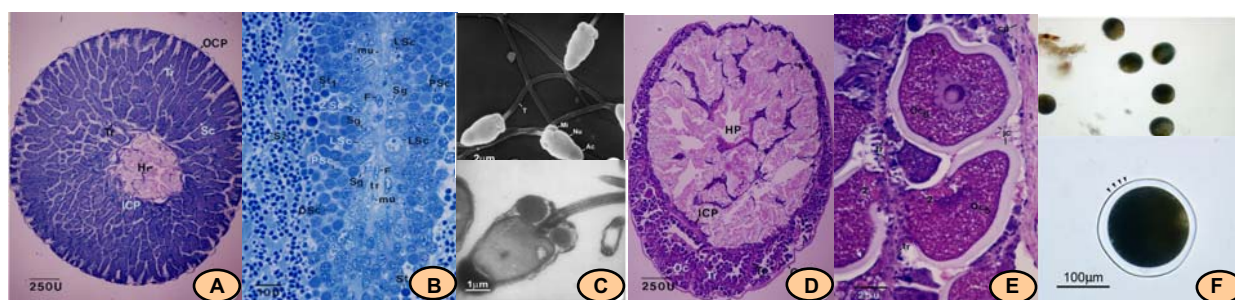
รูปที่ 1. หอยเป้าฮือ *H. asinina* ตัวเต็มวัย ด้านบน (A) ด้านล่าง (B) (C) วงจรชีวิตของหอยเป้าฮือ ซึ่งประกอบด้วยระยะไข่ที่ผสมแล้วหรือไข่โคต (zygote) บลาสตูล่า (blastula) ตัวอ่อน (larvae) ระยะ trochophore และ veliger หอยวัยอ่อน (spat หรือ juvenile) ระยะตัวเต็มวัยซึ่งผลิตเซลล์สืบพันธุ์เพื่อปฏิสนธิเป็นไข่โคต (D) กราฟการอยู่รอดในช่วงชีวิตต่างๆ ของหอยที่เจริญตามธรรมชาติ (ปรับจาก Fallu, 1991) (E) อวัยวะภายในหอยตัวผู้ (F) รังไข่ในหอยตัวเมีย

หัวข้อที่ 2. วงจรชีวิตและระบบสืบพันธุ์ของหอยเป้าฮือ

องค์ความรู้เกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ของหอยเป้าฮือมีค่อนข้างจำกัดและโดยมากก็มักจะได้จากการศึกษาในหอยเป้าฮือชนิดที่อาศัยอยู่ในเขตอบอุ่นและเขตร้อนซึ่งมีช่วงของวงจรชีวิตยาวกว่าพันธุ์ที่อยู่ในเขตร้อน คณะผู้ทำวิจัยได้ทำการศึกษาวงจรชีวิตและช่วงของการพัฒนาในระยะต่างๆ ของหอยเป้าฮือ *H. asinina* (รูปที่ 1 C และ ตารางที่ 1) พบว่าจากไข่ที่ถูกผสมแล้วคือ ระยะไซโกตถึงระยะ first cleavage ใช้เวลา 15 -20 นาที ถึงระยะ blastula 75-85 นาที ถึงระยะ trochophore 90-120 นาที ถึงระยะ late veliger 28-40 ชั่วโมง และลงเกาะเมื่อ 48-72 ชั่วโมง และกลายเป็นตัวอ่อนเมื่อ 3-6 วัน ในที่สุดจะเจริญเติบโตเป็นหอยวัยเยาว์ (juvenile) ขนาด 2 มม. เมื่อประมาณ 30 วัน

ตารางที่ 1 ขั้นตอน ขนาด และระยะเวลา ของการพัฒนาของหอยเป้าฮือ *H. asinina*

Stages	Diameter	Time
<i>Unfertilized eggs</i>	180 μm	0 sec
<i>Sperm attach to egg</i>	185 μm	20-30 sec
<i>Sperm acrosome reaction</i>	185 μm	~ 1 min
<i>Appearance of 1st polar body</i>	185 μm	8-9 min
<i>Appearance of 2nd polar body</i>	185 μm	10 min
<i>First cleavage</i>	220 μm	15-20 min
<i>Second cleavage</i>	195 μm	35-40 min
<i>Morula</i>	200 μm	45-55 min
<i>Blastulation</i>	192 μm	75-85 min
<i>Gastrulation</i>	192 μm	85-90 min
<i>Trochophore larvae</i>	210 μm	90-250 min
<i>Early veliger</i>	225 μm	5-24 hours
<i>Late veliger</i>	228 μm	28-40 hours
<i>Early creeping larvae</i>	230 μm	48-72 hours
<i>Creeping larvae</i>	300 μm	3-6 days
<i>Juvenile</i>	2 mm	30 days



รูปที่ 2 (A) ส่วนตัดขวางต่อมอวัยวะ (B) เซลล์สืบพันธุ์ชั้นต่างๆ ในอวัยวะ (C) เซลล์สเปิร์มโดยจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (D) ส่วนตัดขวางรังไข่ (E) เซลล์ไข่ในรังไข่ (F) ไข่ที่สุกและปล่อยออกมา

พบว่าหอยตัวผู้เริ่มมีต่อมอวัยวะชัดเจน (รูปที่ 1E, 2A) เมื่อมีอายุได้ 4 เดือน และตัวเมียมีรังไข่ (รูปที่ 1F, 2D) ปรากฏชัดเจนเมื่อมีอายุได้ 7 เดือน โดยพบว่าต่อมสืบพันธุ์ (gonad) ทั้งรังไข่และอวัยวะเป็นอวัยวะรูปกรวยห่อหุ้มด้วยตับและตับอ่อน (hepatopancreas) อยู่โดยรอบ (รูปที่ 1E, F) ต่อมสืบพันธุ์ถูกห่อหุ้มโดยถุง (capsule) ที่ประกอบด้วยเยื่อเกี่ยวพัน กล้ามเนื้อ และเส้นประสาท ภายในต่อมสืบพันธุ์ถูกแบ่งออกเป็นห้องเล็ก ๆ โดยแผ่นเยื่อเกี่ยวพัน (trabeculae) ที่ยื่นแผ่เข้าไปภายในต่อมจากถุงหุ้ม (รูปที่ 2A, D)

เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (male germ cells) แบ่งออกเป็น 12 ระยะ คือ spermatogonia, primary spermatocytes (6 ระยะ) secondary spermatocyte spermatids (3 ขั้น) (รูปที่ 2B) และเซลล์อสุจิ (spermatozoa) (รูปที่ 2C) ซึ่งมีหัวลักษณะเป็นรูปโคน มีอะโครโซม (acrosome) ลักษณะคล้ายถ้วยคว่ำปิดอยู่ด้านหน้า หางยาวและมีเฉพาะ axoneme ซึ่งประกอบด้วย microtubules จำนวน 9+2 หุ้มรอบโดยเยื่อหุ้มเซลล์ ที่ด้านท้ายของส่วนหัวมีไมโทคอนเดรียลักษณะเป็นก้อนกลมอยู่ 4-5 ก้อนเรียงต่อกันเป็นวงกลม ในนิวเคลียสของเซลล์อสุจิบรรจุโครมาตินซึ่งมีโปรตีน nucleosomal histones (H_{2A} , H_{2B} , H_3 , H_4) อยู่ครบและมีโปรตีนที่คล้าย protamines (PL proteins) อยู่ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้โครมาตินในนิวเคลียสหดตัวแน่นเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในสัตว์ชั้นสูง เซลล์อสุจิสามารถปฏิสนธิได้ทันทีหลังจากที่ถูกปล่อยออกมาจากหอยพ่อพันธุ์ ซึ่งแสดงว่ากระบวนการกระตุ้นอสุจิให้มีประสิทธิภาพ (sperm capacitation) เกิดขึ้นเรียบร้อยแล้วในต่อมอวัยวะและใช้เพียงน้ำทะเลเป็นตัวกระตุ้นเท่านั้น

เซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (female germ cells) แบ่งออกเป็น 6 ระยะ คือ oogonia (Og), และ primary oocytes ห้าชั้น (Oc_1 - Oc_5) เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียมีขนาดขยายใหญ่ขึ้นมาจาก 12 μm ในระยะ Og ถึง 140 μm ในระยะ Oc_5 ซึ่งมีชั้น jelly coat หนาที่ประกอบด้วยสารไกลโคโปรตีนหุ้มอยู่รอบ (รูปที่ 2E) หลังจาก Oc_5 ตกออกจากรังไข่และผสมกับเซลล์อสุจิก็จะเกิด first polar body เกิดขึ้นเมื่อ 8-9 นาที และ second polar body เกิดขึ้นเมื่อ 10 นาที หลังจากนั้นก็จะเกิด hatching envelope โดยการหนาตัวของชั้น vitelline envelope (รูปที่ 2F) ที่ป้องกันการเข้าผสมของอสุจิตัวอื่นๆ (polyspermy) พบว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับการทำผสมเทียมระหว่างไข่กับอสุจิคือ 1:100 ซึ่งเป็นสัดส่วนที่ทำให้ได้อัตราการปฏิสนธิสูงสุด และถ้าหากจะชักนำให้เกิด polyploidy ในหอยเป่าอื้อเพื่อให้ได้หอยตัวใหญ่ก็ควรชักนำภายใน 10 นาทีแรกหลังจากปฏิสนธิเพื่อป้องกันการเกิด polar bodies

(ดูรายละเอียดในเอกสารหมายเลข 1.2, 1.16, 1.25 และ 1.26 ในภาคผนวก)

หัวข้อที่ 3. ระบบประสาทและฮอร์โมนที่ควบคุมการสืบพันธุ์และการเจริญเติบโต

การพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ในหอยอยู่ภายใต้การควบคุมโดยระบบประสาทที่สร้างและหลั่งฮอร์โมนประสาท (neurohormones) มีการศึกษาเกี่ยวกับระบบประสาท สารสื่อประสาท ตลอดจนฮอร์โมนประสาทที่ควบคุมการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ การแยกเพศ ตลอดจนการเติบโตในหอยเป่าอื้อน้อยมาก องค์ความรู้ส่วนใหญ่ได้มาจากการศึกษาในหอย gastropods ชั้นสูงกว่าหอยเป่าอื้อคือ หอยกลุ่ม pulmonates โดยเฉพาะในหอยทาก *Lymnea stagnalis*, *Helix aspersa* และ *Achatina fulica* และในหอย gastropod กลุ่ม opisthobranchs เช่น *Aplysia spp.* โครงสร้างและการทำงานของระบบประสาทและฮอร์โมนประสาทในหอยเป่าอื้อน่าจะมีส่วนคล้ายคลึงกับในหอย gastropod สองประเภทที่กล่าวแล้วและน่าจะมีส่วนที่แตกต่างเป็นลักษณะเฉพาะด้วย ดังนั้นการวิจัยเพื่อสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับระบบประสาทของหอยว่ามีลักษณะเป็นอย่างไรมีฮอร์โมนประสาท (neurohormones) อะไรบ้างที่ควบคุมกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawning) การลงเกาะ (settlement) และเมตามอร์โฟซิส (metamorphosis) การจำแนกเพศ (sexual differentiation) และการเจริญเติบโต (growth) จะช่วยทำให้เราเข้าใจกลไกการควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตของหอย แล้วสามารถนำความรู้เหล่านั้นมาช่วยปรับปรุงแก้ไขจุดที่เป็น “คอขวด” ของการผลิตลูกหอยและหอยวัยอ่อนได้

ระบบประสาทและฮอร์โมนประสาทที่ควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ในหอย pulmonates และหอย opisthobranchs

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าองค์ความรู้ส่วนใหญ่ได้มาจากการศึกษาในหอยพวก pulmonates และ opisthobranchs เนื่องจากหอยพวก pulmonates มีระบบประสาทที่พัฒนามากที่สุดในกลุ่ม gastropods ด้วยกัน กล่าวคือเซลล์ประสาทและระบบประสาทมีการรวมศูนย์เป็นปมประสาท (ganglia) ขนาดใหญ่หลายปม ซึ่งติดต่อกันด้วยเส้นประสาท ทำหน้าที่คล้ายกับระบบประสาทกลางของสัตว์ชั้นสูง ปมประสาทเหล่านี้ มีอยู่เป็นคู่ ๆ ได้แก่ ปมประสาท tentacular, optic, cerebral, buccal, pleural, parietal และ pedal นอกจากนี้ยังมีปมประสาทเดี่ยวได้แก่ ปมประสาท abdominal หรือ visceral ganglia ปมประสาท 4 อันหลังมักเชื่อมกันเป็นปมเดี่ยว ปมประสาทเหล่านี้โยงต่อกันโดยเส้นประสาทซึ่งมีใยของเซลล์ประสาทที่มีตัวเซลล์อยู่ในปมประสาท

ในปมประสาทของหอยพวก pulmonate มีเซลล์ประสาท (neuron) ที่ปรับสภาพไปเป็น neurosecretory cells (NSC) ซึ่งทำหน้าที่สร้างและหลั่งฮอร์โมนประสาท (neurohormone) ที่ทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและกระบวนการสืบพันธุ์ต่าง ๆ NSC

เหล่านี้มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ๆ ในปมประสาท cerebral, pleural, parietal และ visceral (abdominal) ในปมประสาท cerebral มี NSC สองกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสร้างฮอร์โมนประสาทที่กระตุ้นระบบสืบพันธุ์เพศเมีย คือ dorsal bodies (DB) และ caudo-dorsal cells (CDC) ในหอย *Lymnaea stagnalis* ซึ่งเป็นหอยทากน้ำ (basommatophoran pulmonate) DB แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ lateral (LDB) และ medial (MDB) dorsal bodies นอกจากนี้ยังพบกลุ่ม NSC ซึ่งทำหน้าที่เช่นเดียวกันในเยื่อเกี่ยวพันที่หุ้มปมประสาท cerebral ของหอยทาก *Helix aspersa* ซึ่งเป็นหอยทากบก (stylommatophoran pulmonate) ที่เรียกว่า juxta-ganglionar cells DB ทำหน้าที่ผลิต dorsal body hormone (DBH) ซึ่งเป็น neuropeptide ที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 4,000-7,000 dalton DBH ควบคุมกระบวนการสร้างเซลล์ไข่ (oogenesis) และยังกระตุ้นการพัฒนาของท่อไข่และต่อมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ และการสร้างสาร galactogen ในท่อสืบพันธุ์เพศเมีย อีกนัยหนึ่งฮอร์โมนชนิดนี้ทำหน้าที่คล้ายกับ follicle-stimulating hormone (FSH) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง การสร้างและหลั่ง DBH ถูกยับยั้งโดย growth-promoting factor (insulin-like hormone-ILH) ซึ่งสร้างและหลั่งจากกลุ่ม NSC ที่มีชื่อว่า light green cells (LGC) ซึ่งเป็นกลุ่มเซลล์ส่วนใหญ่ในปมประสาท cerebral การสร้าง DBH ถูกกระตุ้นอีกทางหนึ่งโดยกลุ่ม NSC ใน lateral lobe (LL) ของปมประสาท cerebral ในเพศผู้ NSC ที่อยู่ใน LL สร้าง gonadal-stimulating hormone (GSH) ทำหน้าที่เสริมกับ optic ganglion hormone (OGH) ในการกระตุ้นการสร้างเซลล์สุจิและระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ฮอร์โมนประสาทจาก LL อาจยับยั้ง LGC ซึ่งมีผลทำให้ลดการหลั่ง ILH ลง ทั้งนี้เพื่อให้มีการควบคุมแบบย้อนกลับ (negative feedback loop) ระหว่างกลุ่ม NSC เหล่านี้ ทำให้เกิดการสลับช่วงและรักษาสมดุลระหว่างกระบวนการเจริญเติบโต (somatic growth) และกระบวนการสืบพันธุ์ (reproductive growth) นอกจากนี้เซลล์ในกลุ่ม NSC ของ DB อาจเกี่ยวข้องกับการผลิต ecdysteroid ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเจริญเติบโตและกระบวนการสืบพันธุ์แต่ยังมีหลักฐานสนับสนุนไม่ชัดเจนนัก

กลุ่ม caudo-dorsal cells (CDC) เป็นกลุ่ม NSC ที่อยู่ค่อนข้างด้านหลังของปมประสาท cerebral NSC กลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการสร้าง gonadotropin อีกชนิดหนึ่งที่เรียกว่า caudo-dorsal cell hormone (CDCH) เชื่อว่า NSC กลุ่มนี้ส่งเส้นประสาทไปที่ขอบของ cerebral commissure และปล่อยฮอร์โมน CDCH เข้าสู่ neurohemal organ ที่อยู่ในบริเวณนั้น CDCH ทำหน้าที่กระตุ้นการปล่อยไข่ (spawning) และมันอาจจะกระตุ้นระยะสุดท้ายของกระบวนการพัฒนาไข่ (oogenesis) เพื่อให้เซลล์ไข่พัฒนาเต็มที่เช่นการเกิด germinal vesicle breakdown (GVDB) ซึ่งทำให้ไข่สามารถปฏิสนธิกับเซลล์สุจิได้ ฮอร์โมนนี้จึงทำหน้าที่คล้าย luteinizing hormone (LH) ในสัตว์ชั้นสูง

ในหอยพวก opisthobranch (*Aplysia californica*) พบว่ามีฮอร์โมนคล้ายกับ CDCH อยู่ในปมประสาท visceral หรือ abdominal NSC เหล่านี้สร้างฮอร์โมนที่เรียกว่า egg-laying hormone (ELH) NSC เหล่านี้มีเซลล์ขนาดใหญ่เรียกว่า “bag cells” เชื่อกันว่า bag cells บางตัวยังส่งเส้นประสาทตรงไปที่ต่อมสืบพันธุ์ โดยอาจมีการหลั่งฮอร์โมนชนิดนี้ที่ปลายประสาทที่แทรกอยู่ในเยื่อเกี่ยวพันของต่อมสืบพันธุ์ ELH มีปริมาณและลำดับกรดอะมิโนคล้ายกับ CDCH ยิ่งไปกว่านั้นมีการรายงานว่าการสร้าง ELH ถูกควบคุมโดยยีนชุดเดียวกับที่ควบคุมการสร้าง CDCH

นอกจากนี้ยังมีฮอร์โมนที่ไม่ได้อยู่ในกลุ่ม peptide ที่อาจมีบทบาทในการควบคุมระบบสืบพันธุ์ของหอย pulmonates ซึ่งได้แก่ฮอร์โมนเพศในกลุ่ม sex steroids โดยเฉพาะ 5α -dihydrotestosterone และ 17β -estradiol และฮอร์โมนในกลุ่ม icosanoid เช่น prostaglandin (PG) โดยเฉพาะ PG-E และ PG-F ฮอร์โมนเพศอาจทำหน้าที่กระตุ้นการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์และลักษณะเพศร่วมกับ DBH และ CDCH เช่นเดียวกับในสัตว์ชั้นสูงแต่ยังไม่มีความชัดเจนที่ชี้บ่งแน่ชัดจึงน่าจะมีการวิจัยในประเด็นนี้ต่อไป

ความสัมพันธ์ระหว่างสารสื่อประสาท (neurotransmitters) สารขยายสัญญาณประสาท (neuromodulators) และฮอร์โมนประสาท (neurohormones)

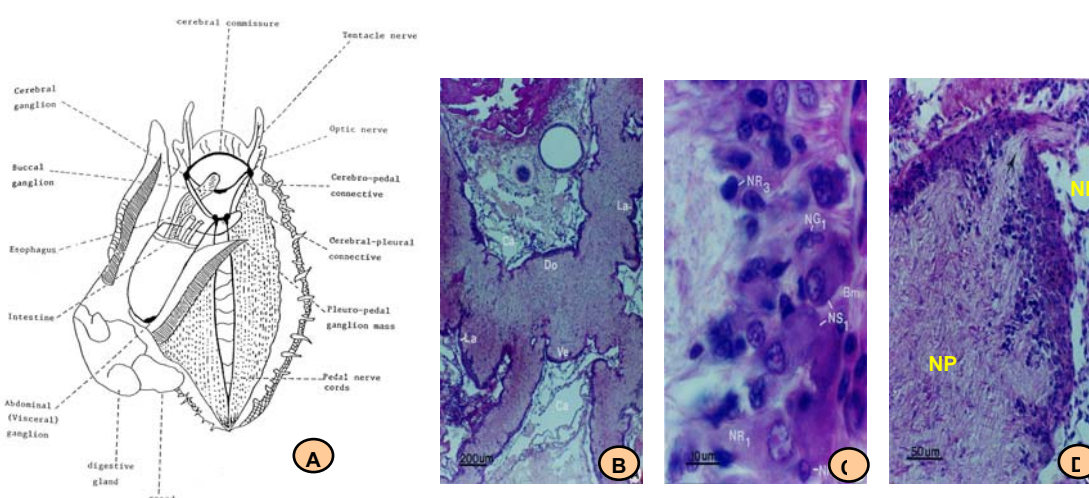
นอกจากฮอร์โมนประสาทและฮอร์โมนเพศที่กล่าวมาแล้ว ยังมีกลุ่มฮอร์โมนประสาทที่เป็นโมเลกุลขนาดเล็กอีกกลุ่มหนึ่งคือสารสื่อประสาท (neurotransmitters) ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ ได้แก่ serotonin (5-hydroxytryptamine, 5HT), dopamine (DA) octopamine (OA) gamma aminobutyric acid (GABA) และอีกกลุ่มหนึ่งคือสาร amides ขนาดเล็ก เช่น FMRF APGW และ GnRH ฯลฯ เป็นต้น พบว่ามี 5HT กระจายอยู่ทั่วไปในเซลล์ประสาทส่วนกลางของปมประสาท และเยื่อเกี่ยวพันรอบปมประสาท และในเยื่อเกี่ยวพันที่หุ้มต่อมสืบพันธุ์ของหอยพวก pulmonate และหอยสองฝา (bivalves) ได้มีการทดลองในหอยสองฝาค้นพบว่ากรด 5HT สามารถกระตุ้นการหลั่งเซลล์สืบพันธุ์ได้ ซึ่งก็ยังไม่สามารถอธิบายให้กระจ่างได้ว่า 5HT ทำให้เกิดการหลั่งเซลล์สืบพันธุ์ได้อย่างไร คาดกันว่า 5HT อาจทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทที่กระตุ้นให้เกิดการหลั่งฮอร์โมนตัวอื่นรวมทั้ง CDCH หรือ ELH และ PG ซึ่งอาจเป็น neurohormones ที่ทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นสุดท้ายซึ่งทำให้เกิดการตกไข่และพฤติกรรมที่เกี่ยวข้อง ยิ่งไปกว่านั้น 5HT น่าจะทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทขั้นต้น (first messenger) ในเซลล์ประสาทรับสัมผัสที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลางด้านหน้า ซึ่งทำหน้าที่รับสัญญาณจากสภาพแวดล้อมภายนอก เช่น สภาพของ

อาหารที่เหมาะสม ช่วงความยาวของแสงสว่าง และอุณหภูมิของน้ำทะเล ฯลฯ สภาวะแวดล้อมเหล่านี้มีอิทธิพลต่อการพัฒนาและการทำงานของระบบสืบพันธุ์ ในทางตรงข้ามสาร DA และพวก amides ขนาดเล็กที่อาจเป็นทั้งสารสื่อประสาทหรือสารปรับสัญญาณประสาท เช่น FMRF และ APGW ซึ่งกระจายอยู่ทั่วไปในระบบประสาทมีการออกฤทธิ์ตรงกันข้ามกับ 5HT และสามารถยับยั้งการหลั่งฮอร์โมนจาก DB และ CDC

ส่วนในเพศผู้ พบว่า optic gland ซึ่งอยู่ที่ฐานของ optic tentacle เป็นกลุ่ม NSC ที่จับเคลื่อนให้เกิดการจำแนกเป็นเพศผู้ optic gland ประกอบด้วย NSC ที่เรียก collar cell ซึ่งสร้างและหลั่ง optic gland hormone (OGH) ฮอร์โมนตัวนี้ทำหน้าที่กระตุ้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ใน ovotestis โดยทำงานร่วมกับ GSH ที่ผลิตจาก LL ส่วนฮอร์โมนที่จำแนกเพศเมียอาจประกอบด้วย DBH และ CDCH ซึ่งกระตุ้นการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียใน ovotestis และลักษณะเพศเมีย ในอนาคตคงต้องมีการวิจัยว่ามีฮอร์โมนเพศกลุ่มสาร steroids ได้แก่ testosterone และ estradiol กับ progesterone มีอยู่ในต่อมสืบพันธุ์ของหอยหรือไม่ และถ้ามีจะเกี่ยวข้องกับการจำแนกเพศอย่างไร

ระบบประสาทและฮอร์โมนประสาทที่ควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ในหอยเป่าฮื้อ

ระบบประสาทของหอยเป่าฮื้อมีการรวมศูนย์และการพัฒนาส่วนหน้าของระบบประสาท (cephalization) น้อยกว่าในพวก pulmonate ดังได้กล่าวมาแล้ว Crofts (1922) เป็นคนแรกที่ได้ศึกษาและอธิบายมหากายวิภาคของระบบประสาทในหอยเป่าฮื้อเขตอบอุ่นคือ *H. tuberculata* หอยเป่าฮื้อ *H. asinina* ก็มีระบบประสาทที่มีลักษณะโครงสร้างคล้ายกันกับของ *H. tuberculata* กล่าวคือมีระบบประสาทกลาง ซึ่งประกอบด้วยปมประสาทที่มีอยู่เป็นคู่ได้แก่ ปมประสาท buccal และปมประสาท cerebral ซึ่งโยงต่อกับปมประสาท pleuropedal โดย nerve connectives จากปมประสาท pleuropedal มีคู่ของ pedal nerve cord (PNC) ทอดไปกลางลำตัวสู่ทางด้านหลังตลอดความยาวของตัว มีเส้นประสาทงอกออกจาก PNC เป็นระยะ ๆ เพื่อไปเลี้ยงกล้ามเนื้อเท้า (pedal muscle) นอกจากนี้ยังมีเส้นประสาทจากปมประสาท pleuropedal ซึ่งมีลักษณะเป็นบ่วงคล้ายเลข 8 ทอดไปทางด้านหลังเพื่อเลี้ยงอวัยวะภายในรวมทั้งเส้นประสาทที่ไปเลี้ยงอวัยวะและต่อมสืบพันธุ์โดยตรง ที่ปลายสุดของบ่วงเส้นประสาทดังกล่าวมีปมประสาทขนาดเล็กที่เรียกว่าปมประสาท visceral หรือ abdominal (รูปที่ 3A)



รูปที่ 3 (A) ภาพมหากายวิภาคระบบประสาทของหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* (B) ภาพปมประสาท pleuropedal (C) ภาพชั้น cortex ในปมประสาท pleuropedal ประกอบด้วยเซลล์ประสาท (neurons-NR) และเซลล์หลั่งฮอร์โมนประสาท (neurosecretory cells-NS) (D) ส่วนกลางของปมประสาท (neuropil)-NP ประกอบด้วยใยประสาทที่รวมตัวออกไปเป็น

คณะผู้วิจัยได้ศึกษาทั้งมหากายวิภาคและจุลกายวิภาคของระบบประสาทในหอยเป่าฮื้อ *H. asinina* พบว่าปมประสาทแต่ละปมมีลักษณะทางจุลกายวิภาคคล้ายกัน กล่าวคือประกอบด้วยเปลือกนอก (cortex) (รูปที่ 3B, C) ที่มีตัวเซลล์ประสาท (neurons) 4 ชนิด เซลล์ที่เลี้ยง (neuroglia) 2 ชนิด และ NSC 3 ชนิดซึ่งกระจายอยู่ทั่วไป โดยไม่มีการรวมตัวเป็นกลุ่มชัดเจน เช่นเดียวกับ NSC ในปมประสาทของหอยพวก pulmonates ส่วนชั้นในของปมประสาท (medulla) มีกิ่งของเซลล์ประสาทและเซลล์ที่เลี้ยงสานกันอยู่ซึ่งเรียกว่า neuropil (รูปที่ 3D) ปมประสาท cerebral มีขนาดเล็กกว่าของหอย pulmonate และอาจทำหน้าที่หลักในการรับรู้สภาพแวดล้อมภายนอกโดยผ่านเส้นประสาทตา (optic tentacle) และหนวด (cephalic tentacle) และควบคุมการเจริญเติบโต มีการทดลองฉีดสารสกัดจากปมประสาท cerebral ให้แก่หอยเป่าฮื้อพบว่าหอยมีน้ำหนักเพิ่มขึ้นและมีการสะสมน้ำในตัวมากขึ้น นอกจากนี้มีการทดลองฉีดสารสกัดจากปมประสาท pleuropedal รวมกับสารสกัดจากปมประสาท visceral พบว่า

สามารถกระตุ้นต่อมสืบพันธุ์และทำให้เกิดการตกไข่ได้ แสดงว่าปมประสาททั้งสองเมื่อนำมาสกัดและฉีดรวมกันจะเพิ่มประสิทธิภาพในการกระตุ้นการตกไข่ซึ่งเป็นหลักฐานที่ส่อว่ามีฮอร์โมนกระตุ้นระบบสืบพันธุ์ (gonadotropin) อยู่ในปมประสาททั้งสอง อย่างไรก็ตามการผลิต gonadotropin อาจจะไม่ได้อยู่เฉพาะที่ปมประสาท pleuropedal และ visceral เท่านั้น เพราะเมื่อตัดปมประสาท cerebral ออกก็สามารถยับยั้งการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์และการจำแนกเพศ (sexual differentiation) ได้ที่ระดับหนึ่งด้วย นอกจากนี้ยังมีการรายงานว่ามี NSC อยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่มตามขอบของปมประสาท cerebral ซึ่งอาจหลังฮอร์โมน gonadotropin กลุ่ม NSC ดังกล่าวนี้อาจมีโครงสร้างเหมือนกับเซลล์ใน DB ของหอย pulmonate โดยสรุปแล้วจะเห็นได้ว่ามีการศึกษาค้นคว้าน้อยมากเกี่ยวกับโครงสร้างของระบบประสาทและฮอร์โมนประสาทที่เกี่ยวข้องในการควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ และการเจริญเติบโตของหอยเป่าอื้อ เมื่อเปรียบเทียบกับองค์ความรู้ในเรื่องเดียวกันที่ทราบแล้วในหอยพวก pulmonate และ opisthobranch ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องศึกษาโครงสร้างและหน้าที่ของระบบประสาทและฮอร์โมนประสาทของหอยเป่าอื้อในขั้นพื้นฐานต่อไป

หัวข้อที่ 4 การศึกษาฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (egg-laying hormone-ELH) และยีนที่ควบคุม

การศึกษาระดับโมเลกุลและยีนของฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ของหอยส่วนใหญ่มุ่งไปที่ฮอร์โมนซึ่งควบคุมการตกไข่ คือ egg-laying hormone (ELH) ของหอยพวก Aplysia และ caudodorsal cell hormone (CDCH) ของหอยพวก Lymnaea ฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้เป็น neuropeptides มีรายงานว่ามีการตกไข่และพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องถูกควบคุมโดยฮอร์โมนเหล่านี้ร่วมกับ neuropeptide ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กหลายตัว ซึ่งเกิดจากการตัดส่วน N-terminal ของ preprohormone ที่เป็นตัวตั้งต้น (precursors) ของทั้ง ELH และ CDCH

การศึกษาใน *A. californica* พบว่า ELH preprohormone มีลักษณะเป็นสายโพรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 271 ตัว ที่มี α -BCP, β -BC, δ -BCP, γ -BCP และ acidic peptide อยู่ทางด้าน amino end และตัว ELH อยู่ทางด้าน carboxy end ของ preprohormone ซึ่งถูกผลิตและหลั่งจาก bag cell (BC) ที่อยู่ในปมประสาท visceral นอกจากนั้นแล้วยังพบแบบ (isotype) อื่น ๆ ของ preprohormone ในตระกูล ELH ใน atrial gland ที่กระจายอยู่ตามท่อสืบพันธุ์ของเพศเมียซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 173 ตัว ฮอร์โมนดังกล่าวถูกหลั่งเข้าสู่ท่อไข่ของหอยและยังแตกตัวออกเป็น ELH กับ peptide A และ peptide B ฮอร์โมนกลุ่มนี้จึงมีโครงสร้างและทำหน้าที่โดยรวมเหมือนกับ ELH preprohormone ของ bag cells

Caudodorsal cell (CDC) ในปมประสาท cerebral ของ *L. stagnalis* ก็สร้าง preprohormone อย่างน้อยสองชนิด คือ prepro-CDCH I, prepro-CDCH II ต่อมาพบว่ามี isotype เพิ่มอีกคือ prepro-CDCH III นอกจากในกลุ่มเซลล์ CDC แล้วยังพบการแสดงออกของ CDCH gene family ภายในเซลล์ประสาทที่อยู่ในระบบประสาทส่วนกลางและส่วนนอก CDCH I preprohormone ประกอบด้วยกรดอะมิโน 259 ตัว หลังจากถูกตัดออกเป็นสั้น ๆ แล้วมันจะให้ peptide สั้น ๆ หลายตัวเช่น α -CDCH, β -CDCH, δ -CDCH, calfluxin, ϵ -peptide, γ -peptide และเปปไทด์ที่เป็น CDCH I ประกอบด้วยกรดอะมิโน 36 ตัว ซึ่งควบคุมการตกไข่โดยตรง ส่วน CDCH II ประกอบด้วยกรดอะมิโน 44 ตัว ซึ่งมีรูปแบบการเรียงตัวเหมือนกัน CDCH I แต่ยังไม่มีการทราบหน้าที่ของ CDCH II

ถึงแม้ว่า ELH preprohormone และ CDCH preprohormone มีความเหมือนกันน้อย (ประมาณ 28.2%) แต่ก็มีบริเวณเฉพาะที่ได้ถูกอนุรักษ์ไว้ถึง 51% คือส่วนที่เป็นฮอร์โมน ELH และ CDCH ที่อยู่ด้าน carboxyl terminal ซึ่งออกฤทธิ์เหมือนกัน คือสามารถกระตุ้นการตกไข่ในหอยทั้งสองกลุ่ม ส่วนเปปไทด์อื่นที่มาจาก N-terminal เช่น α -BCT และ α -CDCH ก็มีความเหมือนกัน 69% และมีหน้าที่กระตุ้น (auto excitation) ให้เซลล์ CDC หรือ bag cell ให้หลั่งฮอร์โมน ELH ออกมา

ฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ในหอยเป่าอื้อ

การศึกษาฮอร์โมนประสาทที่ควบคุมการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในหอยพวก prosobranch รวมทั้งหอยเป่าอื้อมีน้อยมาก การศึกษาด้านพันธุกรรมระดับโมเลกุลของ ELH ในหอยพวก opisthobranch และ pulmonate แสดงให้เห็นว่า ELH ยีนของหอยทั้งสองพวกมีโครงสร้างและส่วนอนุรักษ์ที่เหมือนกันมาก ดังนั้นจึงคาดว่าหอยเป่าอื้อน่าจะมียีนที่เหมือนกันซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการตกไข่รวมทั้งพฤติกรรมต่าง ๆ เมื่อไม่นานมานี้พบว่ามีการค้นพบ ELH และ CDCH อยู่ในปมประสาท cerebral ของหอยพวก prosobranch ซึ่งเป็นหลักฐานสนับสนุน การวิวัฒนาการที่มีการอนุรักษ์ของฮอร์โมนชนิดนี้ในหอย gastropods ทั้งหมด ได้มีการศึกษายีนที่กำกับ ELH ในหอยเป่าอื้อ *H. rubra* ที่อยู่ในเขตอบอุ่นพบว่ายีนที่กำกับ abalone egg-laying hormone (aELH) มีความเหมือนกับ ELH ของ Aplysia ถึง 56% และมีความเหมือนกับ Lymnaea CDCH ถึง 97% คณะวิจัยของเราได้พบว่า aELH ใน *H. asinina* มีความเหมือนกับ aELH ของ *H. rubra* ถึง 99% ซึ่งแสดงว่าการอนุรักษ์ของฮอร์โมนชนิดนี้สูงมากแม้ในหอยเป่าอื้อต่าง

species กัน นอกจากนั้นเราได้สังเคราะห์โปรตีน aELH แล้วผลิตแอนติบอดีในหนูทดลอง เมื่อนำแอนติบอดีต่อ aELH ไปย้อมหาตำแหน่ง aELH ในเนื้อเยื่อของ *H.asinina* พบว่ามีฮอร์โมนชนิดนี้กระจายอยู่ใน NSC ของปมประสาท cerebral pleuropedal และ visceral โดยมีจำนวน NSC ที่สร้าง aELH มากที่สุดในปมประสาท pleuropedal นอกจากนั้นยังพบ aELH ในรังไข่และอวัยวะของหอย *H.asinina* โดยเฉพาะในเยื่อเกี่ยวพันที่เป็นถุงหุ้ม (capsule) และแผ่น trabeculae โดยพบว่า aELH มีปริมาณสูงใน granular cells ที่กระจายอยู่ในโครงเยื่อเกี่ยวพัน เซลล์ดังกล่าวอาจเป็นแหล่งผลิต aELH ในรังไข่ ซึ่งอาจเป็น isotype ที่แตกต่างจากที่พบในปมประสาทก็ได้ นอกจากนั้นคณะวิจัยของเราซึ่งพบว่า ELH-like peptide อยู่ในปมประสาทโดยเฉพาะใน supraesophageal ganglion หรือสมองของกุ้งกุลาดำและกุ้งก้ามกราม ซึ่งแสดงว่าฮอร์โมนชนิดนี้มีอยู่ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นและมีการอนุรักษ์ของโมเลกุลอีกด้วย ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า ELH อาจทำหน้าที่เช่นเดียวกันในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่อยู่ใน phylum ต่าง ๆ

(ดูรายละเอียดในเอกสารหมายเลข 1.3, 1.4 ในภาคผนวก)

Serotonin (5-HT) และฮอร์โมนประสาทอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสืบพันธุ์ในหอยเป่าฮือ

มีรายงานจำนวนมากที่เกี่ยวกับการศึกษาบทบาทของ 5HT ในการควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ของหอยพวก pulmonate และหอยสองฝา แต่ในหอยเป่าฮือมีงานวิจัยทางด้านนี้น้อยมาก เพียงแต่มีรายงานว่า 5HT กระจายอยู่ในเส้นประสาทและเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ระหว่างปมประสาทของหอยพวก prosobranch บางชนิด คณะวิจัยของเราพบว่า 5HT กระจายอยู่ในปมประสาท cerebral และ pleuropedal และในเยื่อเกี่ยวพันที่เป็นโครงและถุงหุ้มของต่อมสืบพันธุ์ซึ่งมีเส้นประสาทไปเลี้ยงเป็นจำนวนมาก มีรายงานว่าถ้านำหอยเป่าฮือที่อยู่ในเขตอบอุ่นเช่น *H. discus hannai* แช่ในน้ำทะเลที่มี hydrogen peroxide หรือน้ำทะเลที่ถูกฉายโดยแสง UV พบว่าสามารถกระตุ้นให้หอยตกไข่ได้ การตกไข่ดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากการกระตุ้นให้มีการหลั่งเซลล์ไข่อย่างรวดเร็วโดย prostaglandin และ aELH ที่สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อรังไข่ที่มีปริมาณสูง ฮอร์โมนดังกล่าวอาจไปกระตุ้นการหดตัวของเซลล์กล้ามเนื้อที่อยู่บนเยื่อเกี่ยวพันที่ทำหน้าที่เป็นโครงและเป็นถุงหุ้มของต่อมสืบพันธุ์ ทำให้มีการปล่อยที่ไม่เป็นธรรมชาติของไข่ทั้งที่เจริญเต็มที่และยังเจริญไม่เต็มที่ออกจากรังไข่ คณะวิจัยของเราได้พบว่า 5-HT เป็นโมเลกุลตัวกลางที่สามารถทำให้เกิดการตกไข่ในหอยเป่าฮือได้ ดังนั้น 5HT อาจเป็นตัวกระตุ้นระดับต้นในกระบวนการตกไข่ที่ควบคุมการปล่อย aELH และ prostaglandins อีกต่อหนึ่ง นอกจากนั้นแล้ว 5HT อาจควบคุมการปรับสภาพ (differentiation) และการเจริญเติบโตในช่วงสุดท้ายของไข่ (oocyte maturation) เนื่องจากพบว่า 5HT อยู่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไข่ขั้นสุดท้ายในปริมาณสูง การศึกษาในหอย opisthobranch และหอยสองฝาซึ่งพบว่า 5HT ก็มีอิทธิพลต่อการพัฒนาขั้นสุดท้ายของไข่ดังกล่าวแล้วเช่นกัน

นอกเหนือจาก aELH, 5HT และ prostaglandin แล้ว ยังมีฮอร์โมนประสาทตัวอื่น ๆ ที่อาจมีบทบาทเกี่ยวข้องกับการปรับสภาพและการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ และอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์กับการตกไข่ เช่น octopamine, FMRF และ APGW amide คณะวิจัยของเราพบว่า FMRF และ APGW amides สามารถกระตุ้นการหลั่งอสุจิในพ่อพันธุ์ได้ถึง 100% ในขณะที่ amide ดังกล่าวไม่สามารถกระตุ้นการตกไข่ในแม่พันธุ์ได้ ดังนั้นในแง่ของการประยุกต์ใช้เราอาจนำ aELH และ 5HT ไปฉีดกระตุ้นหอยแม่พันธุ์ให้ตกไข่และใช้ APGW ฉีดกระตุ้นพ่อพันธุ์ให้ปล่อยอสุจิในช่วงเวลาที่ตรงกันได้ ซึ่งจะช่วยให้การเก็บเซลล์สืบพันธุ์สะดวกขึ้นและสามารถผลิตตัวอ่อนได้มากขึ้น

(ดูรายละเอียดในเอกสารหมายเลข 1.14, 1.24 ในภาคผนวก)

หัวข้อที่ 5 ฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการพัฒนาของตัวอ่อน

ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง การเจริญเติบโตและเมตาบอลิซึมที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตนั้นถูกควบคุมโดยฮอร์โมนเปปไทด์หลายชนิด ได้แก่ growth hormone กับ prolactin ที่ผลิตจากต่อมใต้สมองและ insulin ที่ผลิตจากตับอ่อน thyroid hormone และ androgen ก็มีส่วนในการกระตุ้นการเจริญเติบโตด้วย ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังก็พบว่าฮอร์โมนมีความสัมพันธ์ต่อกระบวนการเจริญเติบโตและกระบวนการเมตาบอลิซึมเช่นเดียวกัน อาทิเช่นในสัตว์พวก arthropods และ crustaceans มีฮอร์โมน 2 ชนิด คือ juvenile hormone และ ecdysone ที่ควบคุมการเพิ่มน้ำหนักตัวของสัตว์ ในสัตว์ตระกูลหอยที่มีวิวัฒนาการต่ำสุดเช่น *Crepidula fornicata* พบว่าถ้าตัดปมประสาท cerebral ออกจะทำให้ฮอร์โมนกระตุ้นการเจริญเติบโตลดลงและส่งผลให้อัตราการเติบโตลดลงอย่างรวดเร็ว ฮอร์โมนนี้สามารถถูกกระตุ้นให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นมาได้ใหม่ และสัตว์เองก็มีอัตราการเจริญเติบโต

เพิ่มขึ้นเมื่อมีการฝังปมประสาท cerebral กลับเข้าไปในตัวหอยตามเดิม จากผลการทดลองดังกล่าวสามารถสรุปได้ว่าภายในปมประสาท cerebral อาจจะมีเซลล์ประสาทที่สามารถผลิตฮอร์โมนที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตในสัตว์ชนิดนี้ได้ ต่อมาได้มีการศึกษาโดยใช้วิธีการที่คล้ายกันในหอย *Lymnaea stagnalis* ซึ่งเป็นหอยที่มีวิวัฒนาการสูงสุดในพวก gastropod การตัด NSC กลุ่ม light green cell (LGC) ออกทำให้หอยหากเจริญเติบโตช้าลง แต่การเจริญเติบโตกลับสู่สภาวะปกติเมื่อมีการฝังเซลล์กลุ่มนี้กลับเข้าไปที่ตัวหอยตามเดิม จึงสรุปได้ว่าฮอร์โมนจาก LGC น่าจะเป็นฮอร์โมนที่ควบคุมการเจริญเติบโตของร่างกายซึ่งมีคุณสมบัติที่คล้ายกับ growth hormone ของสัตว์ชั้นสูง ได้มีการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มฮอร์โมนที่กระตุ้นการเจริญเติบโตของสัตว์มีกระดูกสันหลัง อาทิเช่น insulin, human insulin growth factor I (h-IGFI), human epidermal growth factor (h-EGF) และ fibroblast growth factor (FGF) ต่อกิจกรรมหรือการเคลื่อนไหวของเซลล์เม็ดเลือดที่นำมาเพาะเลี้ยงจากหอยเป่าฮือ *H. tuberculata*, เซลล์เยื่อหุ้ม (mantle cells) และเซลล์บุผิวระบบย่อยอาหาร (digestive cells) จากหอยสองฝา *Pecten maximus* เมื่อวัดการนำเข้า thymidine และ leucine ที่ติดฉลากด้วยทริเทียม (³H-thymidine, ³H-leucine) ในเซลล์เพื่อติดตามการสังเคราะห์ DNA และโปรตีนตามลำดับ พบว่า insulin ทำให้เกิดการนำเข้าของทั้ง ³H-thymidine และ ³H-leucine ในเซลล์ทุกชนิดดังกล่าวแล้วในอัตราที่สูง ในขณะที่ฮอร์โมนชนิดอื่น ๆ ทำให้เกิดการนำเข้าของทั้ง ³H-thymidine และ ³H-leucine ในอัตราที่ต่ำกว่ามาก ข้อมูลเหล่านี้เป็นหลักฐานที่แสดงว่าฮอร์โมนในกลุ่ม growth hormones โดยเฉพาะ insulin มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของเซลล์จากหอย ต่อมาได้มีการศึกษาคุณลักษณะของฮอร์โมนในสกุล insulin ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังอื่น ๆ อีกหลายชนิด เช่น แมลง หนอนตัวกลม (nematodes) และหอยต่าง ๆ พบว่าฮอร์โมนกลุ่มนี้มีลักษณะคล้ายคลึงกันมากถูกจัดให้อยู่ในกลุ่ม “insulin-related peptides (IRP)” เมื่อศึกษาด้วยกรรมวิธี immunocytochemistry ในสัตว์สายพันธุ์ต่าง ๆ โดยเฉพาะในแมลง และหอย โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ insulin ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม พบว่ามี IRP อยู่ในเซลล์ NSC ของ pars intercerebralis ของสมองแมลง และพบ IRP ทั้งในระบบประสาทและระบบย่อยอาหารของหอยสองฝาและหอยหาก *L. stagnalis* โดยเฉพาะที่กลุ่มเซลล์ LGC ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าในสัตว์พวกหอย IRP เป็นฮอร์โมนหลักที่ควบคุมการเจริญเติบโต ซึ่งฮอร์โมนดังกล่าวส่วนใหญ่จะถูกผลิตขึ้นจากเซลล์ LGC ในปมประสาท cerebral และเซลล์ในระบบย่อยอาหารที่ยังไม่สามารถบ่งชี้ตัวตนได้

จากการศึกษาโครงสร้างหลักระดับโมเลกุลของ insulin และยีนของ preproinsulin รวมถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ cDNA ในสัตว์มีกระดูกสันหลังหลาย species พบว่า insulin จากระดับปลาไปจนถึงระดับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม มีโครงสร้างที่มีการอนุรักษ์สูงมาก โครงสร้างของ insulin ประกอบด้วยสาย polypeptide 2 สาย ได้แก่ สาย A และ สาย B เชื่อมต่อกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ โปรตีนเบื้องต้น หรือ preproinsulin มีลักษณะเป็น polypeptide สายเดี่ยวที่ประกอบด้วยส่วนของลำดับกรดอะมิโนสาย A, สาย B, สาย C และสายเปปไทด์ที่เป็นตัวสัญญาณ (signal peptide) ซึ่งจะถูกตัดออกระหว่างกระบวนการขนถ่ายเปปไทด์นี้ผ่าน endoplasmic reticulum (ER) และ Golgi complex ซึ่งเมื่อสายเปปไทด์ผ่านออกนอกเซลล์ดังกล่าวแล้วโมเลกุลก็จะถูกปรับเป็น proinsulin ซึ่งเป็นเปปไทด์ที่จะถูกปรับเป็น insulin ต่อไป

การศึกษาลักษณะโครงสร้างเต็มของ IRP ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังได้มีขึ้นครั้งแรกในตัวไหม ปรากฏว่าเปปไทด์ IRP มีลักษณะโครงสร้างคล้าย insulin ของสัตว์มีกระดูกสันหลังมาก ซึ่งต่อมาได้ถูกตั้งชื่อว่า “Bombyxin” โปรตีนชนิดนี้ผลิตโดยเซลล์ NSC 4 คู่ ที่อยู่ทางด้านหลังของส่วน pars intercerebralis ของสมองในตัวไหม และมีน้ำหนักโมเลกุล 5 kDa การศึกษาโครงสร้างของ IRP ในแมลงหริ่ง *Drosophila* พบว่ามี IRP เปปไทด์อยู่ 7 ชนิด ซึ่งเรียกว่า *Drosophila* insulin like peptides 1-7 (DILP 1-7) สายเปปไทด์เหล่านี้มีโครงสร้างที่มีความคล้ายคลึงกับโปรตีนแม่แบบในกลุ่ม insulin ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมาก

ในสัตว์ตระกูลหอยได้มีการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเปปไทด์ IRP เช่นกัน โดยส่วนใหญ่มีการศึกษาในหอยหาก *Lymnaea stagnalis* ซึ่งผลของการศึกษาพบว่ามีเปปไทด์อยู่ 7 ตัว ที่มีลักษณะคล้ายกับ insulin ซึ่งเรียกว่า mollusc insulin-related peptides (MIP I-VII) ซึ่งมีเพียง 5 ตัวเท่านั้นที่มีการศึกษาลงลึกถึงระดับยีน ได้แก่ MIP I-III, V, VII ซึ่งสามารถพบและแยกได้จากเซลล์ประสาท LGC ในปมประสาท cerebral ส่วนเปปไทด์ MIP IV และ VI เป็นโปรตีนที่พบในเซลล์บุผิวของระบบย่อยอาหาร

ดังนั้นเปปไทด์ดังกล่าวอาจเป็น isotype ที่ต่างกัน ทั้งนี้แต่ละแบบอาจมีบทบาทและหน้าที่ในการควบคุมการเจริญเติบโตและกระบวนการเมตาบอลิซึมในเนื้อเยื่อเฉพาะอย่าง ในหอยเป้าฮ้อ *H. asinina* คณะวิจัยของเราได้ทำการศึกษาเบื้องต้นและพบว่าสามารถใช้แอนติบอดีต่อ human growth hormone (GH) แสดงการกระจายตัวของฮอร์โมนที่เหมือน GH ใน NSC ของปมประสาท cerebral และ pleuropedal ซึ่งอาจเป็นปมประสาทหลักที่ควบคุมการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของหอยกลุ่มนี้ นอกจากนี้ยังพบฮอร์โมนที่เหมือน GH ในเซลล์เยื่อบุผิวลำไส้และเซลล์ของตับ-ตับอ่อน (hepatopancreas) ในชั้นดินของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้ (spermatocytes) และเพศเมีย (oocytes) จากการศึกษด้วยวิธี immunoblotting พบว่าแถบโปรตีนที่ย้อมติดโดย Anti-GH จากเนื้อเยื่อต่างๆดังกล่าวแล้วอยู่ที่น้ำหนักโมเลกุล 45 และ 110 kDa ซึ่งอาจเป็น isoforms ของ GH ในหอยเป้าฮ้อ

(ดูรายละเอียดในเอกสารหมายเลข 2.16 ในภาคผนวก)

หัวข้อที่ 6. การลงเกาะ (settlement) และเมตามอร์โฟซิส (metamorphosis) ในหอยเป้าฮ้อ

หลังจากปฏิสนธิ ไซโกตของหอย *H. asinina* พัฒนาอย่างรวดเร็วจนกลายเป็นตัวอ่อนวัยน้ำระยะ trochophore ภายใน 1.5-2 ชั่วโมง และระยะ veliger ภายใน 5-24 ชั่วโมง ซึ่งพร้อมจะลงเกาะภายใน 2-3 วัน เมื่อถึงจุดนี้ตัวอ่อนจะมีปฏิกิริยาตอบสนองต่อสัญญาณเคมีที่มาจากน้ำทำให้เกิดการลงเกาะ โดยตัวอ่อนจะหยุดว่ายน้ำแล้วลงเกาะบนผิวของพื้นที่ลงเกาะ (substrate) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวเรียกว่าการลงเกาะ (settlement) (รูปที่ 4B) ต่อมาตัวอ่อนจะสลัดซิเลียออกไปแล้วค่อยๆ เปลี่ยนสภาพไปเป็นหอยตัวเล็กๆ ซึ่งเรียกว่าการเมตามอร์โฟซิส (metamorphosis) การลงเกาะเป็นพฤติกรรมที่ย้อนกลับได้ ถ้าหากตัวอ่อนพบว่าพื้นที่ที่มันลงเกาะไม่เหมาะสม แต่เมื่อตัวอ่อนลงเกาะแล้วกระบวนการเมตามอร์โฟซิสต้องเกิดต่อไปโดยไม่สามารถย้อนกลับได้ เมื่อถึงระยะนี้หอยก็เริ่มเปลี่ยนวงจรชีวิตจากช่วงกินแพลงตอนเป็นอาหาร (planktonic phase) เข้าสู่ช่วงกินสาหร่ายเป็นอาหาร (benthic phase) ช่วงการลงเกาะและการเมตามอร์โฟซิสเป็นระยะ “คอขวด” ของกระบวนการผลิตหอยเป้าฮ้อ โดยจะเห็นว่าจากระยะไซโกตมีตัวอ่อนเพียง 20% เท่านั้นที่ลงเกาะได้ และจากจำนวนนี้ไม่เกิน 10% ที่ผ่านกระบวนการเมตามอร์โฟซิส และในที่สุดมีเพียง 2-5% เท่านั้นที่จะกลายเป็นหอยวัยอ่อนที่พัฒนาต่อไปได้ (รูปที่ 1D) ดังนั้นการเข้าใจกลไกควบคุมกระบวนการลงเกาะและเมตามอร์โฟซิส ซึ่งเป็นกระบวนการที่ควบคุมด้วยสารสื่อประสาทและฮอร์โมน น่าจะนำไปประยุกต์ใช้เพื่อให้สามารถผลิตตัวอ่อนและลูกหอยให้มีอัตราการรอดเพิ่มขึ้น

กลไกของการลงเกาะและการเมตามอร์โฟซิส

ในสภาพธรรมชาติปัจจัยหลักที่ชักนำให้เกิดการลงเกาะมีอยู่ 4 ปัจจัยคือ (1) สาหร่ายที่เคลือบอยู่บนพื้นที่ลงเกาะซึ่งอาจเป็นก้อนหินหรือปะการังที่ตายแล้วซึ่งเรียกว่าสาหร่ายคลุมปะการัง (coralline algae) (2) สารเมือก (mucus) ที่ขับออกจากพ่อแม่พันธุ์ขณะเคลื่อนไปบนพื้นที่ลงเกาะ (3) จุลินทรีย์ที่ปะปนอยู่กับสาหร่ายคลุมปะการัง โดยเฉพาะแผ่นสาหร่ายไดอะตอม (diatom) ที่เคลือบอยู่บนพื้นที่ลงเกาะ (4) สารเคมีที่ปล่อยออกมาจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ของสาหร่ายและจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ปะปนกันบนพื้นที่ลงเกาะ นอกจากปัจจัยภายนอกที่เป็นตัวชักนำแล้ว ปัจจัยภายในตัวอ่อนของหอยเองก็มีส่วนผลักดันให้ตัวอ่อนลงเกาะได้ เนื่องจากพบว่าอัตราการลงเกาะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอายุของตัวอ่อน veliger ทั้งนี้เป็นเพราะเมื่อตัวอ่อนมีอายุมากขึ้นสารไข่ที่สะสมไว้ในตัวอ่อนลดน้อยลงจึงเป็นปัจจัยที่ผลักดันให้ตัวอ่อนจำเป็นต้องลงเกาะ ดังนั้นอาจสรุปได้ว่าตัวอ่อนมีโปรแกรมทางพันธุกรรมที่บังคับให้มันลงเกาะอยู่แล้ว โดยสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมดังกล่าวข้างต้นเป็นตัวชักนำให้มันลงเกาะเร็วขึ้น

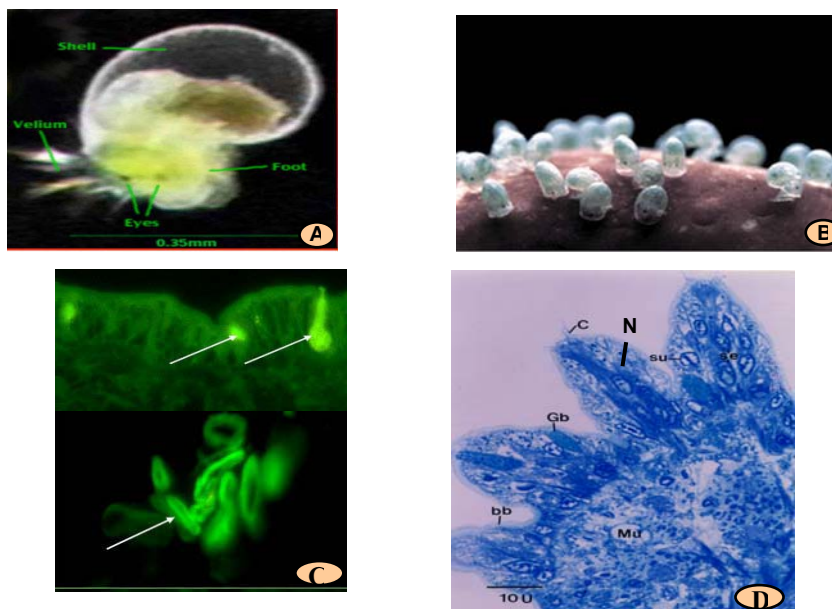
GABA เป็นสารชักนำการลงเกาะและเมตามอร์โฟซิส

GABA ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่งที่สามารถกระตุ้นให้ตัวอ่อน veliger (รูปที่ 4A) ลงเกาะได้ซึ่งเป็นปฏิกิริยาจำเพาะ เนื่องจากสารสื่อประสาทชนิดอื่นไม่สามารถเลียนแบบ GABA ได้ GABA จึงเป็นตัวกระตุ้นจำเพาะสำหรับการลงเกาะ ส่วนการเมตามอร์โฟซิสอาจถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณต่อเนื่องที่มาจากแผ่นสาหร่ายที่เคลือบพื้นที่ลงเกาะซึ่งมีจุลินทรีย์ปะปนอยู่

และจากสารเมือกของตัวเต็มวัย สมมติฐานที่ได้ถูกนำเสนออีกคือ GABA เป็นสารที่มาจากกรดอะมิโนจึงน่าจะมีโครงสร้างคล้ายกับกรดอะมิโนที่ปล่อยออกมาจากแผ่นสาหร่ายปะการัง ซึ่งสามารถจับกับตัวรับ (chemo-receptor) ที่อยู่บนผิวของตัวอ่อน การจับกันระหว่าง GABA และตัวรับสามารถกระตุ้นสัญญาณประสาทที่ควบคุมการว่ายน้ำของตัวอ่อน veliger ทำให้มันหยุดว่ายน้ำแล้วลงเกาะและสับดิเซียให้หลุดไป พบว่ามีสารสกัดจากสาหร่ายปะการังที่สามารถแข่งขันและขัดขวางการลงเกาะที่ชักนำด้วยสาร GABA ได้คือ gamma aminovaleric acid (5 AVA) ซึ่งถูกปล่อยออกมาจากสาหร่าย Hydrolithon samoense สาร 5 AVA สามารถกระตุ้นการลงเกาะของตัวอ่อนได้เช่นเดียวกับ GABA ที่ความเข้มข้น 1-2 เท่า พบว่ามีสาร 5 AVA อยู่ในสาหร่ายเคลือบปะการังสูงถึง 0.72 มก/ก.ของน้ำหนักแห้ง ถึงแม้ไม่พบ GABA ในสาหร่ายแต่การทดลองของกลุ่มวิจัยของเราพบว่ามี GABA อยู่ในสารเมือกจากหอยตัวเต็มวัยปริมาณสูงถึง 0.68 มก/ก สารเมือกที่น่าจะมี GABA อยู่สามารถชักนำการลงเกาะของตัวอ่อน *H. asinina* ได้สูงถึง 30 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระดับ 10 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้เรายังพบว่าการใช้ 5 AVA ที่ความเข้มข้น 1 μM สามารถชักนำการลงเกาะได้สูงถึง 60-70% เมื่อเวลาผ่านไป 72 ชั่วโมง ในขณะที่ GABA ที่ความเข้มข้น 1 μM สามารถชักนำการลงเกาะได้ 50-60% และผงชูรสซึ่งประกอบด้วย monosodium glutamate ก็สามารถชักนำการลงเกาะได้เช่นกันถึงแม้จะมีเปอร์เซ็นต์ต่ำกว่า (ประมาณ 50%) เมื่อเทียบกับ GABA ที่ความเข้มข้นเท่ากัน

แหล่งที่สร้างสาร GABA ในหอยตัวเต็มวัยน่าจะเป็นเซลล์ผลิตสารเมือก (mucus cells) ที่กระจายอยู่ในเยื่อหุ้มรอบตัวหอย (mantle layer) (รูปที่ 4C) และจากเซลล์บุผิวของหนวด (tentacle) ของหอย นอกจากนั้นยังพบว่ามีปริมาณ GABA สูงมากในเซลล์ประสาทบุผิว (neuroepithelial cells) (รูปที่ 4D) ของ cephalic และ epipodial tentacles โดยเฉพาะบริเวณที่อยู่ในตุ่มรับสัญญาณ (sensory papillae) เซลล์สร้างสารเมือกอาจเป็นแหล่งสร้างและปล่อย GABA เพื่อออกไปกระตุ้นตัวอ่อนและหอยตัวอื่นให้มีปฏิกิริยาตอบสนอง ในขณะเดียวกัน GABA จากหอยตัวอื่นหรือจากแหล่งอาหารก็อาจจับกับตัวรับในเซลล์ประสาทบุผิวในตุ่มรับสัญญาณเพื่อกระตุ้นให้หอยเคลื่อนเข้าสู่แหล่งอาหารและเข้าไปหากกลุ่มหอยตัวอื่นๆ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่านอกจากสามารถชักนำให้ตัวอ่อนลงเกาะได้แล้ว GABA อาจเป็นหนึ่งในฟีโรโมน (pheromone) ที่ทำหน้าที่ดึงดูดให้หอยเคลื่อนเข้าหาแหล่งอาหารและเข้าสู่สังคมหอยชนิดเดียวกัน เพื่อเกิดการปฏิสัมพันธ์ทางสังคมและการสืบพันธุ์ ซึ่งควรมีการศึกษาในประเด็นนี้ต่อไป

สารในกลุ่ม GABA ดังที่กล่าวสามารถออกฤทธิ์ได้โดยการจับกับตัวรับ (GABA receptor, GABA-R) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังมี GABA-R อยู่ 2 ชนิด คือ GABA-R_A และ GABA-R_B ส่วนในสัตว์ประเภท mollusc พบว่า GABA-R แตกต่างจากตัวรับทั้งสองชนิดของสัตว์ชั้นสูงเนื่องจากตัวห้าม (inhibitors) ของ GABA-R ในสัตว์ชั้นสูง เช่น bicuculline picrotoxin และ phaclofen ไม่สามารถห้าม GABA ในการออกฤทธิ์ชักนำการลงเกาะของตัวอ่อนต่างๆ ที่ตัวห้ามทั้งสามตัวนี้สามารถขัดขวางการทำงานของ GABA-R ทั้งสองชนิดในสัตว์ชั้นสูงได้โดยสิ้นเชิง ดังนั้นการวิเคราะห์ชนิดของ GABA-R ของสัตว์พวก mollusc โดยเฉพาะในหอยเป่าอื้อ การศึกษาตำแหน่งและการกระจายของ GABA-R ในตัวอ่อนและในหอยตัวเต็มวัยเป็นโจทย์วิจัยที่ควรศึกษาอย่างยิ่ง สมมติฐานที่เราเชื่อว่าเป็นไปได้สูงคือน่าจะมี GABA-R อยู่ที่เซลล์ประสาทบุผิว (neuroepithelial cells) ในตุ่มรับความรู้สึกที่กระจายอยู่บนหนวดและผิวหนังของหอยตัวเต็มวัย และในผิวของตัวอ่อน veligers ซึ่งคณะวิจัยของเรากำลังทำการศึกษาอยู่ คาดว่าการวิจัยในเรื่องดังกล่าวนี้จะทำให้เกิดองค์ความรู้ขึ้นมากที่สามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มผลผลิตของหอยเป่าอื้อทั้งในระดับเศรษฐกิจพอเพียงและระดับเชิงพาณิชย์ต่อไปได้



รูปที่ 4(A) ตัวอ่อนวัยน้ำระยะ veliger (B) ตัวอ่อน veliger ลงเกาะ (C) สาร GABA ที่ปรากฏในเซลล์ผลิตสารเมือกในชั้น mantle ของตัวเต็มวัย (บน) และที่ปล่อยออกไปกับสารเมือก (ล่าง) (D) คู่มรับความรู้สึกที่มีเซลล์ประสาทนิวโร (neuroepithelial cell-NC) แทรกอยู่ ซึ่งเป็นแหล่งที่มี GABA อยู่ด้วย

(ดูรายละเอียดในเอกสารหมายเลข 1.13 และ 1.15 ในภาคผนวก)

หัวข้อที่ 7. การศึกษาบทบาทของฮอร์โมน aELH และ GnRH ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และพัฒนาการของต่อมเพศและเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าอื้อตัวอ่อน

การกระตุ้นการเจริญเติบโตและการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าอื้อตัวอ่อนด้วยฮอร์โมน aELH และ GnRH

การทดลองนี้ใช้หอยเป่าอื้ออายุประมาณ 4 เดือน มีความยาวของเปลือกหอยเฉลี่ย 1.18 ± 0.062 เซนติเมตร และน้ำหนัก 0.33 ± 0.08 กรัม โดยแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 10 กลุ่ม กลุ่มละ 150 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดสารละลาย

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดด้วยสารตัวทำลายที่ไม่มีฮอร์โมน (normal saline solution)

กลุ่มที่ 3 และ 4 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดด้วยสารประสาทฮอร์โมน aELH ที่ ความเข้มข้น 20 และ 200 ng/g body weight (BW) ตามลำดับ

กลุ่มที่ 5 และ 6 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดด้วยสาร buserelin ซึ่งเป็น mammalian GnRH agonist ที่ ความเข้มข้น 20 และ 200 ng/g BW ตามลำดับ

กลุ่มที่ 7 และ 8 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดด้วยสาร octopus GnRH ที่ ความเข้มข้น 20 และ 200 ng/g BW ตามลำดับ

กลุ่มที่ 9 และ 10 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดด้วยสาร tunicate-I GnRH ที่ ความเข้มข้น 20 และ 200 ng/g BW ตามลำดับ

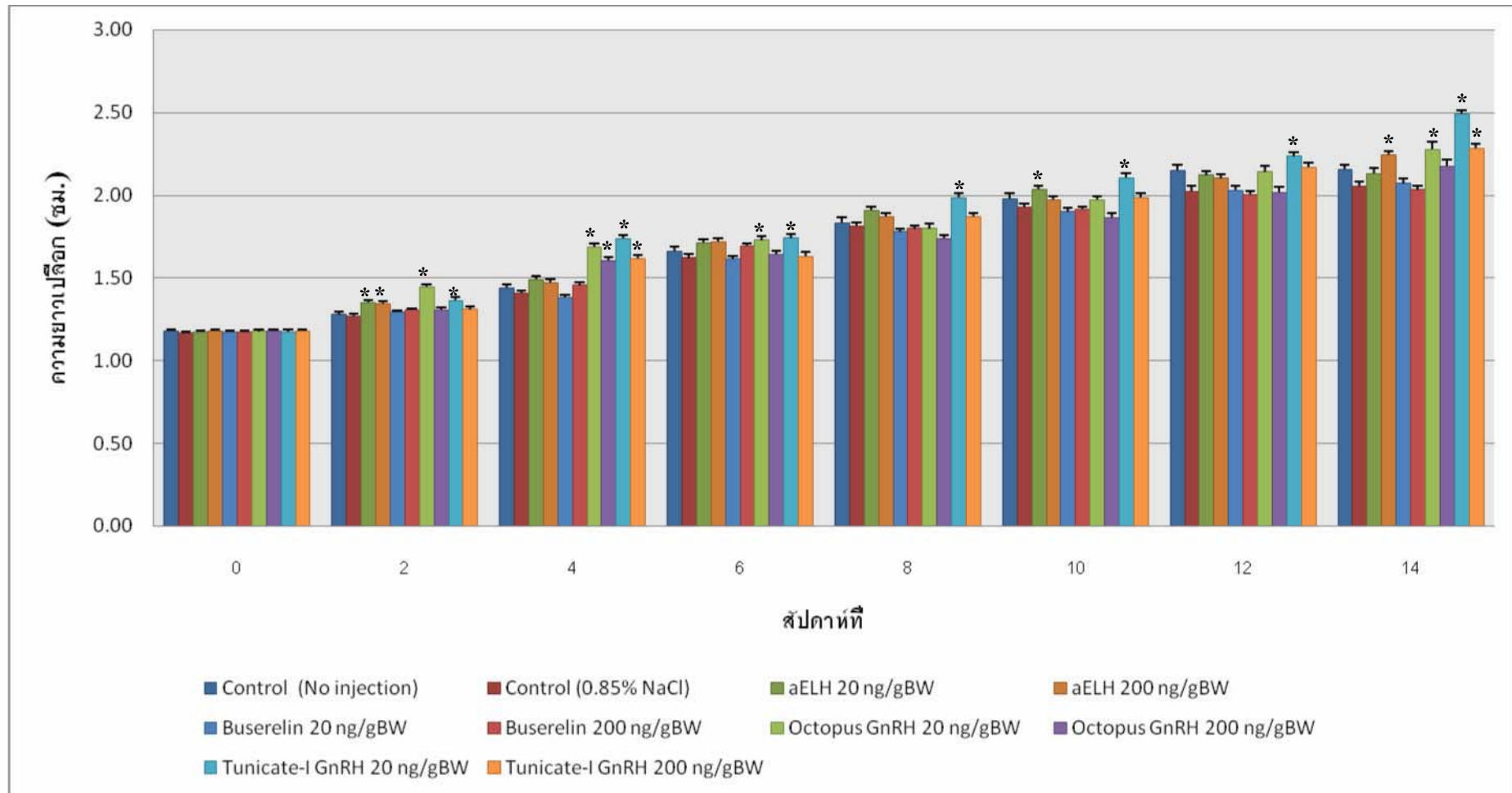
โดยที่สัตว์ทดลองจะถูกฉีดกระตุ้นทุก 7 วัน เป็นจำนวน 14 ครั้ง โดยฉีดเข้าไปตรงบริเวณกล้ามเนื้อเท้าของสัตว์ทดลอง การวัดผลการทดลองใช้ข้อมูล 2 ส่วน คือ 1. การวัดผลการกระตุ้นการเจริญเติบโต ซึ่งทำโดย การวัดความยาวของเปลือกหอย และการชั่งน้ำหนักตัวหอยจำนวน 50 ตัวทุก 2 สัปดาห์ ซึ่งค่าที่ได้จากการวัด จะถูกนำมาหาค่าทางสถิติและประเมินการเจริญเติบโตเทียบกับกลุ่มควบคุม 2. การวัดผลการกระตุ้นการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ (รังไข่และอัณฑะ) ซึ่งทำโดยการเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อของตัวอ่อนหอยจำนวน 10 ตัวในทุก 2 สัปดาห์ จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัณฑะและรังไข่ และดูการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา

ผลการทดลอง

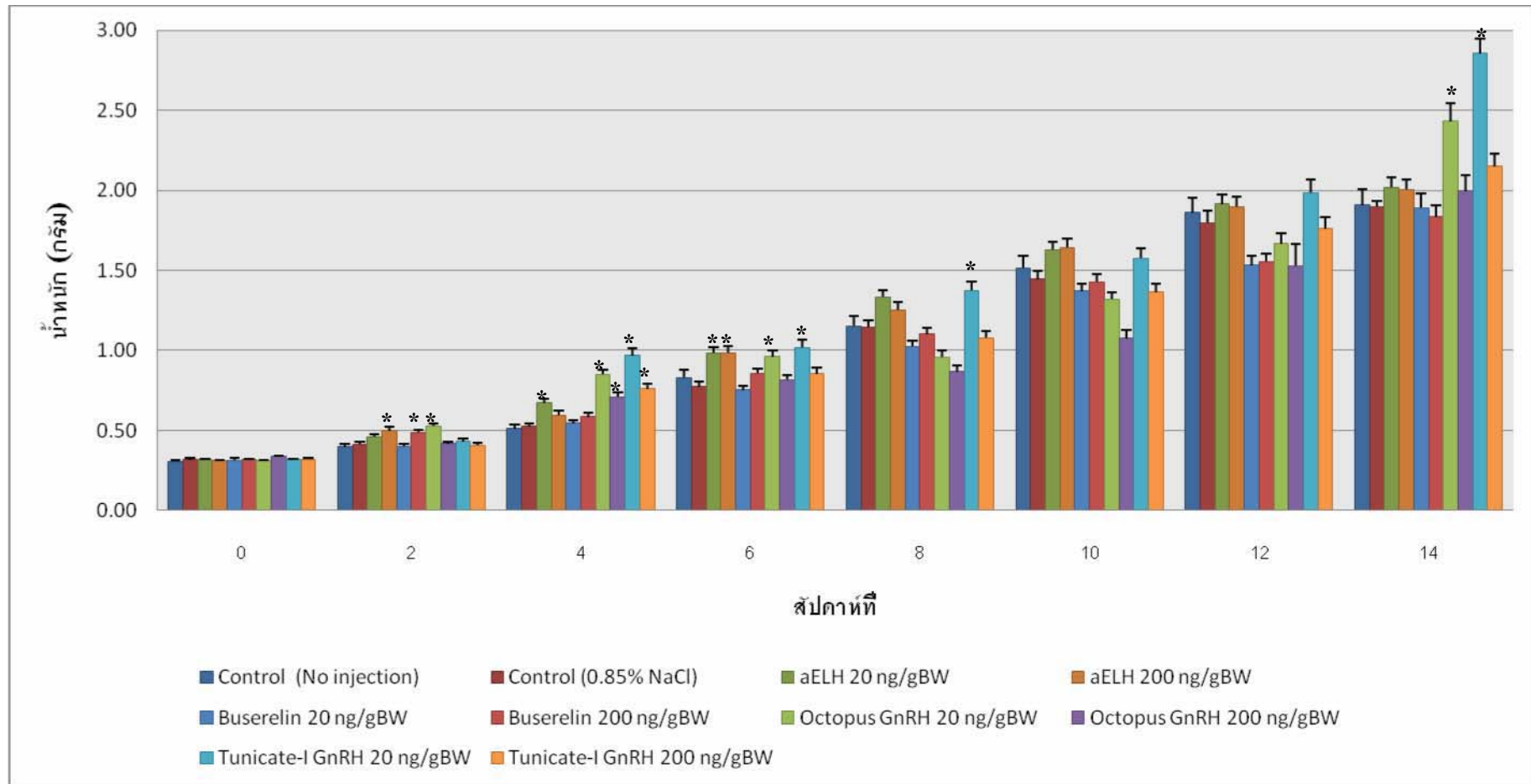
จากแผนภูมิแสดงผลการวัดความยาวเปลือกและชั่งน้ำหนักของหอยเป่าที่ถูกระตุ้นด้วยสารชนิดต่างๆเป็นเวลา 14 สัปดาห์ (รูปที่ 5 และ 6) พบว่า กลุ่มทดลองที่ถูกระตุ้นด้วยสาร aELH ในแต่ละสัปดาห์ ส่วนใหญ่มีการเจริญเติบโตไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม ทั้งความยาวเปลือกและน้ำหนักตัวหอย ส่วนกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วยสาร busserelin และ octopus GnRH ปริมาณ 20 และ 200 ng/g BW ในแต่ละสัปดาห์พบว่าการเจริญของความยาวเปลือกไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่มีผลทำให้น้ำหนักตัวหอยลดลงหลังจากถูกระตุ้นไป 6 สัปดาห์ ซึ่งต่างจากกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย tunicate-I GnRH ปริมาณ 20 ng/g BW ในแต่ละสัปดาห์พบว่ามีผลทำให้เกิดการเจริญของความยาวเปลือกและน้ำหนักตัวเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนในกลุ่มการทดลองที่ฉีดด้วย tunicate-I GnRH ที่ระดับ 200 ng/g BW พบว่าการเจริญของความยาวเปลือกไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่มีผลทำให้น้ำหนักตัวหอยลดลงหลังจากถูกระตุ้นไป 6 สัปดาห์

จากการศึกษาลักษณะทางเนื้อเยื่อวิทยาของต่อมสืบพันธุ์ของหอยตัวอ่อนที่ถูกระตุ้นด้วยสารชนิดต่างๆ เป็นเวลา 14 สัปดาห์ สามารถสรุปผลการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ได้ดังตารางที่ 2 และ 3 พบว่าก่อนการทดลอง หอยทุกกลุ่มยังไม่มีพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ พบแต่ช่องว่างที่จะบรรจุต่อมสืบพันธุ์ (gonadal cavity) บริเวณรอบ hepatopancreas และพบกลุ่มเซลล์ที่สร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันรอบๆบริเวณช่องว่าง (รูปที่ 7B, D และ F) จากนั้นในสัปดาห์ที่ 6 (หอยมีอายุประมาณ 5 เดือนครึ่ง) เริ่มพบการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ระยะเริ่มแรก ในหอยกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารตัวทำละลาย (normal saline solution) และ กลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย tunicate-I GnRH ปริมาณ 20 ng/g BW ส่วนในหอยกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย aELH และ busserelin ที่ความเข้มข้น 20 และ 200 ng/gBW พบว่าการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียอย่างรวดเร็ว โดยพบการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์จำนวนมาก ในขณะที่กลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดสาร และกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วยสาร octopus GnRH ปริมาณ 20 และ 200 ng/gBW และ tunicate-I GnRH ปริมาณ 200 ng/gBW เริ่มพบการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในสัปดาห์ที่ 8 หลังจากการทดลอง แต่พบหอยจำนวนน้อยกว่ากลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย aELH และ busserelin จากนั้นหอยในทุกกลุ่มการทดลองมีการพัฒนาต่อมสืบพันธุ์ และเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียมากขึ้นเรื่อยๆ จนถึงในสัปดาห์ที่ 14 (รูปที่ 8 – 10) ซึ่งเป็นสัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง พบว่ากลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย aELH ทั้งสองความเข้มข้นคือ 20 และ 200 ng/gBW มีผลทำให้เกิดการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ไปเป็นเพศเมียในจำนวนที่มากกว่าเพศผู้ เมื่อเปรียบเทียบกับทุกกลุ่มการทดลอง ส่วนการทดลองที่ฉีดด้วย busserelin, octopus GnRH และ tunicate-I GnRH พบว่าทำให้เกิดการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ได้ทั้งเพศผู้และเพศเมียในจำนวนที่ไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าสาร aELH ที่ปริมาณเพียง 20 ng/gBW มีผลกระตุ้นการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์และเซลล์สืบพันธุ์ไปเป็นเพศเมียได้มากกว่าเพศผู้ และไม่มีผลกระทบต่อเจริญเติบโตทั้งความยาวเปลือกและน้ำหนักตัวของหอย ส่วนสาร busserelin, octopus GnRH และ tunicate-I GnRH มีผลทำให้เกิดการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ไปเป็นทั้งเพศผู้และเพศเมียได้เท่าๆกัน และมีผลทำให้การเจริญเติบโตโดยเฉพาะของน้ำหนักตัวหอยลดลง แต่เมื่อใช้สาร tunicate-I GnRH กระตุ้นในปริมาณน้อย คือ 20 ng/gBW สามารถเพิ่มการเจริญเติบโตได้ทั้งความยาวเปลือกและน้ำหนักตัวของหอย



รูปที่ 5 แผนภูมิแสดงความยาวเปลือกของหอยเป่าฮือในช่วงอายุ 4 เดือน หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร aELH, buserelin, octopus GnRH และ tunicate-I GnRH ที่ความเข้มข้น 20 และ 200 ng/gBW เป็นเวลา 14 สัปดาห์เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (เครื่องหมายดอกจันแสดงกลุ่มทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, บาร์ แสดงค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานเฉลี่ย; s.e.m.)



รูปที่ 6 แผนภูมิแสดงการเพิ่มน้ำหนักตัวหอยเป่าสีในช่วงอายุ 4 เดือน หลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร aELH, buserelin, octopus GnRH และ tunicate-I GnRH ที่ความเข้มข้น 20 และ 200 ng/gBW เป็นเวลา 14 สัปดาห์ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (เครื่องหมายดอกจันแสดงกลุ่มทดลองที่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงผลการกระตุ้นการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ในหอยเป่าฮือตัวอ่อนอายุ 4 เดือนที่ฉีดกระตุ้นด้วยสาร aELH เป็นเวลา 14 สัปดาห์

กลุ่ม	กลุ่มควบคุม						กลุ่มทดลอง					
	ไม่ฉีดสาร			ฉีดด้วยสารตัวทำละลาย (NaCl)			ELH 20 ng/gBW			ELH 200 ng/gBW		
สัปดาห์ที่	ไม่พัฒนา (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	ไม่พัฒนา (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	ไม่พัฒนา (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)	ไม่พัฒนา (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศเมีย (ตัว)
0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
2	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
4	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
6	10	0	0	8	1	1	5	1	4	6	1	3
8	8	1	1	7	1	2	5	1	4	3	3	4
10	8	1	1	6	2	2	3	1	6	1	2	7
12	4	2	4	6	1	3	1	3	6	3	2	5
14	4	4	2	2	6	2	3	1	6	1	2	7

ตารางที่ 3 แสดงผลการกระตุ้นการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ในหอยเป่าฉีดตัวอ่อนด้วยสาร buserelin, octopus GnRH และ tunicate-I GnRH

กลุ่ม สัปดาห์ที่	กลุ่มทดลอง																	
	Buserelin 20 ng/gBW			Buserelin 200 ng/gBW			Octopus GnRH 20 ng/gBW			Octopus GnRH 200 ng/gBW			Tunicate-I GnRH 20 ng/gBW			Tunicate-I GnRH 200 ng/gBW		
	ไม่พัฒนา (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศ เมีย (ตัว)	ไม่ พัฒนา (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศ เมีย (ตัว)	ไม่ พัฒนา (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศ เมีย (ตัว)	ไม่ พัฒนา (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศ เมีย (ตัว)	ไม่ พัฒนา (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศ เมีย (ตัว)	ไม่ พัฒนา (ตัว)	เพศผู้ (ตัว)	เพศ เมีย (ตัว)
0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
2	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
4	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0	10	0	0
6	6	2	2	5	3	2	10	0	0	10	0	0	8	0	2	10	0	0
8	6	1	3	6	2	2	8	1	1	9	1	0	6	2	2	8	0	2
10	6	2	2	3	4	3	7	1	2	8	1	1	8	0	2	7	0	3
12	2	3	5	5	1	4	5	1	4	7	1	2	5	3	2	5	4	1
14	2	4	4	3	2	5	6	3	1	4	2	4	3	6	1	5	2	3

รูปที่ 7 ภาพจุลทรรศน์ธรรมดา ย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin แสดงต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอาย 4 เดือน ก่อนการทดลอง

A-B) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดสาร แสดงตำแหน่ง gonadal cavity (GC) รอบ hepatopancreas และกลุ่มเซลล์ที่สร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณรอบๆช่องว่าง (ลูกศร)

C-D) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารตัวทำละลาย NaCl แสดงกลุ่มเซลล์ที่สร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (หัวลูกศร) ล้อมรอบ hepatopancreas และภายใน gonadal cavity (GC)

E-F) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย aELH 20 ng/g BW แสดงกลุ่มเซลล์ (หัวลูกศร) ที่เนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณเชื่อม (Cp) รอบ hepatopancreas

รูปที่ 8 ภาพจุลทรรศน์ธรรมดา ย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin แสดงการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ในหอยเป่าอาย 4 เดือนภายหลังที่ฉีดกระตุ้นด้วย aELH เป็นเวลา 14 สัปดาห์

A-B) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดสาร แสดงการพัฒนาของอวัยวะ และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะเริ่มแรก (spermatogonia; Sg) เซลล์สืบพันธุ์ระยะต้น (spermatocytes; Sc) และเซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatid (St).

C-D) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารตัวทำละลาย NaCl แสดงการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียจากระยะเริ่มแรกไปเป็น เซลล์สืบพันธุ์ระยะ stage II oocyte (Oc2) และระยะ stage III oocyte (Oc3) มากขึ้น

E-F) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย aELH 20 ng/g BW แสดงการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียและมีการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะเริ่มแรก (Og) และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ stage I oocyte (Oc1)

รูปที่ 9 ภาพจุลทรรศน์ธรรมดา ย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin แสดงการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ในหอยเป่าอาย 4 เดือน หลังจากการฉีดกระตุ้นด้วย aELH และ buserelin เป็นเวลา 14 สัปดาห์

A-B) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย aELH 200 ng/g BW แสดงการพัฒนาของรังไข่ขนาดใหญ่ขึ้น (Go) และมีการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ stage I oocyte (ลูกศร) มากขึ้น

C-D) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย buserelin 20 ng/g BW แสดงการพัฒนาของรังไข่ และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ stage I oocyte (Oc1)

E-F) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย buserelin 200 ng/g BW แสดงการพัฒนาของอวัยวะมีขนาดใหญ่ขึ้น (Go) และมีการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะเริ่มแรก (spermatogonia; Sg), เซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatocytes (Sc) และเซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatid (St) จำนวนมาก

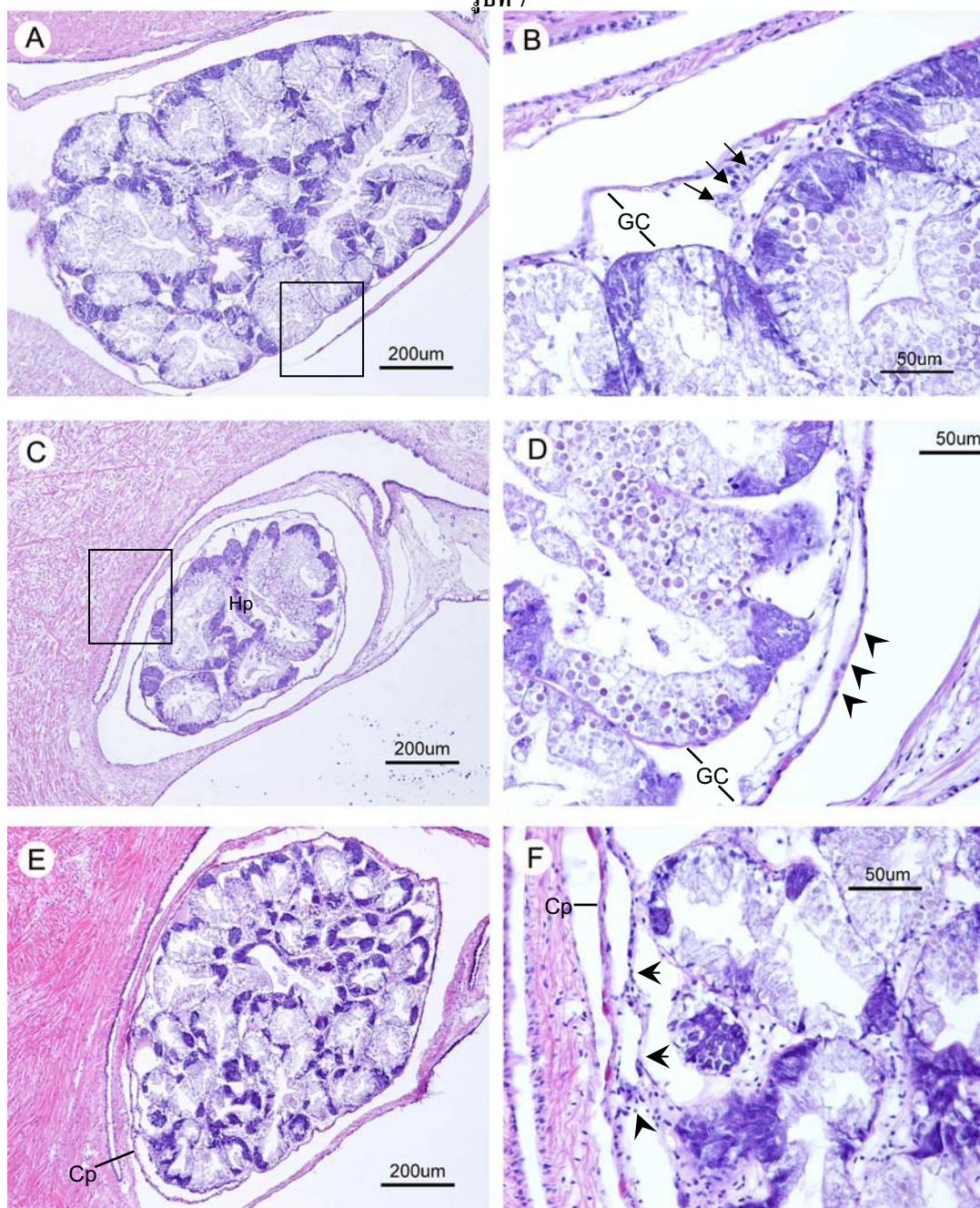
รูปที่ 10 ภาพจุลทรรศน์ธรรมดา ย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin แสดงการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในหอยเป่าอาย 4 เดือน หลังจากการฉีดกระตุ้นด้วย octopus GnRH และ tunicate-I GnRH เป็นเวลา 14 สัปดาห์

A-B) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย octopus GnRH 200 ng/g BW แสดงการพัฒนาของรังไข่ที่มีการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียจากระยะเริ่มแรก (Og) ไปเป็น เซลล์สืบพันธุ์ระยะ stage I oocyte (Oc1) และระยะ stage II oocyte (Oc2) มากขึ้น

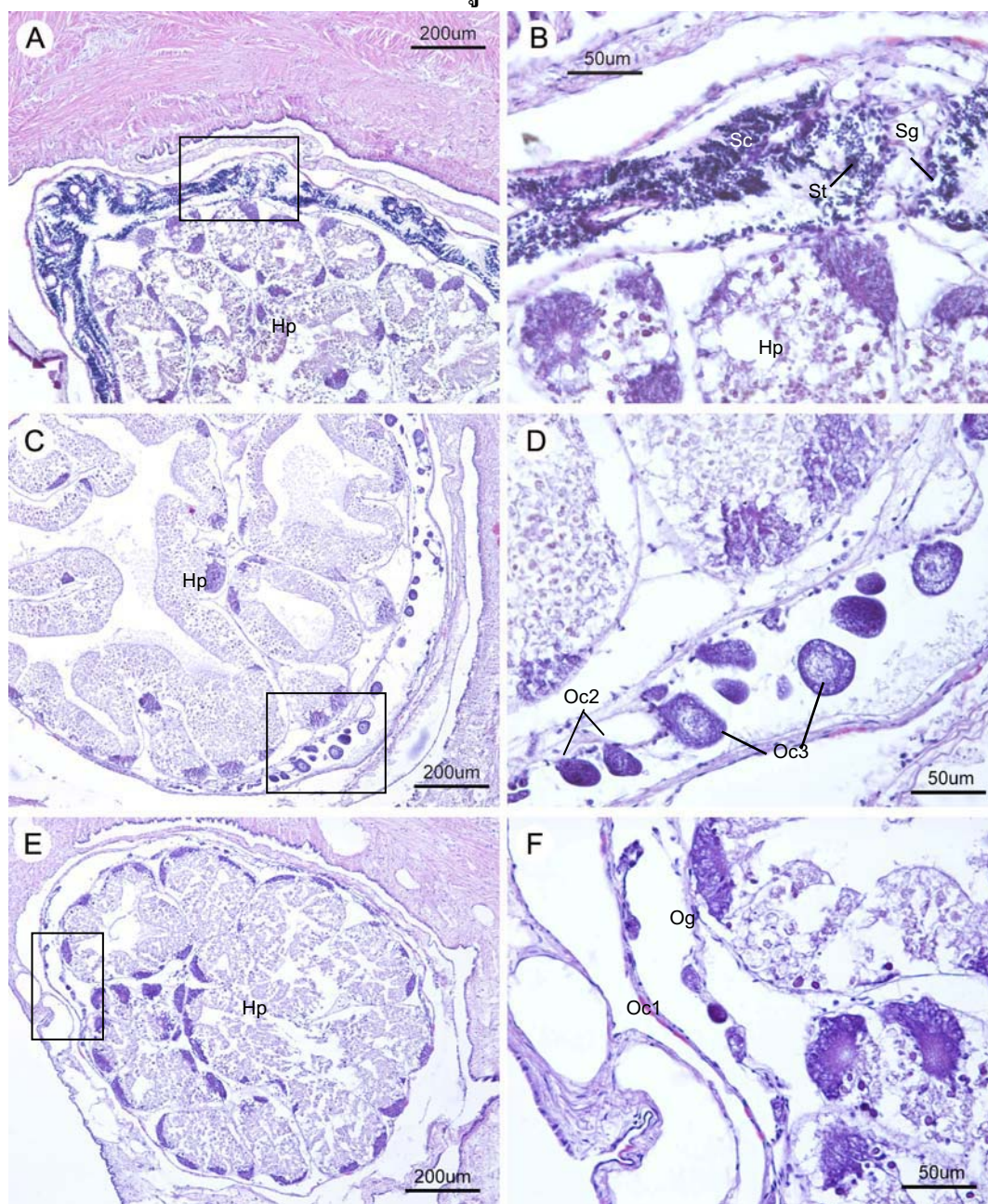
C-D) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย tunicate-I GnRH 20 ng/g BW แสดงการเจริญของอวัยวะซึ่งมีเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะเริ่มแรก (Sg; หัวลูกศร), เซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatocytes (Sc) และเซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatid (St) จำนวนมาก

E-F) ต่อมสืบพันธุ์ของหอยเป่าอายตัวอ่อนในกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย tunicate-I GnRH 200 ng/g BW แสดงการพัฒนาของรังไข่และเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียระยะ stage I oocyte (Oc1) เพิ่มมากขึ้น

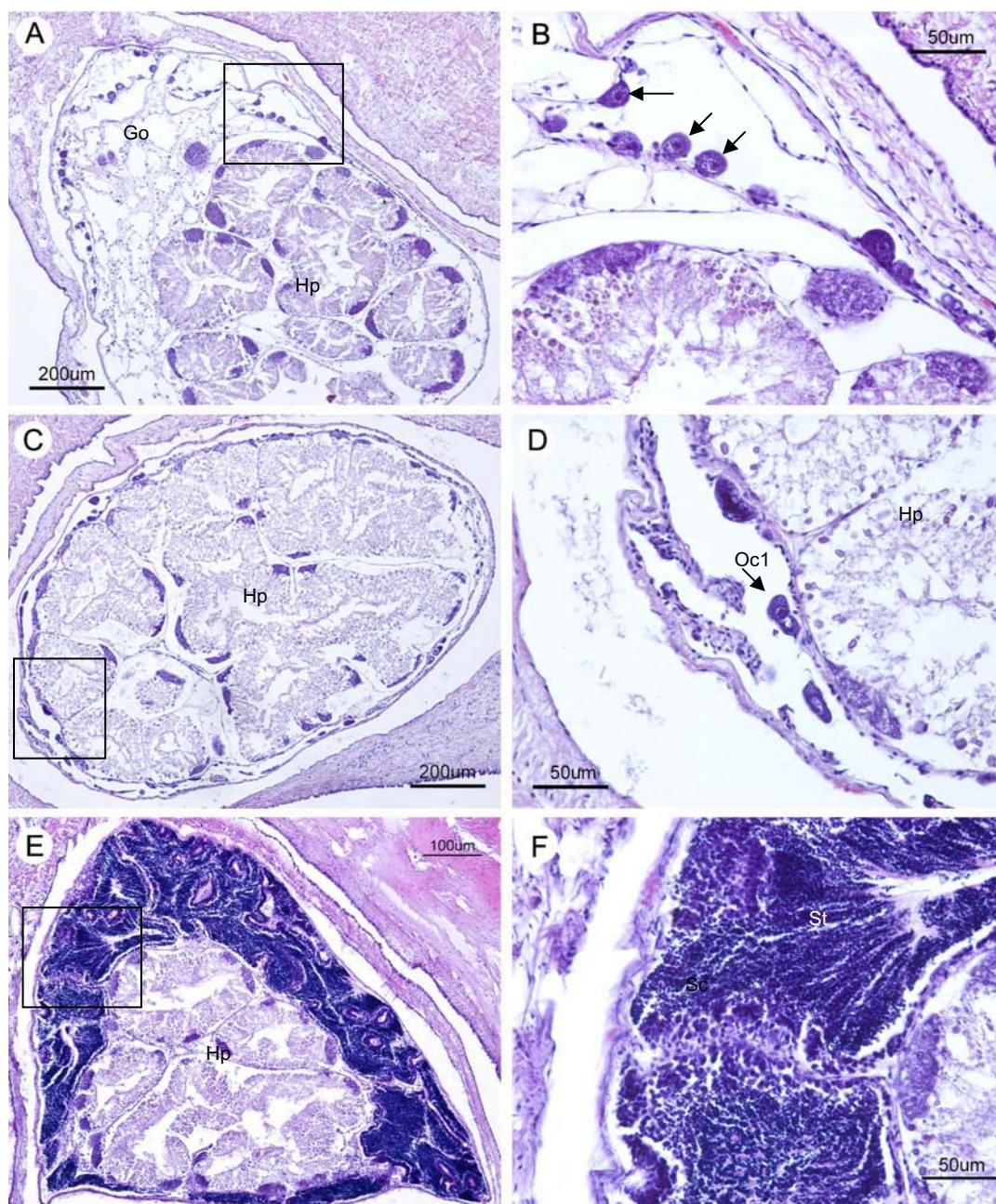
รูปที่ 7



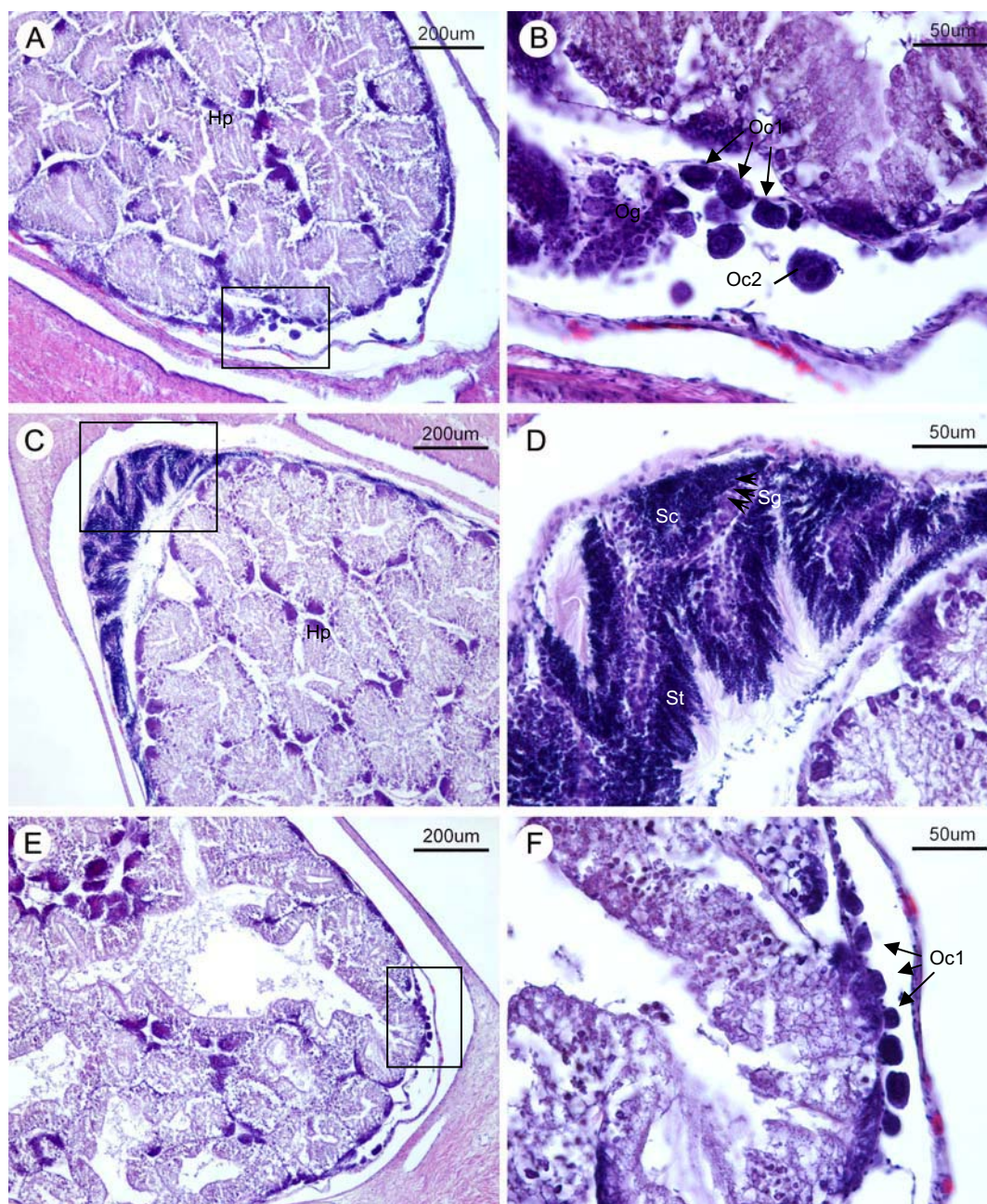
รูปที่ 8



รูปที่ 9



รูปที่ 10



หัวข้อที่ 8. การทดสอบการกระตุ้นการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ในหอยเป่าอื้อตัวเต็มวัยด้วยฮอร์โมน aELH และ GnRH

การทดลองนี้จะใช้หอยเพศเมียตัวเต็มวัยอายุ 1 ปี น้ำหนักประมาณ 20 กรัม ความยาวเปลือกประมาณ 4 ซม. และมีต่อมสืบพันธุ์อยู่ในระยะ proliferative หรือ มีค่า visual gonad index (VGI) เท่ากับ 1 โดยการคำนวณ VGI ตามวิธีของ Kikuchi and Uki (1974) ซึ่งแบ่งออกเป็น 4 ระดับ คือ 0 = sex indistinguishable; 1 = sex distinguishable, thin gonad with pointed tip; 2 = gonad partially enlarged with pointed tip; 3 = gonad swollen with rounded tip โดยแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 12 กลุ่ม กลุ่มละ 35 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดสารละลาย

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดด้วยสารตัวทำละลายที่ไม่มีฮอร์โมน (normal saline solution)

กลุ่มที่ 3 และ 4 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดด้วยสารประสาทฮอร์โมน aELH ปริมาณ 500 และ 1000 ng/gBW

กลุ่มที่ 5 และ 6 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดด้วยสาร busserelin ปริมาณ 500 และ 1000 ng/gBW

กลุ่มที่ 7 และ 8 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดด้วยสาร lamprey-I GnRH ปริมาณ 500 และ 1000 ng/gBW

กลุ่มที่ 9 และ 10 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดด้วยสาร octopus GnRH ปริมาณ 500 และ 1000 ng/gBW

โดยที่สัตว์ทดลองถูกฉีดกระตุ้นทุก 7 วัน เป็นจำนวน 7 ครั้ง โดยฉีดเข้าไปตรงบริเวณกล้ามเนื้อเท้าของสัตว์ทดลอง จากนั้นจึงทำการบันทึก ค่า VGI ของแต่ละกลุ่ม ซึ่งค่าที่ได้ จะถูกนำมาหาค่าทางสถิติ และประเมินการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์เทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังเก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อของหอยจำนวน 4 ตัวในแต่ละกลุ่มทุกสัปดาห์ เพื่อนำมาหาค่า Gonad index (GI) ซึ่งแสดงถึงการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์โดยใช้วิธีการวัดขนาดของเนื้อเยื่อซึ่งแสดงออกมาในรูปอัตราส่วนบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ต่อบริเวณ conical appendage โดยมีสูตรในการคำนวณดังนี้

$$I_G = 100 \times (L - L') / L$$

โดยที่ I_G หรือ Gonad index (GI), L คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของหน้าตัดตามขวางของ conical appendage ที่ห่างจากปลายสุดของอวัยวะ 0.5 ซม และ L' คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของหน้าตัดตามขวางของ hepatopancreas ที่ห่างจากปลายสุดของอวัยวะ 0.5 ซม (ดัดแปลงจาก Fukazawa และคณะ, 2007)

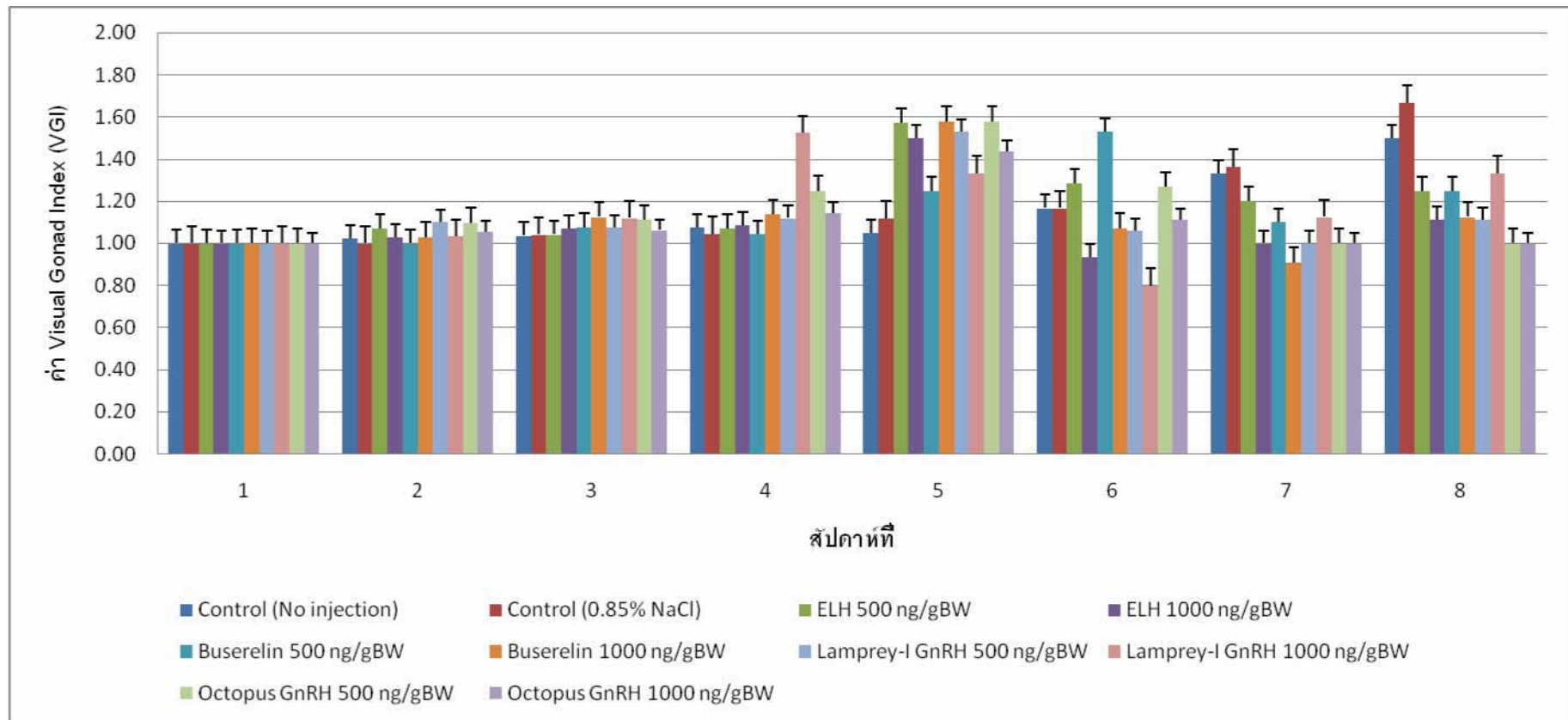
จากนั้นนำมาศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของรังไข่เพื่อดูระยะและการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาตามวิธีการจำแนกของ Sobhon และคณะ (1997)

ผลการทดลอง

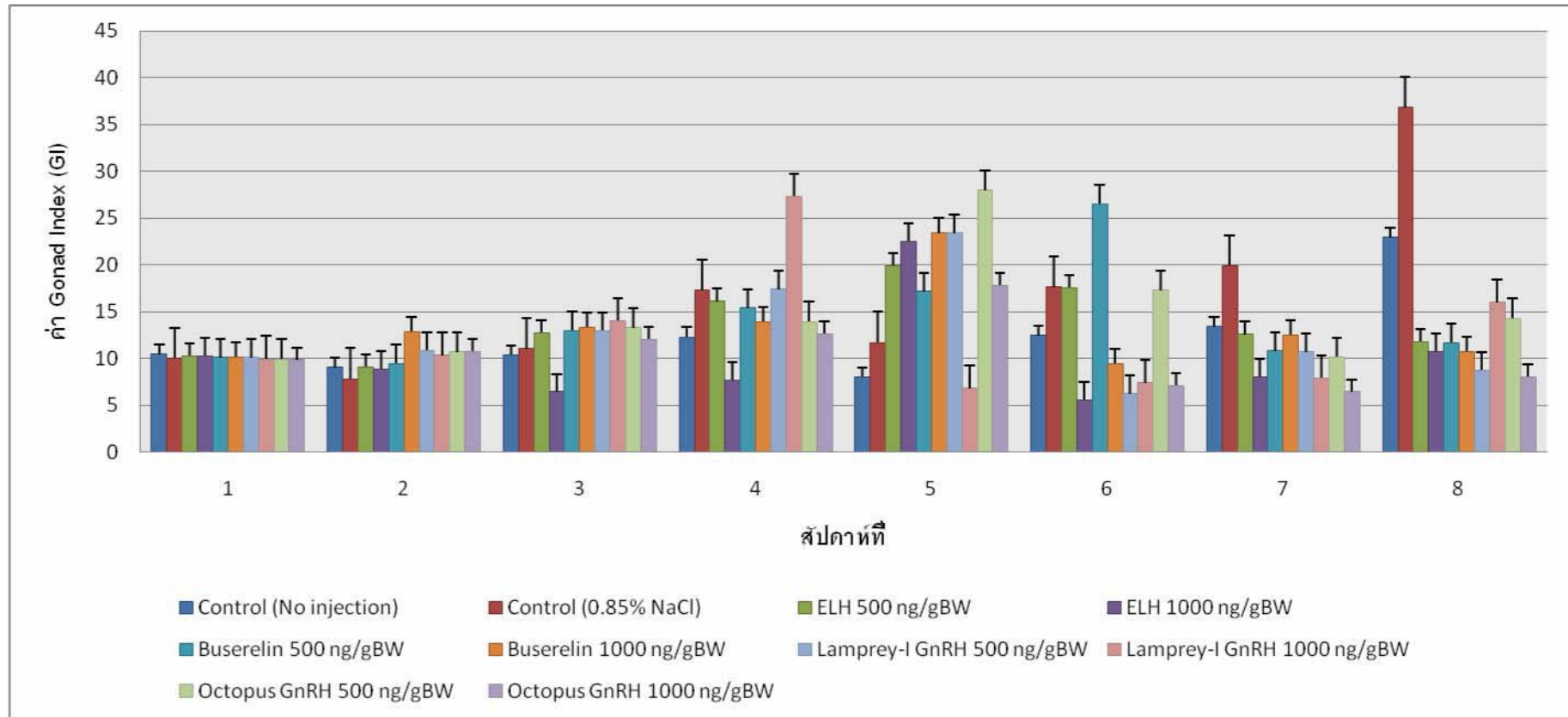
จากแผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยของ VGI และ GI ของหอยเป่าอื้อในแต่ละสัปดาห์หลังจากฉีดกระตุ้นด้วยสาร aELH, busserelin, lamprey-I GnRH และ octopus GnRH ที่ความเข้มข้น 500 และ 1000 ng/gBW (รูปที่ 11) เป็นเวลา 8 สัปดาห์พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองมีค่าเฉลี่ยของ VGI และ GI สัมพันธ์กัน กล่าวคือในสัปดาห์ที่ 1 ทุกกลุ่มการทดลองมีค่า VGI และ GI ต่ำ และมีแนวโน้มสูงขึ้นเรื่อยๆ เมื่อมีการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์มากขึ้นจนถึงระยะที่มีการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์เต็มที่ และมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ จากนั้นค่า VGI และ GI จะมีค่าลดลง และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ในสัปดาห์ถัดไป กลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารตัวทำละลาย และไม่ฉีดสาร พบว่าหอยมีการเจริญและพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์จนถึงระยะที่ต่อมสืบพันธุ์เจริญเต็มที่ (mature) และมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์บางส่วน (partial spawning) ซึ่งใช้เวลาประมาณ 8 สัปดาห์ ส่วนกลุ่มการทดลองที่ฉีดกระตุ้นด้วยสาร aELH ทั้งสองความเข้มข้น คือ 500 และ 1000 ng/gBW สามารถทำให้มีการเจริญและพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ถึงระยะเจริญเต็มที่จนกระทั่งมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาบางส่วนได้ภายใน 5 สัปดาห์ (รูปที่ 12) ส่วนกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วยสาร busserelin ปริมาณ 500 และ 1000 ng/g BW พบว่าหอยมีการเจริญและพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์จนถึงระยะเจริญเต็มที่ (รูปที่ 12) ในสัปดาห์ที่ 6 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งต่างจากกลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย Lamprey-I GnRH ปริมาณ 500 และ 1000 ng/g BW ในแต่ละสัปดาห์ พบว่าหอยมีการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์จนถึงระยะ

premature ในสัปดาห์ที่ 5 และ 4 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่ฉีดด้วยสาร octopus GnRH ปริมาณ 500 และ 1000 ng/g BW พบว่า หอยมีการเจริญและพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์จนถึงระยะเจริญเต็มที่ ภายในเวลา 5 สัปดาห์ นอกจากนี้สาร octopus GnRH ปริมาณ 500 ng/g BW มีผลทำให้มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาบางส่วนในสัปดาห์ที่ 6

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสาร *aELH*, *buserelin*, *lamprey-I GnRH* และ *octopus GnRH* ที่ความเข้มข้น 500 ng/gBW มีผลกระตุ้นการพัฒนาของรังไข่จากระยะ *proliferative* ไปจนถึงระยะ *fully mature* และมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ โดยใช้เวลาเพียง 5 สัปดาห์ ซึ่งเร็วกว่ากลุ่มควบคุมที่ฉีดด้วยสารตัวทำละลาย และไม่ฉีดสารซึ่งต้องใช้เวลาราว 8 สัปดาห์



รูปที่ 11 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยของ Visual Gonad Index (VGI) ของหอยเป่าฮือในแต่ละสัปดาห์หลังจากฉีดกระตุ้นด้วยสาร aELH, buserelin, lamprey-I GnRH และ octopus GnRH ที่ความเข้มข้น 500 และ 1000 ng/gBW เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (เส้นตั้งฉากแสดงค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน; S.D.)



รูปที่ 12 แผนภูมิแสดงค่าเฉลี่ยของ Gonad Index (GI) ของหอยเป่าฮือในแต่ละสัปดาห์หลังจากฉีดกระตุ้นด้วยสาร aELH, buserelin, lamprey-I GnRH และ octopus GnRH ที่ความเข้มข้น 500 และ 1000 ng/gBW เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (เส้นตั้งฉากแสดงค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน; S.D.)

หัวข้อที่ 9. การทดสอบการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าอื้อตัวเต็มวัยด้วยสาร aELH และ GnRH

การทดลองนี้เป็นการทดสอบการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าอื้อที่ถูกเลี้ยงเพื่อใช้เป็นพ่อพันธุ์ และแม่พันธุ์ที่มีวัยวุฒิสืบพันธุ์เจริญเต็มที่ โดยเพศผู้มีวัยวุฒิสืบพันธุ์สีเหลืองครีมชัดเจน ส่วนเพศเมียมีวัยวุฒิสืบพันธุ์สีเขียวชัดเจน โดยแบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 9 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว (เพศผู้ 10 ตัว เพศเมีย 10 ตัว) ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดด้วยสารตัวทำลายที่ไม่มีฮอร์โมน (Normal saline solution)

กลุ่มที่ 2-4 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดด้วยสารประสาทฮอร์โมน aELH ปริมาณ 250, 500 และ 1000 ng/gBW

กลุ่มที่ 5-7 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดด้วยสาร buserelin ปริมาณ 250, 500 และ 1000 ng/gBW

กลุ่มที่ 8 และ 9 เป็นกลุ่มทดลอง ฉีดด้วยสาร octopus GnRH ปริมาณ 500 และ 1000 ng/gBW

ก่อนทำการทดลองสัตว์ทดลองทั้ง 9 กลุ่มถูกนำมาพักไว้ในถังเลี้ยง ในห้องที่มีการควบคุมอุณหภูมิ ความเค็มของน้ำทะเล และการให้อาหารธรรมชาติ (สาหร่าย) การทดลองเริ่มขึ้นก่อนเวลาที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ตามธรรมชาติ 4 วัน โดยการทดลองเริ่มจากการแยกหอยเพศผู้ และเมียใส่ลงตู้กระจก ขนาด 16x20x20 ลูกบาศก์เซนติเมตร โดยใส่หอยจำนวน 1 ตัว ต่อ 1 ตู้ ในน้ำทะเล 2 ลิตร หลังจากการพักในตู้กระจกเป็นเวลา 30 นาที จึงทำการฉีดสารบริเวณกล้ามเนื้อเท้า จากนั้นบันทึกเวลาและจำนวนของสัตว์ทดลองที่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ นับจำนวนและบันทึกคุณภาพของเซลล์ไข่และอสุจิที่ถูกปล่อยออกมา จากนั้นนำเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิของแต่ละกลุ่มมาผสมพันธุ์กัน แล้วคำนวณอัตราส่วนของการปฏิสนธิตามวิธีการของ Pumtong และคณะ (1997) จากนั้นบันทึกเปอร์เซ็นต์ของการปฏิสนธิ และดูการพัฒนาของเซลล์จากระยะ 2 เซลล์ไปจนถึง ระยะ veliger larva

ผลการทดลอง

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่า เมื่อฉีดสาร aELH ปริมาณ 250 ng/gBW หอยเพศผู้จำนวน 2 ตัว มีการปล่อยเซลล์อสุจิภายในเวลา 6-12 ชม. ส่วนกลุ่มที่ฉีดด้วย aELH ปริมาณ 500 ng/gBW หอยจำนวน 6 ตัว มีการปล่อยเซลล์อสุจิ และเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย aELH ปริมาณมากขึ้นคือ 1000 ng/gBW พบจำนวน 7 ตัวที่ปล่อยเซลล์อสุจิ ส่วนกลุ่มควบคุมพบว่าหอยจำนวน 2 ตัว มีการปล่อยเซลล์อสุจิ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเซลล์อสุจิเฉลี่ยที่ปล่อยออกมาในแต่ละกลุ่มการทดลองมีปริมาณไม่แตกต่างกันมากนัก และเซลล์อสุจิที่ปล่อยออกมามีคุณภาพดีในทุกกลุ่มการทดลองคือ เคลื่อนไหวตลอดเวลาอย่างต่อเนื่อง สำหรับเพศเมียพบว่ามีการปล่อยเซลล์ไข่ในกลุ่มทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วย aELH ปริมาณ 250 ng/gBW จำนวน 3 ตัว โดยเริ่มปล่อยไข่หลังจากฉีดสารไปแล้วประมาณ 6-12 ชม. และเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วย aELH ปริมาณมากขึ้นคือ 500 และ 1000 ng/gBW พบจำนวน 6 ตัว และ 8 ตัว ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมพบว่าหอย 2 ตัวมีการปล่อยเซลล์ไข่ และมีคุณภาพของเซลล์ไข่ปกติในทุกกลุ่มการทดลองคือมีลักษณะกลม ขนาดเท่ากันและมี jelly coat หุ้ม ส่วนเปอร์เซ็นต์การ fertilization พบว่ามีเปอร์เซ็นต์เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ฉีดด้วยสาร aELH เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเซลล์สามารถเจริญไปได้ถึง ระยะ veliger larva ได้ทุกกลุ่มการทดลอง ภายในเวลา 17 ชม หลังการ fertilization

ผลการฉีดกระตุ้นสารด้วย GnRH แสดงในตารางที่ 5 พบว่า เมื่อฉีดสาร buserelin ปริมาณ 250 ng/gBW พบว่าไม่สามารถกระตุ้นให้หอยทั้งเพศผู้และเพศเมียปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ ส่วนกลุ่มที่ฉีดด้วย buserelin ปริมาณ 500 ng/gBW หอยจำนวน 6 ตัว มีการปล่อยเซลล์อสุจิ และเมื่อกระตุ้นด้วย buserelin ปริมาณเพิ่มขึ้นคือ 1000 ng/gBW พบจำนวน 5 ตัวที่ปล่อยเซลล์อสุจิ ส่วนกลุ่มที่ฉีดด้วย octopus GnRH ปริมาณ 500 ng/gBW และ 1000 ng/gBW ไม่สามารถกระตุ้นให้หอย

เพศผู้ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ ส่วนกลุ่มควบคุมพบว่าหอยจำนวน 2 ตัว มีการปล่อยเซลล์อสุจิ นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณเซลล์อสุจิเฉลี่ยที่ปล่อยออกมาในแต่ละกลุ่มการทดลองมีปริมาณไม่แตกต่างกันมากนัก และเซลล์อสุจิที่ปล่อยออกมามีคุณภาพดีในทุกกลุ่มการทดลอง

สำหรับเพศเมียพบว่าการปล่อยเซลล์ไข่ในกลุ่มทดลองที่ถูกกระตุ้นด้วย buserelin ปริมาณ 500 ng/gBW จำนวน 5 ตัว และลดลงเมื่อกระตุ้นด้วย buserelin ปริมาณมากขึ้นคือ 1000 ng/gBW พบจำนวน 2 ตัว ส่วนกลุ่มที่ฉีดด้วย octopus GnRH ปริมาณ 500 ng/gBW ไม่สามารถกระตุ้นให้หอยเพศเมียปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ แต่กลุ่มทดลองที่ฉีดด้วย octopus GnRH ปริมาณเพิ่มขึ้นคือ 1000 ng/gBW พบจำนวน 2 ตัวที่ปล่อยเซลล์ไข่ ส่วนกลุ่มควบคุมพบว่าหอย 2 ตัวมีการปล่อยเซลล์ไข่ และมีคุณภาพของเซลล์ไข่ปกติในทุกกลุ่มการทดลองคือมีลักษณะกลม ขนาดเท่ากันและมี jelly coat หุ้ม ส่วนเปอร์เซ็นต์การ fertilization พบว่ามีเปอร์เซ็นต์ไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลการทดลองดังกล่าวสรุปได้ว่าสาร *aELH* มีผลกระตุ้นโดยตรงในการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิ ซึ่งปริมาณที่เหมาะสมคือ 500 ng/gBW และสามารถให้เปอร์เซ็นต์การ fertilization ได้ดี ส่วน buserelin และ octopus GnRH สามารถออกฤทธิ์ได้น้อยกว่า *ELH* และไม่เหมาะสมในการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของทั้งสองเพศ

ตารางที่ 4 แสดงผลการทดสอบการกระตุ้นการปล่อยเซลล์อสุจิในหอยเป่าฉีดตัวเต็มวัยเพศผู้ด้วยสาร aELH

กลุ่มทดลอง	จำนวนสัตว์ทดลองที่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (n=10)		เปอร์เซ็นต์ของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์		ปริมาณเซลล์อสุจิเฉลี่ย (เซลล์/มล.)	คุณภาพเซลล์อสุจิ *	ปริมาณเซลล์ไข่เฉลี่ย (เซลล์)	คุณภาพเซลล์ไข่	เปอร์เซ็นต์ของการผสมพันธุ์
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย					
Control (NaCl)	2	2	20	20	1.395×10^6	+++	660,000	ลักษณะกลม มีขนาดเท่ากัน และมี jelly coat หุ้ม	67.58
ELH 250 ng/gBW	2	3	20	30	6.825×10^6	+++	147,500	ส่วนใหญ่มีลักษณะกลม ขนาดเท่ากัน และมี jelly coat หุ้ม	62.99
ELH 500 ng/gBW	6	6	60	60	3.66×10^6	+++	524,166	ลักษณะกลม มีขนาดเท่ากัน และมี jelly coat หุ้ม	86.94
ELH 1000 ng/gBW	7	8	70	80	2.434×10^6	+++	942,500	ลักษณะกลม มีขนาดเท่ากัน และมี jelly coat หุ้ม	84.14

* หมายถึง คุณภาพของเซลล์อสุจิแบ่งออกเป็น 3 ระดับคือ

+++ หมายถึง อสุจิทุกตัวเคลื่อนไหวตลอดเวลอย่างต่อเนื่อง ++ หมายถึง อสุจิบางตัวเคลื่อนไหวช้า
 + หมายถึง อสุจิไม่เคลื่อนไหว หรือเคลื่อนไหวช้ามาก

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบการกระตุ้นการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเป่าฉีดตัวเต็มวัยด้วยสาร buserelin, และ octopus GnRH

กลุ่มทดลอง	จำนวนสัตว์ทดลองที่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (n=10)		เปอร์เซ็นต์ของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์		ปริมาณเซลล์อสุจิเฉลี่ย (เซลล์/มล.)	คุณภาพเซลล์อสุจิ *	ปริมาณเซลล์ไข่เฉลี่ย (เซลล์)	คุณภาพเซลล์ไข่	เปอร์เซ็นต์ของการผสมพันธุ์
	เพศผู้	เพศเมีย	เพศผู้	เพศเมีย					
Control (NaCl)	2	1	20	10	1.275×10^6	+++	90,000	ลักษณะกลม มีขนาดเท่ากัน และมีjelly coat หุ้ม	71.14
Buserelin 500 ng/gBW	6	5	60	50	1.68×10^7	++	341,875	มีลักษณะกลม ขนาดเท่ากัน และมีjelly coat หุ้ม	88.12
Buserelin 1000 ng/gBW	5	2	50	20	3.97×10^6	+++	319,000	ลักษณะกลม มีขนาดเท่ากัน และมีjelly coat หุ้ม	85.42
Octopus GnRH 1000 ng/gBW	-	2	-	20	-	-	107,500	ลักษณะกลม มีขนาดเท่ากัน และมีjelly coat หุ้ม	-

* หมายเหตุ คุณภาพของเซลล์อสุจิแบ่งออกเป็น 3 ระดับคือ

+++ หมายถึง อสุจิทุกตัวเคลื่อนไหวตลอดเวลาอย่างต่อเนื่อง ++ หมายถึง อสุจิบางตัวเคลื่อนไหวช้า
 + หมายถึง อสุจิไม่เคลื่อนไหว หรือเคลื่อนไหวช้ามาก

โครงการที่ 2 กุ้งก้ามกราม

หัวข้อที่ 1 บทนำ

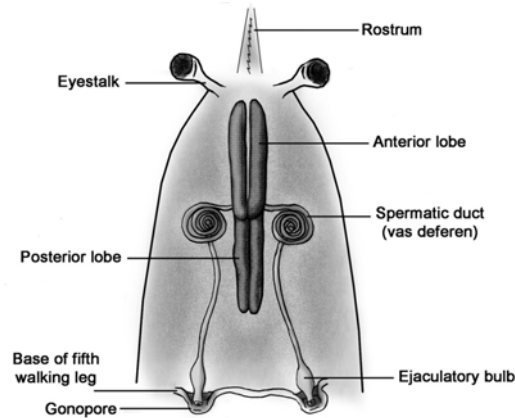
ในสภาพที่เลี้ยงแบบกักขังพ่อแม่พันธุ์ของกุ้ง ลดประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ลงมาก เนื่องจากพ่อแม่พันธุ์ไม่พัฒนาเท่าที่ควร ซึ่งเนื่องมาจากความเครียดที่ถูกเลี้ยงในสภาพที่ไม่เป็นธรรมชาติตามที่เคยอยู่ ทำให้ระดับสารสื่อประสาท (neurotransmitters) และฮอร์โมนที่กระตุ้นการสืบพันธุ์ลดลง เนื่องจากถูกกดด้วยฮอร์โมนห้ามการพัฒนาต่อมสืบพันธุ์จากก้านตา (gonad inhibiting hormone-GIH) สำหรับกุ้งกุลาดำ (*P. monodon*) และกุ้งขาว (*P. vannamei*) ผู้เลี้ยงต้องทำการตัดตาเพื่อกำจัด GIH และทำให้ฮอร์โมนที่กระตุ้นการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์ได้แก่ gonad stimulating hormone (GSH), เมทิลฟานเนโซเอท (methyl farnesoate, MF) และฮอร์โมนที่กระตุ้นการตกไข่ (egg-laying hormone) เพิ่มขึ้น การตัดตานี้ทำให้อายุแม่กุ้งจำกัดและมีช่วงระยะการใช้งานสั้น ถ้าหากหลีกเลี่ยงการตัดตาได้ก็จะทำให้สามารถขยายอายุการใช้งานและประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของแม่กุ้งได้ดีขึ้น การที่จะกระทำเช่นนี้ได้ต้องเข้าใจถึงกลไกของฮอร์โมนประสาทที่ควบคุมการพัฒนาของต่อมสืบพันธุ์และการตกไข่ กับการหลั่งฮูจิกจากแม่และพ่อพันธุ์ สมมุติฐานที่คณะผู้วิจัยเสนอคือ สารสื่อประสาท 5-HT และ DA ที่ผลิตและหลั่งโดยเซลล์ประสาทในระบบประสาทกลาง (CNS) ของแม่พันธุ์ เป็นตัวสัญญาณรับรู้การเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมภายนอก ถ้าสภาพแวดล้อมเหมาะสม 5-HT จะกระตุ้น GnRH ซึ่งเป็นสารขยายสัญญาณประสาท (neuromodulator) ให้กระตุ้นการสร้างและการหลั่งฮอร์โมนกระตุ้นรังไข่ระดับสุดท้ายคือ GSH, ELH และ MF ซึ่งจะถูกปล่อยออกมาจากระบบประสาทกลาง และ/หรือต่อมสืบพันธุ์เพื่อกระตุ้นให้รังไข่พัฒนา มีเซลล์ไข่ที่สมบูรณ์มากขึ้น และสุดท้ายคือ มีไข่ที่ตกออกมาจำนวนมาก ทำให้ประสิทธิภาพการสืบพันธุ์ของแม่กุ้งดีขึ้น

หัวข้อที่ 2. การศึกษาโครงสร้างของต่อมอวัยวะและการพัฒนาของเซลล์ฮูจิกในกุ้งก้ามกรามเปรียบเทียบกับกุ้งกุลาดำ

การจำแนกชนิดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในกระบวนการ spermatogenesis ในกุ้งก้ามกราม

มหากายวิภาคระบบสืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งก้ามกราม (male reproductive system)

ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งก้ามกรามประกอบด้วย อัณฑะ (testis) และท่อนำอสุจิ (vas deferens/spermatic duct) (รูปที่ 13) อัณฑะจะอยู่ในช่องอก โดยอยู่ระหว่าง hepatopancreas และหัวใจ (รูปที่ 14) อัณฑะของกุ้งชนิดนี้สามารถแบ่งได้เป็นสองส่วน คือ anterior lobe และ posterior lobe (รูปที่ 13 และ 14) ทั้งสองส่วนเชื่อมต่อกันตรงกลางและมีท่อนำอสุจิมาเปิดเข้าทั้งสองข้าง Anterior lobe มี 1 คู่และมีขนาดใหญ่กว่าทอดตัวขึ้นไปทางด้านส่วนหัวของกุ้ง ส่วน posterior lobe มีขนาดเล็กก่อนมาทางด้านหลังและทอดตัวอยู่ใต้หัวใจ ท่อนำอสุจิแบ่งได้เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนต้น (proximal) ส่วนกลาง (middle) และส่วนปลาย (distal) ท่อนำอสุจิส่วนต้นมีลักษณะขงอไปมา ท่อส่วนกลางจะทอดยาวลงมาทางด้านข้างของช่องอกท่อส่วนปลายมีลักษณะปลายท่อโป่งพองออกเป็นกระเปาะเรียกว่า ejaculatory bulb (รูปที่ 13, 14c) ซึ่งเป็นบริเวณที่เก็บเซลล์ฮูจิกชั่วคราวก่อนปล่อยออกเมื่อมีการผสมพันธุ์ เซลล์ฮูจิกจะถูกห่อหุ้มด้วยโครงสร้างที่เป็นเยื่อเมือกหลายชั้นเรียกว่า



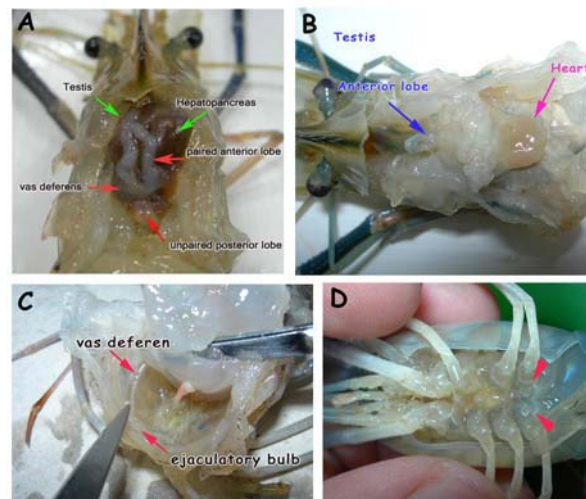
รูปที่ 13 แสดงภาพวาดตำแหน่งและส่วนต่างๆของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งก้ามกราม

spermatophore นอกจากนี้ยังมีต่อมสร้างฮอร์โมนเพศผู้ (androgenic gland) ที่จำเป็นต่อการเจริญและพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ไปสู่ตัวเต็มวัย ทอดตัวขนานอยู่กับ ejaculatory bulb จากนั้นท่อนำอสุจิส่วนปลายนี้จะมีขนาดเล็กลงที่ส่วนปลายสุด และเปิดออกสู่ภายนอกร่างกายตรงบริเวณที่เรียกว่า gonopore ซึ่งอยู่พื้นฐานของขาเดินคู่ที่ห้า (fifth walking leg) (รูปที่ 14D)

จุลกายวิภาคระบบสืบพันธุ์เพศผู้ของกุ้งก้ามกราม

อวัยวะ (Testis)

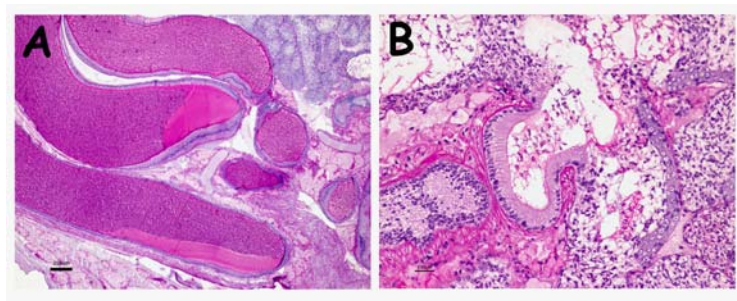
อวัยวะของกุ้งก้ามกรามถูกหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบางๆ เป็น capsule (รูปที่ 15A) ทั้ง anterior และ posterior lobe มีโครงสร้างภายในเหมือนกัน อวัยวะจะมีลักษณะเป็น acinus โดยเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต้นจะอยู่ที่ขอบของ acinus และเซลล์ที่เจริญเต็มที่แล้วจะอยู่ตรงกลาง (รูปที่ 15B) นอกจากนี้ยังมีเซลล์ที่เลี้ยง (Sertoli/Nurse/Sustentacular cell) แทรกตัวอยู่ระหว่างเซลล์ระยะต้นอีกด้วย



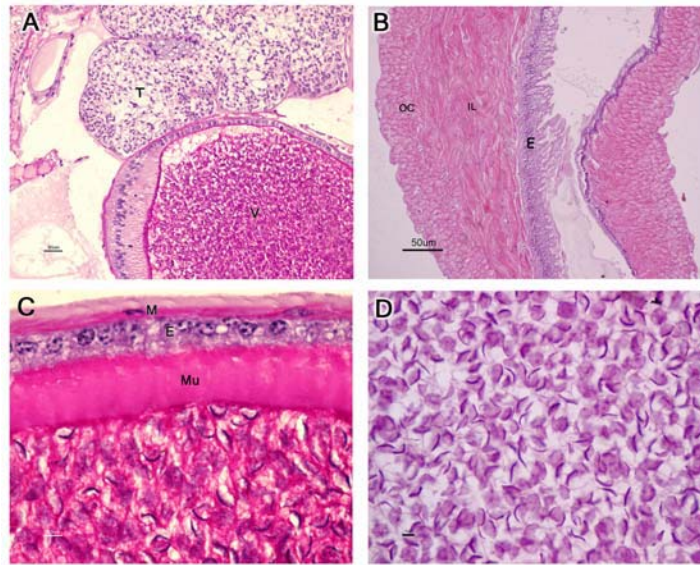
รูปที่ 14 แสดงมหากายวิภาคระบบสืบพันธุ์เพศผู้ในกุ้งก้ามกราม : ภาพ D = gonopore (หัวตุ๊กคร)

ท่อนำสุจิ (vas deferens/spermatic duct)

ท่อนำสุจิสามารถแบ่งได้เป็น 3 ส่วน คือ ส่วนต้น (proximal) (รูปที่ 15) ส่วนกลาง (middle) (รูปที่ 16A) และส่วนปลาย (distal) (รูปที่ 16B) ท่อนำสุจิในกึ่งก้ามกรามจะเชื่อมต่อกับอวัยวะในลักษณะเป็นแอ่งของเซลล์ (รูปที่ 15B) ท่อนำสุจิจะทอดจากด้านข้างของอวัยวะลงไปตามแนวด้านข้างของช่องอก เยื่อผนังท่อเป็นแบบ pseudostratified columnar ด้านบนมี cilia นอกจากนี้พบว่าเยื่อผนังท่อนำสุจียกตัวสูงขึ้น (รูปที่ 16B) ได้ ต่อชั้นเยื่อผนังเป็นชั้นกล้ามเนื้อเรียบบางๆ ที่ช่วยในการหดตัวของท่อนำสุจิ ภายในท่อจะประกอบด้วยเซลล์สุจิที่เจริญเต็มวัยเป็นส่วนใหญ่ และมี mucus ปกคลุมเป็นจำนวนมากทำให้เห็นเป็นสีชมพูเข้มเมื่อย้อมด้วย Periodic Acid Schiff (PAS) (รูปที่ 15A และ 15C) ท่อส่วน proximal ที่ใกล้กับอวัยวะจะมี mucus น้อยกว่าท่อส่วนอื่นๆ ท่อนำสุจิในส่วนปลายบริเวณ ejaculatory bulb มีชั้นกล้ามเนื้อเรียบหนามากขึ้นจนสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชั้นตามการหดตัวของใยกล้ามเนื้อ คือ ชั้นในเรียงตามยาว (inner longitudinal) และชั้นนอกวนรอบท่อ (outer circular) (รูปที่ 16B) ท่อนำสุจิมีหน้าที่บรรจุเซลล์สืบพันธุ์ให้เป็น spermatophore และพร้อมที่จะได้รับการปฏิสนธิต่อไป

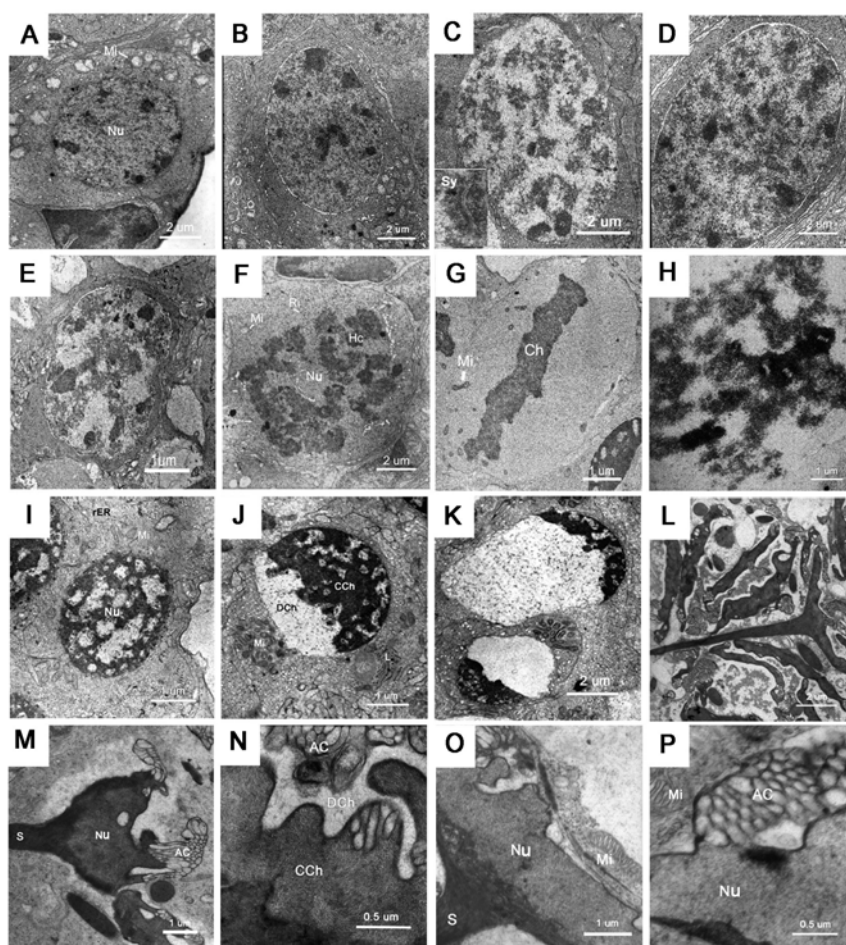


รูปที่ 15 แสดงจุลกายวิภาคของท่อนำสุจิส่วนต้นในกึ่งก้ามกราม (ภาพ A) มีลักษณะขดไปมา และท่อนำสุจิส่วนที่เชื่อมต่อกับอวัยวะ (ภาพ B) เทคนิค PAS กำลังขยาย 20X



รูปที่ 16 แสดงลักษณะจุลกายวิภาคของท่อนำสุจิส่วนกลาง (ภาพ A), ส่วนปลาย (ภาพ B), ส่วนขยายบริเวณผนังท่อนำสุจิ (ภาพ C): ภาพ A และ C ย้อมด้วยเทคนิค PAS ส่วนภาพ B และ D ย้อมด้วยสี H&E (T= Testis, V=Vas deferen, E=Epithelium lining, OC=Outer circular, IL=Inner longitudinal, M=Muscular layer และ Mu=Mucus กำลังขยายภาพ A-D= 20X, 10X และ 100X ตามลำดับ)

จากการศึกษาลักษณะโครงสร้างทางจุลทรรศน์อิเล็กตรอนสามารถจำแนกการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้ 10 ขั้นตอนดังนี้คือ 1. spermatogonia 2. primary spermatocytes ซึ่งสามารถแบ่งย่อยได้ 6 ขั้นตอนย่อยได้แก่ leptotene, zygotene, pachytene, diplotene, diakinesis และ metaphase 3. secondary spermatocyte, 4. spermatids และ 5. mature sperm (รูปที่ 17). Spermatids สามารถแบ่งย่อยได้ 3 ระยะตามรูปแบบของการจัดเรียงตัวของโครมาตินภายในนิวเคลียส ได้แก่ spermatid ระยะต้น เซลล์ชั้นนี้มีนิวเคลียสรูปร่างกลม โครมาตินเรียงตัวกันแน่นจับกันเป็นแผ่นหนากระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส. จากนั้นเซลล์จะพัฒนาเข้าสู่ขั้นกลาง(middle spermatid) ซึ่งโครมาตินจะเริ่มคลายออก decondense จากทางด้านใดด้านหนึ่งของนิวเคลียสไปจนกระทั่งคลุมเกือบทั้งนิวเคลียสในขั้นสุดท้าย (late spermatid) ซึ่งเซลล์ในระยะนี้ จะเห็น heterochromatin หลงเหลืออยู่เพียงเล็กน้อยที่ด้านหนึ่งของนิวเคลียสโดยมีลักษณะเป็นพระจันทร์เสี้ยว(crescent-shape). จากนั้น spermatid จะพัฒนาไปเป็นเซลล์สุจิตัวเต็มวัย (mature sperm) ซึ่งมีรูปร่างคล้ายร่มกลับหัว (everted umbrella-shape) เซลล์สุจิในกึ่งก้ำกรามไม่สามารถเคลื่อนที่ได้เหมือนในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีโครงสร้างคล้ายเรียวแหลมอยู่ด้านหน้าของเซลล์สุจิเรียกว่า spike. โครมาตินมีลักษณะคลายออก (decondensed) อย่างสมบูรณ์เนื่องจากผลของการสูญเสียโปรตีน histone และที่ต่างจากเซลล์สุจิของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ชัดเจนอีกประการหนึ่งคือ ไม่พบโปรตีนประจุบวก protamine ในนิวเคลียสเลย.

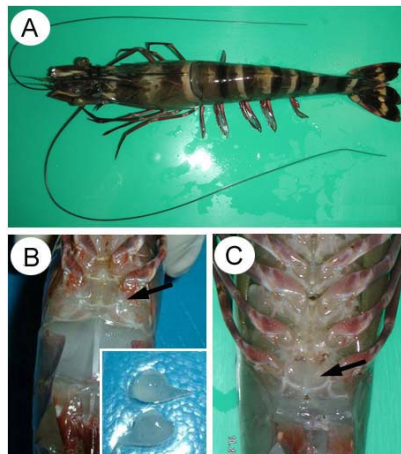


รูปที่ 17 Transmission electron micrographs showing various steps of male germ cells during spermatogenesis (A-H) and spermiogenesis (I-P) in *M. rosenbergii*. (A) Spermatogonia. (B-G) Primary spermatocyte in leptotene stage, zygotene stage, pachytene stage, diplotene stage, diakinesis stage and metaphase stage, respectively. (H) Secondary spermatocyte. (I) Early spermatid. (J) Mid spermatid. (K) Late spermatid. (L-M) Immature spermatozoa. (N) Sperm nucleus showing decondensed (DCh) and condensed chromatin (CCh). (O) Mature sperm showing highly decondensed nucleus. (P) High magnification of mature sperm showing the numerous acrosomal vesicles (AC) nucleus (Nu) and mitochondria (Mi). Nu: Nucleus, Mi: Mitochondria, Sy: Synaptonemal complex, Ri: Ribosome, Hc: Heterochromatin, Ch: Chromatin, rER: Rough endoplasmic reticulum, L: Lamella body, S: spike.

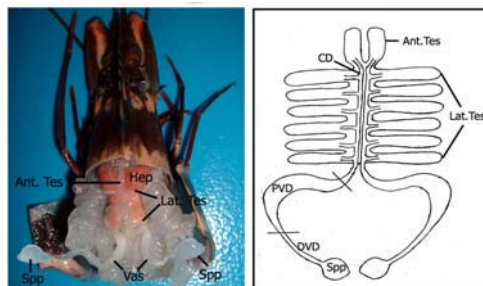
(ดูรายละเอียดในเอกสารหมายเลข 2.19 ในภาคผนวก)

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างละเอียดของเซลล์อสุจิ และการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในนิวเคลียสที่สัมพันธ์กับการจัดระเบียบของเส้นใยโครมาตินในเซลล์อสุจิของกุ้งกุลาดำ

ระบบสืบพันธุ์ของกุ้งกุลาดำเพศผู้วางตัวอยู่ในส่วนหัวของกุ้ง ประกอบด้วย อัณฑะ (Testis) วางตัวอยู่บนตับ (Hepatopancreas) มีลักษณะแบนคล้ายนิ้วมือแผ่ยื่นออกไปเป็นพูโดยแบ่งออกเป็น พูคู่หน้า 1 คู่ และพูด้านข้าง 6 คู่ ด้านบนของอัณฑะมีหัวใจวางทับอยู่ ทางส่วนท้ายของอัณฑะติดต่อกับท่อนำอสุจิ (Vas deferens) เมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ เซลล์อสุจิจะถูกพัฒนาขึ้นในอัณฑะและส่งผ่านมายังท่อเก็บและส่งเซลล์อสุจิ (Vas deferens) ณ ที่นี้ เซลล์อสุจิถูกเคลือบด้วยสารเมือกใสตลอดความยาวของท่อนำเซลล์อสุจิ ท่อนำอสุจินี้มี 1 คู่ซึ่งเป็นท่อยาววางตัวอ้อมไปทางด้านหน้าของตัวกุ้ง ที่ส่วนปลายสุดของท่อนี้พองออกเป็นกระเปาะที่เรียกว่า Spermatophore ซึ่งภายในบรรจุเซลล์อสุจิที่ถูกล้อมรอบด้วยสารเมือก Spermatophore มีสองข้างอยู่ที่บริเวณโคนขาเดินคู่ที่ 5 เมื่อเกิดการผสมพันธุ์ของกุ้งกุลาดำ กุ้งตัวผู้ทำการสอด spermatophore ซึ่งมีเซลล์อสุจิซึ่งถูกหุ้มด้วยสารเมือก (รูปที่ 18, 19) เข้าไปในกุ้งตัวเมียที่ลอกคราบใหม่และยังอยู่ในภาวะเปลือกอ่อน ถุงเซลล์อสุจินี้จะถูกเก็บไว้ระยะหนึ่งในอวัยวะสำหรับเก็บอสุจิของตัวเมียที่เรียกว่า Thelycum (รูปที่ 18) ซึ่งเป็นช่องที่มีฝาปิดที่อยู่บริเวณหน้าอกที่ระหว่างขาเดินคู่ที่ห้าของกุ้งตัวเมีย เมื่อกุ้งตัวเมียพัฒนาร่างไข่จนถึงระยะสมบูรณ์เต็มที่ แม่กุ้งจะวางไข่โดยปล่อยไข่และเซลล์อสุจิมาผสมกัน หลังจากการปฏิสนธิจะได้ตัวอ่อนของกุ้งในระยะที่เรียกว่า นอร์เพลียส (nauplius)

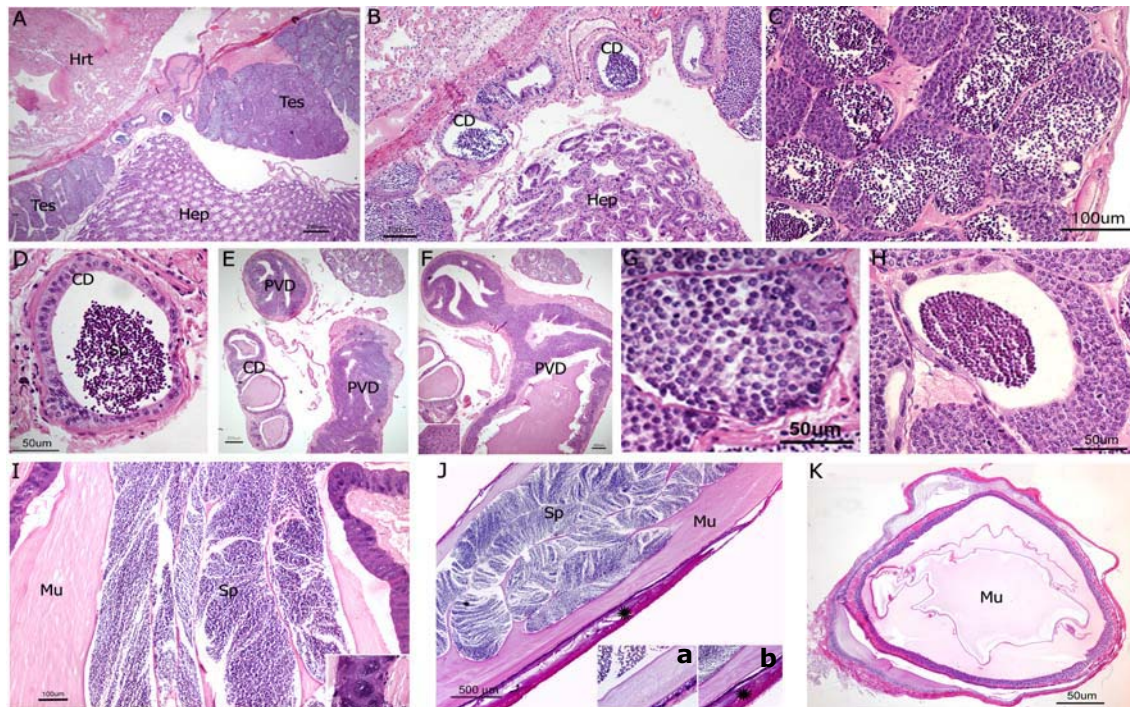


รูปที่ 18 (A) กุ้งกุลาดำ (dorsal view) (B) ตำแหน่งของถุงเก็บอสุจิส่วนปลายในกุ้งกุลาดำเพศผู้ (C) รูปแสดงตำแหน่งของอวัยวะสำหรับเก็บอสุจิในกุ้งกุลาดำเพศเมีย (thelycum)

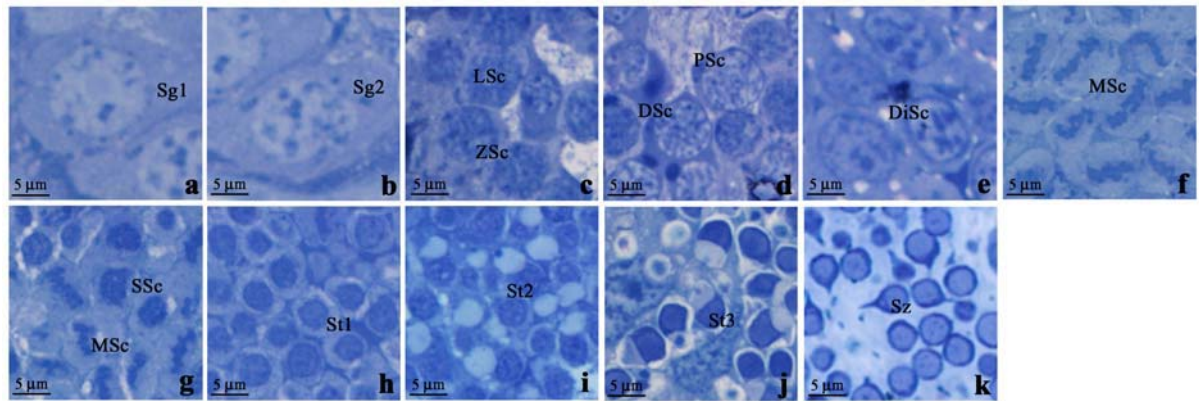


รูปที่ 19 ตำแหน่งและโครงสร้างจำลองของระบบสืบพันธุ์กุ้งกุลาดำเพศผู้ซึ่งอยู่ในส่วนหัวและวางตัวอยู่บนตับ (Hepatopancreas-Hep) อัณฑะ (testis-Tes) มีลักษณะเป็นพูคล้ายนิ้วมือยื่นไปทางด้านหน้า 1 คู่ (anterior lobe-Ant. Tes) และทางด้านข้าง 6 คู่ (lateral lobe-Lat. Tes) บริเวณทางส่วนท้ายของอัณฑะมีท่อนำอสุจิ (vas deferens-Vas) 1 คู่ ส่วนปลายของท่อนี้พองออกเป็นถุงสำหรับเก็บอสุจิส่วนปลาย (spermatophore-Spp) อสุจิจะถูกสร้างจากภายในอัณฑะและส่งต่อมายังท่อนำอสุจิย่อย (collecting duct-CD) และส่งต่อไปยังท่อนำอสุจิ (vas deferens-Vas)

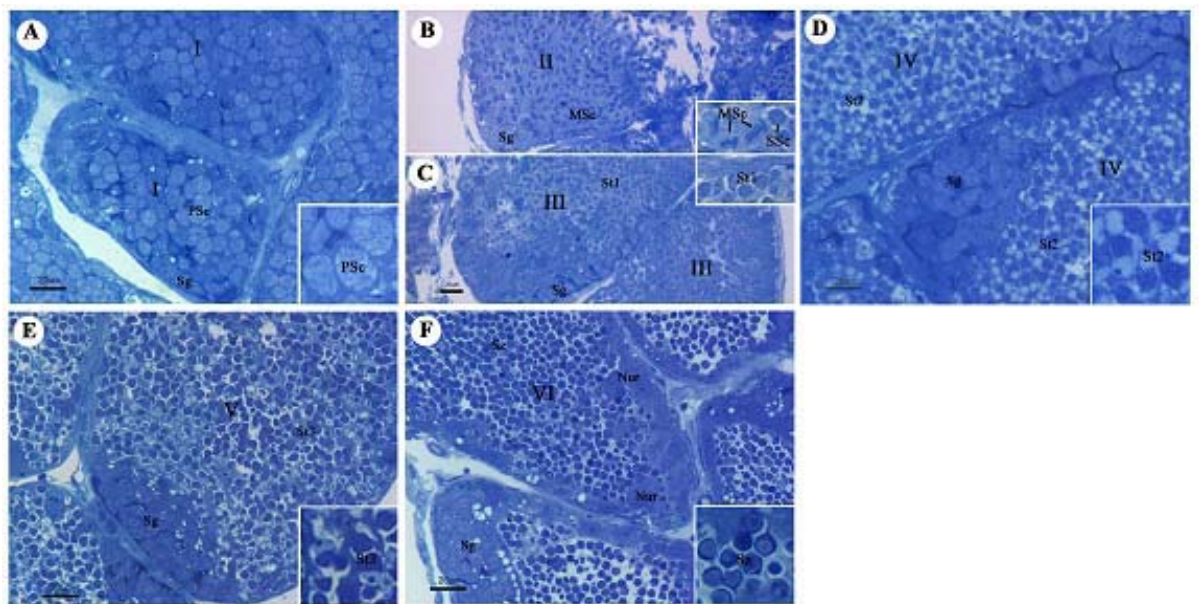
กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ นั้น เกิดในอวัยวะภายในท่อนำอสุจิ (Seminiferous tubules) ซึ่งมีอยู่มากมายในอวัยวะ เมื่อกศึกษาทางจุลกายวิภาคของอวัยวะและท่อนำอสุจิพบว่าสามารถแบ่งเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ได้เป็นระยะต่างๆตามลำดับการพัฒนา โดยใช้ขนาดและลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ รวมถึงลักษณะการขดตัวของเส้นใยโครมาตินที่ปรากฏภายในเซลล์ระยะต่างๆเป็นเกณฑ์ ได้แก่ spermatogonia 2 ชั้น, spermatocyte 6 ชั้น (Leptotene, Zygotene, Pachytene, Diplotene, Diakinetik, Mataphase), spermatid 3 ชั้น, และ เซลล์อสุจิ (Spermatozoa) (รูปที่ 21) นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งระยะของท่อนำอสุจิออกได้เป็น 6 ระยะ ได้แก่ ระยะที่ 1 – ระยะที่ 6 (รูปที่ 22) โดยอาศัยลักษณะของกลุ่มเซลล์ที่ปรากฏอยู่ร่วมกันภายในท่อ (cellular association) ลักษณะของเซลล์ที่ปรากฏภายในท่อนำอสุจิระยะต่างๆนั้นแสดงถึงลักษณะการพัฒนาของเซลล์แบบพร้อมกันทั้งท่อ กล่าวคือภายในส่วนตัดขวางหนึ่งของท่อนำอสุจิจะพบเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ชั้นเดียวกันเกือบทั้งหมด โดยจะพบกลุ่มของเซลล์ spermatogonia รวมตัวกันอยู่ติดกับผนังท่อนำอสุจิ ในระยะที่ 6 ของท่อนำอสุจิ เซลล์ส่วนใหญ่ที่พบคือเซลล์อสุจิ หลังจากนั้นเซลล์อสุจิจะถูกส่งออกไปยังท่อนำอสุจิย่อย (Collecting duct) ซึ่งจะรวมกันเป็นท่อนำอสุจิ (Vas deferens) ภายในท่อนำอสุจินี้พบว่าเซลล์อสุจิจะถูกล้อมรอบด้วยสารเมือกหนาที่ข้อมติดสีชมพู eosin ท่อนำอสุจินี้มีผนังค่อนข้างหนาในส่วนต้น และบางลงในส่วนปลาย ด้านนอกถูกล้อมรอบด้วยชั้นของกล้ามเนื้อ ที่ส่วนปลายของท่อนำอสุจิออกเป็นกระเปาะ spermatophore ซึ่งภายในบรรจุอสุจิที่ฝังอยู่ในสารเมือกที่ข้อมติดสีชมพู ผนังของ spermatophore มีหลายชั้น (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 จุลกายวิภาคระบบสืบพันธุ์กึ่งกุดำเพศผู้ (A) เนื้อเยื่ออวัยวะ (testis-Tes) ซึ่งอยู่ระหว่างหัวใจ (heart-Hrt) และตับ (hepatopancreas-Hep) (B, D) ท่อนำอสุจิย่อย (collecting duct-CD) ที่อยู่ระหว่างพู่ชายและขาของอวัยวะ (C, G-H) ท่อนำอสุจิในอวัยวะ (seminiferous tubules) ซึ่งบรรจุด้วยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะต่างๆ (E, F) ส่วนปลายของท่อนำอสุจิย่อย (collecting duct-CD) และส่วนต้นของท่อนำอสุจิ (proximal vas deferens-PVD) (I) ส่วนต้นของท่อนำอสุจิ (proximal vas deferens-PVD) ภายในบรรจุอสุจิ (Sp) จำนวนมากซึ่งถูกล้อมรอบด้วยสารเมือกที่ข้อมติดสีชมพู (Mu) (J) ส่วนปลายของท่อนำอสุจิ (distal vas deferens-DVD) แสดงส่วนของท่อที่แบ่งออกเป็น primary และ secondary lumen ซึ่งเป็นช่องเล็กบรรจุสารที่ข้อมติดสีชมพูเข้ม (*) ส่วน primary lumen นั้นบรรจุอสุจิและสารเมือกที่ล้อมรอบ (K) ส่วนตัดขวางของ spermatophore แสดงผนังที่มีหลายชั้น ภายในบรรจุสารเมือก (Mu) ที่ห่อหุ้มอสุจิอยู่ภายใน



รูปที่ 21 ระยะต่างๆของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ใน semithin sections ของหลอดสร้างอสุจิเซลล์แบ่งเป็นระยะต่างๆตามขนาด, ลักษณะเฉพาะของเซลล์, และลักษณะโครมาตินในนิวเคลียส ออกเป็น ขั้นตอนต่างๆคือ Spermatogonium 1-2 (Sg1-2), leptotene (LSc), Zygotene (ZSc), Pachytene (PSc), Diplotene (DSc), Diakinetik (DiSc), Mataphase (MSc), Spermatid 1-3 (St1-3), และ Spermatozoa (Sz).

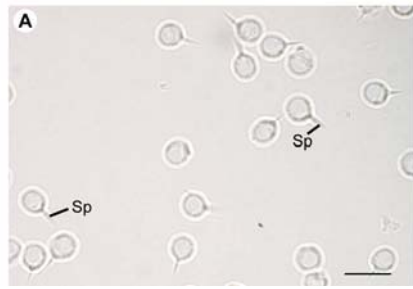


รูปที่ 22 ระยะที่ 1-6 (I-VI) ของท่อสร้างอสุจิ (seminiferous tubules) ใน semithin sections ของอัณฑะ ระยะที่ 1 เซลล์ส่วนใหญ่คือ Pachytene spermatocyte (PSc) ระยะที่ 2 เซลล์ส่วนใหญ่คือ Mataphase spermatocyte (MSc), ระยะที่ 3 เซลล์ส่วนใหญ่คือ spermatid 1 (St1), ระยะที่ 4 เซลล์ส่วนใหญ่คือ spermatid 2 (St2), ระยะที่ 5 เซลล์ส่วนใหญ่คือ spermatid 3 (St3), และระยะที่ 6 เซลล์ส่วนใหญ่คือ เซลล์อสุจิ (spermatozoa-Sz) ในทุกระยะของท่อสร้างอสุจิจะพบกลุ่มของเซลล์ spermatogonia อยู่ทุกระยะ Nur = nurse cells

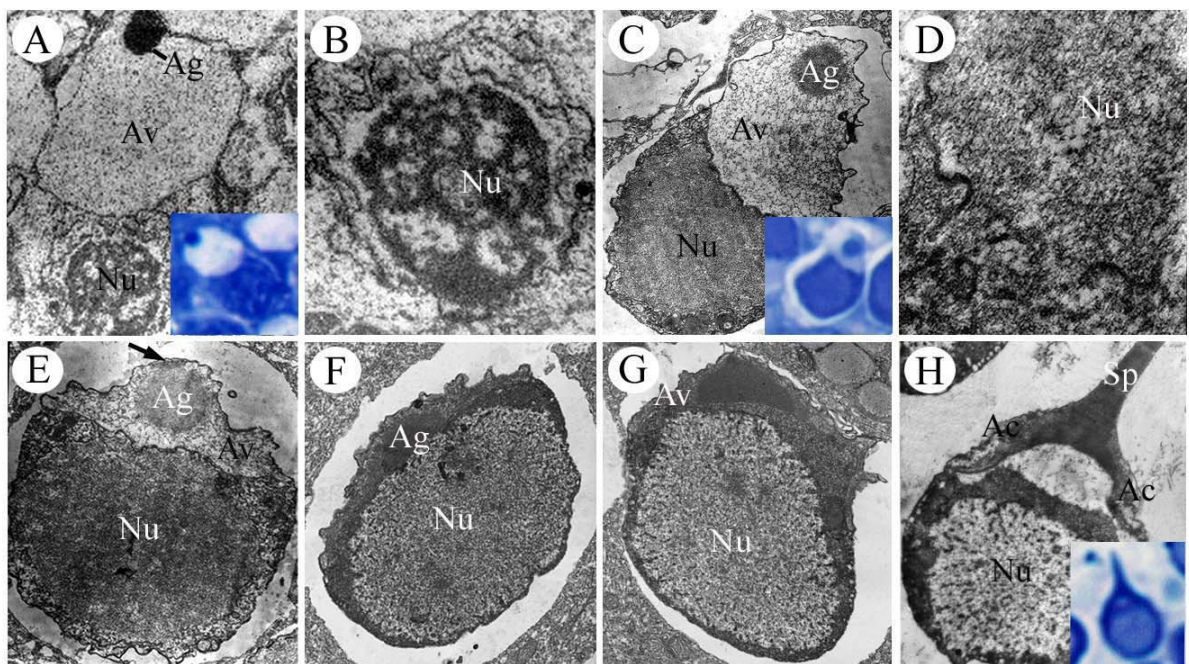
เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เซลล์อสุจิของกิ้งกูดาค่า มีรูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7-8 ไมโครเมตร มีส่วนปลายแหลมยื่นออกไปทางด้านหน้า 1 อันเรียกว่า Spike ส่วนตัวของเซลล์อสุจิที่มีลักษณะกลมมนนั้น ประกอบด้วย นิวเคลียส ที่มีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ ซึ่งบรรจุเส้นใยโครมาตินที่คลี่กระจายออกเต็มนิวเคลียส ส่วนของไซโทพลาสซึมที่อยู่โดยรอบนิวเคลียสมีเพียงเล็กน้อย เห็นเป็นเพียงแถบบางๆ เท่านั้น ทางด้านหน้าตรงบริเวณฐานของ spike นั้น มีโครงสร้างคล้ายถุงอยู่ 2 ข้างของ spike ซึ่งเชื่อว่าเป็นถุง acrosome นอกจากนั้น บริเวณใต้ acrosome หรือที่รอยต่อระหว่าง acrosome กับ nucleus มีส่วนของ subacrosome ในเซลล์อสุจิของกิ้งกูดาค่านี้ไม่พบเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear envelope) ซึ่งอาจเป็นเพราะเยื่อหุ้มนิวเคลียสได้สลายไปแล้ว เพื่อให้เซลล์อสุจิมีความพร้อม (capacitated) สำหรับการปฏิสนธิกับไข่ (รูปที่ 23-25)

สำหรับการพัฒนาโครงสร้างของเซลล์อสุจินั้น พบว่าในขั้น spermatid เซลล์อสุจิมีการพัฒนาถุง acrosome โดยเริ่มต้นจาก acrosomal vesicle ที่บรรจุ acrosomal granule โดยถุง acrosomal vesicle นี้จะมีการวางตัวอยู่ที่ทางด้านหน้าของเซลล์ ที่ทางด้านหน้าสุดของ spermatid ขั้นท้ายๆ มีการพัฒนาส่วนของ spike เริ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าเส้นใยโครมาตินภายในนิวเคลียส มีการคลี่และกระจายออกมากขึ้นจากใน spermatid ขั้นต้นๆ จนถึงขั้น spermatozoa (รูปที่ 24)

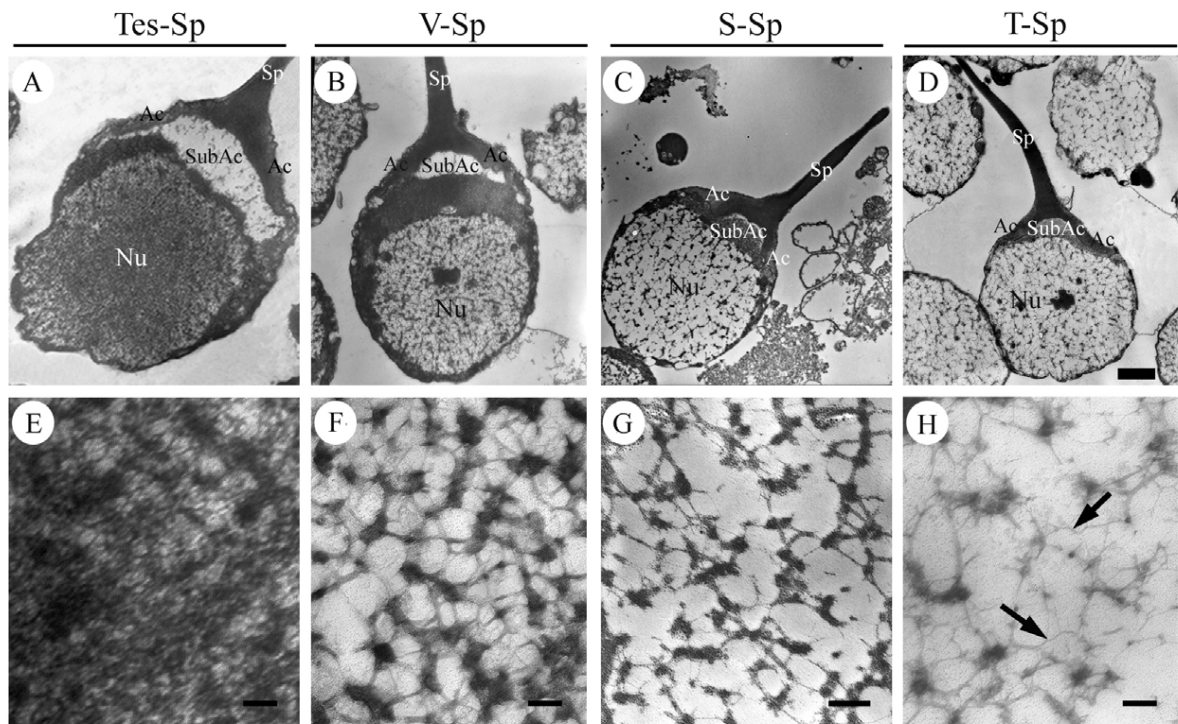
เซลล์อสุจิที่พบในท่อสร้างอสุจิ และภายในท่อนำอสุจิ รวมถึงอสุจิที่พบภายใน thelycum มีลักษณะโครงสร้างที่คล้ายคลึงกัน โดยแบ่งได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่ 1) ส่วนตัว (main body) มีลักษณะกลมขนาดประมาณ 7-8 ไมโครเมตรและประกอบด้วยนิวเคลียสเป็นส่วนใหญ่ 2) ส่วนอะโครโซม (acrosome) มีลักษณะเป็นถุงอยู่สองข้างของแท่ง spike, และ 3) ส่วนใต้อะโครโซม (subacrosomal) เป็นบริเวณที่อยู่ใต้ต่อถุง acrosome และอยู่เหนือต่อนิวเคลียส เมื่อพิจารณาอย่างละเอียดพบว่าเซลล์อสุจิมีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างบางส่วนเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อสุจิจากภายในท่อสร้างภายในอัณฑะ (testicular sperm), เซลล์อสุจิที่พบภายในท่อนำอสุจิ (vas deferens sperm), เซลล์อสุจิที่พบภายในถุงเก็บส่วนปลาย (spermatophore) และเซลล์อสุจิจากภายใน thelycum ของกิ้งกูดาค่า กล่าวคือ มีการเพิ่มระดับการคลี่และการกระจายของเส้นใยโครมาตินภายในนิวเคลียส นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณ subacrosome ของเซลล์อสุจิที่พบในอัณฑะ, ท่อนำอสุจิ และถุงเก็บส่วนปลาย ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ กล่าวคือยังคงสังเกตเห็นช่องว่างภายในอยู่บ้าง ขณะที่เซลล์อสุจิที่พบใน thelycum ไม่มีช่องว่างอยู่ในส่วน subacrosome (รูปที่ 25)



รูปที่ 23 ลักษณะของเซลล์อสุจิเมื่อดูได้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา เซลล์มีลักษณะกลมและมี spike (Sp) ยื่นออกไปทางด้านหน้า Bar = 5 μ m.



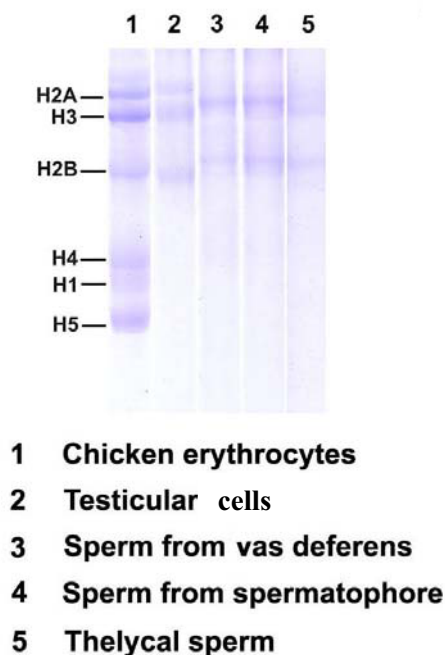
รูปที่ 24 เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ระยะต่างๆ เมื่อถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (A-G) Spermatid ระยะต่างๆ (H) เซลล์อสุจิในท่อสร้างอสุจิในอัณฑะ (Testicular spermatozoa) Av = acrosomal vesicle; Ag = anterior granule; Nu = nucleus; SubAc = subacrosomal region; Ac = acrosome; Sp = anterior spike



รูปที่ 25 (A-D) เซลล์อสุจิจากภายในท่อสร้างในอวัยวะ (testicular sperm, Tes-sp), เซลล์อสุจิที่พบภายในท่อนำอสุจิ (vas deferens sperm, V-sp), เซลล์อสุจิที่พบภายในถุงเก็บส่วนปลาย (spermatophoric sperm, S-sp) และเซลล์อสุจิจากภายใน thelycum ของกิ้งก่า (Thelycal sperm, T-sp) เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (E-H) รูปเปรียบเทียบเส้นใยโครมาตินของเซลล์อสุจิที่มาจากที่ต่างๆ ลูกศรในรูป H แสดงเส้นใยโครมาตินที่คลี่กระจายออกจนเป็นเส้นบางๆ Bar ในรูป D = 1 μm และ Bar in E-H = 0.1 μm .

จากการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างละเอียดของเซลล์อสุจิที่พบในแต่ละส่วนของท่อสืบพันธุ์ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย กล่าวคือ มีการเพิ่มขึ้นของระดับการคลี่กระจายของเส้นใยโครมาตินภายในนิวเคลียส จากชั้นอสุจิที่อยู่ภายในท่อสร้างเซลล์อสุจิภายในอวัยวะ (testicular sperm), เซลล์อสุจิที่พบภายในท่อนำอสุจิ (vas deferens sperm), เซลล์อสุจิที่พบภายในถุงเก็บส่วนปลาย (spermatophore) และเซลล์อสุจิจากภายใน thelycum ของกิ้งก่า ตามลำดับ โดยพบว่าในเซลล์อสุจิใน thelycum มีการคลี่กระจายของเส้นใยโครมาตินสูงสุด ดังนั้นจึงมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงโปรตีนที่พบอยู่ในนิวเคลียสซึ่งสัมพันธ์อยู่กับเส้นใยโครมาตินและอาจอธิบายถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงของการคลี่กระจายออกของเส้นใยโครมาตินได้ในระดับชีวโมเลกุล โดยการศึกษานี้ได้ใช้วิธีการแยกโปรตีนในนิวเคลียสซึ่งเป็นโปรตีนชนิดประจุบวกจากเซลล์ในอวัยวะ (testicular cells) และ อสุจิที่ได้จากแหล่งต่างๆ ของทางเดินสืบพันธุ์ของกิ้งก่าดำทั้งเพศผู้และเพศเมีย คือจาก ท่อนำอสุจิ (vas deferens sperm), ถุงเก็บอสุจิส่วนปลาย (spermatophoric sperm) และจาก thelycum (thelycal sperm) โปรตีนที่สกัดได้นำนามาแยกในสนามไฟฟ้าบนแผ่นเจล acrylamide แบบ acid-urea acrylamide gel electrophoresis หลังจากนั้นจึงนำไปย้อมด้วยสีย้อมโปรตีน Coomassie blue R-250 และเปรียบเทียบแถบโปรตีนที่ได้กับโปรตีนที่สกัดจากโปรตีนในนิวเคลียสของเม็ดเลือดไก่ (chick erythrocyte) จากการทดลองแสดงว่า เซลล์อสุจิในอวัยวะมีโปรตีน

histone 3 ตัว ที่เทียบกับโปรตีน histone H2A, histone H2B, และ histone H3 ส่วนเซลล์อสุจิในท่อนำอสุจิ, ถุงเก็บอสุจิส่วนปลาย, และใน thelycum แสดงแถบโปรตีนเพียง 2 แถบที่เคลื่อนช้ากว่า histone H2B และ H3 ของโปรตีนจากเม็ดเลือดไก่ standard (รูปที่ 26) จะเห็นได้ว่าโปรตีน histone ภายในนิวเคลียสของเซลล์อสุจิที่พบในท่อนำอสุจิ, ถุงเก็บอสุจิส่วนปลาย, และใน thelycum มีการเปลี่ยนแปลงทั้งชนิดและมีปริมาณลดลง โดยแถบโปรตีนที่พบในอสุจิจากแหล่งต่างๆเหล่านี้ อาจเป็นแคออนุพันธ์ของโปรตีน histone H2B และ H3 ที่ยังหลงเหลืออยู่ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนชนิดประจวบภายในนิวเคลียสของอสุจิอาจเกี่ยวข้องกับการคลี่กระจายออกของเส้นใยโครมาติน เนื่องจากมีโปรตีน histone ซึ่งมีประจวบลดลงมาก



รูปที่ 26 โปรตีนประจวบจากเซลล์ในอัมชะ (testicular cells) และ อสุจิที่นำมาจากแหล่งต่างๆของท่อนำอสุจิของกิ้งกูดดำทั้งเพศผู้และเพศเมีย คือจากท่อนำอสุจิ (vas deferens sperm) ถุงเก็บอสุจิส่วนปลาย (spermatophoric sperm) และจาก thelycum (thelycal sperm)

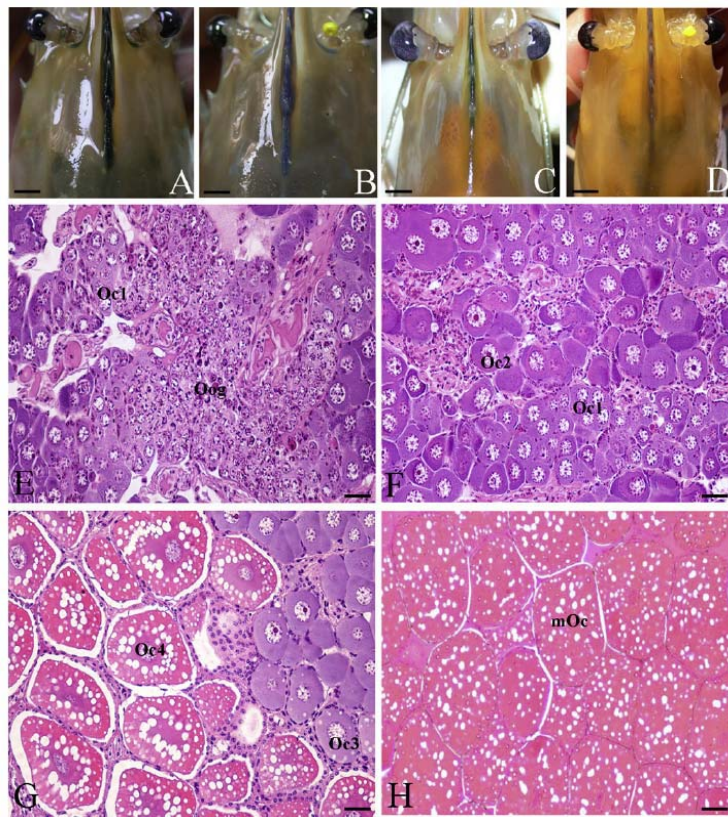
เราพบว่า อสุจิในถุง spermatophore ที่ถูกสอดเข้าไปใน thelycum ของเพศเมียต้องการระยะเวลาบ่มตัวเพื่อเตรียมความพร้อมในการปฏิสนธิกับเซลล์ไข่อย่างน้อย 3 วัน ในระหว่างระยะเวลาดังกล่าว มีการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลที่เกิดขึ้นข้างในนิวเคลียสดังที่กล่าวมาแล้วและในไซโทพลาสซึมโดยเฉพาะการเพิ่มปริมาณของ phosphorelated proteins ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวเป็นส่วนของ sperm capacitation ซึ่งถูกชักนำโดยน้ำทะเลที่มีสารละลายจากเปลือกไข่

หัวข้อที่ 3. การศึกษาโครงสร้างของไข่และการพัฒนาของเซลล์ไข่ในกิ้งกูดดำเปรียบเทียบกับกิ้งกูดดำและกระบวนการปฏิสนธิระหว่างไข่กับอสุจิ

เมื่อศึกษาการพัฒนาของรังไข่และเซลล์ไข่ของกิ้งกูดด้วยวิธีจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่ารังไข่ประกอบด้วยพู (lobe) ที่ห่อหุ้มด้วยเยื่อเกี่ยวพันที่แยกรังไข่ออกเป็นพูย่อย (lobules) แต่ละพูย่อยประกอบด้วย follicle ที่มีเซลล์ไข่

ชั้นต่างๆ อยู่ โดยเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนาแบ่งออกเป็น 5 ชั้นคือ oogonia (Og) primary oocytes 6 ชั้น และ secondary oocytes 4 ชั้น (Oc₁, Oc₂, Oc₃, Oc₄) วงจรของรังไข่แบ่งออกเป็น 4 ช่วงคือ spawn-spent (Stage I), proliferative (stage II), premature (stage III) และ mature (stage IV) แต่ละระยะมีกลุ่มเซลล์ Oc ที่พัฒนาในระดับชั้นต่างๆ stage I มี Og และ Oc₁ stage II มี Og, Oc₁, Oc₂ stage III มี Og, Oc₂, Oc₃ stage IV มี Oc₄ ส่วนใหญ่และ Og จำนวนน้อย

เซลล์ไข่งูกุลาดำมีขั้นตอนต่างๆ คล้ายคลึงกับเซลล์ไข่ของกุ้งก้ามกราม แต่ไข่งูกุลาดำที่สมบูรณ์แล้วมีสารเคลือบไข่ที่มีลักษณะเป็นแท่งๆ (cortical rod) ซึ่งประกอบด้วย สารไกลโคโปรตีนที่มี molecular weight 35-250 kD ซึ่งมีปริมาณน้ำตาลเชิงเดี่ยว mannose สูง (เอกสารอ้างอิงหมายเลข 1) สารเคลือบไข่งูกุลาดำละลายในน้ำทะเลเมื่อไข่ตกออกจากตัวกุ้งซึ่งเรียกว่า egg water (EW) EW มีสารไกลโคโปรตีนและเอนไซม์ trypsin ที่สามารถกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา acrosome reaction ในเซลล์อสุจิได้

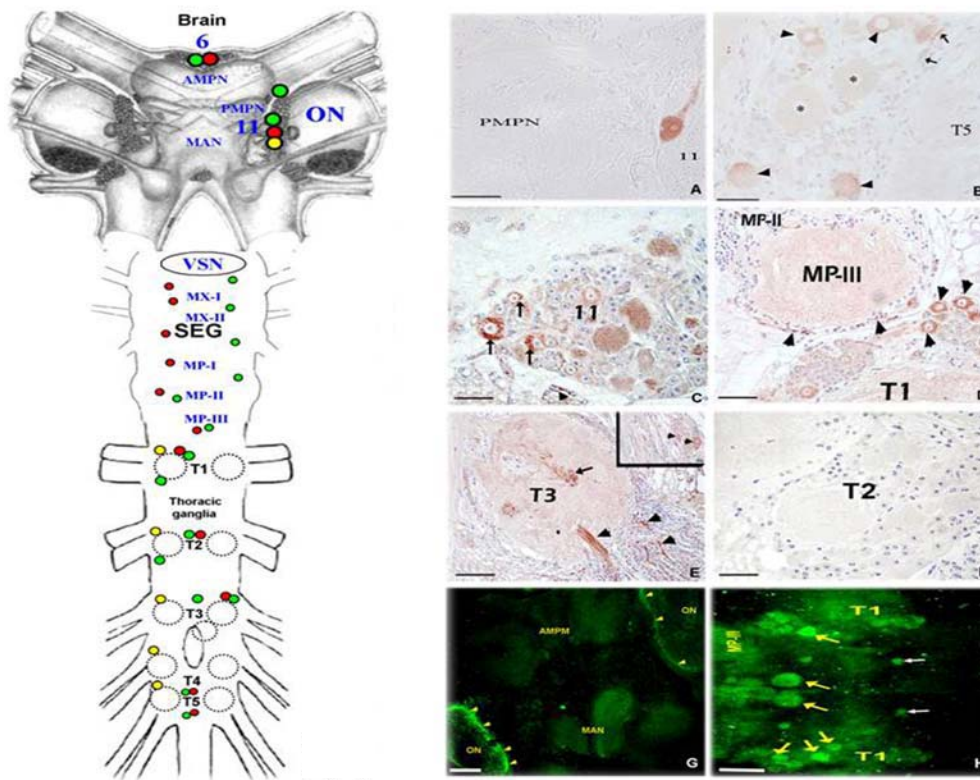


รูปที่ 27 Top views of female giant freshwater prawn, *M. rosenbergii*, showing ovary at various stages: (A) stage I, (B) stage II, (C) stage III, (D) stage IV. (E–H) Light micrographs of H&E-stained ovarian sections showing histology of various stages of ovarian cycle (I–IV) and steps of oocyte development. Oog, oogonia; Oc1, early previtellogenic oocyte; Oc2, late previtellogenic oocytes; Oc3, early vitellogenic oocytes; Oc4, late vitellogenic oocytes; mOc, mature oocytes (classified according to Meeratana and Sobhon 2007). Scale bars = 1 cm (A–D). Scale bars = 50 μm (E–H).

(ดูรายละเอียดในเอกสารหมายเลข 1.6, 1.7, 1.8 ในภาคผนวก)

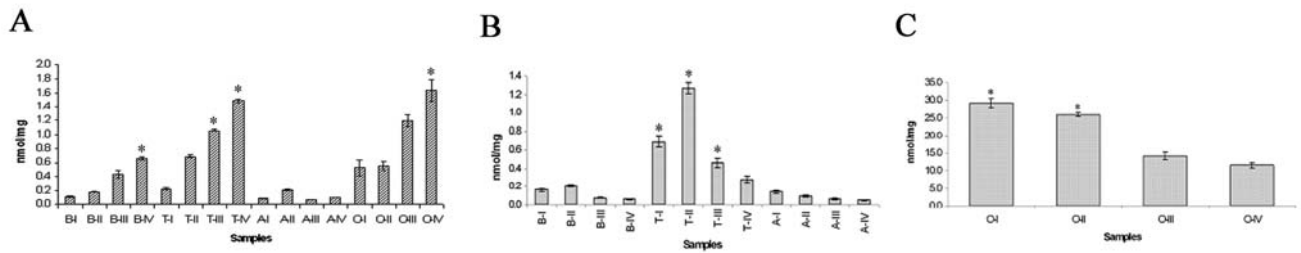
หัวข้อที่ 4 การวิเคราะห์การกระจายและวัดระดับของสารสื่อประสาทเซโรโทนิน (5-HT) โดปามีน (DA) ออกโดปามีน (OA) ในระบบประสาทและรังไข่กุ้งโดยวิธี immunocytochemistry (ICC) และ high performance liquid chromatography (HPLC)

จากการใช้กรรมวิธี ICC และ HPLC พบว่ามี 5-HT และ DA กระจายอยู่ในเซลล์ประสาทและใยประสาทที่อยู่ในปมประสาททุกระบบประสาทส่วนกลางทุกอัน โดยมีจำนวนเซลล์ประสาทที่บรรจุ 5-HT และ DA มากเป็นพิเศษในสมอง (supraesophageal ganglion) และปมประสาทอก (thoracic ganglion) (รูปที่ 28 และ 29 และเมื่อทำการวัดปริมาณของสารสื่อประสาททั้งสองด้วยวิธี HPLC พบว่า 5-HT มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามช่วงของการพัฒนาของรังไข่ ส่วน DA มีปริมาณลดลงสวนทางกับ 5-HT ทั้งในสมอง ปมประสาท thoracic และรังไข่ (รูปที่ 30)



รูปที่ 28 ภาพวาดแสดงการกระจายของเซลล์ที่บรรจุสารสื่อประสาท 5HT (สีเขียว) และ DA (สีแดง) และฮอร์โมน GnRH (สีเหลือง) ในปมประสาทต่างๆของระบบประสาทของกิ้ง AMPN-anterior medial protocerebral neuropil; PMPN-posterior medial protocerebral neuropil; MAN-medial antenna I neuropil; ON-olfactory neuropil; VSN-visceral sensory neuropil; MX-I-maxilla-I; MX-II-maxilla-II; MP-I, maxiliped-I; MP-II, maxiliped-II; MP-III, maxiliped-III.

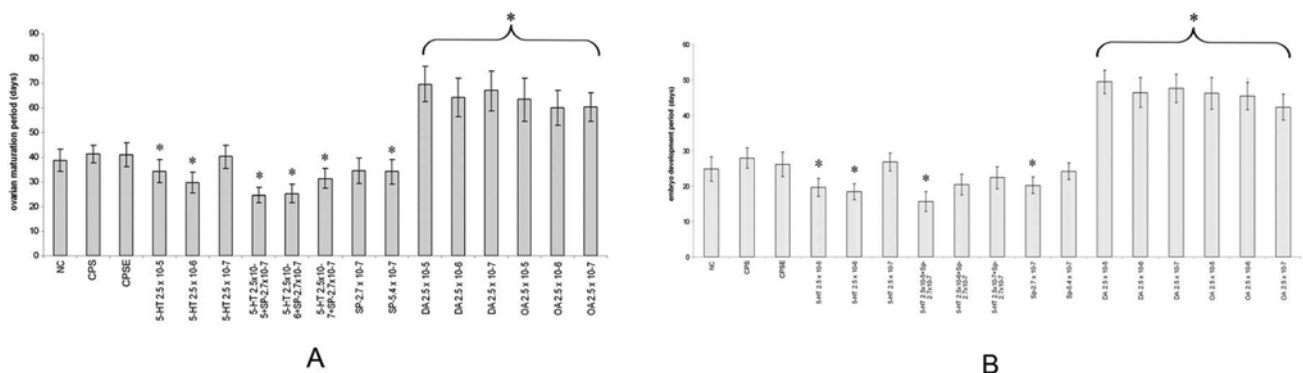
รูปที่ 29 Light micrographs of immunoperoxidase and immunofluorescence detections of 5-HT and DA in the CNS of mature female *M. rosenbergii* as illustrated in the diagram on the left (5-HT, green dot; DA, red dot; GnRH, yellow dot) (A) 5-HT-immunoreactive neuron in cluster 11 (B) 5-HT-immunoreactive neurons in T5 (C) DA-immunoreactive neurons in cluster 11 (D) DA-immunoreactive neurons in SEG and T1 (E) DA-immunoreactive fibers running out of T3 and DA-neurons in T3 (inset) (F) The negative control (G) Immunofluorescence detections of DA-immunoreactive fibers in olfactory neuropil (H) DA-immunoreactive neurons in SEG and T1

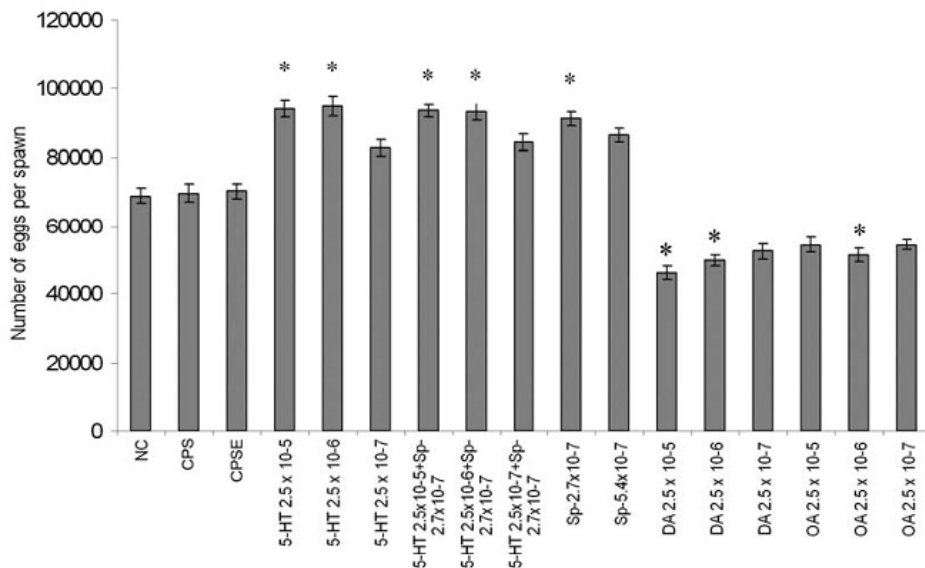


รูปที่ 30 Histogram illustrating the analysis of levels of 5-HT and DA in CNS of *M. rosenbergii* female by HPLC (A) the changing concentrations of 5-HT in the brain, thoracic ganglion, abdominal ganglion, and ovary. (B) the changing of concentrations of DA in the brain, thoracic ganglion, and abdominal ganglion. (C) the changing of concentrations of DA in the ovary. The concentration is expressed as nmol/mg of protein in the organ extract. Numbers are mean $\pm$ S.E.M. B-I to IV, T-I to IV, A-I to IV, and O-I to IV are the brain, thoracic ganglion, abdominal ganglion, and ovary at stages I to IV.

หัวข้อที่ 5. การศึกษาผลกระทบต่อการพัฒนาของรังไข่กุ้งด้วยสารสื่อประสาท 5-HT และ DA

เมื่อทำการฉีดแม่พันธุ์กุ้งด้วย 5-HT, DA antagonist (spiperone-SP) และออกโทพามีน (OA) ทำให้รังไข่พัฒนาเร็วขึ้นกว่าปกติมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 31A) และมีการปล่อยไข่ออกมาซึ่งมีปริมาณและคุณภาพเหมือนสภาพปกติ (รูปที่ 32) นอกจากนั้นยังทำให้ระยะการพัฒนารังไข่ของเอ็มบริโอลดลงด้วย (รูปที่ 31B)



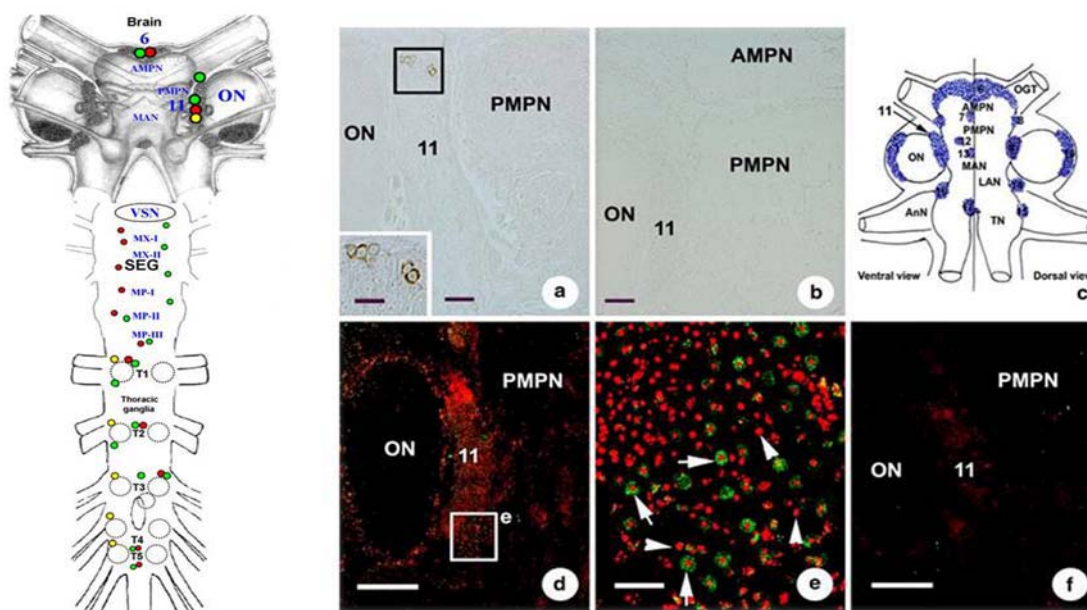


รูปที่ 32 Number of eggs per spawn, after injection with various doses of 5-HT, DA, OA, SP, and 5-HT plus SP, when compared to the control groups. Asterisks indicate significant differences ($P < 0.05$) when compared to the control groups.

(ดูรายละเอียดในเอกสารหมายเลข 1.22 ในภาคผนวก)

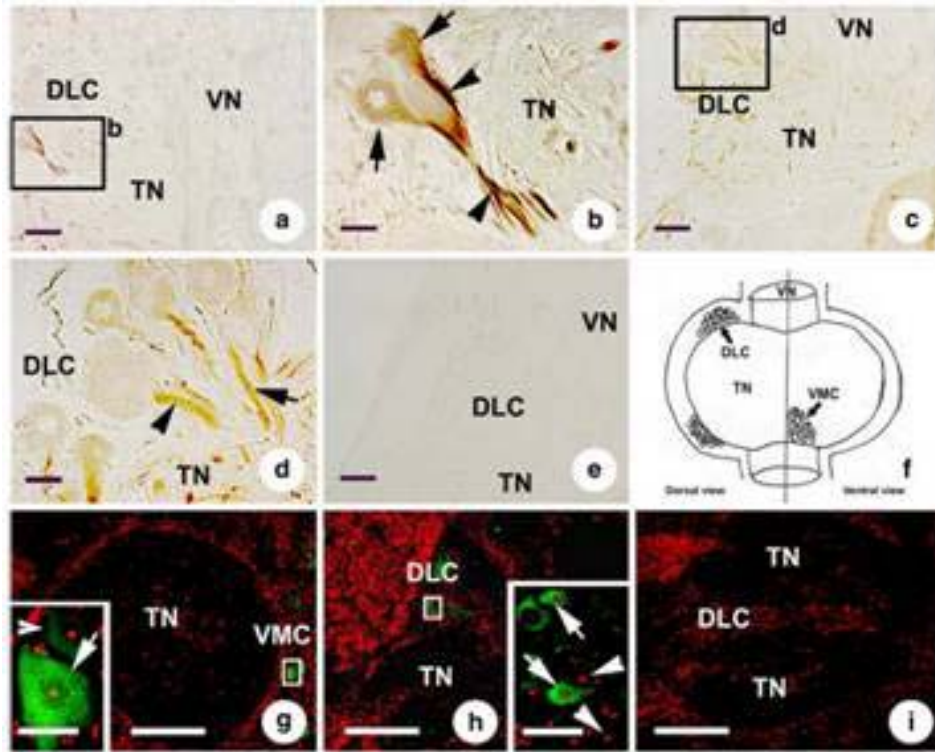
หัวข้อที่ 6. การวิเคราะห์การกระจายของฮอร์โมน gonadotropin-releasing hormone (GnRH) และ egg-laying hormone (ELH) โดยวิธี immunocytochemistry (ICC)

จากการใช้กรรมวิธี ICC พบว่า มี GnRH 3 isotypes ที่มีคุณสมบัติคล้าย lamprey GnRH III (IGnRHIII), octopusGnRH (OctGnRH) และ tunicateGnRH (tGnRH) ในปมประสาทต่างๆ ของระบบประสาทส่วนกลาง โดยในส่วน deutocerebrum ของปมประสาท supraesophageal ganglion หรือ brain มี isotype ที่คล้ายกับ IGnRHIII ในปมประสาท thoracic ganglion มี isotype ที่คล้ายกับ OctGnRH และ tGnRH (รูปที่ 33, 34, 35) ในขณะที่รังไข่มี isotype ที่คล้ายกับ IGnRHI (รูปที่ 36) ส่วนการใช้วิธี ICC วิเคราะห์หาการกระจายของฮอร์โมน ELH พบว่าฮอร์โมนชนิดนี้มีอยู่ทั้งในระบบประสาทกลางในส่วนสมองซึ่งมีจำนวนน้อย (รูปที่ 37) แต่มีจำนวน ELH เซลล์ในรังไข่จำนวนมาก (รูปที่ 36 และ 37)

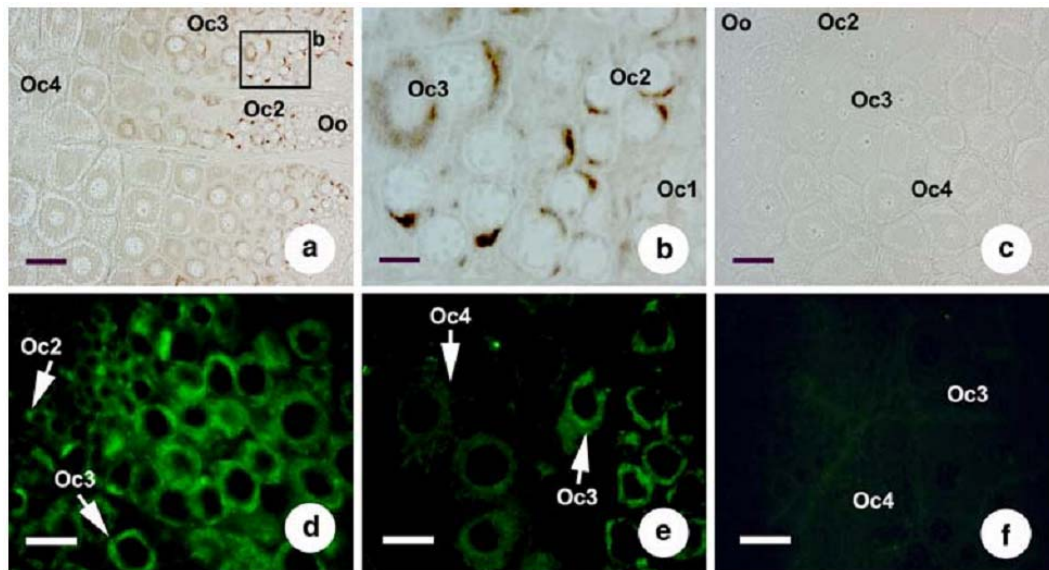


รูปที่ 33 Diagram illustrating the distribution of GnRH in the CNS of mature female freshwater prawn, *M. rosenbergii* (5-HT, green dot; DA, red dot; GnRH, yellow dot). AMPN-anterior medial protocerebral neuropil; PMPN-posterior medial protocerebral neuropil; MAN-medial antenna I neuropil; ON-olfactory neuropil; VSN-visceral sensory neuropil; MX-I-maxilla-I; MX-II-maxilla-II; MP-I, maxiliped-I; MP-II, maxiliped-II; MP-III, maxiliped-III.

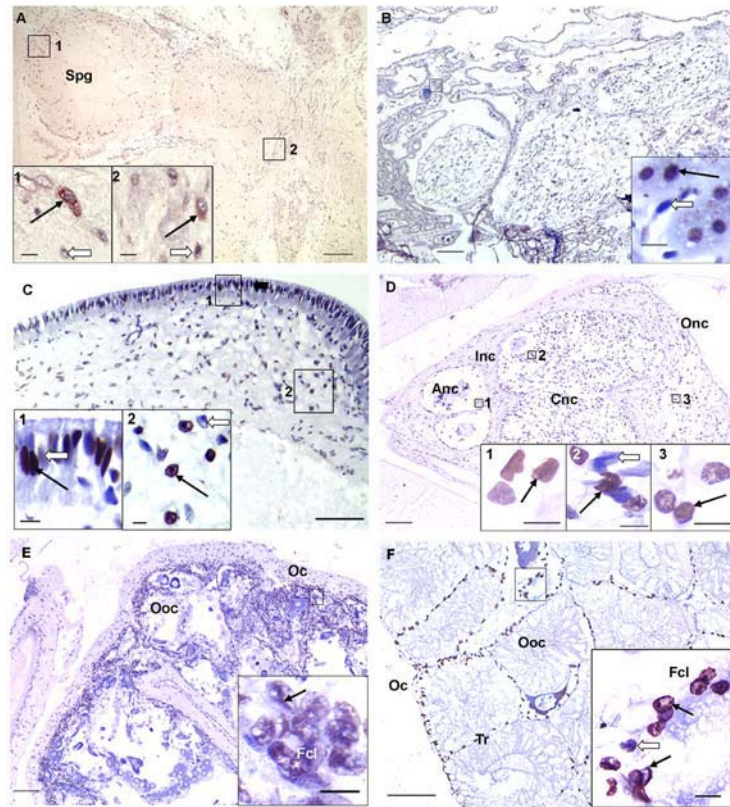
รูปที่ 34 Immunoperoxidase (a-b) and immunofluorescence (d-f), showing the distribution of ir-IgNHRH-III in the prawn supraesophageal ganglion. (a) The ir-IgNHRH-III is present in neuronal cell bodies within cluster 11 of the deutocerebrum. (a, inset) Higher magnification of boxed area in (a), showing the ir-IgNHRH-III in neuronal cell bodies of medium-sized neurons. (b) Negative control section of immunoperoxidase, using IgNHRH-III-preabsorbed antiserum as a probe, showing no ir-IgNHRH-III. (c) A diagram showing the locations of neuronal cell clusters as numbered in the supraesophageal ganglion (modified from Sandeman et al. 1992). (d) Immunofluorescence showing the ir-IgNHRH-III neuronal cell bodies in cluster 11. (e) Higher magnification of the boxed area in (d), revealing the ir-IgNHRH-III in medium-sized neuronal cell bodies (arrows). There was no ir-IgNHRH-III in some neuronal cells within the same cluster (arrowheads). (f) Negative control section of immunofluorescence using IgNHRH-III-preabsorbed antiserum as a probe, showing no immunoreactivity. AMPN anteriomedial protocerebral neuropil, AnN antenna II neuropil, LAN lateral antenna I neuropil, MAN medial antenna I neuropil, PMPN posterior medial protocerebral neuropil, OGT olfactory globular tract, ON olfactory neuropil, TN tegumental neuropil. Scale bars: 100 μ m (a and b); 300 μ m (d and f); 30 μ m (e); 25 μ m (a, inset)



រូបភាព 35 Immunoperoxidase (a-e) and immunofluorescence (g-i), showing the distribution of ir-octGnRH in the prawn thoracic ganglia. (a) The ir-octGnRH is present in medium-sized neuronal cells in the dorsolateral neuronal cell cluster (DLC). (b) Higher magnification showing the ir-octGnRH in the soma of neuronal cells (arrows) and fibers (arrowheads) extending from the soma. (c) and (d) Light micrographs showing the ir-octGnRH positive fibers innervating medium-sized (d, arrow) and large-sized (d, arrowhead) neuronal locations of neuronal cell clusters in the thoracic ganglion. (e) Negative control using octGnRH-preabsorbed antiserum as a probe, revealing only background staining. (f) A diagram showing the locations of neuronal cell clusters in the thoracic ganglion. (g) and (h) showing the ir-octGnRH in the soma of some large-sized neuronal cells in ventromedial neuronal cell cluster (VMC) (g and inset, arrow) and in medium-sized neuronal cells in DLC (h and inset, arrows). However, some neuronal cells with in the same cluster show no ir-octGnRH (g and h, insets, arrowheads). (i) Negative control section of immunofluorescence using octGnRH-preabsorbed antiserum as a probe, showing only nuclear staining. TN thoracic neuropil, VN ventral nerve cord. Scale bars 100 μm (a, c and e); 25 μm (b and d); 300 μm (g, h and i); 30 μm (g and h, insets) cells.



รูปที่ 36 Immunoperoxidase (a-c) and immunofluorescence (d-f) showing the distribution of ir-IGnRH-I in the prawn ovary. Their- IGnRH-I is present in Oc2 and Oc3 oocytes (a and d). Higher magnification showing the ir-IGnRH-I localized at the perinuclear region of Oc2 and in the cytoplasm of Oc3 (b, d, and e). Negative control sections of immunoperoxidase (c) and immunofluorescence (f) using IGnRH-I-preabsorbed antiserum as a probe, showing only background staining. Oo oogonia, Oc2 oocyte stage 2 (late previtellogenic oocyte), Oc3 oocyte stage3 (early vitellogenic oocyte), Oc4 oocyte stage4 (late vitellogenic oocyte). Scale bars: 100 μm (a and c); 25 μm (b); 50 μm (d, e and f)



รูปที่ 37 Immunodetection of ELH in *P. monodon* cephalothoracic region and abdominal nerve tract. Detection used a primary antibody of polyclonal mouse anti-abalone ELH, a secondary of monoclonal biotinylated goat anti-mouse IgG, and visualisation using an avidin-HRP conjugate combined with a NovaRED substrate. Black arrows indicate positive cells under high magnification (insets of designated low power regions), whereas white arrows show negative cells. **A** is the cephalothoracic region showing the supraesophageal ganglion (Spg) and two locations of neurosecretory ELH positive cells. **B** is the antennal gland showing ELH positive cells. **C** is the dorsal cephalothoracic region posterior to the Spg, with high power insets showing ELH positive cells. **D** is the major abdominal nerve tract showing the appendage nerve cord (Anc), central nerve cord (Cnc), inner nerve capsule (Inc), and outer nerve capsule (Onc), with high power insets showing ELH positive cells. Scale bars 100 μm in A-C, 10 μm in insets. ELH immunodetection in female shrimp ovaries at different reproductive stages, using the same technique as used in Fig.37A-D. Arrows indicate positive cells. **E** is a Stage I shrimp ovary showing ovarian capsule (Oc) and oocytes (Ooc), with high magnification of ELH positive follicular cells (Fcl). **F** is a Stage IV shrimp ovary surrounded by a capsule (Oc) and showing fully mature oocytes (Ooc), and trabachulae (Tr), with high magnification of ELH positive Fcl. Scale bars 100 μm in A-C, 10 μm in insets.

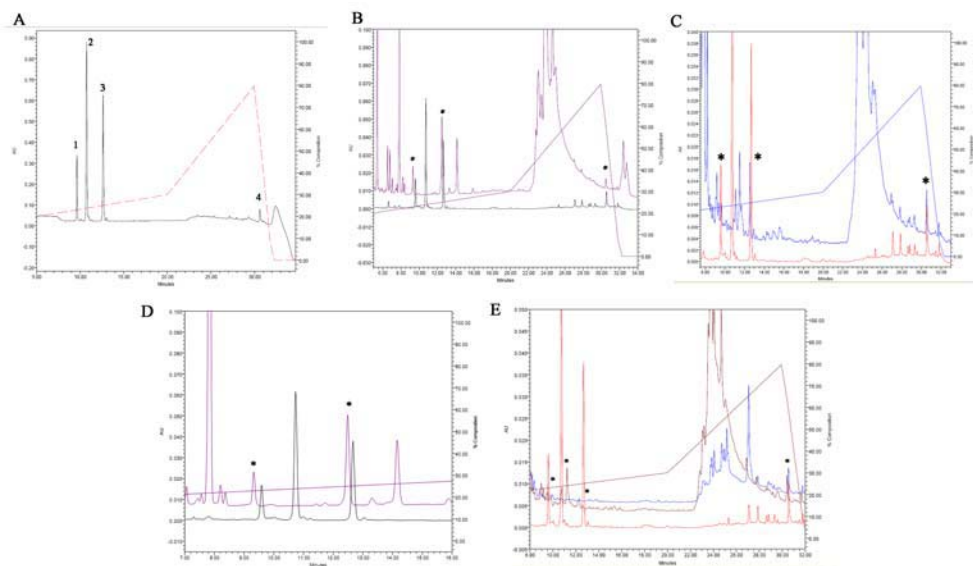
(ดูรายละเอียดในเอกสารหมายเลข 1.4, 1.10, 1.11, 1.12, 1.23 ในภาคผนวก)

หัวข้อที่ 7. วิเคราะห์คุณลักษณะของฮอร์โมน GnRH และ ELH โดยวิธี high performance liquid chromatography (HPLC)

เมื่อวิเคราะห์หาคุณลักษณะและปริมาณของฮอร์โมน GnRH และ ELH โดยวิธี HPLC พบว่า มี GnRH ถึง 3 isotypes ในปมประสาทและต่อมเพศเช่นกัน (รูปที่ 38) โดยมี lamprey I GnRH (lGnRH) ใน brain และ thoracic ganglion ส่วน octopus GnRH (octGnRH) และ tunicate GnRH (tGnRH) พบมากในปมประสาท thoracic ganglion และนอกจากนี้ยังสามารถพบ octGnRH และ tGnRH ในต่อมเพศทั้งรังไข่และต่อมอัณฑะ ส่วน lGnRH พบปริมาณเล็กน้อย ส่วน ELH สามารถพบได้ทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและต่อมเพศของกุ้งทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ตารางที่ 6)

ตารางที่ 6 แสดงการปรากฏของ GnRH และ ELH ในระบบประสาทส่วนกลางและต่อมเพศของกุ้งเพศผู้และเพศเมีย จากการตรวจหาปริมาณด้วยวิธี HPLC

Neuropeptide & Neurohormone	Male				Female			
	Brain	Thoracic ganglion	Abdominal ganglion	Testis	Brain	Thoracic ganglion	Abdominal ganglion	Ovary
Octopus-GnRH	+	+++	+	+++	+	+++	-	++
Tunicate-GnRH	+	++	-	+++	+	++	-	++
Lamprey I GnRH	+++	+	+	-	++	+++	-	-
ELH	+	+++	++	++	+	+++	++	++



รูปที่ 38 (A) HPLC chromatograms of (A) standards at 1.0 ml/min flow rate. (1) Octopus GnRH ; (2) Lamprey I GnRH. ; (3) Tunicate GnRH; (4) abalone ELH extracts of brain (B, purple), thoracic ganglion (C, dark blue), and testis (D, purple) from mature male (E) The thoracic ganglion (brown) and ovary (blue) from female, *Macrobrachium rosenbergii*. Asterisks show the GnRH and ELH positive peaks.