

โครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรมปากจیب และการประยุกต์ใช้ในการจำแนกชนิดของหอยนางรม

กุลนิษฐ์ ถนอมจิตร ภาคภูมิ พระประเสริฐ และสุทิน กิ่งทอง*

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ชลบุรี 20131

*E-mail: sutin@go.buu.ac.th

รับบทความ: 25 มิถุนายน 2563 แก้ไขบทความ: 20 สิงหาคม 2563 ยอมรับตีพิมพ์: 27 สิงหาคม 2563

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาโครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือเซลล์อสุจิหอยนางรมปากจیب *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) เพื่อเปรียบเทียบความแปรผันทางสัณฐานวิทยาของเซลล์อสุจิระหว่างหอยนางรมปากจیبและหอยนางรมชนิดที่มีการศึกษาแล้วใน Family Ostreidae ผลการศึกษาพบว่าเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจیبมีลักษณะสัณฐานวิทยาคล้ายกับที่พบในรายงานของหอยนางรมชนิดอื่นโดยประกอบด้วยส่วนหัวที่ประกอบด้วยส่วนกลาง และ ส่วนหาง ส่วนหัวพบนิวเคลียสรูปเกือบวงและมีอะโครโซมด้านหน้าสุด พบแอ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียสขนาดใหญ่ ส่วนกลางพบไมโทคอนเดรียขนาดใหญ่ 4 อัน ล้อมรอบเซนทริโอล ส่วนหางพบการเรียงตัวของไมโครทิวบูลแบบ 9+2 อย่างไรก็ดีเมื่อเปรียบเทียบกับหอยนางรมชนิดอื่น พบว่า เซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจیبมีความแปรผันทางสัณฐานวิทยาแตกต่างจากหอยนางรมชนิดอื่น ผลการวิเคราะห์ความแปรผันทางสัณฐานวิทยาแสดงให้เห็นว่า อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของแอ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียส (anterior nuclear fossa length/width) สามารถใช้ในการแยกกลุ่มหอยนางรมในระดับสกุล (genus) ระหว่างสกุล *Saccostrea* และ *Crassostrea* ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของอะโครโซม (acrosome length/width) อัตราส่วนระหว่างความยาวของอะโครโซมต่อความยาวของนิวเคลียส (acrosome length/nucleus length) และอัตราส่วนระหว่างความยาวของแอ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียสต่อความยาวของนิวเคลียส (anterior nuclear fossa length/nucleus length) ร่วมกัน มีแนวโน้มสำหรับใช้ในการจำแนกในระดับชนิด (species) ในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* ได้

คำสำคัญ: หอยนางรม อสุจิ จุลกายวิภาค มอร์โฟเมตริกส์

Ultrastructure of Spermatozoa in the Hooded Oyster and the Application in Oyster Taxonomic Classification

Kullanist Thanormjit, Phakpoom Phraprasert, and Sutin Kingtong *

Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi 20131, Thailand

*E-mail: sutin@go.buu.ac.th

Received: 25 June 2020 Revised: 20 August 2020 Accepted: 27 August 2020

Abstract

This work studied the ultrastructures of male gamete or sperm in the hooded oyster *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) using a transmission electron microscope (TEM) in order to compare morphometric variation of sperm between the hooded oyster and other oyster species in Family Ostreidae that have been reported. Our results revealed that sperm of the hooded oyster exhibited similar morphological characteristics to other oysters which included head, midpiece and flagellum. The head is composed of a barrel-shaped nucleus, anteriorly acrosome, and a dominantly anterior nuclear fossa. The midpiece is composed of four large mitochondria surrounding centrioles. The flagellum is composed of an axoneme with 9+2 microtubule arrangement. However, morphometric variations were observed in the hooded oyster sperm when compared to other oysters. Results of morphometric analysis indicated that ratio of anterior nuclear fossa length/width were able to classify oysters into genus level; *Saccostrea* and *Crassostrea*. Moreover, within Genus *Saccostrea*, the combination of the ratio of acrosome length/width, ratio of acrosome length/nucleus length, and ratio of anterior nuclear fossa length/nucleus length were potentially used to classify oysters into species level.

Keywords: Oyster, Sperm, Ultrastructure, Morphometrics

บทนำ

ปัจจุบันการจำแนกชนิดของหอยนางรมออกเป็นชนิดต่าง ๆ นั้นใช้ข้อมูลด้านสัณฐานวิทยา (morphology classification) เช่น ลักษณะเปลือก สีของเปลือก ขนาดเปลือก (Li *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2004) ถิ่นที่อยู่อาศัยของหอยหรือลักษณะเปลือกของตัวอ่อนหอยนางรม (Christo *et al.*,

2010) ในการจำแนกหอยนางรมแต่ละชนิด ซึ่งการใช้สัณฐานวิทยาในการจำแนกหอยนางรมออกเป็นชนิดต่าง ๆ ยังพบปัญหาคือ เมื่อสภาพสิ่งแวดล้อมในถิ่นที่อยู่อาศัยของหอยเปลี่ยนแปลงไป เช่น อุณหภูมิ ความเค็ม ความเป็นกรด-เบส ในน้ำทะเล ปรากฏการณ์น้ำทะเลเปลี่ยนสี หรือการปนเปื้อนของสารพิษชนิดต่าง ๆ ในน้ำทะเล

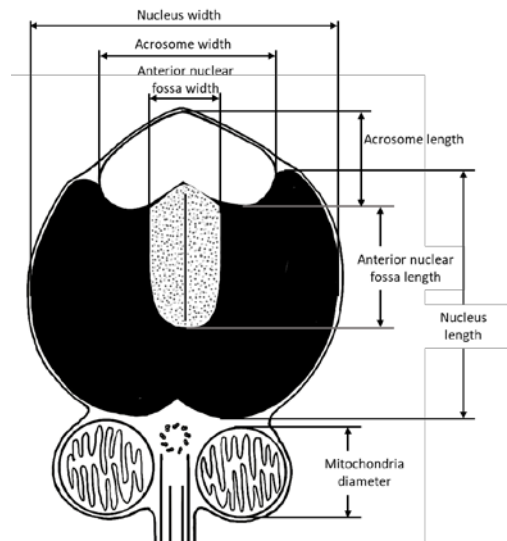
ทำให้หอยนางรมที่อาศัยในพื้นที่เหล่านี้ได้รับผลกระทบ โดยอาจส่งผลทำให้ลักษณะเปลือกเกิดการเปลี่ยนแปลงตามมา ทำให้ข้อมูลที่ใช้ในการจำแนกหอยออกเป็นชนิดต่าง ๆ ยังไม่ชัดเจนและคงที่

เพื่อแก้ไขปัญหาด้านการใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยาในการจำแนกชนิดของหอยนางรม พบบงานวิจัยที่ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular biology) มาใช้ในการจำแนกหอย เช่น การใช้ 16S-rDNA RFLP ในการจำแนกชนิด (Klinbunga *et al.*, 2005) หรืองานวิจัยที่ใช้ 16S-rRNA sequences (Li *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2004) และการใช้ DNA barcode (Reunov *et al.*, 2018) ซึ่งงานวิจัยที่ได้สามารถระบุชนิดหอยนางรมได้ในระดับสกุล (genus) แต่ยังไม่พบปัญหาในการจำแนกหอยในระดับชนิด (species)

สำหรับเทคนิคอื่น ๆ ที่ใช้ในการจำแนกหอยนางรมออกเป็นชนิดต่าง ๆ เช่น การวิเคราะห์ทางสัณฐานวิทยา (morphometric analysis) ของเซลล์อสุจิเพื่อเปรียบเทียบความแปรผันและความแตกต่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตได้ทั้งในระดับประชากร (population) ชนิด (species) สกุล (genus) หรือตามลำดับขั้นที่สูงขึ้นไป อีกทั้งยังสามารถใช้ประโยชน์ในการศึกษาเกี่ยวกับการจัดจำแนกทางอนุกรมวิธาน (taxonomic classification) ได้

พบบงานวิจัยที่ศึกษาขนาดและรูปร่างของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (sperm) จากการศึกษารูปร่างของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในหอยนางรมหลายชนิด เช่น *Crassostrea virginica* (Eckelbarger & Davis, 1996) *Crassostrea angulata* (Sousa & Oliveira, 1994) *Crassostrea gigas* (Yurchenko, 2010) และ *Saccostrea forskali* (Nu-

urai *et al.*, 2016) เพื่อใช้ขนาดและรูปร่างของ sperm ในการจำแนกชนิดของหอยนางรมได้ โดยวัดความกว้างและความยาวของนิวเคลียส (nucleus width and length) การวัดความกว้างและความยาวของอะโครโซม (acrosome width and length) และการวัดความกว้างและความยาวของแอ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียส (anterior nuclear fossa width and length) ดังในภาพที่ 1



ภาพที่ 1 โครงสร้างจุลกายวิภาคทั่วไปของเซลล์อสุจิในหอยนางรมและวิธีการวัดองค์ประกอบของเซลล์อสุจิจากภาพถ่ายที่ได้จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM) (ดัดแปลงจาก Yurchenko, 2012)

เมื่อวัดขนาดของ sperm ในส่วนต่าง ๆ เช่น การใช้อัตราส่วนระหว่างความยาวของส่วนอะโครโซมต่อความยาวนิวเคลียสและนำข้อมูลที่ได้จากความสัมพันธ์ของอัตราส่วนต่าง ๆ ไปประยุกต์ใช้ในการจำแนกหอยนางรมในระดับสกุล (genus) โดยเฉพาะสกุลที่มีความใกล้เคียงกัน ได้แก่ สกุล *Crassostrea* และ สกุล *Saccostrea* แต่

ยังไม่เพียงพอสำหรับใช้ในการจำแนกหอยนางรมในระดับชนิด (species) เนื่องจากยังขาดข้อมูลของหอยนางรมชนิดอื่น ๆ

ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* โดยการใช้วิธีมอร์โฟเมตริกส์ (morphometrics) เพื่อเปรียบเทียบผลการศึกษากับโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิในหอยนางรมที่มีการศึกษาแล้ว ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ อาจเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้พิจารณาการจัดจำแนกชนิดของหอยนางรมใน Family Ostreidae สกุล *Crassostrea* และ สกุล *Saccostrea* ได้

วิธีการดำเนินการวิจัย

ตัวอย่างหอยนางรม

เก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบจากพื้นที่เพาะเลี้ยงอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี ในเดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2561 จำนวน 30 ตัว โดยเลือกหอยนางรมโตเต็มวัยขนาดเปลือก 4–7 เซนติเมตร จากนั้นนำหอยมาทำความสะอาดโดยใช้แปรงขัดสิ่งสกปรกที่ติดมาให้หลุดออก และแกะเพรียงหินที่ติดมากับเปลือกออก และนำมาใส่ตู้เลี้ยงหอย จำนวน 15 ตัว/ตู้ ในน้ำทะเลเทียมที่มีความเค็ม 30 ppt โดยให้อาหารหอย คือ แพลงก์ตอนพืช (*Nannochloropsis* sp.) และแพลงก์ตอนสัตว์ (*Chaetoceros* sp.) ทุกวัน อย่างละ 1 ลิตร/วัน เลี้ยงหอยเพื่อปรับสภาพเป็นเวลา 7 วันก่อนเก็บตัวอย่าง และเปลี่ยนน้ำเลี้ยงหอยทุก ๆ 3 วัน

การจำแนกเพศ

เนื่องจากหอยนางรมปากจีบเป็นสัตว์ที่ไม่สามารถตรวจสอบเพศได้จากลักษณะภายนอก การตรวจสอบเพศทำได้โดยการส่องตัวอย่างเซลล์

สืบพันธุ์จากอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) เพื่อตรวจสอบชนิดของเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเท่านั้น โดยมีวิธีการคือนำหอยนางรมปากจีบมาเปิดเปลือก จากนั้นใช้มีดผ่าตัดเก็บตัวอย่างเซลล์สืบพันธุ์จากบริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ จากนั้นนำมาตรวจสอบชนิดของเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง หากเป็นเพศผู้จะพบเซลล์อสุจิ (sperm) ขนาดเล็กและมีการเคลื่อนที่ตลอดเวลา หากเป็นเพศเมียจะพบเซลล์ไข่ (oocyte or egg) ที่มีลักษณะกลมหรือรี มีขนาดใหญ่เห็นได้ชัดเจน มีความกว้างประมาณ 50 ไมโครเมตร เมื่อแยกเพศแล้วนำหอยนางรมเพศผู้จำนวน 10 ตัว มาผ่าตัดเก็บตัวอย่างบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อใช้สำหรับการศึกษาจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านต่อไป

การศึกษาจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM)

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อบริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) ขนาด 1×1 มิลลิเมตร มาคงสภาพเซลล์ในสารละลาย 2.5% glutaraldehyde ใน phosphate buffer saline (PBS) (146 mM NaCl 67 mM Na₂HPO₄ และ 43 mM NaH₂PO₄) เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำตัวอย่างไปแช่ในสารละลาย 1% osmium tetroxide ใน 0.1 M PBS และนำตัวอย่างมาตั้งน้ำออกจากเซลล์ (dehydration) จากนั้นย้ายเนื้อเยื่อลงใน propylene oxide (PO) และฝังเนื้อเยื่อใน araldite resin และตัดตัวอย่างด้วย Leica ultracut R Ultramicrotome (Leica, Germany) ให้ได้ความหนา 90–120 นาโนเมตร และย้อมด้วย uranyl acetate ใน 70% methanol และ 0.1% lead citrate แล้วนำตัวอย่างที่ได้ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

(TEM) (TECNAI 20, Philips)

การวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาาระดับจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบและหอยนางรมชนิดอื่นใน Family Ostreidae

วัดขนาดโครงสร้างของเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบตามวิธีของ Yurchenko (2012) ประกอบด้วยการวัดความกว้างและความยาวของนิวเคลียส (nucleus width and length) การวัดความกว้างและความยาวของอะโครโซม (acrosome width and length) และการวัดความกว้างและความยาวของแอ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียส (anterior nuclear fossa width and length) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไมโทคอนเดรีย (mitochondria diameter) (N=20) และนำข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์สัดส่วน เพื่อใช้สำหรับการเปรียบเทียบข้อมูลเซลล์อสุจิของหอยนางรมที่มีรายงานแล้ว

ผลการวิจัย

สัณฐานวิทยาาระดับจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบ

การศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเผยให้เห็นโครงสร้างจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิของหอยนางรมปากจีบโดยพบว่า เซลล์อสุจิประกอบด้วยองค์ประกอบสำคัญ 3 ส่วน ได้แก่ ส่วนหัว (head) ส่วนกลาง (mid-piece) และส่วนหาง (flagellum) (ภาพที่2(A))

ส่วนหัว (head) พบนิวเคลียสมีรูปร่างแบบเกือกม้า (barrel-shaped nucleus) ด้านหน้าพบอะโครโซมรูปร่างแบบถ้วย (cup-shaped acrosome) และพบแอ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียสหรืออาจเรียกว่า subacrosomal space เป็นแอ่ง

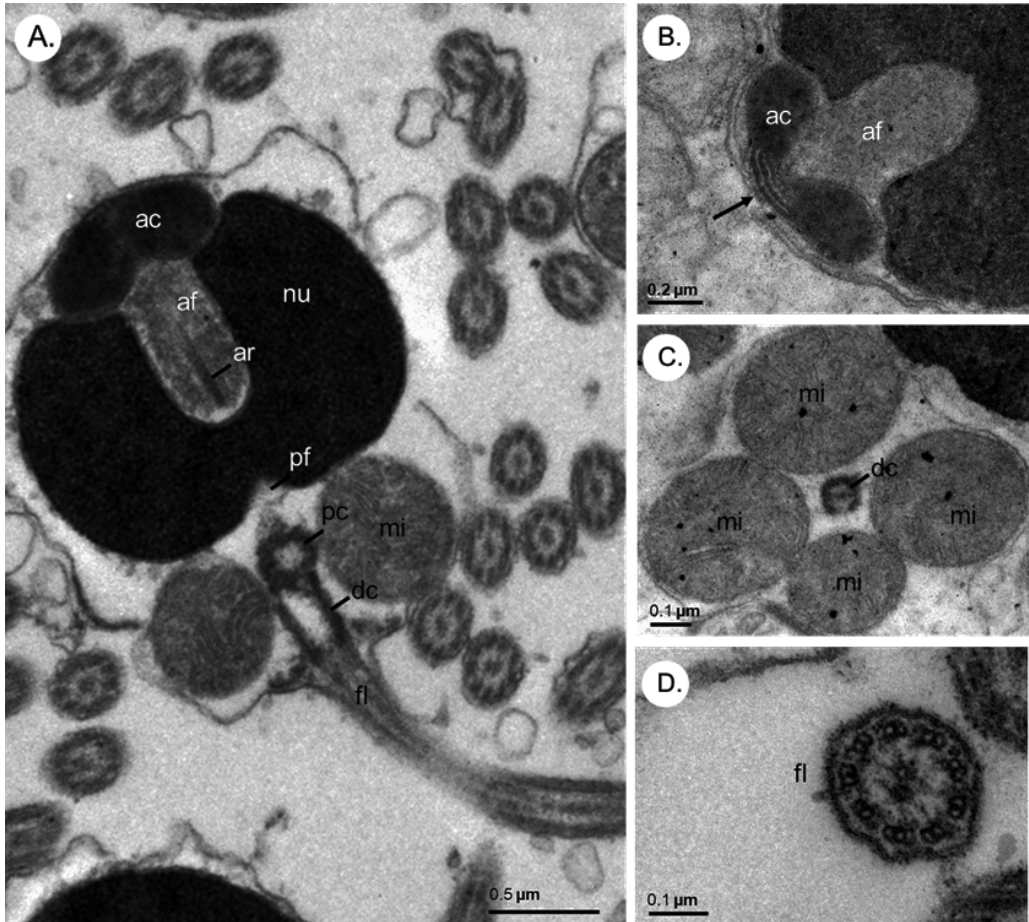
ขนาดใหญ่ที่อยู่ระหว่างนิวเคลียสกับอะโครโซมภายในแอ่งสามารถพบ axial rod (ภาพที่2(A)) นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนปลายที่อยู่ด้านหน้าสุดของอะโครโซมสามารถพบแถบตามขวาง (transverse band) จำนวน 3-4 ชั้น (ภาพที่2(B))

ส่วนกลางประกอบด้วยไมโทคอนเดรียจำนวน 4 อัน อยู่ล้อมรอบเซนทริโอล ซึ่งเซนทริโอลประกอบด้วยเซนทริโอลส่วนต้น (proximal centriole) และเซนทริโอลส่วนปลาย (distal centriole) (ภาพที่2(C))

ส่วนหาง (flagellum) เป็นส่วนที่เซลล์อสุจิใช้ในการเคลื่อนที่ พบโครงสร้างที่เรียกว่า axoneme โดยพบไมโครทิวบูลเรียงตัวแบบ 9+2 (ภาพที่2(D))

การวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาาระดับจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบและหอยนางรมชนิดอื่นใน Family Ostreidae

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาาระดับจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบและหอยนางรมชนิดอื่นใน Family Ostreidae โดยการวัดความกว้างและความยาวของอะโครโซม การวัดความกว้างและความยาวของนิวเคลียส และการวัดความกว้างและความยาวของแอ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียส พบว่า ขนาดความกว้างของอะโครโซมคือ $0.76 \pm 0.09 \mu\text{m}$ ขนาดความยาวของอะโครโซมคือ $0.32 \pm 0.05 \mu\text{m}$ โดยอัตราส่วนระหว่างยาวต่อความกว้าง (L/W) ของอะโครโซมคือ 0.43 ± 0.10 ความกว้างของนิวเคลียสคือ $1.77 \pm 0.19 \mu\text{m}$ ความยาวของนิวเคลียสคือ $1.31 \pm 0.11 \mu\text{m}$ โดยอัตราส่วนความยาวต่อความกว้าง (L/W) ของนิวเคลียสคือ 0.75 ± 0.12 ความ



ภาพที่ 2 จุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบ (A) เซลล์อสุจิประกอบด้วยส่วนหัวที่มีนิวเคลียสและอะโครโซมเป็นองค์ประกอบหลัก ส่วนกลางพบไมโทคอนเดรียและส่วนหางเป็นแฟลเจลลัม (B) อะโครโซมมีรูปร่างคล้ายถ้วย (cup-shaped acrosome) บางกรณีสามารถพบแถบจำนวน 3-4 แถบทางด้านหน้าของอะโครโซม (C) ภาพตัดตามขวางส่วนกลาง (midpiece) พบไมโทคอนเดรียขนาดใหญ่จำนวน 4 อัน ล้อมรอบส่วน distal centriole (D) ภาพตัดตามขวางส่วนหางแสดงโครงสร้างแฟลเจลลัมที่ประกอบด้วยไมโครทิวบูลเรียงตัวแบบ 9+2 (สัญลักษณ์ ac = acrosome; af = anterior nuclear fossa, ar = axial rod; dc = distal centriole; fl = flagellum; mi = mitochondria; nu = nucleus; pc = proximal centriole; pf = posterior nuclear fossa; arrow = transverse band)

กว้างของแ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียสคือ $0.40 \pm 0.07 \mu\text{m}$ ความยาวของแ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียสคือ $0.48 \pm 0.09 \mu\text{m}$ โดยอัตราส่วน

ระหว่างยาวต่อความกว้าง (LW) ของแ่งทางด้านหน้านิวเคลียสคือ 1.23 ± 0.31 สำหรับอัตราส่วนระหว่างความยาวของอะโครโซมต่อความยาวของ

นิวเคลียสคือ 0.25 ± 0.05 อัตราส่วนระหว่างความยาวของแองเททางด้านหน้าของนิวเคลียสต่อความยาวของนิวเคลียส คือ 0.37 ± 0.08 อัตราส่วนระหว่างความกว้างของแองเทด้านหน้านิวเคลียสต่อความกว้างของนิวเคลียส 0.23 ± 0.04 และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไมโทคอนเดรียคือ 0.61 ± 0.09 จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างทางสัณฐานวิทยาของขนาดเซลล์อสุจิในหอยนางรมแต่ละชนิดที่เคยรายงานผลการศึกษาไว้โดยแสดงผลในตาราง 1

อภิปรายผล

การศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของสัณฐานวิทยาของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบ

จากผลการศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* พบว่า โครงสร้างของเซลล์อสุจิในระยะสเปอร์มาโทซัว (spermatozoa) คล้ายกับหอยนางรมชนิดอื่นที่มีรายงานแล้วใน Family Ostreidae เช่น *Crassostrea angulate* (Sousa & Oliveira, 1994), *Crassostrea virginica* (Eckelbarger & Davis, 1996) *Crassostrea gigas* (Yurchenko, 2010) และ *Saccostrea forskali* (Nuurai et al., 2016) แต่มีขนาดขององค์ประกอบต่าง ๆ แตกต่างกันในหอยนางรมแต่ละชนิด

สำหรับรูปร่างของเซลล์อสุจิของหอยนางรมและหอยสองฝาอื่น ๆ เช่น หอยแมลงภู่ เป็นรูปแบบโบราณ (primitive spermatozoa) (Kim et al., 2003; Reunov et al., 1999) เนื่องจากบริเวณส่วนกลางพบการเรียงตัวของไมโทคอนเดรียเป็นก้อนขนาดใหญ่ล้อมรอบเซนทริโอล ลักษณะดังกล่าวต่างจากกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่น เช่น มนุษย์ ซึ่งพบไมโทคอนเดรียจำนวน 50–75 พันล้อมรอบส่วนกลาง (Hirata et al., 2002)

การวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาาระดับจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบและหอยนางรมชนิดอื่นใน Family Ostreidae

เนื่องจากการจำแนกหอยนางรมในระดับชนิด (species) ยังมีปัญหาอยู่มาก เนื่องจากมีความแปรปรวนทางสัณฐานวิทยาของเปลือกและกายวิภาคสูง เพื่อแก้ปัญหาดังกล่าวจึงนำสัณฐานวิทยาาระดับจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิมาประกอบการจำแนกชนิดของหอยนางรมใน Family Ostreidae การศึกษาครั้งนี้จึงนำสัณฐานวิทยาาระดับจุลกายวิภาคของเซลล์อสุจิในหอยนางรมปากจีบและหอยนางรมชนิดอื่นใน Family Ostreidae ที่เคยมีรายงานแล้ว นำมาเปรียบเทียบกัน (ตาราง 1) ซึ่งพบว่า

1) การแยกในระดับสกุล: จากตาราง 1 สามารถใช้อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของแองเททางด้านหน้าของนิวเคลียสในการแยกหอย นางรมออกเป็นสกุล *Saccostrea* และ *Crassostrea* ได้

ในการศึกษานี้พบอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของแองเททางด้านหน้าของนิวเคลียสของเซลล์อสุจิหอยนางรมปากจีบ คือ 1.23 ± 0.31 และจากผลการศึกษาอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของแองเททางด้านหน้าของนิวเคลียสของหอยนางรมสกุล *Saccostrea* ที่มีการรายงานไว้ก่อนหน้า ในหอยนางรม *Saccostrea cf. mordax* คือ 1.3 ± 0.22 (Yurchenko, 2012) และพบการรายงานอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของแองเททางด้านหน้าของนิวเคลียสในหอยนางรมสกุล *Crassostrea* เช่นกัน ได้แก่ *Crassostrea gigas* (Sea of Japan) *Crassostrea gigas* (Taiwan strait) *Crassostrea nippona* และ *Cras-*

ตาราง 1 การวิเคราะห์เปรียบเทียบทางสัณฐานวิทยาระดับจุลกายวิภาคของเซลล์ออสูจิในหอยนางรมปากจیبและหอยนางรมชนิดอื่นใน Family Ostreidae

Cellular structures	Acrosome			Nucleus			Anterior nuclear fossa length			Acrosome length/nucleus length	Fossa length/nucleus length	Fossa width/nucleus width	Mitochondria (Diameter) (µm)	Reference
	Length (µm)	Width (µm)	L/W	Length (µm)	Width (µm)	L/W	Length (µm)	Width (µm)	L/W					
Genus: Saccostrea														
<i>Saccostrea cucullata</i>	0.32±0.05	0.76±0.09	0.43±0.10	1.31±0.11	1.77±0.19	0.76±0.12	0.48±0.09	0.40±0.07	1.23±0.31	0.25±0.05	0.37±0.08	0.23±0.04	0.61±0.09	This study
<i>Saccostrea cf. mordax</i>	0.39±0.05	0.8±0.09	0.49±0.04	1.17±0.15	1.71±0.19	0.69±0.07	0.5±0.09	0.38±0.05	1.3±0.22	0.34±0.03	0.43±0.05	0.23±0.02	-	Yurchenko (2012)
<i>Saccostrea commercialis</i>	0.2	0.8-1.0	0.22	1	1.4-1.5	0.69	0.4-0.5	-	-	0.2	0.45	-	0.84	Healy and Lester (1991)
Genus: Crassostrea														
<i>Crassostrea gigas</i> (Sea of Japan)	0.58±0.05	1.09±0.11	0.53±0.05	1.15±0.09	1.90±0.19	0.61±0.06	0.53±0.08	0.62±0.08	0.87±0.15	0.50±0.05	0.46±0.07	0.33±0.03	0.54	Yurchenko (2012)
<i>Crassostrea gigas</i> (Taiwan strait)	0.49±0.05	1.13±0.11	0.43±0.03	1.07±0.09	1.90±0.19	0.54±0.04	0.43±0.06	0.67±0.09	0.65±0.11	0.46±0.04	0.40±0.05	0.33±0.02	-	Yurchenko (2012)
<i>Crassostrea gigas</i>	0.43±0.06	0.85±0.07	0.5	0.90±0.08	1.55±0.12	0.62	-	-	-	0.45	-	-	-	Gwo et al. (1996)
<i>Crassostrea nippona</i>	0.53±0.07	1.02±0.11	0.52±0.05	1.12±0.09	1.83±0.17	0.61±0.05	0.35±0.04	0.64±0.06	0.55±0.09	0.47±0.04	0.31±0.05	0.35±0.02	-	Yurchenko (2012)
<i>Crassostrea angulata</i>	0.5	1.1	0.45	1	-	-	-	-	-	-	-	-	0.8	Sousa and Oliveira (1994)
<i>Crassostrea virginica</i>	0.34	0.93	0.37	0.91	1.7	0.54	-	-	-	-	-	-	0.61	Daniels et al. 1971
<i>Crassostrea cf. rivularis</i>	0.38±0.05	0.74±0.08	0.52±0.04	1.06±0.11	1.74±0.16	0.62±0.07	0.24±0.04	0.41±0.06	0.58±0.09	0.35±0.04	0.22±0.04	0.24±0.02	-	Yurchenko (2012)

sostrea cf. rivularis (Yurchenko, 2012) คือ 0.87±0.15, 0.65±0.11, 0.55±0.09 และ 0.58±0.09 ตามลำดับ ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของแอ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียสของเซลล์ออสูจิในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* มีอัตราส่วนความยาวต่อความกว้างมากกว่าในหอยนางรมสกุล *Crassostrea*

นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราส่วนระหว่างความกว้างของแอ่งทางด้านหน้านิวเคลียสต่อความกว้างของนิวเคลียสและขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไมโทคอนเดรียไม่เหมาะสมในการจำแนกหอยนางรมในระดับสกุลและระดับชนิดได้ เนื่องจากค่าที่พบในหอยนางรมแต่ละชนิดมีความใกล้เคียงกัน

2) การแยกระดับชนิด: จากตาราง 1 หลังจากจำแนกหอยนางรมในระดับสกุลได้แล้วพบว่าสามารถใช้อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของอะโครโซมในการจำแนกหอยนาง-

รมสกุล *Saccostrea* ในระดับชนิดได้ แต่ไม่เหมาะสำหรับการจำแนกหอยนางรมสกุล *Crassostrea*

ในการจำแนกหอยนางรมสกุล *Saccostrea* สามารถใช้อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของอะโครโซม แยก *Saccostrea commercialis* (0.22) (Healy and Lester, 1991) ออกมาก่อนเนื่องจากมีอัตราส่วนแตกต่างจาก *Saccostrea cucullata* (0.43±0.10) และ *Saccostrea cf. mordax* (0.49±0.04) (Yurchenko, 2012)

สำหรับการจำแนกหอยนางรมปากจیب *Saccostrea cucullata* และ *Saccostrea cf. mordax* นั้น พบว่าการใช้อัตราส่วนระหว่างความยาวของอะโครโซมต่อความยาวของนิวเคลียส (acrosome length/nucleus length) และอัตราส่วนระหว่างความยาวของแอ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียสต่อความยาวของนิวเคลียส (anterior nuclear fossa length/nucleus length) ร่วมกัน มีแนวโน้มที่ดีใน

การนำมาใช้จัดจำแนกระดับชนิดสำหรับการจำแนกหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* และ *Saccostrea cf. mordax* ได้ โดยอัตราส่วนระหว่างความยาวของอะโครโซมต่อความยาวของนิวเคลียส (acrosome length/nucleus length) ของเซลล์อสุจิหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และ *Saccostrea cf. mordax* มีค่า 0.25 ± 0.05 และ 0.34 ± 0.03 ตามลำดับ และอัตราส่วนระหว่างความยาวของอะโครโซมต่อความยาวของนิวเคลียส (acrosome length/nucleus length) ของเซลล์อสุจิหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และ *Saccostrea cf. mordax* มีค่า 0.37 ± 0.08 และ 0.43 ± 0.05 ตามลำดับ

สรุปผลการวิจัย

1) เซลล์อสุจิในระยะสเปิร์มาโทซัวของหอยนางรมปากจีบมีลักษณะคล้ายกับกับสเปิร์มาโทซัวของหอยนางรมชนิดอื่น ๆ คือ พบส่วนหัว ส่วนกลาง และส่วนหาง และมีรูปร่างของเซลล์อสุจิเป็นแบบโบราณ (primitive spermatozoa) คือพบไมโทคอนเดรียเป็นก้อนขนาดใหญ่ 4 ก้อน ล้อมรอบเซนทริโอลบริเวณส่วนกลาง ลักษณะดังกล่าวคล้ายกับ หอยนางรมชนิดอื่นใน Family Ostreidae ที่รายงานแล้ว

2) อัตราส่วนระหว่างความยาวต่อความกว้างของแอ่งทางด้านหน้าของนิวเคลียสของเซลล์อสุจิใช้ในการแยกหอยนางรมในระดับสกุล *Saccostrea* และ *Crassostrea* ได้

3) หลังจากแยกหอยนางรมในระดับสกุลแล้ว สามารถใช้อัตราส่วนความยาวต่อความกว้างของส่วนอะโครโซม อัตราส่วนระหว่างความยาวของอะโครโซมต่อความยาวของนิวเคลียส และอัตราส่วนระหว่างความยาวของแอ่งทางด้าน

หน้าของนิวเคลียสต่อความยาวของนิวเคลียสของเซลล์อสุจิร่วมกันในการจำแนกหอยนางรมในระดับชนิดในสกุล *Saccostrea* ได้ แต่ไม่เหมาะสำหรับการจำแนกนางรมในระดับชนิดในสกุล *Crassostrea*

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (เลขที่สัญญา 96/2559) และทุนสนับสนุนค่าธรรมเนียมการศึกษาสำหรับนิสิตระดับปริญญาโท หลักสูตรมหาอำยา แบบเต็มเวลา ประเภททุนบางส่วน ปีการศึกษา 2559 จากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

เอกสารอ้างอิง

- Christo, S. W., Absher, T. M., Boehs, G. (2010). Morphology of the larval shell of three oyster species of the genus *Crassostrea* Sacco, 1897 (Bivalvia: Ostreidae). **Brazilian Journal of Biology** 70(3): 645–650.
- Daniels, E. W., Longwell, A. C., Mcniff, J. M., and Wolfgang, R. W. (1971). Ultrastructure of spermatozoa from the American oyster *Crassostrea virginica*. **Transactions of the American Microscopical Society**. 90: 275–282.
- Eckelbarger, K. J., and Davis, C. V. (1996). Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. I. Ovary and oogenesis. **Marine Biology** 127(1): 79-87.

- Gwo, J. L., and Chyng, H. C. (1996). Ultrastructure of the spermatozoa of the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia, Ostreidae). **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology** 28: 395–400.
- Healy, J. M., Lester, R. J. G. (1991). Sperm ultrastructure in the Australian oyster *Saccostrea commercialis* (Iredale & Roughley) (Bivalvia: Osteroidea). **Journal of Molluscan Studies** 57: 219–224.
- Hirata, S., Hoshi, K., Shoda, T., and Mabuchi, T. (2002). Spermatozoon and mitochondrial DNA. **Reproductive medicine and biology** 1(2): 41–47.
- Kim, H., Chang, I., and Yoo, M.H. (2003). Spermatogenesis and spermatozoan ultrastructure of Pacific Oyster (*Crassostrea gigas*). **Korean Journal of Fisheries and Aquatic Sciences** 36: 641–645.
- Klinbunga, S., Khamnamtong, B., Puanglarp, N., Jarayabhand, P., Yoosukh, W., and Menasveta, P. (2005). Molecular taxonomy of cupped oysters (*Crassostrea*, *Saccostrea* and *Striostrea*) in Thailand based on COI, 16S and 18S rDNA polymorphism. **Marine Biotechnology** 7(4): 306–317.
- Li, C., Haws, M., Wang, H., and Guo, X. (2017). Taxonomic classification of three oyster (Ostreidae) species from Myanmar. **Journal of Shellfish Research** 36(2): 365–371.
- Nuurai, P., Panasophonkul, S., Tinikul, Y., Sobhon, P., and Wanichanon, R. (2016). Spermatogenesis in the rock oyster, *Saccostrea forskali* (Gmelin, 1791). **Tissue and Cell** 48(1): 43–48.
- Reunov, A., Au, D. and Wu, R. (1999). Spermatogenesis of the green-lipped mussel *Perna viridis* with dual patterns of acrosome and tail development in spermatids. **Helgoland Marine Research** 53: 62–69.
- Reunov, A., Vekhova, E., and Zakharov, E. (2018). Variation of sperm morphology in Pacific oyster precludes its use as a species marker but enables intraspecific geo-authentication and aquatic monitoring. **Helgoland Marine Research** 72: 8.
- Sousa, M., and Oliveira, E. (1994). An ultrastructural study of *Crassostrea angulata* (Mollusca, Bivalvia) spermatogenesis. **Marine Biology** 120(4): 545-551.
- Wang, H., Guo, X., Zhang, G., and Zhang, F. (2004). Classification of jinjiang oysters *Crassostrea rivularis* (Gould, 1861) from China, based on morphology and phylogenetic analysis. **Aquaculture** 242: 137–155.
- Yurchenko, O. V., Radashevsky, V. I., and Reunov, A. A. (2010). Ultrastructural study of spermatogenesis in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae) from the Sea of Japan. **Invertebrate Zoology** 7: 55–69.
- Yurchenko, O. V. (2012). Comparative ultrastructural study of spermatozoa in some

oyster species from the Asian–Pacific Coast.

Micron 43(2): 365–373.