การเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* (Born, 1778)

รัตนชาติ คิ้วสกุลกาญจน์[1] กุลนิษฐ์ ถนอมจิตร์[1]
สุภัททา เฉื่อยฉ่ำ[2] และสุทิน กิ่งทอง[1*]

[1]ภาควิชาชีววิทยา และ [2]หลักสูตรวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เมือง ชลบุรี 20131
[*]E-mail: sutin@buu.ac.th

รับบทความ: 31 กรกฎาคม 2560 ยอมรับตีพิมพ์: 18 กันยายน 2560

บทคัดย่อ

หอยนางรมเป็นสัตว์ที่มีเพศแยก ปัจจุบันพบรายงานการศึกษาการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยนางรมหลายชนิด แต่ยังไม่มีการรายงานในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) ซึ่งเป็นหอยนางรมที่เพาะเลี้ยงมากในภาคตะวันออกของประเทศไทย งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระยะการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์และการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรมปากจีบที่เก็บจากพื้นที่เพาะเลี้ยงบริเวณชายฝั่งจังหวัดชลบุรี โดยเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วยวิธีฝังในพาราฟินและเรซินเพื่อตัดเนื้อเยื่อให้บางและย้อมสี จากนั้นนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ผลการศึกษาพบว่าอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบเริ่มพัฒนาในบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ระหว่างเนื้อเยื่อแมนเทิลและต่อมสร้างน้ำย่อย อวัยวะสืบพันธุ์ประกอบด้วยท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จำนวนมากเชื่อมต่อกัน และมี vesicular connective tissue cell ล้อมรอบ สามารถแบ่งระยะการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ในหอยนางรมปากจีบออกเป็น 5 ระยะ ตามระยะการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ที่อยู่ภายในท่อ ได้แก่ ระยะที่ 1 ระยะที่ไม่สามารถระบุเพศได้ ระยะที่ 2 ระยะเริ่มพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ระยะที่ 3 ระยะพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ตอนปลาย ระยะที่ 4 ระยะเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้พัฒนาสมบูรณ์ และระยะที่ 5 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ ได้แก่ สเปอร์มาโทโกเนียม สเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก สเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง อยู่ใกล้กับด้านฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ พบสเปอร์มาทิดและอสุจิอยู่กลางท่อ นอกจากเซลล์สืบพันธุ์ที่พบในระยะต่าง ๆ แล้ว การศึกษาในครั้งนี้ยังพบเซลล์ค้ำจุนในหอยนางรมปากจีบซึ่งเป็นรายงานการพบระบบเซลล์ค้ำจุนในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เป็นครั้งแรกในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* สันนิษฐานว่าทำหน้าที่คล้ายกับเซลล์เซอโทไลของสัตว์มีกระดูกสันหลัง

คำสำคัญ: หอยนางรม การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ เซลล์ค้ำจุนในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ อวัยวะสืบพันธุ์

Male Gonad Development and Spermatogenesis of the Hooded Oyster *Saccostrea cucullata* (Born, 1778)

Rattanachat Khiusakunkan[1], Kullanist Thanomjit[1], Supatta Chueycham[2] and Sutin Kingtong[1*]

[1]Department of Biology and [2]Program in Environmental Science, Faculty of Science, Burapha University, Mueang, Chonburi 20131, Thailand

[*]E-mail: sutin@buu.ac.th

Received: 31 July 2017 Accepted: 18 September 2017

Abstract

Oysters are dioecious with separate sexes. Currently, oyster spermatogenesis has been reported in many species. However, no evidence has been reported in the hooded oyster *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) which is an important cultivated species along the Gulf of Thailand. In this work, male gonad development and spermatogenesis had been investigated in the hooded oyster collected from oyster farm in Chonburi coastal water. The collected oysters were embedded in both paraffin and resin in order to process and stain thin tissues to be able to observe under a light microscope. The results showed that the gonad was primarily developed in connective tissue between mantle and digestive glands. The gonad composed of several gonadal tubules. Each tubule was surrounding by vesicular connective tissue cell (VCT). Male gonad developments in the hooded oyster were classified into 5 stages according to germ cell development in gonadal tubules: 1) undifferentiated stage, 2) early stage of spermatogenesis, 3) late stage of spermatogenesis, 4) mature stage of spermatogenesis and 5) spawn stage. Within gonadal tubules, various stages of germ cell were located. These included spermatogonium, primary spermatocyte and secondary spermatocyte which were located near to basal lamina of gonadal wall whereas spermatid and spermatozoa were located near to lumen. In addition, accessory cell or intragonadal somatic cell was also reported in gonadal tubules of the hooded oyster. To our knowledge, this is the first report of accessory cell in gonadal tubule of male oyster in genus *Saccostrea*. We hypothesized that this cell may play important role as sertoli cell in vertebrate.

Keywords: Oyster, Spermatogenesis, Intragonadal somatic cell, Gonad

บทนำ

หอยนางรมเป็นสัตว์ที่มีเพศผู้และเพศเมียแยกกัน ในช่วงต้นของชีวิตไม่พบอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) ที่ชัดเจน เมื่อเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จึงมีการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์ขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ระหว่างแมนเทิล (mantle) กับต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) อวัยวะสืบพันธุ์ประกอบด้วยท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal tubule) (Eckelbarger and Davis, 1996; Franco et al., 2011) ในระยะเริ่มต้นของการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์จะมีการรวมกลุ่มของเซลล์สืบพันธุ์ จากนั้นจึงพัฒนาไปเป็นท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และมีการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อดังกล่าว ในระยะแรกของการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์นั้น ยังไม่สามารถระบุเพศของหอยนางรมได้ เนื่องจากในช่วงต้นของการสร้างอวัยวะสืบพันธุ์นั้นเพศผู้และเพศเมียจะมีลักษณะเนื้อเยื่อคล้ายคลึงกัน กล่าวคือ พบการรวมกลุ่มของเซลล์สืบพันธุ์และเริ่มพบท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ระหว่างแมนเทิลและต่อมสร้างน้ำย่อยดังกล่าวข้างต้น ในระยะต่อมาเซลล์สืบพันธุ์เริ่มแบ่งเซลล์มากขึ้น เริ่มสังเกตเห็นความแตกต่างระหว่างเพศผู้และเพศเมียได้ โดยสังเกตได้จากขนาดของเซลล์สืบพันธุ์ ถ้าเป็นเพศผู้จะพบเซลล์อสุจิขนาดเล็กเรียงอยู่กลางท่อ ส่วนหัวประกอบด้วยนิวเคลียสขนาดเล็ก พบอะโครโซมทางด้านหน้าสุด มีการพัฒนาส่วนหางหรือแฟลเจลลัมสำหรับว่ายน้ำ ส่วนในเพศเมียเซลล์ไข่มีการสะสมอาหารภายในไซโทพลาซึมจำนวนมาก ทำให้ขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้นอย่างชัดเจน (Jaramillo et al., 2008)

การศึกษาระยะการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์และกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยนางรม ส่วนใหญ่พบรายงานการศึกษาในสกุล *Crassostrea* เนื่องจากเป็นหอยนางรมพันธุ์ใหญ่ที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจและมีการเพาะเลี้ยงทั่วโลก เช่น *C. gigas* *C. verginica* จากรายงานการ ศึกษา พบว่า การแบ่งระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ในกลุ่มหอยนางรม มีความแตกต่างกัน โดยทั่วไปผู้วิจัยแบ่งระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ออกเป็น 4–7 ระยะ (Baqueiro et al., 2007; Díaz et al., 2009; Gomes et al., 2014; Jaramillo et al., 2008; Paixão et al., 2013) ขึ้นอยู่กับชนิดของหอยนางรม พัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ และเซลล์สืบพันธุ์ที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็นหลัก

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยนางรมเพศเมียและเพศผู้มีความแตกต่างกัน โดยในเพศเมียเซลล์โอโอโกเนียม (oogonium) จะแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพื่อให้ได้เซลล์ไข่ในระยะแรก (primary oocyte) ซึ่งจะไม่แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส แต่มีการสะสมอาหารหรือโยล์ก (yolk) ภายในไซโทพลาซึม ทำให้เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่และเมื่อไข่สุกเต็มที่หอยเพศเมียจะปล่อยไข่ออกมาเพื่อปฏิสนธินอกลำตัว เมื่อเกิดการปฏิสนธิกับเซลล์อสุจิแล้ว เซลล์ไข่จึงแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสสมบูรณ์และเกิดการรวมนิวเคลียสของเซลล์ไข่กับอสุจิกลายเป็นไซโกตในที่สุด ส่วนในหอยนางรมเพศผู้พบการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสทำให้เห็นเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ โดยพบเซลล์สเปอร์มาโทโกเนียม (spermatogonium) และสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก (primary spermatocyte) ใกล้กับส่วนฐานของท่อ ซึ่งสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกเป็นเซลล์ที่แบ่งเซลล์แบบไมโอซิส I (meiosis I) ได้สเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง (secondary spermatocyte) 2 เซลล์ และแบ่งเซลล์แบบ

ไมโอซิส II (meiosis II) ได้สเปอร์มาทิด (spermatid) 4 เซลล์ จากนั้นสเปอร์มาทิดจะพัฒนาเป็นอสุจิหรือสเปอร์มาโทซัว (spermatozoa) เรียงตัวอยู่กลางท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Eckelbarger and Davis, 1996; Franco et al., 2008) นอกจากเซลล์สืบพันธุ์แล้วภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมเพศผู้ยังมีการรายงานเกี่ยวกับเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายกับเซลล์เซอโทไล (sertoli-like cell) ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ซึ่งเป็นเซลล์ร่างกายที่ทำหน้าที่เป็นเซลล์ค้ำจุนในกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ แต่เนื่องจากหน้าที่ของเซลล์ชนิดนี้ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังรวมถึงหอยนางรม จึงยังไม่มีการระบุชื่อเรียกที่แน่นอน (Eckelbarger and Davis, 1996; Franco et al., 2008, 2011) การศึกษาระดับจุลกายวิภาคในหอยนางรม *C. gigas* พบเซลล์ค้ำจุนในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เรียกชื่อว่า intragonadal somatic cell (ISC) โดยพบตั้งแต่ระยะเริ่มต้นของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ สันนิษฐานว่าเซลล์ดังกล่าวมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของสเปอร์มาทิดไปเป็นเซลล์อสุจิที่สมบูรณ์โดยการกำจัดไซโทพลาซึมส่วนเกิน นอกจากนี้ยังช่วยกำจัดเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์หรือตกค้างภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์อีกด้วย (Franco et al., 2011)

ปัจจุบันยังขาดข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับอวัยวะสืบพันธุ์และการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* (Born, 1778) ซึ่งเป็นหอยนางรมพันธุ์เล็กที่พบในธรรมชาติและมีการเพาะเลี้ยงกันมากตามแถบชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย ผู้วิจัยมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาระยะการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้และศึกษากระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบเพื่อใช้ในการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบ

เก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัยความยาวประมาณ 5–7 เซนติเมตร ในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนตุลาคม เดือนละ 30 ตัว จากบริเวณพื้นที่เพาะเลี้ยงหอยนางรมอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยช่วงเวลาดังกล่าวครอบคลุมฤดูผสมพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ ภายหลังเก็บตัวอย่างเปิดเปลือกและตรวจเพศโดยใช้เข็มเขี่ยบริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ เพื่อนำเซลล์สืบพันธุ์มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง จากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ เพื่อนำไปศึกษาระดับเนื้อเยื่อ ในหอยตัวเดียวกันจะตัดชิ้นเนื้อเป็น 2 ชุด สำหรับเตรียมเนื้อเยื่อในพาราฟินและในเรซิน

2. การเตรียมเนื้อเยื่อในพาราฟินเพื่อย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (hematoxylin and eosin)

นำตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ชุดที่ 1 แช่ในน้ำยาคงสภาพบูแองส์ (Bouin's fixative) ฝังเนื้อเยื่อลงในพาราพลาสต์ (paraplast) ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่องไมโครโตมให้ได้ความหนา 6 ไมครอน จากนั้นย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (Khondee et al., 2016) และนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3. การเตรียมเนื้อเยื่อในเรซินเพื่อย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู (methylene blue)

นำตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ชุดที่ 2 แช่ในสารละลาย 0.1 M phosphate buffer

saline (PBS) ที่ประกอบด้วย 2.5% glutaraldehyde จากนั้นตัดชิ้นเนื้อเยื่อให้ได้ขนาดประมาณ 1 x 1 มิลลิเมตร และแช่ในสารละลายที่ประกอบด้วย 0.1 M PBS ที่ประกอบด้วย 1% osmium tetroxide เพื่อฝังเนื้อเยื่อลงใน araldite 502 resin จากนั้นนำชิ้นเนื้อเยื่อมาตัดด้วยเครื่องอัลตราไมโครโตมให้ได้ความหนาประมาณ 700 นาโนเมตร และย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู เพื่อนำไปศึกษาภายใต้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ผลและอภิปรายผล

1. อวัยวะสืบพันธุ์และท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์

อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบพบแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ระหว่างเนื้อเยื่อแมนเทิลและต่อมสร้างน้ำย่อย (ภาพที่ 1A) อวัยวะสืบพันธุ์ประกอบด้วยท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonadal tubule) จำนวนมาก พบ myoepithelial cell เป็นเซลล์ที่มีลักษณะแบนบาง มีนิวเคลียสแบน เป็นส่วนฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์และกั้นระหว่างท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์กับเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ภาพที่ 1B) ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายคลึงกับหอยนางรมชนิดอื่น ๆ เช่น *C. virginica* (Galtsoff, 1964), *C. gigas* (Franco et al., 2008), *S. forskali* (Nuurai et al., 2016; Panasophonkul, 2000)

นอกจากนี้ ยังพบว่าท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่อยู่รอบนอกติดกับเนื้อเยื่อแมนเทิลมีลักษณะแตกต่างจากท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่อยู่ด้านใน กล่าวคือ ส่วนฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านที่ติดกับเนื้อเยื่อแมนเทิลมีการพัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชนิด simple cuboidal ciliated epithelium พบเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) ทำหน้าที่สร้างและหลั่งเมือก (mucin granule) เข้าไปในท่อ จึงไม่พบเซลล์สเปอร์มาโทโกเนียมและไม่พบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่บริเวณฐานของท่อด้านดังกล่าว ส่วนฐานของท่อด้านตรงข้ามหรือด้านที่หันเข้าหาต่อมสร้างน้ำย่อยจะพบเซลล์สเปอร์มาโทโกเนียมและพบการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เช่นเดียวกับท่อที่อยู่ภายใน (ภาพที่ 1C) จากโครงสร้างของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่พบในหอยนางรมปากจีบ ผู้วิจัยจึงแบ่งท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ออกเป็น 2 แบบ ได้แก่ ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านใน (internal gonadal tubule) และท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านนอก (external gonadal tubule) ตามลำดับ โดยท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะแทรกอยู่ระหว่างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งประกอบด้วยเซลล์ขนาดใหญ่ที่มีเม็ดสีเข้มกระจายอยู่ภายในเซลล์ เรียกว่าเซลล์ vesicular connective tissue (VCT) (ภาพที่ 1 และ 3)

ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเนื้อเยื่อแมนเทิลกับต่อมสร้างน้ำย่อย เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วยเซลล์ขนาดใหญ่ เรียกว่า เซลล์ vesicular connective tissue (VCT) มีแกรนูลติดสีเข้มกระจายอยู่ภายในเซลล์ แกรนูลดังกล่าวเกิดจากการสะสมแป้งในรูปไกลโคเจนเพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานของร่างกาย (Eckelbarger and Davis, 1996) ผนังท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีลักษณะเป็นชั้นบาง ๆ มีเซลล์สร้างผนังท่อ เช่นเดียวกับที่มีการรายงานในหอยนางรมชนิดอื่น ๆ (Eckelbarger and Davis, 1996; Franco et al., 2008) และคล้ายกับผนังท่อเซมินิเฟอรัส (seminiferous tubule) ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Gartner and Hiatt, 2014) โดยเซลล์สร้างผนังท่อทำหน้าที่สร้างไมโครฟิลาเมนต์ (micro filament) ประกอบด้วยแอกทิน (actin) ช่วยในการ

บีบตัวหรือการหดตัวของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในขณะที่หอยนางรมปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์สามารถจำแนกได้ 2 แบบ คือ (1) ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านใน พบกระจายอยู่ทั่วไปภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใกล้กับต่อมสร้างน้ำย่อย ผนังท่อมีลักษณะแบนบางสม่ำเสมอ การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เริ่มจากผนังท่อเข้าสู่กลางท่อ และ (2) ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านนอก พบที่บริเวณใกล้กับเนื้อเยื่อแมนเทิล ผนังท่อมีลักษณะไม่สม่ำเสมอ โดยผนังท่อด้านที่ติดกับเนื้อเยื่อแมนเทิลพบเนื้อเยื่อบุผิวชนิด simple cuboidal ciliated epithelium และเซลล์สร้างเมือกที่มีการหลั่งเมือก และไม่พบการแบ่งเซลล์เพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ผนังท่อด้านนี้ การมีซิเลียและเมือกแสดงให้เห็นว่าท่อดังกล่าวทำหน้าที่ช่วยในการโบกพัดเซลล์สืบพันธุ์หรืออสุจิที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วให้ออกสู่ช่องปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ที่อยู่ข้างของลำตัว เช่นเดียวกับที่พบในหอยนางรม *C. virginica* (Galtsoff, 1964) และ *C. gigas* (Franco et al., 2008) ดังนั้นท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านนอกจึงอาจเรียกว่า ท่อนำน้ำเชื้อ ลักษณะดังกล่าวแตกต่างจากท่อนำน้ำเชื้อที่พบในคนซึ่งจะพบเนื้อเยื่อบุผิวชนิด simple cuboidal epithelium แต่ไม่พบซิเลียที่ท่อนำน้ำเชื้อส่วน tubuli recti และ rete testis (Gartner and Hiatt, 2014)

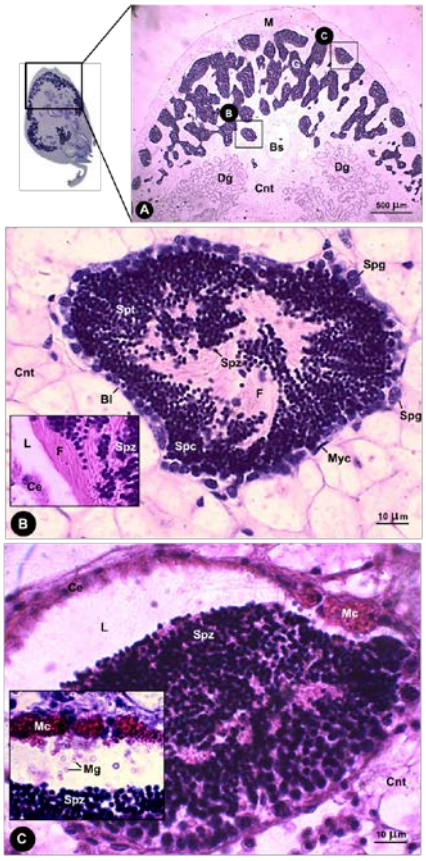
2. การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์

จากการศึกษา พบว่า การสร้างอวัยวะสืบพันธุ์เริ่มขึ้นเมื่อหอยเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ โดยมีการพัฒนาท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ขึ้น ขนาดของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะเพิ่มขึ้นตามระยะการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ (ภาพที่ 2) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยแบ่งระยะการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบออกเป็น 5 ระยะ ได้แก่

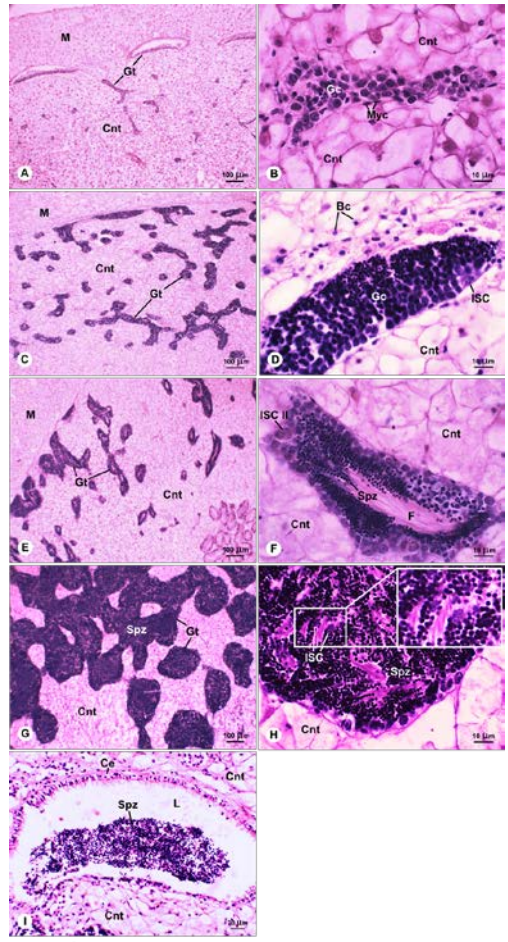
ระยะที่ 1 ระยะที่ไม่สามารถระบุเพศได้ (undifferentiated stage) เป็นระยะเริ่มต้นของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ระยะนี้พบเซลล์สืบพันธุ์รวมกันอยู่เป็นกลุ่มแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันระหว่างเนื้อเยื่อแมนเทิลและต่อมสร้างน้ำย่อย และพบ myoepithelial cell ล้อมรอบกลุ่มเซลล์สืบพันธุ์กลายเป็นผนังท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ในระยะนี้ไม่สามารถระบุได้ว่าเซลล์สืบพันธุ์ที่พบในท่อจะเจริญไปเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือเพศเมีย (ภาพที่ 2A และ 2B)

ระยะที่ 2 ระยะเริ่มพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (early stage of spermatogenesis) เป็นระยะที่สามารถระบุว่าเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือเพศเมียได้ ระยะนี้ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีขนาดใหญ่ขึ้น เซลล์สืบพันธุ์แบ่งเซลล์มากขึ้น ทำให้พบเซลล์สืบพันธุ์ที่มีการแบ่งเซลล์ระยะต่าง ๆ ภายในท่อ ข้อแตกต่างที่สำคัญระหว่างท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียในระยะนี้คือ เซลล์สืบพันธุ์เพศเมียมีขนาดใหญ่ขึ้นเนื่องจากมีการสะสมอาหารไว้ในไซโทพลาซึม ส่วนเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มีขนาดเล็กเนื่องจากมีการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์แบบไมโอซิสได้เป็นเซลล์สเปอร์มาทิดที่มีขนาดเล็ก (ภาพที่ 2C และ 2D) และพบเซลล์ค้ำจุนในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (intragonadal somatic cell; ISC) เซลล์ดังกล่าวนี้มีลักษณะแตกต่างจากเซลล์สืบพันธุ์ คือ นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอน และมีไซไทพลาซึมขนาดใหญ่ ติดสีย้อมจางกว่าเซลล์สืบพันธุ์ พบอยู่ที่บริเวณฐานของท่อ (ภาพที่ 2D)

ระยะที่ 3 ระยะพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ตอนปลาย (late stage of spermatogenesis) ระยะนี้พบว่าท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีขนาดใหญ่ขึ้น (ภาพที่ 1F) เป็นระยะที่พบเซลล์อสุจิที่



ภาพที่ 1 ตำแหน่งของอวัยวะสืบพันธุ์และท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน A คือ ภาพตัดตามขวางลำตัวผ่านอวัยวะสืบพันธุ์ซึ่งพบท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์สองแบบ ประกอบด้วย B คือท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านใน (internal gonadal tubule) และ C คือ ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านนอก (external gonadal tubule)



ภาพที่ 2 การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ ย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน ระยะที่ 1 ระยะที่ไม่สามารถระบุเพศได้ (A และ B) ระยะที่ 2 ระยะเริ่มพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (C และ D) ระยะที่ 3 ระยะพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ตอนปลาย (E และ F) ระยะที่ 4 ระยะเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ พัฒนาสมบูรณ์ (G และ H) ระยะที่ 5 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (I)

สัญลักษณ์ Bl = Basal lamina, Bs = Blood sinus, Ce = Simple cuboidal ciliated epithelium, Cnt = Connective tissue, Dg = Digestive gland, F = Flagellum, G = Gonad, Gc = Germ cell, Gt = Gonadal tubule, ISC = Intragonadal somatic cell, L = Lumen, M = Mantle, Mc = Mucous cell, Mg = Mucin granule, Myc = Myoepithelial cell, Spc = Spermatocyte, Spg = Spermatogonium, Spt = Spermatid, Spz = Spermatozoa

พัฒนาสมบูรณ์แล้วบางส่วน โดยเซลล์อสุจิประกอบด้วยส่วนหัวที่มีนิวเคลียสขนาดเล็กหันด้านหัวเข้าหาฐานของท่อและพบส่วนหาง (flagellum) ติดสีย้อมอีโอซินมีลักษณะเป็นริ้วขนาดเล็กหันเข้าหาลูเมน (ภาพที่ 1E) ที่บริเวณฐานของท่อยังพบการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์อย่างต่อเนื่อง และสามารถพบเซลล์ ISC ที่บริเวณฐานของท่อ

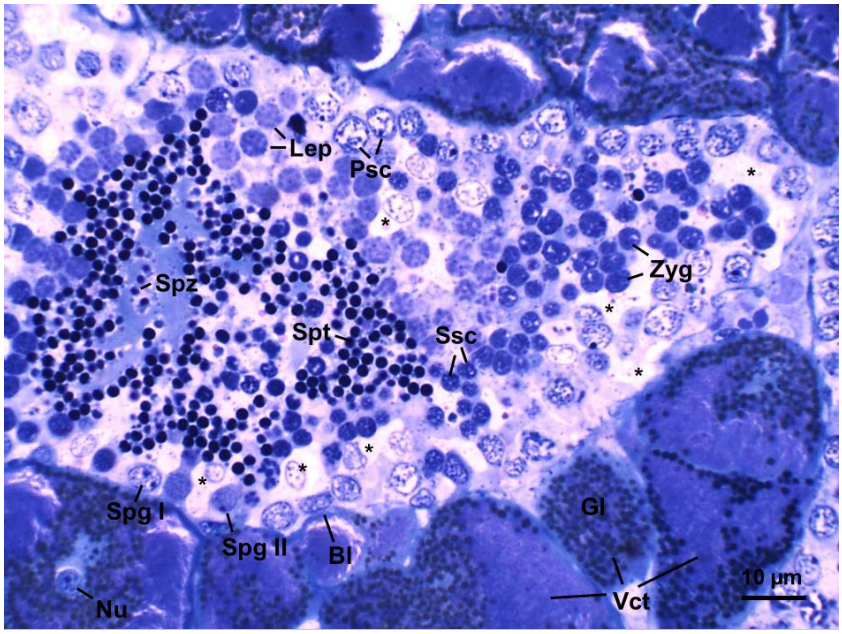
ระยะที่ 4 ระยะเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้พัฒนาสมบูรณ์ (mature stage of spermatogenesis) เป็นระยะที่พบเซลล์อสุจิที่พัฒนาสมบูรณ์แล้วเต็มท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ระยะนี้ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีขนาดใหญ่และเชื่อมต่อกันเกือบเต็มพื้นที่ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน บริเวณกลางท่อพบอสุจิที่มีแฟลเจลลัมจำนวนมาก และสามารถพบเซลล์ ISC ที่บริเวณกลางท่อ (ภาพที่ 2G และ 2H)

ระยะที่ 5 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawn stage) เป็นระยะที่มีการปล่อยเซลล์อสุจิออกสู่ภายนอกผ่านท่อปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ทำให้พบเซลล์อสุจิภายในท่อปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (ภาพที่ 2I)

จากการศึกษาพัฒนาการของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบในครั้งนี้ จำแนกได้เป็น 5 ระยะดังกล่าวข้างต้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานในหอยนางรม *C. gigas* (Díaz et al., 2009; Quayle and Newkirk, 1989; Ren et al., 2003) *C. corteziensis* (Jaramillo et al., 2008) และ *C. gasar* (Gomes et al., 2014) ซึ่งการจำแนกระยะพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบมีหลักการเดียวกับหอยนางรมชนิดอื่น ๆ กล่าวคือ เมื่อหอยนางรมเข้าสู่ช่วงตัวเต็มวัยพบว่าเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ระหว่างต่อมย่อยอาหารและชั้นแมนเทิลพบการพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยเริ่มพบกลุ่มเซลล์สืบพันธุ์ระยะแรกแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน จากนั้นจะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์สืบพันธุ์ระยะเริ่มต้น ตามด้วยการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสเพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์และพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์ที่สมบูรณ์ และปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกสู่ภายนอก โดยการสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีทิศทางเริ่มจากบริเวณผนังท่อเข้าสู่ศูนย์กลางของท่อ เมื่อสังเกตสัณฐานภายนอก พบว่า ในระยะที่ยังไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ล้อมรอบต่อมย่อยอาหารจะบาง ทำให้เห็นต่อมย่อมอาหารเป็นสีเขียวได้จากภายนอก เมื่อเข้าสู่ระยะที่หอยสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เนื้อเยื่อตำแหน่งที่ล้อมรอบต่อมย่อยอาหารจะอวบหนาขึ้นอย่างชัดเจนและมีสีขาวครีม ข้อสังเกตจากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่า ตัวอย่างหอยนางรมปากจีบที่เก็บจากพื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี เริ่มสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในระยะเริ่มต้นตั้งแต่เดือนเมษายนและมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และพบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์สมบูรณ์มากที่สุดในเดือนพฤษภาคมและสามารถพบระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ร่วมด้วย

3. การสร้างเซลล์สืบพันธุ์

จากการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ (ภาพที่ 3) พบว่า การแบ่งเซลล์สืบพันธุ์เริ่มต้นที่บริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โดยเริ่มจากเซลล์สเปอร์มาโทโกเนียม ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ นิวเคลียสค่อนข้างกลมและติดสีจาง สามารถพบนิวคลีโอลัสได้ 1–2 อัน พบที่บริเวณฐานของท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ถัดจากเซลล์สเปอร์มาโทโกเนียมพบเซลล์สเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสค่อนข้างกลม โครมาทินขดตัวหนาและติดสีเข้ม โดยเฉพาะ



ภาพที่ 3 เซลล์สืบพันธุ์ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ ย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู สัญลักษณ์ Bl = Basal lamina, Cnt = Connective tissue, Gl = Glycogen granule, Lep = Leptotene, Nu = Nucleus, Psc = Primary spermatocyte, Spg I = Spermatogonium type I, Spg II = Spermatogonium type II, Spt = Spermatid, Spz = Spermatozoa, Ssc = Secondary spermatocyte, Vct = Vesicular connective tissue, Zyg = Zygotene, * = Intragonadal somatic cell

บริเวณผนังด้านในของเยื่อหุ้มนิวเคลียส สามารถจำแนกสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกออกเป็นระยะย่อย ได้แก่ ระยะเลปโททีน (leptotene) เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสรูปร่างกลม โครมาทินขดตัวติดสีเข้มเป็นจุด ๆ กระจายอยู่ทั่วนิวเคลียส และระยะไซโกทีน (zygotene) เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสรูปร่างกลม โครมาทินขดตัวเป็นแท่งใหญ่และหนาขึ้น ติดสีเข้มทั่วนิวเคลียส ถัดจากสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรกจะพบสเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กลงประมาณครึ่งหนึ่งจากสเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก นิวเคลียสรูปร่างกลม โครมาทินขดตัวหนาและติดสีเข้มมาก ไม่สามารถจำแนกระยะย่อยของเซลล์ได้ ถัดจากสเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สองพบสเปอร์มาทิด เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็ก นิวเคลียสรูปร่างกลม และติดสีเข้มมาก ด้านในสุดของท่อจะพบสเปอร์มาโทซัว เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุด โครมาทินขดตัวแน่นภายในนิวเคลียสทำให้ติดสีเข้ม บางเซลล์สามารถสังเกตเห็นอะโครโซม ไมโทคอนเดรีย และแฟลเจลลัม การสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบมีรูปแบบเช่นเดียวกับหอยนางรมหลายชนิด เช่น *C. glomerata* (Dinamani, 1973), *C. angulate* (Sousa and Oliveira, 1994), *C. virginica* (Galtsoff, 1964; Eckelbarger and Davis, 1996), *C. gigas* (Franco et al., 2008; Kim et al., 2010; Yurchenko et al., 2010), *C. gasar* (Paixão et al.,

2013) และ *S. forskali* (Panasophonkul, 2000; Nuurai et al., 2016)

นอกจากเซลล์สืบพันธุ์ระยะต่าง ๆ แล้ว ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ยังพบเซลล์ค้ำจุนด้วย เมื่อย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู พบว่า ลักษณะของเซลล์ค้ำจุนมีความแตกต่างจากเซลล์สืบพันธุ์ กล่าวคือ เป็นเซลล์ที่มีไซโทพลาซึมขนาดใหญ่แทรกอยู่ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ บางตำแหน่งสามารถพบแขนงของเซลล์ยืดเข้าไปอยู่ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ ไซโทพลาซึมติดสีจาง นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอนและติดสีจางกว่านิวเคลียสของเซลล์สืบพันธุ์ โดยแทรกอยู่ระหว่างเซลล์สืบพันธุ์ (ภาพที่ 3) การศึกษาในครั้งนี้เป็นการรายงานการพบเซลล์ค้ำจุนเป็นครั้งแรกในหอยนางรมสกุล *Saccostrea* จากรายงานการศึกษาในหอยนางรม *C. gigas* สันนิษฐานว่าเซลล์ค้ำจุนอาจเกี่ยวข้องกับการกำจัดไซโทพลาซึมส่วนเกิน (residual body) ที่เหลือจากสเปอร์มาทิด และช่วยในการกำจัดเซลล์สืบพันธุ์ที่ผิดปกติด้วย (Franco et al., 2008, 2011) นอกจากนี้ยังคาดว่าเซลล์ดังกล่าวอาจทำหน้าที่เป็นเซลล์สะสมอาหาร (food storage cell) เพื่อใช้เป็นแหล่งพลังงานในการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ให้กับหอยนางรม *C. gigas* ด้วย (Eckelbarger and Davis, 1996; Franco et al., 2011; Kim et al., 2010) ในภาพรวมเซลล์ค้ำจุนที่พบในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมมีลักษณะคล้ายกับ sertoli cell ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม อย่างไรก็ตามการศึกษาในปัจจุบันยังไม่ทราบหน้าที่ชัดเจนของเซลล์ค้ำจุนเหล่านี้ในหอยนางรม เนื่องจากยังมีลักษณะบางประการที่มีความแตกต่างกันกับที่รายงานไว้ในกลุ่มสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม จึงทำให้มีการเรียกชื่อเซลล์ค้ำจุนแตกต่างกันออกไป เช่น เซลล์ pleomorphic accessory cell (Kim et al., 2010) intragonadal somatic cell (Franco et al., 2008, 2011)

สรุปผลการศึกษา

หอยนางรมปากจีบเริ่มมีการสร้างและพัฒนาอวัยวะสืบพันธุ์เมื่อถึงวัยเจริญพันธุ์ โดยมีการรวมตัวของเซลล์สืบพันธุ์และพัฒนาเป็นท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์แทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณระหว่างเนื้อเยื่อแมนเทิลกับต่อมสร้างน้ำย่อย มีเซลล์ vesicular connective tissue (VCT) อยู่ล้อมรอบท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทำหน้าที่เป็นแหล่งสะสมอาหาร ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบ่งเป็น 2 แบบ ได้แก่ ท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านในและท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ด้านนอก ท่อด้านในทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์ ส่วนท่อด้านนอกทำหน้าที่สร้างเซลล์สืบพันธุ์และเป็นท่อนำน้ำเชื้อ เนื่องจากประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชนิด simple cuboidal ciliated epithelium มีซิเลียและเซลล์สร้างเมือกทำหน้าที่หลั่งเมือกช่วยในการเคลื่อนที่ของอสุจิ การพัฒนาของอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ของหอยนางรมปากจีบแบ่งได้เป็น 5 ระยะ คือ ระยะที่ 1 ระยะที่ไม่สามารถระบุเพศได้ ระยะที่ 2 ระยะเริ่มพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ระยะที่ 3 ระยะพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ตอนปลาย ระยะที่ 4 ระยะเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้พัฒนาสมบูรณ์ และระยะที่ 5 ระยะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบเซลล์สืบพันธุ์ในระยะต่าง ๆ ได้แก่ สเปอร์มาโทโกเนียม สเปอร์มาโทไซต์ระยะแรก สเปอร์มาโทไซต์ระยะที่สอง สเปอร์มาทิด และสเปอร์มาโทซัวหรืออสุจิ นอกจากนี้ยังพบเซลล์ค้ำจุนในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ซึ่งไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัดแต่สันนิษฐานว่าเซลล์นี้ทำหน้าที่คล้ายกับเซลล์เซอโทไลที่พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 96/2559

เอกสารอ้างอิง

Baqueiro, C. E. R., Aldana, A. D., Sevilla, M. L., and Rodríguez, E. P. F. (2007). Variations in the reproductive cycle of the oyster *Crassostrea virginica* (Gmelin, 1791), Pueblo Viejo lagoon, Veracruz, Mexico. **Transitional Waters Bulletin** 2: 37–46.

Díaz, M. E., Pouvreau, S., Villalba, J. C., and Pennec, M. L. (2009). Gametogenesis, reproductive investment, and spawning behavior of the Pacific giant oyster *Crassostrea gigas*: Evidence of an environment-dependent strategy. **Aquaculture International** 17(5): 491–506.

Dinamani, P. (1973). Reproductive cycle and gonadial changes in the New Zealand rock oyster *Crassostrea glomerata*. **New Zealand Journal of Marine and Fresh water Research** 8(1): 39–65.

Eckelbarger, K. J., and Davis, C. V. (1996). Ultrastructure of the gonad and gametogenesis in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. II. Testis and spermatogenesis. **Marine Biology** 127: 89–96.

Franco, A., Berthelin, C. H., Goux, D., Sourdaine, P., and Mathieu, M. (2008). Fine structure of the early stages of spermatogenesis in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Mollusca, Bivalvia). **Tissue and Cell** 40: 251–260.

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

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

Gartner, L. P., and Hiatt, J. L. (2014). **Color Atlas and Text of Histology**. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins.

Gomes, C. H. A. M., Silva, F. C., Lopes, G. R., and Melo, C. M. R. (2014). The reproductive cycle of the oyster *Crassostrea gasar*. **Brazilian Journal of Biology** 74(4): 967–976.

Jaramillo, C. R., Hurtado, M. A., Vivas, E. R., Ramírez, J. L., Manzano, M., and Palacios, E. (2008). Gonadal development and histochemistry of the tropical oyster, *Crassostrea corteziensis* (Hertlein, 1951) during an annual reproductive cycle. **Journal of Shellfish Research** 27(5): 1129–1141.

Khondee, P., Srisomsap, C., Chokchaicham

nankit, D., Svasti, J., Simpson, R. J., Kingtong, S. (2016). Histopathological effect and stress response of mantle proteome following TBT exposure in the hooded oyster *Saccostrea cucullata*. **Environmental Pollution** 218: 855–862.

Kim, J. H., Chung, E. Y., Choi, K. H., Lee, K. Y., and Choi, M. S. (2010). Ultrastructure of the testis and germ cell development during spermatogenesis in male *Crassostrea gigas* (Bivalvia: Ostreidae) in Western Korea. **Korean Journal of Malacology** 26(3): 235–244.

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: 43–48.

Paixão, L., Ferreira, M. A., Nunes, Z., Sizo, F. F., and Rocha, R. (2013). Effects of salinity and rainfall on the reproductive biology of the mangrove oyster (*Crassostrea gasar*): Implications for the collection of broodstock oysters. **Aquaculture** 6(12): 380–383.

Panasophonkul, S. (2000). **Spermatogenesis and chromatin condensation in the male germ cells of a marine oyster, *Saccostrea forskali* Gmelin**. Master of Science Thesis (Anatomy). Nakhonpathom: Mahidol University.

Quayle, D. B., and Newkirk, G. F. (1989). **Farming bivalve molluscs: Methods for study and development**. Canada: The International Development Research Centre.

Ren, J. S., Marsden, I. D., Ross, A. H., and Schiel, D. R. (2003). Seasonal variation in the reproductive activity and biochemical composition of the Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) from the Marlborough Sounds, New Zealand. **New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research** 37: 171–182.

Sousa, M., and Oliveira, E. (1994). An ultrastructural study of *Crassostrea angulata* (Mollusca, Bivalvia) spermatogenesis. **Marine Biology** 120: 545–551.

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(1): 55–69.