



ใบรับรองวิทยานิพนธ์  
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

ปริญญา

สัตววิทยา	สัตววิทยา
สาขา	ภาควิชา
เรื่อง	โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของเขียดงูสกุล <i>Ichthyophis supachaii</i> Taylor, 1960 (Amphibia: Gymnophiona)
	Histological Structure of the Reproductive Organs of Supachai's Caecilian <i>Ichthyophis supachaii</i> Taylor, 1960 (Amphibia: Gymnophiona)
نامผู้วิจัย	นายอัคนี ผิวหอม
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย	
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	( รองศาสตราจารย์กรรณิกา ชัชวาลวานิช, วท.ม. )
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	( อาจารย์ปราโมทย์ ชำนาญปิ่น, Ph.D. )
หัวหน้าภาควิชา	( รองศาสตราจารย์มณฑิรินทร์ เมฆธน, Ph.D. )

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

( รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr. )

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. ....

สืบสินธุ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของเขียดงูสุกช้าย *Ichthyophis supachaii* Taylor,  
1960 (Amphibia: Gymnophiona)

Histological Structure of the Reproductive Organs of Supachai's Caecilian *Ichthyophis supachaii*  
Taylor, 1960 (Amphibia: Gymnophiona)

โดย

นายอัคนี ผิวหอม

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์  
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อัคนี ผิวหอม 2557: โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของเขียดงูคูกุซัย  
*Ichthyophis supachaii* Taylor, 1960 (Amphibia: Gymnophiona) ปริญาวิทยาสาสตร  
มหาบัณฑิต (สัตววิทยา) สาขาสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก: รองศาสตราจารย์ภรณีภา ชัชวาลวานิช, วท.ม. 98 หน้า

จากการศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของเขียดงูคูกุซัยที่โตเต็มวัย ทั้งเพศผู้และเพศเมีย (จำนวน 3 และ 5 ตัว ตามลำดับ) พบว่าในเพศผู้ อัณฑะมีหลาย lobe แต่ละ lobe ประกอบด้วยหลาย lobule ซึ่งภายใน พบ Sertoli cell และ germ cell ที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเดียวกันอยู่เป็นกลุ่มเรียกว่า germ cyst ซึ่ง germ cell ที่อยู่ในแต่ละ cyst เติบโตอยู่ในระยะที่แตกต่างกัน ได้แก่ 1. primary spermatogonia 2. secondary spermatogonia 3. primary spermatocyte 4. secondary spermatocyte 5. spermatid และ 6. spermatozoa ส่วน Mullerian duct มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต่อมที่เรียกว่า Mullerian gland ซึ่งประกอบด้วย simple tubular gland จำนวนมากเรียงตัวอยู่รอบ central duct ภายใน tubular gland ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด คือ 1. secretory cell 2. ciliated cell และ 3. amoeboid cell เนื้อเยื่อบุผิวของ central duct เป็นแบบ simple low columnar epithelium มี cilia ยื่นเข้าไปใน lumen ส่วนโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมียนั้น พบว่า ภายในรังไข่ทั้ง 2 ข้างประกอบด้วย follicle ซึ่งแบ่งระยะการเจริญออกเป็น oogonia, previtellogenic follicle (early previtellogenic follicle และ late previtellogenic follicle), vitellogenic follicle (early vitellogenic follicle และ late vitellogenic follicle) และ atretic follicle ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ corpus luteum ท่อนำไข่แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนต้นและส่วนท้าย โดยส่วนต้นนั้น เนื้อเยื่อบุผิวด้านหนึ่งเป็นชนิด simple columnar epithelium ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นโครงสร้างเรียกว่า villus-like projection ใต้เยื่อบุผิวมีชั้นกล้ามเนื้อ และชั้น serosa ท่อนำไข่ส่วนท้าย พบว่า ชั้น mucosa มีลักษณะเป็นสันนูน เนื้อเยื่อบุผิวเป็นแบบ simple cuboidal epithelium ถัดมาเป็นชั้น submucosa, muscularis และ serosa

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Akkanee Pewhom 2014: Histological Structure of the Reproductive Organs of Supachai's Caecilian *Ichthyophis supachaii* Taylor, 1960 (Amphibia: Gymnophiona). Master of Science (Zoology), Major Field: Zoology, Department of Zoology. Thesis Advisor: Associate Professor Kannika Chatchavalvanich, M.S. 98 pages.

The histological structure of the reproductive organs in adult Supachai's caecilians (3 males and 5 females) have been studied. In males, each testis lobe consists of numerous lobules where the Sertoli cells and the groups of germ cells are located their germ cysts. For each cyst, all germ cells are found to be at the same stage of differentiation (1. primary spermatogonia 2. secondary spermatogonia 3. primary spermatocyte 4. secondary spermatocyte 5. spermatid and 6. spermatozoa). We found that the different cysts consist of the germ cells at different developmental stages. Mullerian duct transformed to be the Mullerian gland which consists of numerous simple tubular glands arranged in a centripetal manner around the circumference of the central duct. The tubular gland has 3 types of cells; 1. secretory cell 2. ciliated cell and 3. amoeboid cell. The central duct's epithelium lining is simple low columnar epithelium. In females, the ovary consists of the germ cells at 4 stages; oogonia, previtellogenic follicle (early previtellogenic follicle and late previtellogenic follicle), vitellogenic follicle (early vitellogenic follicle and late vitellogenic follicle) and atretic follicle. In this study, the corpus luteum could not be found in any specimen. The oviduct is divided into 2 regions (anterior and posterior portion). The anterior portion bordered with 2 types of epithelium one half circumferenced by simple columnar epithelium and another half by villus-like projection. Under epithelium layer, muscularis and serosa layer can be found. For the posterior part is divided into 4 layers (mucosa, submucosa, muscularis and serosa). Its mucosa layer forms rugae structure and bordered with simple cuboidal epithelium.

---

Student's signature

---

Thesis Advisor's signature

## กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ภรณีภา ชัชวาลวานิช อาจารย์ที่ปรึกษา  
วิทยานิพนธ์หลัก และอาจารย์ ดร. ปราโมทย์ ชำนาญปิ่น อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่ได้  
กรุณาให้คำสอน ชี้แนะแนวทางในการศึกษา การค้นคว้า การทำวิจัย การดูแลเอาใจใส่ และให้  
กำลังใจแก่ข้าพเจ้าอย่างดียิ่ง รวมทั้งการให้คำแนะนำในการเขียน การตรวจและการแก้ไข  
วิทยานิพนธ์ให้มีความถูกต้องจนกระทั่งงานวิจัย และรูปเล่มเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ศพ.ญ. ดร. อุไร พงษ์ชัยฤกษ์ ที่สละเวลาเป็นผู้แทน  
บัณฑิตในการสอบประมวลความรู้ และขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. ประไพร์ เศรษฐ์รักษ์ ที่  
สละเวลาเป็นผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกในการสอบปากเปล่าขั้นสุดท้าย ตลอดจนให้คำแนะนำ และ  
ข้อคิดต่างๆ

ขอขอบพระคุณคุณภรรยา สัมพันธ์มิตร คุณสายัณห์ มากอง และเจ้าหน้าที่โครงการคืนชะนีสู่  
ป่า มูลนิธิช่วยชีวิตสัตว์ป่าแห่งประเทศไทย ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำแนะนำในการเก็บ  
ตัวอย่างตลอดจนการอำนวยความสะดวกเรื่องที่พักตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่าง

ขอขอบคุณนายอิสเรศ มุขคำ สำหรับการสอนกระบวนการการทำวิจัย รวมถึงอำนวยความสะดวก  
ในการทำงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณนายอรรถพล วัฒนสัมบัน  
นางสาววิภาวดี สุวรรณพันธ์ รวมถึงเพื่อนร่วมสาขา สำหรับการช่วยเหลือ และให้กำลังใจ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่ได้สนับสนุนและส่งเสริมทางการศึกษา  
ความรัก ความห่วงใย รวมถึงกำลังใจจากพี่และน้องที่มีให้ข้าพเจ้าเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์ทางวิชาการของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอกราบแสดงกตเวทิตาแด่  
บุพพการี และคณาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทความรู้และปัญญาแก่ข้าพเจ้าทั้งในอดีตและปัจจุบัน

อค์นี ผิวหอม

ธันวาคม 2556

## สารบัญ

## หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	19
ผลและวิจารณ์	24
ผล	24
วิจารณ์	51
สรุปและข้อเสนอแนะ	64
สรุป	64
ข้อเสนอแนะ	67
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	68
ภาคผนวก	82
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	98

## สารบัญตาราง

ตารางผนวกที่	หน้า
1 ขั้นตอนและระยะเวลาในกระบวนการ tissue processing	83
2 ความยาวและน้ำหนักของตัวอย่างเขี่ยคงสุกซัยเพศผู้และเพศเมีย	84
3 ความกว้างและความยาวของ lobule	85
4 ขนาดนิวเคลียสของ germ cell เพศผู้ของเขี่ยคงสุกซัย	87

## สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สัณฐานวิทยาของอวัยวะของเย็บคูกุศกรชัย	24
2	อวัยวะของเย็บคูกุศกรชัยแสดง lobule (H&E)	25
3	อวัยวะของเย็บคูกุศกรชัยแสดง lobule (Masson's trichrome)	26
4	อวัยวะของเย็บคูกุศกรชัยแสดง primary spermatogonia	28
5	อวัยวะของเย็บคูกุศกรชัยแสดง secondary spermatogonia และ primary spermatocyte	29
6	อวัยวะของเย็บคูกุศกรชัย แสดง interstitial tissue	31
7	อวัยวะของเย็บคูกุศกรชัย แสดง secondary spermatocyte, spermatid I, spermatid II และ spermatid III	32
8	อวัยวะของเย็บคูกุศกรชัย แสดง early spermatozoa และ spermatozoa	33
9	อวัยวะของเย็บคูกุศกรชัย แสดง collecting duct และ spermiating cyst	34
10	Mullerian duct	36
11	Mullerian duct (ต่อ)	37
12	สัณฐานวิทยาของรังไข่ของเย็บคูกุศกรชัย	38
13	germinal nest และ oogonia	39
14	early previtellogenic follicle	40
15	late previtellogenic follicle	41
16	early vitellogenic follicle	43
17	late vitellogenic follicle	44
18	atresia ของ early previtellogenic follicle และ atresia ของ late previtellogenic follicle	45
19	atresia ของ early vitellogenic follicle	46
20	atresia ของ late vitellogenic follicle	47



โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของเขียดงูคูกชัย *Ichthyophis supachaii*  
Taylor, 1960 (Amphibia: Gymnophiona)

Histological Structure of the Reproductive Organs of Supachai's Caecilian  
*Ichthyophis supachaii* Taylor, 1960 (Amphibia: Gymnophiona)

คำนำ

เขียดงู หรือ caecilian เป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก จัดอยู่ในชั้นแอมฟิเบีย (Amphibia) ซึ่งสมาชิกของชั้นนี้ประกอบด้วย กบ คางคก อึ่งอ่าง ปาด เขียด นิวท์ และซาลาแมนเดอร์ เขียดงูกูกชัย อยู่ในอันดับ Gymnophiona หรือ apoda ซึ่งมีสมาชิกประมาณ 150 สายพันธุ์ มีการกระจายในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทวีปอเมริกา และทวีปแอฟริกา วงศ์เขียดงู Ichthyophiidae เป็นหนึ่งในหลายๆ วงศ์ของอันดับ Gymnophiona ที่มีลักษณะรูปร่างคล้ายงู มีหนวด ไม่มีรยางค์ที่ใช้สำหรับการเคลื่อนที่ ลำตัวมีลักษณะเป็นปล้องเรียงต่อกัน 322 ปล้อง พบมากในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมทั้งประเทศไทย เขียดงูวงศ์ Ichthyophiidae มี 2 สกุลคือ *Caudacaecilia* และ *Ichthyophis* โดยเขียดงูกูกชัย *Ichthyophis supachaii* ที่ใช้ในการวิจัยครั้งนี้พบทางภาคใต้ของประเทศไทย ตั้งแต่จังหวัดนครศรีธรรมราชลงไป ซึ่งมีลักษณะเฉพาะตัวคือ ลำตัวมีสีม่วงเข้มอมเทา ด้านท้องมีสีเทาใกล้กับมุมปาก ข้างลำคอ และช่องเปิดทวารมีจุดสีครีม 1 จุด มีแถบยาวสีเหลืองตั้งแต่ร่องบริเวณคอ ร่องที่ 3 ไปจนถึงระดับช่องเปิดทวาร ที่หลังมีจุดสีเหลืองเพียงเล็กน้อย แต่พบมากที่บริเวณส่วนท้องรอบตามีวงสีครีม เขียดงูที่ออกจากไข่ในระยะแรกนั้น ตัวอ่อนจะอาศัยอยู่ในน้ำ มีช่องเหงือกช่วยในการหายใจ หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างระหว่างการเจริญเติบโต (metamorphosis) ขึ้นมาอาศัยอยู่บนบก หรืออยู่ในน้ำแล้วแต่ชนิด เขียดงูส่วนใหญ่กินตัวอ่อน และตัวเต็มวัยของแมลง หรือไส้เดือนดินเป็นอาหาร เขียดงูที่อาศัยอยู่บนบกนั้น ส่วนใหญ่ดำรงชีวิตในโพรงใต้ดินที่มีความชื้นชื้น ทำให้การศึกษา และการทำการวิจัยเกี่ยวกับชีววิทยาของเขียดงูมีน้อยมาก และเนื่องจากว่าเขียดงูมีลักษณะลำตัวที่ยาว และมีความลื่นเป็นอย่างมากเมื่ออยู่ในที่ชื้นแฉะ รวมถึงการเคลื่อนที่ที่เร็วมากเมื่ออาศัยอยู่ในน้ำ จึงเป็นอีกอุปสรรคหนึ่งในการจับตัวนำมาศึกษาเช่นเดียวกัน ในธรรมชาติเขียดงูจะออกจากโพรงใต้ดินเพื่อหาอาหาร มักพบเขียดงูตามเศษซากใบไม้ ได้ซอนไม้บริเวณที่มีความชื้นแฉะ และมีสารอินทรีย์สูง ตาม IUCN Red List of Threatened Species กำหนดสถานะของเขียดงูกูกชัย เป็นสัตว์ชนิดที่ยังขาดแคลนข้อมูลอยู่ ซึ่งสอดคล้องกับอุปนิสัยการดำรงชีวิตที่หาตัว

ยาก จึงทำให้มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับเขียดงูชนิดนี้มีจำนวนน้อยตามไปด้วย ซึ่งการศึกษาวิจัยเขียดงูชนิดนี้นับเป็นจุดเริ่มต้นที่สำคัญในการสร้างองค์ความรู้พื้นฐานต่อไป

การศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของอันดับ Gymnophiona ยังมีจำนวนน้อยมาก ทั้งๆ ที่อวัยวะสืบพันธุ์เป็นอวัยวะที่มีความสำคัญในสิ่งมีชีวิต เพราะเป็นอวัยวะที่เกี่ยวกับการดำรงเผ่าพันธุ์และขยายพันธุ์ ด้วยเหตุนี้ ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของเขียดงูสกุลซัยทีโตเต็มวัย อันจะเป็นประโยชน์ทางการศึกษาในด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ และเป็นฐานข้อมูลความรู้เกี่ยวกับจุลกายวิภาคศาสตร์ของสัตว์ชนิดนี้ นอกจากนี้ยังสามารถนำข้อมูลไปใช้ประกอบการวิจัยในด้านอื่นๆ เช่น ชีววิทยาวิวัฒนาการ และนิเวศวิทยา อันจะก่อให้เกิดองค์ความรู้ที่แพร่หลายเกี่ยวกับสัตว์ชนิดนี้เพิ่มมากขึ้น

## วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาลักษณะ โครงสร้างในระดับจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ของเขียดงูคูกุชย์ที่โตเต็มวัย
2. เพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานที่สำคัญ และเพิ่มเติมข้อมูลที่ยังขาดแคลนทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์ของเขียดงูคูกุชย์



## การตรวจเอกสาร

### อนุกรมวิธาน

#### 1. การจัดจำแนก

เขียดงูศุกซัย *Ichthyophis supachaii* Taylor, 1960 เป็นเขียดงูที่มีการแพร่กระจายทางภาคใต้ของประเทศไทย พบตั้งแต่จังหวัดนครศรีธรรมราชลงไป โดยมีลำดับอนุกรมวิธานตาม Taylor (1968) ดังนี้

Kingdom Animalia

Phylum Chordata

Class Amphibia

Order Gymnophiona

Family Ichthyophiidae

Genus *Ichthyophis*

Species *I. supachaii*

#### 2. สัณฐานวิทยาของเขียดงู

เขียดงูมีกระดูกสันหลัง 283 ข้อทำให้สามารถเคลื่อนที่ได้ทุกทิศทาง (Nussbaum and Naylor, 1982) เขียดงูมีลิ้นที่สากแต่ไม่สามารถขยับลิ้นได้มากนัก (Freiberg, 1972) ไม่สามารถยื่นลิ้นออกมาเหมือนกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น และลิ้นไม่ได้ทำหน้าที่ช่วยในการจับเหยื่อ (Wake, 1992) แต่เมื่อเหยื่อเข้ามาในช่องปาก ลิ้นอาจช่วยในการนำเหยื่อไปยังตำแหน่งที่จะกลืนเหยื่อลงไปได้ (Bemis et al., 1983) เขียดงูมีฟันหลายชุด (polyphyodonty) เช่นเดียวกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่นที่ประกอบด้วย crown และ pedicle มีการเรียงของฟันเป็นแถบเดียวในแนวโค้ง เพื่อประโยชน์ในการจับเหยื่อและยึดเหยื่อในขณะที่ปิดปากกินอาหาร (Wake, 1976) ฟันแถวหน้ามีการพัฒนาที่ดีกว่าแถวหลัง (Wake and Wurst, 1979) ในระยะ fetus ฟันจะมีขนาดใหญ่และมีหลายแถวอยู่ทางผิวด้านนอกของขากรรไกรส่วน mandible ฟันลักษณะเช่นนี้มีไว้สำหรับขูดมากกว่าการจับเหยื่อ (Wilkinson, 1991)

ลักษณะของผิวหนังของเขียดงูมีโครงสร้าง 2 ชั้น คือ epidermis และ dermis มีหน้าที่ในการรับสัมผัส หลังสาร และหายใจ (แลกเปลี่ยนก๊าซ) เช่นเดียวกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่นๆ และมีเกล็ด (dermal scale) จำนวนชั้นของ dermis มี 2 ชั้นคล้ายกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่นคือ stratum spongiosum และ stratum compactum ชั้นนอกสุดของ stratum spongiosum ปกคลุมไปด้วยต่อมเมือก (mucous gland) granular gland เกล็ด (dermal scale) และเซลล์เม็ดสี (chromatophore) ลักษณะผิวหนังโดยทั่วไปของอันดับ Gymnophiona มีโครงสร้างในการลดการสูญเสียน้ำคล้ายกับพวก anuran (Elkan, 1968)

ต่อมเมือกทำหน้าที่สร้างเมือกที่ละลายน้ำได้ (hydrophilic mucin) ปกคลุมทั่วทั้งลำตัว ช่วยในการรักษาความชุ่มชื้นของผิวหนัง เพื่อประโยชน์ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ และช่วยลดแรงเสียดสีเมื่อเคลื่อนที่ผ่านรูใต้ดิน (Gabe, 1971) อย่างไรก็ตามการที่เขียดงูที่อยู่ในน้ำมีเมือกมาก ทำให้การเคลื่อนที่ในสภาพแวดล้อมที่แห้งแล้งลำบาก เนื่องจากเมือกเมือกสูญเสียน้ำทำให้มีคุณสมบัติที่เหนียวเป็นพิเศษ (Wilkinson, 1991) ต่อม granular หรือ mixed gland มีจำนวนมากและมีขนาดใหญ่กว่าต่อมสร้างเมือก (mucous gland) และต่อมในผิวหนังของเขียดงูด้วย myoepithelial cell (Fox, 1983) จากงานวิจัยของ Gabe (1971) พบว่า แม้จะไม่มีหลักฐานที่สนับสนุนว่าต่อมเหล่านี้สร้างพิษแต่อย่างไรก็ตามนักวิจัยบางท่านต่างให้ความเห็นว่า สารคัดหลั่งที่หลั่งออกมาต่างทำหน้าที่เกี่ยวกับการป้องกันอันตราย (Toledo and Jared, 1995)

Dermal scale นั้นพบเฉพาะในเขียดงูบางชนิดในวงศ์ Ichthyophiidae และ Caeciliidae (Zylberberge *et al.*, 1980) และใน *T. compressicaudus* (Wake, 1975) โครงสร้างนี้มีบทบาทสำคัญที่ทำให้ลำตัวของเขียดงูมีความแข็งแรงขึ้น ป้องกันอวัยวะภายในจากการทำร้ายของผู้ล่า ทำให้ผิวหนังแห้งช้าลง และช่วยเพิ่มแรงบีบทำให้ต่อมหลังสารออกมาได้ระหว่างการเคลื่อนที่ (Fox, 1983) การมีเกล็ดของเขียดงูอาจเป็นลักษณะโบราณที่สืบทอดมาในอันดับนี้โดยมีหลักฐานทางฟอสซิลแสดงให้เห็นว่ากลุ่ม Labyrinthodont และ Lepospondyli มีเกล็ดปกคลุมลำตัว (Colbert, 1955) ใน *Ichthyophis kohtaoensis* และ *Hypogeophis rostratus* มีเกล็ดที่แบนคล้ายจาน (Zylberberg *et al.*, 1980) ในสกุล *Dermophis* และ *Microcaecilia* พบเกล็ดในร่องลำตัว ซึ่งในร่องนั้นประกอบด้วยเนื้อเยื่อประสาน และมีความเกี่ยวข้องกับ granular gland (Zylberberg and Wake, 1990)

ส่วนหัวของเขี้ยวที่อาศัยในดินนั้นมีจำนวนชั้นของเนื้อเยื่อชั้นนอกหรือหนังกำพร้า (epidermis) มากกว่าสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่น (Andrew, 1979) และระหว่างชั้นพบเซลล์รูปขวด (flask cell) ที่ให้ผลบวกกับสีย้อมทดสอบ neutral mucin (Gabe, 1971) ใน *I. kohtaoensis* เซลล์รูปขวดมีส่วนปลายบนของเซลล์คล้ายกับไมโครวิลไล (microvilli) และมีคริสตี (cristae) ในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) จำนวนมาก แสดงให้เห็นว่าเซลล์รูปขวดทำหน้าที่เกี่ยวกับเมแทบอลิซึม (metabolism) เป็นหลัก ในพวก anuran เซลล์นี้ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งไอออน เช่น คลอไรด์ (chloride) เป็นต้น (Katz and Larsen, 1984)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของผิวหนังมีการเปลี่ยนแปลงตามพัฒนาการ ในเขี้ยว *I. glutinosus* ที่อายุน้อย ผิวหนังชั้น epidermis มีความบางมากกว่าเขี้ยวที่โตเต็มวัยและไม่มีเคอราติน (keratinized) ในชั้น stratum corneum และพบ ampullary organ ซึ่งไม่พบในเขี้ยวที่โตเต็มวัย (Breckenridge *et al.*, 1987)

ในเขี้ยว *I. glutinosus* นั้น Leydig cell neuromast และ ampullary organ จะไม่พบระหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่างระหว่างการเจริญเติบโต (metamorphosis) และจะพบว่ามีการพัฒนาของผิวหนังชั้น stratum corneum ที่พบเคอราติน (keratinized) และการมี dermal scale การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้สัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงที่อยู่อาศัยจากในน้ำขึ้นมาอาศัยอยู่บนบก (Breckenridge *et al.*, 1987)

## ชีววิทยา

### 1. ถิ่นที่อยู่และพฤติกรรมทั่วไปของเขี้ยว

ความหลากหลายทางสัณฐานวิทยาของสิ่งมีชีวิตในอันดับ Gymnophiona นั้นมาจากการปรับตัวเพื่ออยู่ในถิ่นที่อยู่ที่หลากหลาย ไม่ว่าจะเป็นดินที่ชื้นแฉะ พื้นดินในป่าเขตร้อน ยกเว้นวงศ์ Typhlonectidae ที่อาศัยอยู่ในน้ำ

ในพื้นที่เขตร้อนจะพบเขี้ยวอาศัยอยู่ในชั้นดินที่มีความชื้น โดยการขุดรูอยู่ (Renous and Gasc, 1989) เขี้ยวสามารถขุดรูทะลุชั้นดินที่มีความแข็งได้ ทำให้เกิดโพรงดินที่มีความซับซ้อนหลายชั้น *Siphonops annulatus* อาศัยอยู่ในดินความลึก 20 เซนติเมตร ที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง

(Freiberg, 1972) ยังมีเขียดบางชนิดที่ไม่สามารถขุดรูได้ และว่ายน้ำได้บ้าง เช่น เขียดงูสกุล *Rhinatrema* ซึ่งจะเคลื่อนที่ไปมาบนพื้นผิวป่าที่เต็มไปด้วยซากพืช (Renous and Gasc, 1989) *H. rostratus* อาศัยอยู่ใต้หิน พื้นที่อับชื้น หรือตามซากพืชที่กำลังย่อยสลาย (Lawson, 1963) เขียดงูสกุล *Ichthyophis* มักจะพบได้ตามซากพืช หรือขอนไม้ผุเป็นส่วนใหญ่ ตัวอ่อนของ *I. glutinosus* ดำรงชีวิตอยู่ในน้ำ แต่จะขึ้นมาอาศัยอยู่บนพื้นดินเมื่ออายุได้ 50 สัปดาห์หลังจากฟักออกจากไข่ หลังจากนั้นจึงดำรงชีวิตอยู่ในโพรงใต้ดินที่มีทางเปิดออกสู่พื้นดินอย่างเป็นระบบ (Badenhorst, 1978) *Afrocaecilia taitana* อาศัยอยู่บนที่สูงเหนือระดับน้ำทะเล 2,500 เมตร และยังพบในดินที่มีระดับความลึกแตกต่างกันตั้งแต่ 4-64 เซนติเมตร นอกจากนี้ยังสามารถพบได้ในดินข้างทางน้ำไหลที่ไม่เปียกชื้นจนเกินไป ซึ่งเป็นที่อยู่ของหนอนและแมลง (Hebrard et al., 1992) *Geotrypetes seraphini* อาศัยอยู่ในหลุมทรายของป่าในแถบแอฟริกาตะวันตก (Bennett and Wake, 1974) *S. paulensis* อาศัยอยู่ในดินที่แห้ง และมักจะพบในรังของมดและปลวก (Freiberg, 1972)

จากทั้งหมด 4 สกุลของเขียดวงศ์ Thyphlonectidae เฉพาะสกุล *Thyphlonectes* และ *Potomotyphlus* เท่านั้นที่อาศัยอยู่ในน้ำอย่างแท้จริง ซึ่งมีการปรับตัวทางสัณฐานวิทยาเพื่อตอบรับกับการดำรงชีวิตในรูปแบบนี้ โดยมีส่วนท้ายของลำตัวแบนทางด้านข้าง และด้านท้ายของลำตัวมีลักษณะแบน ซึ่งแตกต่างจากเขียดชนิดอื่นซึ่งมีลำตัวกลมแบนแบบบนล่าง (Wilkinson, 1989) *T. compressicaudus* อาศัยอยู่ในรูโคลนใต้แม่น้ำ ซึ่งอาจประสบกับปัญหาปริมาณออกซิเจนต่ำและปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สูง (Toews and Macintyre, 1977) และจากการวิจัยยังพบว่าเขียดชนิดนี้มักไม่ว่ายน้ำ แต่สามารถอยู่ในน้ำได้นานถึง 100 นาที ที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส (Homscheid and Greven, 1996)

## 2. วงจรชีวิตของเขียด

เขียดส่วนใหญ่วางไข่ครั้งละ 20-50 ฟอง (Exbrayat and Delsol, 1985) แต่ก็พบว่ามีรายงานในเขียดบางชนิดที่มีปริมาณการวางไข่ที่แตกต่างไปจากนี้ เช่น *Idiocranium russelli* ที่วางไข่ครั้งละ 6 ฟอง (Wake, 1977) *I. malabarensisi* และ *S. annulatus* วางไข่ประมาณ 100 ฟองต่อครั้ง ไข่ของ *S. annulatus* มีลักษณะที่ใส สามารถมองเห็นตัวอ่อนที่กำลังเจริญเติบโตภายในไข่ได้ (Wake, 1968)

ตัวอ่อนของ *I. glutinosus* อายุ 50 สัปดาห์หลังจากฟักออกจากไข่ สามารถดำรงชีวิตบนบกได้ (Breckenridge *et al.*, 1987) เขียดชนิดนี้มีอัตราการเจริญเติบโตโดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (metamorphosis) ที่ช้า ทำให้ช่วงชีวิตที่เป็นตัวอ่อนต้องอาศัยอยู่ในน้ำเป็นเวลานาน ในขณะ ตัวอ่อนของเขียดในสกุล *Siphonops* และ *Hypogenophis* หลังจากฟักออกจากไข่สามารถมีอัตราการเจริญเติบโตโดยมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างอย่างรวดเร็ว ทำให้สามารถอยู่บนบกได้โดยไม่ต้องอาศัยอยู่ในน้ำ ซึ่งถือว่าเป็นรูปแบบที่พัฒนาแล้ว (Exbrayat and Bloquet, 1994) การเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์ของเขียดบางชนิดอาจใช้เวลายาวนาน เช่น *T. compressicaudus* ใช้เวลานานถึง 3 ปี (Exbrayat, 1986a)

การศึกษาความแตกต่างของระยะการฟักตัวระหว่างเขียด *Dermorphis mexicanus* (Wake, 1980a) *Chthonerpeton indistinctum* (Freiberg, 1972) และ *T. compressicaudus* พบว่า ระยะฟักตัวของเขียดชนิดที่อาศัยอยู่ในน้ำสั้นกว่าชนิดที่อาศัยอยู่บนบก (Exbrayat and Delsol, 1985) แต่ยังคงอาศัยการวิจัยเพิ่มเติมมากกว่านี้

### 3. โภชนาการและสัตว์ผู้ล่า

เขียดตัวโตเต็มวัยที่ถูกรับประทานโดยสัตว์กินเนื้อเป็นอาหาร เช่น *C. indistinctum* (Serie, 1915) *I. glutinosus* (Breckenridge *et al.*, 1987) *Gegeneophis carnosus* (Sutharam *et al.*, 1990) และ *I. Beddomei* (Masood *et al.*, 1992) แต่บางครั้งอาจกินปลาเทราท์แช่แข็ง เช่น *T. compressicaudus* (Exbrayat and Delsol, 1985) หรือเนื้อวัวและหนูปด เช่น *S. annulatus* ตัวอ่อนของเขียดกินแมลง (Breckenridge *et al.*, 1987) เขียดในธรรมชาติกินปลวก จิ้งหรีด ทาก หอยทาก และไส้เดือนดินเป็นอาหาร (Duellman and Trueb, 1986) *Gymnopsis multiplicata* (Bemis *et al.*, 1983) และ *D. mexicanus* (Wake, 1980b) กินปลวก และตัวอ่อนของแมลงในอันดับ Orthoptera ส่วน *T. compressicaudus* กินปลาที่ตายแล้ว (Exbrayat and Delsol, 1985) และแมลงที่อาศัยอยู่ในน้ำ (Moodie, 1978) จากการวิจัยพบว่าเขียดบางชนิด เช่น *A. taitana* มีซากพืชอยู่ในทางเดินอาหาร (Hebrard *et al.*, 1992) ดินและใยอาหารใน *I. glutinosus* (Breckenridge *et al.*, 1987) พบทรายและพืชใน *T. compressicaudus* (Exbrayat and Delsol, 1985)

เขียดมีความเร็วมากในการจู่โจมเหยื่อ และมีความสามารถในการจับเหยื่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ หลังจากนั้นจะลากเหยื่อลงไปในรูเพื่อทำให้เหยื่อได้รับบาดเจ็บจากการเสียดสีกับรู

(Bemis *et al.*, 1983) อาหารของ *G. seraphini* คือไส้เดือนดินขนาดใหญ่ซึ่งอาจต้องใช้เวลา 2-3 นาทีในการลากลงรู (Bennett and Wake, 1974) สำหรับ *D. mexicanus* และเขียดชนิดอื่นๆ สามารถกลืนเหยื่อที่มีลำตัวยาวได้ โดยไม่ต้องอาศัยวิธีข้างต้น ส่วนเขียดสกุล *Ichthyophis* นั้น ใช้วิธีจับและเลียไปพันรอบตัวของเหยื่อ เพื่อให้เหยื่อยากต่อการหลบหนี (Pattile *et al.*, 1977)

ศัตรูส่วนใหญ่ของเขียด คือสัตว์เลื้อยคลานด้วยน้ำนม สัตว์เลื้อยคลาน และมด เช่น *Micrurus carallinus* (Marques, 1992) ในขณะนี้ยังมีความรู้น้อยมากสำหรับวิธีการป้องกันตัวจากศัตรูของเขียด แต่คาดว่าอาจป้องกันตัวโดยใช้สารเมือกที่หลั่งมาจากผิวหนัง (Breckenridge and Murugapillai, 1974) ซึ่งอาจทำให้ลื่นหลุดจากการจับกุมของศัตรู (Pe'faur *et al.*, 1992)

#### 4. อวัยวะรับความรู้สึก

เขียดมีการพัฒนาการรับสัมผัสทางเคมี การรับสัมผัสทางไฟฟ้า ในระยะที่อายุน้อยจะมีเส้นข้างลำตัว (lateral line) และมีการวิวัฒนาการของการรับกลิ่น ขณะที่การมองเห็น (Badenhorst, 1978; Roth *et al.*, 1992) และการได้ยินมีความสำคัญลดลง (Roth *et al.*, 1992)

เขียดโตเต็มวัยที่อาศัยอยู่บนบกจะมีการมองเห็นที่ต่ำ ขณะที่เขียดที่อาศัยอยู่ในน้ำมีตาที่มีความซับซ้อนและมองเห็นได้ดีกว่า (Wake, 1992) ใน retina จะประกอบไปด้วย rod cell ซึ่งคล้ายกับสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ (Wake, 1985) เขียดบางชนิดที่อาศัยอยู่บนบกที่แท้จริงจะมีการลดการทำหน้าที่ของ retina และเลนส์ ในทางกลับกันจะพบการพัฒนาที่ดีของเลนส์ในเขียดสกุล Typhlonectidae และ Ichthyophiidae (Wake, 1992)

เขียดมี tentacle ที่ใช้สำหรับรับสัมผัสทางเคมี และทำหน้าที่เกี่ยวกับการสัมผัสที่เกี่ยวกับการตรวจจับเหยื่อ (Pough *et al.*, 1996) ตำแหน่งของ tentacle มีความหลากหลาย เช่น เขียด *T. compressicaudus* มี tentacle อยู่ระหว่างด้านหลังของจมูกและปาก ขณะที่ในเขียด *Rhinatrema colombianum* มี tentacle อยู่ที่ด้านหน้าของตาและไม่ค่อยพัฒนา (Freiberg, 1972)

## 5. การสืบพันธุ์

เขียดงูทุกชนิดมีการปฏิสนธิภายใน แต่นักวิทยาศาสตร์ยังมีข้อมูลน้อยเกี่ยวกับการเกี่ยวพันราสี และพฤติกรรมต่างๆ ที่เกี่ยวกับการสืบพันธุ์ (Wake, 1995) เขียดงูเพศผู้มีอวัยวะที่ช่วยในการสืบพันธุ์ เรียกว่า phallosome (Young, 1981) เขียดงู *T. compressicaudus* ใช้เวลาในการสืบพันธุ์นานประมาณ 3 ชั่วโมง (Paillot *et al.*, 1997) ฤดูกาลสืบพันธุ์ของเขียดงูขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น ปริมาณฝน ความชื้น และ โภชนาการ (Exbrayat and Delsol, 1985)

### การศึกษาอวัยวะสืบพันธุ์ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก

#### 1. อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้

ในสัตว์จำพวก anuran มีอวัยวะเป็นคู่ มีลักษณะกลม อัดแน่น และมีสีเหลือง (Goin and Goin, 1962) ล้อมรอบด้วยชั้น tunica albuginea ในอวัยวะมีโครงสร้างที่เรียกว่า seminiferous tubule เป็นจำนวนมาก ชั้น tunica albuginea ประกอบด้วยเส้นใยคอลลาเจน (collagen fiber) (Santos and Oliveira, 2008) การสร้าง spermatozoa ของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกเกิดขึ้นโดยกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ germ cell ที่จัดเรียงเป็นกลุ่มอยู่ภายใน germ cyst หรือ spermatocyst (Lofts, 1974) ในกบ *Dendropsophus minutus* กระบวนการสร้าง spermatozoa เกิดขึ้นใน seminiferous tubule ในแต่ละ cyst ประกอบด้วยเซลล์ที่อยู่ในระยะเดียวกัน primary spermatogonia พบที่ฐานของเยื่อบุผิว และมักพบว่ามีความสัมพันธ์กับ Sertoli cell ที่อยู่ติดกับ basal membrane (Santos and Oliveira, 2008)

Primary spermatogonia เป็นระยะแรกของ germ cell ใน seminiferous tubule เซลล์นี้มีนิวเคลียสรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ย้อมติดสีพวกค้าง อยู่ติดกับผนังของ seminiferous tubule ร่วมกันกับ follicle cell ที่มีนิวเคลียสเป็นรูปเหลี่ยมจันท์คล้ายกับ Sertoli cell ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ส่วน secondary spermatogonia มีนิวเคลียสรูปร่างกลม นิวเคลียสของ secondary spermatogonia มีขนาดเล็ก และติดสีพวกค้างมากกว่า primary spermatogonia

Primary spermatocyte มีนิวเคลียสกลม แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ secondary spermatogonia พบว่า primary spermatocyte มีขนาดของเซลล์ที่ใหญ่กว่า primary spermatocyte แยกออกจากเซลล์

อื่นๆ ได้ง่ายโดยดูจากลักษณะโครมาทิน และลักษณะของนิวเคลียสที่มีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิส ส่วน secondary spermatocyte มีขนาดเล็ก และนิวเคลียสรูปร่างกลม โครมาทินมีการขดกันแน่นกว่า มีการติดสีพวกต่างมากกว่า germ cell อื่นๆ ส่วน spermatid แบ่งออกเป็น first spermatid, second spermatid และ third spermatid ซึ่ง first spermatid มีรูปร่างกลม และมีขนาดเล็ก ในนิวเคลียสมีโครมาทินหยาบ นิวเคลียสของ second spermatid มีเส้นใยโครมาทินที่ขดกันแน่นกว่า spermatid ที่อยู่ในระยะเริ่มแรก นิวเคลียสของ third spermatid มีรูปร่างรี และมีโครมาทินขดกันแน่น สำหรับกลุ่มของ spermatozoa (sperm band) เกิดจาก spermatozoa ที่มีส่วนหัวรูปยาวอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม และ spermatozoa ที่โตเต็มที่แล้วจะเป็นอิสระอยู่ใน tubular lumen และจะไปตามเส้นทางของระบบของท่อสืบพันธุ์ (Kaptan and Murathanoglu, 2008)

ในสัตว์จำพวกเขียดงูอันทะมีจำนวนหลายพู (lobe) แต่ละ lobe ประกอบด้วยหลายๆ lobule แต่ละ lobule จะแยกออกจากกันด้วยเนื้อเยื่อประสาน เส้นเลือด เส้นประสาท และกลุ่มของ interstitial หรือ Leydig cell แต่ละ lobule จะมี Sertoli cell และ germ cell (Seshachar, 1936, 1942) อันทะมีการสร้าง spermatozoa และปล่อยเข้าสู่ไต โดยผ่าน rete testis จากนั้น spermatozoa จะเคลื่อนที่ผ่านทาง kidney ductule และ Wolffian duct ออกสู่ cloaca (Wake, 1981)

การพัฒนาการของ Sertoli cell ในเขียดงูมีจุดกำเนิดมาจาก follicle cell ที่ล้อมรอบ primary spermatogonia (Seshachar, 1942) เขียดงูและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอื่นๆ มีลักษณะร่วมกันอยู่ประการหนึ่งคือ ในกระบวนการสร้าง spermatozoa เซลล์ทั้งหมดใน 1 cyst เป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะเดียวกัน และมีการเจริญเติบโตที่เหมือนกัน (Lofts, 1974)

ในสัตว์จำพวกเขียดงูมีการพัฒนาทางด้านการสืบพันธุ์สูงกว่าสัตว์จำพวกสะเทินน้ำสะเทินบกด้วยกัน คือ มีการปฏิสนธิภายใน (Oommen *et al.*, 2000) จากการศึกษาการทำงานของอันทะจากวิธีทางวิทยาเนื้อเยื่อในเขียดงู *I. tricolor* การสร้าง spermatozoa มี 3 ระยะ คือ 1. ระยะ active spermatocyte อยู่ในช่วงเดือนกรกฎาคมถึงพฤศจิกายน 2. ระยะ early regression อยู่ในช่วงเดือนธันวาคมถึงมีนาคม 3. ระยะ spermatogenetic quiescence อยู่ในช่วงเดือนเมษายนถึงมิถุนายน Spengel (1876) ได้อธิบายกระบวนการสร้าง spermatozoa ในเขียดงู *C. gracilis*, *I. glutinosus* และ *S. annulatus* โดยกล่าวว่า อันทะของเขียดงูแบ่งออกเป็น lobe ภายใน lobe มีโครงสร้างคล้ายห้อง (chamber) เรียกว่า locule Seshachar (1936) ได้เลือกใช้คำที่เหมือนกันในการอธิบายอันทะของเขียดงู *I. glutinosus*, *Ureotyphlus narayani* (1939), *S. annulatus* และ *D. gregorii* (1942) แต่ Wake

(1968, 1977) ได้พิจารณาคำว่า *locule* ที่อธิบายโดย Spengel (1876) ว่ามีความหมายเหมือนกับคำว่า *lobule* การอธิบายของ Wake (1968, 1977) มีความเหมาะสมมากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้คำว่า *lobule* ซึ่ง *lobule* มีรูปค่อนข้างกลมไปจนถึงหกเหลี่ยม และแต่ละ *lobule* ถูกหุ้มด้วย *basement membrane* (Smita *et al.*, 2004)

กระบวนการสร้าง *spermatozoa* ของเขียดงู มีการแบ่งเป็นระยะ โดยที่ *germ cell* ใน *lobule* ประกอบด้วยเซลล์ และมีการทำงานร่วมกันของเซลล์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและการเจริญ Spengel (1876) ได้ศึกษาเขียดงู *C. gracilis*, *I. glutinosus* และ *S. annulatus* โดยจำแนกกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ *germ cell* ออกเป็น 7 ระยะ แต่ Seshachar (1936) แบ่งการพัฒนาเป็น 6 ระยะ คือ 1. *primary spermatogonia* 2. *secondary spermatogonia* 3. *primary spermatocyte* 4. *secondary spermatocyte* 5. *spermatid* และ 6. *spermatozoa*

*Primary spermatogonia* เริ่มพบในบริเวณ *collecting duct* ไปจนถึง *lobule* (Spengel, 1876) นิวเคลียสของ *primary spermatogonia* จะอยู่ในสภาวะพัก (*resting condition*) นิวเคลียสติดสีพวกต่าง (Smita *et al.*, 2004) *primary spermatogonia* ผ่านกระบวนการการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ได้ *cell nest* ที่ประกอบด้วย *secondary spermatogonia* 2-16 เซลล์ (Seshachar, 1936) *secondary spermatogonia* มีขนาดเล็กกว่า *primary spermatogonia* (De Sa and Berois, 1986)

*Primary spermatocyte* จัดเรียงตัวเป็น 2 แถวใน *cyst* (Seshachar, 1937) หลังจากนั้นจะแบ่งเซลล์กลายเป็น *secondary spermatocyte* และ *spermatid* ส่วน *spermatozoa* ของเขียดงูมีรูปร่างแบบเรียวยาว (*filiform*) ประกอบด้วย ส่วนหัว (*acrosome* และ *nucleus*) ส่วนกลาง (*midpiece*) และส่วนหาง (*tail*) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (*light microscope*) อโครโซมและนิวเคลียสปรากฏโครงสร้างที่แตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ *Ichthyophis* sp., *Boulengerula* sp. และ *Uraeotyphlus* sp. แต่ไม่แตกต่างกันใน *Chthonerpeton* sp., *Gegeneophis* sp. และ *Typhlonectes* sp. ในเขียดงู *Ichthyophis* sp. และ *Uraeotyphlus* sp. ที่ส่วนปลายของอโครโซมจะค่อนข้างกลม (*rounded*) ขณะที่เขียดงูสปีชีส์ *Boulengerula* sp., *Chthonerpeton* sp., *Gegeneophis* sp. และ *Typhlonectes* sp. มีอโครโซมเป็นจุด สำหรับ *spermatozoa* ที่โตเต็มที่จะเป็นอิสระอยู่ใน *efferent ductule* (Seshachar, 1936, 1937, 1940, 1945; Wake, 1968; De Sa and Berois, 1986; Smita *et al.*, 2004; Scheltinga *et al.*, 2003)

## 2. Mullerian duct

ในเขียดงูเพศผู้ที่โตเต็มวัยจะพบ Mullerian duct ที่เป็นไปได้ว่าอาจเกิดจากความล่าช้าจากกระบวนการการ sexual differentiation (Wake, 1981) ซึ่งในสัตว์จำพวก anuran นั้น Mullerian duct ปกติยังคงอยู่จนกระทั่งเกิดกระบวนการ sexual differentiation ในเอมบริโอเพศผู้ จากนั้น anti-Mullerian hormone จะหลั่งออกมาโดย Sertoli cell ฮอว์โมนนี้จะหยุดการเจริญของ Mullerian duct และทำให้สลายไป แต่ในเพศเมีย ท่อนี้ยังคงอยู่และกลายเป็นท่อนำไข่ (Duellman and Trueb, 1986) แต่ในเขียดงูเพศผู้ เป็นไปได้ว่า anti-Mullerian hormone ยังคงหลั่งอยู่ แต่ Mullerian duct อาจไม่ตอบสนองต่อการได้รับ anti-Mullerian hormone เนื่องจากตัวรับ (receptor) ไม่สามารถทำงานได้ (Jamieson, 2006)

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาสามารถแบ่ง Mullerian duct ออกเป็น 2 ประเภทตามแต่ละสปีชีส์ โดยประเภทที่ 1 ส่วนท้ายของท่อนี้มีความหนา และส่วนหน้าประมาณ 3 ใน 4 ของท่อนี้มีลักษณะแคบ ประเภทที่ 2 Mullerian duct มีความหนาเท่ากันตลอดความยาวของท่อ มีเพียงปลายสุดของส่วนหน้าเท่านั้นที่มีลักษณะแคบ (Wake, 1970) เมื่อมีการศึกษาทางวิทยาเนื้อเยื่อ พบว่า Mullerian duct ประเภทที่ 1 พบ tubular gland เฉพาะในส่วนท้ายของท่อเท่านั้น โดย tubular gland จะอยู่รอบๆ central duct แต่ใน Mullerian duct ประเภทที่ 2 พบ tubular gland ตลอดความยาวของท่อ (Tonutti, 1931)

Mullerian duct ของเขียดงู *U. narayani* พบว่า tubular gland จำนวนมากที่เรียงตัวรอบๆ central duct แยกออกจากกัน โดยเนื้อเยื่อประสานและเส้นเลือด ในช่วงระหว่าง spermatogenic phase เนื้อเยื่อผิวของ tubular gland ประกอบด้วย secretory cell และ ciliated cell ภายใน secretory cell บรรจุแกรนูลที่ย้อมติดสี PAS ที่แสดง glycoprotein (George *et al.*, 2005)

## 3. อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย

กระบวนการการสร้างไข่ (oogenesis) ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกแต่ละชนิดมีหลากหลายรูปแบบ ส่งผลให้เกิดความหลากหลายของขนาด และจำนวนของไข่ อย่างไรก็ตาม ในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำรวมถึงสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก oogonia ยังคงมีอยู่ในตัวเต็มวัย ซึ่งจะเริ่มกระบวนการสร้างไข่ในระหว่างวงจรการสืบพันธุ์ในแต่ละปี เมื่อ oogonia เข้าสู่กระบวนการแบ่ง

เซลล์ oogonia จะกลายเป็น primary oocyte หลังจากนั้นจะผ่านกระบวนการการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cyto-differentiation) และผลจากการแบ่งเซลล์จะได้เซลล์สืบพันธุ์ของเพศเมียออกมา oocyte จะผ่านกระบวนการพัฒนาตามลำดับ เหตุการณ์สำคัญระหว่างกระบวนการพัฒนา คือ มีการสะสมไข่แดง (yolk) ในไซโทพลาซึมของ oocyte และการก่อกำเนิดของเยื่อหุ้มไข่แดง สำหรับ yolk granule ประกอบด้วย vitelline ซึ่งมาจาก vitellogenin glycogen และ lipid ใน vitellogenic follicle (Beyo *et al.*, 2008)

รังไข่ (ovary) ของเขียดงูมี 1 คู่ เป็นอวัยวะที่มีลักษณะยาวคล้ายถั่ว ซึ่งจะเคียงข้างไปกับส่วนของทางเดินอาหาร ใต้ fat body และท่อนำไข่ (oviduct)

ระหว่างรังไข่ ใต้ และ fat body มีเส้นเลือดตามขวาง (transverse blood vessels) รังไข่แต่ละอันประกอบด้วย follicle จำนวนมากที่อยู่ในระยะที่แตกต่างกันตามการเจริญ และตามวงจรการสืบพันธุ์ หลังจากเขียดงูวางไข่ สามารถสังเกตเห็น corpus luteum ได้ในรังไข่ของเขียดงูทั้งในกลุ่ม oviparous และ viviparous ขณะเดียวกันก็จะพบไข่และตัวอ่อนเรียงตัวอยู่ในท่อนำไข่

ในเขียดงู *T. compressicaudus* ที่อายุน้อย รังไข่ประกอบด้วย oogonia และ oocyte ที่มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง ซึ่ง oocyte ส่วนใหญ่เป็นแบบเปลือย (naked oocyte) ส่วน oocyte อื่นๆจะมี follicle cell เพียงชั้นเดียวล้อมรอบ ใน oocyte จะมีไซโทพลาซึมที่เต็มไปด้วยแกรนูลที่ย้อมติดสี fuchsin หรือ aniline blue มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง หรือค่อนข้างขอบเซลล์และมีนิวคลีโอลัสหลายอัน

ในเขียดงู *T. compressicaudus* ที่มีอายุ 1 ปี อาจพบ oogonia และ primary oocyte ได้โดย primary oocyte อาจมี หรือไม่มี follicle cell 1 ชั้นล้อมรอบ เมื่อเขียดงู *T. compressicaudus* อายุ 1 ปี ครั้ง (18 เดือน) ภายใน oocyte จะมีนิวเคลียสและนิวคลีโอลัสจำนวนมาก แกรนูลที่ย้อมติดสี fuchsin หรือ aniline blue ซึ่งพบอยู่เต็มไซโทพลาซึม บริเวณช่องว่างที่อยู่รอบนิวเคลียสจะไม่มีแกรนูล

เมื่อเขียดงู *T. compressicaudus* อายุได้ 19-22 เดือน oocyte จะมีนิวเคลียสอยู่ขอบเซลล์ (eccentric nucleus) และมีนิวคลีโอลัสจำนวนมาก ในไซโทพลาซึมพบแกรนูลมากขึ้น ซึ่งจะย้อมติดสี PAS ที่บ่งบอกว่ามีคาร์โบไฮเดรต บริเวณไซโทพลาซึมที่ล้อมรอบนิวเคลียสจะไม่มีแกรนูล oocyte จะแยกออกจาก follicle cell ด้วยชั้น zona pellucida ที่บางมาก และติดสี PAS

เมื่อเขียดงู *T. compressicaudus* มีอายุ 24-28 เดือน oocyte เป็น previtellogenic follicle ชั้น zona pellucida มีความหนาเพิ่มขึ้น โดยสามารถพบ atretic follicle ได้บ้างและจะโตเต็มวัยเมื่ออายุ 3 ปี (Jamieson, 2006)

Exbrayat (1983) ได้ศึกษา oocytes และ follicle ในเขียดงู *T. compressicaudus* พบว่า germinal nest สามารถพบได้ตลอดความยาวของรังไข่ โดยที่ oogonia ไม่มี follicle cell ล้อมรอบ ส่วน secondary oocyte จะมี granule ที่ย้อมติดสี PAS อยู่ภายในไซโทพลาซึม นิวเคลียสอยู่ด้านข้างของ oocyte ชั้น zona pellucida ย้อมติด aniline blue และ PAS มีชั้น follicular และ theca ล้อมรอบ oocyte

Tertiary follicle ของเขียดงู *T. compressicaudus* เต็มไปด้วย yolk granule ซึ่งย้อมติดสี PAS ชั้น zona pellucida มีความหนาเพิ่มขึ้น และล้อมรอบด้วยชั้น follicular และ theca

Atretic follicle ที่พบในเขียดงู *T. compressicaudus* เกิดขึ้นหลายแบบ โดย แบบที่ 1 follicle cell มีการเพิ่มจำนวนมากกว่า 1 ชั้นและแทรกเข้าไปใน oocyte แบบที่ 2 สามารถแยกเป็นระยะย่อย 2 แบบ คือ 1. มีลักษณะเหมือนกับ atretic แบบที่ 1 แต่มีขนาดใหญ่ขึ้น 2. atresia ที่เกิดขึ้นมาจากการสลายของ previtellogenic follicle แบบที่ 3 มี adipose tissue ในเซลล์ และแบบที่ 4 พบว่า atretic follicle ประกอบด้วยเซลล์ที่มีการสลาย และเต็มไปด้วยไขมัน ซึ่งต่อไปเซลล์เหล่านี้จะหายไป นอกจากนี้ยังสามารถพบ corpus luteum ได้ในเขียดงูที่กำลังตั้งครรรภ์

Berois and De Sa (1988) ได้ศึกษา oocyte และ follicle ในเขียดงู *C. indistinctum* พบว่า เซลล์ขนาดเล็กที่สุดคือ oogonia ซึ่งมีนิวเคลียสกลมที่มีเพียง 1 นิวคลีโอลัส เซลล์ขนาดใหญ่ที่สุดคือ oocyte ซึ่งนิวเคลียสมีนิวคลีโอลัส 1 อันหรือหลายอัน จากงานวิจัยสามารถแบ่งระยะของ ovarian follicle ออกเป็น 3 ระยะคือ

1. Primary follicle มี oocyte ที่มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง และมีนิวคลีโอลัส 1 อันหรือหลายอัน แต่จะมีนิวคลีโอลัส 1 อันที่มีขนาดใหญ่กว่าอันอื่น ที่ระยะนี้ไซโทพลาซึมมีแกรนูลที่ย้อมติดสี PAS งามๆ ชั้น follicular มี follicle cell ที่มีลักษณะเป็นรูปแบนชั้นเดียวล้อมรอบ oocyte แบบไม่ต่อเนื่อง

2. Secondary follicle oocyte มีขนาดแตกต่างกันตามระยะของการพัฒนา ไซโทพลาซึมมี yolk granule ขนาดเล็กที่ย้อมติดสี PAS จางๆ นิวเคลียสเป็นรูปไข่ และมาอยู่ตรงขอบ ซึ่งจะย้อมติดสีจางมาก มีนิวคลีโอลัสจำนวนมาก มี follicle cell ที่มีรูปร่างแบนล้อมรอบ oocyte เพียงชั้นเดียวแบบไม่ต่อเนื่อง เริ่มปรากฏชั้น zona pellucida ที่ย้อมติดสี PAS อยู่ระหว่าง oocyte และ follicle cell

3. Tertiary follicle มีขนาดใหญ่ที่สุด ภายในไซโทพลาซึมของ oocyte เต็มไปด้วย yolk granule ซึ่ง granule แบบละเอียดจะอยู่ติดกับเยื่อหุ้มของ oocyte และย้อมติดสี PAS จางๆ yolk granule ที่มีขนาดใหญ่ จะย้อมติดสี PAS เข้มมากกว่า นิวเคลียสของ oocyte มีลักษณะแบนและถูกเบียดไปติดกับผนังของ oocyte มีโครมาทินเป็นเนื้อเดียวกัน และมีนิวคลีโอลัสหลายอัน ชั้น zona pellucida ติดสี PAS ชั้น follicular มี follicle cell เป็นรูป columnar และล้อมรอบ oocyte แบบต่อเนื่อง ชั้น theca เป็นเนื้อเยื่อประสานซึ่งพบเส้นเลือดจำนวนมากแทรกอยู่

นอกจากนี้อาจพบ atypical follicle ซึ่ง Berois และ De Sa (1988) รายงานว่า atypical follicle มีขนาดใกล้เคียงกับ tertiary follicle แต่มี follicle cell ล้อมรอบแบบไม่ต่อเนื่อง หรือไม่มี zona pellucida มี yolk granule ขนาดใหญ่ที่ย้อมติดสี PAS อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม oocyte ของ follicle นี้จะมี lymphocyte จำนวนมาก และ oocyte จะไม่มีนิวเคลียส ลักษณะคล้ายกับ atretic follicle

พบโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นกลุ่มก้อน ไม่มี yolk granule และ follicle cell โครงสร้างนี้สามารถเทียบได้กับ corpus luteum ของเขียดงูชนิดอื่น

จากงานวิจัยของ Masood and Nadkarni (1993a, b) ทำการวิจัยในเขียดงู *I. beddomei* พบ germinal area ที่ประกอบด้วยกลุ่มของ germ cell และมีการกระจายอย่างสม่ำเสมอในรังไข่ ซึ่งคล้ายกับที่พบในเขียดงู *T. compressicaudus* และพบ oogonia ที่กำลังพัฒนาภายใน germinal nest ระหว่าง germinal nest พบ follicle ที่อยู่ในระยะที่แตกต่างกัน ซึ่งมีการจัดจำแนก follicle ออกเป็น 4 ระยะ คือ

1. Previtellogenic follicle เป็นระยะที่มีขนาดเล็กที่สุด oocyte มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ มีรูปร่างไม่แน่นอน มี follicle cell รูปร่างแบนเพียงชั้นเดียว และมีชั้น theca ที่บางมากล้อมรอบ oocyte เอาไว้

2. Vitellogenic follicle follicle มี yolk granule ขนาดเล็กที่อยู่ด้านข้างของ oocyte ชั้นที่ห่อหุ้ม follicle คล้ายกับระยะก่อนหน้านี้นี้ และระยะนี้แบ่งเป็นระยะย่อยตามขนาดของการเจริญของ oocyte ได้อีก 5 ระยะ

3. Postovulatory follicle พบชั้น follicular มีการขยายขนาด และพบอยู่เต็มภายใน oocyte ในไซโทพลาซึมมี vacuole อยู่ ลักษณะของนิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอน ชั้น theca มีการขยายขนาด

4. Atretic follicle มี 2 ชนิด คือ ชนิดแรก oocyte เกิดการหดตัวออกจากชั้น follicular ชนิดที่ 2 follicle cell มีการขยายขนาดและมีการแบ่งตัวแทรกเข้าไปใน oocyte เซลล์นี้จะจับกินและทำลาย oocyte ด้วยการ phagocytosis จากงานวิจัยของ Masood และ Nadkarni (1993a, b) ได้แบ่ง atresia ชนิดนี้ออกเป็น 5 ระยะย่อยคือ 1. การขยายขนาดของ follicle cell 2. การเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่จะแทรกเข้าไปใน oocyte 3. พบ phagocytic cell ตลอด oocyte 4. การเสื่อมสลายของ oocyte และพบเม็ดสีน้ำตาล-แดงของ phagocytic cell และการขยายขนาดของชั้น theca 5. ชั้น follicular และ theca ที่ขยายขนาดนั้นไม่ได้รวมกัน

Exbrayat (2006) ได้จัดจำแนก oocyte ออกเป็น 6 ระยะระหว่างการพัฒนาของ follicle ในเขียดงู *T. compressicaudus* ระยะที่ 1 oogonia จะมีการรวมกลุ่มไปยัง germinal nest (Wake, 1968) ระยะที่ 2 primary oocyte พบอยู่ใน germinal nest ซึ่งอาจจะเปลือย หรือล้อมรอบด้วย follicle cell ที่มีรูปร่างแบน ระยะที่ 3 เป็นระยะ previtellogenic oocyte และ previtellogenic follicle ซึ่งขนาดของ follicle จะมีความหลากหลายตามระดับพัฒนาการ แต่มักจะมีขนาดเล็ก oocyte มีลักษณะเป็นรูปวงกลมและมีนิวเคลียสกลมตรงกลาง ซึ่งภายในมีนิวคลีโอลัสจำนวนมาก ไซโทพลาซึมล้อมติดสีพวกต่าง ที่มีแกรนูลขนาดเล็ก และพบ cortical granule นอกจากนี้ยังพบเซลล์รูปแบนจำนวนมากที่แยกตัวออกจาก oocyte โดยชั้น zona pellucida ประกอบกันเป็นชั้น follicular ระยะที่ 4 เป็นระยะ vitellogenic oocyte และ vitellogenic follicle ไซโทพลาซึมของ oocyte เต็มไปด้วย yolk granule ขนาดใหญ่และมีนิวเคลียสที่ติดกับผนังของ oocyte สามารถสังเกตเห็น cortical granule ได้บ้าง oocyte ล้อมรอบโดยชั้น zona pellucida ที่ล้อมติดสี PAS และชั้นของ follicle cell ที่มีการเพิ่มมากขึ้นเมื่อใกล้ระยะเวลาที่จะมีการตกไข่ ระยะที่ 5 เป็นระยะของ atretic follicle ที่แบ่งออกอีกหลายระยะย่อย ระยะที่ 6 เป็นระยะ corpus luteum

#### 4. ท่อนำไข่

ในเยีงคตุงเพศเมีย oocyte จะถูกปล้ดอยจากรังไข่สู่ช่องว่างลำตัว หลังจากนั้นจะถูกพัดเข้าสู่อostium และส่งต่อไปยังท่อนำไข่ (Masood, 1987) ท่อนำไข่ของเยีงคตุงที่วางไข่ แบ่งออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เรียกว่า par recta ประกอบด้วยเซลล์ต่อมที่หลังสารประกอบจำพวกโปรตีน และพบต่อมเมือกที่หลังสารประกอบที่มีสภาพเป็นกรด ส่วนที่ 2 เรียกว่า par convoluta พบว่าครึ่งหนึ่งของเส้นรอบวงของท่อด้วยต่อมที่หลังเมือกสภาพเป็นกรด และสารประกอบจำพวกโปรตีน อีกครึ่งของเส้นรอบวงพบเซลล์ที่มี cilia ส่วนที่ 3 เรียกว่า par uterina ระหว่างระยะสืบพันธุ์ด้วยเซลล์ที่มี cilia และเซลล์ต่อมที่สร้างสารเมือกที่เป็นกลาง (Masood, 1987; Masood and Nadkarni, 1991)

## อุปกรณ์และวิธีการ

### ตัวอย่างและสถานที่เก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างเขียดงูสุกซัย จากเขาพระแทว อำเภอกลาง จังหวัดภูเก็ต โดยเขียดงูตัวที่ 1-5 เก็บในเดือนกรกฎาคม สิงหาคม และธันวาคม พ.ศ. 2554 เขียดงูตัวที่ 6-8 เก็บเดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2555 เพื่อนำมาศึกษาลักษณะโครงสร้างภายนอกและจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยศึกษาทั้งในเพศผู้และเพศเมีย รวมถึง Mullerian duct ในเพศผู้ และท่อนำไข่ในเพศเมีย

### การเตรียมตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษา

เขียดงูสุกซัยที่จับมาจากเขาพระแทวประกอบด้วยเพศผู้ 3 ตัว (ความยาว  $22.80 \pm 0.88$  เซนติเมตรและน้ำหนัก  $8.45 \pm 0.28$  กรัม) เพศเมีย 5 ตัว (ความยาว  $21.64 \pm 3.93$  เซนติเมตรและน้ำหนัก  $8.52 \pm 3.92$  กรัม) นำมาทำให้สลบด้วยอีเทอร์ (ether) วัดขนาดและชั่งน้ำหนักตัว จากนั้นผ่าทางด้านท้อง (ventral) โดยเริ่มจากช่องเปิดทวารร่วม (cloacal pore) ไปจนถึงส่วนหัว ระหว่างที่ทำการผ่าตัดให้หยด Ringer' solution เพื่อทำให้เนื้อเยื่อยังคงสภาพปกติมากที่สุด ศึกษาลักษณะอวัยวะภายในด้วยตาเปล่า และตัดอวัยวะสืบพันธุ์แช่ในน้ำยาคงสภาพ Bouin's solution เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อหยุดกระบวนการทางเคมีของเซลล์ไม่ให้เกิดการสลายตัว และยังช่วยให้การย้อมสีติดดีมากขึ้น (mordant) หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เพื่อล้างกรดพิคริกที่มีสีเหลือง จนกระทั่งสีเหลืองของน้ำยาคงสภาพจางลงหรือหมดไป แล้วจึงนำมาแช่แอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์

ชิ้นต่อมาตัดอวัยวะให้เป็นชิ้น โดยมีความยาวไม่เกิน 1 เซนติเมตร และมีความหนาไม่เกิน 0.5 เซนติเมตร นำชิ้นเนื้อเข้าเครื่อง automatic tissue processor ซึ่งบรรจุสารเคมีที่ทำหน้าที่ต่างๆ คือ การขจัดน้ำส่วนเกินโดยใช้แอลกอฮอล์จากความเข้มข้นระดับต่ำไปหาระดับความเข้มข้นที่สูง ชิ้นต่อมาคือการขจัดแอลกอฮอล์และทำให้ชิ้นเนื้อใส ซึ่งสารที่ใช้คือไซลีน หลังจากนั้นเป็นการแทรกซึมโดยใช้พาราฟินแทรกเข้าไปในชิ้นเนื้อ โดยกระบวนการต่างๆ จะตั้งโปรแกรมไว้ดังตารางผนวกที่ 1

นำชิ้นเนื้อตัวอย่างที่ผ่านขั้นตอนดังกล่าวมาฝังใน Paraplast<sup>®</sup> ด้วยเครื่อง embedding center วางชิ้นเนื้อให้ด้านที่ต้องการตัดคว่ำหน้าลง รอจนกระทั่ง Paraplast<sup>®</sup> แข็งตัวแล้วจึงนำมาตัดแต่งหน้า บล็อก (trimming) ให้เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูเพื่อให้แถบเนื้อเยื่อแผ่นบางมีรอยหยัก จะได้ทราบขอบเขตของแผ่นเนื้อเยื่อว่าอยู่ระหว่างแต่ละรอยหยัก และควรแต่งหน้าบล็อกให้เหลือพาราฟิน ล้อมรอบชิ้นเนื้ออย่างน้อย 2 มิลลิเมตร หลังจากนั้นนำมาตัดด้วยเครื่อง rotary microtome หน้า 5 ไมโครเมตร นำชิ้นเนื้อเยื่อแผ่นบาง (section) มาติดบนกระจกสไลด์แล้วทำการย้อมสี ดังนี้ Harris's haematoxylin and eosin (H&E) (Luna, 1968) เพื่อดูลักษณะทั่วไปของเนื้อเยื่อ Masson's trichrome (Luna, 1968) เพื่อดู collagen fiber และ Periodic acid Schiff's-haematoxylin (PAS-H) (Bancroft and Gamble, 1996) เพื่อดู glycoprotein

#### 1. วิธีย้อมสี Harris's haematoxylin and eosin นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

- 1.1 ขจัดพาราฟิน (deparaffinization) โดยใช้ xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 1.2 ให้น้ำเข้าเนื้อเยื่อ (hydration) โดยใช้แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ แอลกอฮอล์ 95 % แอลกอฮอล์ 70% และน้ำกลั่นครั้งละ 2 นาที
- 1.3 ย้อมสีครั้งแรกโดยใช้สี Harris's haematoxylin 10 นาที
- 1.4 ล้าง (rinse) ในน้ำประปาที่ไหลจนแผ่นเนื้อเยื่อเป็นสีน้ำเงิน 5-10 นาที
- 1.5 ล้างสีส่วนเกิน (differentiation) ใน acid alcohol, 1% โดยจุ่ม (dip) 3 ครั้ง
- 1.6 แช่ในน้ำประปาที่ไหล 5 นาที
- 1.7 ปรับเนื้อเยื่อให้มีสภาพเป็นกลาง (neutralization) โดยจุ่มใน ammonium water solution 1 นาที
- 1.8 แช่ในน้ำประปาที่ไหล 5 นาที

1.9 ย้อมสีทับ (counterstain) โดย eosin working solution 30 วินาที-1 นาที

1.10 จัดน้ำ (dehydration) โดยใช้แอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง แอลกอฮอล์ 95% 2 ครั้ง และ แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที เพื่อจัดน้ำ

1.11 จัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) โดยใช้ xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

1.12 ปิดกระจกปิดสไลด์ (mounting) ด้วย permount

ผล: นิวเคลียส ย้อมติดสีม่วงน้ำเงินหรือน้ำเงิน

ไซโทพลาซึม ย้อมติดสีชมพูถึงส้มแดง

## 2. วิธีย้อมสี Masson's trichrome นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

2.1 จัดพาราฟิน (deparaffinization) โดยใช้ xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

2.2 เอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (hydration) โดยใช้แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ แอลกอฮอล์ 95% แอลกอฮอล์ 70% และน้ำกลั่นครั้งละ 2 นาที

2.3 ย้อมสีโดยใช้ Weigert's iron haematoxylin นาน 10 นาที

2.4 ล้างด้วยน้ำประปนาน 5 นาที และน้ำกลั่น 5 นาที

2.5 ย้อมด้วย Biebrich scarlet-acid fuchsin นาน 5 นาที

2.6 ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 นาที

2.7 Phosphomolybdic-phosphotungstic acid นาน 10-15 นาที ก่อนย้อม aniline blue (หรือ phosphotungstic acid นาน 15 นาที ก่อนย้อมด้วย light green)

2.8 ย้อมสีโดยใช้สี aniline blue นาน 5 นาที (หรือ light green 1 นาที)

2.9 แช่ใน glacial acetic acid 1 นาที

2.10 ขจัดน้ำ (dehydration) โดยใช้แอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง แอลกอฮอล์ 95% 2 ครั้ง และ แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที เพื่อขจัดน้ำ

2.11 ขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) โดยใช้ xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

2.12 ปิดกระจกปิดสไลด์ (mounting) ด้วย permount

ผล: นิวเคลียส ติดสีดำ

Collagen fiber ติดสีน้ำเงินของ aniline blue

ไซโทพลาซึม keratin และเซลล์กล้ามเนื้อ ติดสีแดง

### 3. วิธีย้อมสี Periodic acid Schiff's-haematoxylin (PAS-H) นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

3.1 ขจัดพาราฟิน (deparaffinization) โดยใช้ xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

3.2 เอน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (hydration) โดยใช้แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ แอลกอฮอล์ 95% แอลกอฮอล์ 70% และน้ำกลั่นครั้งละ 2 นาที

3.3 ออกซิไดซ์ใน 0.5%-1.0% aqueous periodic acid 5 นาที

3.4 แช่ในน้ำกลั่น 5 นาที

3.5 จุ่มลงใน Schiff's reagent 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง (ทำในที่มืด)

3.6 ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำประปา 10 นาที หรือ sulfurous acid 2 นาที และล้างน้ำประปาอีก 5 นาที

3.7 ย้อมสี Harris's haematoxylin 30 วินาที และล้างน้ำประปาอีก 5 นาที

3.8 ขจัดน้ำ (dehydration) โดยใช้แอลกอฮอล์ 70% 1 ครั้ง แอลกอฮอล์ 95% 2 ครั้งและ แอลกอฮอล์สัมบูรณ์ 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที เพื่อขจัดน้ำ

3.9 ขจัดแอลกอฮอล์และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) โดยใช้ xylene 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

3.10 ปิดกระจกปิดสไลด์ (mounting) ด้วย permount

ผล: นิวเคลียส ย้อมติดสีม่วง

ไกล โคโนเจน กระจุกอ่อน colloid, mucin, basement membrane, chitin, hyaline cast, Amyloid, reticular fiber, collagen fiber, matrix, fibrin และ cartilage matrix ย้อมติดสีม่วงแดง

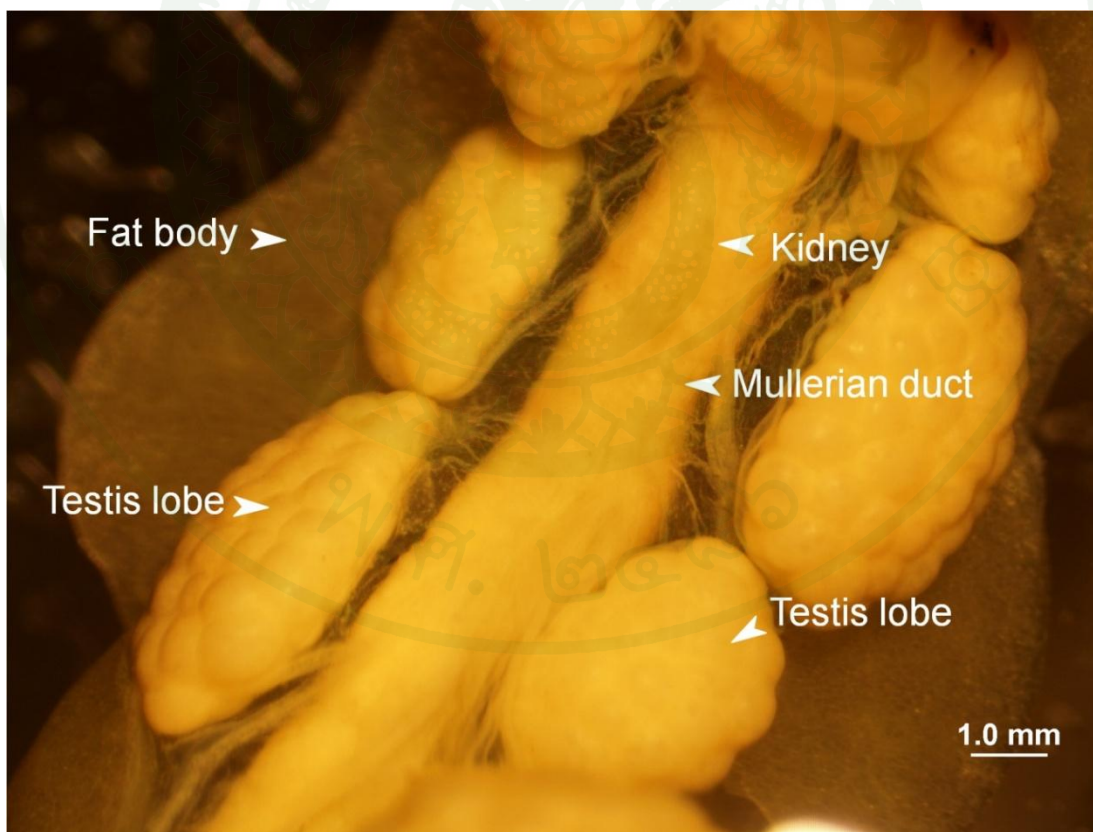
นำสไลด์ที่ย้อมสีแล้วไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope) บันทึกภาพ และวิเคราะห์ผล

## ผลและวิจารณ์

### ผล

#### 1. ศึกษานิวทอยของอวัยวะของเจียคูกุชชัย

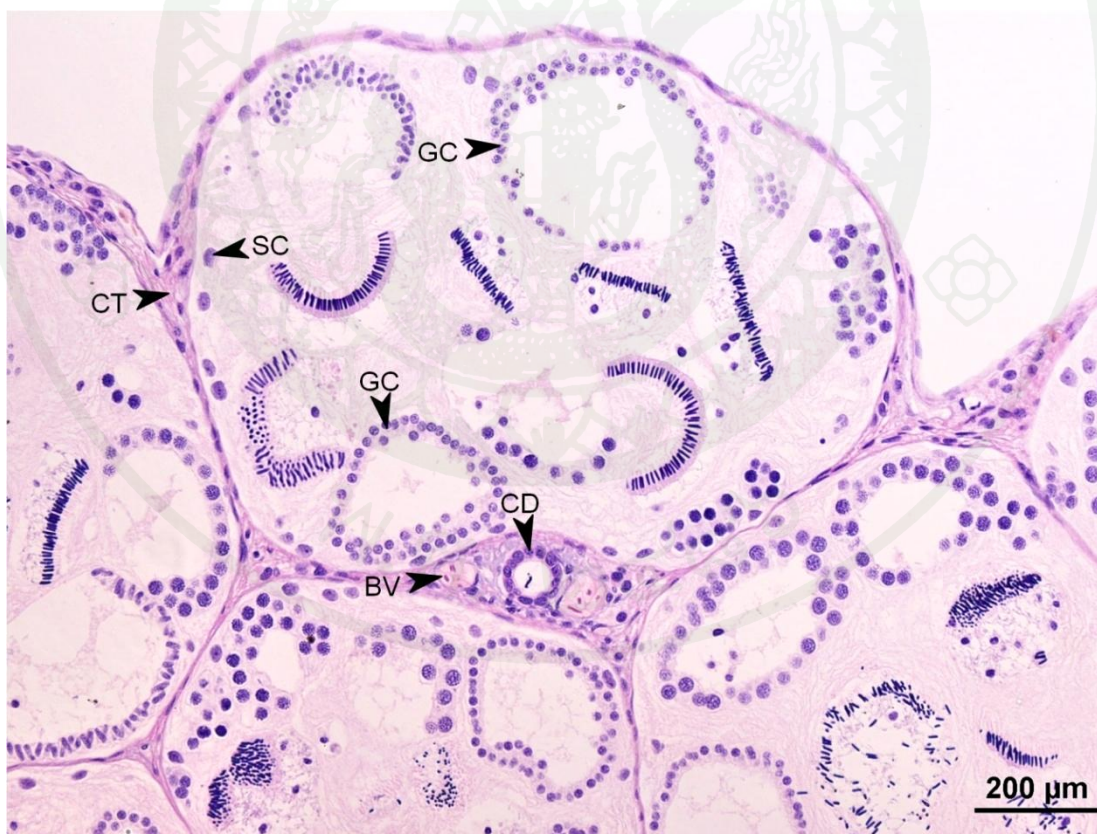
อวัยวะของเจียคูกุชชัยมี 2 ข้าง แต่ละข้างมีจำนวน 6-15 lobe ที่มีขนาดไม่เท่ากัน โดย lobe ที่อยู่ทางด้านหน้า (anterior) มีขนาดเล็กกว่า lobe ที่อยู่ทางด้านท้าย (posterior) และมีสีครีม ทอดยาวเฉียงข้างไปกับทางเดินอาหาร ไต และ fat body เมื่อดูด้วยตาเปล่าพบว่า อวัยวะแต่ละ lobe มีลักษณะคล้ายผลหม่อน (mulberries) ประกอบด้วยพูย่อย (lobule) จำนวนมาก ลักษณะพื้นผิวของอวัยวะพบว่า ทั้งด้าน ventral และด้าน dorsal มีลักษณะนูน (ภาพที่ 1)



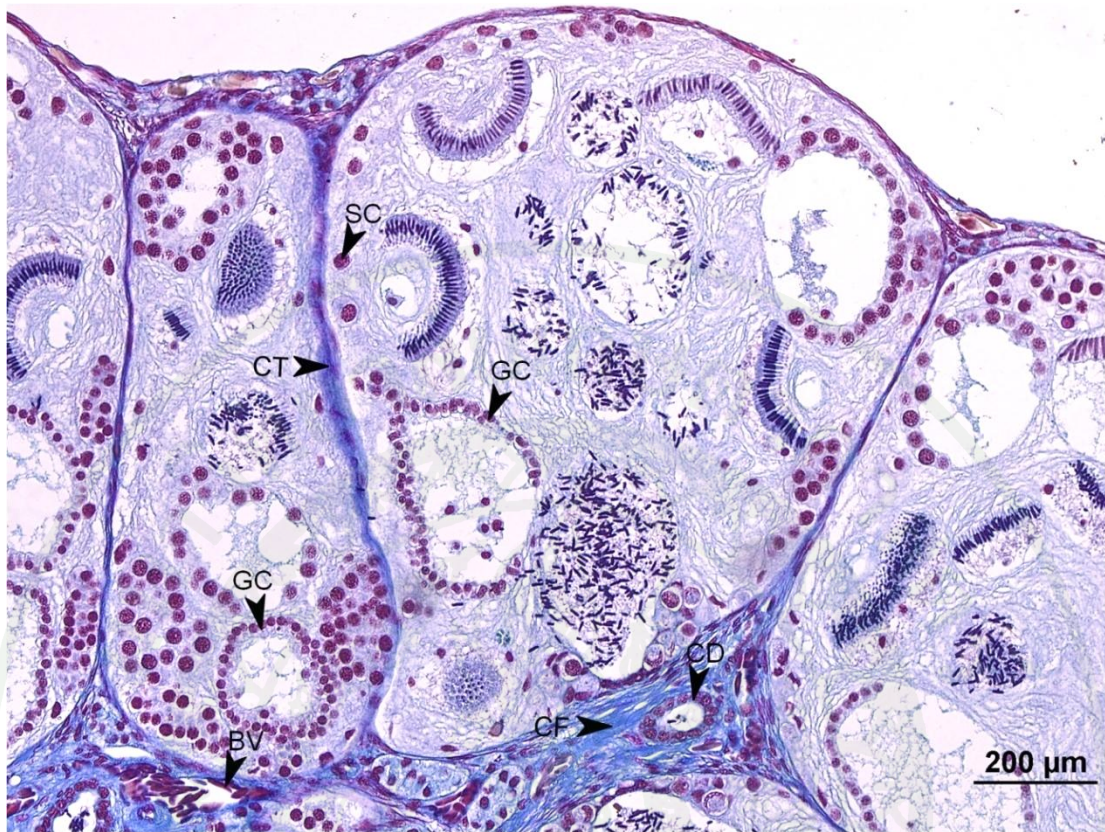
ภาพที่ 1 อวัยวะของเจียคูกุชชัย (หลังจากคงสภาพ) ที่มีลักษณะเป็นพุดคล้ายผลหม่อน

## 2. โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะของเขียดงูสุกซ์

อวัยวะแต่ละ lobe มีเนื้อเยื่อประสานหุ้มล้อมรอบเรียกว่า tunica albuginea มีเนื้อเยื่อผิวหนังเป็นแบบ squamous epithelium ภายในแต่ละ lobe มี lobule ที่มีรูปร่างกลมไปจนถึงหกเหลี่ยมอยู่เป็นจำนวนมากซึ่งมีขนาดแตกต่างกัน (ความกว้าง  $438.8 \pm 1.94$  ไมโครเมตร และความยาว  $574.0 \pm 2.30$  ไมโครเมตร) และแต่ละ lobule มีเนื้อเยื่อประสานหุ้มล้อมรอบ เมื่อย้อมด้วย Masson's trichrome จะติดสีฟ้าของ aniline blue ระหว่าง lobule เป็น interstitial tissue ซึ่งพบ collecting duct และเส้นเลือด ภายใน lobule พบ Sertoli cell อยู่ตรงขอบของ lobule เซลล์ชนิดนี้มีนิวเคลียสและนิวคลีโอลัสล้อมติดสีพวกค่างชัดเจน พบ germ cell ที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเดียวกันอยู่เป็นกลุ่มภายใน germ cyst ซึ่ง germ cell ที่อยู่ในแต่ละ cyst จะเติบโตอยู่ในระยะที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 2, 3)



ภาพที่ 2 อวัยวะของเขียดงูสุกซ์แสดง lobule (BV = blood vessel, CD = collecting duct, CT = connective tissue, GC = germ cyst, SC = Sertoli cell) (H&E)



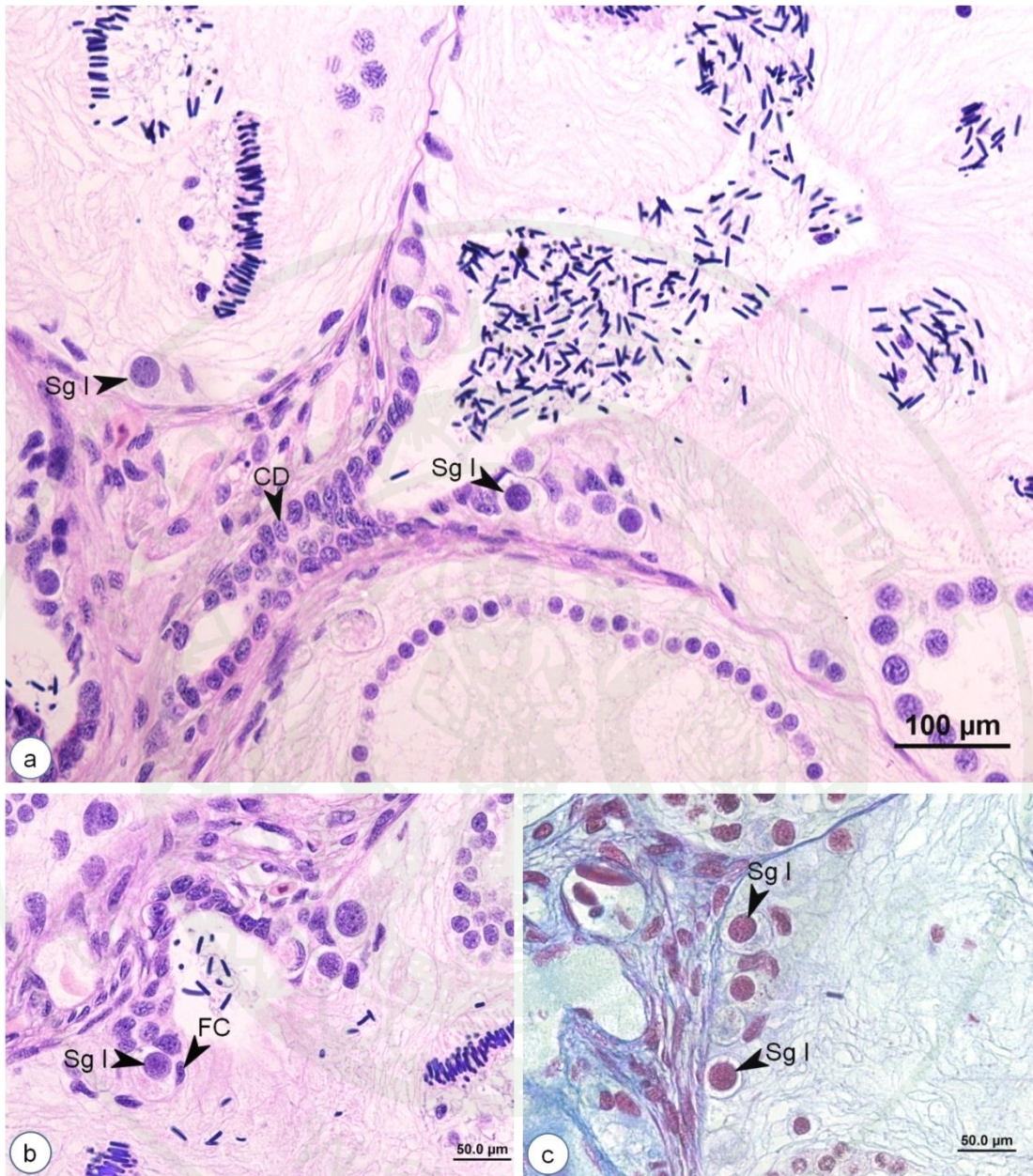
ภาพที่ 3 อันตะของเขียดงูสุกซัยแสดง lobule (BV = blood vessel, CD = collecting duct, CF = collagen fiber, CT = connective tissue, GC = germ cyst, SC = Sertoli cell) (Masson's trichrome)

การจำแนก germ cell ของเขียดงูสุกซัยอาศัยลักษณะการติดสีย้อม ขนาดของเซลล์ การจัดเรียงตัว และรูปร่างของนิวเคลียสเป็นเกณฑ์ในการจำแนก โดยสามารถจำแนกได้ดังนี้

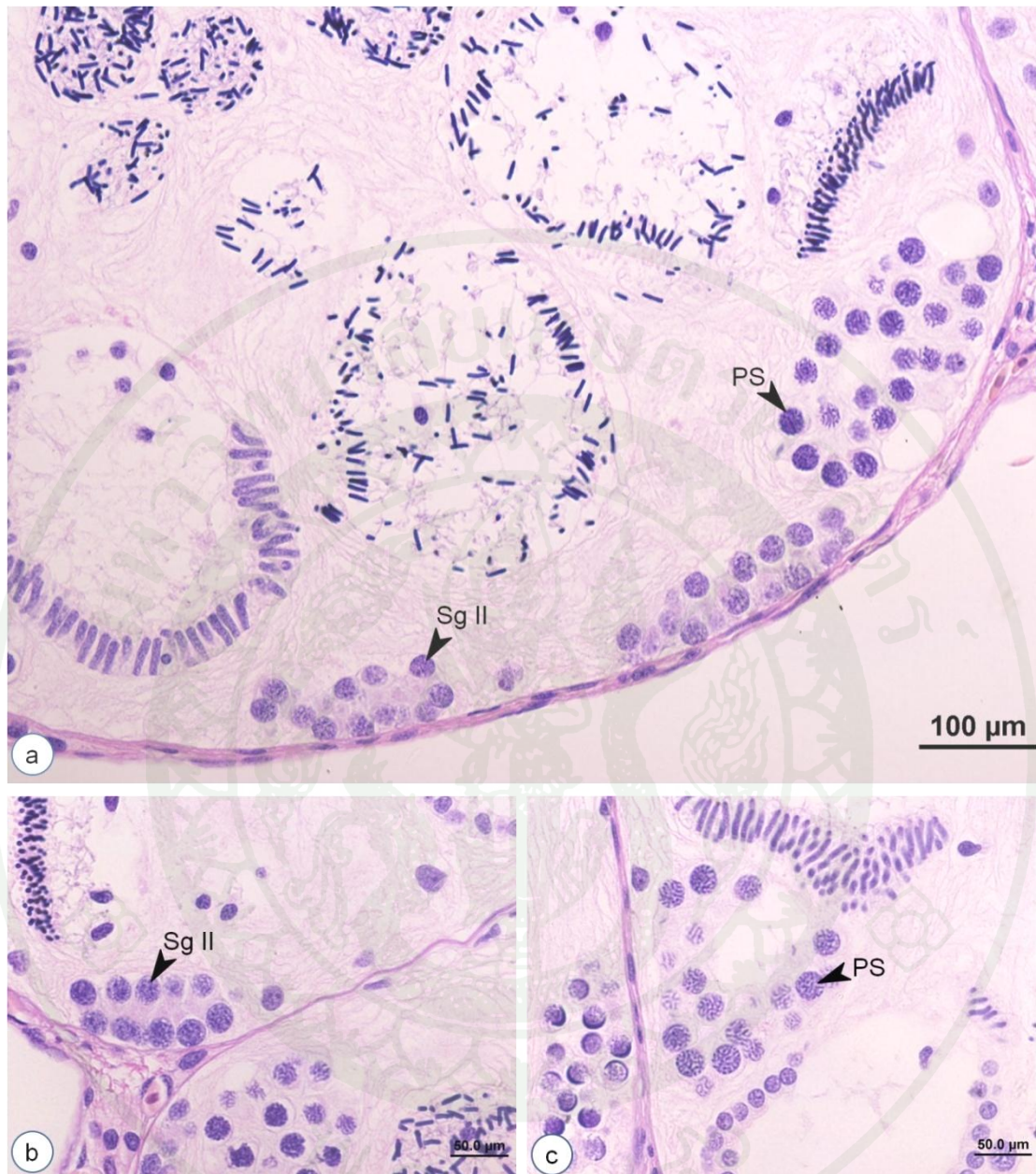
1. Primary spermatogonia เป็นเซลล์ที่มีนิวเคลียสกลมและมีขนาดใหญ่ที่สุด ( $13 \pm 1.69$  ไมโครเมตร) ไซโทพลาซึมติดสีพวกกรด โครมาทินมีลักษณะเป็นเม็ด (granular) primary spermatogonia มี follicle cell ซึ่งมีนิวเคลียสเป็นรูปสี่เหลี่ยมรอบ อาจพบ primary spermatogonia อยู่เดี่ยวๆ หรือพบเป็นกลุ่มอยู่ติดกับผนังของ lobule (ภาพที่ 4c) หรือพบอยู่บริเวณรอยต่อระหว่าง collecting duct กับ lobule (ภาพที่ 4a, b) สามารถแยก primary spermatogonia ออกจาก germ cell ระยะอื่นได้ง่าย

2. Secondary spermatogonia มีนิวเคลียสรูปปร่างกลมเช่นเดียวกับ primary spermatogonia ไซโทพลาซึมล้อมติดสีพวกต่าง เมื่อเปรียบเทียบกับ primary spermatogonia พบว่ามีขนาดเล็กกว่า ( $9.83 \pm 0.65$  ไมโครเมตร) และพบเป็นกลุ่มเล็กๆ จำนวน 2-16 เซลล์อยู่ติดกับผนังของ lobule (ภาพที่ 5a, b)

3. Primary spermatocyte ลักษณะนิวเคลียสเป็นรูปกลม และมีขนาดเล็กกว่า primary spermatogonia ( $11.17 \pm 1.29$  ไมโครเมตร) เส้นใยโครมาทินอยู่กันอย่างหลวม ทำให้สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างจาก germ cell ระยะอื่นๆ ได้ชัดเจนชัด นิวเคลียสล้อมติดสีพวกต่าง และกำลังแบ่งตัวอยู่ในระยะใดระยะหนึ่งของ prophase I ทำให้ระดับการขดรวมกันของเส้นใยโครมาทินแตกต่างกัน ตำแหน่งที่พบ primary spermatocyte มักอยู่ใกล้กับผนังของ lobule (ภาพที่ 5a) และเริ่มมีการเรียงตัวเป็นวงกลมอยู่ภายใน cyst (ภาพที่ 5c)



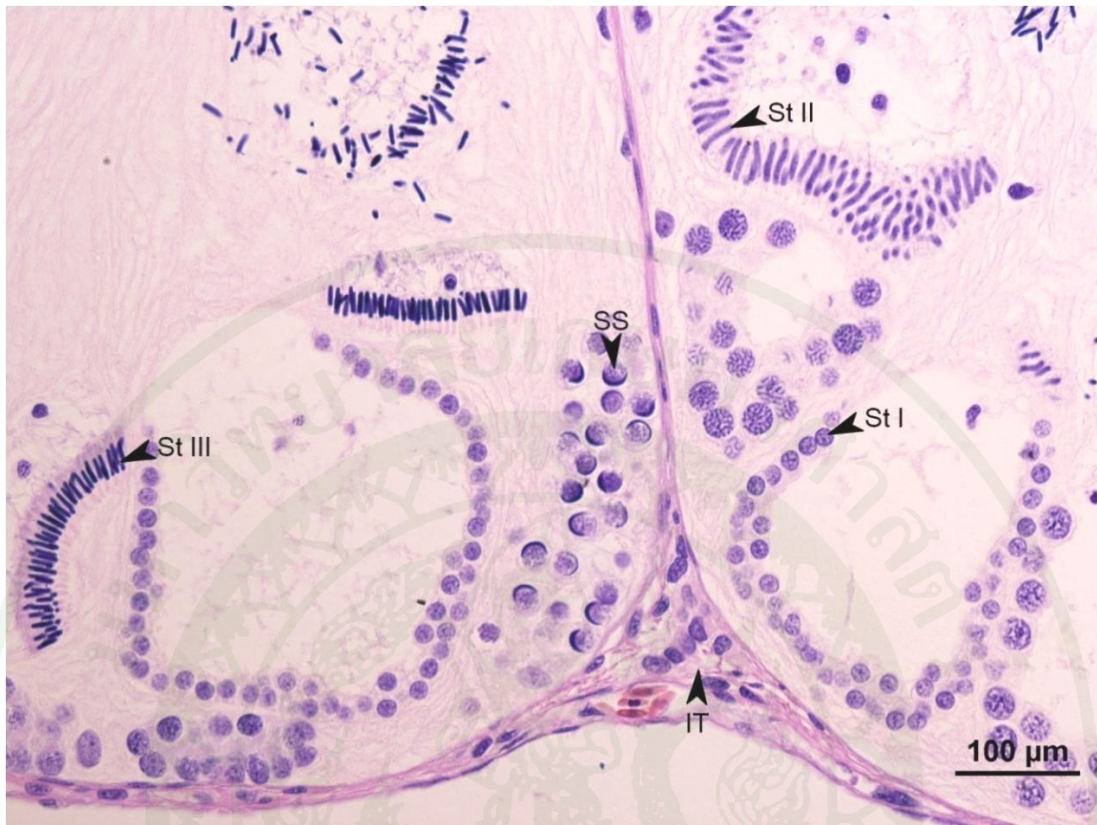
ภาพที่ 4 อวัยวะของเขียดงูสุกซ์แสดง primary spermatogonia (CD = collecting duct, FC = follicle cell, Sg I = primary spermatogonia) a-b (H&E) c (Masson's trichrome)



ภาพที่ 5 อันตะของเขียดงูคูกิชัยแสดง secondary spermatogonia และ primary spermatocyte (PS = primary spermatocyte, Sg II = secondary spermatogonia) (H&E)

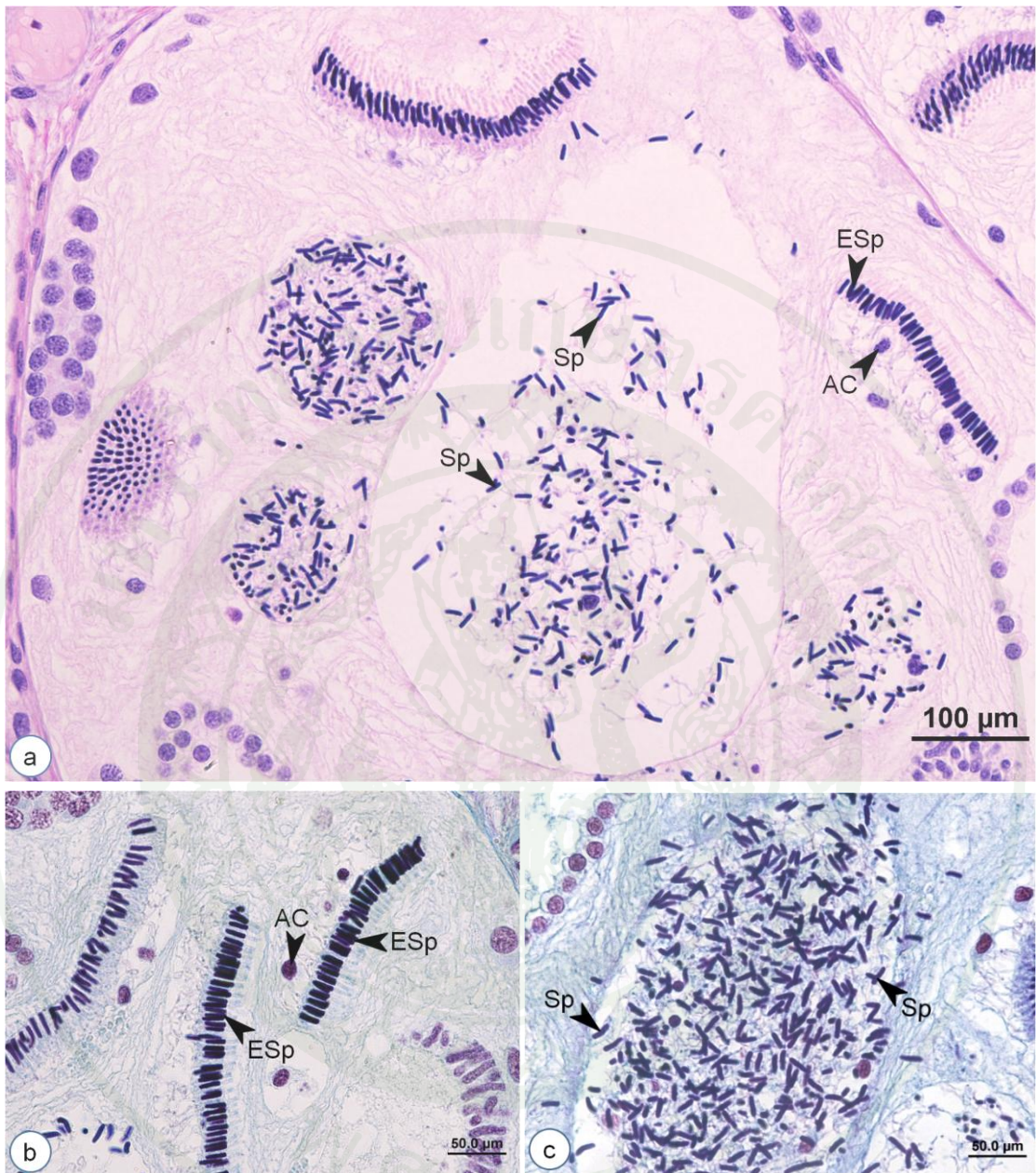
4. Secondary spermatocyte นิวเคลียสมีขนาดเล็กกว่า primary spermatocyte ( $10.5 \pm 1.03$  ไมโครเมตร) มีเส้นใยโครมาทินขดรวมตัวกันแน่นมากกว่า primary spermatocyte และติดสีพวกต่างมากกว่า มักพบว่ามีการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นวงกลมอยู่ภายใน cyst ทำให้ตรงกลางของ cyst เกิดช่องว่าง (ภาพที่ 6, 7a)

5. Spermatid พบว่าภายในนิวเคลียสมีโครมาทินรวมกันแน่นมากกว่า germ cell ระยะเวลาอื่นๆ และสามารถแบ่งได้ 3 ระยะย่อย โดยอาศัยลักษณะการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวได้แก่ spermatid I, spermatid II และ spermatid III ซึ่ง spermatid I มีลักษณะกลม มีขนาดเล็กกว่า secondary spermatocyte ( $6.5 \pm 1.27$  ไมโครเมตร) โครมาทินมีการรวมกันแน่น และพบว่าเซลล์มีการเรียงตัวกันเป็นชั้นเดียวรูปวงกลมอยู่ภายใน cyst (ภาพที่ 6, 7b) ระยะย่อยที่ 2 คือ spermatid II นิวเคลียสเป็นรูปวงรีหรือรูปไข่ ต่อมามีความยาวมากขึ้น (ความกว้าง  $4.83 \pm 0.65$  ไมโครเมตร ความยาว  $10.83 \pm 1.22$  ไมโครเมตร) นิวเคลียสติดสีพวกต่างมากขึ้น มีการเรียงตัวเป็นรูปครึ่งวงกลมอยู่ภายใน cyst (ภาพที่ 6, 7c) ส่วน spermatid III นิวเคลียสมีลักษณะยาวมากขึ้น และเป็นรูปทรงกระบอก (ความกว้าง  $2.5 \pm 0.00$  ไมโครเมตร ความยาว  $11.5 \pm 1.27$  ไมโครเมตร) โครมาทินรวมกันแน่นมาก มีการเรียงตัวกันของเซลล์ในลักษณะโค้งอยู่ภายใน cyst และติดสีพวกต่างเข้มมากขึ้น เมื่อย้อมด้วย Masson's trichrome พบว่า นิวเคลียสติดสีเข้มของ Weigert's iron haematoxylin (ภาพที่ 6, 7d) ภายใน cyst ของ spermatid ยังพบ amoeboid cell อีกด้วย (ภาพที่ 6, 7c, d)

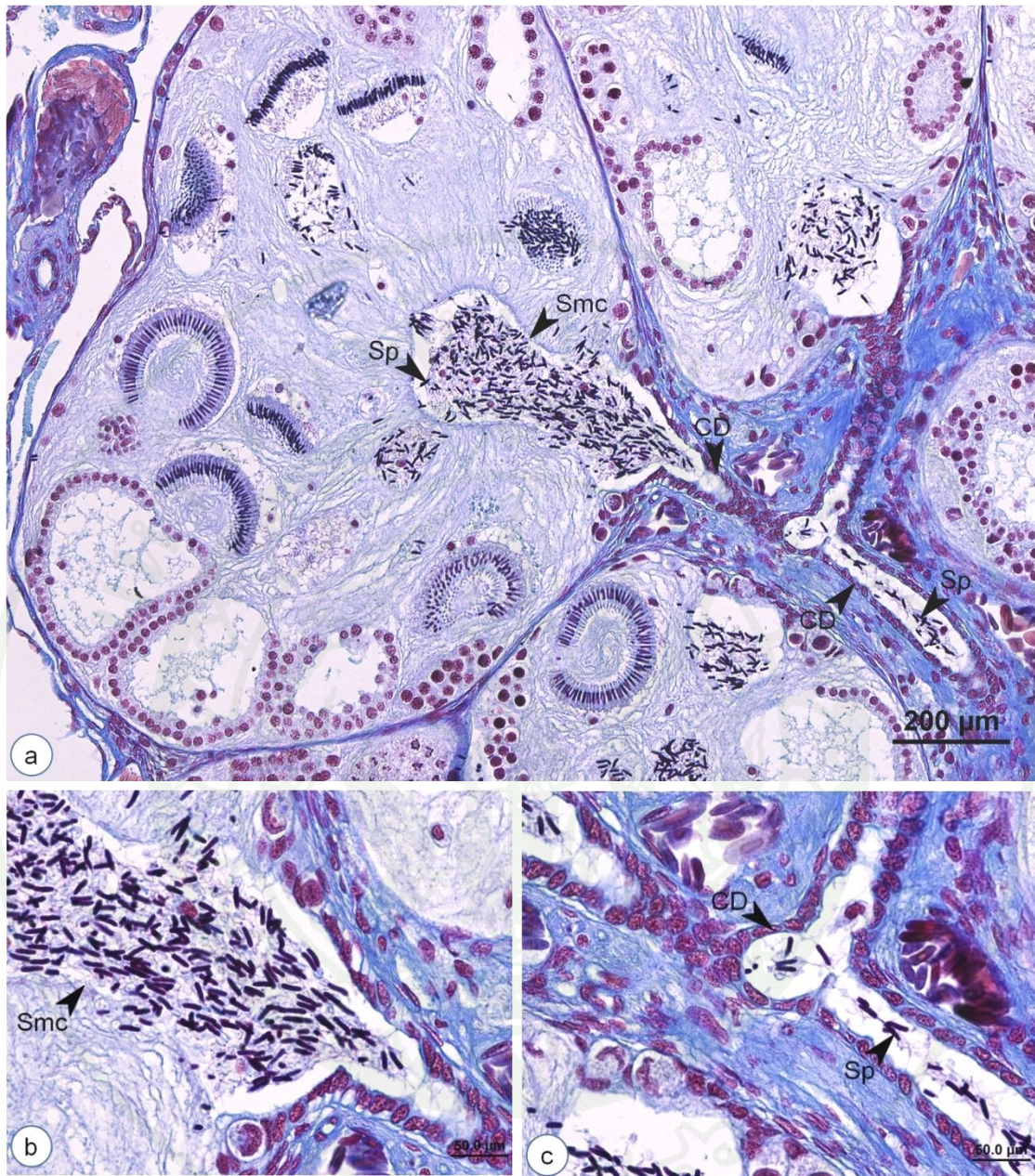


ภาพที่ 6 อวัยวะของเขียดงูคูกุชชัย แสดง lobule (IT = interstitial tissue, SS = secondary spermatocyte, St I = spermatid I, St II = spermatid II, St III = spermatid III) (H&E)





ภาพที่ 8 อันฑะของเขียดงูคูกัย แสดง lobule (AC = amoeboid cell, ES = early spermatozoa, Sp = spermatozoa) a (H&E) b-c (Masson's trichrome)



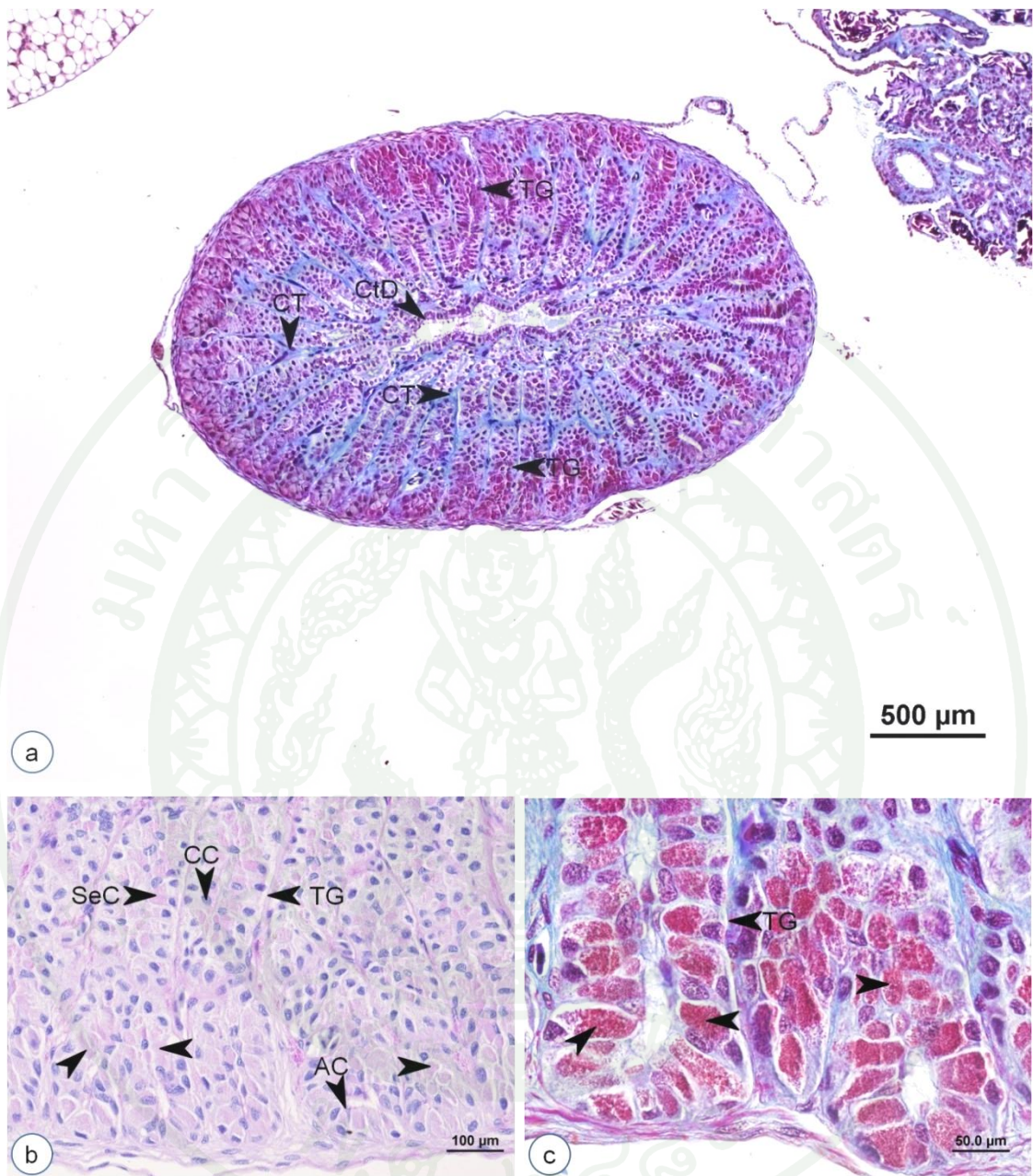
ภาพที่ 9 อวัยวะของเขียดงูศุกซ์ แสดง lobule (CD = collecting duct, Smc = spermiating cyst, Sp = spermatozoa) (Masson's trichrome)

### 3. สัณฐานวิทยาของ Mullerian duct ของเขียดงูสุกซัย

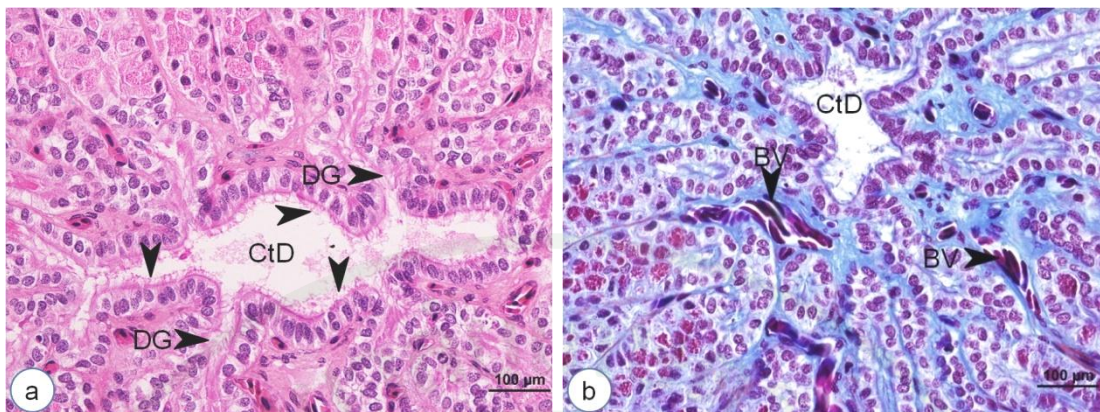
Mullerian duct ของเขียดงูสุกซัยเป็นท่อคู่ทอดยาวเคียงข้างไปกับไต อัมทะ และ fat body โดยที่ Mullerian duct นั้นอยู่ด้านนอกของไต มีสีขาว (ภาพที่ 1) ส่วนปลายของ Mullerian duct เปิดเข้าสู่ทวารร่วม (cloaca) ร่วมกันกับท่อที่มาจากระบบขับถ่ายปัสสาวะ

### 4. โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของ Mullerian duct ของเขียดงูสุกซัย

Mullerian duct ของเขียดงูสุกซัยมีลักษณะของเนื้อเยื่อที่เหมือนกันตลอดทั้งท่อคือ มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็น โครงสร้างที่เป็นต่อมเรียกว่า Mullerian gland ซึ่งประกอบด้วย simple tubular gland จำนวนมากที่จัดเรียงตัวอยู่รอบๆ central duct (ภาพที่ 10a) โดย tubular gland บริเวณใกล้เคียงกันจะเปิดสู่ท่อร่วมเดียวกันที่เรียกว่า duct of gland จากนั้นจึงเปิดเข้าสู่ central duct (ภาพที่ 11a) ระหว่าง tubular gland มีเนื้อเยื่อประสานกัน เมื่อย้อมด้วย Masson's trichrome จะติดสีน้ำเงิน ของ aniline blue (ภาพที่ 10a) และมีเส้นเลือดแทรกอยู่ด้วย (ภาพที่ 11b) ภายใน tubular gland พบว่ามี เซลล์ 3 ชนิด คือ secretory cell ที่สร้าง granule ที่ย้อมติดสี PAS-H และ Masson's trichrome มีรูปร่างแบบ tall columnar (ภาพที่ 10b, c) ส่วน ciliated cell ไม่มี granule และมีขนาดเล็กกว่า secretory cell สำหรับ amoeboid cell พบแทรกอยู่ระหว่าง secretory cell ที่อยู่ตรงส่วนฐานของ tubular gland (ภาพที่ 10b) เนื้อเยื่อบุผิวของ central duct เป็นแบบ simple low columnar epithelium เซลล์มีนิวเคลียสอยู่ตรงกลาง และมี cilia ยื่นเข้าไปในช่องว่างของท่อ (ภาพที่ 11a) เนื้อเยื่อประสานบริเวณใกล้กับ duct of gland พบว่ามีเส้นเลือดแทรกอยู่เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 11b)



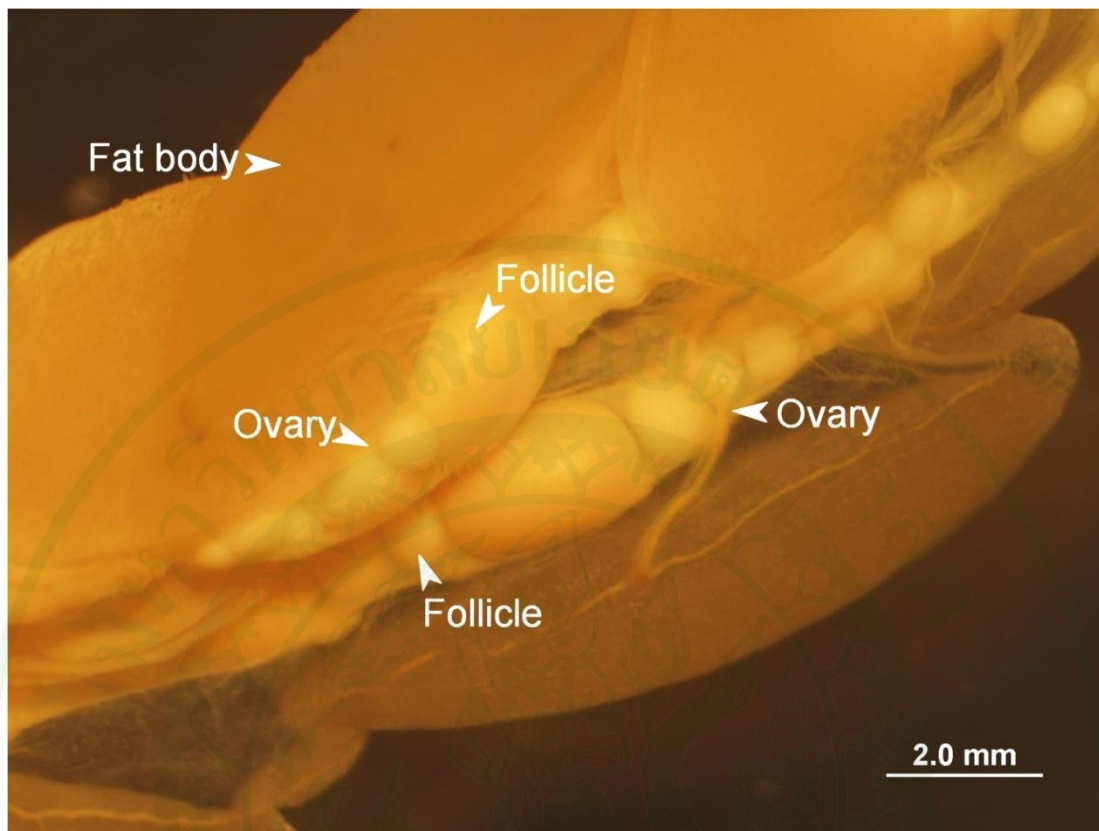
ภาพที่ 10 Mullerian duct ของเหี้ยดงคูกุ๊กซี่ (AC = amoeboid cell, CC = ciliated cell, CT = connective tissue, CtD = central duct, SeC = secretory cell, TG = tubular gland, หัวลูกศร = granule) a,c (Masson's trichrome) b (PAS-H)



ภาพที่ 11 Mullerian duct ของเจี๊ยดงสุกซัย (BV = blood vessel, CtD = central duct, DG = duct of gland, หัวตุ๊กศร = cilia) a (H&E) b (Masson's trichrome)

#### 5. สัณฐานวิทยาของรังไข่ของเจี๊ยดงสุกซัย

รังไข่ของเจี๊ยดงสุกซัยมี 1 คู่ ลักษณะคล้ายถุง รูปร่างยาวเคียงข้างไปกับไต fat body ท่อนำไข่ และระบบทางเดินอาหาร ภายในรังไข่พบว่ามี follicle จำนวนมากที่กำลังเจริญ และมีขนาดแตกต่างกันเรียงตัวกันตามยาว ทั้งรังไข่และฟอลลิเคิลมีสีขาว-เหลือง (ภาพที่ 12)



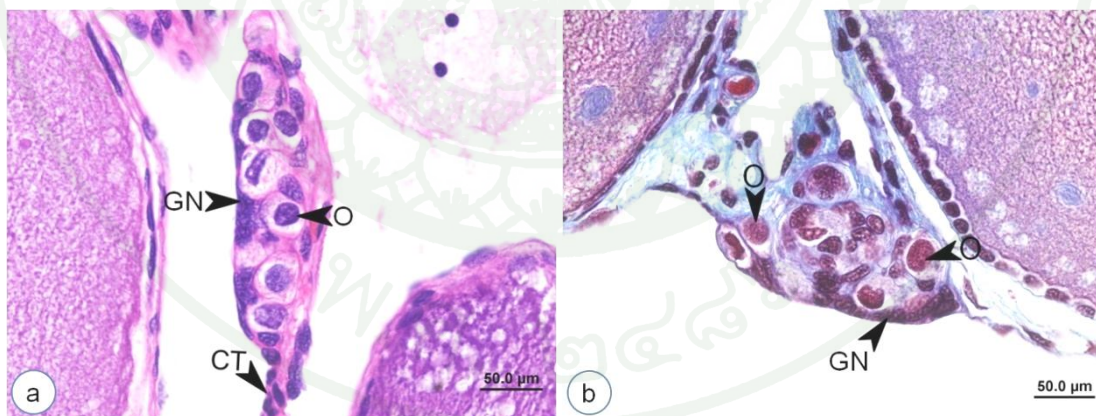
ภาพที่ 12 รังไข่ของเขียดงูสุกซัย (หลังจากคงสภาพ) แสดง follicle และ fat body

#### 6. โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของรังไข่ของเขียดงูสุกซัย

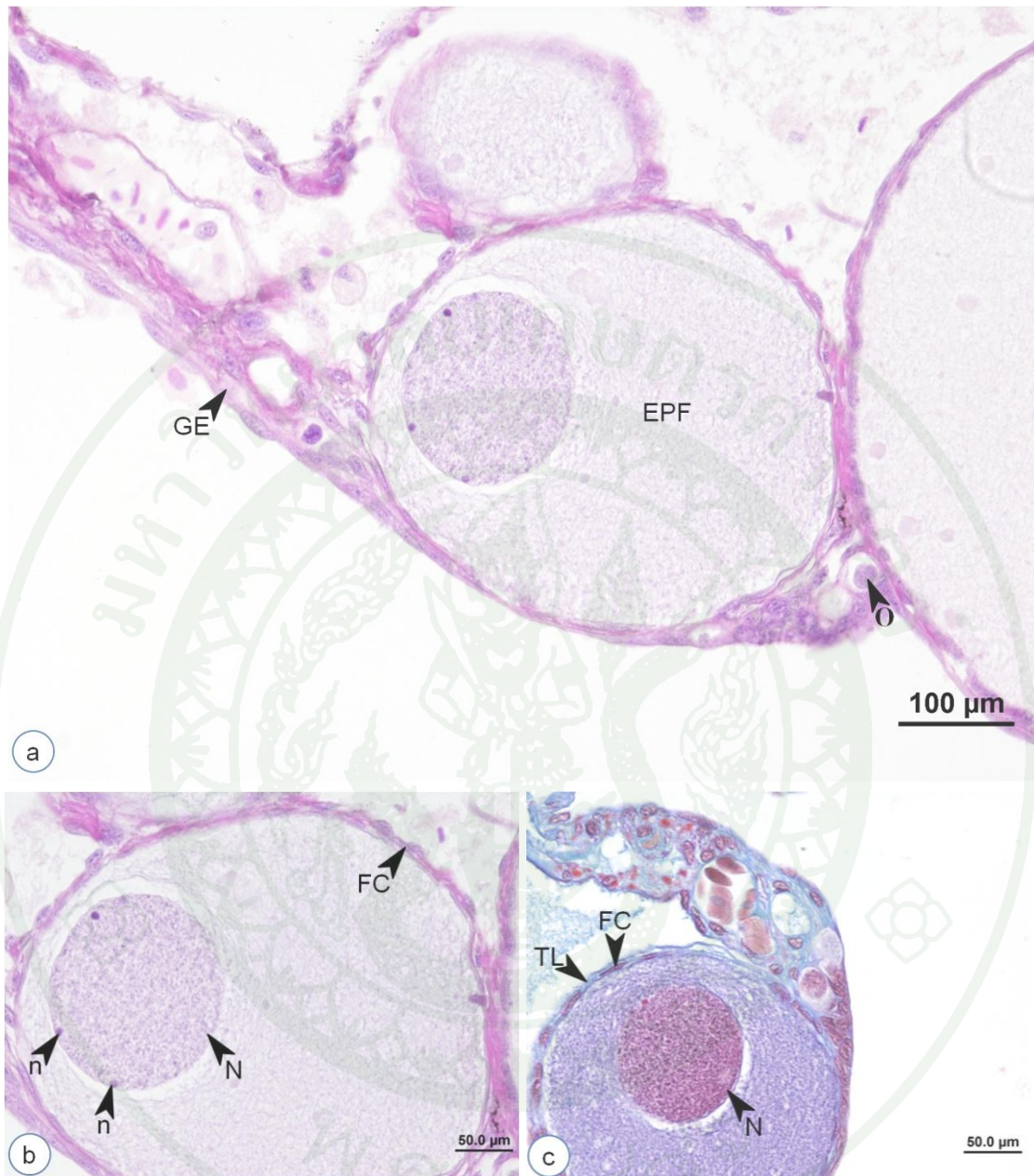
การศึกษาลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของรังไข่ พบว่า รังไข่มีเนื้อเยื่อประสานบางๆ ล้อมรอบ และยังมีเนื้อเยื่อประสานเชื่อมระหว่างรังไข่กับไต และระหว่างรังไข่กับ fat body ภายในรังไข่ทั้ง 2 ข้างประกอบด้วย follicle ประมาณ 80-140 follicle แต่ละ follicle เชื่อมต่อกันด้วยเนื้อประสานซึ่งมีเส้นเลือดแทรกอยู่ หลักเกณฑ์ในการแบ่งระยะการเจริญของ follicle โดยการสังเกตจากขนาด การติดสีของเซลล์ไข่ การพัฒนาของ zona pellucida ชั้น follicular และการพัฒนาของ yolk granule ซึ่งสามารถแบ่งระยะการเจริญของ follicle ออกเป็น oogonia, previtellogenic follicle (early previtellogenic follicle และ late previtellogenic follicle), vitellogenic follicle (early vitellogenic follicle และ late vitellogenic follicle) และ atretic follicle

ระยะ oogonia เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุด อยู่รวมกันเป็นกลุ่มภายใน germinal nest ซึ่งพบอยู่บริเวณสายของเนื้อเยื่อประสานที่เชื่อมระหว่าง follicle แต่ละอัน นิวเคลียสมีเพียง 1 นิวคลีโอลัส ไซโทพลาซึมล้อมติดสีพวกด่าง และพบ oogonia ตลอดความยาวของรังไข่ (ภาพที่ 13a, b)

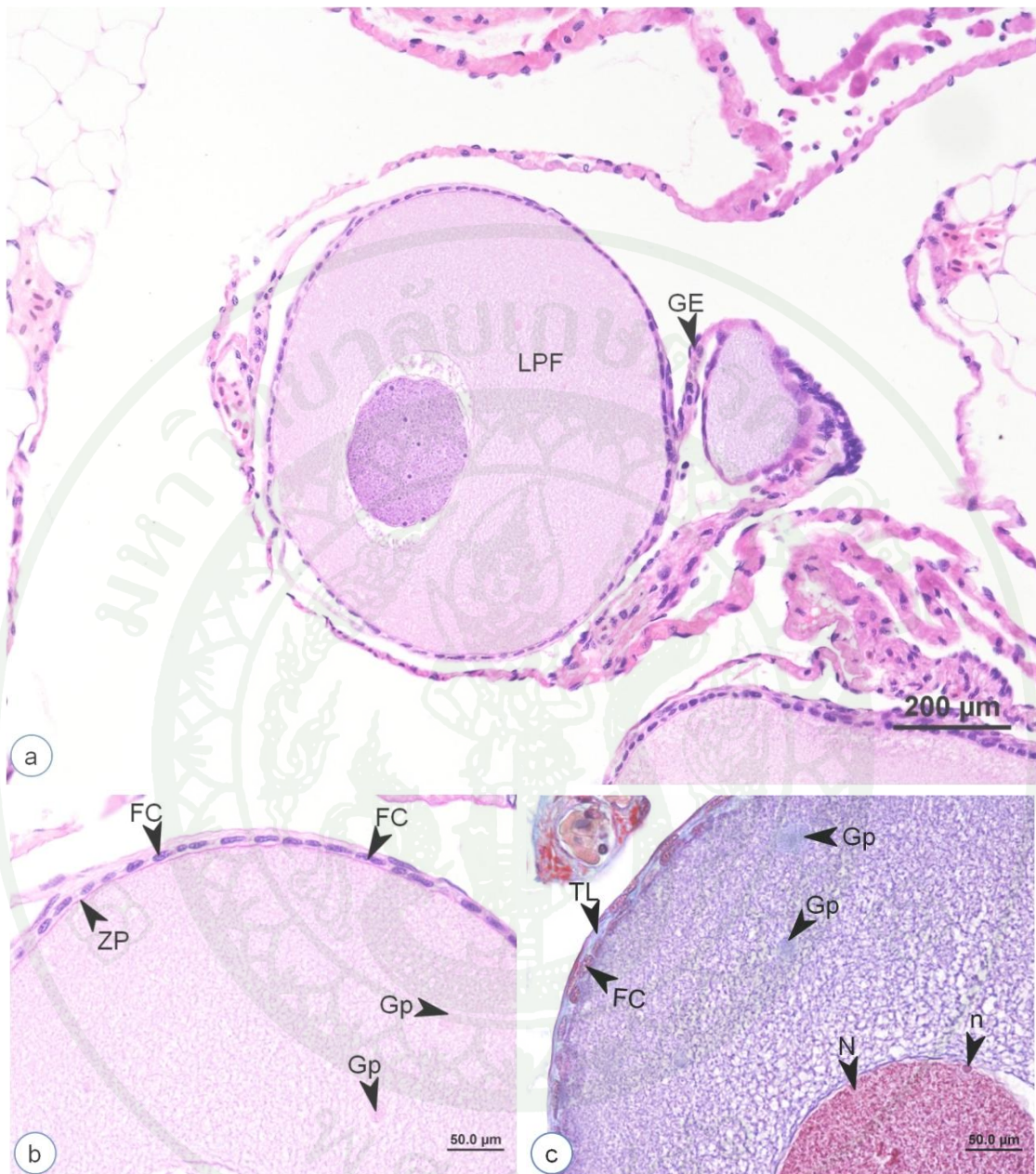
ระยะ previtellogenic follicle ในระยะนี้แบ่งเป็น 2 ระยะย่อยคือ early previtellogenic follicle และ late previtellogenic follicle โดยที่ทั้ง 2 ระยะย่อย oocyte จะมีขนาดใหญ่มากขึ้น และใหญ่กว่า oogonia ระยะ early previtellogenic follicle ล้อมรอบด้วยชั้น follicular ซึ่งเป็นเซลล์รูปแบนชั้นเดียว (simple squamous epithelium) เรียงกันแบบไม่ต่อเนื่องติดกับผนังของ oocyte (ภาพที่ 14a, b, c) และปรากฏชั้น theca บางๆ ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อประสานที่ย้อมติดสีฟ้าของ aniline blue (ภาพที่ 14c) นิวเคลียสมีลักษณะกลมล้อมติดสีด่างและมีหลายนิวคลีโอลัส (ภาพที่ 14a, b) แต่ late previtellogenic follicle นั้นพบว่ามีความใหญ่กว่า early previtellogenic follicle (ภาพที่ 15a) และชั้น follicular เป็นเซลล์แบบ low cuboidal เรียงกันชั้นเดียวแบบต่อเนื่อง (ภาพที่ 15b, c) นิวเคลียสมีลักษณะกลมล้อมติดสีพวกด่างและมีหลายนิวคลีโอลัส บาง follicle เริ่มปรากฏ zona pellucida ระหว่าง oocyte กับชั้น follicular (ภาพที่ 15b) และเมื่อย้อมด้วย Masson's trichrome พบว่าภายในไซโทพลาซึมของ oocyte นั้น ย้อมติดสีฟ้า-น้ำเงินของ aniline blue (ภาพที่ 15c) และติดสี PAS-H



ภาพที่ 13 รังไข่ของเป็ดงูสกุลงูขี้แอมแสดง germinal nest (CT = connective tissue, GN = germinal nest, O = oogonia) a (H&E) b (Masson's trichrome)



ภาพที่ 14 follicle ระยะ early previtellogenic follicle (EPF) (FC = follicle cell, GE = germinal epithelium, N = nucleus, n = nucleolus, TL = theca layer) a-b (H&E) c (Masson's trichrome)

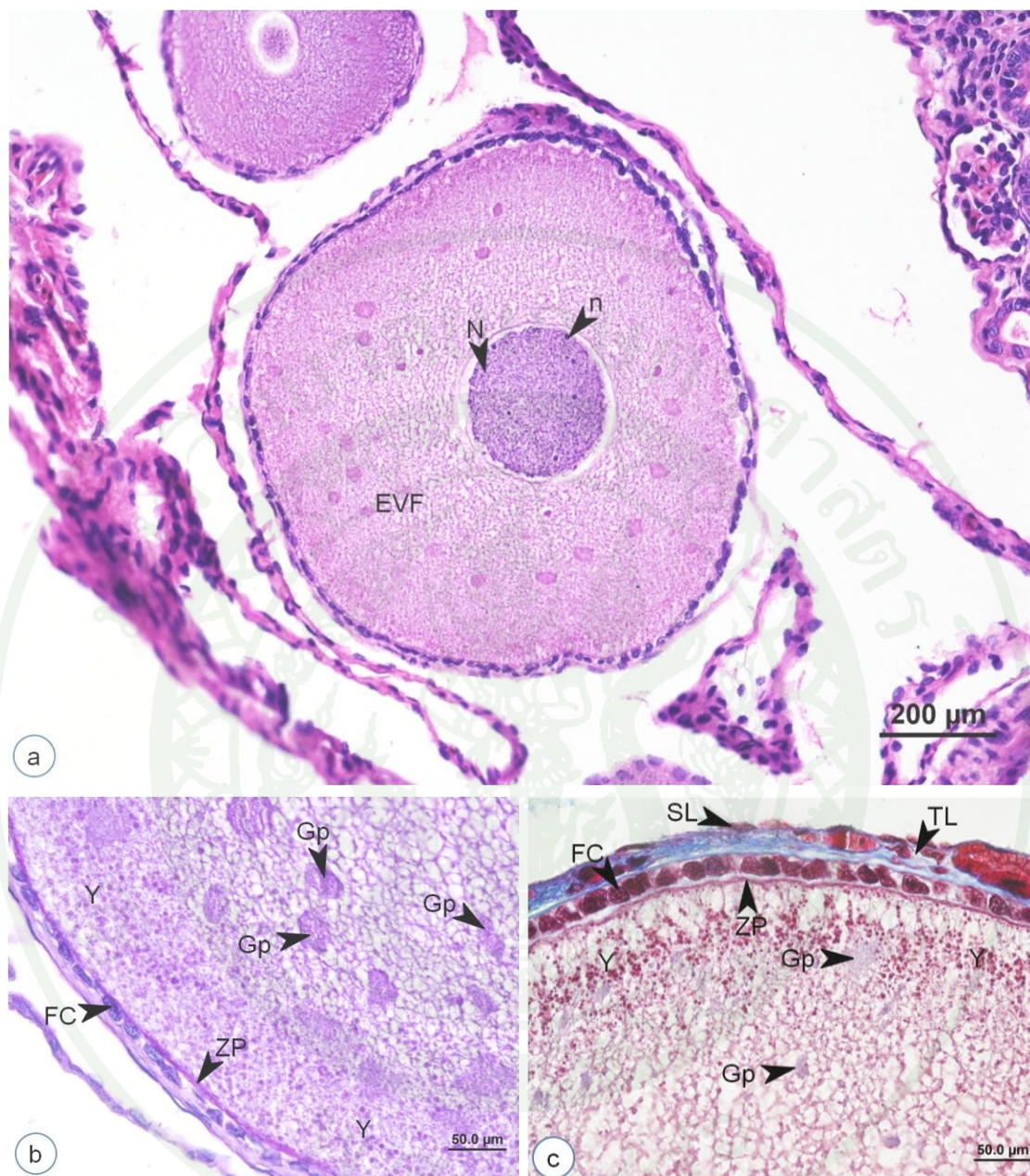


**ภาพที่ 15** follicle ระยะ late previtellogenic follicle (LPF) (FC = follicle cell, GE = germinal epithelium, Gp = glycoprotein, N = nucleus, n = nucleolus, TL = theca layer, ZP = zona pellucida) a-b (H&E) c (Masson's trichrome)

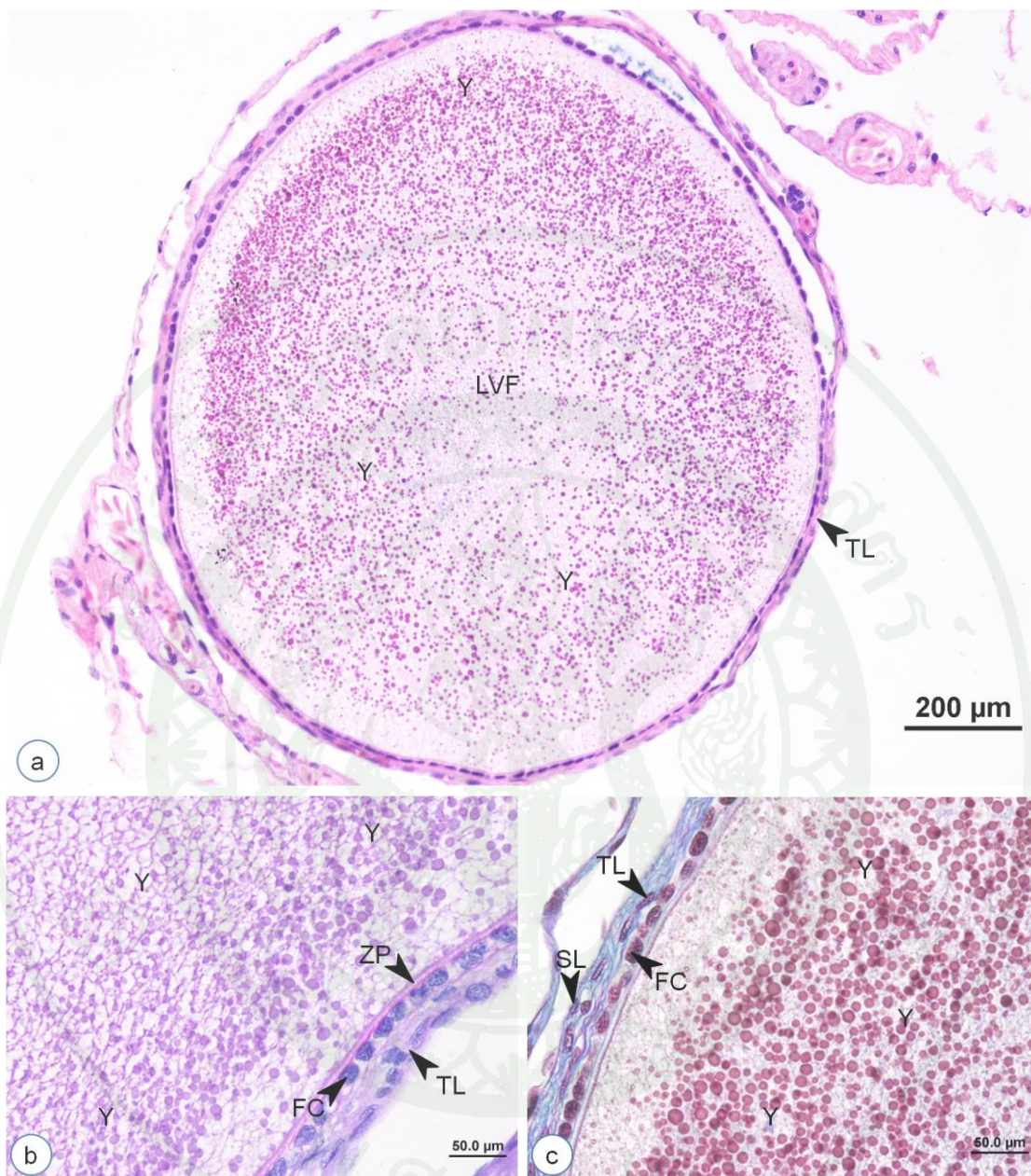
ระยะ vitellogenic follicle สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระยะย่อย คือ early vitellogenic follicle (ภาพที่ 16a) และ late vitellogenic follicle (ภาพที่ 17a) โดยที่ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ early vitellogenic follicle นั้นบริเวณชั้น follicular มี follicle cell เป็นรูปลูกบาศก์เรียงกันชั้นเดียว (simple

low cuboidal epithelium) แบบต่อเนื่อง (ภาพที่ 16b, c) นิวเคลียสมีลักษณะกลมล้อมด้วยเยื่อหุ้มเซลล์พลาสมา และมีนิวคลีโอลัสหลายอัน (ภาพที่ 16a) และไซโทพลาซึมของ oocyte เริ่มปรากฏ yolk granule ขนาดเล็กที่บริเวณใกล้กับผนังของ oocyte ซึ่งล้อมด้วยเยื่อหุ้มเซลล์พลาสมา เมื่อย้อมด้วย PAS-H ระหว่าง oocyte กับชั้น follicular เห็นชั้น zona pellucida ปรากฏชัดเจนมากขึ้น ซึ่งชั้น zona pellucida ล้อมด้วยเยื่อหุ้มเซลล์พลาสมา เมื่อย้อมด้วย PAS-H (ภาพที่ 16b) ภายในไซโทพลาซึมของ oocyte นั้น เยื่อหุ้มเซลล์พลาสมา-น้ำเงินของสี aniline blue เมื่อย้อมด้วย Masson's trichrome ชั้น theca มีความหนาเพิ่มขึ้น และมีชั้น surface อยู่รอบนอกสุด ซึ่งจะล้อมรอบ follicle ไว้ (ภาพที่ 16c)

ระยะ early vitellogenic follicle จะมีการพัฒนาเป็นระยะ late vitellogenic follicle ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุด ลักษณะของชั้น follicular จะมี follicle cell เป็นรูปลูกบาศก์เรียงกันอยู่ชั้นเดียว (simple cuboidal epithelium) แบบต่อเนื่อง (ภาพที่ 17b, c) yolk granule มีขนาดใหญ่เพิ่มขึ้นและกระจายอยู่ภายในไซโทพลาซึมของ oocyte มากขึ้น และต่อมาจะกระจายทั่วทุกบริเวณ (ภาพที่ 17a) ซึ่ง yolk granule ที่มีขนาดใหญ่เหล่านี้จะล้อมด้วยเยื่อหุ้มเซลล์พลาสมา เข้มมากกว่า yolk granule ที่มีขนาดเล็ก ชั้น zona pellucida ล้อมด้วยเยื่อหุ้มเซลล์พลาสมาอย่างชัดเจน (ภาพที่ 17b) พบชั้น theca ที่เป็นเนื้อเยื่อประสาน ซึ่งไม่สามารถแยกเป็นชั้นในและชั้นนอกได้ และมีชั้น surface อยู่รอบนอกสุด (ภาพที่ 17c)



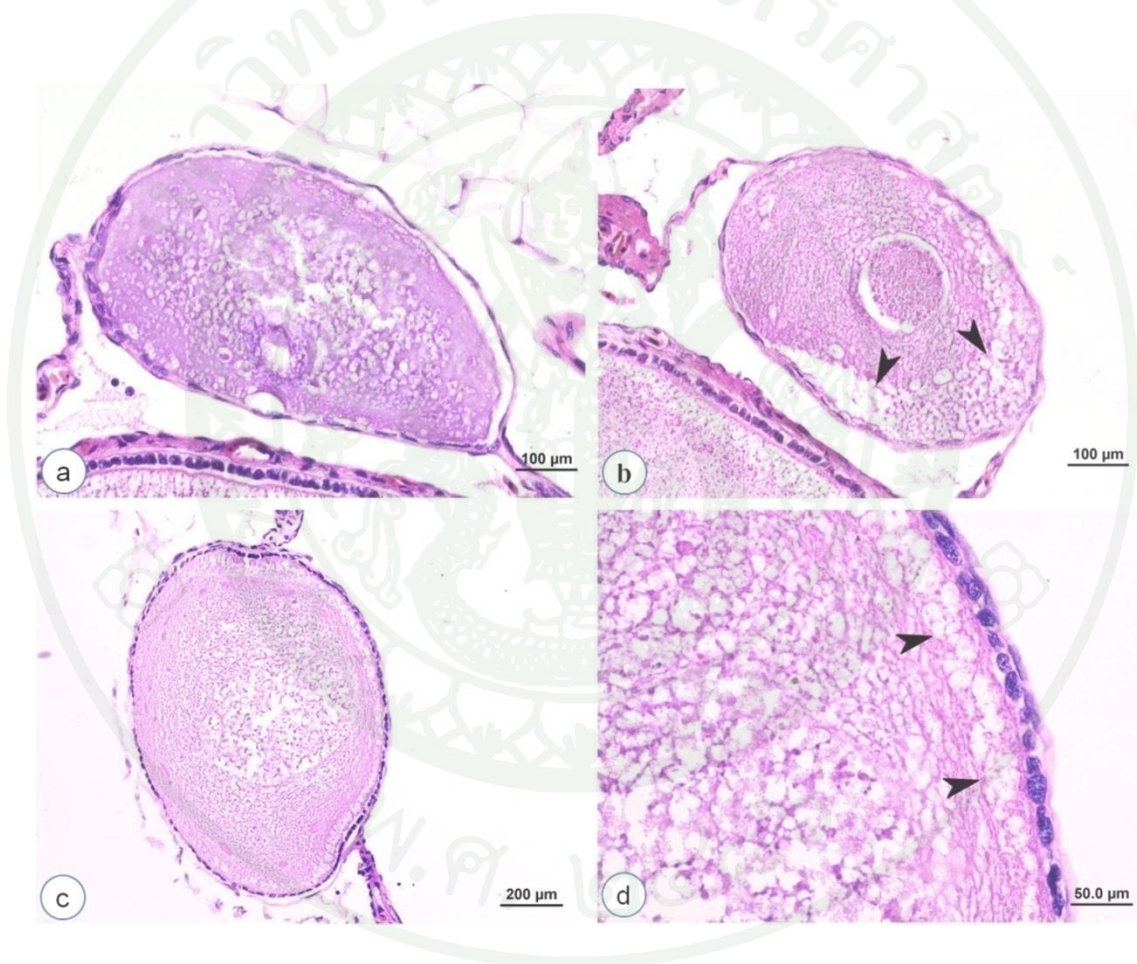
ภาพที่ 16 follicle ระยะ early vitellogenic follicle (EVF) (FC = follicle cell, Gp = glycoprotein, N = nucleus, n = nucleolus, SL = surface layer, TL = theca layer, Y = yolk, ZP = zona pellucida) a (H&E) b (PAS-H) c (Masson's trichrome)



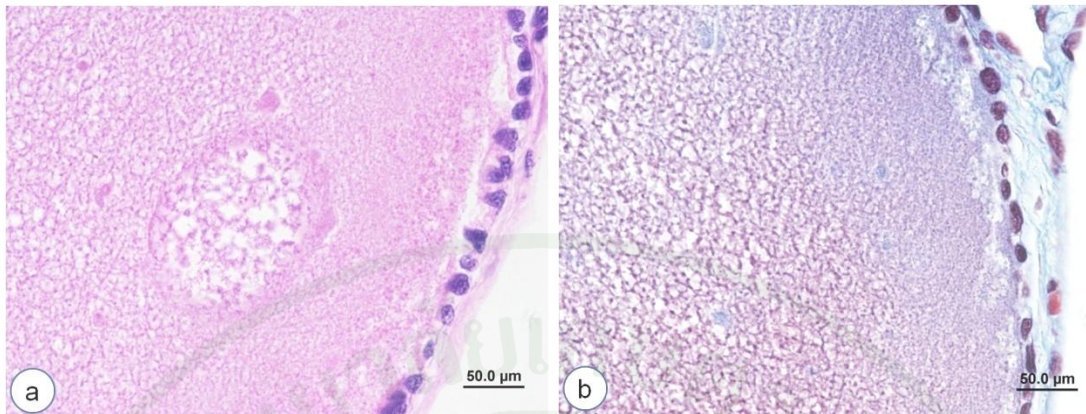
**ภาพที่ 17** follicle ระยะ late vitellogenic follicle (LVF) (FC = follicle cell, SL = surface layer, TL = theca layer, Y = yolk, ZP = zona pellucida) a (H&E) b (PAS-H) c (Masson's trichrome)

ในรังไข่ยังพบ atretic follicle ซึ่งจะพบได้ทุกระยะของการเจริญ ได้แก่ atresia ของ early previtellogenic follicle (ภาพที่ 18a, b) atresia ของ late previtellogenic follicle (ภาพที่ 18c, d) atresia ของ early vitellogenic follicle (ภาพที่ 19a, b) และ atresia ของ late vitellogenic follicle

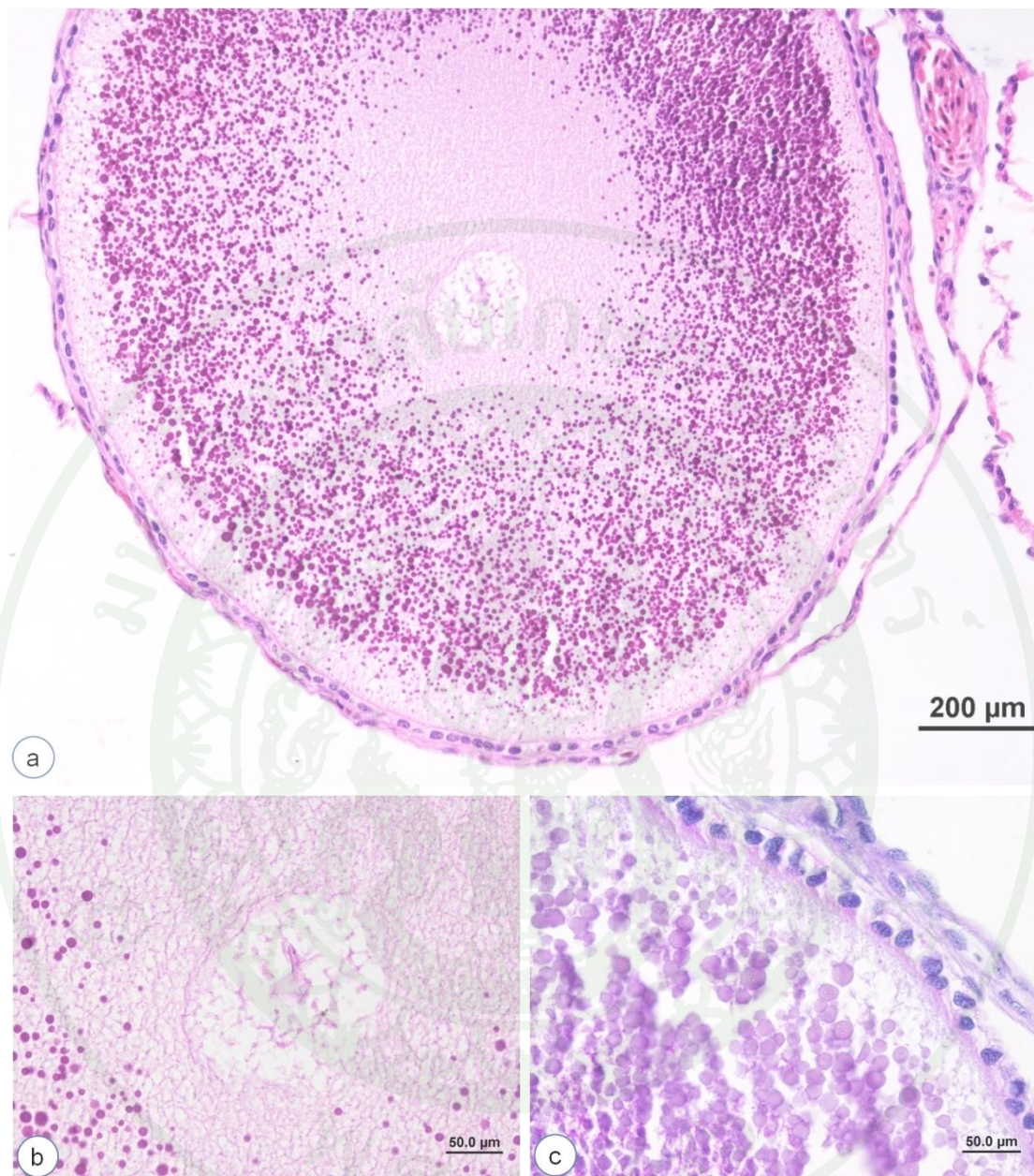
(ภาพที่ 20a, b, c) โดย atretic follicle มีลักษณะดังนี้ นิวเคลียสเกิดการหดตัว และต่อมาสลายตัวจนเหลือเพียงร่องรอย ซึ่งพบในทุกระยะ (ภาพที่ 18a, b, c) (ภาพที่ 19a) (ภาพที่ 20a, b) ไซโทพลาซึมหดตัว และแยกออกจากผนังของ oocyte ทำให้เกิดช่องว่างขึ้นในระยะ early previtellogenic follicle และ late previtellogenic follicle (ภาพที่ 18b, d) หรือไซโทพลาซึมของ oocyte เกิดการหดตัวแยกออกจากชั้น zona pellucida หรือชั้น zona pellucida สลาย (ภาพที่ 19a, b) (ภาพที่ 20c) และชั้น follicular อาจพบว่า มีการเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ (ภาพที่ 19a, b) นอกจากนี้ yolk granule มีการรวมกลุ่มกัน ในระยะ early vitellogenic follicle และ late vitellogenic follicle (ภาพที่ 20c)



**ภาพที่ 18** atretic follicle (a-b = atresia ของ early previtellogenic follicle, c-d = atresia ของ late previtellogenic follicle (หัวลูกศร = ไซโทพลาซึมที่แยกตัวออกจากผนังของ oocyte) (H&E)



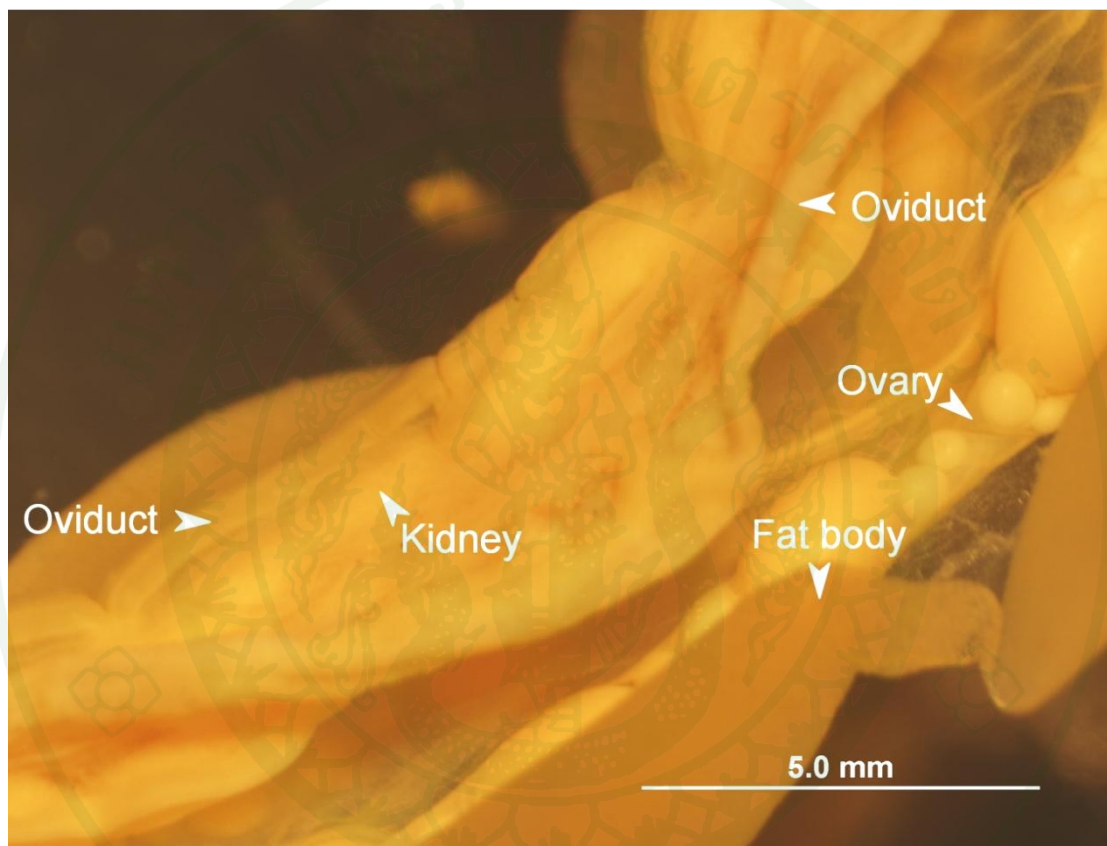
ภาพที่ 19 atresia ของ early vitellogenic follicle; a (H&E) b (Masson's trichrome)



ภาพที่ 20 atresia ของ late vitellogenic follicle; a-b แสดงการสลายของนิวเคลียส, c แสดงการสลายของชั้น zona pellucida และการรวมกลุ่มของ yolk granule; a-b (H&E) c (PAS- H)

## 7. สัณฐานวิทยาของท่อนำไข่ของเขียดงูสุกซ์

ท่อนำไข่ของเขียดงูสุกซ์มี 2 ข้าง สีขาวครีม ทอดยาวเคียงข้างไปกับไต fat body และรังไข่ โดยส่วนต้นอยู่ที่ระดับตับพวแรก และส่วนท้ายเปิดสู่ cloaca ร่วมกับทางเดินปัสสาวะ (ภาพที่ 21 )

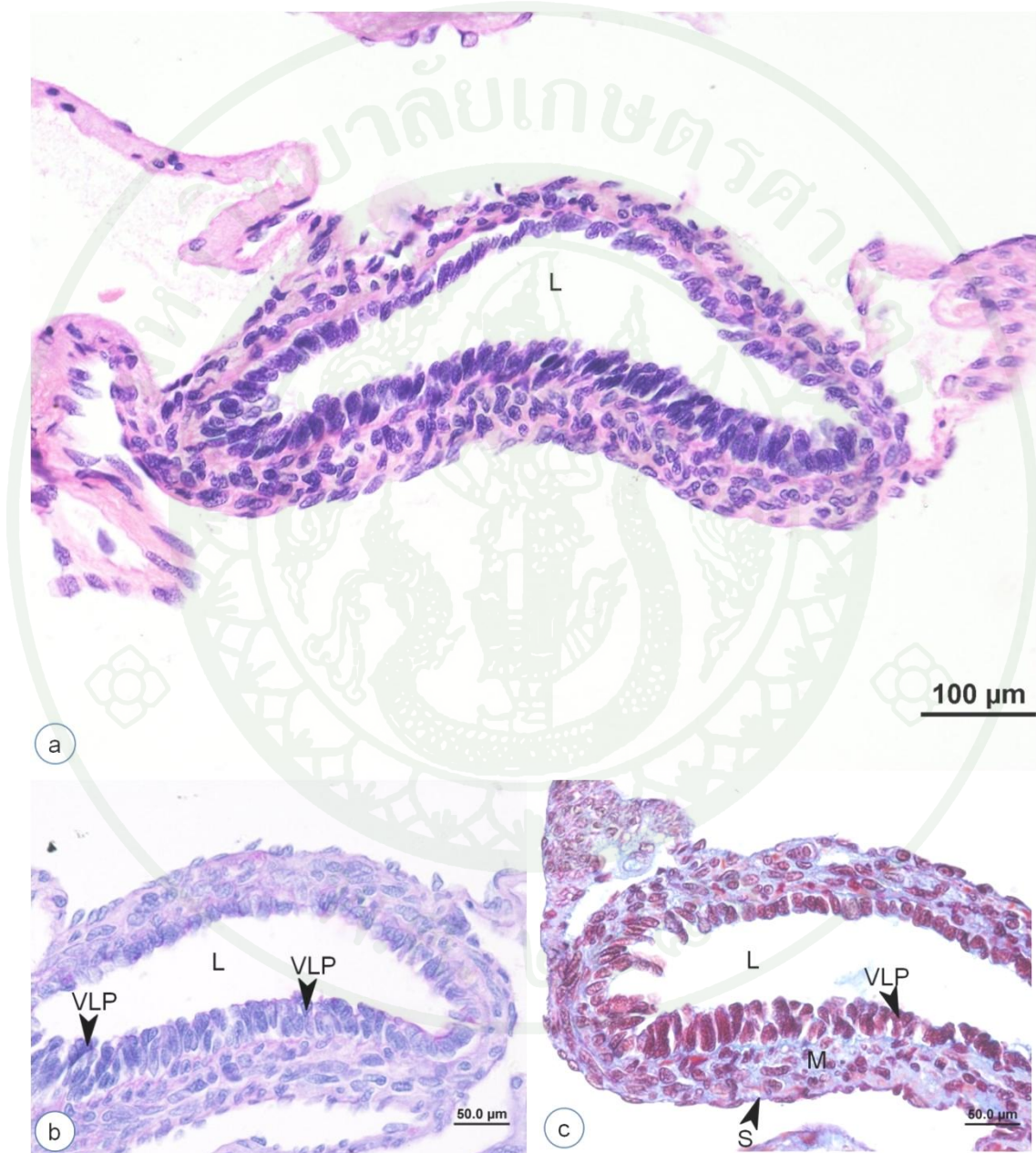


ภาพที่ 21 สัณฐานวิทยาของท่อนำไข่ของเขียดงูสุกซ์ (หลังจากคงสภาพ)

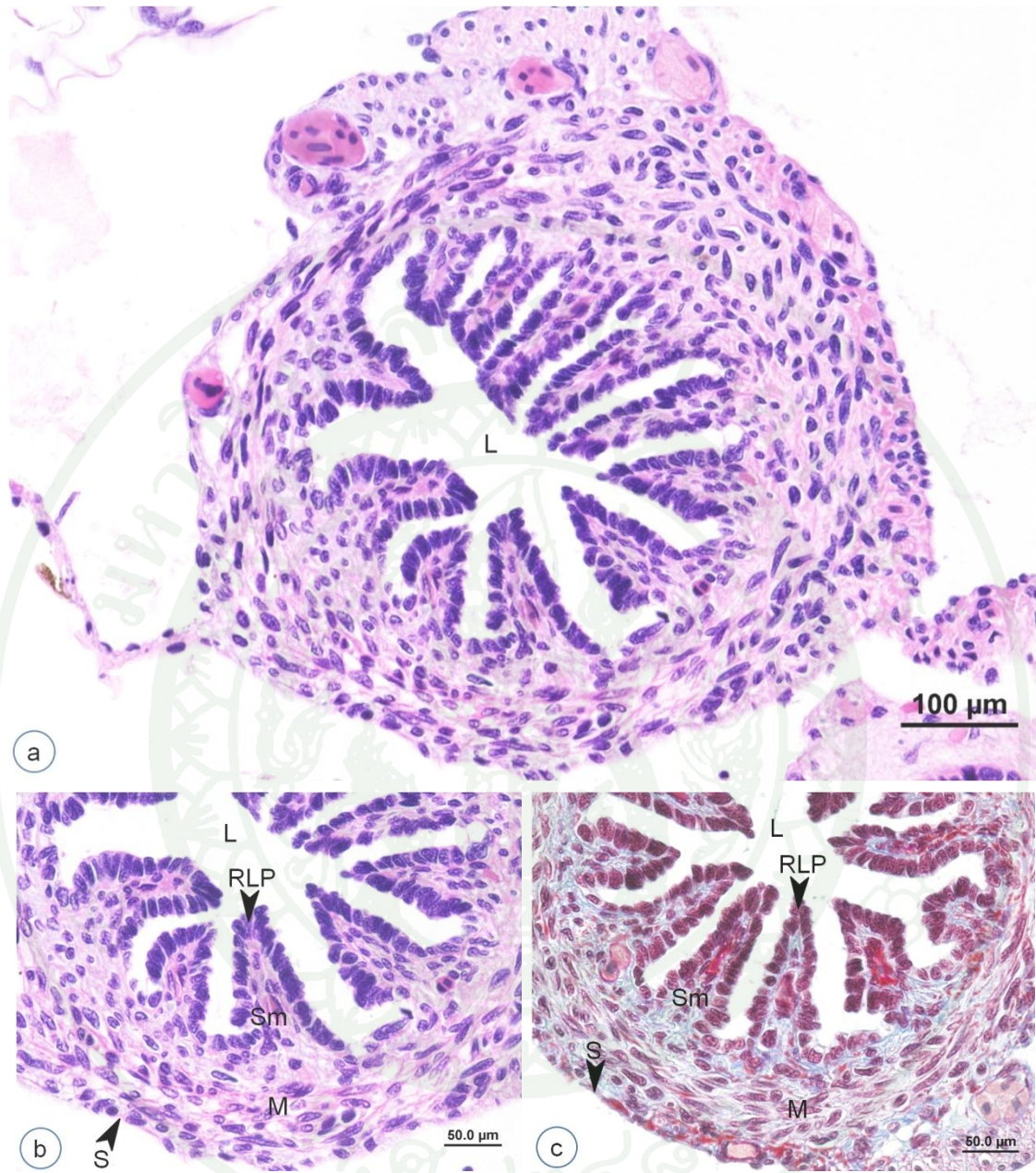
## 8. โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของท่อนำไข่ของเขียดงูสุกซ์

โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของท่อนำไข่ของเขียดงูสุกซ์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนต้นและส่วนท้าย โดยส่วนต้นนั้นด้านหนึ่งบุด้วยเนื้อเยื่อเยื่อผนังชนิด simple columnar epithelium ตรงกลางเป็น lumen ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นโครงสร้างเรียกว่า villus-like projection (ภาพที่ 22a, b, c) ใต้เยื่อผนังมีชั้นกล้ามเนื้อ (muscularis layer) และชั้นนอกสุดคือ serosa (ภาพที่ 22c)

ท่อนำไข่ส่วนท้าย พบว่า ชั้น mucosa มีลักษณะเป็นสันนูนยื่นเข้าไปใน lumen เรียก โครงสร้างนี้ว่า rugae-like projection เนื้อเยื่อผิวเป็นแบบ simple cuboidal epithelium ถัดมาเป็น ชั้น submucosa (ภาพที่ 23a, b, c) ชั้น muscularis และชั้นนอกสุดคือ serosa (ภาพที่ 23c)



ภาพที่ 22 ท่อนำไข่ส่วนต้น (L = lumen, M = muscularis, S = serosa, VLP = vilus-like projection) a (H&E) b (PAS-H) c (Masson's trichrome)



ภาพที่ 23 ท่อน้ำไขส่วนท้าย (L = lumen, M = muscularis, RLP = rugae-like projection, S = serosa, Sm = submucosa) a-b (H&E) c (Masson's trichrome)

## วิจารณ์

### 1. สันฐานวิทยาของอวัยวะ

สันฐานวิทยาของอวัยวะของเขียดมีลักษณะที่แตกต่างจากสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอื่นๆ โดยเฉพาะพวก anuran ซึ่งเป็นสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่มีวิวัฒนาการสูงสุด เช่น กบ *Dendropsophus minutus* ที่มีอวัยวะ 2 อัน รูปร่างรีไม่มีการแบ่งออกเป็น lobe (Santos and Oliveira, 2008) ในพวก urodele อวัยวะมีลักษณะเป็นรูปยาว 2 ข้าง (Humphery, 1922) แต่ในบางชนิดอวัยวะแบ่งออกเป็นหลาย lobe เช่น *Desmognathus* sp. (Organ, 1961) หรืออาจพบอวัยวะเป็นโครงสร้างรูปยาวข้างเดียว เช่น ใน *Lissotriton italicus* (Sperone et al., 2009) แต่ในเขียดทุกซัย อวัยวะทั้ง 2 ข้างมีจำนวน lobe 12-30 lobe แต่ละ lobe มีสายของเนื้อเยื่อประสานเชื่อมต่อกัน ในเขียด *Typhlonectes compressicaudus* อวัยวะแต่ละข้างมีประมาณ 12 lobe ซึ่งแตกต่างกันไปในด้านซ้ายและด้านขวา และระหว่างตัวจะแตกต่างกันอยู่ระหว่าง 5-22 lobe ซึ่งความแตกต่างนี้ไม่มีความสัมพันธ์กับขนาดของลำตัวและอายุของเขียด (Exbrayat, 1986a, b) ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจำพวก urodele เช่น *Bolitoglossa rostrata* จำนวน lobe ของอวัยวะจะเพิ่มขึ้นตามอายุ (Houck, 1977) นอกจากนี้การศึกษาจำนวน lobe ของเขียดสายพันธุ์อื่นๆ เช่น เขียด *Ichthyophis tricolor* และ *Uraeotyphlus narayani* ในแต่ละข้างมีจำนวน lobe อยู่ระหว่าง 9-14 lobe ขณะที่เขียด *Gegeneophis ramswamii* มี 8 lobe (Smita et al., 2003, 2004) เขียดที่พบในทวีปแอฟริกา ได้แก่ เขียด *Geotrypetes seraphinii*, *Gymnopsis multiplicata*, *Schistometopum gregorii*, *Siphonops thomensis* และ *Herpele squalostoma* มีจำนวน lobe และขนาดของ lobe ที่หลากหลายแตกต่างกันไป ขณะที่เขียด *Rhinatrema* sp. มีจำนวน lobe มากที่สุด และเขียด *Gymnopsis* sp. และ *Dermophis* sp. มีจำนวน lobe น้อยที่สุด เช่น เขียด *D. gregorii* ที่มีเพียงแค่ 3 lobe (Seshachar, 1942) และในเขียด *D. mexicanus* พบว่ามีการลดจำนวนของ lobe โดย lobe มีการรวมเข้าด้วยกัน (Wake, 1968) สรุปได้ว่าจำนวน lobe ที่มีความหลากหลายในแต่ละสปีชีส์บ่งบอกถึงวิวัฒนาการที่มีแนวโน้มในการลดจำนวนของ lobe ลง (Jamieson, 2006) ซึ่งคาดจะนำไปสู่วิวัฒนาการที่สูงกว่า

จากการวิจัยพบว่า ขนาดของอวัยวะแต่ละ lobe ของเขียดทุกซัยมีขนาดไม่เท่ากันโดย lobe ที่อยู่ทางด้านหน้ามีขนาดเล็กกว่า lobe ที่อยู่ทางด้านท้าย เมื่อเปรียบเทียบกับเขียดชนิดอื่นๆ พบว่าขนาดของ lobe มีความแปรผันต่างกันออกไป เช่น เขียด *U. oxyurus* มี lobe ที่อยู่ตรงกลางใหญ่ที่สุด ในเขียด *G. seraphinii*, *S. brasiliensis*, *C. viviparus* และ *T. compressicaudus* พบว่า มีทั้ง

lobe ที่อยู่ทางด้านหน้าหรือ lobe ที่อยู่ทางด้านท้ายมีขนาดใหญ่ที่สุด แต่ในเขียด *Caecilia ochrocephala* และ *Idiocranium russeli* lobe ที่อยู่ทางด้านหน้ามีขนาดใหญ่กว่า (wake, 1968)

ลักษณะภายนอกของอวัยวะของเขียดสกุลชัชเมื่อดูด้วยตาเปล่า พบว่า อวัยวะแต่ละ lobe มีลักษณะคล้ายผลหม่อน (mulberries) เหมือนกันกับที่พบในเขียด *Boulengerula titanus* (Measey et al., 2008)

## 2. โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะ

อวัยวะแต่ละ lobe มีเนื้อเยื่อประสานหุ้มล้อมรอบเรียกว่า tunica albugenea จากการศึกษาด้านจุลกายวิภาคของอวัยวะในเขียด *C. gracilis*, *I. glutinosus*, *S. annulatus*, *I. glutinosus*, *U. narayani* และ *D. gregorii* พบว่า ภายใน lobe ประกอบด้วยโครงสร้าง เรียกว่า locule จำนวนมาก (Spengel, 1876; Seshachar, 1936, 1939, 1942) ต่อมา นักวิจัยใช้คำว่า lobule แทนคำว่า locule (Wake, 1968, 1977) งานวิจัยนี้ได้ใช้คำว่า lobule ในการอธิบาย ภายในอวัยวะของเขียดสกุลชัชมี lobule รูปร่างกลมไปจนถึงหกเหลี่ยม มีขนาดที่แตกต่างกัน และแต่ละ lobule มีเนื้อเยื่อประสานหุ้มล้อมรอบ ระหว่าง lobule เป็น interstitial tissue ซึ่งพบ collecting duct และเส้นเลือด เหมือนกับที่พบในเขียด *T. compressicaudus* (Anjubault and Exbrayat, 2000)

ภายใน lobule ของเขียดสกุลชัชพบ germ cell ที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเดียวกันอยู่กันเป็นกลุ่มเรียกว่า germ cyst ซึ่ง germ cell ที่อยู่ในแต่ละ cyst จะเจริญอยู่ในระยะที่แตกต่างกัน ลักษณะเช่นนี้เป็นลักษณะร่วมกันของเขียดและสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอื่นๆ (Lofts, 1974) แต่ในสัตว์จำพวก urodele เช่น ซาลาแมนเดอร์ จะมีการเจริญของ germ cell ที่อยู่ภายใน cyst แบ่งเป็นบริเวณ (zonation) แบบ caudo-cranially ซึ่ง cyst ที่อยู่ด้าน cranial มีการเจริญของ spermatogonia ส่วนบริเวณถัดไป cyst จะเจริญอยู่ในระยะที่ต่างกันเป็นลำดับของการพัฒนาจนถึงด้าน caudal ที่เป็น cyst ของ spermatozoa ขณะที่สัตว์จำพวก anuran พบว่า cyst ที่อยู่ใน lobule มีการเจริญอยู่ในระยะที่ต่างกันคล้ายกับที่พบในสัตว์จำพวกเขียด ถึงแม้ว่าในช่วงฤดูสืบพันธุ์ภายใน lobule อาจมีเพียง 1 ระยะของการเจริญก็ตาม (Propper, 2011) ซึ่งลักษณะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในรูปแบบ cyst นี้ ยังพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังที่ไม่มีถุงน้ำคร่ำชนิดอื่นอีกด้วย เช่น สัตว์จำพวกปลาปากกลม พบว่า ภายใน lobule เดียวกันประกอบด้วย germ cell ที่มีการเจริญอยู่ในระยะเดียวกัน แต่มีบาง lobule ที่ประกอบด้วย germ cell 2 ระยะที่เจริญต่อเนื่องกัน ในปลากระดูกอ่อน พบ

โครงสร้างที่เรียกว่า ampulla ในแต่ละ ampulla ประกอบด้วย spermatogenic cell ที่เจริญอยู่ในระยะเดียวกัน ซึ่ง ampulla ที่อยู่บริเวณเดียวกัน จะมีเซลล์เจริญอยู่ในระยะเดียวกัน แต่ในปลากระดูกแข็ง โครงสร้างของอวัยวะแบ่งได้ 2 แบบ คือ 1. แบบ lobular อวัยวะประกอบด้วย lobular จำนวนมาก ภายในมี cyst ที่มี germ cell เจริญอยู่ในระยะเดียวกัน อวัยวะแบบนี้มี lumen ตรงกลาง พบ cyst ที่เจริญอยู่ในระยะต่างๆ ตลอดความยาวของอวัยวะ ภายใน lumen พบ spermatozoa อยู่ 2. แบบ tubular อวัยวะแบบนี้ไม่มี lumen อยู่ตรงกลาง cyst มีการเรียงลำดับตามระยะการเจริญ โดยที่ spermatogonia จะอยู่ทางท่อปลายต้น ส่วนทางปลายเปิดจะเป็น spermatozoa ที่จะถูกปล่อยออกสู่ efferent duct (Nagahama, 1983) ลักษณะของการสร้าง spermatozoa ใน cyst นี้เป็นลักษณะเฉพาะของสัตว์ที่ต้องอาศัยน้ำช่วยในการปฏิสนธิ และมีช่วงเวลาการวางไข่ จึงมีความจำเป็นต้องมี spermatozoa จำนวนมาก เพื่อสอดคล้องกับการที่สัตว์มีการปฏิสนธิภายนอก (Lofts, 1974) นอกจากนี้ มีงานวิจัยเพิ่มเติม โดย Wake (1968) รายงานว่าระยะการเจริญของ germ cell ที่แตกต่างกันในแต่ละ cyst เป็นลักษณะเฉพาะที่พบในสัตว์จำพวกเขียดงูเท่านั้น แต่ Burgos and Mancini (1947) พบว่าภายใน lobule ของ *Bufo* sp. และสัตว์จำพวก anuran อื่นๆ เช่น *Leptodactylus ocellatus*, *Hyla pulchella*, *Physalaemus gracilis* และ *P. cuvieri* ก็มีลักษณะเช่นเดียวกันนี้

เพราะฉะนั้นสรุปได้ว่า การเจริญของ cyst ลักษณะนี้ ไม่ใช่ลักษณะเฉพาะที่พบในเขียดงูเท่านั้น แต่ยังพบในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกอื่นๆ อีกด้วย ซึ่งแตกต่างจากสัตว์จำพวกมีถุงน้ำคร่ำ ที่ไม่ต้องอาศัยน้ำในการปฏิสนธิ และมีการปฏิสนธิภายใน เช่น ในสัตว์เลื้อยคลาน อวัยวะประกอบด้วย seminiferous tubule จำนวนมาก การสร้าง spermatozoa จะเริ่มจากขอบของ seminiferous tubule และเคลื่อนเข้าไปใน lumen ซึ่งเหมือนกับนกและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Fox, 1997) สัตว์เลื้อยคลานเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังพวกแรกที่กระบวนการสร้าง spermatozoa เกิดขึ้นใน seminiferous tubule อย่างแท้จริง และภายใน seminiferous tubule มี germinal epithelium ที่ถาวร ซึ่งแตกต่างจากสัตว์ที่ไม่มีถุงน้ำคร่ำที่ germ cell มีการเจริญอยู่ภายใน cyst (Grier, 1992)

ภายใน lobule ของเขียดงูทุกชนิดพบ Sertoli cell อยู่ตรงขอบของ lobule เหมือนกับที่พบในเขียดงู *I. glutinosus* และ *U. narayani* (Seshachar, 1942) ซึ่งในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่นๆ เช่น พวก anuran นั้น Sertoli cell มีจุดกำเนิดจาก follicle cell ที่ล้อมรอบ spermatogonia เมื่อ spermatogonia มีการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวน follicle cell จะมีการเคลื่อนที่ไปที่ผนังของ lobule และกลายเป็น Sertoli cell (Seshachar, 1936) สุดท้าย Sertoli cell ที่พัฒนาเต็มที่ จะสลายและผ่านเข้าไปใน efferent duct พร้อมกับ spermatozoa (Exbrayat and Dansard, 1994)

จากผลการวิจัยในเขียดงูศุกษัยไม่พบส่วนหัวของ spermatid และ spermatozoa ฝังอยู่กับ Sertoli cell ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Seshachar (1942) รายงานว่า Sertoli cell พบได้ที่ขอบของ lobule ส่วน cyst ลอยอยู่ใน fatty matrix นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลการศึกษาในเขียดงู *I. tricolor* พบว่า Sertoli cell ยังคงอยู่ติดกับ basal membrane ตลอดการพัฒนาของ spermatozoa จนกระทั่ง spermatozoa ถูกปล่อยออกไป (Propper, 2011) ถึงแม้ว่าจะมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับ Sertoli cell แต่บทบาทของ Sertoli cell ต่อ germ cell ในเขียดงูก็ยังไม่กระจ่างชัด ดังนั้นในอนาคต ควรมีการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญของ Sertoli cell ของเขียดงูในระดับที่สูงขึ้นไป

Exbrayat and Sentis (1982) แบ่งระยะของกระบวนการการสร้าง spermatozoa ในเขียดงู *T. compressicaudus* ออกเป็น 1. primary spermatogonia 2. secondary spermatogonia 3. primary spermatocyte 4. secondary spermatocyte 5. spermatid 6. young spermatozoa 7. spermatozoa และ 8. free spermatozoa แต่ Seshachar (1936) แบ่งออกเป็น 6 ระยะ คือ 1. primary spermatogonia 2. secondary spermatogonia 3. primary spermatocyte 4. secondary spermatocyte 5. spermatid และ 6. spermatozoa เช่นเดียวกับเขียดงูศุกษัยที่แบ่งออกเป็น 6 ระยะ ตามลักษณะการติดสีย้อม ขนาดของเซลล์ การจัดเรียงตัว และรูปร่างของนิวเคลียส แต่สำหรับ spermatid สามารถแบ่งได้อีก 3 ระยะย่อย

ในเขียดงูศุกษัย primary spermatogonia มีขนาดของนิวเคลียสใหญ่ที่สุดและล้อมรอบด้วย follicle cell ซึ่ง Seshachar (1942) รายงานว่า follicle cell ที่ล้อมรอบนี้ เป็นจุดกำเนิดของ Sertoli cell ตำแหน่งที่พบ primary spermatogonia อยู่ติดกับผนังของ lobule เช่นเดียวกันกับที่พบใน *P. cuvieri* (Oliveira *et al.*, 2002), *B. arenarum* (Cavicchia and Moviglia, 1983) และ *Dendropsophus minutus* (Santos and Oliveira, 2008) และอาจอยู่เป็นกลุ่มหรือพบเพียงเซลล์เดี่ยวใกล้กับ collecting duct ใน seminiferous tubule การที่พบ primary spermatogonia อยู่ใกล้กับ collecting duct นั้น อาจเนื่องจากว่า primary spermatogonia มีจุดกำเนิดมาจากเซลล์ที่อยู่ใกล้กับ collecting duct และการปรากฏของ collecting duct ในสายของเนื้อเยื่อประสานที่เชื่อมระหว่างอวัยวะ มีผู้วิจัยกล่าวว่าเป็นลักษณะเฉพาะของสัตว์จำพวกเขียดงู ซึ่ง collecting duct จะเชื่อมต่อโดยตรงกับอวัยวะและท่อไต และ collecting duct นี้ อาจเป็นที่เก็บ spermatozoa ก่อนที่จะมีการปล่อยออกสู่ urogenital duct และปล่อยออกสู่ cloaca ต่อไป (Smita *et al.*, 2004)

Secondary spermatogonia เกิดจากการแบ่งเซลล์แบบ ไมโทซิสของ primary spermatogonia ในเขียดงูศูกซัย พบว่า secondary spermatogonia ไม่มี follicle cell ล้อมรอบ ซึ่งต่างกับ secondary spermatogonia ของกบ *Rana tigerina* ที่พบ follicle cell ล้อมรอบ (Sretarugsa *et al.*, 1997) ความแตกต่างของ secondary spermatogonia เมื่อเปรียบเทียบกับ primary spermatogonia คือมีขนาดเล็กกว่า และพบเป็นกลุ่มเล็กๆ จำนวน 2-16 เซลล์อยู่ใกล้กับผนังของ lobule อย่างไรก็ตาม De sa and Berois (1986) ไม่พบ secondary spermatogonia ในอวัยวะของเขียดงู *Chthonerpeton indistinctum* อาจเป็นเพราะ primary spermatogonia มี metabolic rate ที่สูงและเกิดการเปลี่ยนแปลงข้ามผ่านสู่ระยะอื่นอย่างรวดเร็ว

Primary spermatocyte ของเขียดงูศูกซัยมีลักษณะของนิวเคลียสแตกต่างกันไปตามระยะของการแบ่งเซลล์ใน prophase I ทำให้เกิดการขดกันของโครโมโซมในระดับที่แตกต่างกัน คล้ายกับที่พบในเขียดงู *C. indistinctum* (De Sa and Berois, 1986), *I. tricolor* และ *U. narayani* (Lofts, 1974) และหลังจากนั้น primary spermatocyte จะมีการแบ่งเซลล์แบบ meiotic ครั้งแรกได้ secondary spermatocyte ซึ่งมีนิวเคลียสเล็กกว่า primary spermatocyte และ secondary spermatocyte มีโครมาทินกระจายคล้ายกับที่พบในกบ *R. tigerina* (Sretarugsa *et al.*, 1997) จากนั้น secondary spermatocyte จะมีการแบ่งเซลล์แบบ meiotic ครั้งที่ 2 ได้ spermatid

De sa and Berois (1986) ได้แบ่ง spermatid ของเขียดงู *C. indistinctum* ออกเป็น 4 ระยะย่อยคือ 1. round spermatid 2. kidney shaped spermatid 3. attenuate spermatid และ 4. mature spermatid แต่จากการศึกษาในเขียดงูศูกซัย พบว่า spermatid สามารถแบ่งได้ 3 ระยะย่อยโดยอาศัยลักษณะการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวโดยผู้วิจัยได้กำหนดชื่อระยะย่อยเป็น spermatid I, spermatid II และ spermatid III ตามลำดับ ซึ่ง spermatid III จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (spermiogenesis) ไปเป็น spermatozoa

Spermatozoa ของเขียดงูศูกซัยในระยะแรกจะมีการเรียงตัวเป็นแถบตรง ต่อมาจะเป็นอิสระภายใน cyst และปล่อยเข้าสู่ collecting duct ที่พบแทรกอยู่ระหว่าง lobule คล้ายกับที่พบในเขียดงู *B. taitanus* (Measey *et al.*, 2008) หลังจากนั้น spermatozoa จะเคลื่อนไปตามท่อของระบบสืบพันธุ์ (Wake, 1981) แต่ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจำพวก anuran เช่น กบ *D. minutus* พบว่า cyst ของ spermatozoa ที่เจริญเต็มที่แล้วจะแตกออก และ spermatozoa จะถูกปล่อยออกสู่ tubular lumen ของ seminiferous tubule (Santos and Oliveira, 2008) นอกจากนี้ใน cyst ของ spermatid และ

spermatozoa ของเขียดงูศุกซัย ยังพบเซลล์ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน ซึ่งงานวิจัยของ Smita และคณะ (2004) เรียกเซลล์นี้ว่า amoeboid cell ซึ่งไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัดของเซลล์นี้ จึงต้องมีการศึกษาต่อไปในอนาคต

การแยกความแตกต่างของ early spermatozoa ออกจาก spermatid III ของเขียดงูศุกซัยนั้น ผู้วิจัยสังเกตเห็นความแตกต่างจากการติดสีของนิวเคลียส โดยที่ spermatid III ที่เรียงเป็นรูปโค้งมีนิวเคลียสติดสีพวกต่างจากว่า spermatozoa ที่เรียงเป็นแถบ และนิวเคลียสของ spermatozoa ที่เป็นแถบตรงจะติดสีเหมือนกับ spermatozoa ที่เป็นอิสระอยู่ภายใน cyst ดังนั้นจึงสามารถแยก spermatid III กับ early spermatozoa ตามหลักเกณฑ์การติดสีที่ส่วนหัวนี้

การสร้าง spermatozoa นั้น มีผู้วิจัยหลายท่านได้ศึกษาไว้ โดยการเปลี่ยนแปลงของ round spermatid ไปเป็น long spermatid สามารถพบได้ตลอดทั้งปีในเขียดงู *B. titanus* แต่จะไม่พบในช่วงฤดูแล้ง (Measey *et al.*, 2008) เช่นเดียวกับกบ *R. ridibunda* ที่มีกระบวนการการสร้าง spermatozoa ตลอดทั้งปี (Loft, 1974) Breckenridge and Jayasing (1979) รายงานว่าการสืบพันธุ์ของเขียดงู *I. giltinosus* พบอยู่ในช่วงที่มีฝนตก ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงกันยายน ซึ่งอัมตะของเขียดงูศุกซัยที่เก็บในเดือนพฤษภาคม กรกฎาคม และธันวาคม พบว่ามีการเจริญของ germ cell ทุกระยะ จึงคาดว่าเขียดงูศุกซัยน่าจะมีกระบวนการสร้าง spermatozoa เกิดขึ้นได้ตลอดทั้งปี ที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากลักษณะภูมิอากาศของภาคใต้ของประเทศไทยมีฝนตกเกือบตลอดทั้งปี ทำให้เหมาะสมแก่การสืบพันธุ์ของเขียดงูชนิดนี้

### 3. สัณฐานวิทยาของ Mullerian duct

สิ่งที่แตกต่างจากสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ และสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกด้วยกัน (anuran และ urodele) คือ ในเขียดงูเพศผู้ที่โตเต็มวัยมี Mullerian duct อยู่ ซึ่งมีลักษณะเป็นคู่ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นต่อมที่สามารถทำงานได้ เรียกว่า Mullerian gland (Wake, 1981; George *et al.*, 2004) เขียดงูศุกซัยที่โตเต็มวัยมี Mullerian duct เหมือนกับเขียดงูชนิดอื่นๆ แต่ Mullerian duct ของสัตว์มีกระดูกสันหลังอื่นๆ จะสลายไประหว่างที่มีการพัฒนาของตัวอ่อน ซึ่งเป็นผลมาจาก Mullerian inhibiting hormone (MIH) ที่สร้างจาก Sertoli cell ของอัมตะ แต่การที่ Mullerian duct ยังคงอยู่จนถึงตัวเต็มวัยนั้นอาจเนื่องจาก Mullerian duct ไม่มีการตอบสนองต่อ MIH (Akbarsha *et al.*, 2006)

Mullerian duct ของเขียดงูคูกซัยเป็นท่อคู่ทอดยาวเลียงข้างไปกับไต อัณฑะและ fat body โดยที่ Mullerian duct นั้นอยู่ด้านนอกของไต เหมือนกับที่พบในเขียดงู *Uraeotyphlus* sp. (Wake, 1970) และในเขียดงู *U. menoni* (Chatterjee, 1936)

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของงานวิจัยที่ผ่านมา สามารถแบ่ง Mullerian duct ออกเป็น 2 แบบที่แตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ โดยแบบที่ 1 ส่วนท้ายของท่อมีลักษณะหนาแต่ส่วนหน้าประมาณ 3 ใน 4 ของท่อมีลักษณะแคบ ซึ่ง Mullerian duct แบบนี้พบในเขียดงู *B. boulengeri*, *B. taitanus*, *Caecilia* sp., *C. tentaculata*, *Oscacaecilia ochrocephala*, *G. seraphinii*, *G. multiplicata*, *H. squalostoma*, *Hypogeophis rostratus*, *I. glutinosus*, *I. peninsularis*, *S. gregorii*, *S. vittatus*, *S. uluguruensis*, *S. brasiliensis* และ *U. oxyurus* (Wake, 1970) Mullerian duct แบบที่ 2 พบในเขียดงู *U. narayani*, *C. viviparus*, *D. mexicanus*, *S. thomensis*, *T. compressicaudus* และ *G. multiplicata* โดยท่อจะมีความหนาเท่ากันตลอดความยาวของท่อ มีเพียงปลายสุดของท่อส่วนหน้าเท่านั้นที่มีลักษณะแคบ (George *et al.*, 2004)

#### 4. โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของ Mullerian duct

จากการศึกษาทางวิทยาเนื้อเยื่อของงานวิจัยก่อนหน้านี้นี้ พบว่า Mullerian duct แบบที่ 1 พบ tubular gland เฉพาะส่วนท้ายเท่านั้น แต่ใน Mullerian duct แบบที่ 2 พบ tubular gland ตลอดความยาว (Tonutti, 1931) ซึ่งลักษณะทางวิทยาเนื้อเยื่อของ Mullerian duct ของเขียดงูคูกซัยมีลักษณะเหมือนกับ Mullerian duct แบบที่ 2 ที่พบในเขียดงู *U. narayani* (George *et al.*, 2004) และพบว่าภายใน tubular gland ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด คือ secretory cell, ciliated cell และ amoeboid cell ซึ่ง secretory cell สร้างแกรนูลที่ย้อมติดสี PAS แสดงว่าสารนั้นคือ ไกลโคโพรตีน หรือ neutral mucopolysaccharide คล้ายกับที่พบในเขียดงู *U. narayani* (George *et al.*, 2004, 2005)

Ciliated cell ที่พบใน tubular gland ของเขียดงูคูกซัย อาจทำหน้าที่ขนส่งสารที่ผลิตออกมาจาก secretory cell ไปสู่ duct of gland และเข้าสู่ central duct ต่อไป ส่วนหน้าที่ของ amoeboid cell นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด ยังคงต้องศึกษาต่อไปในอนาคต สารคัดหลั่งที่ออกมาจาก Mullerian duct ของเขียดงูคูกซัยเป็น glycoprotein คล้ายกับรายงานในเขียดงู *D. mexicanus* และ *T. compressicaudus* ที่หลั่งสารจำพวก mucopolysaccharide น้ำตาลฟรุกโตส และเอนไซม์ acid phosphatase ซึ่งสารเหล่านี้มีความคล้ายคลึงกับที่พบใน epididymis ของสัตว์เลื้อยคลาน นก และ seminal vesicle และ

ต่อมลูกหมากของสัตว์เลื้อยคลานด้วยน้ำนม (Wake, 1981) สารที่หลั่งออกมาจาก Mullerian gland จะช่วยในการขนส่ง spermatozoa และเป็น medium ให้กับ spermatozoa ขณะที่ฉีดออกไปทาง phallodeum (Tonutti, 1931) และอาจมีส่วนประกอบที่เป็นอาหารของ spermatozoa ด้วย (Wake, 1970, 1981)

จากข้อมูลเหล่านี้สนับสนุนสมมติฐานที่ว่า Mullerian gland เป็นต้นกำเนิดของต่อมลูกหมากที่พบในสัตว์เลื้อยคลานด้วยน้ำนม (Jamieson, 2006) ซึ่งอาจสันนิษฐานได้ว่า การที่เขียดงูมี Mullerian gland ที่หลั่งสารช่วยในการขนส่งและช่วยในการเคลื่อนที่ของ spermatozoa เกี่ยวข้องกับการที่เขียดงูเพศผู้มี phallodeum ที่เป็นอวัยวะช่วยในการสืบพันธุ์สำหรับสอดใส่เข้าไปใน cloaca ของเพศเมีย ซึ่งน่าจะเป็นต้นแบบของการสืบพันธุ์บนบกที่มีการปฏิสนธิภายใน

## 5. สันฐานวิทยาของรังไข่

สำหรับสันฐานวิทยาและจุลกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของเขียดงูเพศเมียนั้น มีผู้วิจัยศึกษาน้อยมากหากเทียบกับสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกชนิดอื่นๆ ซึ่งเขียดงูที่มีผู้ศึกษาไว้ได้แก่ *C. inditinctum* (Berois and De Sa, 1988), *T. compressicaudus* (Exbrayat and Laurent, 1983), *I. beddomei* (Masood and Nadkarni, 1993a, b), *I. tricolor* และ *Gegeneophis ramaswamii* (Beyo et al., 2008)

รังไข่ของเขียดงูสกุลชัยมี 1 คู่ มีลักษณะคล้ายถุง รูปร่างยาวเคียงข้างไปกับไต fat body ท่อนำไข่ และระบบทางเดินอาหาร คล้ายกับที่พบในเขียดงูชนิดอื่นๆ เช่น *I. glutinosus* (Sarasin and Sarasin, 1887-1890), *Ichthyophis* และ *Hypogeophis* genera (Marcus, 1939), *Idiocranium* sp. และ *Rhinatrema* sp. (Parker, 1934, 1936), *U. oxyurus* (Garg and Prasad, 1962) และ *I. beddomei* (Masood, 1987; Masood and Nadkarni, 1991)

ในรังไข่ทั้ง 2 ข้างของเขียดงูสกุลชัย ประกอบด้วย 80-140 follicle แต่ละ follicle เชื่อมต่อกันด้วยเนื้อประสาน ซึ่ง Jamieson (2006) กล่าวว่า รังไข่ของเขียดงูจะมี oocyte ขนาดเล็กที่มีสีครีมจำนวน 50-100 follicle และ follicle ที่มีสีเหลือง 3-12 follicle แทรกอยู่ระหว่าง follicle ขนาดเล็ก นอกจากนี้ยังพบ follicle ที่มีขนาดใหญ่มากที่สุดอยู่บริเวณด้านหน้าของรังไข่ประมาณ 20-30

follicle ซึ่งเมื่อรวมจำนวนทั้งหมดแล้วพบว่า จำนวนของ follicle ใกล้เคียงกับที่พบในเขียดงูคูกุชชั และ การกระจายของ follicle ขนาดต่างๆ ของเขียดงูคูกุชชัคล้ายกับที่ Jemieson (2006) รายงานไว้

## 6. โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของรังไข่

ในการแบ่งระยะการเจริญของ germ cell ในเขียดงูคูกุชชั สามารถแบ่งออกเป็น oogonia, previtellogenic follicle (early previtellogenic follicle และ late previtellogenic follicle) , vitellogenic follicle (early vitellogenic follicle และ late vitellogenic follicle) และ atretic follicle โดยแต่ละระยะของการเจริญยึดหลักจากขนาด การติดสี การพัฒนาของชั้น zona pellucida ชั้น follicular และการพัฒนาของ yolk granule

Oogonia ของเขียดงูคูกุชชัเป็น germ cell ที่มีขนาดเล็กที่สุด อยู่รวมกันเป็นกลุ่มภายใน germinal nest ซึ่ง germinal nest นี้ พบในสายของเนื้อเยื่อประสานที่เชื่อมระหว่าง follicle แต่ละอัน และจะพบตลอดความยาวของรังไข่เหมือนกับที่มีการรายงานไว้ในเขียดงู *T. compressicaudus* (Exbrayat, 1983) และเขียดงู *I. beddomei* (Masood, 1987) การพบ oogonia ในรังไข่ของเขียดงูคูกุชชัที่โตเต็มวัยนี้เป็นลักษณะที่พบได้ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกทั่วไป (Tokarz, 1978) ในสัตว์เลื้อยคลานพบ oogonia อยู่เป็นกลุ่มในบริเวณที่เรียกว่า germinal bed ซึ่ง oogonia จะมีการแบ่งตัวเจริญเป็น oocyte แล้วเคลื่อนตัวออกจาก germinal bed (Guray, 1989) การที่พบ oogonia ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกที่ตัวเต็มวัยนั้นคล้ายกับสัตว์จำพวกปลากระดูกแข็งบางชนิด และ สัตว์เลื้อยคลานบางชนิด ที่มีกระบวนการสร้างไข่เกิดขึ้นใน germinal epithelium ซึ่งแตกต่างจาก ปลาปากกลม ปลากระดูกอ่อน ปลากระดูกแข็งบางชนิด สัตว์เลื้อยคลานบางชนิด นก และ สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ที่พบว่า การแบ่งเซลล์แบบ meiosis ทั้งหมดเกิดขึ้นในระยะตัวอ่อน ทำให้ไม่พบ oogonia ในตัวเต็มวัย (Hildebrand, 1982)

เมื่อมีการเจริญมากขึ้น oocyte จะมี follicle cell มาล้อมรอบ เกิดเป็น ovarian follicle และเข้าสู่ระยะ previtellogenic follicle ระยะนี้ในเขียดงูคูกุชชัแบ่งเป็น 2 ระยะย่อย คือ early previtellogenic follicle และ late previtellogenic follicle โดยที่ทั้ง 2 ระยะย่อย oocyte จะมีขนาดที่ใหญ่มากขึ้น ระยะ early previtellogenic follicle ล้อมรอบด้วยชั้น follicular ซึ่งเป็นเซลล์รูปแบนชั้นเดียว (simple squamous epithelium) เรียงกันอยู่แบบไม่ต่อเนื่อง และระยะนี้เริ่มปรากฏชั้น theca บางๆ แต่ late previtellogenic follicle นั้นพบว่ามีความหนาใหญ่กว่า early previtellogenic follicle และ

ชั้น follicular เป็นเซลล์แบบ low cuboidal เรียงกันชั้นเดียวและเรียงกันอย่างต่อเนื่อง ระยะนี้เริ่มปรากฏ zona pellucida ซึ่ง Beoris and De Sa (1988) ได้มีการแบ่งระยะของการเจริญของฟอลลิเคิลในเขียดงู *C. indistinctum* ออกเป็น 3 ระยะ ซึ่งระยะ previtellogenic (early และ late) ของเขียดงูศุกชัสนั้นเทียบได้กับระยะ primary follicle ของเขียดงู *C. indistinctum* แต่ในเขียดงู *C. indistinctum* ยังไม่พบชั้น zona pellucida (Beoris and De Sa, 1988) และคล้ายกับระยะ previtellogenic follicle ของเขียดงู *I. beddomei* (Masood, 1987) และ secondary follicle ของ *T. compressicaudus* (Exbrayat, 1983, 1986b)

ระยะ vitellogenic follicle ในเขียดงูศุกชัสนั้นสามารถแบ่งออกเป็น 2 ระยะย่อย คือ early vitellogenic follicle และ late vitellogenic follicle โดย early vitellogenic follicle บริเวณชั้น follicular มี follicle cell เป็นรูปลูกบาศก์เรียงกันชั้นเดียว (simple low cuboidal epithelium) แบบต่อเนื่อง และระยะนี้ไซโทพลาซึมของ oocyte เริ่มปรากฏ yolk granule และเห็นชั้น zona pellucida ชัดเจน ชั้น theca มีความหนาเพิ่มขึ้น ระยะ early vitellogenic follicle ของเขียดงูศุกชัสนั้นเทียบได้กับระยะ tertiary follicle ของเขียดงู *T. compressicaudus* (Exbrayat, 1983, 1986b) *c. indistinctum* และ *I. beddomei* แต่ต่างกันตรงที่ follicle cell ของเขียดงู *c. indistinctum* (Beoris and De Sa, 1988) และ *I. beddomei* (Masood, 1987) เป็นเซลล์รูปแบนชั้นเดียวล้อมรอบแบบไม่ต่อเนื่อง

ระยะ late vitellogenic follicle ซึ่งมีขนาดใหญ่ที่สุด ลักษณะของชั้น follicular มี follicle cell เป็นรูปลูกบาศก์เรียงกันชั้นเดียว (simple cuboidal epithelium) แบบต่อเนื่อง yolk granule กระจายอยู่ภายในไซโทพลาซึมทั่วทุกบริเวณ คล้ายกับที่พบในเขียดงู *I. beddomei* (Masood, 1987) เมื่อเทียบกับเขียดงู *T. compressicaudus* (Exbrayat, 1983, 1986b) และเขียดงู *C. indistinctum* ระยะนี้คือ ระยะ tertiary follicle แต่ต่างกันตรงที่ follicle cell ของเขียดงู *C. indistinctum* เป็นรูปทรง columnar และชั้น zona pellucida สมบูรณ์ในระยะนี้ (Beoris and De Sa, 1988)

ในรังไข่ของเขียดงูศุกชัสนั้นพบ atretic follicle ได้ทุกระยะของการเจริญ ซึ่งตรงกับรายงานในเขียดงู *I. beddomei* (Masood and Nadkarni, 1993b), *C. indistinctum* (Beoris and De Sa, 1988) และในปลากระดูกแข็ง เช่น *Channa gachua* (Shanbhag and Nadkarni, 1982) ในสัตว์จำพวก lizard เช่น *Calotes versicolor* (Gouder *et al.*, 1963) ในนกพิราบ *Columba livia* (Dominic, 1961)

Atretic อีกแบบหนึ่งที่พบในไขยคูกุสกุชชี่ มีลักษณะที่ไซโทพลาซึมของ oocyte เกิดการหดตัวแยกออกจากชั้น zona pellucida หรือชั้น zona pellucida มีการสลาย และชั้น follicular มีการเรียงกันของเซลล์ไม่เป็นระเบียบ พบได้ในระยะ early vitellogenic follicle และ late vitellogenic follicle ลักษณะของ atretic follicle แบบนี้คล้ายกับรายงานในไขยคูกุสกุชชี่ *I. beddomei* (Masood and Nadkarni, 1993) ในไขยคูกุสกุชชี่ยังพบ yolk granule มีการรวมกลุ่มคล้ายกับที่พบในไขยคูกุสกุชชี่ *C. indistinctum* แต่ในไขยคูกุสกุชชี่ *C. indistinctum* จะเรียก atretic follicle แบบนี้ว่า atypical follicle (Berois and De Sa, 1988) ลักษณะของ atypical follicle ยังมีรายงานพบในไขยคูกุสกุชชี่ *T. compressicuvadus* (Exbrayat, 1983, 1986b)

ชั้น follicular ที่อยู่รอบ oocyte ในรังไข่ของไขยคูกุสกุชชี่ พบว่ามีเซลล์ชั้นเดียวจนกระทั่ง oocyte เจริญเต็มที่ก็ยังคงเป็นชั้นเดียว เหมือนกับที่พบในสัตว์จำพวก anuran และ urodele (Dumont and Brummet, 1978) พวกรูปร่าง Chelonian พวกรูปร่าง crocodilian reptile (Sarkar *et al.*, 1996; Calderon *et al.*, 2004) และห่าน (Kovacs *et al.*, 1992) แต่แตกต่างจากสัตว์กลุ่ม lizard งู และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ที่ระยะแรกจะมี follicle cell ล้อมรอบเพียงชั้นเดียว แต่เมื่อ oocyte เจริญมากขึ้นจะมี follicle cell เรียงกันหลายชั้น (Kanamadi and Saidapur, 1982)

Follicle cell ในไขยคูกุสกุชชี่ จัดว่าเป็นเซลล์ที่จำเป็นสำหรับการพัฒนาของ oocyte ซึ่งจากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า ในสัตว์จำพวก anuran และ urodele เซลล์ชนิดนี้มีบทบาทในการสังเคราะห์ yolk จาก vitellogenin จากเลือดมาสู่ oocyte (Wallace and Dumont, 1968) ซึ่ง yolk granule ประกอบด้วย vitelline ที่มาจาก vitellogenin ไกลโคเจน และไขมัน (Sanchez and Villecco, 2003) follicle cell ยังมีส่วนในการสร้างชั้น vitelline envelope (Dumont and Brummet, 1978)

จากการที่พบ glycoprotein ในไซโทพลาซึมของ oocyte ของไขยคูกุสกุชชี่ ตั้งแต่ระยะ late previtellogenic follicle ไปจนถึงระยะ early vitellogenic follicle โดย glycoprotein มีจำนวนมากขึ้นตามการเจริญของ follicle สันนิษฐานได้ว่า follicle cell มีการผลิต glycoprotein ออกมา ซึ่งอาจเป็นสารตั้งต้นเกี่ยวกับการสังเคราะห์ yolk granule สอดคล้องกับงานวิจัยของ Wallace (1983) ที่กล่าวว่า lipoglycophosphoprotein (vitellogenin) ที่สังเคราะห์ขึ้นในตับ สารนี้จะเป็นสารตั้งต้นในการผลิต yolk protein (lipovitellin, phosvitin) ซึ่งสามารถพบได้ใน oocyte ของสัตว์ที่ไม่ใช่สัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม บทบาทของ follicle cell จะจัดหาสารอาหารสำหรับการเจริญของ oocyte (Hope *et al.*, 1963) ซึ่งงานวิจัยที่สนับสนุนคำกล่าวนี้ได้ทำการทดลอง โดยนำ follicular cell ออกจาก oocyte ของ

*Xenopus* sp. ผลที่เกิดขึ้นคือ เกิดการรบกวนความสามารถในการรวมกลุ่มของ vitellogenic protein (Wallace, 1970) แต่ปัจจุบันนี้ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการเจริญของ yolk ในสัตว์จำพวกเขียดงู (Berois and De Sa, 1988) ซึ่งต่อไปในอนาคตควรมีการศึกษาในระดับสูงขึ้นไปในอนาคต

ชั้น zona pellucida ของเขียดงูสุกซัยเป็นสารจำพวก mucopolysaccharide สอดคล้องกับรายงานของ Raven (1961) และพบว่าชั้น zona pellucida จะหนามากขึ้นเมื่อ oocyte พัฒนามากขึ้น เหมือนกับที่พบในเขียดงูสุกซัย ส่วนชั้น theca ของเขียดงูสุกซัยไม่สามารถแยกเป็นชั้นในและชั้นนอกเหมือนกับสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูงได้

ในเขียดงูสุกซัยนั้นไม่พบ corpus luteum อาจเป็นเพราะยังไม่ถึงช่วงตกไข่ ถึงแม้จะเป็นฤดูฝนก็ตาม ซึ่งอาจพบได้หลังจากช่วงระยะเวลาที่เล็กน้อย เหมือนกับเขียดงู *I. beddomei* ที่ไม่พบ corpus luteum โดยผู้วิจัยให้เหตุผลว่า ยังไม่มีการตกไข่ (Masood and Nadkarni, 1993b)

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า germinal nest จะพบระหว่างวงสืบพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันไปในแต่ละสปีชีส์ เช่น ในเขียดงู *C. indistinctum* จะพบ germinal nest พร้อมกันกับ corpus luteum (Berois and De Sa, 1988) ในเขียดงู *T. compressicaudus* พบ germinal nest มีการเจริญแบ่งตัว โดยเฉพาะอย่างยิ่งระหว่างวงสืบพันธุ์แบบปีละ 2 ครั้ง (biannual) (Exbrayat, 1983, 1986b) ตรงกันข้ามกับเขียดงู *I. beddomei* ที่ oogonia มีการแบ่งตัวเฉพาะฤดูสืบพันธุ์เท่านั้น (Masood, 1987) ซึ่งจากงานวิจัยบอกได้ว่า เขียดงู *T. compressicaudus* (Exbrayat, 1983, 1986b) มีกระบวนการการสร้างไข่ต่อเนื่องตลอดทั้งปี ในทุกสปีชีส์ที่มีการศึกษา พบว่าหลายๆ oocyte จะมีการสลายก่อนที่จะมีการวางไข่ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงที่ไม่ใช่ฤดูสืบพันธุ์ จึงคาดว่า กระบวนการการสร้างไข่ของ *Gymnophiona* น่าจะเกิดขึ้นตลอดทั้งปี คล้ายกับเขียดงู *T. compressicaudus* ที่ระยะ previtellogenic oocyte จะสลายไปเมื่อยังไม่ถึงเวลาตกไข่ (Jamieson, 2006) จากผลจากการวิจัยครั้งนี้คาดว่า เขียดงูสุกซัยมีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์แบบต่อเนื่องตลอดทั้งปี เนื่องจากว่าพื้นที่ที่พบเขียดงูสุกซัยนั้นอยู่ในเขตที่มีฝนตกเกือบตลอดทั้งปี เว้นบางช่วงเท่านั้น ทำให้สภาพแวดล้อมเหมาะแก่การสืบพันธุ์ เช่นเดียวกับในคางคก *B. melanostictus* ที่มีกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ตลอดทั้งปี (Kanamadi and Saidapur, 1982)

## 7. สัณฐานวิทยาของท่อนำไข่

ในส่วนของท่อนำไข่ของเขียดงูศุกษัยนั้น มี 2 ข้าง สีขาวครีม ทอดยาวเคียงข้างไปกับไต fat body และรังไข่ โดยส่วนต้นอยู่ที่ระดับตับพู่แรก และส่วนท้ายจะเปิดออกสู่ cloaca เหมือนกับที่พบในเขียดงู *I. glutinosus* (Sarasin and Sarasin, 1887-1890), *Ichthyophis* และ *Hypogeophis* genera (Marcus, 1939), *Idiocranium* sp., *Rhinatrema* sp. (Parker, 1934, 1936), *Uraeotyphlus oxyurus* (Garg and Prasad, 1962) และ *I. beddomei* (Masood, 1987; Masood and Nadkarni, 1991)

## 8. โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของท่อนำไข่

โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของท่อนำไข่ของเขียดงูศุกษัย สามารถแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนต้นและส่วนท้าย จากงานวิจัยที่ผ่านมาในเขียดงู *I. glutinosus* ได้แบ่งท่อนำไข่ออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนที่ 1 เรียกว่า par recta ประกอบด้วยเซลล์ต่อมที่หลังสารประกอบจำพวกโปรตีน และพบต่อมเมือกที่หลังสารประกอบที่มีสภาพเป็นกรด ส่วนที่ 2 เรียกว่า par convoluta พบว่าครึ่งหนึ่งของเส้นรอบวงของท่อไปด้วยต่อมที่หลังสารสภาพเป็นกรด และสารประกอบจำพวกโปรตีน อีกครึ่งของเส้นรอบวงในระยะสืบพันธุ์พบเซลล์ที่มี cilia ซึ่งจะช่วยพัดโบกไข่ไปตลอดท่อนำไข่ ส่วนที่ 3 เรียกว่า par uterina ช่วงระยะสืบพันธุ์ด้วยเซลล์ที่มี cilia และเซลล์ต่อมที่สร้างสารเมือกที่เป็นกลาง (Masood, 1987; Masood and Nadkarni, 1991) ซึ่งการที่ท่อนำไข่ของเขียดงูศุกษัยมีโครงสร้างต่างจากเขียดงู *I. glutinosus* อาจเป็นเพราะว่า ช่วงที่เก็บตัวอย่างเป็นช่วงก่อนที่จะมีการตกไข่ ทำให้เซลล์ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ในการสร้างสารคัดหลั่ง อีกทั้งไม่พบต่อมและเซลล์ที่มี cilia ในท่อนำไข่

## สรุปและข้อเสนอนแนะ

### สรุป

เย็บคองสุกซัยมีอัญหะ 2 ข้าง ซึ่งมีจำนวน lobe 12-30 lobe ที่มีขนาดไม่เท่ากัน อัญหะแต่ละ lobe มีลักษณะคล้ายผลหมอนที่ประกอบด้วยพูย่อย (lobule) จำนวนมาก ลักษณะทางจุลกายวิภาคของอัญหะแต่ละ lobe พบว่า ภายในมี lobule ที่มีรูปร่างค่อนข้างกลมจำนวนมาก ระหว่าง lobule เป็น interstitial tissue, collecting duct และเส้นเลือด ภายใน lobule พบ Sertoli cell และพบ germ cell ที่มีการเจริญเติบโตอยู่ในระยะเดียวกันอยู่เป็นกลุ่มเรียกว่า germ cyst ซึ่ง germ cell ในแต่ละ cyst จะเติบโตอยู่ในระยะที่แตกต่างกัน การจำแนก germ cell ของเย็บคองสุกซัย จำแนกได้ดังนี้

1. Primary spermatogonia มีนิวเคลียสกลมและมีขนาดใหญ่ที่สุด มี follicle cell ซึ่งมีนิวเคลียสเป็นรูปสี่เหลี่ยมรอบ อาจพบ primary spermatogonia อยู่เดี่ยวๆ หรือพบเป็นกลุ่มติดกับผนังของ lobule หรือพบอยู่บริเวณรอยต่อระหว่าง collecting duct กับ lobule
2. Secondary spermatogonia มีนิวเคลียสรูปร่างกลม เมื่อเปรียบเทียบกับ primary spermatogonia พบว่ามีขนาดเล็กกว่า และพบเป็นกลุ่มเล็กๆ จำนวน 2-16 เซลล์
3. Primary spermatocyte ลักษณะนิวเคลียสเป็นรูปกลม และมีขนาดเล็กกว่า primary spermatogonia เส้นใยโครมาทินอยู่กันอย่างหลวม และนิวเคลียสกำลังแบ่งตัวอยู่ในระยะใดระยะหนึ่งของ prophase I อาจพบ primary spermatocyte เริ่มมีการเรียงตัวเป็นวงกลมอยู่ภายใน cyst
4. Secondary spermatocyte นิวเคลียสมีขนาดเล็กกว่า primary spermatocyte มีเส้นใยโครมาทินขดรวมตัวกันแน่นมากกว่า primary spermatocyte และติดสีพวกต่างมากกว่า มักพบว่ามีการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นวงกลมอยู่ภายใน cyst
5. Spermatid พบว่าภายในนิวเคลียสมีโครมาทินรวมกันแน่นมากกว่า germ cell ระยะอื่นๆ และแบ่งได้ 3 ระยะย่อย ได้แก่ spermatid I, spermatid II และ spermatid III ซึ่ง spermatid I มีลักษณะกลม มีขนาดเล็กกว่า secondary spermatocyte และมีการเรียงตัวกันเป็นชั้นเดียวรูปร่างกลมอยู่ภายใน cyst ระยะย่อยที่ 2 คือ spermatid II นิวเคลียสเป็นรูปวงรี มีการเรียงตัวเป็นรูปครึ่งวงกลม

อยู่ภายใน cyst ส่วน spermatid III นิวเคลียสมีลักษณะเป็นรูปทรงกระบอก มีการเรียงตัวกันในลักษณะโค้งอยู่ภายใน cyst และติดสีพวกต่างเข้มมากขึ้น

6. Spermatozoa ส่วนหัวซึ่งมีนิวเคลียสติดสีพวกต่างเข้มมากที่สุด มีรูปร่างเป็นทรงกระบอก โดยระยะแรกจะมีการเรียงตัวเป็นแนวตรง ระยะต่อมา spermatozoa จะกระจายเป็นอิสระอยู่ภายใน cyst และสุดท้าย spermatozoa จะถูกปล่อยเข้าสู่ collecting duct

Mullerian duct ของเขียดงูคูกุชชั้ยเป็นท่อคู่ทอดยาวเคียงข้างไปกับไต อัณฑะ และ fat body ลักษณะทางจุลกายวิภาคของ Mullerian duct พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นต่อมเรียกว่า Mullerian gland ซึ่งประกอบด้วย simple tubular gland จำนวนมากเรียงตัวอยู่รอบ central duct โดย tubular gland บริเวณใกล้เคียงกันจะเปิดสู่ duct of gland จากนั้นจึงเปิดเข้าสู่ central duct ภายใน tubular gland มีเซลล์ 3 ชนิด คือ secretory cell, ciliated cell และ amoeboid cell เนื้อเยื่อบุผิวของ central duct เป็นแบบ simple low columnar epithelium มี cilia ขึ้นเข้าไปใน lumen

รังไข่ของเขียดงูคูกุชชั้ยมี 1 คู่ ยาวเคียงข้างไปกับไต fat body ท่อนำไข่ และระบบทางเดินอาหาร ลักษณะทางจุลกายวิภาคของรังไข่ พบว่า ภายในรังไข่ทั้ง 2 ข้าง ประกอบด้วย follicle ประมาณ 80-140 follicle ซึ่งแบ่งระยะการเจริญของ follicle ออกเป็น oogonia, previtellogenic follicle (early previtellogenic follicle และ late previtellogenic follicle), vitellogenic follicle (early vitellogenic follicle และ late vitellogenic follicle) และ atretic follicle

ระยะ oogonia เป็นเซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สุด อยู่รวมกันเป็นกลุ่มใน germinal nest

ระยะ previtellogenic follicle ระยะนี้แบ่งเป็น 2 ระยะย่อย คือ early previtellogenic follicle และ late previtellogenic follicle โดยทั้ง 2 ระยะย่อย oocyte จะมีขนาดใหญ่ขึ้น ระยะ early previtellogenic follicle ล้อมรอบด้วยชั้น follicular ซึ่งเป็นเซลล์รูปแบนชั้นเดียว (simple squamous epithelium) เรียงกันแบบไม่ต่อเนื่อง และปรากฏชั้น theca บางๆ แต่ late previtellogenic follicle พบว่ามีขนาดใหญ่กว่า early previtellogenic follicle และชั้น follicular เป็นเซลล์แบบ low cuboidal เรียงกันชั้นเดียวแบบต่อเนื่อง บาง follicle เริ่มปรากฏ zona pellucida และพบว่าภายในไซโทพลาซึมของ oocyte นั้น มี glycoprotein

ระยะ vitellogenic follicle ระยะนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระยะย่อย คือ early vitellogenic follicle และ late vitellogenic follicle โดยลักษณะทางจุลกายวิภาคของ early vitellogenic follicle บริเวณชั้น follicular มี follicle cell เป็นรูปลูกบาศก์เรียงกันชั้นเดียว (simple low cuboidal epithelium) แบบต่อเนื่อง ไซโทพลาซึมของ oocyte เริ่มปรากฏ yolk granule ขนาดเล็ก เห็นชั้น zona pellucida ชัดเจนมากขึ้น และพบว่าภายในไซโทพลาซึมของ oocyte นั้น มี glycoprotein อยู่ ชั้น theca มีความหนาเพิ่มขึ้น และพบชั้น surface อยู่นอกสุด ต่อมาระยะ late vitellogenic follicle มีขนาดใหญ่ที่สุด มี follicle cell เป็นรูปลูกบาศก์เรียงกันอยู่ชั้นเดียว (simple cuboidal epithelium) แบบต่อเนื่อง yolk granule มีขนาดใหญ่ขึ้น และกระจายอยู่ภายในไซโทพลาซึมทั่วทุกบริเวณ ชั้น zona pellucida ปรากฏอย่างชัดเจน และชั้น theca ที่ไม่สามารถแยกเป็นชั้นในและชั้นนอกได้ พบชั้น surface อยู่อกสุด

Atretic follicle พบได้ทุกระยะของการเจริญ ได้แก่ atresia ของ early previtellogenic follicle, atresia ของ late previtellogenic follicle, atresia ของ early vitellogenic follicle และ atresia ของ late vitellogenic follicle โดย atretic follicle นั้นมีลักษณะดังนี้ นิวเคลียสเกิดการหดตัว และต่อมาจะสลายตัว ซึ่งพบในทุกระยะ ไซโทพลาซึมหดตัวและแยกออกมาจากผนังของ oocyte พบได้ในระยะ early previtellogenic follicle และ late previtellogenic follicle หรือไซโทพลาซึมของ oocyte เกิดการหดตัวแยกออกมาจากชั้น zona pellucida หรือชั้น zona pellucida สลาย และ yolk granule มีการรวมกลุ่ม พบได้ในระยะ early vitellogenic follicle และ late vitellogenic follicle

ท่อนำไข่ของเขียดงูสุกซัยมี 2 ข้าง ทอดยาวเคียงข้างไปกับไต fat body และรังไข่ ลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของท่อนำไข่แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนต้นและส่วนท้าย โดยส่วนต้นนั้นด้านหนึ่งบุด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชนิด simple columnar epithelium ตรงกลางเป็น lumen ส่วนอีกด้านหนึ่งเป็นโครงสร้างเรียกว่า villus-like projection ใต้เยื่อบุผิวมีชั้น muscularis และชั้น serosa สำหรับท่อนำไข่ส่วนท้าย พบว่า ชั้น mucosa มีลักษณะเป็นสันนูนยื่นเข้าไปใน lumen เรียกโครงสร้างนี้ว่า rugae-like projection เนื้อเยื่อบุผิวเป็นแบบ simple cuboidal epithelium ถัดมาเป็นชั้น submucosa, muscularis และ serosa

### ข้อเสนอแนะ

ในอนาคต การศึกษาเกี่ยวกับอวัยวะและ Mullerian duct ของเขียดงูทุกซัย ควรศึกษาในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เพื่อที่จะทราบเกี่ยวกับ โครงสร้างละเอียดของ germ cell ในแต่ละระยะ เช่น ลักษณะของเส้นใยโครมาทินที่อยู่ภายในนิวเคลียส spermiogenesis รวมถึงศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง Sertoli cell และ germ cell ที่ยังไม่กระจ่างชัด สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับรังไข่และท่อไข่ ควรศึกษาในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเช่นเดียวกัน โดยสิ่งที่ควรศึกษาเพิ่มเติมคือ โครงสร้างที่พบใน follicle เช่น yolk granule ชั้น zona pellucida และ glycoprotein ที่พบอยู่ภายในไซโทพลาซึมของ oocyte รวมถึงเซลล์ และ โครงสร้างของท่อไข่

นอกจากนี้ ในอนาคตการศึกษาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ ควรมีการศึกษาความแตกต่างในรอบ 1 ปี เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของโครงสร้างภายในอวัยวะสืบพันธุ์ และการผลิตสาร หรือ ออจนาการศึกษาทางด้านสรีรวิทยา เช่น ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์มาศึกษาเพิ่มเติม เพื่อที่จะนำไปสู่ข้อมูลที่มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

## เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- Akbarsha, M., j. George, S. Mathew and O.V. Oommen. 2006. Caecilian male Mullerian Gland, with special reference to *Uraeotyphlus narayani*, pp. 157-182. In J.M. Exbrayat, ed. **Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona, vol 5**. Science Publishers. Enfield, New Hampshire.
- Andrew, W. 1979. **Textbook of Comparative Histology**. University Press, New York.
- Anjubault, E. and J.M. Exbrayat. 2000. Cycle annuel des cellules du tissu interstitial des testicules chez *Typhlonectes compressicaudus*, Amphibien Gymnophione. **Bulletin de la Société Zoologique de France** 125: 133.
- Badenhorst, A. 1978. The development and the phylogeny of the organ of Jacobson and the tentacular apparatus of *Ichthyophis glutinosus* (Linne'). **Ann. Univ. Van. Stellenb. Serie A2 (Soo" I)** 1: 1-26.
- Bancroft, J.D. and M. Gamble. 1996. **Theory and practice of histological techniques**. Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Bemis, W.E., K. Schwenk and M.H. Wake. 1983. Morphology and function of the feeding apparatus in *Dermophis mexicanus* (Amphibia: Gymnophiona). **Zool. J. Linn. Soc.** 77: 75-96.
- Bennett, A.F. and M.H. Wake. 1974. Metabolic correlates of activity in the Caecilian *Geotrypetes seraphini*. **Copeia** 1974: 764-769.
- Berois, N. and R. De Sa. 1988. Histology of the ovaries and fat bodies of *Chthonerpeton indistinctum*. **J. Herpetol.** 22: 146-151.

- Beyo, R.S., L. Divya, M. Smita, O.V. Oommen and M.A. Akbarsha. 2008. Stages in follicle cell/oocyte interface during vitellogenesis in caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Gegeneophis ramaswamii*: a transmission electron-microscopic study. **Cell Tissue Res.** 331: 519-528.
- Breckenridge, W.R. and R. Murugapillai. 1974. Mucous glands in the skin of *Ichthyophis glutinosus* (Amphibia: Gymnophiona). **Ceylon. J. Sci.** 11: 43–51.
- \_\_\_\_\_ and S. Jayasinghe. 1979. Observations on the eggs and larvae of *Ichthyophis glutinosus*. **Ceylon. J. Sci.** 13: 187-202.
- \_\_\_\_\_, S. Nathanael and L. Pereira. 1987. Some aspects of the biology and development of *Ichthyophis glutinosus* (Amphibia: Gymnophiona). **J. Zool. Lond.** 211: 437–499.
- Burgos, M.H. and R.E. Mancini. 1947. Estudio histologico del testiculo de sapo "in vivo" e "in vitro." **Rev. Soc. Arg. Biol.** 23(2): 154-164.
- Calderon, M.L, G.R. De Perez and M.P. Ramirez. 2004. Morphology of the ovary of *Caiman crocodilus* (Crocodylia: Alligatoridae). **Ann. Anat.** 186: 13–24.
- Cavicchia, J.C., G.A. Moviglia. 1983. The blood–testis barrier in the toad (*Bufo arenarum Hensel*): a freeze fracture and lanthanum tracer study. **Anat. Rec.** 205: 387–396.
- Chatterjee, B. K. 1936. The anatomy of *Uraeotyphlus menoni* Annandale. Part I. The digestive, circulatory, respiratory, and urino-genital systems. **Anat. Anz.** 81: 393-414.
- Colbert, E.H. 1955. Scales in the Permian amphibian *Trimerorhachis*. **Am. Mus. Novit.** 1740: 1–17.

- De Sa, R. and N. Berois. 1986. Spermatogenesis and histology of the testes of the Caecilian *Chthonerpeton indistinctum*. **J. Herpetol.** 20: 510-514.
- Dominic, C. J. 1961. A study on the atretic follicles in the ovary of the domestic pigeon. **Proc. Nat. Acad. Sci. (India)** B31: 273-286.
- Duellman, W.E. and L. Trueb. 1986. **Biology of Amphibians**. McGraw-Hill, New York.
- Dumont, J.N. and A.R. Brummet. 1978. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). V. Relationships between developing oocytes and their developing follicular tissues. **J. Morphol.** 155: 73-98.
- Elkan, E. 1968. Mucopolysaccharides in the anuran defence against desiccation. **J. Zool. Lond.** 155: 19-53.
- Exbrayat, J.M. 1983. Premières observations sur le cycle annuel de l'ovaire de *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Batracien Apode vivipare. **Comptes rendus des Séances de l'Académie des Sciences de Paris** 296: 493-498.
- \_\_\_\_\_. 1986a. Quelques aspects de la biologie de la reproduction chez *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron 1841) Amphibien Apode. **Bull. Soc. Herp. Fr.** 38: 20-23.
- \_\_\_\_\_. 1986b. Le testicule de *Typhlonectes compressicaudus*; structure, ultrastructure, croissance et cycle de reproduction. **Mem. Soc. Zool. France** 43: 121-132.
- \_\_\_\_\_. 2006. Oogenesis and folliculogenesis, pp. 275-290. In J.M. Exbrayat, ed. **Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona, vol 5**. Science Publishers. Enfield, New Hampshire.

Exbrayat, J.M. and S. Bloquet. 1994. Un exemple d'heterochronie: la me'tamorphose chez les Gymnophiones. **Bull. Soc. Zool. Fr.** 119: 117-126.

\_\_\_\_\_ and C. Dansard. 1994. Apports de techniques complémentaires à la connaissance de l'histologie du testicule d'un Amphibien Gymnophione. **Revue Française d'Histotechnologie** 7: 19-26.

\_\_\_\_\_ and M. Delsol. 1985. Reproduction and growth of *Typhlonectes compressicaudus* a viviparous gymnophione. **Copeia** 1985: 950-955.

\_\_\_\_\_ and M.T. Laurent. 1983. Quelques observations concernant le maintien en élevage de deux amphibiens apodes: *Typhlonectes compressicaudus* et un *Ichthyophis*.  
Reproduction de *Typhlonectes compressicaudus*. **Bull. Soc. Herp. Fr.** 26: 25-26.

\_\_\_\_\_ and P. Sentis. 1982. Homogénéité du testicule et cycle annuel chez *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril et Bibron, 1841), Amphibien Apode vivipare. **Comptes Rendus des Séances de l'Académie des Sciences de Paris** 294: 757-762.

Fox, H. 1983. The skin of *Ichthyophis* (Amphibia: Caecilia): an ultrastructural study. **J. Zool. Lond.** 199: 223-248.

\_\_\_\_\_. 1997. The urinogenital system of reptiles, pp. 1-157. In H. Fox, ed. **Biology of the Reptilia, Vo. 6**. Academic Press, New York.

Freiberg, M.A. 1972. Los anfibios (Amphibia). In L. Cendrero, ed. **Zoología Hispanoamericana. Vertebrados**. Edit. Porrúa, Mexico.

Gabe, M. 1971. Donne'es histologiques sur le te'gument d'*Ichthyophis glutinosus* L. (Batracien Gymnophione). **Ann. Sci. Nat.** 13: 573-608.

- Garg, B. L. and J. Prasad. 1962. Observations of the female urogenital organs of limbless amphibian *Uraeotyphlus oxyurus*. **J. Anim. Morphol. Physiol.** 9: 154-156.
- George, J. M., M. Smita, B. Kadalmani, R. Girija, O.V. Oommen and A. Akbarsha. 2005. Contribution of the secretory material of Caecilian (Amphibia: Gymnophiona) male Mullerian gland to motility of sperm: a study in *Uraeotyphlus narayani*. **J. Morphol.** 263: 227-237.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, O.V. Oommen and M.A. Akbarsha. 2004. Anatomy, histology and ultrastructure of male Mullerian gland of *Uraeotyphlus narayani* (Amphibia: Gymnophiona). **J. Morphol.** 260: 33-56.
- Goin, C.J. and O.B. Goin. 1962. **Introduction to Herpetology.** W.H. Freeman, San Francisco.
- Gouderb, Y.M., V.B. Nadkarni and M.A. Rao. 1963. Histological and histochemical studies on the follicular atresia in the ovary of the lizard, *Calotes versicolor*. **J. Herpetol.** 14: 451-456.
- Grier, H.J. 1992. Chordate testis : The extracellular matrix hypothesis. **J. Exp. Zool.** 261: 151-160.
- Guray, S.S. 1989. **Ovarian follicles in reptiles and birds.** Springer-Verlag, Berlin.
- Hebrard, J.J., G.M.O. Maloiy, and D.M.I. Alliangana. 1992. Notes on the habitat and diet of *Afrocaecilia taitana* (Amphibia: Gymnophiona). **J. Herpetol.** 26: 513-515.
- Homscheid, A. and H. Greven. 1996. Activities of the caecilian *Typhlonectes compressicauda* in the aquarium. **Salamandra** 32(3): 181-192.

- Hope, J., A.A. Humphries and G.H. Bourne. 1963. Ultrastructure studies on the developing oocytes of the salamander *Notophthalmus viridescens*. I. The relationship between follicle cells and developing oocytes. **J. Ultrastruct. Res.** 9: 302-324.
- Houck, L.D. 1977. Reproductive biology of a neotropical salamander, *Bolitoglossa rostrata*. **Copeia** 70-83.
- Hildebrand, M. 1982. **Analysis of vertebrate structure**. John Wiley & Sons, New York.
- Humphery, R.R. 1922. The multiple testis in urodels. **Biol. Bull.** 43: 45-67.
- Jamieson, G.M. 2006. **Reproductive biology and phylogeny of Gymnophiona (caecilians)**. vol 5. Science Publishers. Enfield, New Hampshire.
- Kanamadi, R.D. and S.K. Saidapur. 1982. Pattern of ovarian in the Indian toad *Bufo melanostictus* (Schn.). **Proc. Indian Natn. Sci. Acad.** 3: 307-316.
- Kaptan, E. and O. Murathanoglu. 2008. Annual Morphological Cycles of Testis and Thumb Pad of the Male Frog (*Rana ridibunda*). **Anat. Rec.** 291: 1106–1114.
- Katz, U. and E.H. Larsen. 1984. Chloride transport in toad skin (*Bufo viridis*). The effect of salt adaptation. **J. Exp. Biol.** 109: 353–371.
- Kovacs, J., V. Forgo and P. Peczely. 1992. The fine structure of the follicular cells in growing and atretic ovarian follicles of the domestic goose. **Cell Tissue Res.** 267: 561–569.
- Lawson, R. 1963. The anatomy of *Hypogeophis rostratus* Cuvier (Amphibia: Apoda or Gymnophiona). Part I, the skin and skeleton. **Proc. Univ. Durham Phil. Soc.** 13A: 254–273.

Lofts, B. 1974. Reproduction, pp. 107-218. In B. Lofts, ed. **Physiology of the Amphibian**. 1st ed. Academic Press, New York.

Luna, L.G. 1968. **Manual of histologic staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. MacGraw-Hill, New York.

Marcus, H. 1939. Beitrag zur kenntnis der Gymnophionen. Ueber keimbahn, keimdruesen, Fettkörper und Urogenitalverbindung bei *Hypogeophis*. **Biomorphosis** 1: 360-384.

Marques, O.A.V. 1992. **Histo'ria natural de micrurus corallinus (Serpentes, Elapidae)**. Master diss. Univ. Sa'õ Paulo (IB), Brazil.

Masood, U. 1987. **Some aspects of reproduction in the female Apodan Amphibian *Ichthyophis***. Dissertation Karnatak University, Dharwad, India.

\_\_\_\_\_, G.K. Bhatta and V.B. Nadkarni. 1992. Interrenal of a female Gymnophione amphibian, *Ichthyophis beddomei*, during the annual reproductive cycle. **J. Morphol.** 211: 201-206.

\_\_\_\_\_ and B. Nadkarni. 1991. Morphological, histological, histochemical and annual cycle of the oviduct in *Ichthyophis beddomei* (Amphibia: Gymnophiona). **J. Herpetol.** 25: 234-237.

\_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1993a. The ovarian cycle in an oviparous gymnophione amphibian, *Ichthyophis beddomei* (Peters). **J. Herpetol.** 27: 59-63.

\_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 1993b. Morphological, histological and histochemical studies of the ovary of an oviparous Caecilian, *Ichthyophis beddomei* (Peters). **J. Herpetol.** 27: 63-69.

- Measey, G.J., M. Smita, R.S. Beyo and O.V. Oommen. 2008. Year-round spermatogenic activity in an oviparous subterranean caecilian, *Boulengerula taitamus* Loveridge 1935 (Amphibia: Gymnophiona: Caeciliidae). **Tropical Zoology** 21: 109-122.
- Moodie, G.E.E. 1978. Observations on the life history of the caecilian *Typhlonectes compressicaudus* (Duméril and Bibron) in the Amazon Basin. **Can. J. Zool.** 56: 1005–1008.
- Nagahama, Y. 1983. The functional morphology of teleost gonads. pp. 223-275. In W.S. Hoar, D.J. Randall and E.M. Donaldson, eds. **Fish Physiology, Vol. IX**. Academic Press, New York.
- Nussbaum, R.A. and B.G. Naylor. 1982. Variation in the trunk musculature of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). **J. Zool. Lond.** 198: 383–393.
- Oliveira C.D., C. Zanetoni and R. Zieri. 2002. Morphological observations on the testes of *Physalaemus cuvieri* (Amphibia: Anura). **Rev. Chil. Anat.** 20(3): 263-268.
- Oommen, O. V., J.G. Measey, D.J. Gower and M. Wilkinson. 2000. Distribution and abundance of the caecilian *Gegeneophis ramaswamii*. **Curr. Sci.** 79: 1386-1389.
- Organ, J.A. 1961. Life history of the pigmy salamander, *Desmognathus wrighti*, in Virginia. **Amer. Midl. Nat.** 66: 384-390.
- Paillet, R., J. Estabel and J.M. Exbrayat. 1997. Hematopoietic organs and blood cells of *Typhlonectes compressicaudus* and *Typhlonectes natans* (Amphibia: Gymnophiona). **Bull. Mens. Soc. Linn. Lyon.** 66(5): 124–134.
- Parker, H.W. 1934. Reptiles and Amphibians from Southern Ecuador. **Ann. Mag. Nat. Hist.** 10: 264-273.

- Parker, H.W. 1936. The Caecilians of the Mamfe Division, Cameroons. **Proc. Zool. Soc. Lond.** 1936: 135-163.
- Pattle, R.E., C. Schock, J.M. Creasey and G.M. Hughes. 1977. Surpellic films, lung surfactant, and their cellular origin in newt, caecilian, and frog. **J. Zool. Lond.** 182: 125–136.
- Pe'faur, J.E., N. Sierra, R. Pe' rez and F. Godoy. 1992. Aspectos biolo' gicos de una poblacio' n de cecili' dos de los Andes Venezolanos. **Acta Zool. Lilloana.** 41: 67–74.
- Pough, F.H., J.B. Heiser and W.N. Mcfarland. 1996. **Vertebrate Life, 4rd ed.** Englewood Cliffs, New Jersey.
- Propper, C.R. 2011. **Hormones and Reproduction of Vertebrates, volume 2-Amphibians.** Elsevier Inc, United Kingdom.
- Renous, S. and J.P. Gasc. 1989. Body and vertebral proportions in Gymnophiona (Amphibia): diversity of morphological types. **Copeia** 1989: 837–847.
- Raven, C.H.R. 1961. **Oogenesis: the storage of developmental information.** London: Pergamon.
- Roth, G., U. Dicke and K. Nishikawa. 1992. How do ontogeny, morphology, and physiology of sensory systems constrain and direct the evolution of amphibians. **Am. Nat.** 139: 105–124.
- Sanchez, S. and E.I. Villecco. 2003. Oogenesis, pp. 27-71. *In* B.G.M. Jamieson, ed. **Reproductive biology and phylogeny of Anura, vol 2.** Science Publishers, Enfield, New Hampshire.

- Santos, L.R.S. and C. Oliveira. 2008. Histological aspects and structural characteristics of the testes of *Dendropsophus minutes* (Anura: Hylidae). **Micron** 39: 1266-1270.
- Sarasin, P. and F. Sarasin. 1887-1890. **Ergebnisse Naturwissenschaftlicher Forschungen auf Ceylon. Zur Entwicklungsgeschichte und Anatomie der Ceylonischen Blindwuhle *Ichthyophis glutinosus***. C.W. Kreidel's Verlag, Wiesbaden.
- Sarkar, S., N.K. Sarkar, P. Das and B.R. Maiti. 1996. Photothermal effects on ovarian growth and function in the soft-shelled turtle *Lissemys punctata punctata*. **J. Exp. Zool.** 274: 41-55.
- Scheltinga, D.M., M. Wilkinson, B.G.M. Jamieson and O.V. Oommen. 2003. Ultrastructure of the mature spermatozoa of caecilians (Amphibia: Gymnophiona). **J. Morphol.** 258: 179-192.
- Serie, P. 1915. Nota sobre un batracio a'podo de la Argentina '*Chthonerpeton indistinctum*'. **Physis** 9: 41-43.
- Seshachar, B.R. 1936. The spermatogenesis of *Ichthyophis glutinosus* (Linn.) I. The spermatogonia and their division. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.** 24: 662-706.
- \_\_\_\_\_. 1937. Spermatogenesis of *Ichthyophis glutinosus*. II. The meiotic divisions. **Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.** 27: 133-158.
- \_\_\_\_\_. 1939. The spermatogenesis of *Uraeotyphlus narayani* Seshachar. **La Cellule** 48: 63-76.
- \_\_\_\_\_. 1940. The apodan sperm. **Curr. Sci.** 11: 439-441.

- Seshachar, B.R. 1942. Stages in the spermatogenesis of *Siphonops annulatus* Mikan. and *Dermophis gregorii* (Blgr) (Amphibia: Apoda). **Proc. Indian Acad. Sci.** 15: 263-277.
- \_\_\_\_\_.1945. Spermateleosis in *Uraeotyphlus narayani* Sesh. and *Gegenophis carnosus* Bedd. **Proc. Nat. Instit. Sci. India.** 11: 36-40.
- Shanbhaga, B. and V. B. Nadkarni. 1982. Occurrence of cystic atresia in the ovary of *Channa gachua*. **Curr. Sci.** 51: 420-422.
- Smita, M., O.V. Oommen, M.G. Jancy and M.A. Akbarsha. 2003. Sertoli cell in the testis of caecilians, *Ichthyophis tricolor* and *Uraeotyphlus narayani* (Amphibia: Gymnophiona): light and electron microscopic perspective. **J. Morphol.** 258: 317-326.
- \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_, \_\_\_\_\_ and \_\_\_\_\_. 2004. Stages in spermatogenesis of two species of caecilians *Ichthyophis tricolor* and *Uraeotyphlus cf. narayani* (Amphibia: Gymnophiona): Light and electron microscopic study. **J. Morphol.** 261: 92-104.
- Spengel, J.W. 1876. Das Urogenital system der Amphibien. 1. Theil. Der anatomische Bau des Urogenitalsystem. **Arbeiten aus dem Zoologzootom Institute Würzburg** 3: 51-114.
- Sperone, E., A. Bonacci, E. Brunelli, S. Tripepi and B.G.M. Jamieson. 2009. Male reproductivesystem in the Italian newt *Lissotriton italicus* (Peracca 1898) (Amphibia: Urodela): ultrastructural and morphological study with description of spermiogenesis, spermatozoon and spermatophore. **Zoomorphology** 128: 183-195.
- Sretarugsa, P., V. Nakiem, P. Sobhon, J. Chavadej, M. Kruatrachue and E.S. Upatham. 1997. Structure of the testis of *Rana tigerina* and its changes during development and seasonal variation. **J. Sci. Soc. Thailand.** 23: 75-86.

- Sutharam, K.K., M.C. Peter and O.V. Oommen. 1990. Stimulation of oxidative metabolism by thyroid hormones in an apodan amphibian, *Gegenophis carnosus* (Beddome). **Gen. Comp. Endocrinol.** 79: 246–252.
- Taylor, E.H. 1968. **The Caecilians of The World.** A Taxonomic Review. University of Kansas Press, Lawrence.
- Toews, D. and D. Macintyre. 1977. Blood respiratory properties of a viviparous amphibian. **Nature** 266: 464–465.
- Tokarz, R.D. 1978. **Oogonial proliferation, oogenesis and folliculogenesis in nonmammalian vertebrate; in the vertebrate ovary.** pp. 145-173. Plenum Press. New York.
- Toledo, R.C., C. Jared. 1995. Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comp. Biochem. Physiol.** 111: 1–29.
- Tonutti, E. 1931. Beitrag zur Kenntnis der Gymnophionen. XV. Das Genital-system. **Morphologisches Jahrbuch** 68: 151-292.
- Wake, M.H. 1968. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. I. The gonads and the fat bodies. **J. Morphol.** 126: 291–332.
- \_\_\_\_\_. 1970. Evolutionary morphology of the caecilian urogenital system. Part II: the kidneys and urogenital ducts. **Acta Anat.** 75: 321-358.
- \_\_\_\_\_. 1975. Another scaled caecilian (Gymnophiona: Typhlonectidae). **Herpetologica** 31: 134–136.
- \_\_\_\_\_. 1976. The development and replacement of teeth in viviparous caecilians. **J. Morphol.** 148: 33–64.

- Wake, M.H. 1977. The reproductive biology of caecilians: an evolutionary perspective, pp. 73-102. In D.H. Taylor and S.I. Guttman, eds. **The Reproductive Biology of Amphibians**. Plenum Press, New York.
- \_\_\_\_\_. 1980a. Fetal tooth development and adult replacement in *Dermophis mexicanus* (Amphibia: Gymnophiona): fields versus clones. **J. Morphol.** 166: 203–216.
- \_\_\_\_\_. 1980b. Reproduction, growth, and population structure of the Central American caecilian *Dermophis mexicanus*. **Herpetologica** 36: 244–256.
- \_\_\_\_\_. 1981. Structure and function of the male Mullerian gland in caecilians (Amphibia: Gymnophiona), with comments on its evolutionary significance. **J. Herpetol.** 15: 17-22.
- \_\_\_\_\_. 1985. The comparative morphology and evolution of the eyes of Caecilians (Amphibia: Gymnophiona). **Zoomorphology** 105: 277-295.
- \_\_\_\_\_. 1992. Patterns of peripheral innervation of the tongue and hyobranchial apparatus in caecilians (Amphibia: Gymnophiona). **J. Morphol.** 212: 37–53.
- \_\_\_\_\_. G.Z. Wrust. 1979. Tooth crown morphology in caecilians (Amphibia: Gymnophiona). **J. Morphol.** 159: 331–341.
- \_\_\_\_\_. 1995. The spermatogenic cycle of *Dermophis mexicanus* (Amphibia: Gymnophiona). **J. Herpetol.** 29: 119-122.
- Wallace, R.A. 1970. Studies on amphibian yolk IX. *Xenopus vitellogenin*. **Biochim Biophys Acta** 215: 176-183.

- Wallace, R.A. 1983. Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates, pp. 127-177. In L. W. Browder, ed. **Developmental Biology, Vol. 1. Oogenesis**. Plenum Press, New York and London.
- \_\_\_\_\_ and J.N. Dumont. 1968. The induced synthesis and transport of yolk protein and their accumulation by the oocyte in *Xenopus laevis*. **J. Cell Physiol.** 72(suppl 1): 73-89.
- Wilkinson, M. 1989. On the status of *Nectocaecilia fasciata* Taylor, with a discussion of the phylogeny of the Typhlonectidae (Amphibia: Gymnophiona). **Herpetologica** 45: 23–36.
- \_\_\_\_\_. 1991. Adult tooth crown morphology in the Typhlonectidae (Amphibia: Gymnophiona). A reinterpretation of variation and its significance. **Z. Zool. Syst. Evolut. Forsch.** 29: 304–311.
- Young, J.Z. 1981. **The Life of Vertebrates, 3rd ed.** New York: Oxford University Press, California.
- Zylberberg, L., J. Castanet, and A. De Ricales. 1980. Structure of the dermal scales in Gymnophiona (Amphibia). **J. Morphol.** 165: 41–54.
- \_\_\_\_\_ and M.H. Wake. 1990. Structure of the scales of *Dermophis* and *Microcaecilia* (Amphibia: Gymnophiona), and a comparison to dermal ossification of other vertebrates. **J. Morphol.** 206: 25–43.



ภาคผนวก

ตารางผนวกที่ 1 ขั้นตอนและระยะเวลาในกระบวนการ tissue processing

Step/tank	สารละลาย	เวลา (ชั่วโมง)
1	70% Alcohol I	6
2	70% Alcohol II	2
3	80% Alcohol I	1
4	80% Alcohol II	1
5	95% Alcohol I	1
6	95% Alcohol II	1
7	Absolute Alcohol I	1
8	Absolute Alcohol II	1
9	Xylene I	1
10	Xylene II	1
11	Paraplast® I	1.5
12	Paraplast® II	1

ตารางผนวกที่ 2 ความยาวและน้ำหนักของเขี้ยวคูดงสุนัขเพศผู้และเพศเมีย

ตัวอย่าง	ความยาว (cm)	น้ำหนัก (g)
เพศผู้		
1	23.50	8.78
2	21.80	8.25
3	23.10	8.32
	$\bar{x} \pm SD$	$8.45 \pm 0.28$
เพศเมีย		
1	22.50	8.26
2	15.70	2.78
3	20.40	7.37
4	26.30	13.06
5	23.30	11.13
	$\bar{x} \pm SD$	$8.52 \pm 3.92$

ตารางผนวกที่ 3 ความกว้างและความยาวของ lobule ภายในอัมชะของเขียดงูสุกซ์

Lobule	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )
1	420	580
2	420	620
3	430	600
4	450	570
5	400	560
6	430	550
7	430	600
8	450	560
9	420	550
10	430	580
11	420	600
12	430	540
13	460	560
14	460	540
15	410	580
16	420	530
17	440	580
18	460	600
19	460	600
20	450	550
21	450	600
22	480	580
23	460	550
24	430	530
25	470	550
26	440	580

## ตารางผนวกที่ 3 (ต่อ)

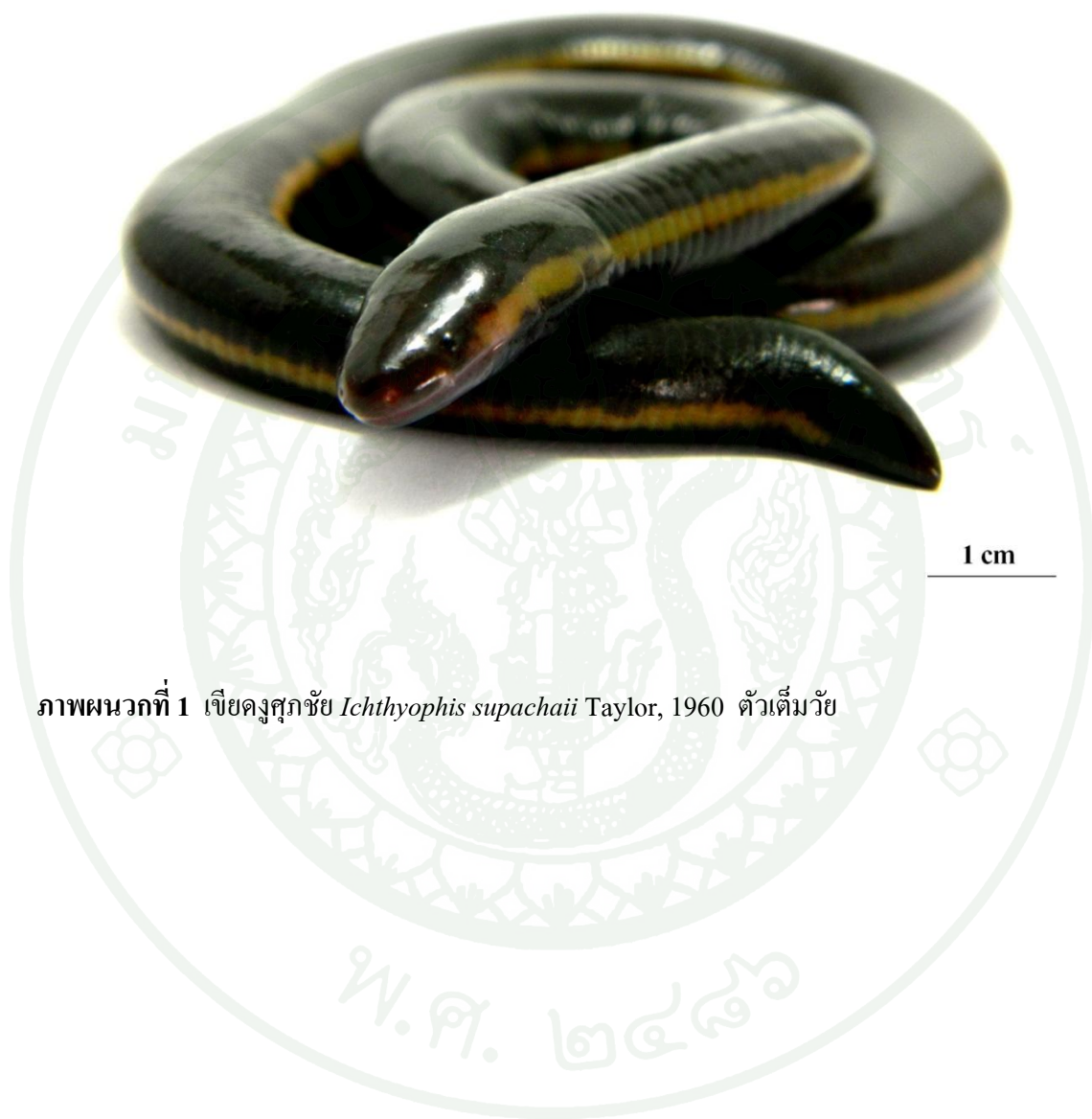
Lobule	ความกว้าง ( $\mu\text{m}$ )	ความยาว ( $\mu\text{m}$ )
27	420	550
28	420	570
29	450	590
30	470	560
31	450	580
32	440	580
33	450	580
34	420	540
35	470	600
36	440	580
37	410	580
38	460	580
39	440	540
40	420	590
41	420	600
42	420	600
43	470	550
44	450	590
45	450	580
46	420	540
47	430	600
48	460	600
49	420	600
50	420	540
$\bar{x} \pm \text{SD}$	438.8 $\pm$ 1.94	574.0 $\pm$ 2.30

ตารางผนวกที่ 4 ขนาดนิวเคลียสของ germ cell เพศผู้ของเขียดงูศุกชัย

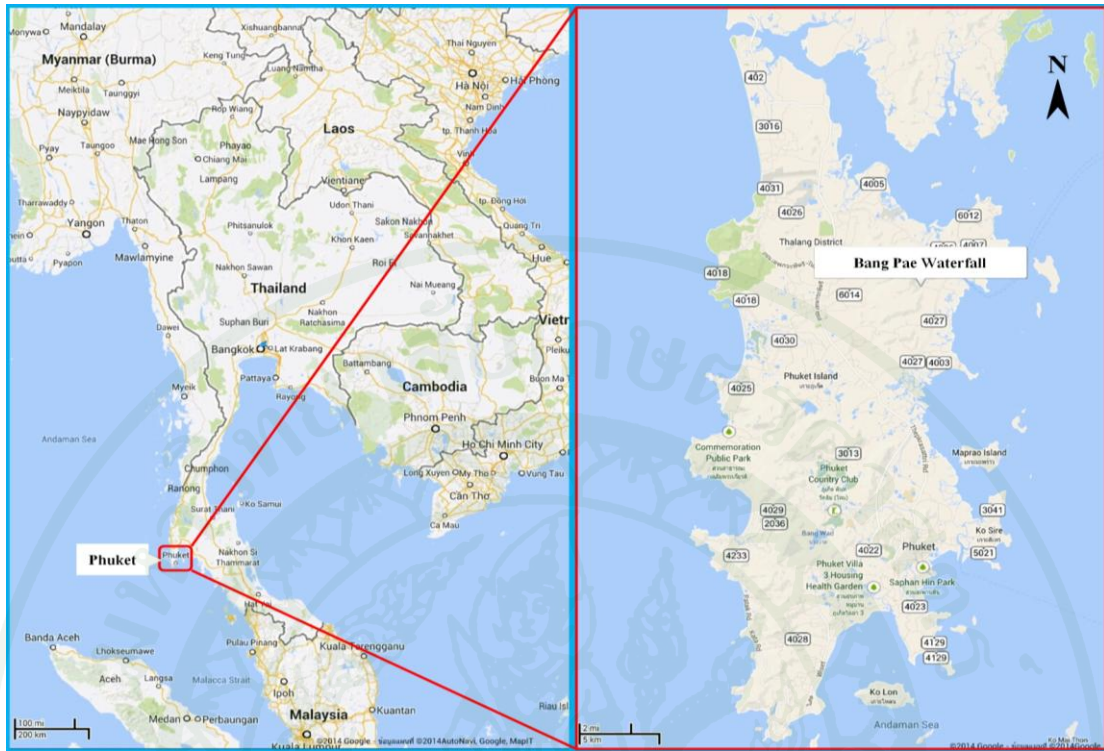
n	Germ cell ( $\mu\text{m}$ )			
	SgI	SgII	PS	SS
1	12.5	10	12.5	10
2	12.5	10	12.5	10
3	15	10	12.5	12.5
4	12.5	10	12.5	12.5
5	12.5	10	12.5	10
6	12.5	7.5	10	10
7	12.5	10	10	12.5
8	12.5	10	12.5	10
9	10	10	10	10
10	12.5	10	10	10
11	12.5	10	10	10
12	12.5	10	12.5	10
13	17.5	10	10	10
14	15	10	10	10
15	12.5	10	10	10
$\bar{x} \pm$	13 $\pm$	9.83 $\pm$	11.17 $\pm$	10.5 $\pm$
SD	1.69	0.65	1.29	1.03

## ตารางผนวกที่ 4 (ต่อ)

n	Germ cell ( $\mu\text{m}$ )								
	St I	St II		St III		ESp		Sp	
		กว้าง	ยาว	กว้าง	ยาว	กว้าง	ยาว	กว้าง	ยาว
1	7.5	5	12.5	2.5	12.5	2.5	10	2.5	12.5
2	7.5	5	10	2.5	12.5	2.5	10	2.5	12.5
3	7.5	2.5	12.5	2.5	12.5	2.5	10	2.5	10
4	7.5	5	12.5	2.5	12.5	2.5	12.5	2.5	12.5
5	7.5	5	12.5	2.5	12.5	2.5	12.5	2.5	10
6	5	5	10	2.5	10	2.5	12.5	2.5	12.5
7	5	5	10	2.5	10	2.5	10	2.5	12.5
8	7.5	5	12.5	2.5	12.5	2.5	12.5	2.5	12.5
9	7.5	5	10	2.5	12.5	2.5	12.5	2.5	12.5
10	5	5	10	2.5	10	2.5	12.5	2.5	12.5
11	5	5	10	2.5	12.5	2.5	12.5	2.5	12.5
12	7.5	5	10	2.5	10	2.5	12.5	2.5	12.5
13	7.5	5	10	2.5	10	2.5	12.5	2.5	12.5
14	5	5	10	2.5	10	2.5	12.5	2.5	12.5
15	5	5	10	2.5	12.5	2.5	12.5	2.5	12.5
$\bar{x} \pm$	6.5 $\pm$	4.83 $\pm$	10.83 $\pm$	2.5 $\pm$	11.5 $\pm$	2.5 $\pm$	11.83 $\pm$	2.5 $\pm$	12.17 $\pm$
SD	1.27	0.65	1.22	0	1.27	0	1.14	0	0.88



ภาพผนวกที่ 1 เขียดดงสุกซัย *Ichthyophis supachaii* Taylor, 1960 ตัวเต็มวัย



ภาพผนวกที่ 2 แผนที่แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างเขาพระเทว อำเภอลาง จังหวัดภูเก็ต

พ.ศ. ๒๕๖๖



ภาพผนวกที่ 3 แผนที่แสดงลักษณะภูมิประเทศของสถานที่เก็บตัวอย่างเขาพระแทว อำเภอดง  
จังหวัดภูเก็ต



ภาพผนวกที่ 4 สถานที่เก็บตัวอย่าง บริเวณน้ำตกบางแป เขาพระแทว อำเภอถลาง จังหวัดภูเก็ต

## การเตรียมสารเคมีและวิธีการย้อมสีทางพาราฟินเทคนิค

### 1. น้ำยาคงสภาพ Bouin's solution

Picric acid (sat. aqu)	75.00 ml
37-40% Formalin	25.00 ml
Glacial acetic acid	5.00 ml

### 2. สีย้อม Harris's haematoxylin and Eosin (H&E)

#### 2.1 Harris's haematoxylin

Haematoxylin crystal	5.00 g
Absolute alcohol	50.00 ml
Ammonium alum	100.00 g
Mercuric oxide (red)	2.50 g
Distilled water	1, 000.00 ml

ต้มน้ำกลั่นในบีกเกอร์ขนาด 1,500 ml ให้เดือด เติม ammonium หรือ potassium alum คนให้ละลาย ละลายผง haematoxylin ใน absolute alcohol ในบีกเกอร์ขนาด 100 ml แล้วเติมลงในสารละลายของ ammonium หรือ potassium alum ที่กำลังเดือด คนให้เข้ากัน ต้มต่อไปอีก 30 วินาที ยกกลงแช่ในน้ำเย็น และเติม mercuric oxide ลงไปอย่างช้าๆ ทีละน้อย ไม่ควรเติมทีเดียวหมด เพราะจะกระเด็นซึ่งอาจเกิดอันตรายได้เนื่องจากเกิดปฏิกิริยารุนแรง คนสารละลายให้เข้ากันจนกระทั่งได้สารละลายสีม่วงน้ำเงินเข้ม ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเทใส่ขวดสีน้ำตาล เก็บไว้นาน 1 สัปดาห์ แต่ถ้ามีความจำเป็นต้องรีบใช้ทันที ก็ใช้ได้เลยหลังจากที่สารละลายเย็นแล้ว สารละลายนี้เก็บไว้ได้นานประมาณ 6 เดือนในที่มีด

การตรวจว่าสารละลายหมดอายุนั้นทำได้โดยหยดสารละลาย 3-5 หยด ในน้ำประมาณ 200 ml ถ้าได้สารละลายสีน้ำตาล แสดงว่าสารละลายหมดอายุ สารละลายที่เก็บไว้ก่อนใช้ให้เติม glacial

acetic acid 2-4 ml ลงในสารละลาย 100 ml เพื่อช่วยให้ haematoxylin เปลี่ยนเป็น hematein อย่างช้าๆ และทำให้การติดสีนิวเคลียสดีขึ้น

## 2.2 Eosin-phloxine solution

### 2.2.1 Stock eosin

Eosin Y	1.00 g
Distilled water	100.00 ml

### 2.2.2 Stock phloxine

Phloxine B	1.00 g
Distilled water	100.00 ml

### 2.2.3 Working solution

Stock eosin	100.00 ml
Stock phloxine	10.00 ml
95% alcohol	780.00 ml
Glacial acetic acid	4.00 ml

เติม glacial acetic acid 0.5 ml ต่อ 100 ml ของ working solution

## 2.3 Acid alcohol, 1%

70% alcohol	1,000.00 ml
Hydrochloric acid	10.00 ml

## 2.4 Ammonium water, 0.2%

Tab water	1,000.00 ml
Ammonium hydroxide, 28%	2.00 ml

### 3. สีย้อม Masson's trichrome

#### 3.1 Weigert's iron haematoxylin (ผสมก่อนใช้ในอัตราส่วนเท่ากัน)

##### สารละลาย A

Haematoxylin	1.00 g
Alcohol, 95%	100.00 ml

##### สารละลาย B

Ferric chloride aqueous solution, 30%	4.00 ml
Distilled water	100.00 ml
Hydrochloric acid, conc.	1.00 ml

#### 3.2 Biebrich scarlet-acid fuchsin

Biebrich scarlet aqueous solution, 1%	180.00 ml
Acid fuchsin aqueous solution, 1%	20.00 ml
Glacial acetic acid	2.00 ml

#### 3.3 Phosphomolybdic-phosphotungstic acid, 2.5%

Phosphomolybdic acid	5.00 g
Phosphotungstic acid	5.00 g
Distilled water	200.00 ml

## 3.4 Phosphotungstic acid, 5%

Phosphotungstic acid	5.00 g
Distilled water	100.00 ml

## 3.5 Glacial acetic, 1%

Glacial acetic acid	1.00 ml
Distilled water	100.00 ml

## 3.6 Aniline blue

Aniline blue	2.50 g
Glacial acetic acid	2.00 ml
Distilled water	100.00 ml

## 3.7 Light green, 2%

Light green, SF yellowish	2.00 g
Distilled water	98.00 ml
Glacial acetic	1.00 ml

## 4. สีย่อย Periodic acid Schiff's-hematoxylin (PAS-H)

## 4.1 Schiff's reagent

Basic fuchsin	1.00 g
Distilled water	200.00 ml
Hydrochloric acid, 1 N	20.00 ml
Sodium metabisulphite (Sodium bisulphate, anhydrous )	1.00 g

ต้มน้ำกลั่นในบีกเกอร์ขนาด 500 ml ให้เดือด เติม basic fuchsin ที่ละน้อย คนให้ละลายยกบีกเกอร์ลงจากเตา แชนในภาชนะที่มีน้ำหล่อเย็นจนกระทั่งสารละลายมีอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส กรองใส่ flask ขนาด 500 ml เติม hydrochloric acid ลงในสารละลาย ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติม sodium metabisulphite แล้วเขย่าให้ละลาย เก็บไว้ในที่มืด 1-2 คืน นำมาเติม activated charcoal 2.0 g เขย่าให้เข้ากันเพื่อฟอกสี กรองใส่ขวดสีน้ำตาลขนาด 250 ml หรือขวดสีขาวหุ้มด้วยอลูมิเนียมฟอยล์ป้องกันแสง สารละลายนี้มีสีเหลืองอ่อน เก็บในที่มืดที่อุณหภูมิห้องได้ประมาณ 6 เดือน ก่อนใช้สารละลายควรทิ้งไว้ให้เท่าอุณหภูมิห้องและเมื่อใช้ข้อมเสร็จแล้วควรนำกลับแช่ตู้เย็นถ้าสารละลายยังไม่เปลี่ยนเป็นสีม่วงแดง แต่ไม่ควรเทสารละลายที่ใช้แล้วกลับใส่ขวดที่เก็บ Schiff's reagent ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงไม่ควรนำกลับมาใช้อีกต่อไป เพราะหมดอายุการใช้ นอกจากนี้อาจทดสอบ Schiff's reagent ว่ายังใช้ได้หรือไม่โดยใช้ 37-40% formalin 10 ml ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 20 ml แล้วหยด Schiff's reagent ลงไป 2-3 หยด ถ้าได้สารละลายสีม่วงแดงทันทีแสดงว่าสารละลายยังดีอยู่ แต่ถ้าสารละลายเปลี่ยนเป็นสีม่วงแดงอย่างช้าๆ ไม่ควรนำสารละลายนี้มาใช้

#### 4.2 Periodic acid, 0.5-1.0% (เตรียมก่อนใช้และใช้ในวันต่อวัน)

Periodic acid	0.5-1.0 g
Distilled water	100.00 ml

#### 4.3 Sulfurous acid (ควรเตรียมก่อนใช้)

Sodium metabisulphite, 10%	6.00 ml
Hydrochloric acid, 1 N	5.00 ml
Distilled water	100.00 ml

#### 4.4 Harris's haematoxylin

## ประวัติการศึกษาและการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายอัคนี ผิวหอม
วัน เดือน ปี เกิด	24 เมษายน 2532
สถานที่เกิด	อำเภอเมืองสุรินทร์ จังหวัดสุรินทร์
ประวัติการศึกษา	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร
ตำแหน่งปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและ/หรือรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-