



ใบรับรองวิทยานิพนธ์

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยา)

ปริญญา

สัตววิทยา	สัตววิทยา
สาขา	ภาควิชา

เรื่อง ศึกษาการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856) โดยวิธีทางมิถุนวิทยา

Histological Observation on Gonadal Development of Freshwater Pearl Mussel, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856)

นามผู้วิจัย นายนพรัตน์ สระแก้ว

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์กรรณิกา ชัชวาลวานิช, วท.ม.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์อุทัยวรรณ โกวิทวที, Ph.D.)

กรรมการ

(รองศาสตราจารย์อมรา ทองปาน, Ph.D.)

กรรมการ

(อาจารย์สุปราณี ชินบุตร, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(รองศาสตราจารย์สมภพ นวีภาพ, วท.ม.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์วินัย อาจคงหาญ, M.A.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ ๒ เดือน พ.ค. พ.ศ. ๒๕๔๙

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ศึกษาการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด
Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana (Lea, 1856) โดยวิธีทางมิถุนวิทยา

Histological Observation on Gonadal Development of Freshwater Pearl Mussel,
Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana (Lea, 1856)

โดย

นายนพรัตน์ สระแก้ว

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (สัตววิทยา)
พ.ศ. 2549

ISBN 974-16-1630-9

นพรัตน์ สระแก้ว 2549: ศึกษาการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *myersiana* (Lea, 1856) โดยวิธีทางมีนุษวิทยา ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สัตววิทยา) สาขาสัตววิทยา ภาควิชาสัตววิทยา ปรธานกรรมการที่ปรึกษา: รองศาสตราจารย์กรรณิกา ชัชวาลวานิช, วท.ม. 143 หน้า ISBN 974-16-1630-9

จากการศึกษาการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และเหงือกในหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *myersiana* ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หลังจากผ่านเทคนิคการเตรียมเนื้อเยื่อ ตั้งแต่หอยระยะไข่ในวัยอายุ 1 วันถึงระยะตัวเต็มวัยอายุ 360 วัน พบว่าอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (acinus) เริ่มปรากฏในหอยอายุ 180 วัน ภายใน acinus ประกอบด้วยเซลล์ซึ่งกำลังพัฒนาเป็น spermatozoa และ spermatozoa เพียงเล็กน้อย นอกจากนี้ไม่พบท่อนำอสุจิ (gonoduct) ในหอยอายุดังกล่าว แต่เริ่มพบในหอยอายุ 210 วัน โครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (acinus) และท่อนำไข่ (gonoduct) เริ่มปรากฏในหอยอายุ 240 วัน ซึ่งช้ากว่าในหอยเพศผู้ประมาณ 60 วัน และโครงสร้างดังกล่าวก็ยังพัฒนาไม่สมบูรณ์ โดยรวมพบว่าโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และท่อนำเซลล์สืบพันธุ์ของทั้งเพศผู้และเพศเมียพัฒนามากขึ้นเมื่อหอยมีอายุมากขึ้น และพัฒนาสมบูรณ์เป็นครั้งแรกในหอยอายุ 270 วัน นอกจากนี้ในหอยเพศเมียอายุ 270 วันมีการเปลี่ยนแปลงของเหงือกแผ่นนอก (outer demibranch) ไปเป็นถุงเพาะฟักตัวอ่อน (marsupia) เหงือกของหอยมุกน้ำจืดเริ่มพัฒนาทางด้านท้าย (posterior) ของลำตัวแล้วมีการสร้าง gill filament เพิ่มจากเดิมมาทางด้านหน้า (anterior) จำนวน gill filament เพิ่มขึ้นเมื่อหอยมีอายุมากขึ้น การศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของเหงือก พบว่า marsupia มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง กล่าวคือมี primary water tube และ secondary water tube เกิดขึ้น ซึ่งพบเฉพาะช่วงที่มีการเพาะฟักตัวอ่อน เมื่อตรวจสอบการสร้าง mucopolysaccharide ด้วยวิธีมิวซเคมี พบว่าสารดังกล่าวพบมากที่สุดที่ mucocyte ซึ่งบวรอบ water tube โดยส่วนมากเป็นชนิด acid mucopolysaccharide และพบมากขึ้นใน primary water tube แต่ไม่พบที่ secondary water tube ของ marsupia และพบมากกว่าที่ water tube ของเหงือกแผ่นใน (inner demibranch) ซึ่งไม่ใช่เป็นที่เพาะฟักตัวอ่อน นอกจากนี้ยังพบมากกว่าที่ water tube ของ inner และ outer demibranch ของหอยเพศผู้ซึ่งมีอายุเท่ากัน สำหรับ gill filament ประกอบด้วย mucocyte ซึ่งสร้างสาร acid และ mixed mucopolysaccharide



ลายมือชื่อนิติศิต

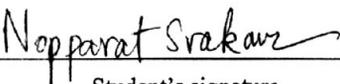


ลายมือชื่อประธานกรรมการ

๒๗ / ๒๕.๕. / ๔๙

Nopparat Srakaew 2006: Histological Observation on Gonadal Development of Freshwater Pearl Mussel, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856). Master of Science (Zoology), Major Field: Zoology, Department of Zoology. Thesis Advisor: Associate Professor Kannika Chatchavalvanich, M.S. 143 pages.
ISBN 974-16-1630-9

Gonadal development of the cultured freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856), was histologically investigated under the light microscope from 1-day-old juveniles to 360-day-old adults. Gill development was also observed especially the modified outer demibranchs, called marsupia, which play a crucial part in brooding embryos and glochidia. Spermatogenesis was first discernible within acini of 180-day-old males; however, the process was scarce and the acini were also scant and minuscule. Male gonoducts were not detectable until the onset of the 210-day-old stage. Moreover, the male gonadal development, which progressed in accordance with the advancement of the mussel, became first mature at the 270-day-old stage coincided with the presence of spermatozoa in the terminal gonoduct suggesting its preparation for spawning. On the contrary, oogenesis, found in follicles, and female gonoducts were initially noticeable at the 240-day-old, lagging behind the spermatogenesis about 60 days. Like the former, the oogenesis and the female gonoducts were fully developed at the 270-day-old stage in conjunction with first appearance of the marsupia indicative of complete development of the female reproductive system. The growth of the gills proceeded at the posterior end of the mussel and developed symmetrically. Newly-formed gill filaments were attached anteriorly to the previous ones and their numbers increased in accordance with the stage of the mussel. Histological descriptions of the marsupia revealed their structural modifications for brooding: primary and secondary water tube, which were present only during the incubation period. Histochemical technique was performed on the gills to characterize and localize mucopolysaccharides. The results showed marked increase in acid mucopolysaccharide-producing mucocytes lining the primary water tube, but not in the secondary water tube of the gravid female. This increment was much more numerous than in any other water tube of the male mussel at the same stage, or even the tubes within the inner demibranchs of the respective female. On the other hand, gill filaments were exclusively composed of two types of mucocytes: acid and mixed mucopolysaccharide-producing mucocytes.


Student's signature


Thesis Advisor's signature

27 / Apr. / 06

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์กรรณิกา ชัชวาลวานิช ประธานกรรมการที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.อุทัยวรรณ โกวิทวาทิ รองศาสตราจารย์ ดร.อมรา ทองปาน และ ดร.สุปราณี ชินบุตร กรรมการที่ปรึกษา ตลอดจนผู้ช่วยศาสตราจารย์อรรถพร หอมจันทร์ ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์สาธิต โกวิทวาทิ อาจารย์มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้านสมเด็จเจ้าพระยา ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างหอยมุกน้ำจืด ขอกราบขอบพระคุณ Prof. Dr. Harold Silverman จาก Louisiana State University, Prof. Dr. Alexei V. Korniushin จาก Institute of Zoology of the National Academy of Sciences, Prof. Dr. Nicola Volpi จาก University of Modena and Reggio, Dr. Suzanne C. Dufour จาก Scripps Institution of Oceanography และ Mr. G. Juhel จาก University College Cork ที่กรุณามอบข้อมูลทางวิชาการเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์และเหงือกของหอยกาน้ำจืด ตลอดจนคำแนะนำอันมีคุณค่า ขอขอบคุณนางสาวกมลพร มาแสวง นางสาวเบญญาภา พึ่งโพธิ์ นางสาววิไลลักษณ์ จำรูญ และนายอิทธิชัย เอี่ยมสุวรรณ ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือ ก่อให้เกิดความสำเร็จของวิทยานิพนธ์เล่มนี้

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา ซึ่งเป็นผู้ให้กำเนิดทั้งความคิดและสติปัญญาแก่ข้าพเจ้า ตลอดจนเป็นผู้ให้การศึกษาค้ำจุนให้กำลังใจ ให้ความรักและเอาใจใส่ดูแล และยังเป็นผู้ปลูกฝังแนวความคิดที่จะนำไปสู่ความถูกต้องตามครรลองแห่งธรรม และความเจริญแห่งชีวิต

การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ได้รับเงินทุนสนับสนุนการวิจัย/วิทยานิพนธ์ ระดับบัณฑิตศึกษา จากมูลนิธิการศึกษาเขต 100 ปี ทุนสนับสนุนงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และทุนสนับสนุนวิทยานิพนธ์ระดับปริญญาโท โครงการพสวท.

คุณค่าและประโยชน์ทางวิชาการของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอกราบแสดงกตเวทิตาแด่ บพพการี และคณาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทความรู้และปัญญาแก่ข้าพเจ้าทั้งในอดีตและปัจจุบัน

นพรัตน์ สระแก้ว

เมษายน 2549

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ.....	(1)
สารบัญภาพ.....	(3)
คำนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	3
การตรวจเอกสาร.....	4
รูปร่างและลักษณะของหอยมุกน้ำจืด <i>Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana</i>	4
วงชีวิต.....	4
ฤดูกาลสืบพันธุ์.....	6
ระบบสืบพันธุ์.....	7
กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์.....	7
ลักษณะเหงือกของหอยมุกน้ำจืด.....	17
การเพาะเลี้ยงหอยกาน้ำจืดระยะ โกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์.....	19
การเพาะเลี้ยงหอยกาน้ำจืดระยะจูวีไนล์ในห้องปฏิบัติการ.....	21
อุปกรณ์และวิธีการ.....	22
การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดระยะ โกลคิเดีย.....	22
การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดระยะจูวีไนล์อายุ 1 วันจนถึงหอยอายุ 360 วัน.....	23
การเตรียมตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดเพื่อศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาค.....	26
สถานที่ทำการทดลอง.....	28
ระยะเวลาในการทดลอง.....	28
ผล.....	29
การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด.....	
<i>Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana</i>	29
การพัฒนาเหงือกของหอยมุกน้ำจืด <i>Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana</i>	31
วิจารณ์.....	101
การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด.....	
<i>Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana</i>	101
การพัฒนาเหงือกของหอยมุกน้ำจืด <i>Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana</i>	104

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
สรุปและข้อเสนอแนะ.....	112
สรุป.....	112
ข้อเสนอแนะ.....	113
เอกสารและสิ่งอ้างอิง.....	114
ภาคผนวก.....	128
ภาคผนวก ก ภาพประกอบ.....	129
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีและสีย้อม.....	132
ประวัติการศึกษา และการทำงาน.....	143

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 1 วัน.....	36
2	ภาพตัดตามขวางหอยอายุ 1 วัน.....	36
3	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 10 วัน.....	38
4	ภาพตัดตามขวางหอยอายุ 20 วัน.....	38
5	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 20 วัน.....	40
6	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 30 วัน.....	40
7	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 30 วัน (แสดงเหงือก).....	42
8	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 40 วัน.....	42
9	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 40 วัน (แสดงเหงือก).....	44
10	ภาพตัดในระนาบ obliquely frontal ของหอยอายุ 40 วัน.....	44
11	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 50 วัน.....	46
12	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 50 วัน (แสดงเหงือก).....	46
13	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 60 วัน.....	48
14	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 60 วัน (แสดงเหงือก).....	48
15	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 80 วัน.....	50
16	ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 80 วัน (แสดงเหงือก).....	50
17	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยอายุ 80 วัน.....	52
18	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ inner demibranch หอยอายุ 80 วัน.....	52
19	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 90 วัน.....	54
20	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ inner demibranch หอยอายุ 90 วัน.....	54
21	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 100 วัน.....	56
22	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยอายุ 100 วัน.....	56
23	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass ของหอยอายุ 120 วัน.....	58
24	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ inner demibranch หอยอายุ 120 วัน.....	58
25	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 140 วัน.....	60
26	ภาพตัดในระนาบ frontal ของเหงือกหอยอายุ 140 วัน.....	60
27	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 160 วัน.....	62

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
28	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยอายุ 160 วัน.....	62
29	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 180 วัน.....	64
30	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 180 วัน.....	64
31	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 180 วัน.....	66
32	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 180 วัน.....	66
33	ภาพขยายของภาพที่ 32.....	68
34	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 210 วัน.....	68
35	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 210 วัน.....	70
36	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยอายุ 210 วัน.....	70
37	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 210 วัน.....	72
38	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 240 วัน.....	72
39	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 240 วัน.....	74
40	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศเมียอายุ 240 วัน.....	74
41	ภาพตัดในแนว frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 240 วัน.....	76
42	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศเมียอายุ 240 วัน.....	76
43	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 240 วัน.....	78
44	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 270 วัน.....	78
45	ภาพขยายของภาพที่ 44.....	80
46	ภาพตัดตามขวางทางด้านหลัง (dorsal) ของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 270 วัน...	80
47	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศเมียอายุ 270 วัน.....	82
48	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 270 วัน.....	82
49	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ inner demibranch หอยเพศเมียอายุ 270 วัน.....	84
50	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน.....	84
51	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน.....	86
52	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน.....	86
53	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน.....	88
54	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน.....	88

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
55	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน.....	90
56	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน.....	90
57	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน.....	92
58	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 300 วัน.....	92
59	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 300 วัน.....	94
60	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 330 วัน.....	94
61	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 330 วัน.....	96
62	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 360 วัน.....	96
63	ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศเมียอายุ 360 วัน.....	98
64	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศเมียอายุ 360 วัน.....	98
65	ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศเมียอายุ 360 วัน.....	100
66	ภาพขยายของภาพที่ 65.....	100

ศึกษาการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด

Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana (Lea, 1856) โดยวิธีทางมิถุนวิทยา

Histological Observation on Gonadal Development of Freshwater Pearl Mussel,

***Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856)**

คำนำ

หอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856) เป็นหอยกาน้ำจืดชนิดหนึ่งซึ่งพบได้ตามแหล่งน้ำจืดทั่วไปในประเทศไทย มีเปลือกหนา และเปลือกด้านในมีความแวววาวเป็นมุก จึงสามารถนำเปลือกมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมเครื่องประดับ และเครื่องเรือนประดับมุก หอยมุกน้ำจืดยังมีความสามารถในการผลิตไข่มุก และได้มีการเพาะเลี้ยงเพื่อนำไข่มุกมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตยา ซึ่งประเทศจีนได้ทำการศึกษา พบว่าไข่มุกมีกรดอะมิโน 17 ชนิด และแร่ธาตุที่เป็นประโยชน์แก่ร่างกาย 8 ชนิด นอกจากนี้หอยมุกน้ำจืดชนิดนี้ยังมีความสำคัญต่อระบบนิเวศเพราะช่วยลดมลภาวะในแหล่งน้ำด้วยการกินอาหารแบบกรอง (filter feeding) และยังสามารถใช้หอยเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (bioindicator) ของแหล่งน้ำโดยเฉพาะหอยในระยะจูเวไนล์ (juvenile) ซึ่งนิยมนำมาทดสอบความเป็นพิษที่ก่อให้เกิดมลภาวะในแหล่งน้ำ อนึ่งหอยกาน้ำจืดยังมีความสำคัญทางโภชนาการโดยเป็นอาหารที่มีคุณค่าทางโปรตีนสูง และสามารถนำมาปรุงเป็นอาหารสำหรับมนุษย์ได้หลายรูปแบบ เช่น ปลา ผักเห็ด และแกงเห็ด เป็นต้น นอกจากนี้ยังใช้เป็นอาหารของสัตว์ได้อีกด้วย ในทางการแพทย์สามารถนำเปลือกชั้นนาคเรียม (nacreous layer) มาใช้เป็นส่วนประกอบในการผ่าตัดซ่อมแซมกระดูกของผู้ป่วยได้

ประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งซึ่งมีศักยภาพในการผลิตไข่มุกน้ำจืด ด้วยเหตุที่ประเทศไทยมีความสมบูรณ์ทั้งด้านแหล่งน้ำ สภาพภูมิอากาศ และทรัพยากรหอยมุกซึ่งมีอยู่ ประกอบกับหอยชนิดนี้มีการแพร่กระจายพันธุ์ในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทยหลายจังหวัด อย่างไรก็ตามในปัจจุบันประชากรหอยมุกน้ำจืดในธรรมชาติลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว เนื่องจากสภาพแวดล้อมของแหล่งน้ำเกิดการเปลี่ยนแปลงไปจนเสียสมดุลธรรมชาติ โดยมีสาเหตุจากการขยายตัวทางด้านอุตสาหกรรม เกษตรกรรม และการขยายตัวของชุมชน รวมทั้งการสร้างเขื่อนกั้นน้ำซึ่งก่อให้เกิดการตื้นเขินในแหล่งน้ำ จากสาเหตุเหล่านี้เท่ากับเป็นการทำลายแหล่งที่อยู่อาศัยและแหล่งอนุบาลหอย

มูกน้ำจืด นอกจากนี้ยังมีการนำหอยมาใช้ประโยชน์อย่างเกินความจำเป็น โดยไม่มีการทดแทนกลับคืนสู่ธรรมชาติ ด้วยเหตุนี้จึงมีความตระหนักถึงการสูญพันธุ์ของหอยชนิดนี้ เป็นเหตุให้เกิดความพยายามที่จะเพาะพันธุ์เพื่อเพิ่มจำนวนหอยชนิดนี้ ทั้งเพื่อการอนุรักษ์และการนำมาใช้ประโยชน์อย่างยั่งยืน ปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่งในการเพาะพันธุ์คือการเข้าใจถึงการสืบพันธุ์ โดยเฉพาะการศึกษาการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมูกน้ำจืดตั้งแต่ระยะจูวีไนล์จนถึงตัวเต็มวัย นับว่ามีความสำคัญและน่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง เพราะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการขยายพันธุ์หอยมูกน้ำจืดและหอยกาน้ำจืดชนิดอื่นๆ ซึ่งจะเป็นการอนุรักษ์ชนิดพันธุ์ของหอยมูกน้ำจืดและสร้างรายได้ให้แก่ประเทศไทยต่อไป

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis*
(*Limnoscapha*) *myersina*
2. เพื่อทราบช่วงอายุที่แท้จริงของการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด
H. (L.) myersina
3. เพื่อศึกษาการพัฒนาเหงือกซึ่งสัมพันธ์กับการพัฒนาตัวอ่อนระยะเอมบริโอและ โกลคี
เดียมของหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersina*
4. เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด และหอยกาน้ำจืดชนิด
อื่น

การตรวจเอกสาร

1. รูปร่างและลักษณะของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana*

เปลือกประกอบด้วย 3 ชั้น ได้แก่ ชั้นนอกสุดเรียกว่า เพริโอสตราคัม (periostracum) มีสีน้ำตาลถึงสีน้ำตาลดำ เมื่อหอยอายุมากขึ้น ชั้นนี้มักถูกกัดเซาะหลุดไปโดยเฉพาะบริเวณอัมโบ (umbo) ทำให้เห็นเปลือกชั้นกลางซึ่งมีสีขาว เรียกว่า ปริสมาติก (prismatic layer) ชั้นด้านในสุดของเปลือกเรียกว่า นาคเรียส (nacreous layer) มีความแวววาวเป็นมุก ความหนาของเปลือกจะมากขึ้นตามอายุ เปลือกด้านซ้ายและขวายึดติดกันทางด้านบน (dorsal) ด้วยเส้นเอ็น (ligament) ที่ยึดติดได้ เปลือกทั้งสองจะนูนออกบริเวณใกล้เส้นเอ็นเรียกว่า อัมโบ (umbo) อัมโบจะอยู่ค่อนไปทางด้านหน้า (anterior) ซึ่งเป็นส่วนของเปลือกที่เกิดก่อน ใต้อัมโบลงมา มีแนวเส้นโค้งเรียงเป็นชั้นๆ เรียกว่า เส้นการเจริญเติบโต (line of growth) ซึ่งเป็นเส้นเรียบทั้งด้านหน้าและด้านหลัง เปลือกทางด้านหน้ามน ส่วนเปลือกทางด้านท้ายเรียวยาว ช่วงกลางของเปลือกด้านบนเป็นรูปสามเหลี่ยมตั้งสูงชัน เรียกว่า posterior wing ทางด้านหน้ามี anterior wing ขนาดเล็ก ในหอยบางตัวอาจถูกทำลายไปเมื่ออายุมากขึ้น (จรัสธาดา, 2514; จ่านงค์, 2527; บพิธ และนันทพร, 2528; Brandt, 1974) ทางด้านหน้าของเปลือกด้านในทั้งสองฝา มีฟันยื่นลงมา เรียกว่า pseudocardinal teeth ส่วนทางด้านท้ายของเปลือกซีกขวามีฟันยื่นลงมาเรียกว่า lateral teeth มีลักษณะเรียวยาว ซึ่งสวมลงมาที่ร่องรองรับบนเปลือกซีกซ้าย เรียกร่องนี้ว่า pit หรือ groove ลักษณะลำตัวของ *H. (L.) myersiana* ด้านข้างทั้งสองด้านมีแผ่นแมนเทิลเป็นแผ่นเนื้อแบนบาง มีซิเลียโบกพัดอยู่ตลอดเวลาเพื่อช่วยให้น้ำไหลเข้าออก ผิวด้านในของแผ่นแมนเทิลติดกับลำตัว ผิวด้านนอกติดกับเปลือก ส่วนขอบของแผ่นแมนเทิลเป็นอิสระทำหน้าที่สร้างเปลือกชั้นเพริโอสตราคัมและปริสมาติก ช่องว่างที่อยู่ระหว่างแผ่นแมนเทิลทั้งสอง เรียกว่า ช่องแมนเทิล (mantle cavity) เป็นที่อยู่ของเหงือก (gill) labial palp เท้า (foot) และกลุ่มอวัยวะภายใน (visceral mass) ซึ่งมีลักษณะอ่อนนุ่มเป็นสีเหลืองอ่อน อยู่เหนือเท้า (จ่านงค์, 2527; Brandt, 1974 และ Barnes, 1987) (ภาพผนวก ก1 และ ก2)

2. วงชีวิต

วงชีวิตของหอยกาน้ำจืด โดยทั่วไป เริ่มต้นเมื่อหอยเพศผู้ปล่อย spermatozoa ในน้ำผ่านทางท่อให้น้ำออก (excurrent siphon) หลังจากนั้นหอยเพศเมียจะรับ spermatozoa เข้ามาทางท่อน้ำเข้า (incurrent siphon) และปฏิสนธิกับไข่ในบริเวณท่อน้ำ (water tube) บนแผ่นเหงือกของหอย

เพศเมียที่ฟองออกเป็นถุงเพาะฟักตัวอ่อน เรียกว่า marsupia (Smith, 2001) ไข่ที่ปฏิสนธิแล้วจะพัฒนาเป็นตัวอ่อนที่เรียกว่าไกลคิเดีย (glochidia) มีฝา 2 ฝา ขยับปิดเปิดได้ ที่ขอบฝาไกลคิเดียของหอยกาบบางชนิดมีโครงสร้างคล้ายตะขอ เรียกว่า hook (Miller and Harley, 1994; McMahon and Bogan, 2001) บริเวณกลางลำตัวมีเส้นใยยาว (thread) สำหรับยึดเกาะปลา (McMahon and Bogan, 2001) เมื่อแม่หอยปล่อยไกลคิเดียในน้ำ ไกลคิเดียจะเข้าเกาะที่บริเวณเหงือกหรือครีบก้นของปลาแล้วกระตุ้นให้ปลาสร้างเนื้อเยื่อล้อมรอบไกลคิเดียเกิดเป็น cyst (Smith, 2001) ไกลคิเดียที่อยู่ใน cyst จะดำรงชีวิตแบบปรสิต (parasite) โดยรับสารอาหารผ่านทางน้ำเลือดของปลาและพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปร่างจนเข้าสู่ระยะจูวีไนล์ (juvenile) ตัวอ่อนระยะนี้จะเคลื่อนตัวออกจาก cyst และตกลงสู่พื้นท้องน้ำ ดำรงชีวิตเป็นอิสระเพื่อเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (อรภา, 2543; Kondo, 1987; Pennak, 1989; Jessop, 1995; Conn, 2000) แต่หอยกาบน้ำจืดในกลุ่ม Dreissenid เช่น *Dreissena polymorpha* มีความแตกต่างจากหอยกาบน้ำจืดทั่วไป เนื่องจากมีการปฏิสนธิเกิดขึ้นภายนอกลำตัว (external fertilization) จึงมีตัวอ่อนที่ว่ายน้ำเป็นอิสระ (free swimming larva) (Sprung, 1991) การพัฒนาของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิเป็น ไกลคิเดียใน marsupia จะใช้ระยะเวลาแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของหอยและอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญ (สุชาติ และคณะ, 2538) เช่น ไข่ของหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* ใช้เวลา 5-9 วัน (อรภา และคณะ, 2537; อรภา, 2543) แต่ *Chamberlainia hainesiana* และ *H. (H.) bialatus* ใช้เวลาพัฒนาเป็น ไกลคิเดีย 6-10 วัน (อรภา และคณะ, 2537; อรภา, 2543; ธวัชชัย และคณะ, 2546) โดย *H. (H.) bialatus* ใช้ระยะเวลาในการพัฒนาจากไข่โกตจนกลายเป็น ไกลคิเดียเฉลี่ย 7.67 ± 1.30 วัน (ธวัชชัย และคณะ, 2546) แต่ในช่วงเดือนธันวาคมซึ่งมีอุณหภูมิของน้ำเท่ากับ 24-25 องศาเซลเซียส พบว่าระยะเวลาของการพัฒนานานประมาณ 9-10 วัน แต่ถ้าอุณหภูมิของน้ำเพิ่มสูงขึ้น ระยะเวลาของการพัฒนาจะสั้นลง โดยใช้เวลาประมาณ 5-6 วัน (อรภา และคณะ, 2537; อรภา, 2543; ธวัชชัย และคณะ, 2546) ลักษณะรูปร่างและสีของ marsupia จะเปลี่ยนแปลงตามการพัฒนาจากไข่เป็น ไกลคิเดีย เช่นในหอยมุกน้ำจืด *H. (H.) bialatus* ขณะที่ไม่มี การพัฒนาตัวอ่อนใน marsupia แผ่นเหงือกจะมีลักษณะแบนบาง ไม่มีสี หลังจากนั้น แผ่นเหงือกจะบวมพองขึ้น พร้อมกับมีเซลล์ไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิเป็นวันแรกพัฒนาอยู่ภายใน โดย marsupia ระยะนี้มีสีขาว และจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองอ่อน สีเหลือง สีน้ำตาลอ่อน และสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลอมแดง ในขณะที่ตัวอ่อนพัฒนาเป็น ไกลคิเดียตัวเต็มวัยตามลำดับ (ธวัชชัย และคณะ, 2546) สีของ marsupia เกิดจากสีของไกลคิเดีย เช่น ไกลคิเดียของหอยกาบน้ำจืด *Inversidens japaensis*, *Unio douglasiae* และ *Anodonta woodiana* มีสีเหลืองอ่อน พวก *Pseudodon omensis* และ *I. yanagawensis* มีสีขาวนํ้านม ส่วน *I. brandi* มีสีส้ม และ *Lanceolaria grayana* มีสีแดงเข้ม เป็นต้น (Kondo, 1987) เมื่อแม่หอยปล่อยไกลคิเดียออกจาก marsupia แล้ว การพัฒนาตัวอ่อนระยะ

โกลกิดีใน marsupia ครั้งต่อไปของหอยกาบบางชนิดสามารถเกิดต่อเนื่องได้อย่างรวดเร็ว เช่น *H. (H.) bialatus* เว้นระยะเวลาการเกิด marsupia แต่ละครั้งประมาณ 18 ชั่วโมงถึง 36 ชั่วโมงเท่านั้น (รัชชชัย และคณะ, 2546) โกลกิดีที่ออกจาก marsupia จะเข้าเกาะกับปลาเพื่อเจริญพัฒนาเป็นตัวอ่อนระยะจูวีไนล์ (juvenile) โดยระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนาจากโกลกิดีเป็นจูวีไนล์ในหอยกาบน้ำจืดแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป เช่น หอยกาบน้ำจืดในกลุ่ม Unionacea ระยะที่เป็นปรสิตอาจใช้เวลาตั้งแต่ 6-193 วัน แต่โดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 10-20 วัน (สุชาติ และคณะ, 2538) หลังจากนั้นจูวีไนล์จะผละออกจากตัวปลาและเจริญเติบโตเป็นตัวเต็มวัยต่อไป (ภาคผนวก ก3)

3. ฤดูกาลสืบพันธุ์

ฤดูกาลสืบพันธุ์ของหอยกาบแตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของหอยกาบและเขตการแพร่กระจายพันธุ์ตามตำแหน่งละติจูด (Smith, 2001) หอยกาบในเขตอบอุ่นมีการผสมพันธุ์ปีละครั้งคือ ระหว่างฤดูร้อนหรือฤดูใบไม้ผลิ ส่วนหอยกาบในเขตร้อนอาจมีการผสมพันธุ์ได้สองครั้ง และบางชนิดผสมพันธุ์ได้เกือบตลอดทั้งปี (สุชาติ และคณะ, 2538) โดยพิจารณาจากช่วงเวลาการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และการมีตัวอ่อนระยะ โกลกิดี หอยกาบบางชนิดสร้างเซลล์สืบพันธุ์ได้ในบางช่วงเวลาของปี แต่บางชนิดสร้างได้ตลอดทั้งปี (Smith, 2001) เช่น หอยมุกน้ำจืด *C. hainesiana* และ *H. (L.) myersiana* มีการเพาะฟักตัวอ่อนใน marsupia ระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนกุมภาพันธ์ และเดือนกันยายนถึงเดือนพฤษภาคม ตามลำดับ (อรภา, 2543) ส่วนหอยกาบน้ำจืดในกลุ่ม Unionidae 6 ชนิด ในประเทศญี่ปุ่น มีการสืบพันธุ์ระหว่างเดือนมีนาคมถึงสิงหาคม (Kondo, 1987) แต่หอยมุกน้ำจืด *Margaritifera margaritifera* บางตัวจะไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในบางปี หอยกาบน้ำเค็มบางชนิดเช่น *Mya arenaria* มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ปีละครั้ง โดยเริ่ม สร้างเซลล์สืบพันธุ์ในปลายฤดูหนาวหรือต้นฤดูใบไม้ผลิ แล้วปล่อยออกจากตัวหอยในฤดูใบไม้ผลิหรือต้นฤดูร้อน ส่วนในฤดูหนาวไม่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Ropes and Stickney, 1965) หอยกาบน้ำเค็ม *Ostrea edulis* สร้างเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม แต่ฤดูสืบพันธุ์เริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคมถึงเดือนพฤศจิกายน (Cáceres-Marténeez *et al.*, 1995) ส่วนหอยกาบน้ำเค็ม *Gafrarium pectinatum* สามารถสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้หรือเมีย หรือทั้งสองเพศได้ตลอดทั้งปี

4. ระบบสืบพันธุ์

ระบบสืบพันธุ์ในหอยกาน้ำจืดแบ่งได้เป็นสองกลุ่ม ได้แก่ หอยกานที่มีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียแยกกัน (dioecious) และหอยกานที่มีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และเพศเมียอยู่ในตัวเดียวกัน (monoecious) (สุชาติ และคณะ, 2538) ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของหอยกานทั้งเพศผู้และเพศเมียมีความคล้ายคลึงกัน กล่าวคืออัณฑะ (testis) และรังไข่ (ovary) อยู่บริเวณเหนือเท้า หอยกานที่มีระบบสืบพันธุ์แบบเพศรวมมีอวัยวะสืบพันธุ์หนึ่งคู่ที่อยู่ใกล้หรือติดกับ digestive gland ซึ่งส่วนมากแล้วอวัยวะสืบพันธุ์ที่เป็นคู่นี้จะอยู่ชิดกันมากจนแยกไม่ออกในหอยกานหลายชนิด (สุชาติ และคณะ, 2538; Tompa *et al.*, 1984) ดังที่พบในหอยกานน้ำเค็มในสกุล *Myonera*, *Cuspidaria*, *Panomya*, *Thysaria* และหอยกานน้ำจืดในกลุ่ม Unionidae บางชนิด (Tompa *et al.*, 1984) หอยกานน้ำจืดส่วนใหญ่และหอยกานน้ำเค็มบางชนิด เช่นหอย *Crassostrea virginica* (Loosanoff, 1965; Jessop, 1995) เป็นหอยที่มีเพศแยก พบว่าระบบสืบพันธุ์อยู่ติดกับระบบทางเดินอาหาร โดยส่วนของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) จะห่อหุ้มและแทรกในพื้นที่ระหว่างกระเพาะอาหาร ลำไส้ และ digestive gland (Jessop, 1995) หอยกานบางชนิดสามารถจำแนกเพศได้จากสีของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เช่นหอย *Placopecten magellanicus* เพศผู้มีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์สีขาว ส่วนเพศเมียมีสีส้ม (Conn, 2000) ในหอย *Lima scabra* เพศผู้มีอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์สีเทา ส่วนเพศเมียมีสีน้ำตาล (Lodeiros and Himmelman, 1999) การสืบพันธุ์ของหอยกานน้ำจืดที่มีสองเพศในตัวเดียวกัน เช่น หอยในกลุ่ม Sphaeriidae และหอยบางชนิดในกลุ่ม Unionidae มีการปฏิสนธิในตัวเอง (self-fertilization) การปฏิสนธิเกิดขึ้นในส่วนของ reproductive duct (Pennak, 1989) สำหรับหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* เป็นหอยที่มีเพศแยกจึงมีการผสมพันธุ์ข้าม (cross fertilization) โดยการปฏิสนธิเกิดภายในหอยเพศเมีย (internal fertilization)

5. กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วยการสร้างอสุจิและการสร้างไข่ การศึกษาเรื่องการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยสองฝา น้ำจืด มีผู้รายงานไว้เป็นจำนวนน้อย ดังนั้นข้อมูลส่วนใหญ่จึงเป็นข้อมูลเกี่ยวกับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยสองฝา น้ำเค็ม กระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ดังกล่าว มีดังนี้

5.1 กระบวนการสร้างอสุจิ

การสร้างอสุจิของหอยกาบน้ำจืดและหอยกาบน้ำเค็ม เกิดขึ้นภายในโครงสร้างลักษณะคล้ายถุงที่กระจายอยู่ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (Sastry, 1979; Franzén, 1987) โดยเรียกโครงสร้างคล้ายถุงดังกล่าวได้หลากหลายเช่น acinus (Heard, 1975; Tompa *et al.*, 1984; Jones *et al.*, 1986; Henley, 2002) alveolus (Ropes and Stickney, 1965) follicle (Loosanoff, 1962) germinal follicle (Hodgson and Bernard, 1986) และ seminiferous tubule (Morton, 1990) เป็นต้น การสร้างอสุจิเริ่มต้นจาก primary gonial cell (Sastry, 1979; Franzén, 1987; Morse and Zardus, 1997) หรือ spermatogonium mother cell (Vendonk *et al.*, 1983) ซึ่งเรียงตัวอยู่ที่ผนังด้านในของ acini (Hodgson and Bernard, 1986) แบ่งเซลล์แบบ mitosis เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ได้เป็น primary spermatogonia และ secondary spermatogonia ตามลำดับ หลังจากนั้น secondary spermatogonia จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น primary spermatocyte แล้วเกิดการแบ่งเซลล์แบบ meiosis 2 ครั้ง กลายเป็น secondary spermatocyte และ spermatid ตามลำดับ (de Jong-Brink *et al.*, 1977) spermatid จะเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น spermatozoa แต่ในหอยกาบบางชนิดมีเซลล์สืบพันธุ์ในระยะ spermatid morulae ซึ่งเกิดจากการรวมกลุ่มของ spermatid ในระยะต้น (early spermatid) หลังจากนั้นจึงแยกตัวออกเป็น spermatid เซลล์เดี่ยว (Matos *et al.*, 1998) โดยพบ spermatid morulae ในหอยกาบที่อยู่ในกลุ่ม Unionacea และหอยทะเลบางชนิด (Tompa *et al.*, 1984) เช่น หอยกาบน้ำจืด *Prisodon alatus* (Matos *et al.*, 1998) และ *M. margaritifera* (Smith, 1980) หอยกาบน้ำเค็ม *O. edulis* (Loosanoff, 1962) และ *S. solidissima* (Ropes, 1968) เป็นต้น ในระหว่างการแบ่งเซลล์ทุกระยะจะมี intercellular bridge (Longo and Dornfeld, 1967) หรือ cytoplasmic bridge เชื่อมระหว่างเซลล์ที่พัฒนามาจากเซลล์เริ่มต้นเดียวกัน เพื่อช่วยให้การแบ่งเซลล์และการพัฒนาของเซลล์เป็นไปโดยพร้อมกัน (Fawcett, 1961; Rocha and Azevedo, 1990; Sousa *et al.*, 1989) ในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้ง ไซโทพลาซึมของเซลล์จะลดลง ทำให้ germ cells ในแต่ละระยะมีขนาดเล็กลงและเคลื่อนที่เข้าสู่ศูนย์กลางของท่อ (lumen) ที่อยู่ภายใน acini และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการแบ่งเซลล์ ภายใน lumen จะเต็มไปด้วยเซลล์สืบพันธุ์ซึ่งเจริญเต็มที่ (mature gametes) โดยเซลล์รุ่นใหม่พร้อมพัฒนาจะอยู่ที่บริเวณผนังของ acini (Morse and Zardus, 1997)

รัชชชัย (2546) ได้ศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ในวงสืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *H. (H.) bialatus* และได้รายงานลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในแต่ละระยะไว้ดังนี้

spermatogonia เป็นเซลล์ที่มีขนาดใหญ่ที่สุด โดยมีขนาดเฉลี่ย $5.78 \pm 0.78 \times 6.92 \pm 0.77$ ไมโครเมตร พบอยู่ติดกับ basement membrane นิวเคลียสรูปกลมหรือรี ขนาดใหญ่ ติดสีน้ำเงินของ hematoxylin พบโครมาทินเป็นกลุ่มกระจายทั่วนิวเคลียส ไซโทพลาซึมมีน้อย ติดสี hematoxylin อ่อนกว่านิวเคลียส

primary spermatocyte เซลล์มีขนาดเล็กกว่า spermatogonia ขนาดเฉลี่ย $3.95 \pm 0.27 \times 4.83 \pm 0.40$ ไมโครเมตร เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม อยู่ถัดเข้ามาทางด้านในของ acini นิวเคลียสมีรูปร่างกลม ติดสีเข้มกว่านิวเคลียสของ spermatogonia โครมาทินเป็นเส้นหยาบติดสีน้ำเงิน นอกจากนี้ primary spermatocyte บางเซลล์มีโครมาทินอยู่เป็นกลุ่มรอบๆ นิวเคลียส ทำให้พื้นที่บางส่วนภายในนิวเคลียสเป็นพื้นที่ว่าง นิวเคลียสมักอยู่ในระยะ prophase-I ของการแบ่งเซลล์แบบ meiosis-I

secondary spermatocyte เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเล็กกว่า primary spermatocyte ขนาดเฉลี่ย $2.38 \pm 0.33 \times 3.06 \pm 0.17$ ไมโครเมตร นิวเคลียสติดสี hematoxylin ใกล้เคียงกับ primary spermatocyte โครมาทินเรียงตัวกันแน่นที่ขั้วนิวเคลียส ทำให้ช่องว่างในนิวเคลียสน้อย เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม โดยเซลล์บางกลุ่มอยู่ถัดเข้ามาใกล้ lumen ของ acini แต่เซลล์บางกลุ่มอยู่ใกล้กับผนังของ acini

spermatid morulae เซลล์อยู่รวมกันเป็นรูปทรงกลมขนาดใหญ่ ลักษณะคล้ายดอกไม้ นิวเคลียสรูปวงกลมหรือรี ขอบเขตเซลล์ไม่ชัดเจน นิวเคลียสย้อมติดสี hematoxylin เข้ม พบ spermatid morulae กระจายอยู่ทั่วไปใน acini โดยแต่ละ morula มีจำนวนเซลล์แตกต่างกัน ตั้งแต่ 2 เซลล์ ถึงมากกว่า 20 เซลล์ ทำให้ขนาดของ morula แตกต่างกันไป

spermatid เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเล็ก เซลล์มีขนาดเฉลี่ย $2.00 \pm 0 \times 2.00 \pm 0$ ไมโครเมตร อยู่รวมกันเป็นกลุ่มใหญ่ นิวเคลียสย้อมติดสี hematoxylin เข้มกว่า secondary spermatocyte โครมาทินอัดตัวกันแน่นอยู่ทั่วนิวเคลียส พบกลุ่มเซลล์กระจายอยู่ทั่วไปใน acini โดยกลุ่มเซลล์ส่วนใหญ่อยู่ถัดเข้ามาทางด้านในของ acini ใกล้ lumen มากขึ้น

spermatozoa เป็นเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงมาจาก spermatid เซลล์มีขนาดเล็ก ส่วนหัวมีขนาดประมาณ $1.16 \pm 0.13 \times 2.32 \pm 0.14$ ไมโครเมตร นิวเคลียสรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า ปลายด้านบนมีรูปร่างโค้ง ส่วนด้านฐานตัดตรง เซลล์ย้อมติดสี hematoxylin เข้มมาก พบส่วนหางเป็นเส้นบางๆ ติด

กับส่วนฐานของหัว เซลล์อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม อยู่เข้ามาใกล้บริเวณศูนย์กลางของ acini ติดกับ lumen เซลล์มีการจัดเรียงตัวโดยหันส่วนหางเข้าสู่ lumen เพื่อเตรียมปล่อยออกจาก acini เข้าสู่ท่อนำอสุจิ (gonoduct) ซึ่งเป็นท่อที่เชื่อมต่อกับ acini

ลักษณะ โครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และรูปแบบการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แตกต่างกันตามชนิดของหอยกาบ หอยกาบโดยทั่วไปมีฤดูกาลสืบพันธุ์ที่แน่นอน จึงทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่เห็นได้ชัดเจน และสามารถจำแนกออกเป็นระยะต่างๆ ได้หลายระยะ เช่น หอยกาบน้ำจืด *Elliptio complanata* มีระยะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ 6 ระยะ ได้แก่ ระยะ inactive, early active, late active, mature, spawned และ resorbing ตามลำดับ การแบ่งระยะดังกล่าว อาศัยลักษณะการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เป็นหลัก ซึ่งจะแตกต่างกันตามการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยแต่ละชนิด และขึ้นกับเกณฑ์ในการตัดสินใจของผู้ทำการศึกษา จึงทำให้การจำแนกระยะของการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้สามารถทำได้หลายรูปแบบ ซึ่งสรุปได้ดังนี้

Morriconi *et al.* (2002) จำแนกระยะการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เป็น 6 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ภายในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มี acini จำนวนมาก มีพื้นที่ระหว่าง acini เล็กน้อย ภายใน acini พบเซลล์สืบพันธุ์ระยะ spermatogonia, spermatocyte, spermatid และ spermatozoa ซึ่ง spermatozoa มีการจัดเรียงตัวโดยหันส่วนหางเข้าสู่ lumen แตกต่างจากผลการศึกษาของ Henley (2002) และ Nagachinta and Meejui (1998) ซึ่งพบว่าไม่มีการพัฒนาของ germ cells ในระยะนี้

ระยะที่ 2 acini มีขนาดใหญ่ขึ้น spermatocyte และ spermatid รวมกลุ่มอยู่กันเป็นแถว มองเห็นชัดเจน จำนวนของ spermatozoa เพิ่มมากขึ้น แต่ Nagachinta and Meejui (1998) พบ spermatogonia, spermatocyte และ spermatid เท่านั้นในระยะนี้

ระยะที่ 3 acini มีขนาดใหญ่ขึ้น spermatocyte และ spermatid ลดจำนวนลงมาก lumen มีขนาดใหญ่และมี spermatozoa อยู่เต็มในบาง acini เพื่อพร้อมปล่อยออกสู่ท่อนำอสุจิ

ระยะที่ 4 spermatozoa ลดจำนวนลงมาก เกิดเป็นช่องว่างบางส่วนใน acini กลุ่มของ spermatocyte และ spermatid เรียงตัวอย่างกระจาย ไม่เป็นระเบียบ ส่วน acini มีรูปร่างไม่แน่นอน เนื่องจากมีการหดตัวของ acini แต่ Henley (2002) พบว่าในระยะนี้ spermatozoa จะอยู่เต็ม acini

ระยะที่ 5 acini มีขนาดเล็กและมีรูปร่างไม่แน่นอน ภายในมี spermatocyte และ spermatid เล็กน้อย acini อยู่ห่างกันทำให้มีพื้นที่ระหว่าง acini มาก นอกจากนี้ Henley (2002) พบว่า ใน acini มี hemocyte และ phagocyte รวมอยู่ด้วย

ระยะที่ 6 acini มีขนาดเล็ก พบพื้นที่ระหว่าง acini จำนวนมาก ภายใน acini มี spermatogonia และ spermatozoa เล็กน้อย ส่วน Henley (2002) และ Nagachinta and Meejui (1998) พบว่า acini มีลักษณะเหี่ยวแฟบและขนาดเล็กลง

Ropes (1968) จำแนกระยะการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เป็น 5 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ผนังของ acini หนา ส่วน spermatogonia ที่อยู่ติดผนังมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วและเคลื่อนที่เข้าสู่ศูนย์กลางของ lumen เซลล์มีขนาดใหญ่ กลม นิวเคลียสรูปไข่ ล้อมรอบด้วยไซโทพลาซึมบางๆ ที่มีรูปร่างไม่แน่นอน primary spermatocyte มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 3-4 ไมโครเมตร

ระยะที่ 2 พบ secondary spermatocyte และ spermatid ซึ่ง secondary spermatocyte มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 2-3 ไมโครเมตร พบโครมาตินชนิดสี basic เข้มอยู่เกือบเต็ม นิวเคลียส ไซโทพลาซึมมีรูปร่างและขนาดไม่แน่นอน spermatid ย้อมติดสี basic เข้ม อยู่รวมกันเป็นกลุ่มหนาแน่นในบริเวณใกล้ศูนย์กลางของ lumen เซลล์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1.5 ไมโครเมตร หลังจากนั้น spermatid เปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็น spermatozoa ซึ่งอยู่ภายใน lumen โดยเรียงตัวกันคล้าย column และหันส่วนหางเข้าสู่ศูนย์กลางของ lumen ส่วนหัวของ spermatozoa มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1 ไมโครเมตร

ระยะที่ 3 พบ spermatozoa เป็นจำนวนมาก spermatozoa ที่เจริญเต็มที่ จะรวมกลุ่มหนาแน่นบริเวณศูนย์กลางของ lumen บาง acini พบ spermatozoa มีการเคลื่อนที่แบบหมุนวนอยู่ภายใน หรือมีการจัดเรียงตัว โดยหันส่วนหางเข้าสู่ศูนย์กลางของ lumen หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่ม

spermatozoa ที่พบมีปริมาณมากกว่าเซลล์ซึ่งอยู่ในระยะเริ่มแรกที่อยู่บริเวณผนังของ acini แตกต่างจากการศึกษาของ Morton (1985) ซึ่งพบว่า ในระยะนี้มี spermatid จำนวนมากและมี spermatozoa จำนวนน้อย

ระยะที่ 4 บริเวณศูนย์กลางของ acini ยังมี spermatozoa อยู่ แต่ปริมาณน้อยกว่าในระยะที่ 3 ผนังของ aciniหนาและเรียงตัวกันหนาแน่น บริเวณเยื่อที่ฐานของ acini มี spermatogonia และ primary spermatocyte

ระยะที่ 5 พบว่า acini ของหอยที่ปล่อย spermatozoa แล้ว จะมี spermatozoa เหลืออยู่เพียงเล็กน้อย ภายใน lumen เป็นที่ว่าง ผนังของ acini มี primary spermatogonia ที่แบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว

Jones *et al.* (1986) จำแนกระยะการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เป็น 3 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 พบกลุ่มของ spermatogonia และ sperm-morulae จำนวนมาก

ระยะที่ 2 พบกลุ่มของ primary spermatocytes, secondary spermatocytes, spermatid และ spermatozoa

ระยะที่ 3 พบ spermatozoa จำนวนมาก กระบวนการสร้างอสุจิลดต่ำลง

5.2 กระบวนการสร้างไข่

การสร้างไข่ของหอยกาบน้ำจืดและหอยกาบน้ำเค็ม เกิดขึ้นภายในโครงสร้างคล้ายถุงที่กระจายอยู่ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ โครงสร้างดังกล่าวมีชื่อเรียกหลากหลาย เช่น acinus (Pipe, 1987a; Dorange and Le Penne, 1989a; Henley, 2002) alveolus (Ropes and Stickney, 1965; Ropes, 1968) และ follicle (Jones *et al.*, 1986; Cáceres-Marténe, 1995) เป็นต้น การสร้างเซลล์ไข่เริ่มต้นจาก primordial germ cell (de Jong-Brink *et al.*, 1983; Dorange and Le Penne, 1989b) ซึ่งมีขนาดประมาณ 5-7 ไมโครเมตร (Pipe, 1987a; Dorange and Le Penne, 1989a) พัฒนากลายเป็น primary oogonia แล้วผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์แบบ mitosis กลายเป็น secondary

oogonia หลังจากนั้นแบ่งเซลล์แบบ meiosis I ได้เซลล์ primary oocyte และแบ่งเซลล์แบบ meiosis II ได้เซลล์ secondary oocyte ซึ่งพัฒนาต่อไปกลายเป็น mature oocyte (de Jong-Brink *et al.*, 1983; Dorange and Le Penec, 1989b) ต่อมา mature oocyte ถูกปล่อยออกมาที่ lumen ของ acini และเคลื่อนที่ผ่าน lumen ของท่อไข่เพื่อปล่อยไข่ (Daniels *et al.*, 1973; de Jong-Brink *et al.*, 1983; Dorange and Le Penec, 1989b) ตลอดระยะเวลาของการพัฒนา เซลล์ไข่มักมี stalk ซึ่งเป็นก้านเชื่อมติดกับผนังของ acini โดยเชื่อมต่อกับเซลล์พี่เลี้ยง (auxiliary cell) ที่ทำหน้าที่ในการเตรียมสารอาหารและส่วนประกอบของไข่แดง (yolk) ให้กับ oocyte (Rebhun, 1962) เซลล์ไข่จะหลุดออกจาก stalk เมื่อเซลล์ถูกล้อมรอบด้วย vitelline layer (Pipe, 1987a; Dorange and Le Penec, 1989a) หลังจากการวางไข่สิ้นสุดลง เซลล์ไข่ที่เหลืออยู่ใน acini จะถูกทำให้สลาย (resorb) หรือกระจายออกจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เช่น ไข่ของหอย *Cucumerunio novaehollandiae* ระยะ primary oocyte และ secondary oocyte มีแกนเชื่อมต่อกับผนังของ follicle เมื่อ oocyte เจริญเต็มที่แล้วจะถูกปล่อยออกสู่ภายนอก โดย oocyte บางส่วนที่เหลืออยู่ใน ovary จะถูกทำให้สลาย (Jones *et al.*, 1986) นอกจากนี้ในหอยหลายชนิดมีการเสื่อมสลาย (degeneration or astresia) ของ oocyte ซึ่งเป็นวิธีการผลิตไข่ให้เกิดความสมดุลกับสถานะที่มีสารอาหารปริมาณต่ำ (Lubet *et al.*, 1986; Pipe, 1987b) หรือในสถานะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม (Motavkine and Varaksine, 1983; Le Penec *et al.*, 1991)

การจำแนกระยะการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียมีหลากหลายรูปแบบ โดยอาจจำแนกออกเป็น 6 ระยะ (Henley, 2002; Nagachinta and Meejui, 1998) หรือ 5 ระยะ (Ropes and Stickney, 1965; Ropes, 1968; Cáceres-Marténeez *et al.*, 1995) ซึ่งสรุปได้ดังนี้

Nagachinta and Meejui (1998) จำแนกระยะการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเป็น 6 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 ไม่ปรากฏเซลล์สืบพันธุ์ในอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

ระยะที่ 2 มี eosinophilic granular cell และ oogonia กับ oocyte ระยะแรก

ระยะที่ 3 ปริมาณของ eosinophilic granular cell ลดลง ใน acini ประกอบด้วย oogonia และ oocyte ระยะแรก

ระยะที่ 4 ภายใน acini มี oocyte ที่เจริญเต็มที่ (mature oocyte) มากกว่า oocyte ระยะแรก oocyte ที่เจริญเต็มที่ที่มีรูปร่างกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 117.50 ไมโครเมตร และเคลื่อนที่มาอยู่บริเวณกลาง acini

ระยะที่ 5 ผนังของ acini บางมาก oocyte ที่เจริญเต็มที่บางส่วนถูกปล่อยออกจาก acini จึงปรากฏเป็นช่องว่างใน acini

ระยะที่ 6 oocyte ซึ่งเจริญเต็มที่ ถูกปล่อยออกจาก acini เป็นจำนวนมาก acini มีลักษณะเหี่ยวแฟบและมีขนาดเล็กลง

โดย Ropes (1968) จำแนกระยะการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเป็น 5 ระยะ ดังนี้

ระยะที่ 1 เซลล์ oogonia ฝังตัวอยู่ที่ผนังของ acini เซลล์มีนิวเคลียสกลม หรือรูปไข่ นิวคลีโอลัส (nucleolus) ติดสี basic ส่วนนิวคลีโอพลาซึม (nucleoplasm) มีรูปร่างไม่แน่นอน ย้อมติดสี basic เข้ม ไซโทพลาซึมมีรูปร่างไม่แน่นอน oogonia ในระยะนี้อาจเป็นเซลล์ที่อยู่ในระยะ pre-meiotic phase เช่นเดียวกับที่พบในหอย *Eremina desertorum* (Fahmy, 1949) และใน *Mya arenaria* (Coe and Turner, 1938) oocyte ระยะแรกส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม นิวเคลียสรูปไข่ มีนิวคลีโอลัสติดสี basic ส่วนนิวคลีโอพลาซึมมีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกัน oocyte เรียงตัวอยู่ที่บริเวณรอบๆ ผนังของ acini และมีรูปร่างหลายแบบ เช่น รูปสี่เหลี่ยม สามเหลี่ยม ทรงกระบอก หรือครึ่งวงกลม โดย oocyte มีก้านเชื่อมต่อกับ basement membrane ของ acini นิวเคลียสมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-20 ไมโครเมตร โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.10 ไมโครเมตร

ระยะที่ 2 พบว่า oocyte มีขนาดใหญ่ขึ้นและมีรูปร่างกลม ภายในนิวเคลียสมีนิวคลีโอลัสย้อมติดสี basic ส่วนนิวคลีโอพลาซึมมีลักษณะคล้าย granule ที่เป็นเนื้อเดียวกัน ไซโทพลาซึมมีปริมาณมากขึ้น oocyte บางส่วนยังเชื่อมติดกับ basement membrane ด้วยก้านบางๆ (thin stalk) oocyte ส่วนใหญ่จะอยู่อย่างอิสระใน lumen ของ acini นิวเคลียสของ oocyte ระยะนี้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 14-32 ไมโครเมตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 24.10 ไมโครเมตร แตกต่างจากการรายงานของ Morton (1985) ซึ่งพบว่า oocyte ระยะนี้จะนูนสูงขึ้นจากผนังของ acini และมีส่วนของก้าน (stalk) เชื่อมต่อระหว่างเซลล์ไปกับผนังของ acini เซลล์ไข่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 ไมโครเมตร

ระยะที่ 3 พบ oocyte มีขนาดใหญ่ขึ้นและอยู่อย่างอิสระภายใน lumen ของ acini พบ vitelline membrane ล้อมรอบ oocyte ซึ่ง oocyte ในระยะนี้คล้ายกับ oocyte ในระยะ late active ยกเว้นแต่ในระยะนี้มี amphinucleoli ปรากฏอย่างเด่นชัด (Allen, 1951) นิวเคลียสของ oocyte มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 22-33 ไมโครเมตร มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 28.50 ไมโครเมตร

ระยะที่ 4 พบ oocyte ที่เจริญเต็มที่เหลืออยู่จำนวนน้อยในบาง acini ผนังของ acini มี oogonia และ oocyte ระยะแรกเกิดขึ้น พื้นที่ระหว่าง acini พบ mesenchyme cell ระยะนี้อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียจะมีลักษณะอ่อนนุ่มและหลวม (loose and flaccid) ในหอยบางตัว oocyte ที่เจริญเต็มที่ซึ่งเหลืออยู่ใน acini เกิดการสลายของเซลล์ (cytolysis) ต่างจากผลการศึกษาของ Morton (1985) ซึ่งพบว่าเซลล์ไ้ระยะนี้มีขนาดใหญ่ขึ้น เส้นผ่านศูนย์กลาง 60 ไมโครเมตร vesicular nucleus มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 30 ไมโครเมตร นิวเคลียสปรากฏชัดเจน

ระยะที่ 5 lumen ของ acini กลายเป็นช่องว่างขนาดใหญ่ ไม่มี oocyte ที่เจริญเต็มที่ (ripe oocyte) อยู่ภายใน พบเซลล์ oogonia และ oocyte ระยะแรกปรากฏที่บริเวณผนังของ acini ซึ่งมีความหนาเพิ่มขึ้น พบ mesenchyme cell อยู่กันอย่างหลวมๆ บริเวณพื้นที่ระหว่าง acini

รัชชัย (2546) ได้ศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ในวงสืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *H. (H.) bialatus* และได้รายงานลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในแต่ละระยะไว้ดังนี้

oocyte ระยะที่ 1 เซลล์ไข่มีขนาดเล็กมาก ขนาดเฉลี่ย $14.72 \pm 3.90 \times 19.92 \pm 4.35$ ไมโครเมตร เซลล์ที่มีขนาดเล็กสุดที่วัดได้ มีขนาด 7.50×17.50 ไมโครเมตร อยู่ติดกับผนังของ acini มองเห็น stalk ไม่ชัดเจน นิวเคลียสรูปร่างกลมหรือรี มีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์ ขนาดของนิวเคลียสเฉลี่ย $8.83 \pm 1.44 \times 9.56 \pm 1.97$ ไมโครเมตร ไซโทพลาซึมมีปริมาณน้อย ไม่พบ yolk granule ทั้งไซโทพลาซึมและนิวเคลียสย้อมติดสีน้ำเงินเข้มของ hematoxylin พบกลุ่มของโครมาทินชัดเจน แต่ไม่พบ vitelline membrane ล้อมรอบเซลล์ไ้ระยะนี้

oocyte ระยะที่ 2 เซลล์ไข่มีขนาดใกล้เคียงหรือใหญ่กว่าเซลล์ไ้ระยะที่ 1 เล็กน้อย ขนาดเฉลี่ยประมาณ $22.89 \pm 6.62 \times 27.85 \pm 6.81$ ไมโครเมตร เซลล์เจริญยกตัวสูงขึ้นจากผนังของ acini ปรากฏส่วนของ stalk ย้อมติดสีน้ำเงินของ hematoxylin มองเห็นค่อนข้างชัดเจน นิวเคลียสรูปร่าง

ร่างกลมหรือรี มีขนาดใหญ่ประมาณครึ่งหนึ่งของเซลล์ โดยมีขนาดเฉลี่ย $11.50 \pm 2.30 \times 12.68 \pm 2.35$ ไมโครเมตร ภายในไซโทพลาซึมยังไม่มีสารสะสม yolk granule ทั้งไซโทพลาซึมและนิวเคลียส ย้อมติดสีน้ำเงินอ่อนกว่าเซลล์ในระยะที่ 1 ยังไม่พบ vitelline membrane ในระยะนี้

oocyte ระยะที่ 3 เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีขนาดเฉลี่ย $30.63 \pm 5.13 \times 41.67 \pm 8.74$ ไมโครเมตร stalk ติดสีน้ำเงินของ hematoxylin อ่อนๆ มองเห็นได้ชัดเจน ที่บริเวณฐานของ stalk มี yolk granule สะสม ภายในไซโทพลาซึมของเซลล์เริ่มพบ yolk granule มีลักษณะเป็นเม็ดขนาดเล็ก จำนวนน้อย อยู่ล้อมรอบนิวเคลียส yolk granule ย้อมติดสีชมพูอมแดงของ eosin นิวเคลียสรูปร่างกลมหรือรี มีขนาดเฉลี่ย $12.97 \pm 1.72 \times 15.94 \pm 2.64$ ไมโครเมตร พบกลุ่มของโครมาทินและขอบเขตของนิวเคลียสได้ค่อนข้างชัดเจน ไม่พบ vitelline membrane ในระยะนี้

oocyte ระยะที่ 4 เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยมีขนาดเฉลี่ย $44.15 \pm 9.80 \times 58.55 \pm 10.70$ ไมโครเมตร stalk ติดสี basic จางๆ และติดสี acid เข้ม มี yolk granule สะสมที่บริเวณฐานของ stalk เซลล์ไข่มี yolk granule ลักษณะเป็นเม็ดหยาบกระจายอยู่ทั่วเซลล์และมีช่องว่างระหว่าง granule นิวเคลียสย้อมติดสี basic เชื้อหุ้มนิวเคลียสบางแห่งยื่นยาวออกไปคล้าย pseudopodia นิวเคลียสรูปร่างค่อนข้างกลมหรือรี มีขนาดเฉลี่ย $12.24 \pm 2.92 \times 17.27 \pm 4.06$ ไมโครเมตร พบโครมาทินเป็นกลุ่มชัดเจน เซลล์ไข่อ้อมรอบด้วย vitelline membrane มีลักษณะเป็นเส้นซึ่งย้อมติดสี basic อ่อน และมีส่วนเชื่อมต่อกับ stalk ที่บริเวณฐานของเซลล์ไข่

oocyte ระยะที่ 5 เซลล์ไข่มีขนาดใหญ่ขึ้น และพัฒนาจนกลายเป็นเซลล์ไข่ที่เจริญเต็มที่ ขนาดเฉลี่ย $87.16 \pm 13.83 \times 113.06 \pm 23.87$ ไมโครเมตร เซลล์ไข่ขนาดใหญ่ที่สุดที่วัดได้มีขนาดเท่ากับ 116.25×135.00 ไมโครเมตร เซลล์ไข่ที่ยังไม่เจริญเต็มที่ พบ stalk ขนาดใหญ่ ย้อมติดสี acid อ่อนๆ บริเวณฐานของ stalk มี yolk granule จำนวนมาก เซลล์ไข่มี yolk granule สะสมมาก มองเห็นเป็น granule ละเอียดย้อมติดสี acid เข้ม นิวเคลียสมีรูปร่างไม่แน่นอนย้อมติดสี basic เข้ม ขอบเขตของนิวเคลียสไม่ชัดเจน แต่พบโครมาทินเป็นเส้นหยาบชัดเจน เซลล์ไข่อ้อมรอบด้วย vitelline membrane ขนาดใหญ่ ติดสี basic อ่อนๆ เซลล์ไข่ซึ่งเจริญเต็มที่หลุดออกจาก stalk โดยส่วนของ stalk คอดเล็กลงในบริเวณที่เป็นรอยต่อระหว่าง vitelline membrane กับ stalk หลังจากนั้น เซลล์ไข่กับ stalk จะขาดออกจากกัน และเซลล์ไข่เคลื่อนเข้าสู่ lumen ของ acini แล้วถูกขับออกสู่ภายนอกเพื่อรอการปฏิสนธิ

6. ลักษณะเหงือกของหอยมุกน้ำจืด

หอยกาบน้ำจืดซึ่งอยู่ในกลุ่ม Unionidae มีลักษณะโครงสร้างของเหงือกแบบ lamellibranch ซึ่งมีขนาดใหญ่และมีการพัฒนามากกว่าเหงือกชนิด protobranch โครงสร้างเหงือกของหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* จัดอยู่ในกลุ่มย่อยชนิด eulamellibranch ซึ่งประกอบด้วย gill filament ที่มีลักษณะบางและยาว โดย gill filament จะมีการหักงอทางด้านท้อง (ventral) ทำให้เกิดรูปร่างคล้ายอักษร “v” แขนทั้งสองข้างของ v-shaped gill filament จะเรียกชื่อต่างกันโดยพิจารณาจากแกนกลาง (central axis) ของเหงือกที่แต่ละ filament ยึดเกาะ กล่าวคือแขนข้างที่ยึดเกาะกับแกนกลาง เรียกว่า descending limb of gill filament และเรียกแขนอีกข้างซึ่งงอขึ้นจากด้านท้องว่า ascending limb of gill filament อย่างไรก็ตามด้านซ้ายและขวาของลำตัวหอยประกอบด้วย gill filament ซึ่งมีรูปร่างคล้ายอักษร “v” สองอันมาเชื่อมติดกันที่แกนกลางทำให้เกิดเป็นรูปร่างคล้ายอักษร “w” และเหงือกแต่ละด้านประกอบด้วยโครงสร้างรูปร่างดังกล่าวหลายอันมาเรียงต่อกันในทิศทางจากด้านหน้าไปด้านหลังของลำตัว (antero-posterior orientation) โดยมีการเชื่อมกันของ gill filament ที่อยู่ติดกันด้วย interfilamental ciliary junction และ interfilamental tissue junction ซึ่งเป็นแผ่นเนื้อเยื่อที่มีบางบริเวณไม่ต่อเนื่องกัน ทำให้เกิดเป็นช่องขึ้น ช่องดังกล่าวจะอยู่ระหว่าง gill filament เรียกว่า water canal (Gardiner *et al.*, 1991) หรือ interfilamental canal (Tankersley and Dimock, Jr, 1992) ปากทางของช่องที่เปิดสู่ช่องแมนเทิล (mantle cavity) เรียกว่า ostium การเชื่อมกันของ gill filament ทำให้เกิดแถวของ ascending limb และ descending limb ที่ต่อเนื่องกันคล้ายแผ่น เรียกแต่ละแผ่นว่า lamella โดย lamellae สองอันที่เกิดจากแถวของ ascending limb และ descending limb ที่อยู่ใกล้กัน จะประกบกันเป็นแผ่นเหงือกแต่ละแผ่นซึ่งเรียกว่า demibranch ดังนั้นด้านซ้ายและขวาของลำตัวหอยมุกน้ำจืดจึงประกอบด้วยแผ่นเหงือกสองแผ่น เรียกแผ่นซึ่งติดกับ foot และ visceral mass ว่า inner demibranch และเรียกอีกแผ่นซึ่งติดกับแมนเทิล (mantle) ว่า outer demibranch แต่ละ demibranch จะมีการเชื่อมติดกันของ lamella ด้วยโครงสร้างซึ่งเป็นแผ่น ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเพื่อให้เกิดความแข็งแรงของเหงือก เรียกว่า interlamellar septum หรือ interlamellar junction ทำให้เกิดการแบ่งเหงือกออกเป็นท่อจำนวนมาก ในแนวด้านหลังและท้อง (dorso-ventral orientation) เรียกแต่ละท่อว่า water tube แต่ละ water tube จะติดต่อกับช่องแมนเทิล โดย water canal นอกจากนี้ water tube แต่ละท่อจะเปิดรวมกันเข้าสู่ช่องทางด้านหลัง (dorsal) ซึ่งเรียกว่า suprabranchial chamber เซลล์เยื่อหุ้มของ gill filament ซึ่งเปิดสู่ช่องแมนเทิลมีการเปลี่ยนแปลงที่มีความซับซ้อน โดยมีโครงสร้างของซิเลีย ซึ่งสามารถจำแนกตามตำแหน่งได้เป็น 3 ชนิด คือ frontal cilia, frontolateral cilia และ lateral cilia และมีเซลล์ซึ่งเปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ในการสร้างสารเมือก

(mucus) เรียกเซลล์ดังกล่าวว่า goblet cell, mucous cell หรือ mucocyte นอกจากนี้ยังพบเซลล์ดังกล่าวแทรกระหว่างเซลล์เยื่อผิวของผนัง water tube ด้วย (Fiala-Médinoi and Métiver, 1986; Brusca and Brusca, 1990; Harrison and Kohn, 1997; Byrne *et al.*, 2000; Dufour and Beninger, 2001; Korniusshin and Glaubrecht, 2003; Dufour, 2005; Gómez-Mendikute *et al.*, 2005; Cannuel and Beninger, 2006)

เหงือกของหอยมุกน้ำจืดทำหน้าที่หลายประการ เช่นทำหน้าที่สะสม คัดเลือก และขนส่งอนุภาคแขวนลอยในน้ำที่ผ่านเข้ามาทางช่องนำน้ำเข้า (incurrent siphon) และทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊ส การทำหน้าที่ดังกล่าวข้างต้นอาศัยการทำงานร่วมกันของซีเลียทั้งสามชนิดและสารเมือกที่สร้างจาก mucocyte นอกจากนี้เหงือกของหอยมุกน้ำจืดยังดัดแปลงเป็นบริเวณให้ตัวอ่อนระยะเอมบริโอและโกลคิเดียพัฒนา โดยตัวอ่อนจะพัฒนาใน water tube ของหอยเพศเมีย และเรียก demibranch ซึ่งทำหน้าที่เป็นถุงเพาะฟักตัวอ่อนว่า marsupia หรือ marsupia demibranch (Heard, 1975) การเพาะฟักตัวอ่อนในเหงือกถือได้ว่าเป็นวิวัฒนาการของการสืบพันธุ์ซึ่งพบมากในหอยน้ำจืดกลุ่ม Unionidae, Corbiculidae, Margartiferae และ Sphaeridae (สุชาติ และคณะ, 2538; Tompa *et al.*, 1984; Kondo, 1987; Silverman *et al.*, 1987; Richard *et al.*, 1991; Tankersley and Dimock, Jr, 1992; Byrne *et al.*, 2000; Schwartz and Dimock, Jr, 2001) เหงือกที่เปลี่ยนไปเป็น marsupia จะมีการสร้างแผ่นกั้นแยกจาก water tube เดิม เรียกว่า secondary septum เพื่อสร้างท่อน้ำใหม่คือ secondary water tube ทำให้เห็นลักษณะท่อน้ำเป็นแบบ tripartite water-tube หรือ tripartite organization ซึ่งประกอบด้วย primary water tube เรียงตัวอยู่แถวกลางระหว่าง secondary water tube สองแถว primary water tube จะทำหน้าที่เป็นถุงไข่ (ovisac) สำหรับการพัฒนาตัวอ่อนระยะเอมบริโอและโกลคิเดีย (Ortmann, 1911; Heard, 1975; Tompa *et al.*, 1984) ในขณะที่ secondary water tube ซึ่งเป็นท่อที่เกิดขึ้นชั่วคราวในช่วงที่มีการพัฒนาตัวอ่อน ทำหน้าที่ในการแลกเปลี่ยนแก๊สแทน primary water tube หลังจากที่โกลคิเดียถูกปล่อยออกจาก marsupia แล้ว ส่วนของ secondary water tube จะหายไปเหลือเพียง primary water tube เท่านั้น (Ortmann, 1911) แต่ในหอยบาง Subfamily ส่วนของเหงือกที่เป็น marsupia ไม่มีโครงสร้างแบบ tripartite organization แต่ก็สามารถเพาะฟักตัวอ่อนได้ (Tompa *et al.*, 1984)

ขนาดและตำแหน่งการเกิด marsupia มีความแตกต่างกันในหอยแต่ละชนิด หอยบางชนิดอาจใช้ demibranch ทั้ง 4 แผ่นเป็น marsupia (tetragenous) เช่นที่พบในหอยกาน้ำจืดชนิด *Corbicula possoensis* ส่วนหอยกาน้ำจืด *H. (L.) desowitzi* ทั้ง inner และ outer demibranch

สามารถเปลี่ยนเป็น marsupia ได้ (อรภา, 2543) หอยบางชนิดอาจใช้เฉพาะ inner demibranch ทั้ง 2 แผ่นเป็น marsupia (endobranchous) เช่นหอยชนิด *C. linduensis*, *C. loehensis*, *C. moltkiana* และ *C. australiasis* (Byrne *et al.*, 2000; Korniusshin and Glaubrecht, 2003) ในขณะที่หอย กาบน้ำจืดออสเตรเลียชนิด *Hyridella depressa* ใช้เฉพาะ inner demibranch ช่วงกลางเท่านั้นเป็น marsupia (Jupiter and Byrne, 1997) นอกจากนี้หอยบางชนิดอาจใช้เฉพาะ outer demibranch เป็น marsupia อย่างสมบูรณ์ทั้ง 2 แผ่น (ectobranchous) เช่น หอยกาน้ำจืดชนิด *C. hainesiana* (อรภา, 2543), *H. (H.) bialatus* (ธวัชชัย และคณะ, 2546), *Anodonta woodiana* (Fukuhara and Nagata, 1988), *A. cataracta* (Tankersley and Dimock, Jr, 1992), หอยกาน้ำจืดในสกุล *Anodonta* 8 ชนิด (Heard, 1975), *H. (L.) myersiana* (Kovitvadhi *et al.*, 2001a), *Pyganodon cataracta* และ *Utterbackia imbecillus* (Schwartz and Dimock, Jr, 2001) และหอยกลุ่ม Pleuroblemini (Tompa *et al.*, 1984) หอยบางชนิดใช้เฉพาะบางส่วนของ outer demibranch เป็น marsupia เช่นหอยกาน้ำจืด ชนิด *Lampsilis ventricosa*, *Ligumia subostrata* และ *Carunculina parva texasensis* ใช้บริเวณ ส่วนท้ายของ outer demibranch เป็น marsupia (Pennak, 1989; Richard *et al.*, 1991) นอกจากนี้พบว่าหอยน้ำเค็มบางชนิดมีการเพาะฟักตัวอ่อน เช่น หอยน้ำเค็มชนิด *Ostrea chilensis* แต่การเพาะฟัก เกิดขึ้นในช่องแมนเทิล ดังนั้นจึงไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเหงือกเพื่อทำหน้าที่ดังกล่าว (Chaparro *et al.*, 1993) อนึ่งหอยน้ำเค็มส่วนมากมีตัวอ่อนที่ดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนซึ่งเรียกว่า trochophore และ veliger ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องอาศัย marsupia ในการเพาะฟักตัวอ่อน (Tankersley and Dimock, Jr, 1992)

7. การเพาะเลี้ยงหอยกาน้ำจืดระยะไกลทีเดียวในอาหารสังเคราะห์

Isom and Hudson (1982, 1984a, 1984b) ประสบความสำเร็จในการเลี้ยงไกลทีเดียวของหอย กาน้ำจืด 2 ชนิด คือ *Ligumia recta* และ *Pleurobema cordatum* พบว่าไกลทีเดียวของหอยทั้งสอง ชนิดสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ ได้ในเวลา 15-22 วันในอาหารสังเคราะห์ที่ผสม พลาสมาปลา channel catfish และปลา smallmouth buffalo โดยเปอร์เซ็นต์การรอดตายและการ เปลี่ยนแปลงเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์สูงขึ้น นอกจากนี้ไกลทีเดียวของหอยกาน้ำจืด *Fusconaia ebena* ที่เลี้ยงในอาหารสังเคราะห์สูตรเดิมที่เสริมด้วยพลาสมาปลาใน 80 เปอร์เซ็นต์ ที่สภาวะ pH 7.8-8.1 สามารถเปลี่ยนแปลงเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้มากที่สุดในเวลา 11 วัน และถ้าใช้พลาสมา ปลาในเสริมในอาหารสังเคราะห์เพียง 33 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำให้ไกลทีเดียวเปลี่ยนแปลงเป็นลูก

หอยระยะจูวีไนล์ได้ในปริมาณใกล้เคียงกันแต่ทั้งนี้ต้องควบคุมสภาพแวดล้อมอย่างดีที่สุดมิให้เกิดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์

Keller and Zam (1990) ทดลองเลี้ยง โกลคิเดียมของหอยกาบน้ำจืด *Anodonta imbecilis* ในอาหารเพาะเลี้ยงที่เสริมด้วยแหล่งโปรตีนต่างๆ ในอาหารสูตรของ Isom and Hudson (1982) โดยเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 23 ± 2 องศาเซลเซียส และให้แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ในบรรยากาศของตู้เพาะเลี้ยง พบว่าแหล่งโปรตีนจาก neonatal calf serum, horse serum, salmon liver, trout liver, fish plasma และ rabbit pancreas ทำให้โกลคิเดียมเปลี่ยนแปลงเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้โดยมีเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลงอยู่ในระดับที่น่าพอใจ ส่วนอาหารสังเคราะห์ที่เสริมด้วยโปรตีนเคซีนนั้น โกลคิเดียมไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นจูวีไนล์เลย

อุทัยวรรณ และคณะ (2540) พัฒนารูปการเลี้ยง โกลคิเดียมในอาหารสังเคราะห์ตามสูตรของ Isom and Hudson (1982, 1984a) และ Keller and Zam (1990) ในการเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดสายพันธุ์ที่พบในประเทศไทยคือ *H. (L.) desowitzi* โดยเลี้ยงในสูตรอาหารสังเคราะห์ 2 สูตรคือ M199 ผสมซีรัมม้า และ M199 ผสมพลาสติกเป็นแหล่งโปรตีน และเสริมด้วยยาปฏิชีวนะ พบว่าโกลคิเดียมสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ในเวลา 10-11 วัน ของการเพาะเลี้ยง โดยมีอัตราการรอดตายสูงถึง 96.60 และ 91.39 เปอร์เซ็นต์ และมีการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียมเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ถึง 89.64 และ 80.99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แต่เมื่อนำสูตรอาหารชุดเดียวกันนี้มาใช้เลี้ยงหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* พบว่ามีการรอดตายเท่ากับ 46.2 ± 12.7 และ 85.3 ± 3.9 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ทำให้ทราบว่า การใช้พลาสติกเป็นแหล่งโปรตีนได้ผลดีกว่าซีรัมม้าอย่างเห็นได้ชัด

สาริต และคณะ (2546) ได้พัฒนาการเพาะเลี้ยง โกลคิเดียมของหอย *H. (L.) myersiana* ตามวิธีของ Kovitvadhi *et al.* (2001b, 2002, 2003a, 2003b) โดยใช้อาหารสังเคราะห์ M199 ผสมพลาสติกเป็นแหล่งโปรตีน เสริมด้วยยาปฏิชีวนะ พบว่าโกลคิเดียมสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ในเวลาเพียง 8 วันซึ่งเร็วกว่าเดิม 2 วัน มีการรอดตายสูงถึง 95.35 ± 2.45 เปอร์เซ็นต์ และมีการเปลี่ยนแปลงจากโกลคิเดียมเป็นลูกหอยระยะจูวีไนล์ได้ถึง 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ยังสามารถเพิ่มปริมาณ โกลคิเดียมที่เลี้ยงสูงถึง 7 เท่า

8. การเพาะเลี้ยงหอยกาบน้ำจืดระยะจูวีไนล์ในห้องปฏิบัติการ

Hudson and Isom (1984) ได้ทดลองเลี้ยงลูกหอย *Anodonta imbecillis* ระยะจูวีไนล์โดยใช้ น้ำที่มาจากแหล่งน้ำหลายแหล่งซึ่งมีแพลงก์ตอนขนาดเล็กกว่า 5 ไมโครเมตรปะปนอยู่คือ สกุล *Gonium*, *Anabaena*, *Navicula*, *Oscillatoria*, *Bodo*, *Fragilaria*, *Eudorina*, *Stentor*, *Vorticella*, *Scenedesmus*, *Trachelomonas*, *Crucigenia*, *Phacus*, *Stephanodiscus* และ *Chorococcales* เปรียบเทียบกับการเลี้ยงด้วยสาหร่าย 3 สกุล คือ *Salenastrum*, *Tetraedon* และ *Chlorella* ที่เสริมด้วย catfish chow พบว่าลูกหอยเริ่มตายในสัปดาห์ที่ 2 และตายหมดในสัปดาห์ที่ 3 และพบว่าน้ำจาก แหล่งน้ำที่เดิมโคลนลงไปช่วยให้อัตราการรอดและการเจริญเติบโตของหอยระยะจูวีไนล์เพิ่มขึ้น ดังนั้นการเลี้ยงลูกหอยระยะจูวีไนล์ในห้องปฏิบัติการที่ควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมสามารถ เพาะเลี้ยงลูกหอยให้เจริญเติบโตได้ก่อนที่จะนำไปปล่อยลงสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ นอกจากนี้กัญญา และคณะ (2543) ได้เลี้ยงลูกหอยระยะจูวีไนล์ *Chamberlainia hainesiana* ในห้องปฏิบัติการด้วย สาหร่ายสีเขียว 3 ชนิด คือ *Monoraphidium* sp., *Chlamydomonas* sp. และ *Chlorella* sp. นาน 60 วัน พบว่าลูกหอยที่เลี้ยงด้วยสาหร่าย *Monoraphidium* sp. มีการเจริญเติบโตและมีเปอร์เซ็นต์การรอดตายเท่ากับ 9.67 ± 0.58 เปอร์เซ็นต์

การเลี้ยงหอยกาบน้ำจืดระยะจูวีไนล์ที่ได้จากการเลี้ยงโคลนเดียวในอาหารสังเคราะห์จนกระทั่งสามารถเจริญเติบโตในบ่อดิน พบว่ามีเพียงงานทดลองของ สาธิต และคณะ (2546) ซึ่งได้ทดลองเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดระยะจูวีไนล์อายุ 1-60 วัน ในห้องปฏิบัติการโดยให้แพลงก์ตอนพืชผสม 4 ชนิดเป็นอาหาร คือ *Chlorella* sp., *Kerchinella incurvata*, *Navicula* sp. และ unknown เป็นอาหาร พบว่ามีอัตราการรอดตาย 8.24 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำลูกหอยอายุ 60 วันมาแยกเลี้ยงในแพลงก์ตอนพืชแต่ละชนิดพร้อมทั้งเปรียบเทียบแพลงก์ตอนพืชผสม 4 ชนิด จนอายุครบ 120 วัน พบว่าลูกหอยที่เลี้ยงด้วย *K. incurvata* มีขนาดใหญ่ที่สุด และมีอัตราการรอดตาย 65 ± 8.32 เปอร์เซ็นต์ ต่อมานำหอยอายุ 120 วันมาเลี้ยงในบ่อดินจนอายุ 180 วันพบว่ามีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีอัตราการรอดตาย 100 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองของสาธิต และคณะ (2546) พบว่าหอยมุกน้ำจืดในช่วงอายุ 1-60 วันมีอัตราการรอดตายต่ำกว่าช่วงอายุ 60-180 วัน ดังนั้นการเพาะเลี้ยงหอยตั้งแต่อายุ 1-180 วันให้ประสบผลสำเร็จจำเป็นต้องมีความเข้าใจถึงชนิดและสัดส่วนของแพลงก์ตอนพืชที่เหมาะสมต่อการกินอาหารของลูกหอยแต่ละช่วงอายุ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดระยะโกลคิเดีย

1.1 เก็บตัวอย่างหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856) ระยะตัวเต็มวัยจากอำเภอท่าม่วง จังหวัดกาญจนบุรี ใช้เข็มเปิดเปลือกหอยให้แยกจากกันประมาณ 0.5-1 เซนติเมตร นำลิมส์สอดเข้าไประหว่างเปลือกหอยเพื่อป้องกันการปิดเปลือกหอย จากนั้นใช้ กระบอกลดขนาด 1 มิลลิลิตรติดกับเข็มเบอร์ 18 ดูเอาเซลล์สืบพันธุ์ออกมาปริมาณเล็กน้อยนำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดาเพื่อแยกเพศ และทำเครื่องหมายแสดงเพศบนเปลือกหอย นำหอยมุกน้ำจืดที่แยกเพศแล้วใส่ในกระชังเลี้ยงหอยทรงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 50 เซนติเมตร สูง 50 เซนติเมตร ภาชนะละ 30 ตัว โดยใส่หอยเพศผู้ 15 ตัว และเพศเมีย 15 ตัว นำไปแขวนที่แพเลี้ยงหอยระดับความลึก 1.5 เมตร ภายในบ่อดิน ของภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

1.2 การเตรียมอาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดระยะโกลคิเดีย ใช้อาหารสำเร็จรูปสูตร M199 (M199 powder of Life technologies, Inc. no. 7, NO.262) 1 ชอง เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ใส่ NaHCO_3 จำนวน 2 กรัมลงไปผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 7.1-7.3 ด้วย 1 M HCl เตรียมพลาสติกโดยใช้ปลาไน (*Cyprinus carpio*) จำนวน 30 ตัว ขนาดความยาว 40-50 เซนติเมตร น้ำหนักประมาณ 1,300-2,300 กรัม ซึ่งเลี้ยงในแพปลา ของภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร ทำให้ปลาสลบด้วย quinaldine 100 ไมโครลิตรต่อน้ำ 1 ลิตร (Sado, 1985) หลังจากปลาสลบแล้วใช้เอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์เช็ดบริเวณที่จะเจาะเลือด โดยใช้กระบอกลดขนาดซึ่งเคลือบด้วย heparin พร้อมเข็มลดขนาดเบอร์ 18 เจาะเส้นเลือดเวนบริเวณหางปลา (caudal vein) เก็บเลือดที่เจาะได้ในหลอดปลอดเชื้อซึ่งแช่อยู่ในน้ำแข็งแล้วนำเลือดที่ได้มาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1,000 และ 3,000 รอบต่อนาที ความเร็วละ 10 นาที ทำการแยกพลาสมาออกมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที อีก 10 นาที แยกส่วนของพลาสมาที่ได้นำไปใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงโกลคิเดียต่อไป เตรียมยาปฏิชีวนะและยากำจัดเชื้อรา โดยชั่ง rifampicin 20 มิลลิกรัม gentamy cin sulfate 0.5 มิลลิลิตร cabanilin 20 มิลลิกรัม และ amphotericin B 1.8 มิลลิกรัม ผสมกันและเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 200 มิลลิลิตร สุดท้ายเตรียมอาหารสังเคราะห์โดยผสมอาหารสำเร็จรูปสูตร M199 พลาสมาปลา และยาปฏิชีวนะและยากำจัดเชื้อราในอัตราส่วน 2 : 1 : 0.5 ตามลำดับ ผสมให้เข้ากัน นำมากรองด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดช่อง

0.45 ไมโครเมตร และกรองอีกครั้งด้วยกระดาษกรองที่มีขนาดช่องเท่ากับ 0.22 ไมโครเมตร แบ่งใส่หลอดขนาด 10-15 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ -20 องศาเซลเซียส

1.3 เตรียมหอยมุกน้ำจืดระยะโกลกิเดีย เริ่มจากการคัดเลือกแม่หอยโดยการเปิดเปลือกสังเกตสีของเหงือก เลือกรอยที่สีของเหงือกเป็นสีน้ำตาลอมแดง จากนั้นนำแม่หอยมาทำความสะอาดเปลือกด้านนอกด้วยน้ำประปาจนสะอาด แล้วล้างทำความสะอาดด้านในตัวหอยด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยค่อยๆ ล้างภายในจนสะอาด ตรวจสอบความสมบูรณ์ของโกลกิเดียโดยใช้เข็มเบอร์ 18 เจาะเอาโกลกิเดียปริมาณเล็กน้อยออกจากเหงือกของแม่หอยแล้วนำไปตรวจดูใต้กล้องจุลทรรศน์ (โกลกิเดียที่แข็งแรงจะขยับฝาปิดเปิดเป็นระยะๆ ส่วนโกลกิเดียที่แก่เต็มทีเปลือกจะมีสีสม่ำเสมอ) เมื่อพบว่าโกลกิเดียมีความสมบูรณ์ดีจึงนำแม่หอยมาแยกโกลกิเดียในห้องปลอดเชื้อโดยใช้เข็มเบอร์ 18 เจาะดูดโกลกิเดียที่อยู่ในเหงือกแม่หอยมาใส่ในบีกเกอร์ที่บรรจุน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ใช้หลอดหยดดูดโกลกิเดียแล้วพ่นเบาๆ ใต้น้ำให้ฟุ้งกระจายหลายๆ ครั้งเพื่อให้โกลกิเดียหลุดออกจากเมือก โกลกิเดียที่แข็งแรงจะตกลงที่ก้นบีกเกอร์ ส่วนเศษเนื้อเยื่อของเหงือกและโกลกิเดียที่ยังอ่อนอยู่จะลอยอยู่ด้านบน จึงต้องเทน้ำหรือดูดน้ำทิ้งแล้วเปลี่ยนน้ำกลั่นหลายๆ ครั้งจนน้ำใสมากที่สุด เพื่อให้ได้โกลกิเดียที่สะอาดพร้อมที่จะนำไปเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์

1.4 เพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดระยะโกลกิเดียตามวิธีของอุทัยวรรณ และคณะ (2540) ใช้หลอดหยดดูดโกลกิเดียที่ล้างสะอาดแล้ว ใส่ในจานเพาะเลี้ยงขนาด 60 x 15 มิลลิเมตร แต่ละจานบรรจุอาหารสังเคราะห์ปริมาณ 10 มิลลิลิตร มีโกลกิเดีย 5,000-6,000 ตัว จากนั้นหมูนจานเพาะเลี้ยงเบาๆ เพื่อให้โกลกิเดีย กระจายโดยรอบ นำจานเพาะเลี้ยงไปเลี้ยงในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 25±1 องศาเซลเซียส ให้แก๊สคาร์บอน ไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ภายใต้สภาพปลอดเชื้อ เมื่อเลี้ยงครบ 5 วัน เปลี่ยนอาหารสังเคราะห์และเปลี่ยนจานเพาะเลี้ยงใหม่เนื่องจากโกลกิเดียมีการพัฒนาตัวเองและปล่อยของเสียออกมา หลังจากนั้นในวันที่ 10 เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาณ 3 มิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยงเพื่อเป็นการกระตุ้นให้โกลกิเดียพัฒนาเป็นจูว์ไนล์ วันที่ 11 จึงนำหอยระยะจูว์ไนล์ไปเพาะเลี้ยงต่อไป

2. การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดระยะจูว์ไนล์อายุ 1 วันจนถึงหอยอายุ 360 วัน

2.1 คัดแยกและเตรียมแพลงก์ตอนพืชเพื่อการเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดระยะจูว์ไนล์ โดยการผ่าแยกท่อทางเดินอาหารออกจากตัวหอย *H. (L.) myersiana* ใช้กรรไกรตัดตามยาวของท่อทางเดิน

อาหารให้แยกออกจากกัน แล้วใช้หลอดแก้วปลายแหลมดูดตะกอนทั้งหมดที่อยู่ในท่อทางเดินอาหารลงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียฟิชซูต *f/2* (Gillard and Ryther, 1962) ปริมาตร 1 ลิตร นำไปเลี้ยงภายใต้แสงนีออนที่มีความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ นานวันละ 18 ชั่วโมง และให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ ตลอดเวลาทุกๆ 10 วัน แยกแบคทีเรียที่เลี้ยงให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plating (Hoshov and Rosowski, 1973) บนจานแก้ว (Petri dish) ที่มีอาหารแข็งสูตร *f/2* จากขวดเลี้ยงแบคทีเรีย จากนั้นนำจานแก้วไปวางภายใต้แสงนีออนที่มีความเข้มแสง 10,000 ลักซ์ นานวันละ 18 ชั่วโมง ตรวจสอบแบคทีเรียบนจานแก้วทุกวันภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้ามีแบคทีเรียปรากฏขึ้นเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ ให้ทำการถ่ายแบคทีเรียที่ได้ไปเลี้ยงด้วยอาหารแข็งสูตร *f/2* ในหลอดฝาเกลียวเพื่อนำไปจำแนกชนิดและนำไปขยายพันธุ์ต่อไป จากนั้นนำแบคทีเรียที่ได้มาคัดเลือกชนิดที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงลูกหอย โดยนำแบคทีเรียแต่ละชนิดที่มีความหนาแน่นเท่ากับ 1×10^3 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาใส่ในสไลด์หลุมๆ ละ 0.2 มิลลิลิตร ชนิดละ 1 สไลด์ พร้อมทั้งใส่ลูกหอยชนิดละ 3 ตัว จากนั้นนำไปดูที่กล้องขยาย 100 เท่า เพื่อพิจารณาความเหมาะสมที่จะนำไปเลี้ยงลูกหอย

2.2 การเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดระยะจูวีไนล์และระยะเต็มวัย ตามวิธีของ Kovitvadhi *et al.* (2003) โดยแบ่งออกเป็น 4 ช่วงของการเพาะเลี้ยงดังนี้

2.2.1 การเพาะเลี้ยงหอยอายุ 1-60 วันในห้องปฏิบัติการ

นำลูกหอยที่เข้าสู่ระยะจูวีไนล์วันแรก (ผ่านกระบวนการ transformation จากระยะโกลดิเดีย) ลงในกล่องพลาสติกใสขนาดความกว้าง x ยาว x สูงเท่ากับ 20 x 11 x 8 เซนติเมตร กล่องละ 5,000-6,000 ตัว จำนวน 3 กล่อง ให้อากาศผสมแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ ตลอดเวลา ใส่ทรายขนาด 140 ไมโครเมตร จำนวน 20 กรัมต่อกล่อง น้ำที่ใช้เลี้ยงลูกหอยเป็นระบบปิด โดยนำไหลจากกล่องเลี้ยงลูกหอยผ่านตู้กรองขนาดความจุ้น้ำ 80 ลิตร ซึ่งมีวัสดุกรองคือ ใยแก้วกรวด และเปลือกหอยกาน้ำจืด จากนั้นน้ำจะไหลผ่านท่อพีวีซีไปยังตู้พักน้ำขนาดความจุ้น้ำ 40 ลิตร แล้วใช้ปั้มน้ำดูดน้ำผ่านเข้าไปในกล่องเลี้ยงลูกหอยด้วยอัตราการไหลของน้ำ 50 มิลลิลิตรต่อ นาที ส่วนน้ำที่เหลือจะไหลกลับไปตู้กรองอีกครั้ง นำแบคทีเรียที่ได้คัดเลือกไว้ในข้อที่ 2.1 มา 2 ชนิดคือ *Chlorella sp.* และ *Kirchneriella incuvata* ในอัตราส่วน 1:1 ความหนาแน่น 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร มาเลี้ยงลูกหอยวันละ 2 ครั้งๆ ละ 50 มิลลิลิตร (ตอนเช้าและตอนเย็น) ถ้างูกหอย

เปลี่ยนทรายและน้ำในตู้พักน้ำ 40 ลิตรวันเว้นวัน ทำการสูบลูกหอยเพื่อวัดขนาดความยาวและความสูงของลูกหอยที่เลี้ยงทุกๆ 10 วัน จนครบ 60 วัน พร้อมทั้งตรวจสอบอัตราการรอดตาย

2.2.2 การเพาะเลี้ยงหอยอายุ 60-120 วันในห้องปฏิบัติการ

คัดขนาดลูกหอยอายุ 60 วัน ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน จากนั้นสูบลูกหอยมาเลี้ยงในกล่อง (ขนาดกล่องเท่ากับขั้นตอนแรก) กล่องละ 60 ตัว จำนวน 10 กล่อง ใส่ทรายขนาด 250 ไมโครเมตร จำนวน 20 กรัมต่อกล่อง เลี้ยงด้วยแพลงก์ตอนที่ได้เตรียมเอาไว้ โดยปริมาณแพลงก์ตอนที่ให้เลี้ยงแต่ละชนิดเท่ากับ 1×10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทำการวัดขนาดและความสูงของลูกหอยทุกตัวที่เลี้ยงทุกๆ 10 วัน จนครบ 120 วัน

2.2.3 การเพาะเลี้ยงหอยอายุ 120-180 วัน

คัดขนาดลูกหอยมุกน้ำจืดอายุ 120 วัน ให้มีขนาดใกล้เคียงกัน จากนั้นสูบลูกหอยมาเลี้ยงในกล่องพลาสติกใสขนาดความกว้าง x ยาว x สูง เท่ากับ 20 x 12 x 72 เซนติเมตร ซึ่งด้านข้างทั้ง 4 ด้านกรุด้วยตาข่ายพลาสติกขนาดช่อง 0.42 มิลลิเมตร ด้านบนของกล่องมีฝาพลาสติกใสเจาะรูปิดอยู่ และด้านล่างของกล่องมีกล่องพลาสติกใสขนาดความสูงเท่ากับ 3.0 เซนติเมตร สำหรับใส่ลูกหอยซึ่งสวมพอดีกับตัวกล่องอันใหญ่ โดยฝาปิดและกล่องด้านล่างจะสามารถเปิดออกได้ กล่องเลี้ยงหอยด้านล่างใส่ทรายขนาด 425 ไมโครเมตร จำนวน 400 กรัม และในกล่องมีลูกหอยจำนวน 13 ตัวต่อกล่อง จากนั้นนำกล่องพลาสติกไปแขวนในบ่อดินให้กล่องด้านล่างอยู่ลึกลงไปจากผิวน้ำ 50 เซนติเมตร เปลี่ยนทรายและทำความสะอาดลูกหอยทุกๆ 10 วัน จนครบ 180 วัน

2.2.4 การเพาะเลี้ยงหอยอายุ 180-270 วัน

นำหอยมุกน้ำจืดอายุ 180 วัน มาเลี้ยงต่อโดยใช้ภาชนะเลี้ยงและวิธีการเลี้ยงแบบเดียวกัน แต่ต่างกันที่ขนาดตาข่ายพลาสติกที่กรุทั้ง 4 ด้านเปลี่ยนเป็นขนาด 2.0 มิลลิเมตร เปลี่ยนทรายและทำความสะอาดลูกหอยทุกๆ 10 วัน จนครบ 270 วัน

2.2.5 การเพาะเลี้ยงหอยอายุ 270-360 วัน

นำหอยมุกน้ำจืดอายุ 270 วัน มาเลี้ยงต่อแต่เปลี่ยนภาชนะเลี้ยงเป็นแบบกระเป๋ามีโครง (pocket net with frame) โดยใช้เหล็กเส้นขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ตัดเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้ามีขนาดความกว้างและยาว เท่ากับ 60 x 45 เซนติเมตรเป็นโครง จึงด้วยตาข่ายไนลอนทั้งสองด้านที่มีขนาดช่องตา 0.5 เซนติเมตร มุมด้านบนทั้งสองมุมผูกเชือกเข้ากับตะขอเหล็กเพื่อใช้สำหรับแขวนภาชนะเลี้ยงกับแพ จากนั้นแบ่งภาชนะเลี้ยงออกเป็น 6 ช่องเท่าๆ กันโดยใช้เชือกจิ้งในแต่ละช่องมีรูเปิดด้านบนเพื่อไว้ใส่หอยมุกน้ำจืดและนำออกมาทำความสะอาด ใส่หอยมุกน้ำจืดจำนวน 6 ตัวต่อช่อง นำภาชนะเลี้ยงไปแขวนที่แพในบ่อดินขนาด 5 ไร่ โดยให้มีระดับความลึกลงไปจากผิวน้ำ 50 เซนติเมตรทำความสะอาดลูกหอยและภาชนะเลี้ยงทุกๆ 10 วัน จนครบ 360 วัน

3. การเตรียมตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดเพื่อศึกษาโครงสร้างทางจุลกายวิภาค

3.1 สุ่มเก็บตัวอย่างหอยมุกน้ำจืดช่วงอายุต่างๆ ตั้งแต่อายุ 1 วันจนถึง 360 วัน ช่วงอายุละ 6 ตัว แล้วคงสภาพหอยทุกตัวด้วยน้ำยาคงสภาพ 10% buffered neutral formalin นาน 24 ชั่วโมง หอยระยะแรกซึ่งมีอายุ 1, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 วัน คงสภาพทั้งเปลือกเนื่องจากมีขนาดเล็กไม่สามารถนำเปลือกออกได้ ส่วนหอยอายุ 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 210, 240, 270, 300, 330 และ 360 วัน ทำการเลาะเปลือกออกโดยตัด adductor muscle แล้วจึงคงสภาพ เนื่องจากหอยขนาดใหญ่พอที่จะนำเปลือกออกได้ หลังจากคงสภาพแล้วหอยนำซึ่งมีอายุ 1, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 วัน มาผ่านขั้นตอนการดิ่งแคลเซียมออกจากเปลือก (decalcification) โดยแช่หอยในสารละลายดิ่งแคลเซียมสูตร EDTA ตามวิธีของ Luna (1968) นาน 24 ชั่วโมง (เนื่องจากแคลเซียมที่เปลือกทำให้เปลือกแข็งเป็นอุปสรรคในการตัดเนื้อเยื่อ) จากนั้นล้างสารละลายที่ใช้ดิ่งแคลเซียมออกโดยให้น้ำประปาไหลผ่านตัวอย่างหอย นานประมาณ 2 ชั่วโมง แล้วแช่ตัวอย่างหอยในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ก่อนผ่านขั้นตอนพาราฟินเทคนิค ส่วนหอยที่ไม่ได้ผ่านการดิ่งแคลเซียม ล้างน้ำยาคงสภาพออกด้วยน้ำประปาที่เปิดให้ไหลผ่านนาน 2 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์เช่นเดียวกับหอยที่ผ่านการดิ่งแคลเซียม

3.2 ผ่านตัวอย่างหอยตามขั้นตอนพาราฟินเทคนิค ดังนี้

3.2.1 กำจัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อ (dehydration) โดยแช่ตัวอย่างหอยในเอธานอลความเข้มข้น 70, 80, 95, และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ตัวอย่างหอยระยะแรกที่มีอายุ 1, 10, 20, 30, 40, 50 และ 60 วันแช่ในเอธานอลความเข้มข้นละ 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที ปฏิบัติด้วยมือโดยให้ตัวอย่างหอยอยู่ในขวดแก้วขนาดเล็ก (vial) ตัวอย่างหอยระยะกลางอายุ 80, 90, 100, 120, 140, 160 และ 180 วัน และตัวอย่างหอยระยะท้ายอายุ 210, 240, 270, 300, 330 และ 360 วัน แช่ในเอธานอลความเข้มข้นละ 2 ครั้งๆ ละ 30 และ 45 นาที ตามลำดับ โดยใช้เครื่องมือ automatic tissue processor

3.2.2 ผ่านตัวอย่างจุลินทรีย์ในถังในตัวอย่าง (xylene) ก่อนการแทรกซึม ตัวอย่างหอยระยะแรก แช่ใน xylene 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที โดยยังปฏิบัติในขวดแก้วขนาดเล็กอยู่ ตัวอย่างหอยระยะกลางและระยะท้ายแช่ 2 ครั้งๆ ละ 30 และ 45 นาที โดยใช้เครื่องมือ automatic tissue processor ทำต่อเนื่องจากขั้นตอนการกำจัดน้ำออกจากชิ้นเนื้อ

3.2.3 แทรกซึมตัวอย่าง (infiltration) ด้วยสารที่ใช้ในการฝังตัวอย่าง (embedding agent) ในที่นี้คือ paraplast หลอมเหลว ตัวอย่างหอยระยะแรกแช่ใน paraplast 2 ครั้งๆ ละ 10 นาที โดยตัวอย่างอยู่ในตู้อบความร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิประมาณ 60 องศาเซลเซียส ตัวอย่างหอยระยะกลางและระยะท้ายแช่ใน paraplast 2 ครั้งๆ ละ 30 และ 45 นาที โดยใช้เครื่องมือ automatic tissue processor ทำต่อจากขั้นตอนก่อนหน้า

3.2.4 ฝังตัวอย่าง (embedding) โดยนำตัวอย่างหอยที่ผ่านขั้นตอนการแทรกซึมมาฝังใน paraplast หลอมเหลว แล้วทำให้ paraplast แข็งตัวโดยเร็วด้วยความเย็นจัด หลังจากแข็งตัว ตัดแต่ง paraplast block เป็นรูปสี่เหลี่ยมคางหมูแล้วนำไปตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (rotary microtome) ให้มีความหนา 5-6 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อที่ตัดมาติดบนสไลด์ วางบน slide warmer เมื่อสไลด์แห้งแล้ว นำไปย้อมสี Harris hematoxylin and eosin (H&E), Masson's trichome, alcian blue, PAS (Sheehan and Hrapchak, 1980) และ PAS-alcian blue (Luna, 1968) จากนั้นนำสไลด์ที่ย้อมสีแล้วไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พร้อมทั้งวิเคราะห์ผลและทำการถ่ายภาพ

4. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการมิถุนเคมี 1004 อาคารปฏิบัติการวิทยาศาสตร์พื้นฐาน คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพมหานคร

โปรแกรมวิชาเกษตรศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏบ้าน
สมเด็จพระเจ้าพระยา กรุงเทพมหานคร

บริเวณบ่อดินขนาด 5 ไร่ ภาควิชาเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
กรุงเทพมหานคร

สถานีวิจัยประมงน้ำจืดนครสวรรค์ (บึงบอระเพ็ด) จังหวัดนครสวรรค์

5. ระยะเวลาในการทดลอง

การทดลองครั้งนี้เริ่มตั้งแต่เดือนตุลาคม 2547 สิ้นสุดเดือนมกราคม 2549

ผล

1. การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana*

การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยมุกน้ำจืดตั้งแต่หอยอายุ 1-360 วัน แบ่งเป็น 2 ระยะ คือระยะที่ยังไม่มีการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และระยะที่มีการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

1.1 ระยะที่ยังไม่มีการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

หอยที่มีอายุตั้งแต่ 1 ถึง 160 วัน เป็นช่วงที่ไม่มีการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ทั้งสองเพศ สำหรับหอยอายุ 180 และ 210 วัน บางตัวไม่มีการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ บริเวณ visceral mass นอกกระบบทางเดินอาหาร หรือรอบปมประสาทเท้า (pedal ganglion) ในหอยอายุ 1 และ 10 วัน พบกลุ่มเซลล์อยู่กันอย่างหลวมๆ และอาจพบกล้ามเนื้อแทรกบ้างเล็กน้อย (ภาพที่ 1-3) หอยอายุ 20, 30, 40, 50 และ 60 วัน พบเซลล์ที่อยู่รอบระบบทางเดินอาหารมีจำนวนมากขึ้นพร้อมกับพื้นที่ของ visceral mass เพิ่มขึ้นตามอายุ อย่างไรก็ตาม โครงสร้างส่วนใหญ่ของ visceral mass ยังคงเป็นระบบทางเดินอาหารและปมประสาทเท้า (ภาพที่ 4, 6, 8, 11 และ 13) และหอยในช่วงอายุ 80, 90, 100, 120, 140 และ 160 วัน พบกลุ่มของเนื้อเยื่อไขมันและกล้ามเนื้อชัดเจนแทรกกระหว่างทางเดินอาหารและปมประสาทเท้า โดยปริมาณที่แทรกจะมากตามอายุที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 15, 19, 21, 23, 25 และ 27) เหมือนกับหอยอายุ 180 และ 210 วัน บางตัวซึ่งไม่มีการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เพียงแต่ในหอยอายุ 180 และ 210 วันพบเนื้อเยื่อไขมันกระจายมากกว่า (ภาพที่ 31 และ 36)

1.2 ระยะที่มีการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

1.2.1 การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

เริ่มพบในหอยอายุ 180 วัน acini ที่พบในหอยอายุ 180 วันมีขนาดเล็กและจำนวนน้อย หอยบางตัวพบเพียง 1-2 acini ภายในมีเซลล์ซึ่งกำลังพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (developing spermatogenic cell) และ spermatozoa จำนวนน้อย และยังไม่พบท่อนำอสุจิ (gonoduct) (ภาพที่ 29 และ 30) เมื่อหอยอายุมากขึ้นในช่วง 210-270 วัน การพัฒนาของอวัยวะสร้าง

เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะมากขึ้นตามลำดับ หอยอายุ 210 วันเป็นระยะแรกที่เริ่มพบท่อนำอสุจิ acini มีขนาดใหญ่กว่าที่พบในหอยอายุ 180 วัน ภายในพบเซลล์ซึ่งกำลังพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และ spermatozoa มากกว่าหอยอายุ 180 วัน ท่อนำอสุจิมีย spermatozoa นอกจากนี้พบ eosinophilic granular cell และเม็ดเลือดชนิดอื่นมาล้อมรอบบริเวณ acini และท่อนำอสุจิ และมีเซลล์บางส่วนเข้าไปภายใน acini แทรกระหว่าง spermatogenic cell (ภาพที่ 34 และ 35) หอยอายุ 240 วันพบ acini และท่อนำอสุจิมียขนาดใหญ่ขึ้น และจำนวน acini มากขึ้น ภายใน acini ประกอบด้วยเซลล์ซึ่งกำลังพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้และ spermatozoa พบ nutritive granule (storage granule) จำนวนมากภายใน acini (ภาพที่ 38) ไม่พบ spermatozoa ในท่อนำอสุจิ (ภาพที่ 39) ลักษณะของเซลล์เยื่อหุ้มท่อนำอสุจิมียเซลล์ที่ปลายด้านบนของเซลล์ การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้สมบูรณ์เป็นครั้งแรกในหอยอายุ 270 วัน เพราะว่า acini มีขนาดใหญ่ จำนวนมาก ทำให้พื้นที่ส่วนใหญ่ของ visceral mass เป็นที่อยู่ของ acini ภายใน acini พบเซลล์ที่กำลังพัฒนาทุกระยะและ spermatozoa จำนวนมาก (ภาพที่ 44) พบท่อนำอสุจิมียขนาดใหญ่ภายในมี spermatozoa จำนวนมาก ลักษณะทางจุลกายวิภาคของท่อนำอสุจิ พบว่าเยื่อหุ้มประกอบด้วยเซลล์รูปทรงสูง มีเซลล์เยื่อหุ้มด้านบนของเซลล์ ไชโทพลาซึมใส นิวเคลียสเป็นรูปรีหรือกระสวย บางท่อนมีสันตามยาว (longitudinal ridge) ซึ่งเกิดจากเนื้อเยื่อหุ้มและเนื้อเยื่อประสานยื่นเข้าไปใน lumen (infolding) ภายในท่อพบ spermatozoa (ภาพที่ 44 และ 45) ทางด้านหลังของ visceral mass มีท่อนำอสุจิมียขนาดใหญ่คือ terminal gonoduct ซึ่งมีโครงสร้างทางจุลกายวิภาคเช่นเดียวกับ gonoduct แต่อาจพบ longitudinal ridge บางบริเวณของท่อภายในท่อพบอสุจิมียจำนวนมาก (ภาพที่ 46) การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยอายุ 300 วัน น้อยกว่าหอยอายุ 270 วัน เพราะจำนวน acini น้อยกว่า ขนาดของ acini และท่อนำอสุจิลึกกว่า พบเนื้อเยื่อไขมันแทรกระหว่าง acini และมีเม็ดเลือด (hemocyte) แทรกบ้างแต่ไม่มาก (ภาพที่ 58) หอยอายุ 330 และ 360 วัน มีโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้พัฒนามากกว่าหอยอายุ 300 วัน และมากขึ้นเป็นลำดับ โดยขนาดของ acini ใหญ่ขึ้น จำนวน acini มากขึ้นและอยู่เบียดชิดติดกันเป็นกลุ่ม (ภาพที่ 60 และ 62) อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบกับหอยอายุ 270 วันก็ยังคงพบการพัฒนาที่น้อยกว่า

1.2.2 การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

เริ่มพบการสร้างอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในหอยอายุ 240 วัน และพัฒนาสมบูรณ์เป็นครั้งแรกในหอยอายุ 270 วันเช่นเดียวกับเพศผู้ หอยอายุ 240 วันพบ acini จำนวนน้อย ขนาดเล็ก ภายในประกอบด้วย oocyte ระยะต้นของการพัฒนาโดยพิจารณาจากขนาดเซลล์ซึ่ง

เล็ก ไม่มีการสร้าง yolk granule ไซโตพลาซึมติดสี basic และมีก้าน (stalk) ยึดกับผนังของ acini นอกจากนี้ใน acini ยังพบ nutritive granule จำนวนมาก (ภาพที่ 40) ท่อนำไข่มีเซลล์เยื่อบุผิวที่มีซิเลียเช่นเดียวกับเพศผู้ ในขณะที่หอยอายุ 270 วันพบจำนวน acini มากขึ้น แต่ละ acinus มี oocyte อยู่ในระยะที่พัฒนามากกว่าที่พบในหอยอายุ 240 วันเพราะเซลล์ขนาดใหญ่กว่า มีการสร้าง yolk granule ไซโตพลาซึมติดสี acid ท่อนำไข่มีลักษณะเหมือนกับเพศผู้แต่ไม่พบไข่ภายในท่อ (ภาพที่ 47) หอยระยะนี้มีการสร้าง marsupia แต่หลังจาก 270 วัน ตัวอย่างหอยเพศเมียที่สุ่มเก็บมาได้เฉพาะหอยอายุ 360 วัน และพบการพัฒนาโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียน้อยกว่าอายุ 270 วันเพราะ acini มีขนาดเล็กกว่า และภายในมี oocyte จำนวนน้อยกว่า และ oocyte ที่พัฒนาในระยะท้ายมีน้อย (ภาพที่ 63)

2. การพัฒนาเหงือกของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana*

เหงือกที่กำลังพัฒนา (developing gill) เริ่มทางด้านท้าย (posterior) ของลำตัวก่อนแล้วเพิ่มจำนวนไปทางด้านหน้า (anterior) การพัฒนาเหงือกในหอยอายุ 1 วันเกิดขึ้นทั้งด้านซ้ายและขวาของลำตัวเท่ากันทั้งขนาดและจำนวน จำนวนเหงือกที่นับได้ในช่วงอายุ 1 ถึง 60 วันเพิ่มขึ้นตามอายุ หอย เหงือกที่พบในหอยอายุ 1 วันมีเยื่อบุผิวชนิด simple low cuboidal epithelium แทรกด้วยเซลล์ของเนื้อเยื่อประสานซึ่งจะหายไปและเริ่มถูกแทนที่ด้วย hemolymphatic sinus และ calcified chitinous rod เมื่อหอยอายุ 10 วันและ 20 วันตามลำดับ (ภาพที่ 1, 3 และ 5) เริ่มพบ interfilamental ciliary junction ตลอดความยาวของ gill filament ในหอยอายุ 20 วัน (ภาพที่ 5 และ 9) ในขณะที่ mucocyte เริ่มพบในหอยอายุ 30 วันอยู่ทางด้านหลัง (dorsal) (ภาพที่ 7) ลักษณะเซลล์เป็นรูปหลายเหลี่ยม ไซโตพลาซึมใสแต่มีแกรนูลหลายๆ ชนิด eosin อ่อนๆ จากการศึกษาเหงือกหอยอายุ 40 วันโดยการตัดในระนาบ frontal ยังไม่พบ demibranch ที่สมบูรณ์ แต่พบ gill filament เรียงตัวกันเพียงแถวเดียว โดยหันด้านหน้า (frontal side) ของ gill filament ออกทางด้านข้าง (lateral) ของลำตัวหอย (ภาพที่ 10) หอยอายุ 50 วันเป็นระยะแรกที่เริ่มพบ interfilamental tissue junction (ภาพที่ 11) ไม่พบความแตกต่างของโครงสร้างเหงือกเมื่อเปรียบเทียบระหว่างหอยอายุ 50 วัน (ภาพที่ 12) และหอยอายุ 60 วัน เพียงแต่หอยอายุ 60 วันพบ gill filament มีความยาวเพิ่มขึ้น interfilamental ciliary junction พบมากตลอดแนวของ gill filament (ภาพที่ 14)

โครงสร้างของ interfilamental tissue junction และ interfilamental ciliary junction ที่พบในหอยอายุ 80 วันไม่แตกต่างจากที่พบในหอยอายุ 50 และ 60 วัน แต่อาจมีจำนวนมากขึ้น (ภาพที่

16) นอกจากนี้เหงือกหอยอายุ 80 วัน สามารถศึกษาโครงสร้างในแนวการตัดแบบ frontal ได้เพราะสามารถจัดวางระนาบในการตัดได้ โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของ inner และ outer demibranch ไม่แตกต่างกัน (ภาพที่ 17 และ 18) interlamellar septum ประกอบด้วยเนื้อเยื่อประสานและกล้ามเนื้อแทรกระหว่างเยื่อผิวหนังชนิด simple squamous epithelium ที่บุ water tube ขนาดของ water tube แต่ละท่อแตกต่างกัน ที่ปลายของ interlamellar septum ประกอบด้วยท่อเลือด (septum blood vessel) lamella ประกอบด้วย interfilamental tissue junction และแองเงอเลียมซึ่งผนังด้านในเป็นเนื้อเยื่อผิวหนังชนิด simple squamous epithelium และบุ water tube จึงทำให้ผนังของ water tube บูดด้วยเนื้อเยื่อผิวหนังชนิด simple squamous epithelium ทุกด้าน พบลักษณะเช่นนี้จนถึงหอยอายุ 180 วัน (ภาพที่ 20, 22, 24, 26, 28, 32 และ 33) แต่เริ่มพบ mucocyte บูด water tube ในหอยอายุ 180 วัน (ภาพที่ 33) เมื่อหอยอายุตั้งแต่ 210 วันขึ้นไป interlamellar septum และ interfilamental tissue junction หนาตัวขึ้นตามขนาดของ demibranch ที่ใหญ่ขึ้นตามอายุ พบเนื้อเยื่อประสานและกล้ามเนื้อมากขึ้น (ภาพที่ 37, 41, 42, 43, 48, 49, 59, 64, 65 และ 66) เซลล์เยื่อผิวหนังของ water tube ด้านที่เกิดจาก interlamellar septum มีลักษณะเหมือนคุ่มหรือหยดน้ำ ทำให้ชั้นเนื้อเยื่อผิวหนังดูไม่เรียบแต่มีลักษณะเป็นลอน mucocyte เพิ่มจำนวนขึ้นและเมื่อตรวจสอบทางมิวซเคมีสามารถจำแนกได้เป็น 3 ชนิด คือ mucocyte ที่สร้างเฉพาะ acid mucopolysaccharide ติดสีน้ำเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับ alcian blue mucocyte ที่สร้างเฉพาะ neutral mucopolysaccharide ติดสีม่วงแดง (magenta) เมื่อทำปฏิกิริยากับ PAS และ mucocyte ที่สร้างทั้ง acid และ neutral (mixed) mucopolysaccharide ติดสีผสมระหว่าง 2 สี และการติดสีผสมมีหลายระดับ พบได้ทั้งใน inner และ outer demibranch ของทั้งเพศผู้และเพศเมีย (ภาพที่ 43, 56, 57, 65 และ 66) นอกจากนี้พบความผิดปกติของเซลล์ที่เหงือกในหอยอายุ 210 และ 240 วัน ณ ตำแหน่งของ gill filament และผนัง water tube (ภาพที่ 37 และ 41) ความผิดปกติที่พบคือเซลล์มีขนาดเซลล์และนิวเคลียสเพิ่มขึ้นกว่าเซลล์ปกติประมาณ 2 ถึง 3 เท่า และบางเซลล์นิวเคลียสแตกหักเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ ไซโตพลาซึมติดสี acid เข้มขึ้น ความแตกต่างของโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของ demibranch ระหว่างหอยที่ไม่มีการเพาะฟักตัวอ่อนและหอยเพศเมียที่มีการเพาะฟักตัวอ่อนใน marsupia เริ่มพบในหอยอายุ 270 วัน อย่างไรก็ตามโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของ inner demibranch ในหอยเพศเมียที่มีการเพาะฟักตัวอ่อนจะเหมือนกับ inner และ outer demibranch ในหอยทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ไม่มีการเพาะฟักตัวอ่อน แต่แตกต่างจาก marsupia ลักษณะโดยรวมของ demibranch ที่ไม่ทำหน้าที่เป็น marsupia ในหอยอายุ 270 วัน พบว่า demibranch จะมีขนาดใหญ่ interlamellar septum มีความหนา อาจพบว่ามีพับเป็นจีบ (folding) มีจำนวน mucocyte ที่บุ water tube มากขึ้น (ภาพที่ 48 และ 49)

marsupia ที่มีตัวอ่อนระยะ โกลคิเดียนพัฒนาอยู่ใน primary water tube (ภาพที่ 50, 51, 52, 54, 55 และ 56) ซึ่งเป็น water tube เดิม พบว่ามีการสร้าง secondary water tube ใหม่ขึ้นเฉพาะใน lamella ซึ่งอยู่ทางด้านข้าง (lateral lamella) ของ marsupia และมี secondary water tube เพียงบางช่วงของ lamella เท่านั้น (ภาพที่ 50) จำนวน secondary water tube ที่พบอาจมีมากถึงประมาณ 5-6 ท่อต่อ 1 ท่อของ primary water tube และ secondary water tube ที่เกิดขึ้นใหม่นี้แยกออกจาก primary water tube โดย secondary septum ซึ่งเป็นแผ่นกั้นประกอบขึ้นจากเยื่อบุผิวของทั้ง 2 ท่อ และเนื้อเยื่อประสานซึ่งแทรกระหว่างเนื้อเยื่อบุผิวทั้งสอง (ภาพที่ 52) นอกจากนี้พบว่าในบางช่วงของ lamella ซึ่งไม่มี secondary water tube จะมีการเชื่อมต่อกันระหว่าง primary water tube และช่องแมนเทิลโดยผ่านทางช่อง water canal (ภาพที่ 51) โครงสร้างของ primary water tube บางบริเวณ ผนังท่อด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชนิด pseudostratified columnar epithelium ซึ่งมีชนิดขนาดสั้นที่ปลายด้านบนของเซลล์และยังพบ mucocyte แทรกระหว่างเนื้อเยื่อดังกล่าวเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 53) interlamellar septum มีการยื่น (infolding) ของชั้นเนื้อเยื่อบุผิวและเนื้อเยื่อซึ่งอยู่ใต้เนื้อเยื่อบุผิว (sub-epithelial tissue) เข้าไปใน primary water tube พบ interlamellar septum หลายบริเวณที่มีลักษณะเหมือนเบ้า (socket) รองรับ โกลคิเดียนได้อย่างพอดี (ภาพที่ 51, 55 และ 56) โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของ secondary water tube บูดด้วยเนื้อเยื่อบุผิวเพียงชั้นเดียว โดยผนังด้านข้างซึ่งกั้นระหว่าง secondary water tube ทั้ง 2 ท่อ ประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิว 2 ชั้นของแต่ละท่อแทรกด้วยเนื้อเยื่อประสาน (ภาพที่ 52) interlamellar septum ยาวมากกว่าในหอยทุกระยะที่กล่าวไว้ตอนต้น และยาวมากกว่าที่พบทั้งใน inner และ outer demibranch ของหอยเพศผู้อายุเท่ากัน นอกจากนี้ยังยาวมากกว่า inner demibranch ของหอยตัวเดียวกัน อย่างไรก็ตาม interlamellar septum บางอันจะบางเมื่อเปรียบเทียบกับ inner demibranch ของหอยตัวเดียวกัน (ภาพที่ 54 และ 56) โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของ interlamellar septum ประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิว 2 ด้านซึ่งบุ primary water tube ที่อยู่ใกล้กันและแทรกด้วยเนื้อเยื่อประสาน กล้ามเนื้อ และเซลล์เม็ดเลือด (ภาพที่ 52 และ 55) interlamellar septum ที่ถูกตัดบางช่วงไม่ได้เชื่อมระหว่าง 2 lamellae ของ marsupia อย่างสมบูรณ์ ทำให้เกิดช่อง (perforation) เชื่อมกันระหว่าง primary water tube ที่อยู่ติดกัน (ภาพที่ 51 และ 55) septum blood vessel พบเด่นชัดที่ปลายของ interlamellar septum ทางด้านที่อยู่ใกล้กับ secondary water tube (lateral lamella) (ภาพที่ 50)

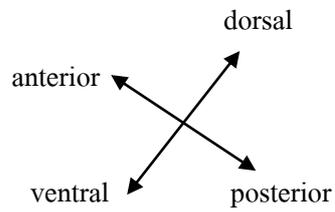
การศึกษาเพื่อจำแนกชนิดและตำแหน่งของ mucopolysaccharide ที่ marsupia โดยวิธีทางมิวซเคมี พบ acid mucopolysaccharide ที่ 3 บริเวณคือ mucocyte ที่ gill filament mucocyte ที่บุรอบผนังของ primary water tube และเปลือกด้านนอกของ โกลคิเดียน เมื่อพิจารณาการติดสี alcian

blue พบว่า mucocyte ที่ gill filament และที่เปลือกของโกลกิเดียดิตสีฟ้าสว่างจางๆ ในขณะที่ mucocyte ที่บุรอบ primary water tube ดิตสีน้ำเงินปนม่วงและพบเซลล์ซึ่งดิตสีเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 54) ตำแหน่งของ neutral mucopolysaccharide พบว่ามีการดิตสี PAS ชัดเจน 3 ตำแหน่ง คือ mucocyte ที่บุรอบผนัง primary water tube ซึ่งมีเซลล์จำนวนน้อยที่ให้ผลบวกในการดิตสี นอกจากนี้ ดิตสียังติดที่ mucopolysaccharide band ของโกลกิเดียดิตสีซึ่งมีลักษณะเป็นแท่งโค้งหรือกลมเมื่อตัดตามขวางแท่ง และสุดท้ายคือที่เปลือกโกลกิเดียดิตสีด้านนอก เมื่อพิจารณาการดิตสีพบว่า mucocyte ที่บุรอบผนัง primary water tube และเปลือกของโกลกิเดียดิตสีม่วง ในขณะที่ mucopolysaccharide band ของโกลกิเดียดิตสีม่วงแดง (ภาพที่ 55) เพื่อเป็นการยืนยันครั้งสุดท้ายถึงชนิดและตำแหน่งของ mucopolysaccharide บน marsupia จึงทำการย้อมด้วยสี PAS-alcian blue (ภาพที่ 56 และ 57) พบว่า mucocyte ที่บุรอบ primary water tube มี 3 ชนิด คือ acid, neutral and mixed mucopolysaccharide-producing mucocyte โดย mucocyte ที่สร้าง acid mucopolysaccharide เป็นเซลล์ส่วนใหญ่มีจำนวนมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ของ mucocyte ซึ่งพบที่ primary water tube ที่สร้าง neutral mucopolysaccharide พบปริมาณน้อยที่สุด และ mucocyte ที่สร้าง mixed mucopolysaccharide มีจำนวนปานกลางระหว่างเซลล์ 2 กลุ่มแรก นอกจากนี้ mucocyte ซึ่งพบที่ gill filament เป็นชนิดที่สร้าง acid และ mixed mucopolysaccharide สำหรับผลการดิตสีที่โกลกิเดียดิตสีที่โกลกิเดียดิตสี mucopolysaccharide band เป็นสารพวก neutral mucopolysaccharide ส่วนเปลือกด้านนอกมีสารในกลุ่ม mixed mucopolysaccharide เคลือบอยู่

เหงือกหอยอายุ 300, 330 และ 360 วัน มีขนาดของ water tube และความหนาของ interlamellar septum ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหอยอายุ 270 วัน (ภาพที่ 59, 61, 64, 65 และ 66) อย่างไรก็ตามจากการส่องเก็บตัวอย่างหอยอายุ 300 และ 330 วัน ไม่พบหอยเพศเมีย แต่ในหอยอายุ 360 วัน พบหอยเพศเมียแต่ไม่เปลี่ยนแปลงเป็น marsupia และ โครงสร้างทางจุลกายวิภาคไม่พบ secondary water tube จำนวน mucocyte มีน้อยกว่าในหอยเพศเมียอายุ 270 วัน และพบชนิดที่สร้าง mixed mucopolysaccharide เด่นกว่าชนิดอื่น (ภาพที่ 65 และ 66) นอกจากนี้ในหอยอายุ 300 และ 360 พบความผิดปกติของเซลล์กระจายทั่วไปที่ฐาน gill filament และ interlamellar tissue junction โดยความผิดปกติส่วนใหญ่คือเซลล์มีขนาดเซลล์และนิวเคลียสใหญ่ขึ้น และมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากขึ้น (ภาพที่ 59 และ 64)

ภาพที่ 1 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 1 วัน

DT = digestive tract
 F = foot
 GF = gill filament
 M = mantle
 MT = muscular tissue
 S = shell



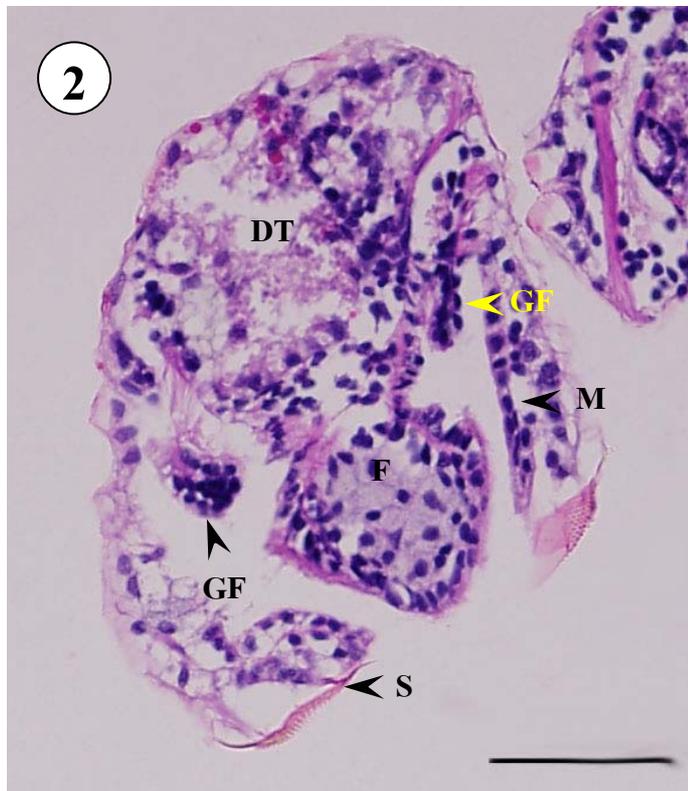
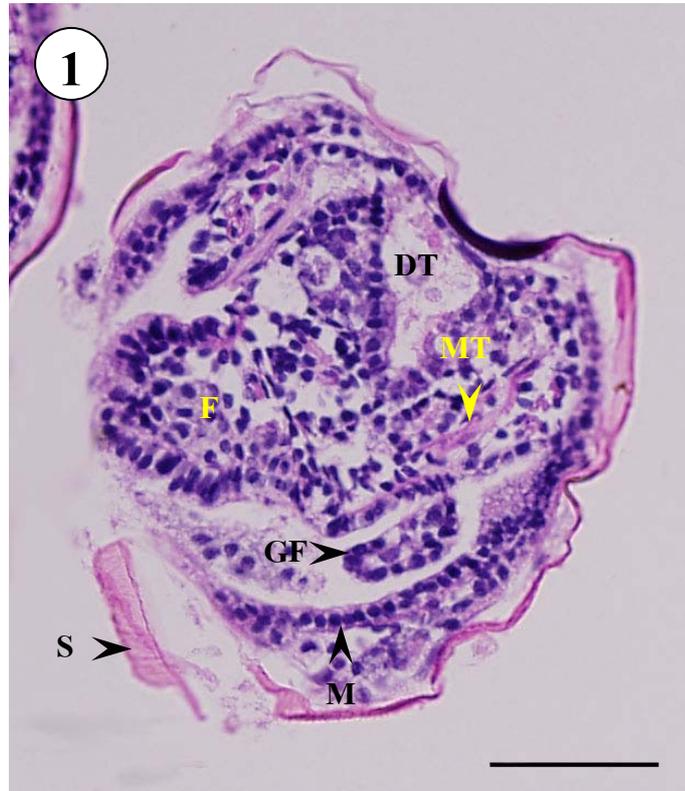
(H&E: bar = 50 μ m)

ภาพที่ 2 ภาพตัดตามขวางหอยอายุ 1 วัน

DT = digestive tract
 F = foot
 GF = gill filament
 M = mantle
 S = shell

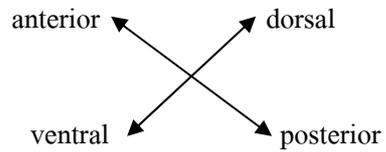


(H&E: bar = 50 μ m)



ภาพที่ 3 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 10 วัน

- Ci = cilia
 DT = digestive tract
 F = foot
 GF = gill filament
 HS = hemolymphatic sinus
 M = mantle
 PG = pedal ganglion

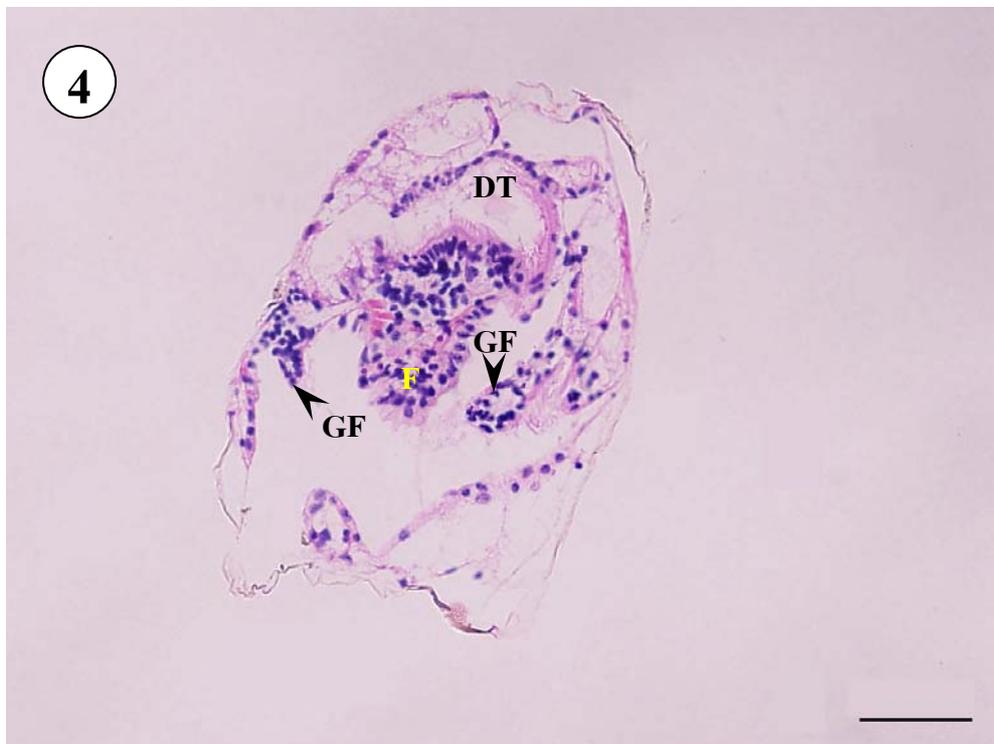
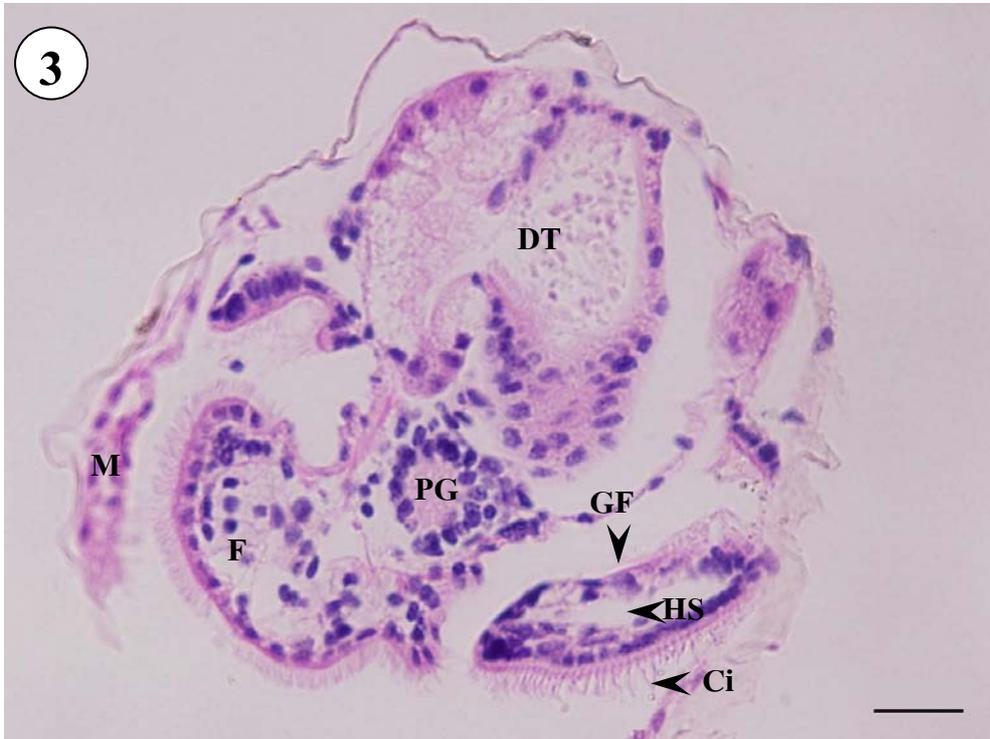


(H&E: bar = 20 μ m)

ภาพที่ 4 ภาพตัดตามขวางหอยอายุ 20 วัน

- DT = digestive tract
 F = foot
 GF = gill filament

(H&E: bar = 50 μ m)



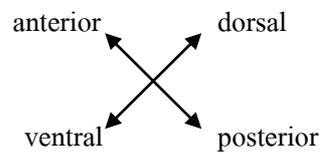
ภาพที่ 5 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 20 วัน

- CR = calcified chitinous rod
 GF = gill filament
 ICJ = interfilamental ciliary junction

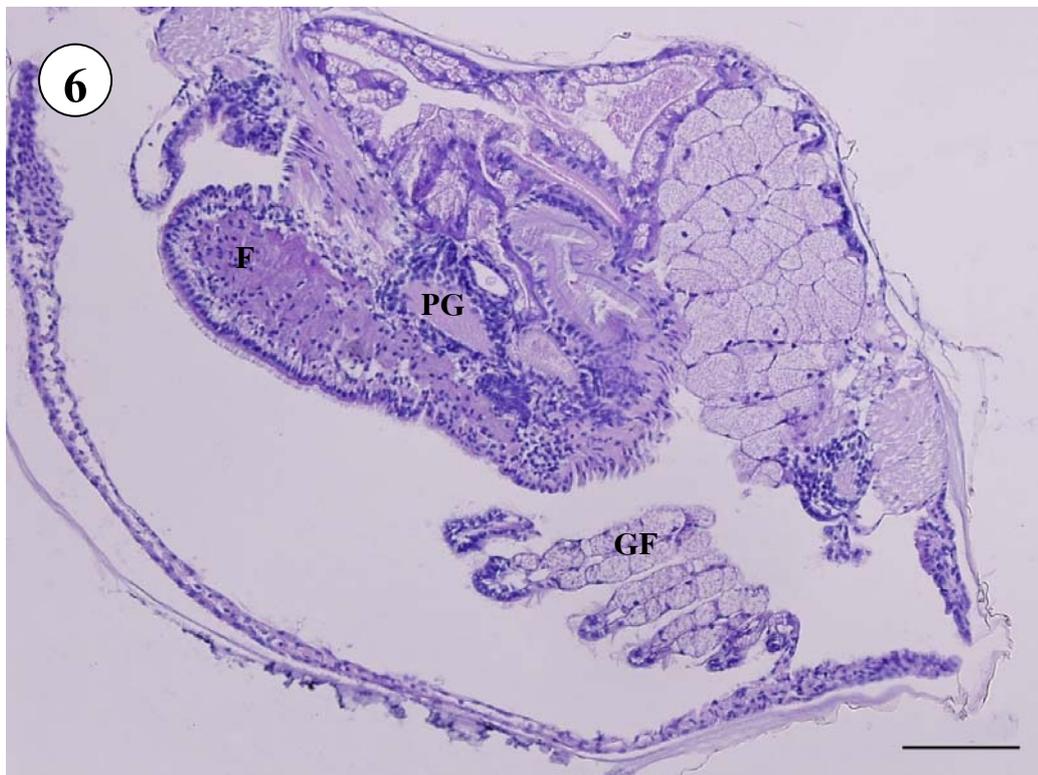
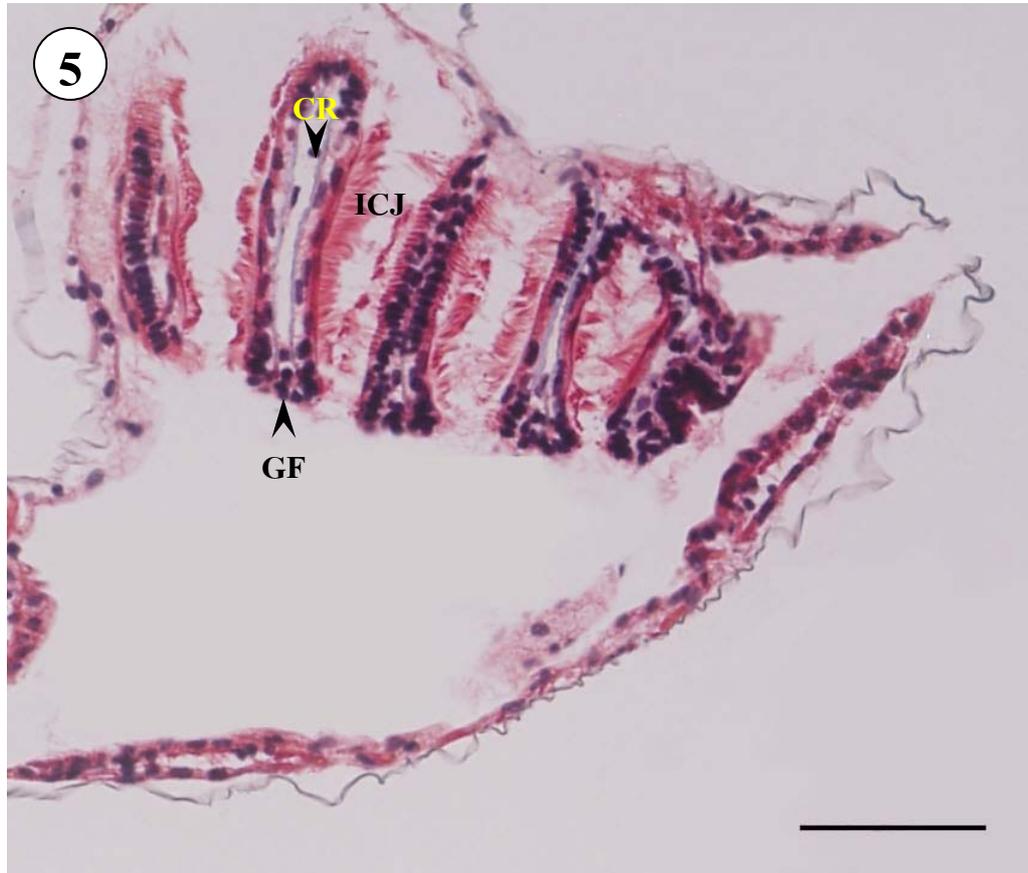
(Masson's trichome: bar = 50 μm)

ภาพที่ 6 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 30 วัน

- F = foot
 GF = gill filament
 PG = pedal ganglion



(PAS: bar = 100 μm)



ภาพที่ 7 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 30 วัน (แสดงเหงือก)

CR = calcified chitinous rod

GF = gill filament

Mu = mucocyte

(H&E: bar = 100 μ m)

ภาพที่ 8 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 40 วัน

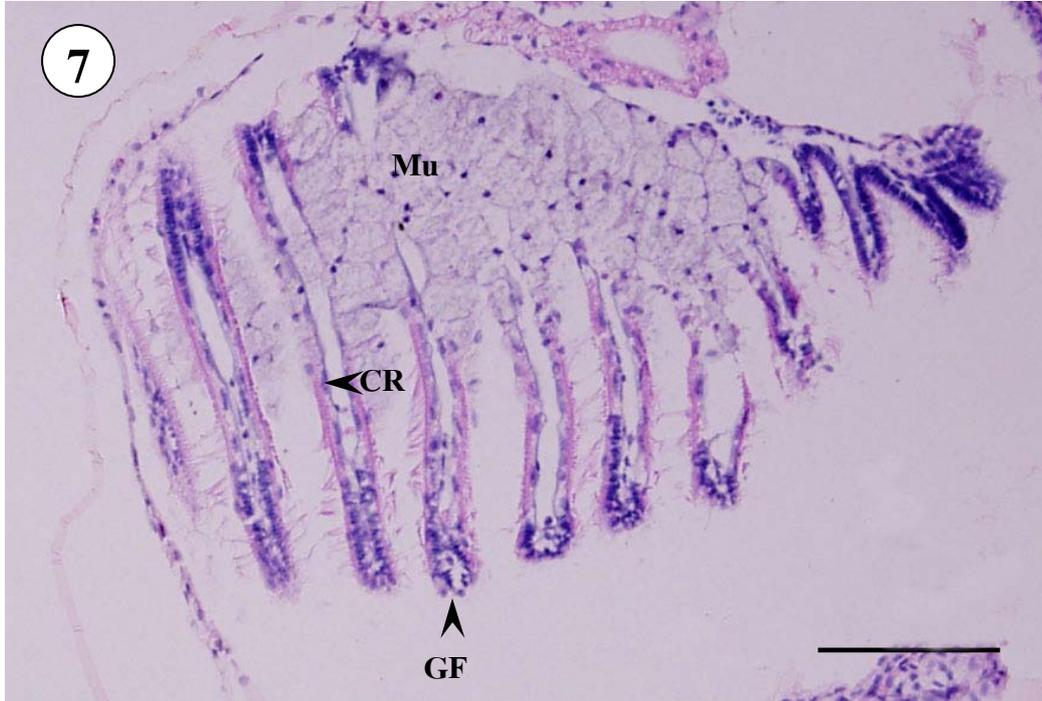
F = foot

GF = gill filament

PAM = posterior adductor muscle

PG = pedal ganglion

(Masson's trichome: bar = 100 μ m)



ภาพที่ 9 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 40 วัน (แสดงเหงือก)

- CR = calcified chitinous rod
- GF = gill filament
- HS = hemolymphatic sinus
- ICJ = interfilamental ciliary junction

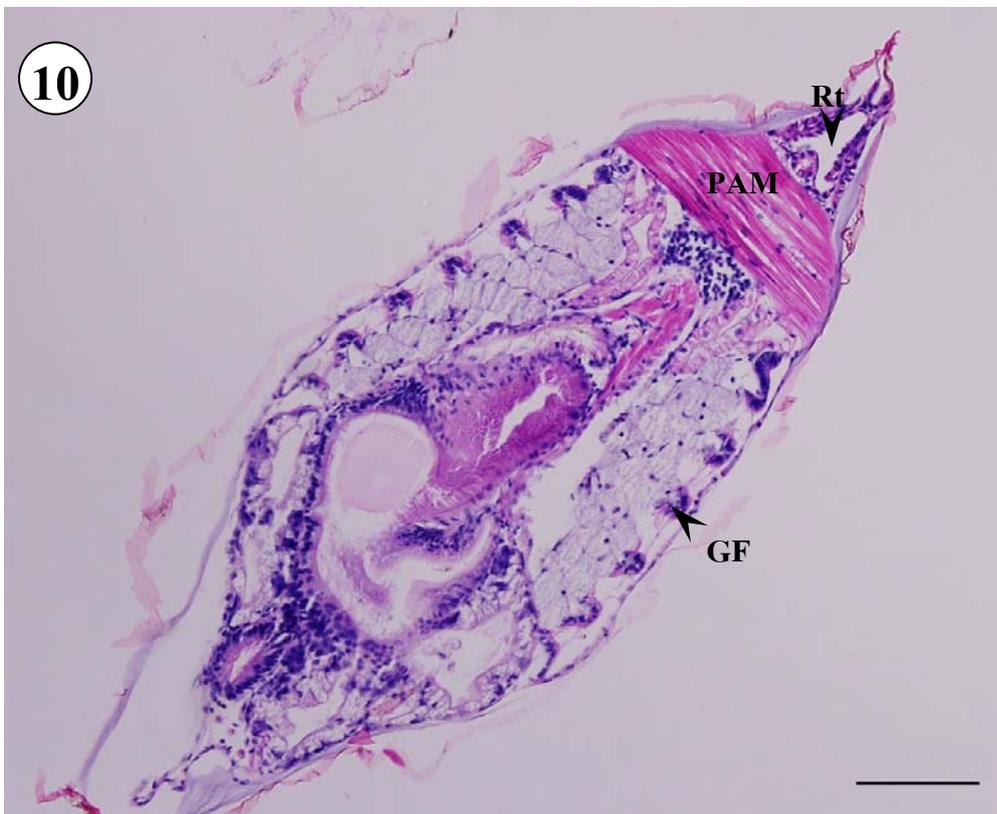
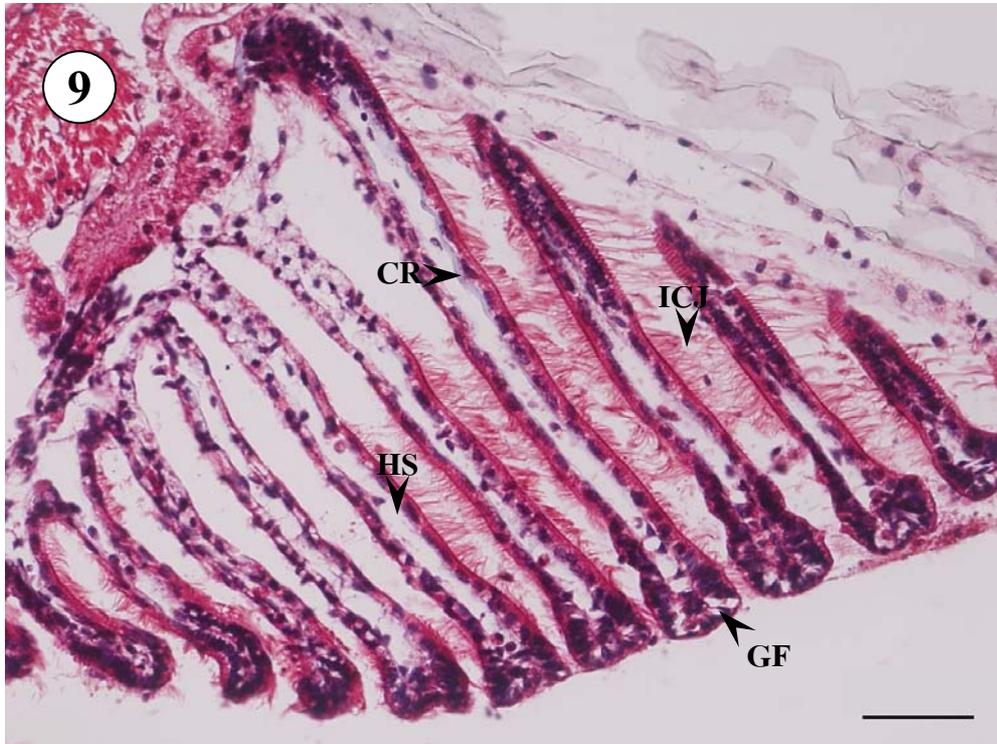
(Masson's trichome: bar = 50 μm)

ภาพที่ 10 ภาพตัดในระนาบ obliquely frontal ของหอยอายุ 40 วัน

- GF = gill filament
- PAM = posterior adductor muscle
- Rt = rectum

posterior
↖
anterior

(H&E: bar = 100 μm)



ภาพที่ 11 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 50 วัน

F = foot

GF = gill filament

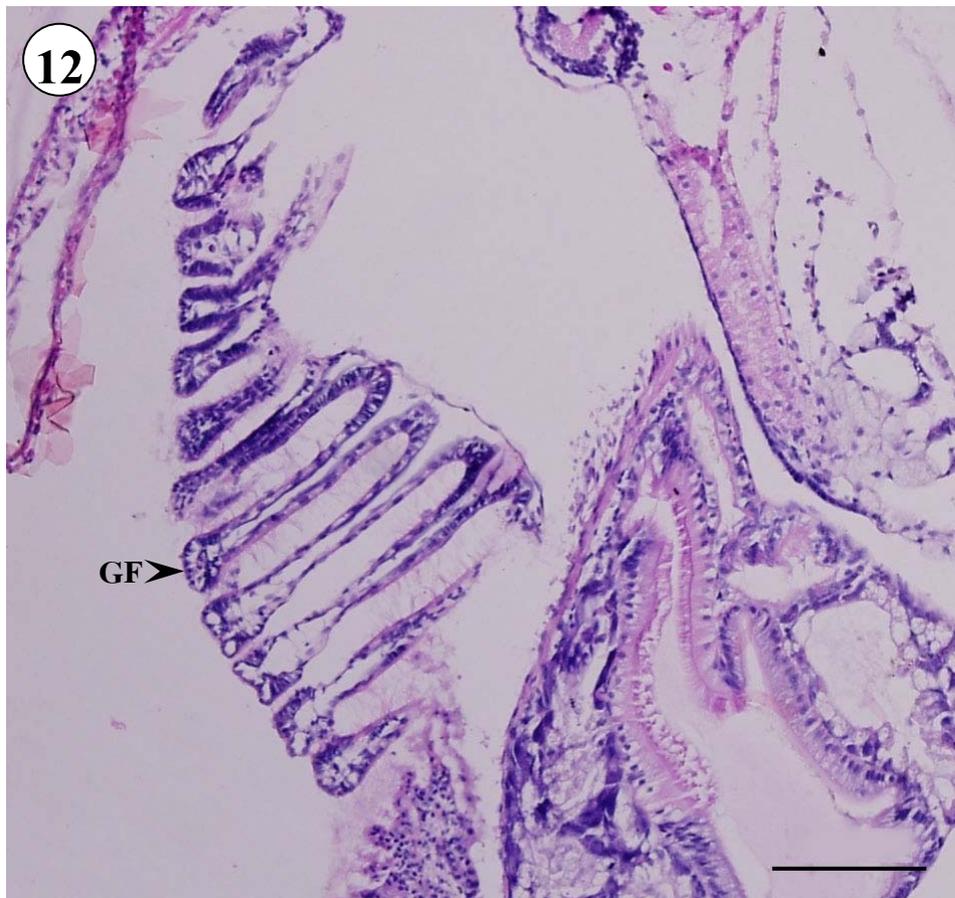
IFJ = interfilamental tissue junction

(Masson's trichome: 100 μ m)

ภาพที่ 12 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 50 วัน (แสดงเหงือก)

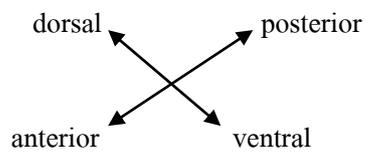
GF = gill filament

(H&E: bar = 100 μ m)



ภาพที่ 13 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 60 วัน

F = foot
GF = gill filament
PG = pedal ganglion

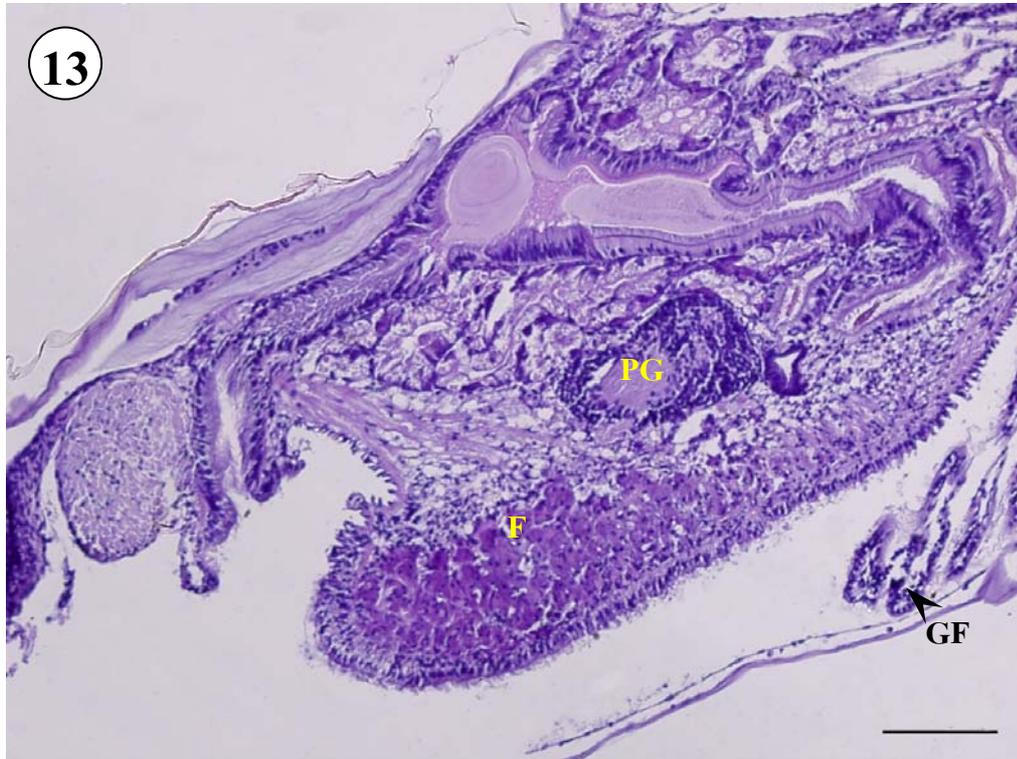


(PAS: bar = 100 μ m)

ภาพที่ 14 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 60 วัน (แสดงเหงือก)

GF = gill filament
ICJ = interfilamental ciliary junction

(H&E: bar = 100 μ m)



ภาพที่ 15 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 80 วัน

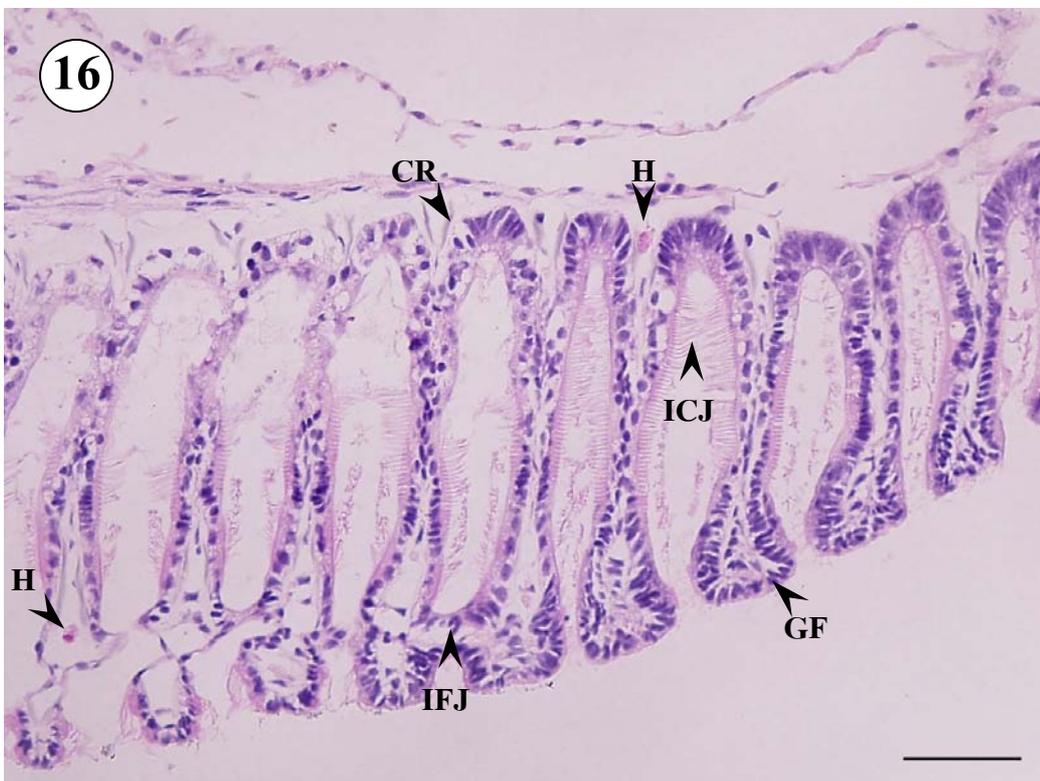
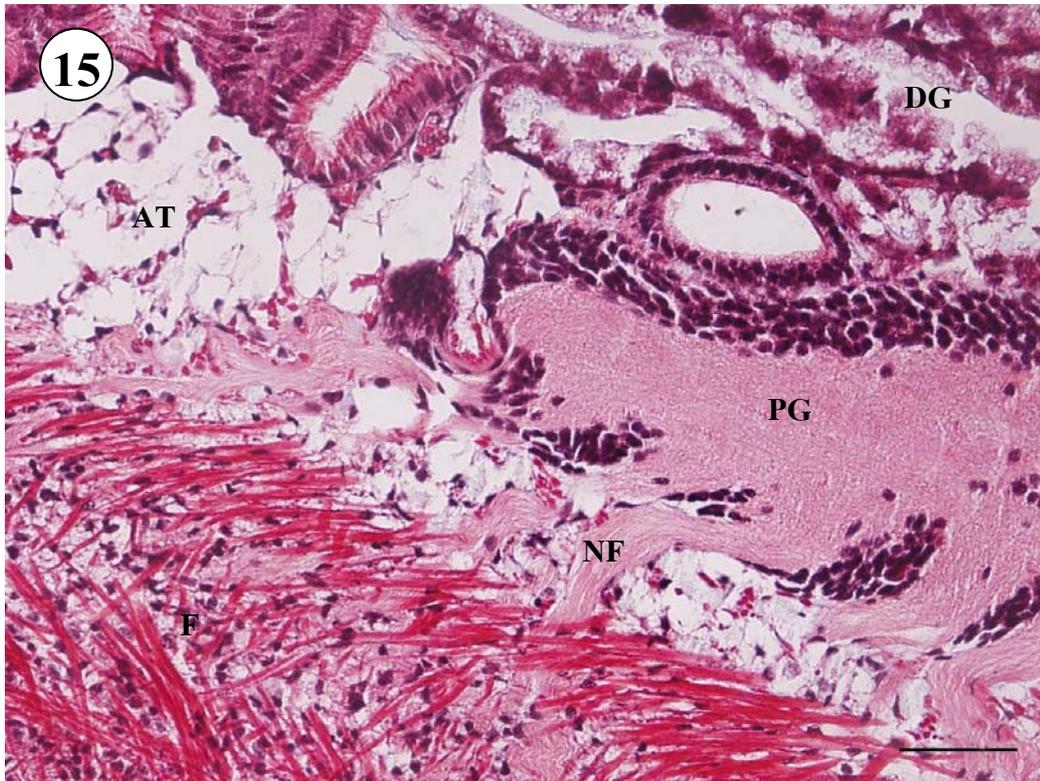
- AT = adipose tissue
- DG = digestive gland
- F = foot
- NF = nerve fiber
- PG = pedal ganglion

(Masson's trichome: bar = 50 μ m)

ภาพที่ 16 ภาพตัดตามยาวหอยอายุ 80 วัน (แสดงเหงือก)

- CR = calcified chitinous rod
- GF = gill filament
- H = hemocyte
- ICJ = interfilamental ciliary junction
- IFJ = interfilamental tissue junction

(H&E: bar = 50 μ m)



ภาพที่ 17 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยอายุ 80 วัน

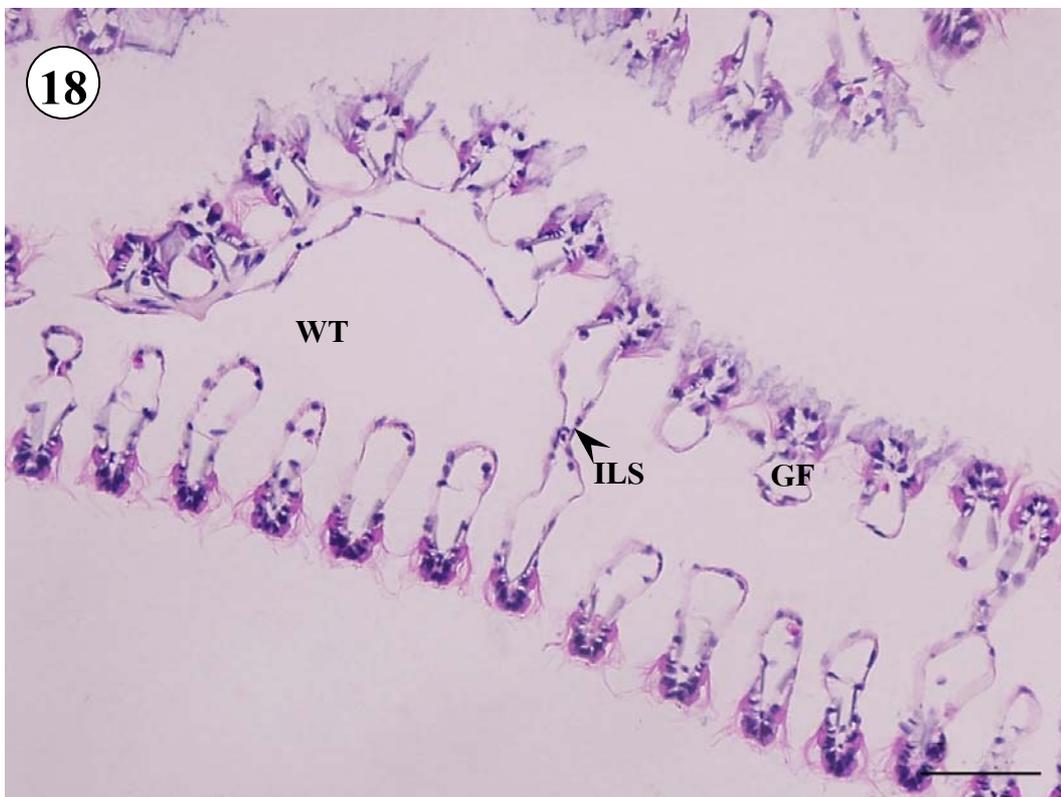
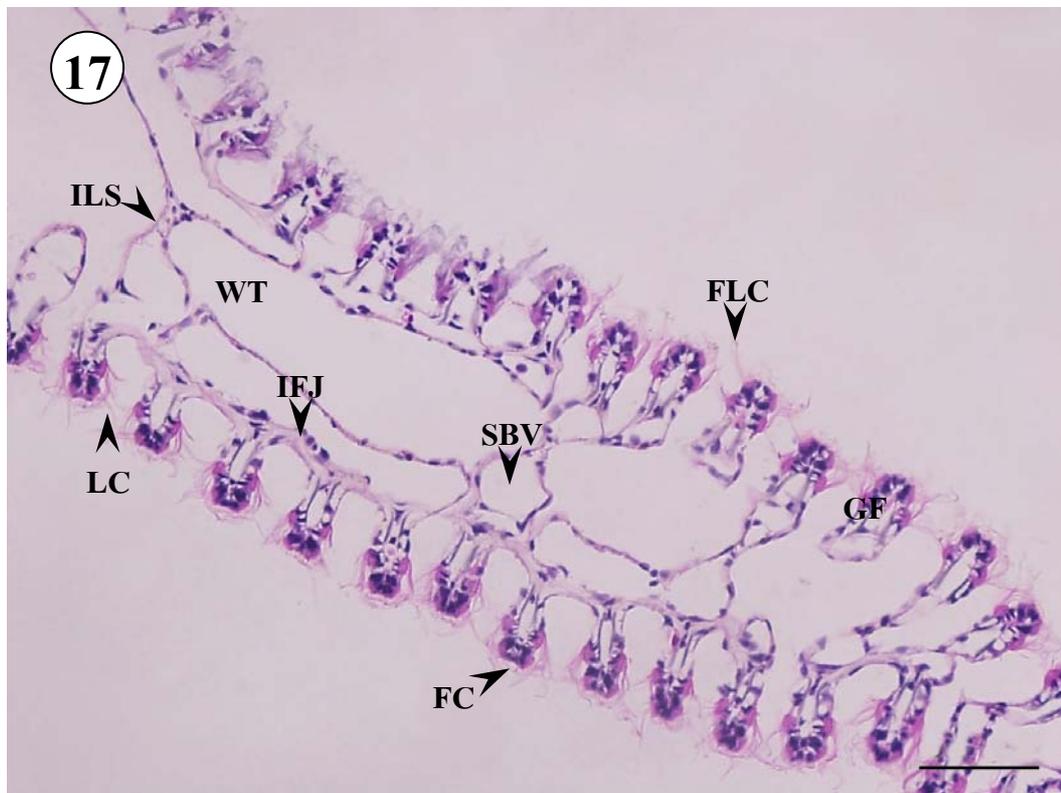
- FC = frontal cilia
- FLC = frontolateral cilia
- GF = gill filament
- IFJ = interfilamental tissue junction
- ILS = interlamellar septum
- LC = lateral cilia
- SBV = septum blood vessel
- WT = water tube

(H&E: bar = 50 μ m)

ภาพที่ 18 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ inner demibranch หอยอายุ 80 วัน

- GF = gill filament
- ILS = interlamellar septum
- WT = water tube

(H&E: bar = 50 μ m)



ภาพที่ 19 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 90 วัน

AT = adipose tissue

MT = muscular tissue

(Masson's trichome: bar = 20 μm)

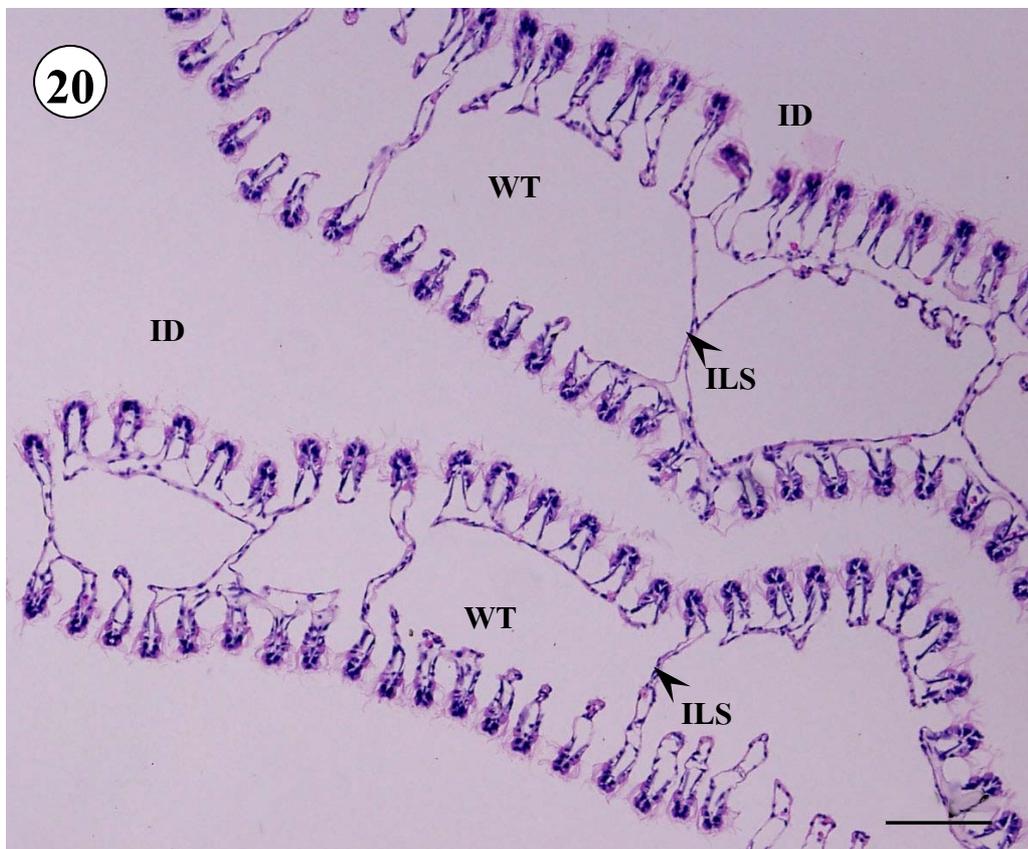
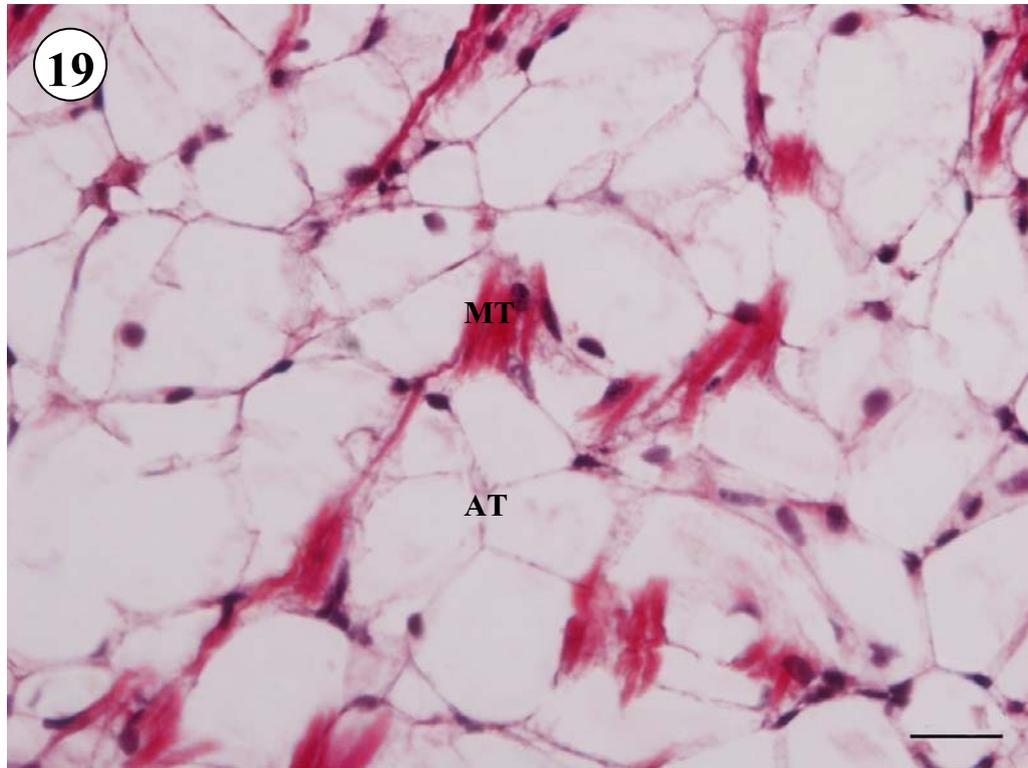
ภาพที่ 20 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ inner demibranchs หอยอายุ 90 วัน

ID = inner demibranch

ILS = interlamellar septum

WT = water tube

(H&E: bar = 200 μm)



ภาพที่ 21 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 100 วัน

AT = adipose tissue

MT = muscular tissue

(Masson's trichome: bar = 50 μm)

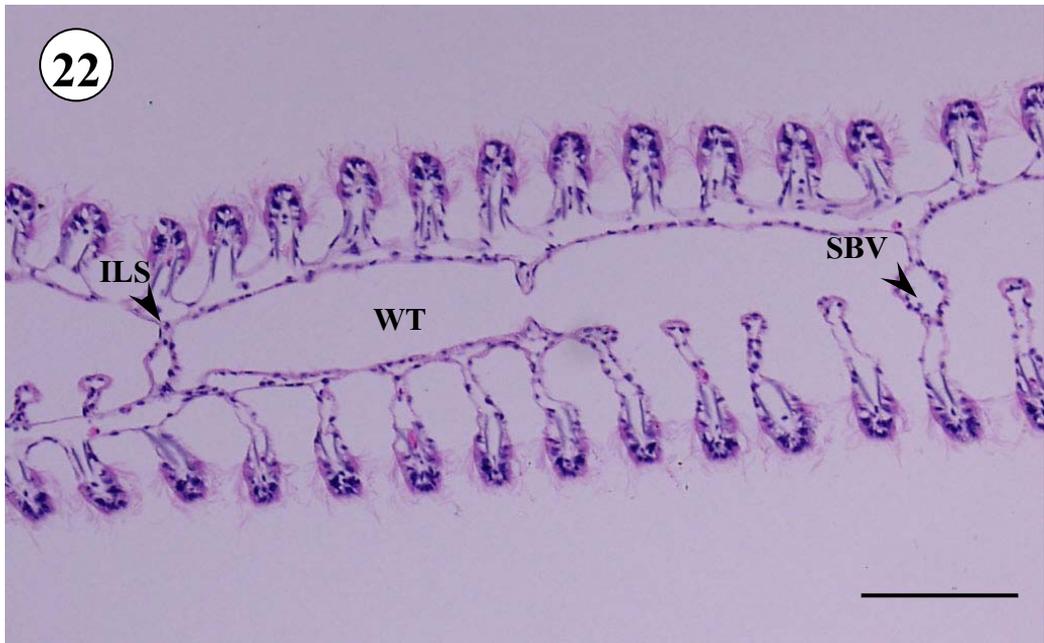
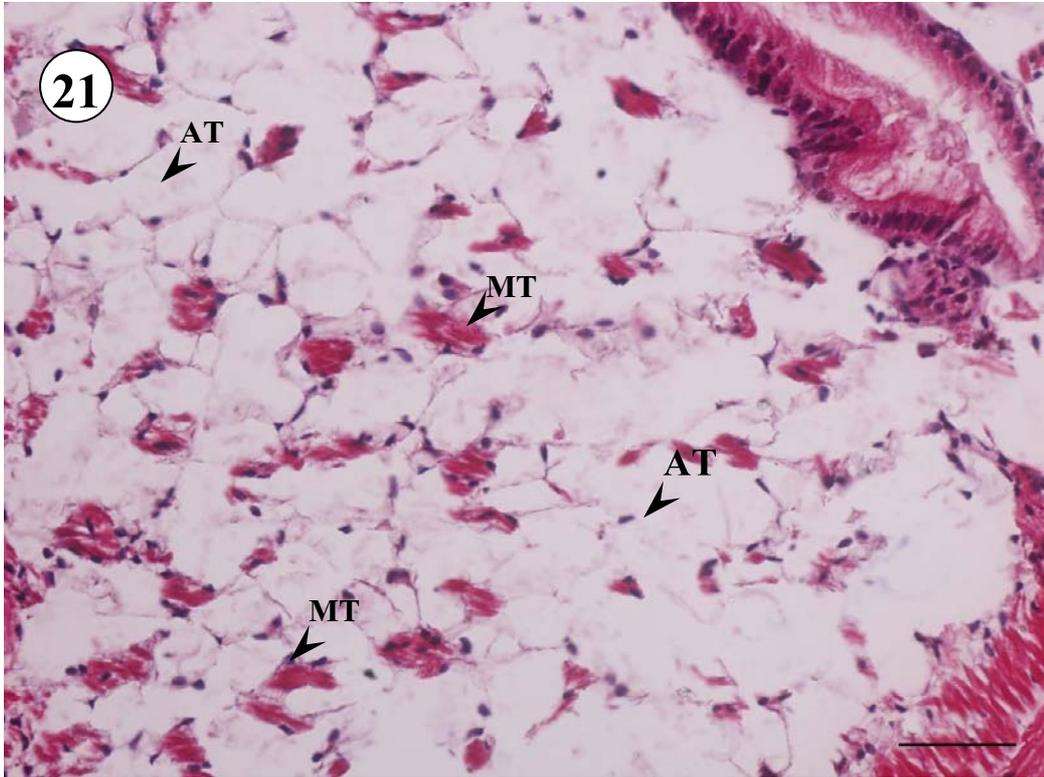
ภาพที่ 22 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยอายุ 100 วัน

ILS = interlamellar septum

SBV = septum blood vessel

WT = water tube

(H&E: bar = 100 μm)



ภาพที่ 23 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 120 วัน

AT = adipose tissue

MT = muscular tissue

(H&E: bar = 50 μ m)

ภาพที่ 24 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ inner demibranch หอยอายุ 120 วัน

H = hemocyte

HS = hemolymphatic sinus

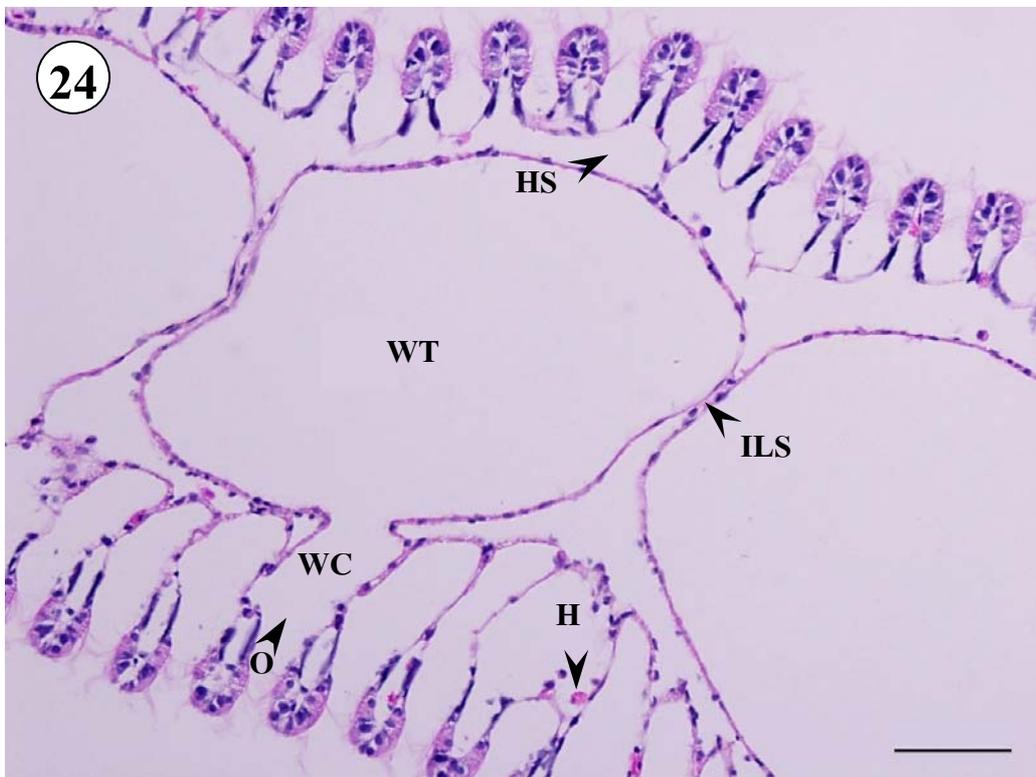
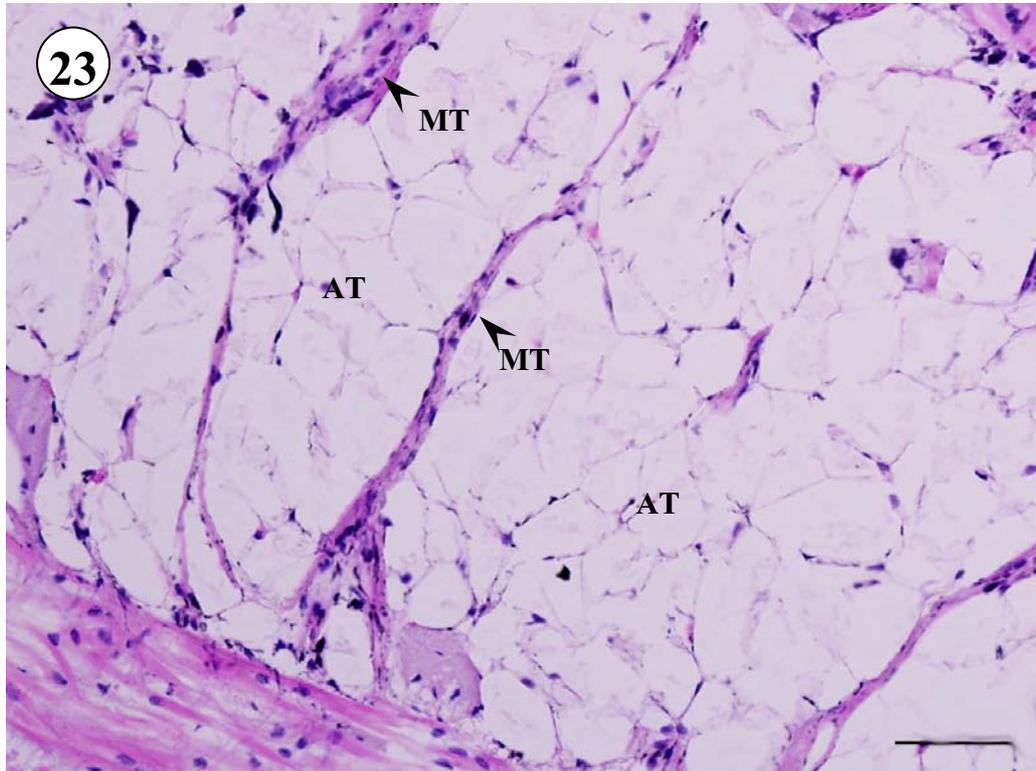
ILS = interlamellar septum

O = ostium

WC = water canal

WT = water tube

(H&E: bar = 50 μ m)



ภาพที่ 25 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 140 วัน

AT = adipose tissue

MT = muscular tissue

(Masson's trichome: bar = 20 μm)

ภาพที่ 26 ภาพตัดในระนาบ frontal ของเหงือกหอยอายุ 140 วัน

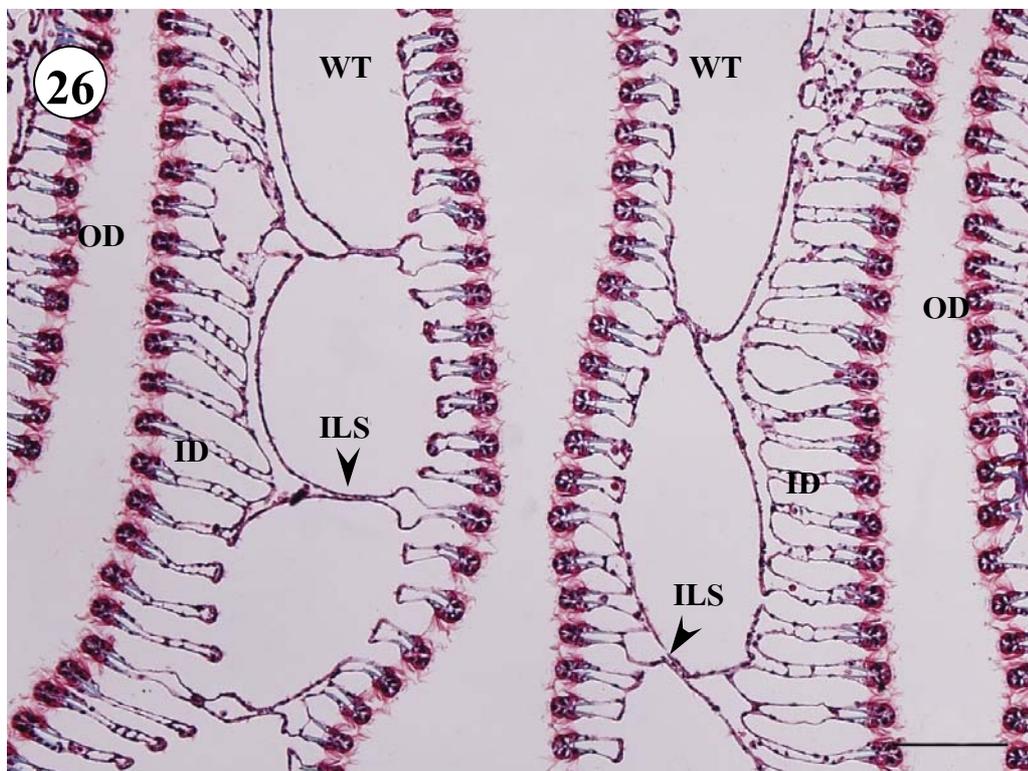
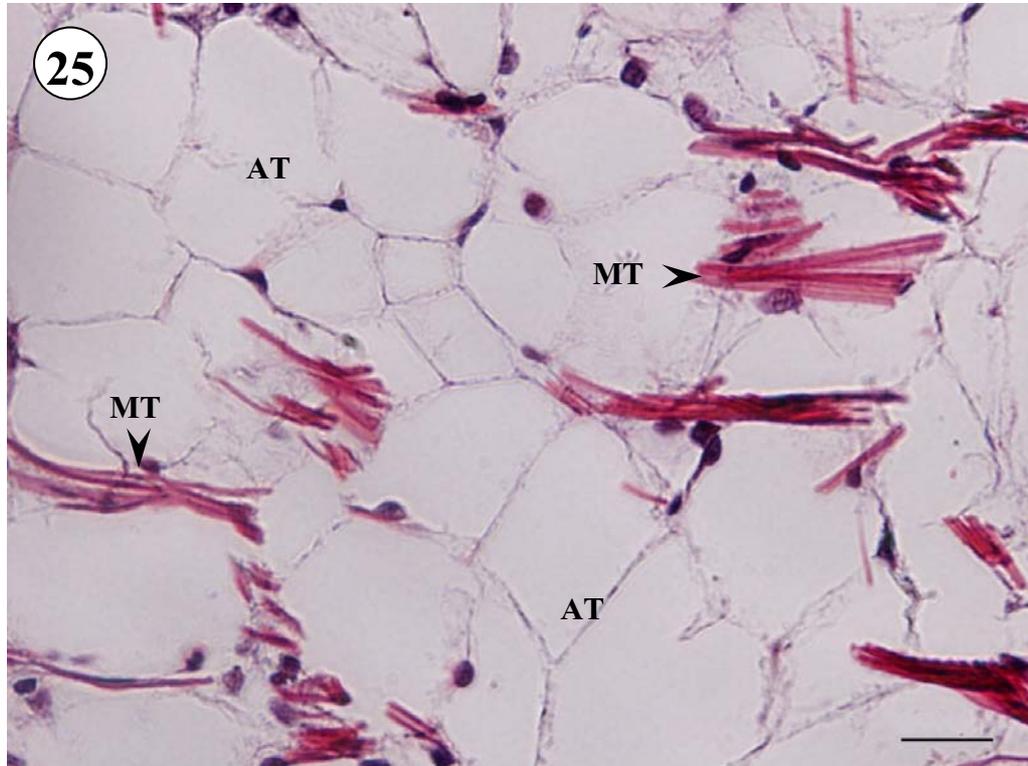
ID = inner demibranch

ILS = interlamellar septum

OD = outer demibranch

WT = water tube

(Masson's trichome: bar = 100 μm)



ภาพที่ 27 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 160 วัน

AT = adipose tissue

MT = muscular tissue

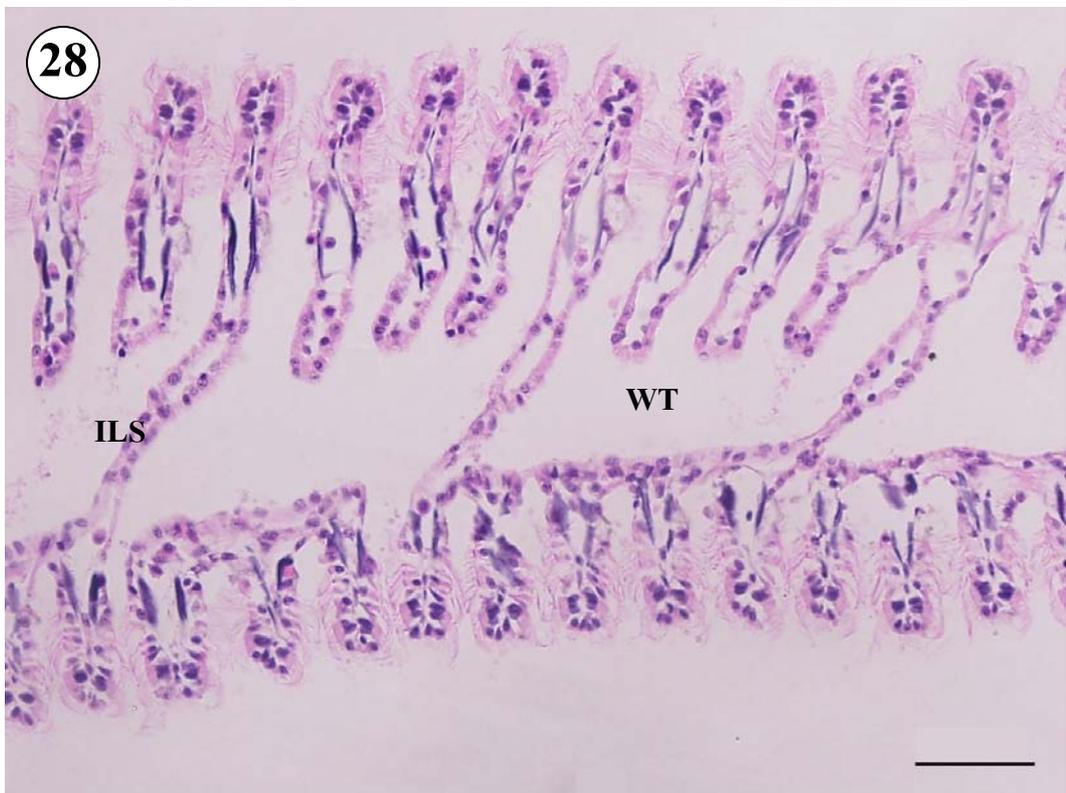
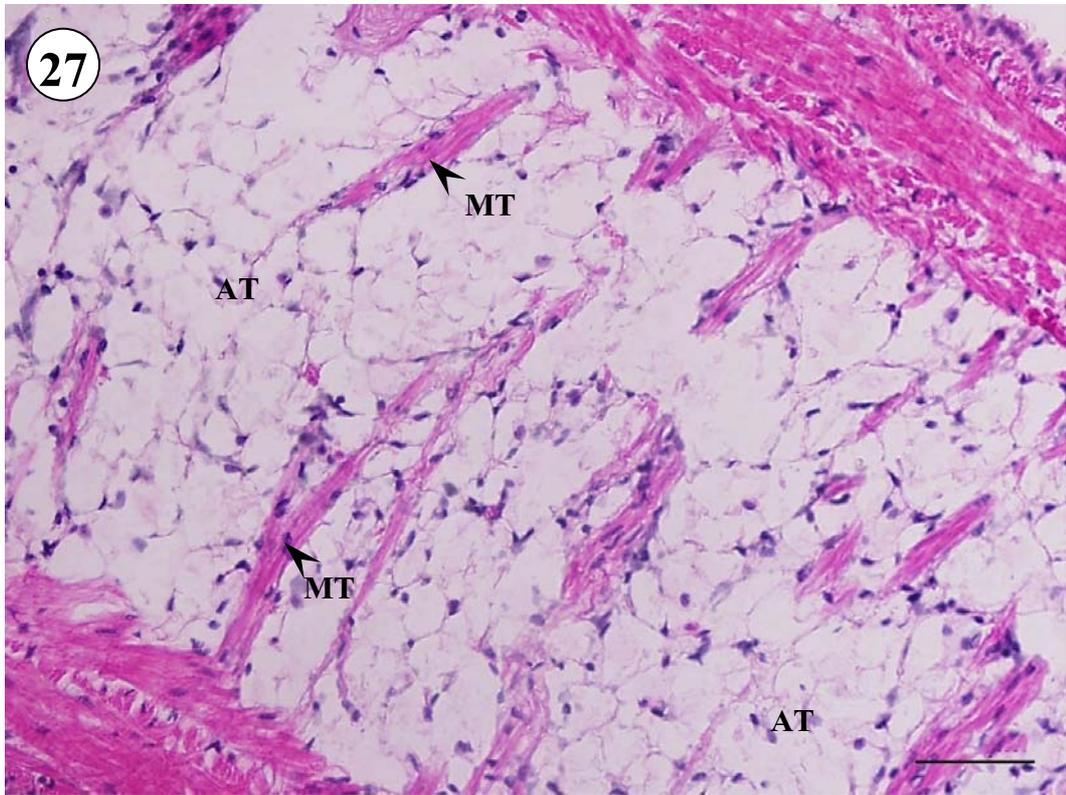
(H&E: bar = 50 μ m)

ภาพที่ 28 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยอายุ 160 วัน

ILS = interlamellar septum

WT = water tube

(H&E: bar = 50 μ m)



ภาพที่ 29 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 180 วัน

Ac = acinus

AT = adipose tissue

DSC = developing spermatogenic cell

MT = muscular tissue

(H&E: bar = 20 μm)

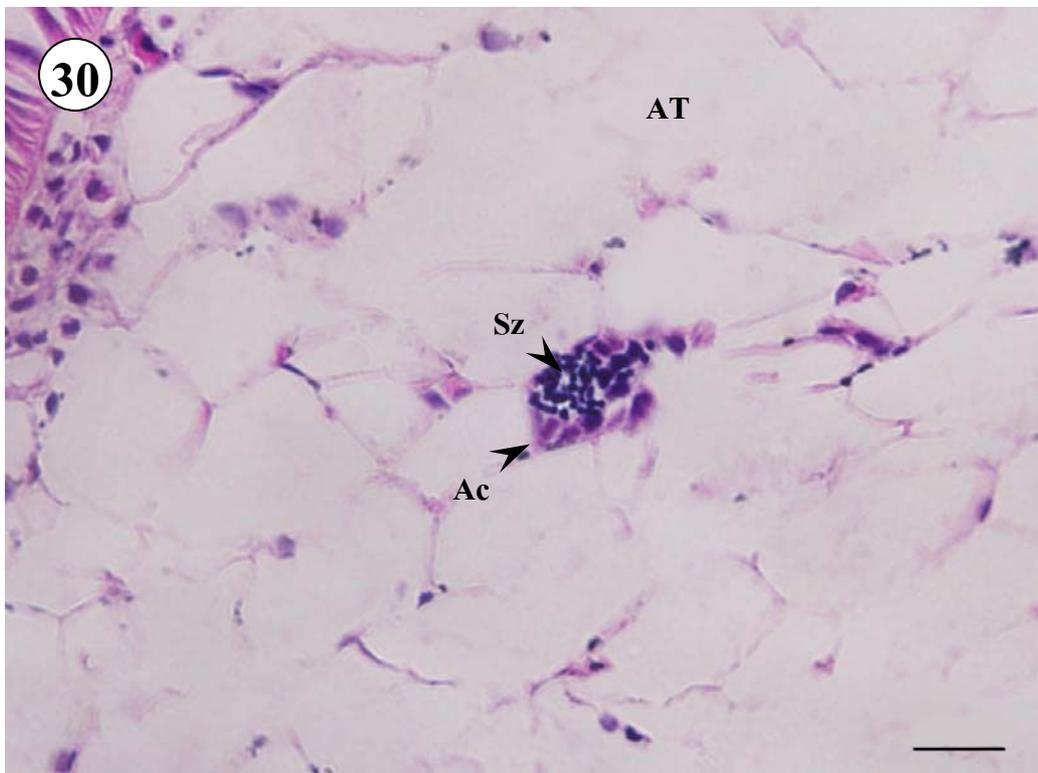
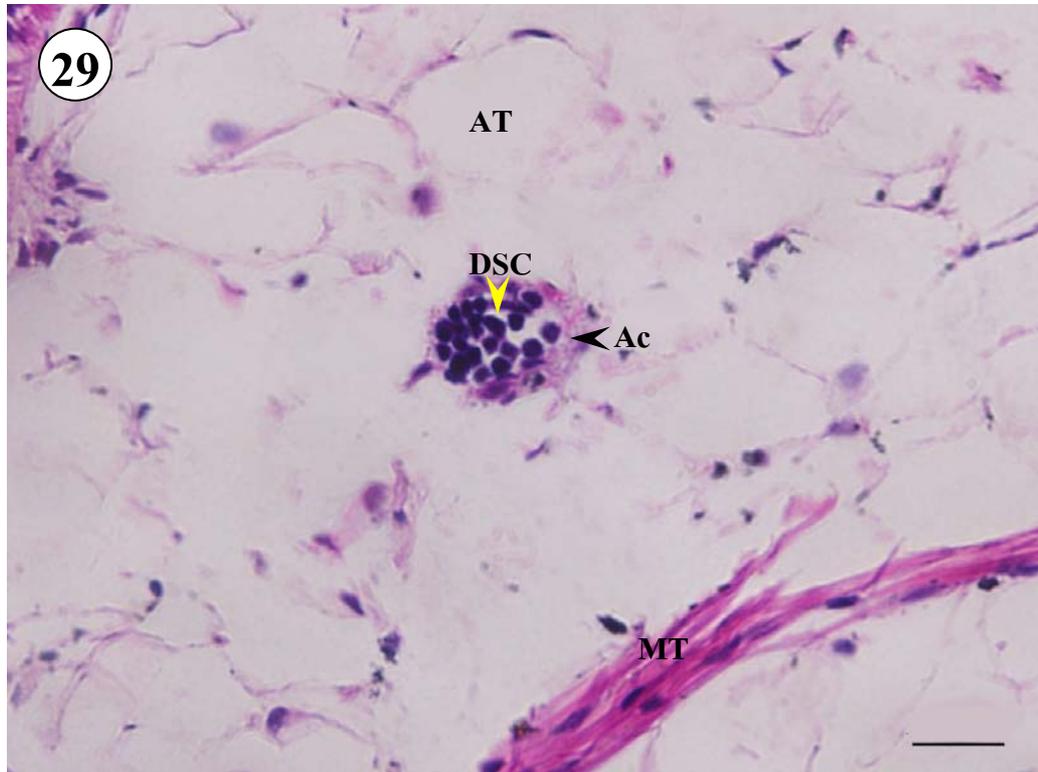
ภาพที่ 30 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 180 วัน

Ac = acinus

AT = adipose tissue

Sz = spermatozoa

(H&E: bar = 20 μm)



ภาพที่ 31 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ visceral mass หอยอายุ 180 วัน

AT = adipose tissue

MT = muscular tissue

(H&E: bar = 50 μm)

ภาพที่ 32 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 180 วัน

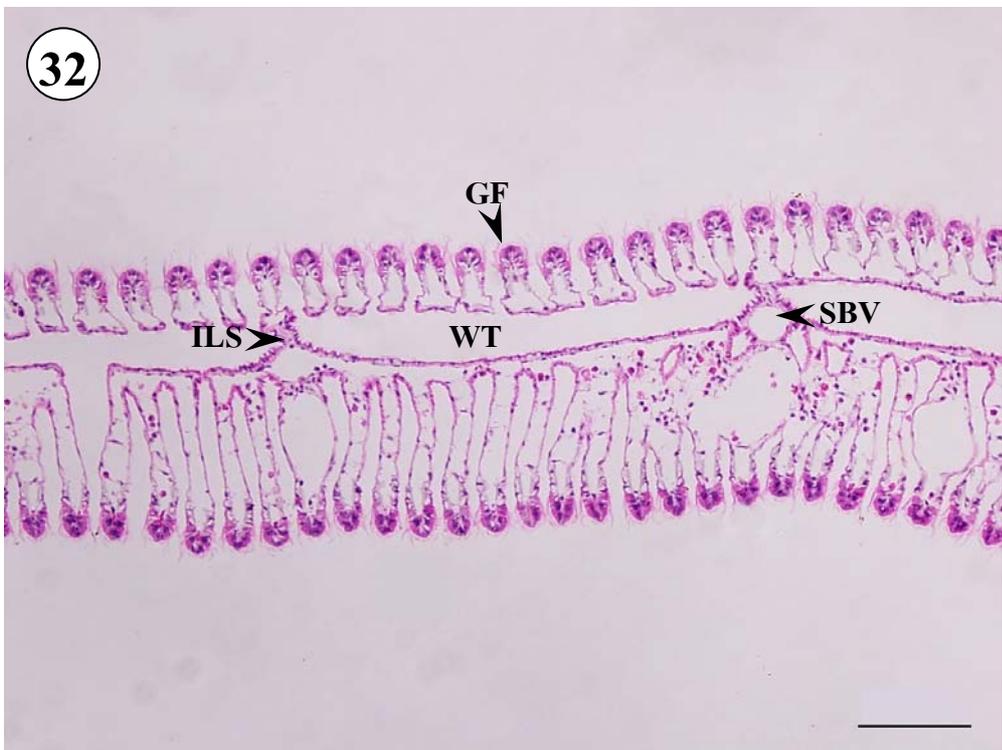
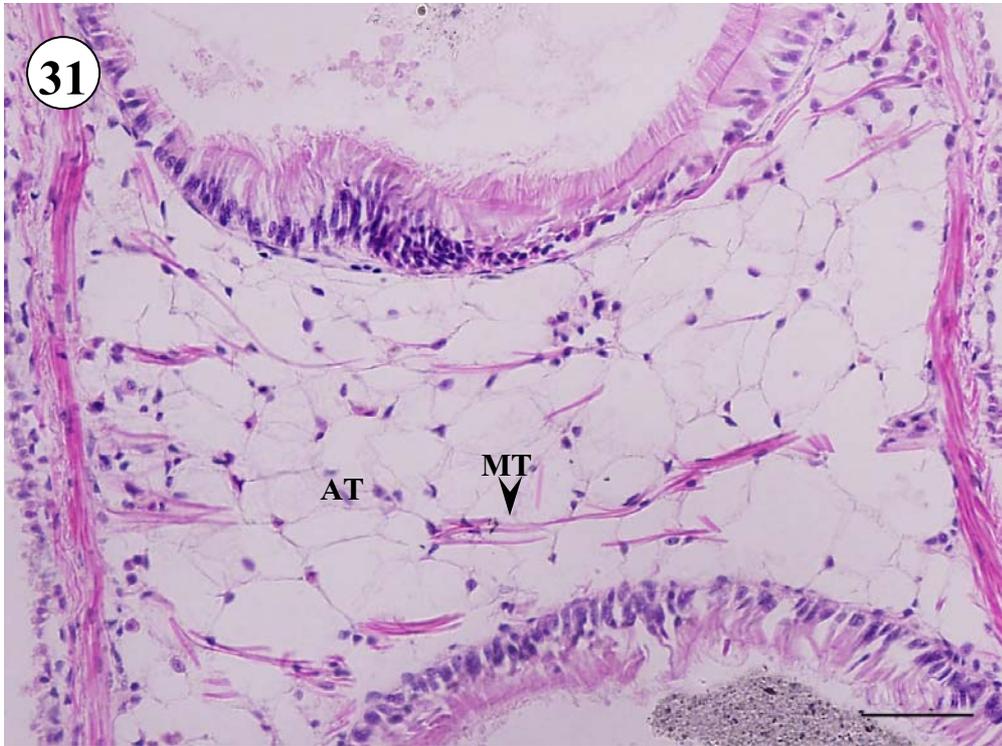
GF = gill filament

ILS = interlamellar septum

SBV = septum blood vessel

WT = water tube

(H&E: bar = 100 μm)



ภาพที่ 33 ภาพขยายของภาพที่ 32

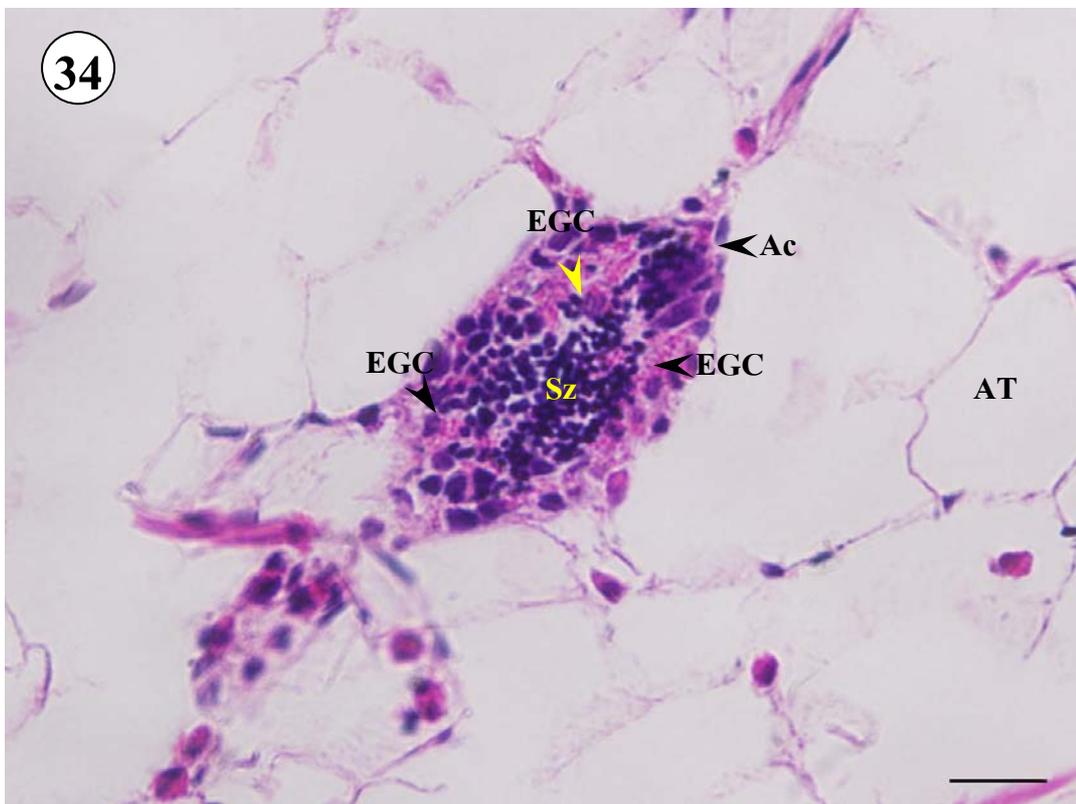
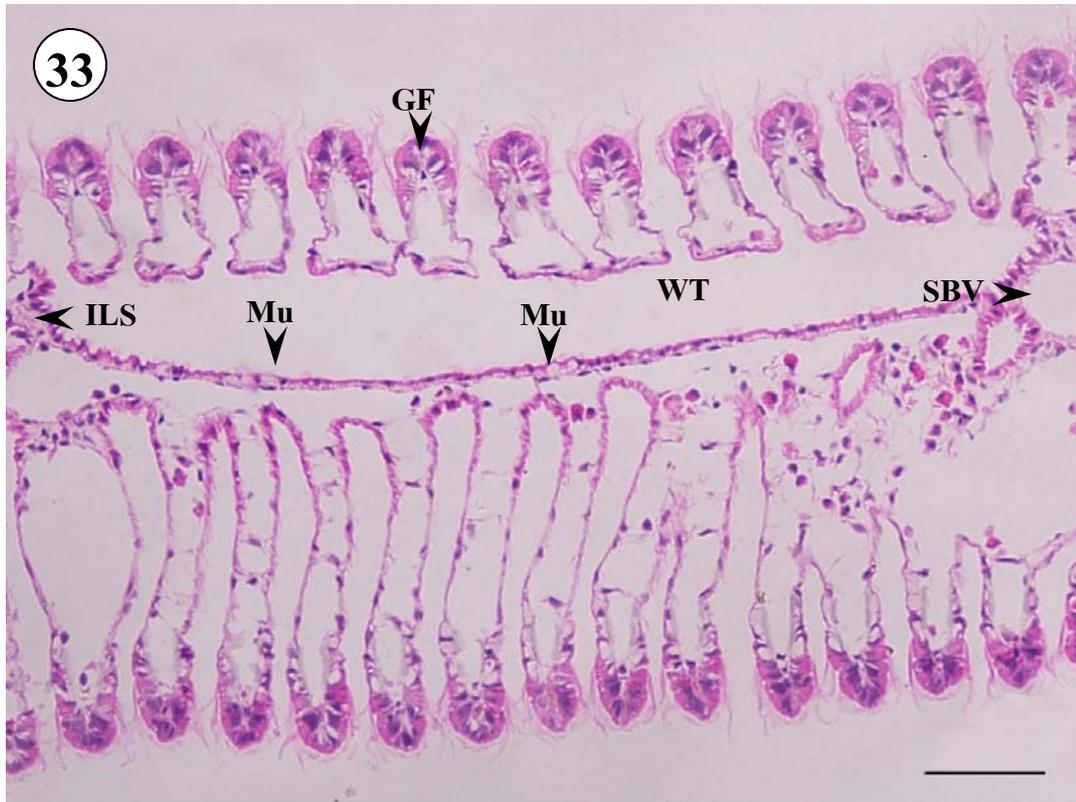
- GF = gill filament
- ILS = interlamellar septum
- Mu = mucocyte
- SBV = septum blood vessel
- WT = water tube

(H&E: bar = 50 μ m)

ภาพที่ 34 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพชผู้อายุ 210 วัน

- Ac = acinus
- AT = adipose tissue
- EGC = eosinophilic granular cell

(H&E: bar = 20 μ m)



ภาพที่ 35 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 210 วัน

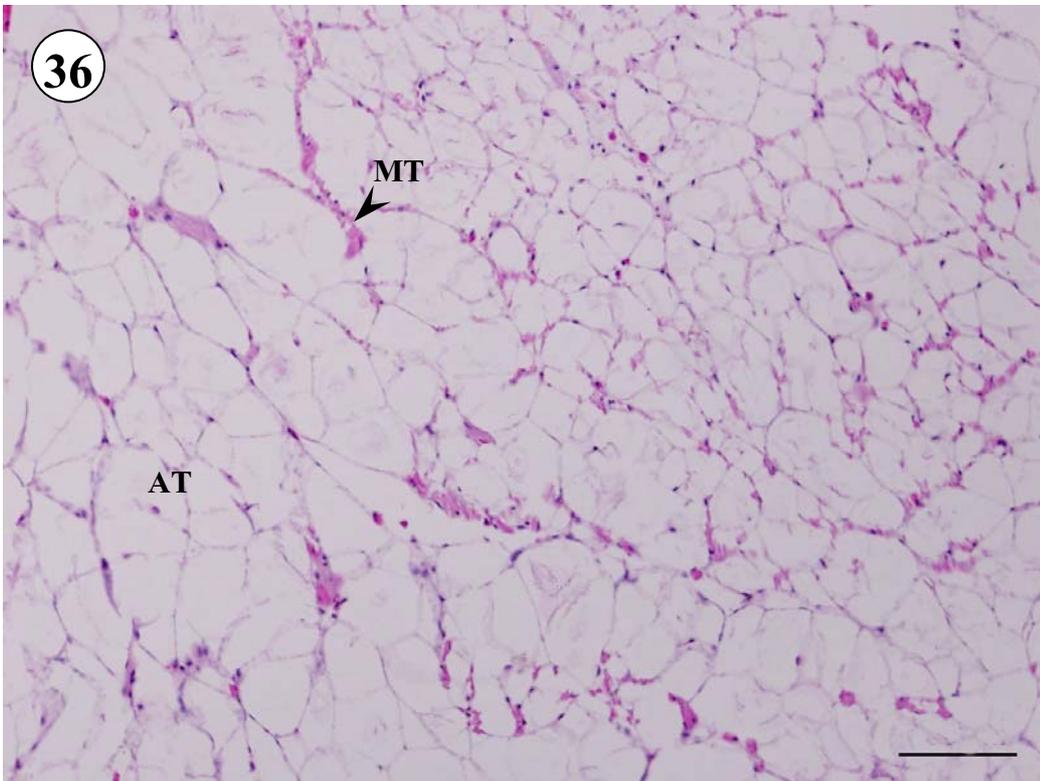
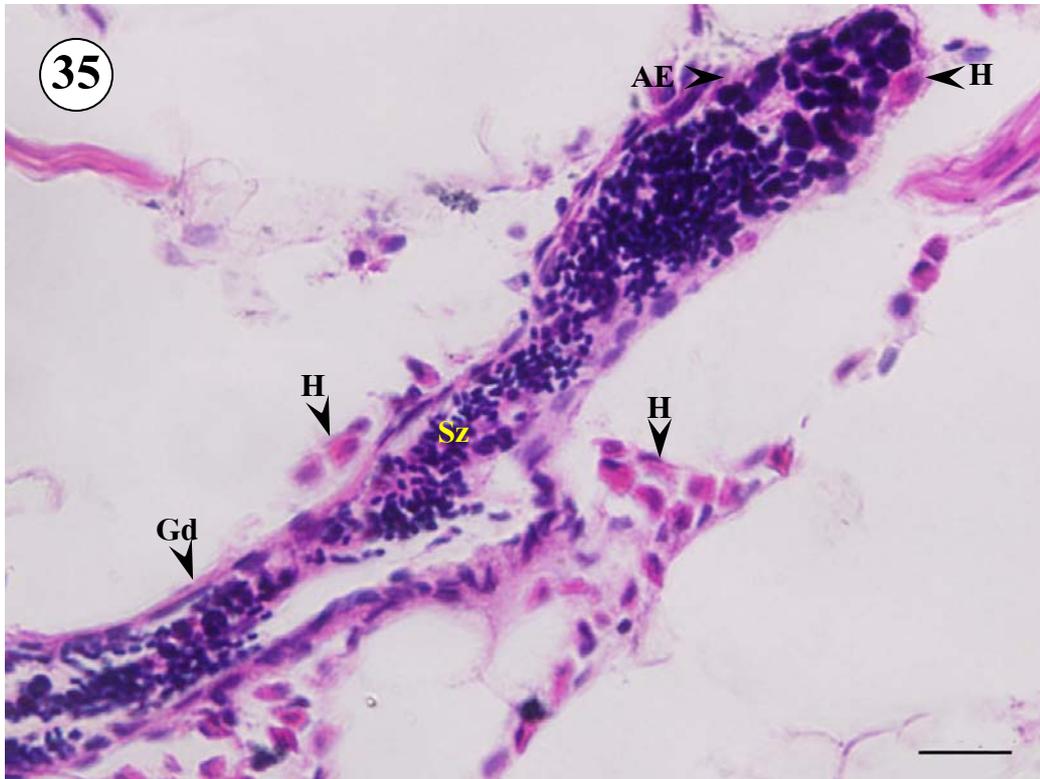
- Ac = acinus
- AE = acinar end
- Gd = gonoduct
- H = hemocyte
- Sz = spermatozoa

(H&E: bar = 20 μ m)

ภาพที่ 36 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยอายุ 210 วัน

- AT = adipose tissue
- MT = muscular tissue

(H&E: bar = 100 μ m)



ภาพที่ 37 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 210 วัน

ILS = interlamellar septum

Mu = mucocyte

SBV = septum blood vessel

WT = water tube

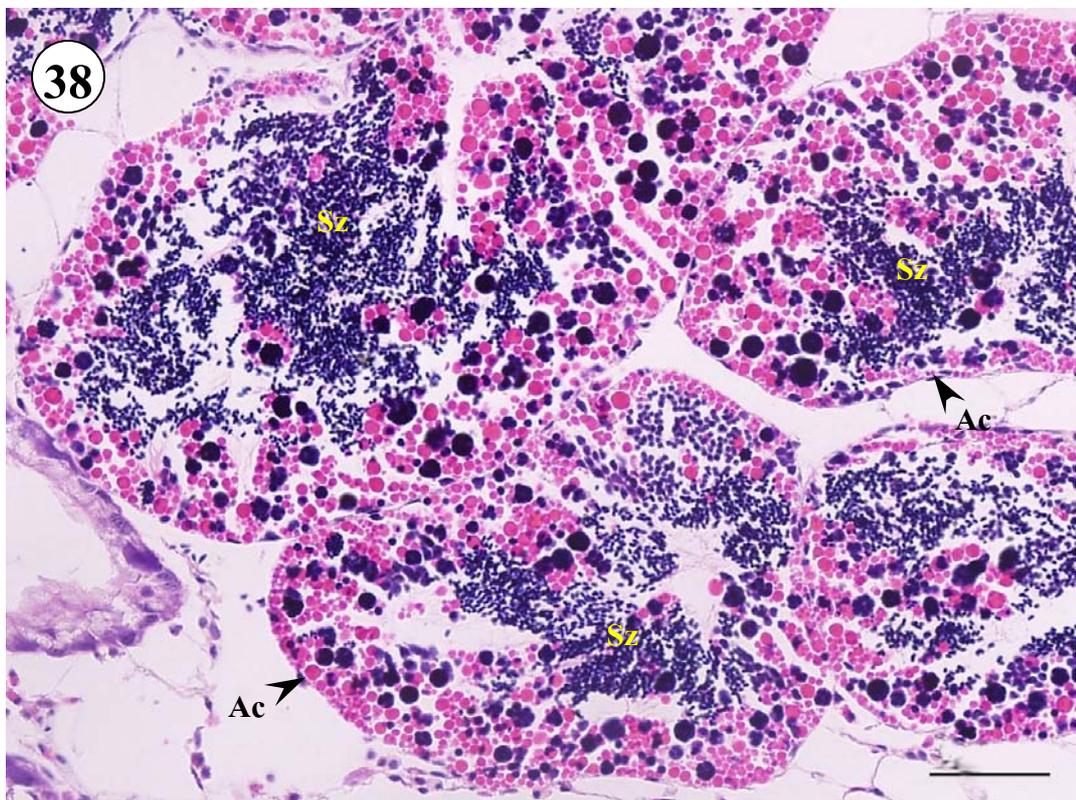
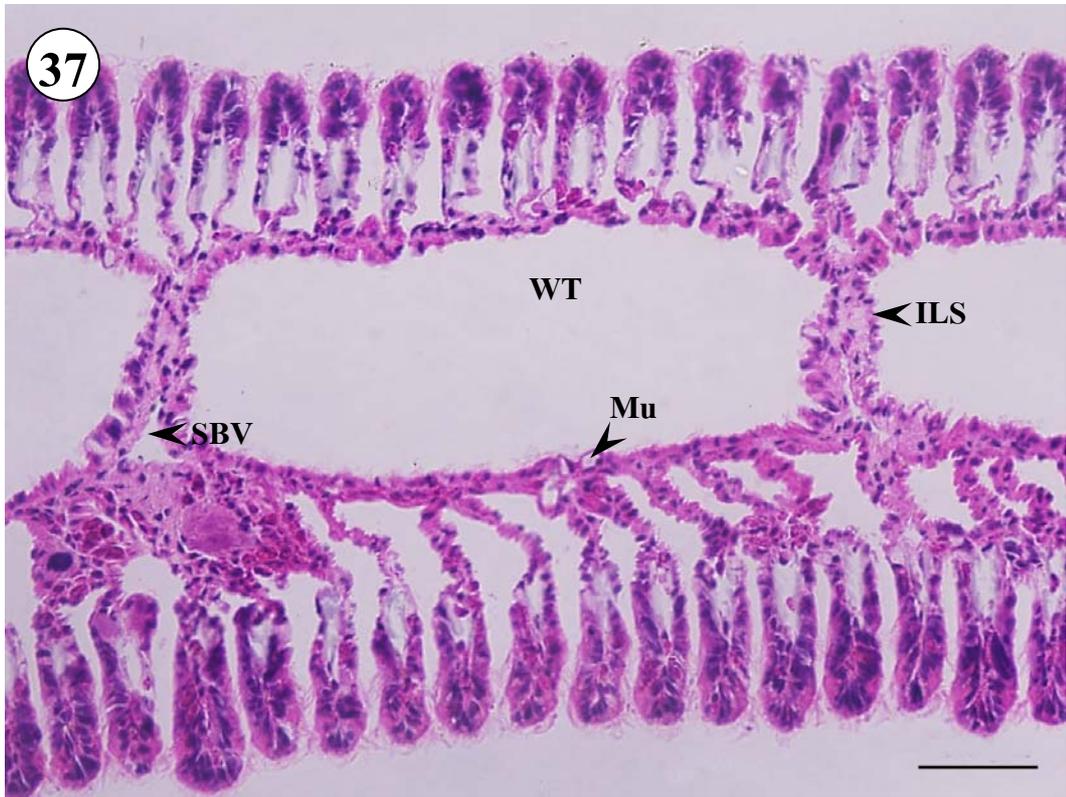
(H&E: bar = 50 μ m)

ภาพที่ 38 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 240 วัน

Ac = acinus

Sz = spermatozoa

(H&E: bar = 50 μ m)



ภาพที่ 39 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 240 วัน

Ac = acinus

Gd = gonoduct

(H&E: bar = 20 μ m)

ภาพที่ 40 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศเมียอายุ 240 วัน

Ac = acinus

AT = adipose tissue

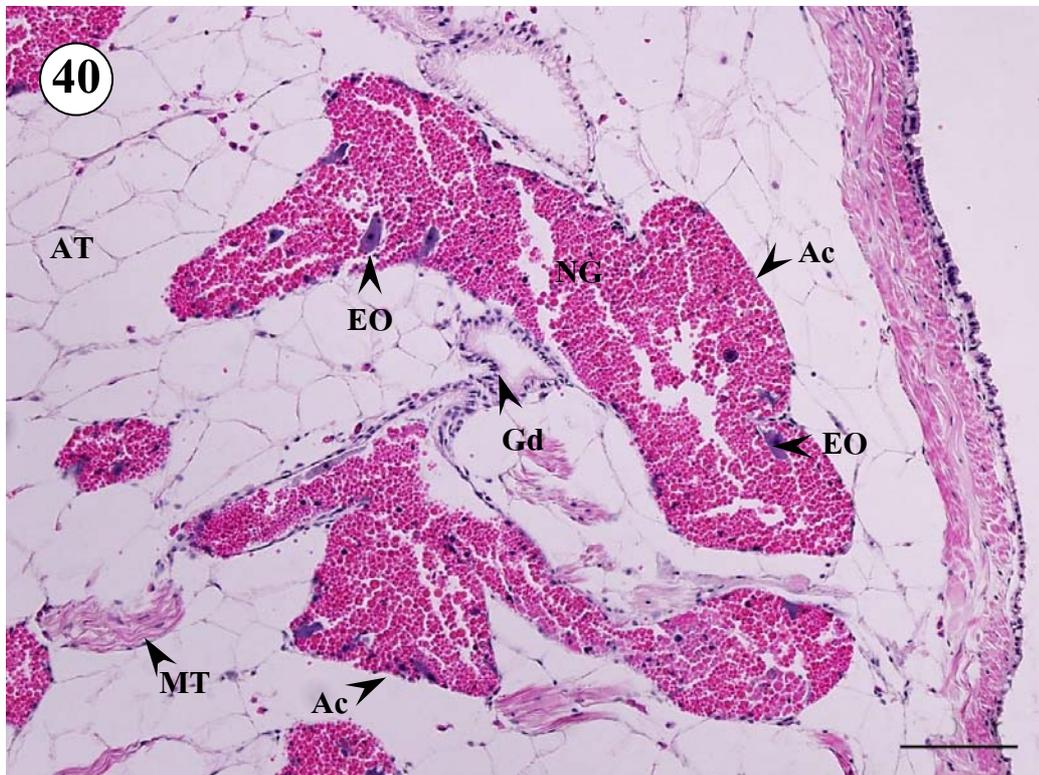
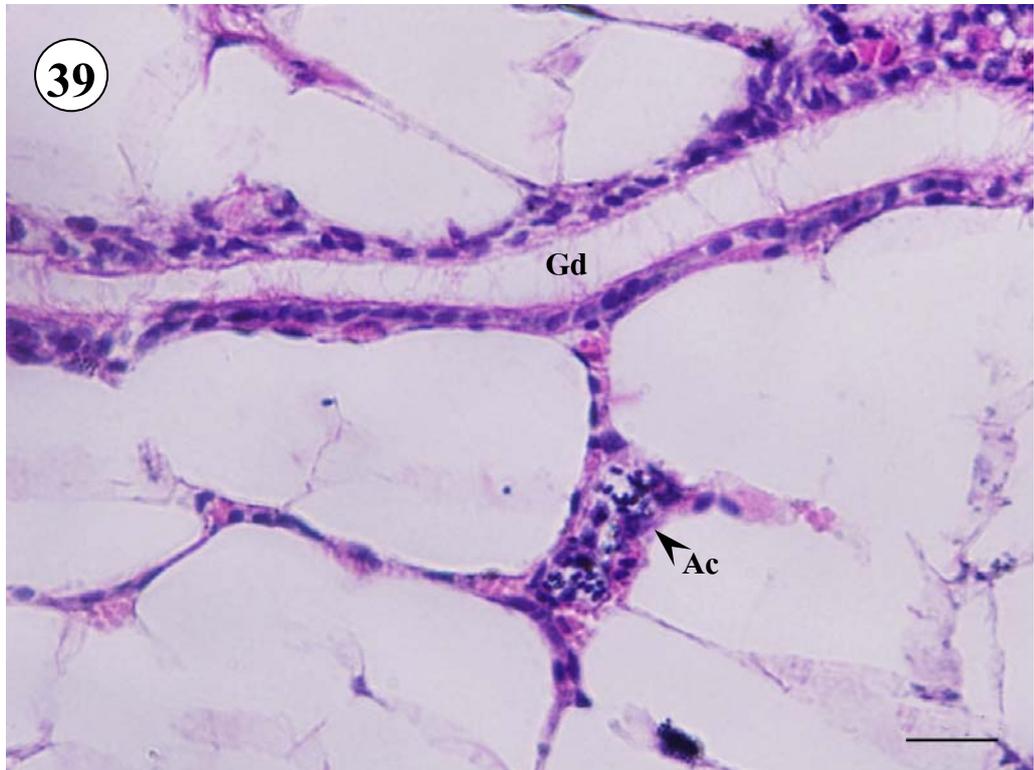
EO = early developing oocyte

Gd = gonoduct

MT = muscular tissue

NG = nutritive granule

(H&E: bar = 100 μ m)



ภาพที่ 41 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 240 วัน

ILS = interlamellar septum

Mu = mucocyte

SBV = septum blood vessel

WT = water tube

(H&E: bar = 50 μm)

ภาพที่ 42 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศเมียอายุ 240 วัน

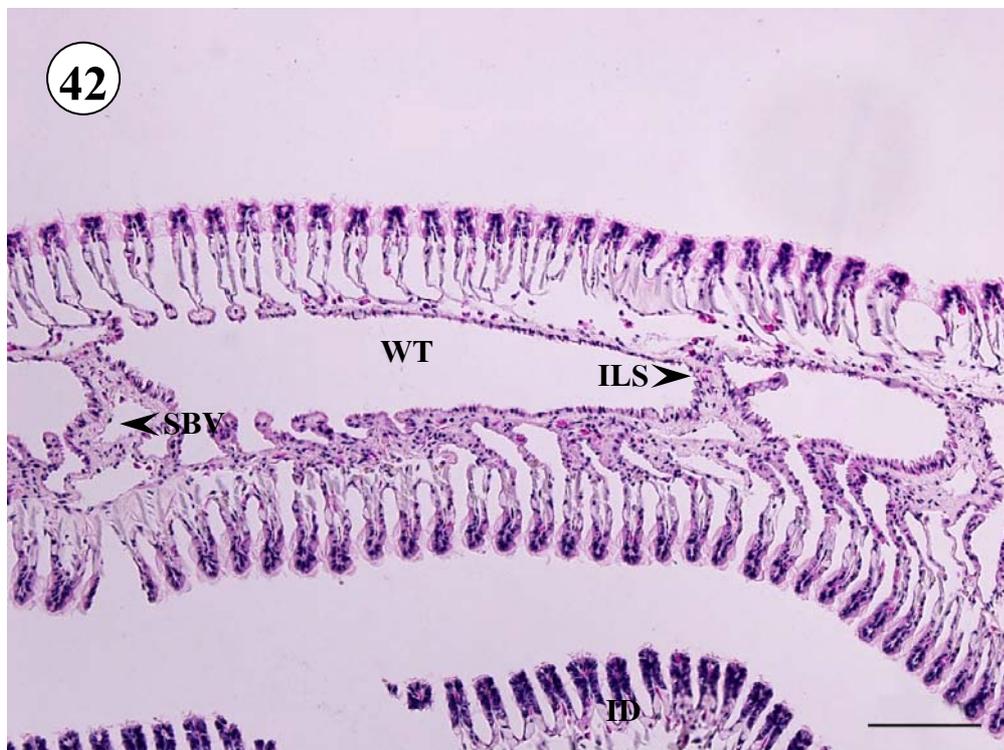
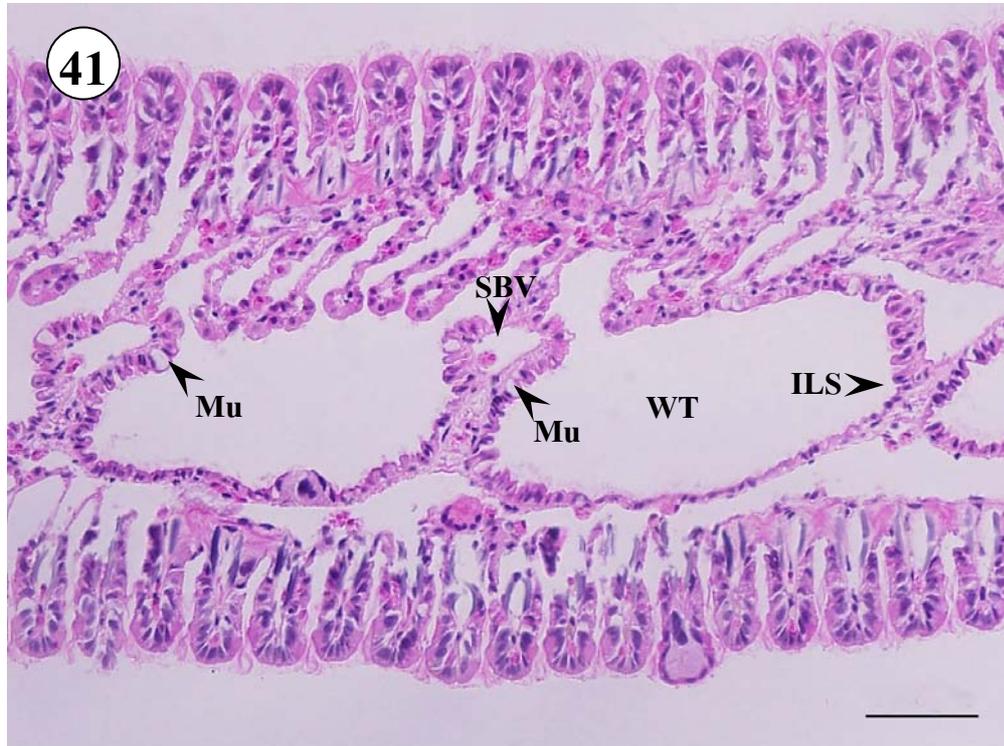
ID = inner demibranch

ILS = interlamellar septum

SBV = septum blood vessel

WT = water tube

(H&E: bar = 100 μm)



ภาพที่ 43 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพชผู้อายุ 240 วัน

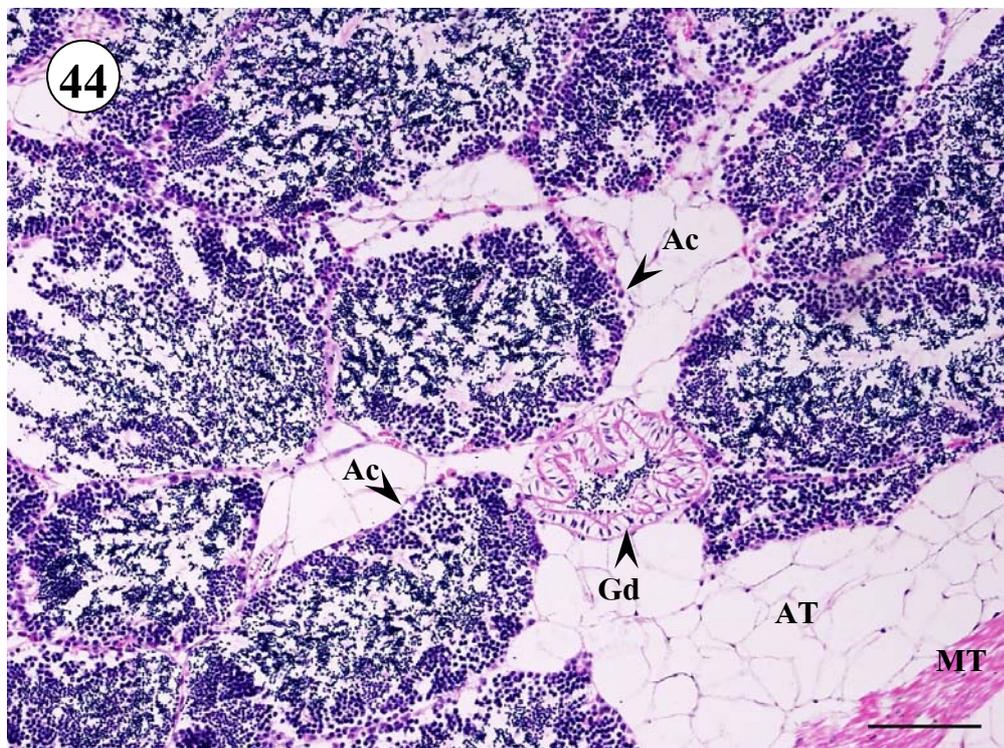
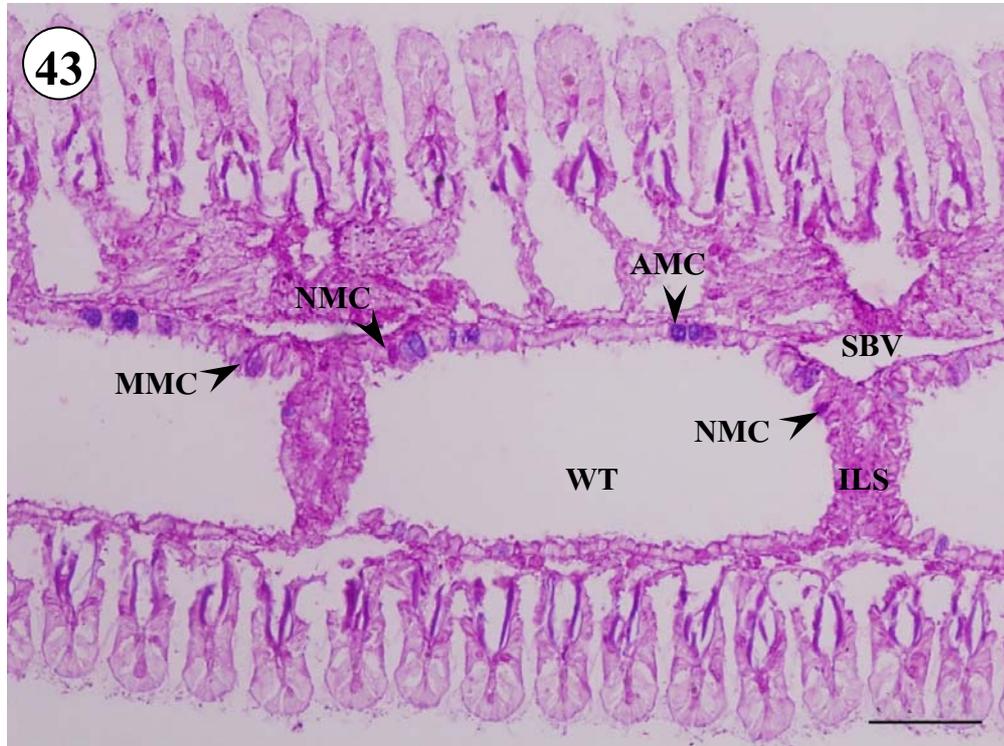
- AMC = acid mucopolysaccharide-producing mucocyte
- ILS = interlamellar septum
- MMC = mixed mucopolysaccharide-producing mucocyte
- NMC = neutral mucopolysaccharide-producing mucocyte
- SBV = septum blood vessel
- WT = water tube

(PAS-alcian blue: bar = 50 μm)

ภาพที่ 44 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพชผู้อายุ 270 วัน

- Ac = acinus
- AT = adipose tissue
- Gd = gonoduct
- MT = muscular tissue

(H&E: bar = 100 μm)



ภาพที่ 45 ภาพขยายของภาพที่ 44

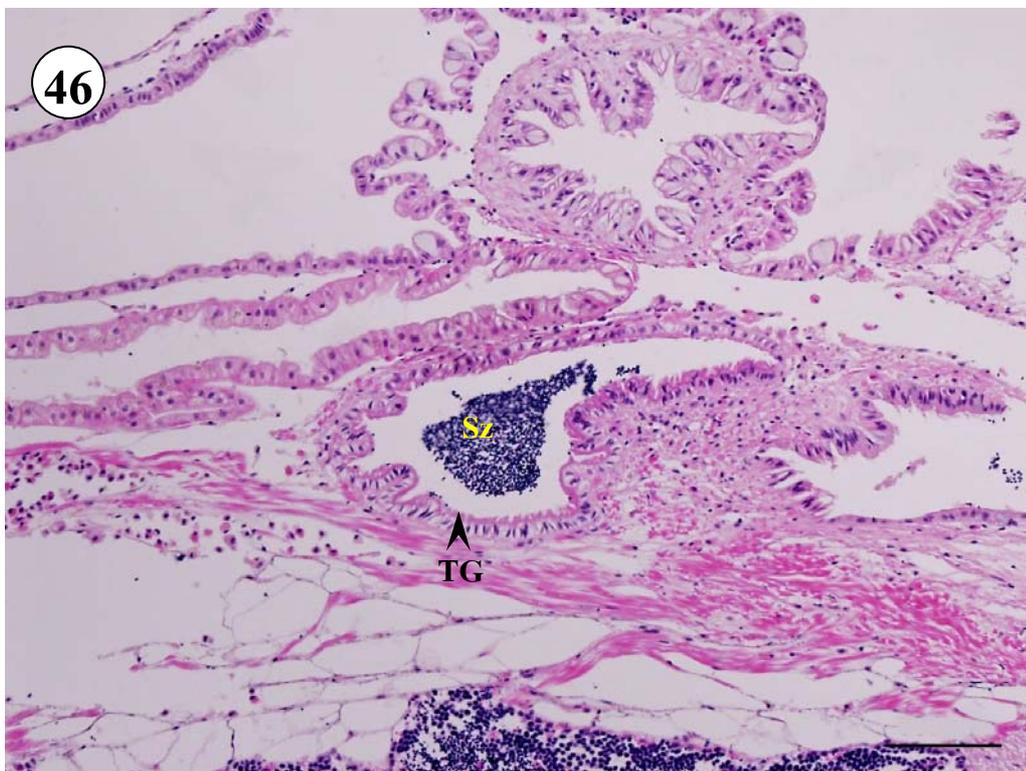
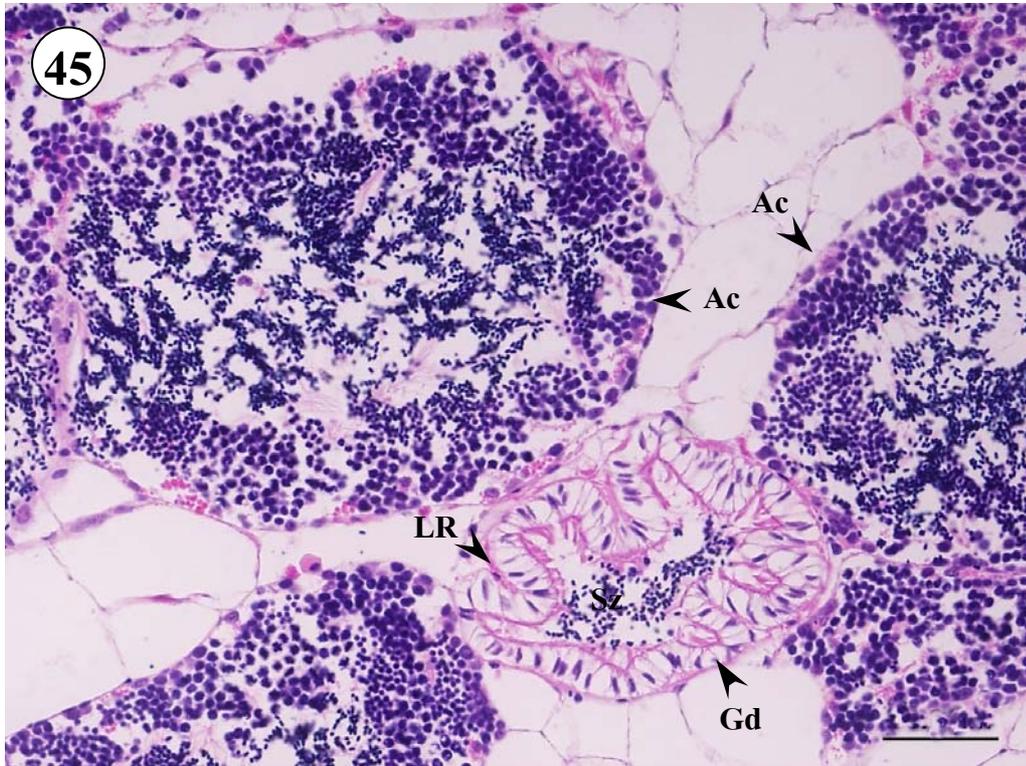
- Ac = acinus
- Gd = gonoduct
- LR = longitudinal ridge
- Sz = spermatozoa

(H&E: bar = 50 μ m)

ภาพที่ 46 ภาพตัดตามขวางทางด้านหลัง (dorsal) ของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 270 วัน

- TG = terminal gonoduct
- Sz = spermatozoa

(H&E: bar = 100 μ m)



ภาพที่ 47 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศเมียอายุ 270 วัน

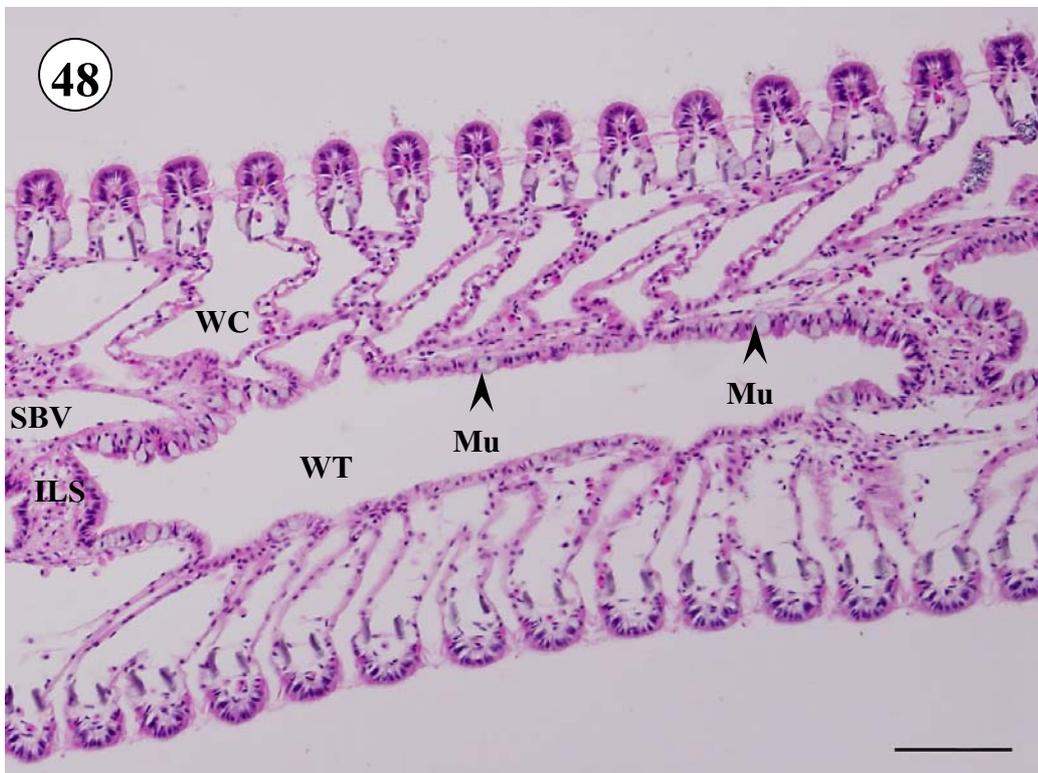
- Ac = acinus
- AT = adipose tissue
- Gd = gonoduct
- MT = muscular tissue
- O = oocyte

(H&E: bar = 100 μ m)

ภาพที่ 48 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 270 วัน

- ILS = interlamellar septum
- Mu = mucocyte
- SBV = septum blood vessel
- WC = water canal
- WT = water tube

(H&E: bar = 100 μ m)



ภาพที่ 49 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ inner demibranch หอยเพศเมียอายุ 270 วัน

ILS = interlamellar septum

SBV = septum blood vessel

WC = water canal

WT = water tube

(PAS: bar = 100 μm)

ภาพที่ 50 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน

G = glochidia

ILS = interlamellar septum

LS = lateral side

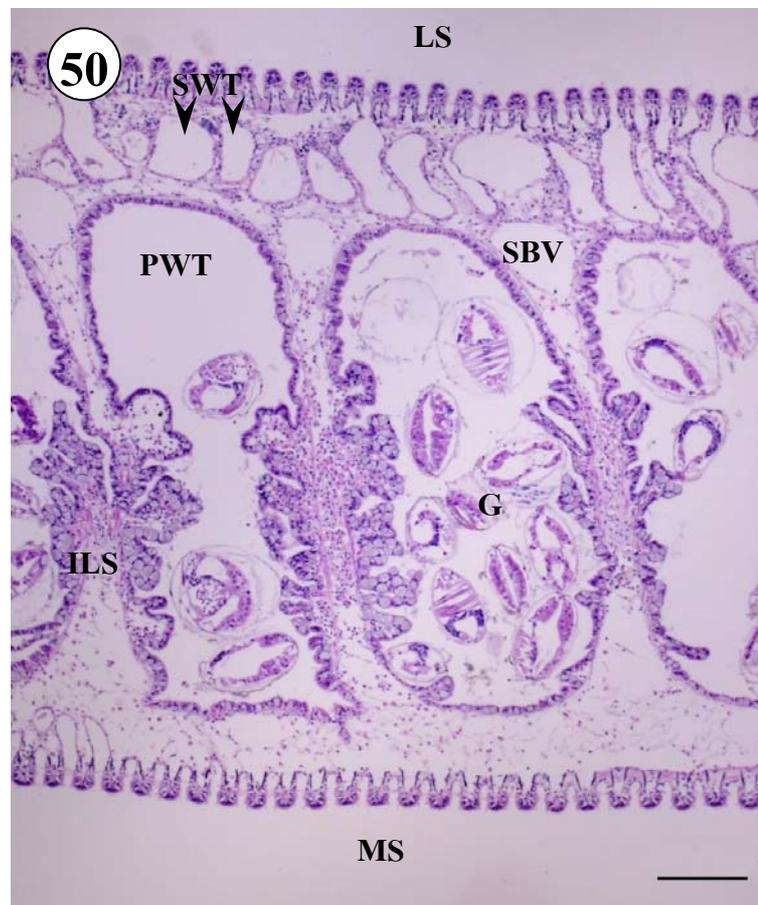
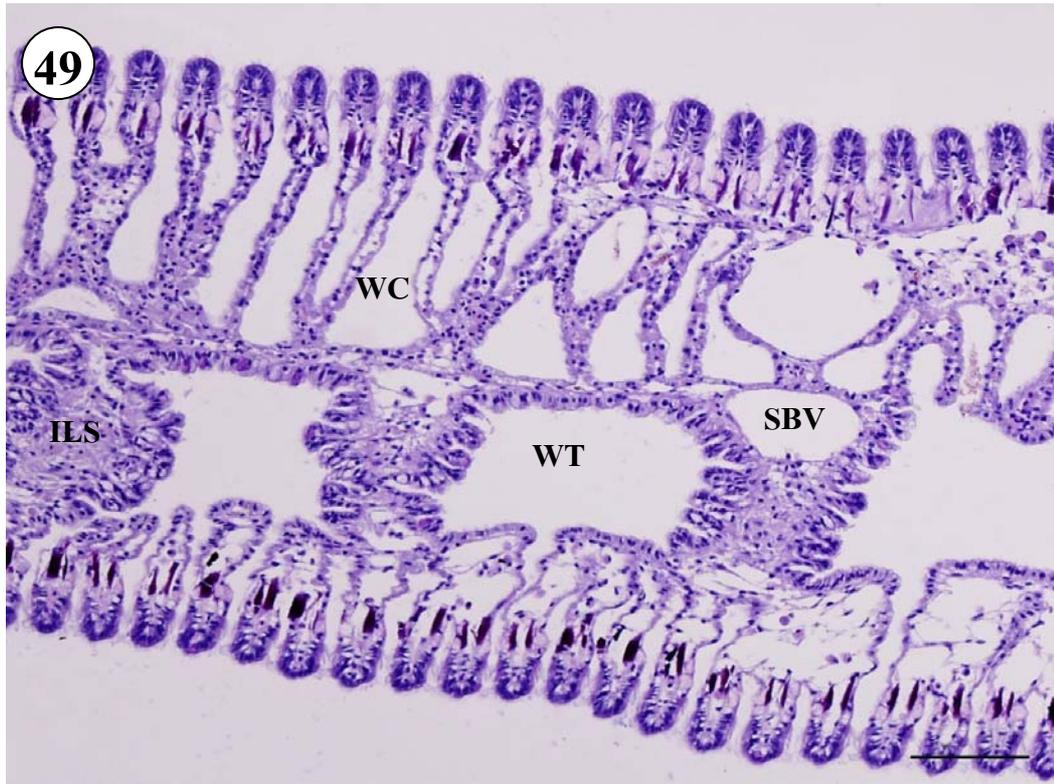
MS = medial side

PWT = primary water tube

SBV = septum blood vessel

WT = water tube

(H&E: bar = 200 μm)



ภาพที่ 51 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน

LS = lateral side

MS = medial side

WC = water canal

(PAS: bar = 200 μm)

ภาพที่ 52 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน

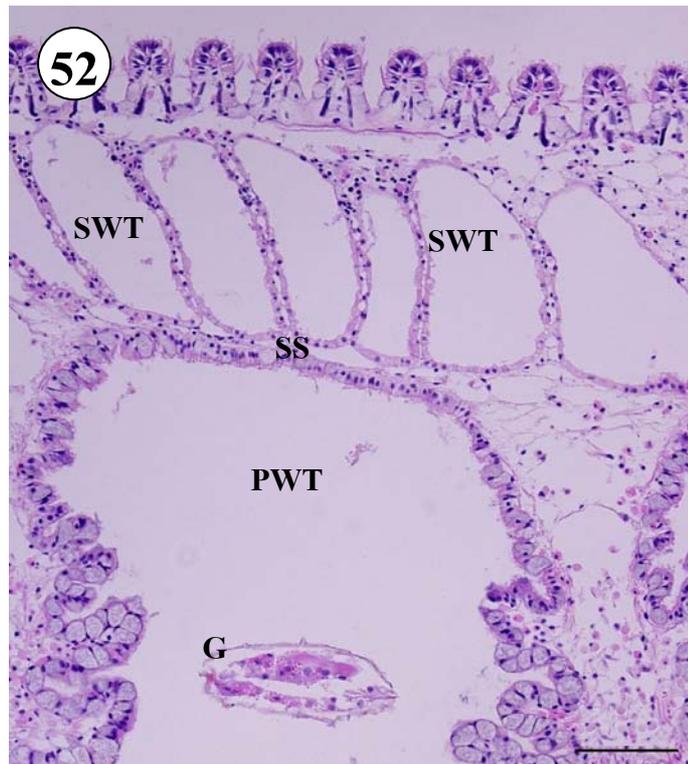
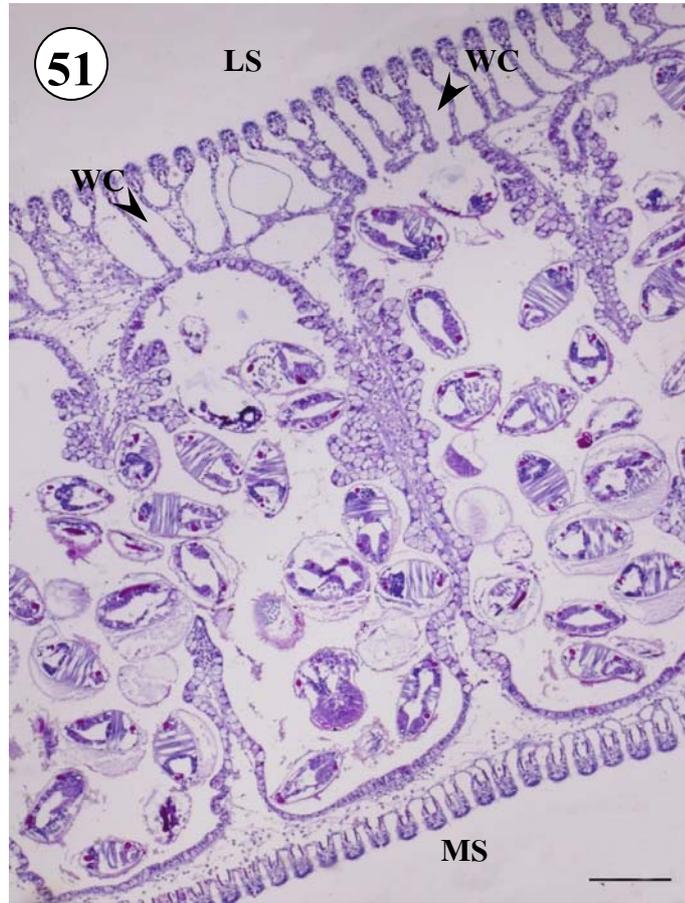
G = glochidia

PWT = primary water tube

SS = secondary septum

SWT = secondary water tube

(H&E: bar = 100 μm)



ภาพที่ 53 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน

CR = calcified chitinous rod

G = glochidia

Mu = mucocyte

Ci = cilia

(H&E: bar = 50 μ m)

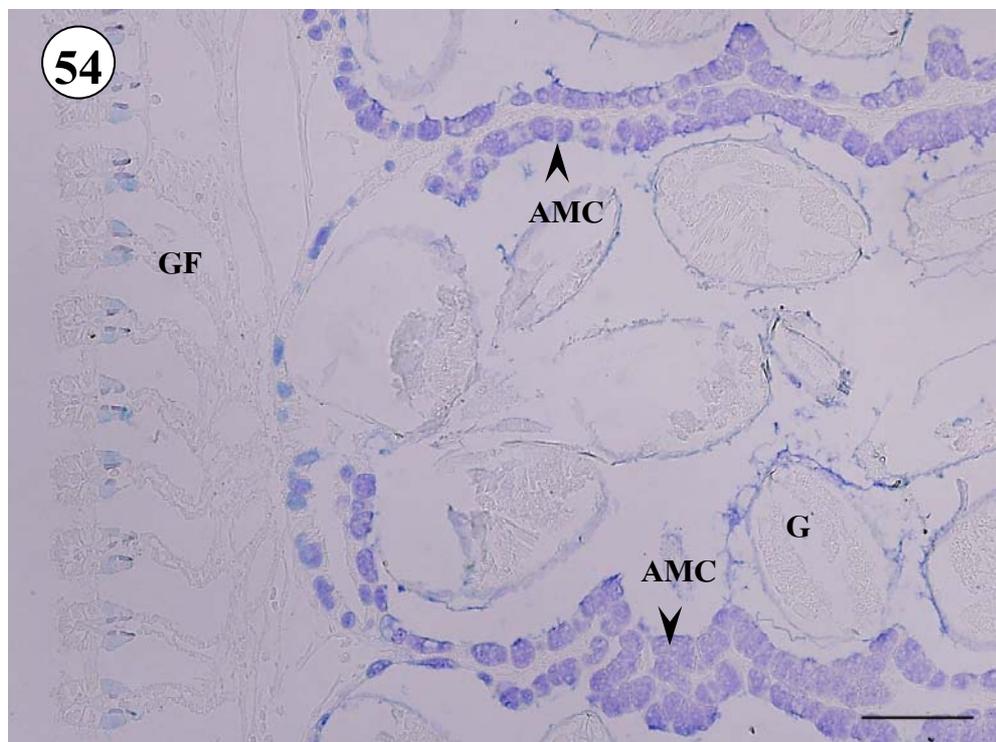
ภาพที่ 54 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน

AMC = acid mucopolysaccharide-producing mucocyte

G = glochidia

GF = gill filament

(Alcian blue: bar = 100 μ m)



ภาพที่ 55 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน

MPB = mucopolysaccharide band

NMC = neutral mucopolysaccharide-producing mucocyte

G = glochidia

WC = water canal

(PAS: bar = 100 μ m)

ภาพที่ 56 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน

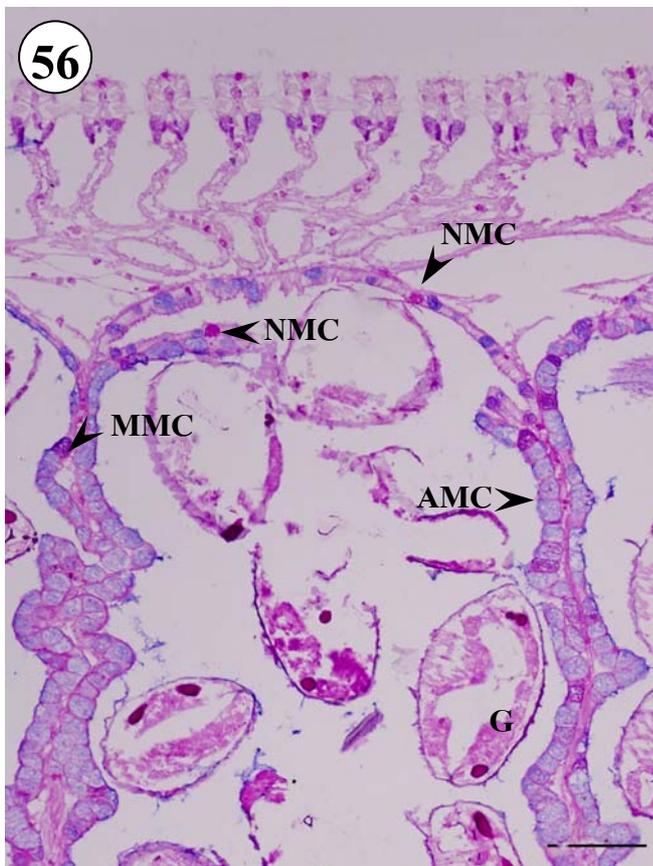
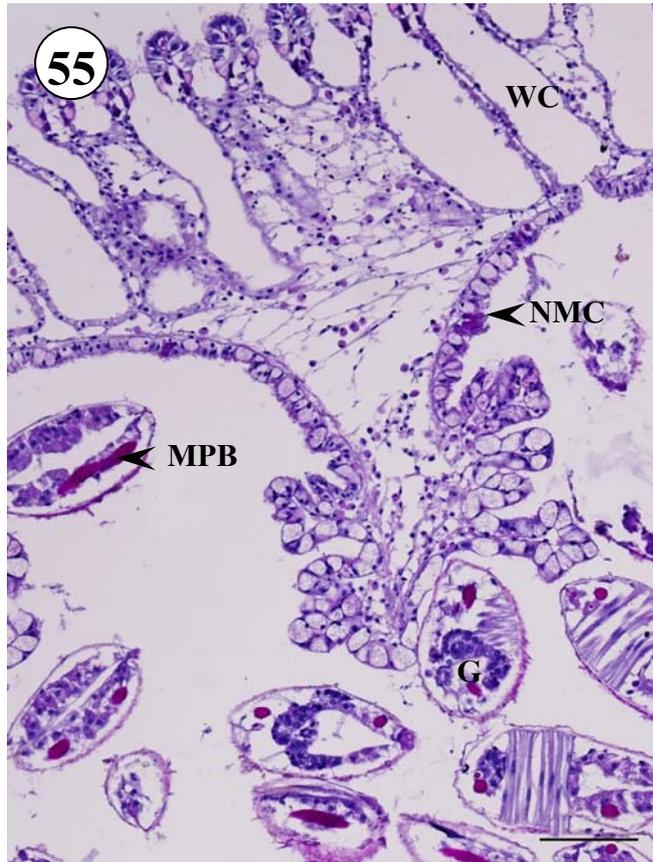
AMC = acid mucopolysaccharide-producing mucocyte

G = glochidia

MMC = mixed mucopolysaccharide-producing mucocyte

NMC = neutral mucopolysaccharide-producing mucocyte

(PAS-alcian blue: bar = 100 μ m)



ภาพที่ 57 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ marsupia หอยเพศเมียอายุ 270 วัน

AMC = acid mucopolysaccharide-producing mucocyte

GF = gill filament

NMC = neutral mucopolysaccharide-producing mucocyte

MMC = mixed mucopolysaccharide-producing mucocyte

(PAS-alcian blue: bar = 50 μ m)

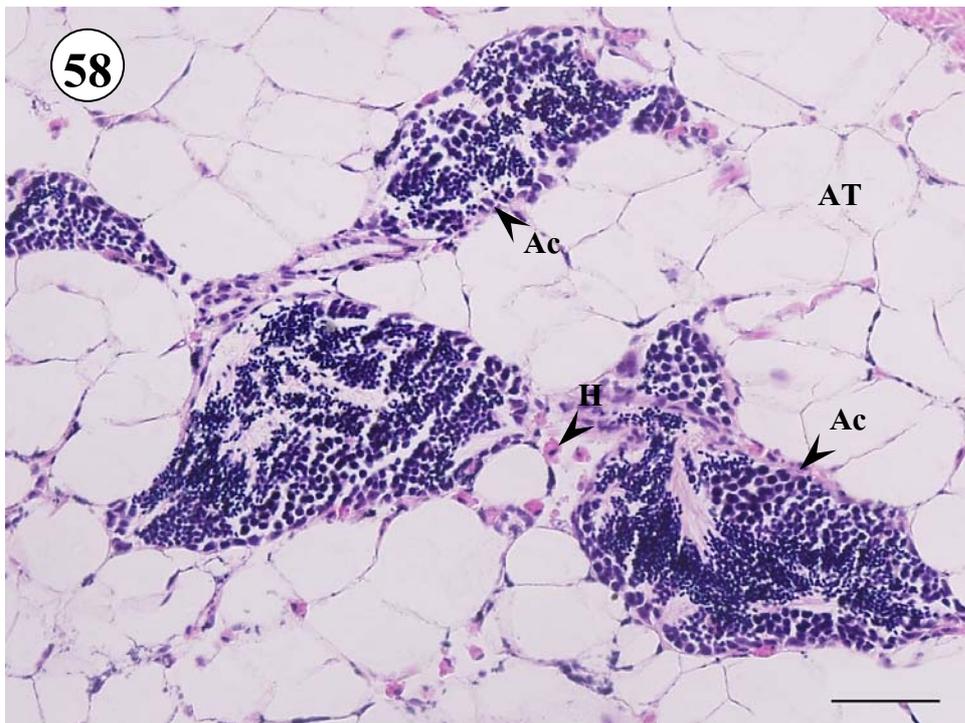
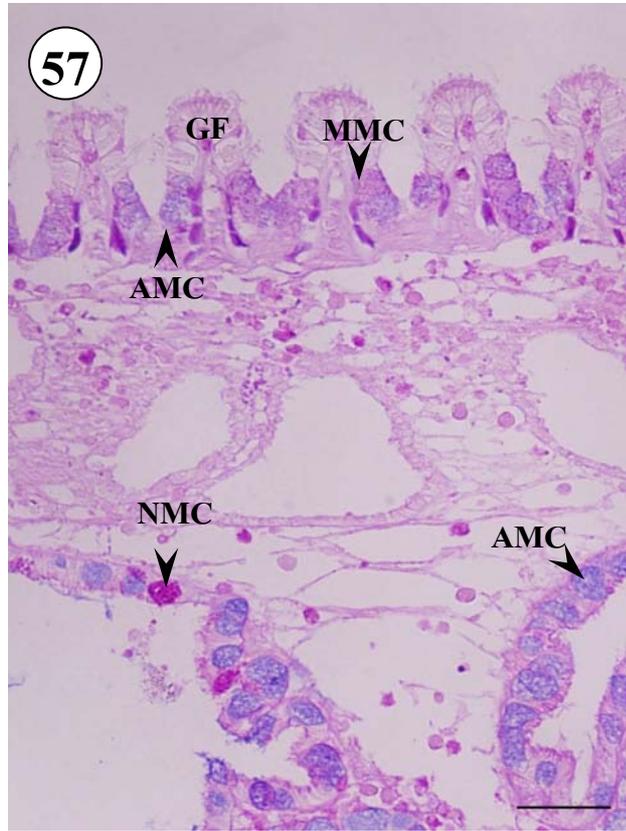
ภาพที่ 58 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 300 วัน

Ac = acinus

AT = adipose tissue

H = hemocyte

(H&E: bar = 50 μ m)



ภาพที่ 59 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 300 วัน

ILS = interlamellar septum

SBV = septum blood vessel

WT = water tube

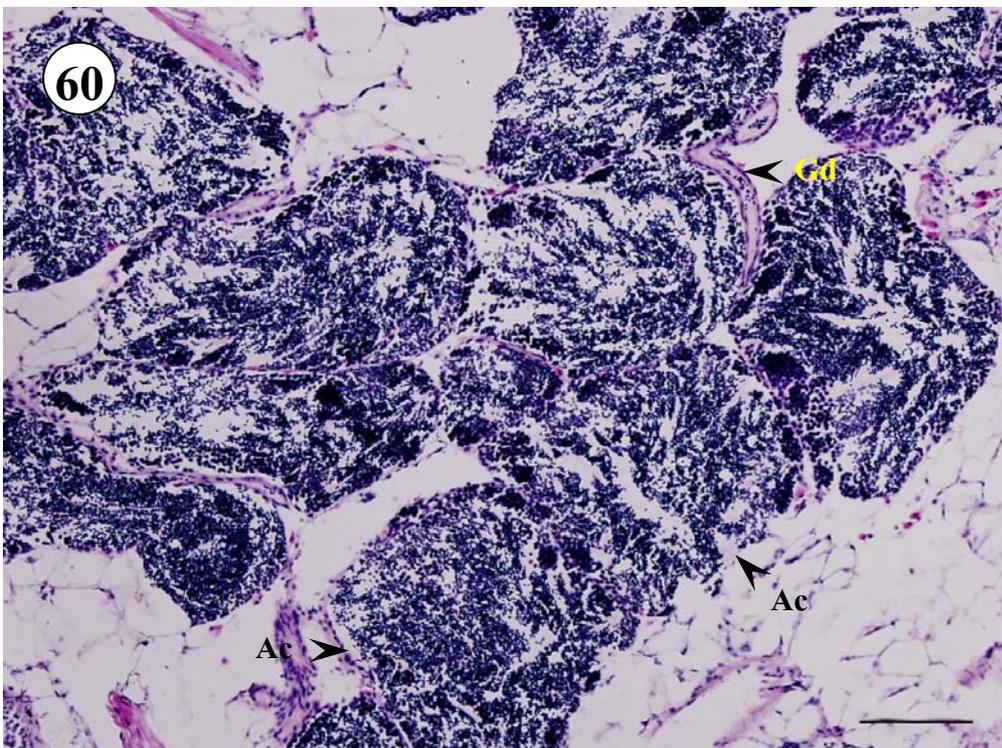
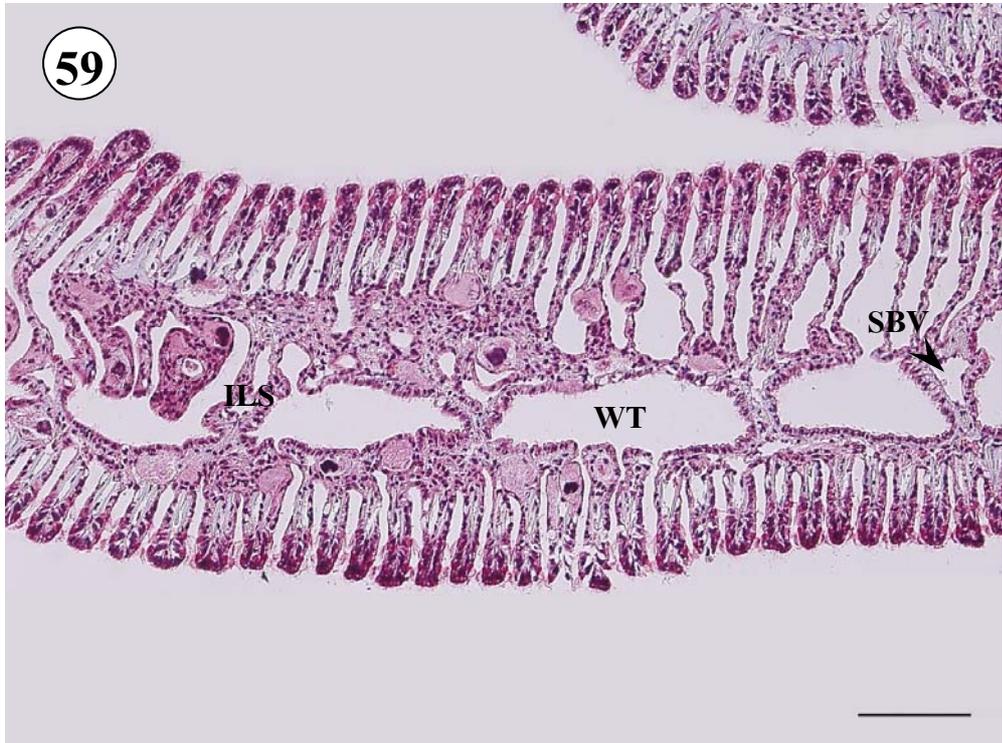
(Masson's trichome: bar = 100 μ m)

ภาพที่ 60 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 330 วัน

Ac = acinus

Gd = gonoduct

(H&E: bar = 100 μ m)



ภาพที่ 61 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศผู้อายุ 330 วัน

ILS = interlamellar septum

WT = water tube

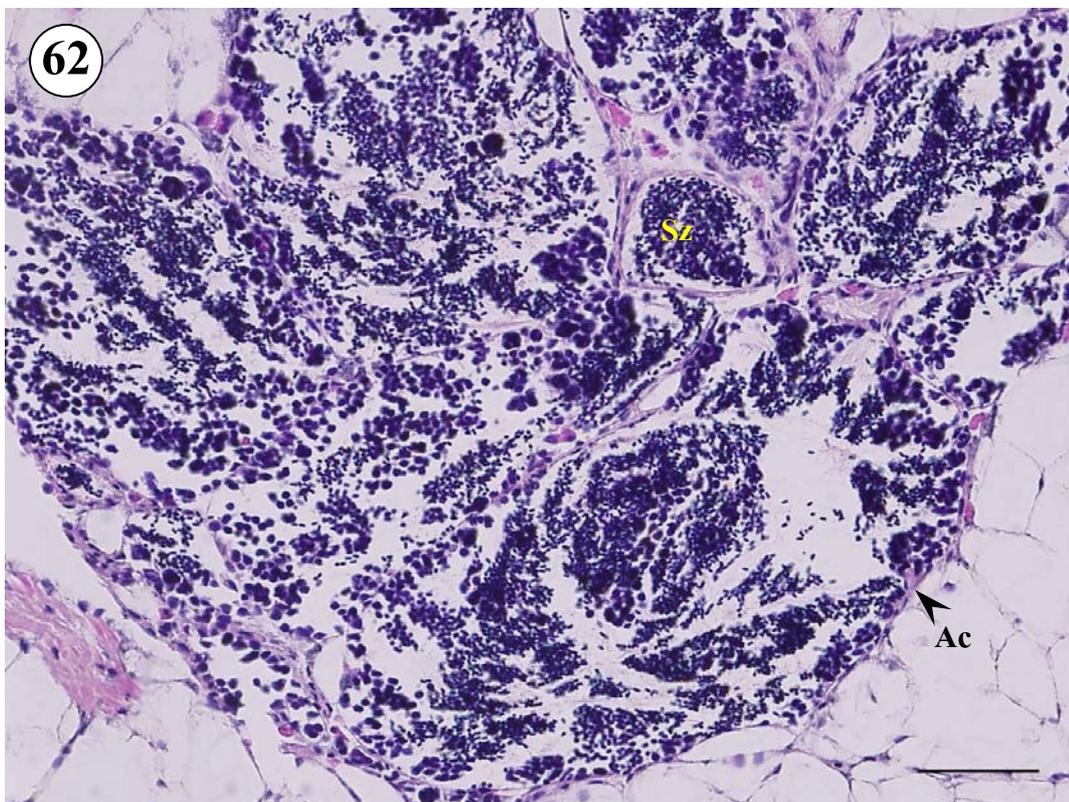
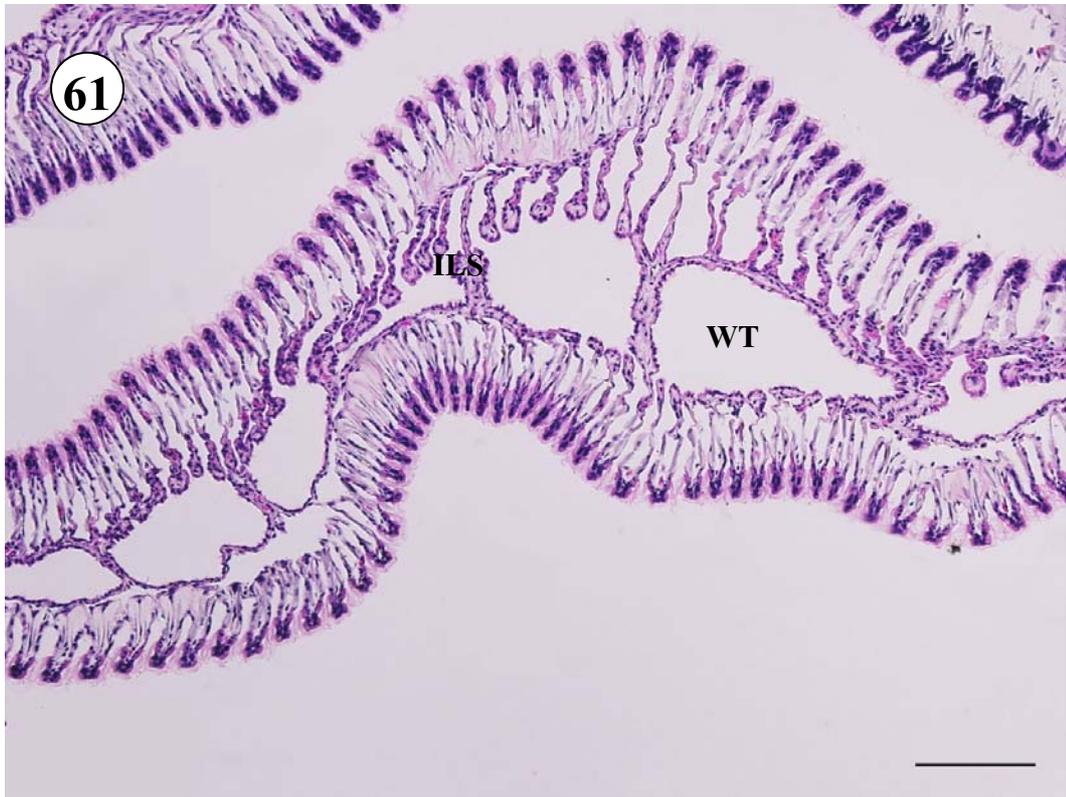
(H&E: bar = 100 μm)

ภาพที่ 62 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศผู้อายุ 360 วัน

Ac = acinus

Sz = spermatozoa

(H&E: bar = 50 μm)



ภาพที่ 63 ภาพตัดตามขวางของ visceral mass หอยเพศเมียอายุ 360 วัน

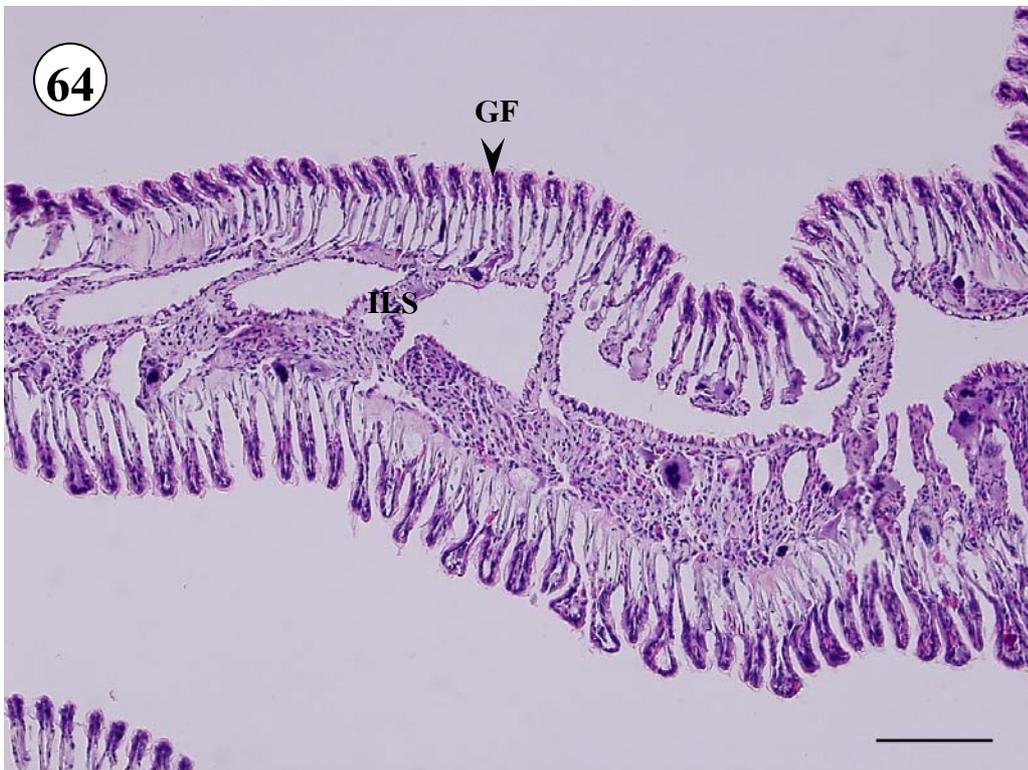
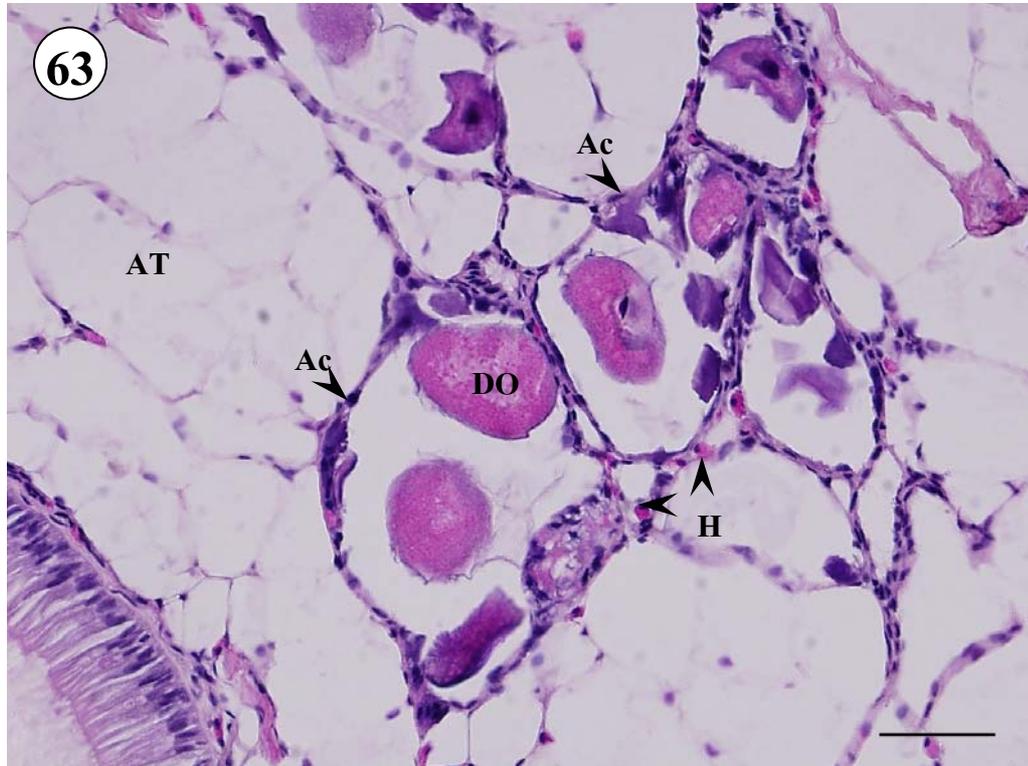
- Ac = acinus
- AT = adipose tissue
- DO = developing oocyte
- H = hemocyte

(H&E: bar = 50 μ m)

ภาพที่ 64 ภาพตัดในระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศเมียอายุ 360 วัน

- GF = gill filament
- ILS = interlamellar septum

(H&E: bar = 100 μ m)



ภาพที่ 65 ภาพตัดระนาบ frontal ของ outer demibranch หอยเพศเมียอายุ 360 วัน

ILS = interlamellar septum

WT = water tube

(H&E: bar = 100 μ m)

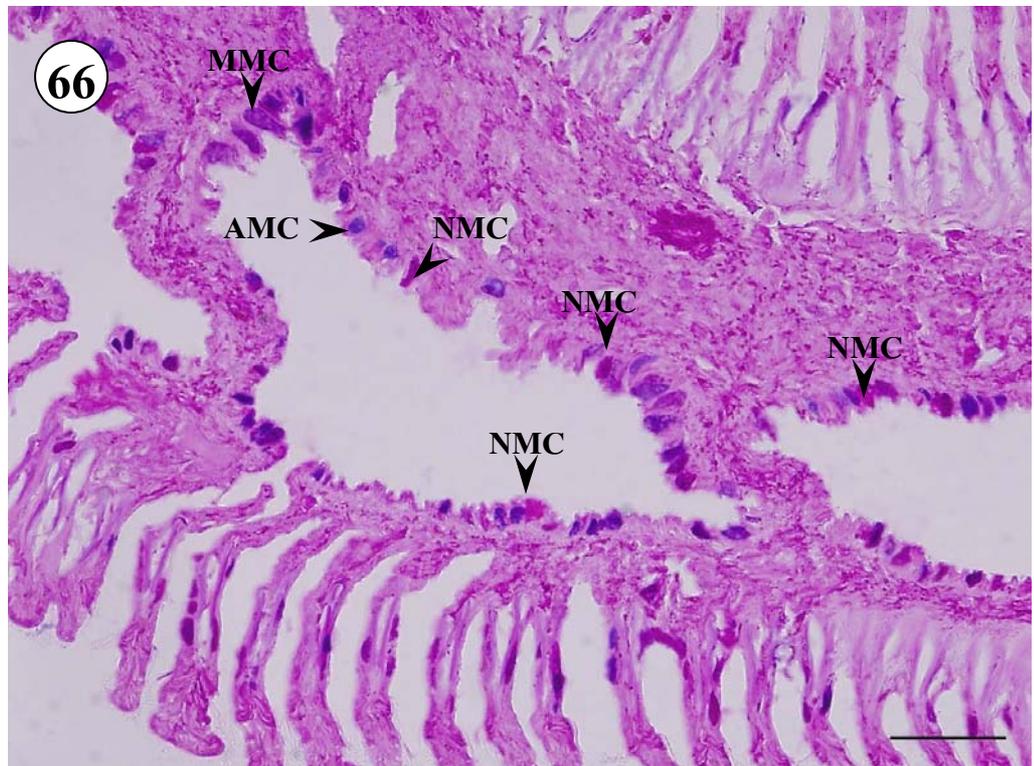
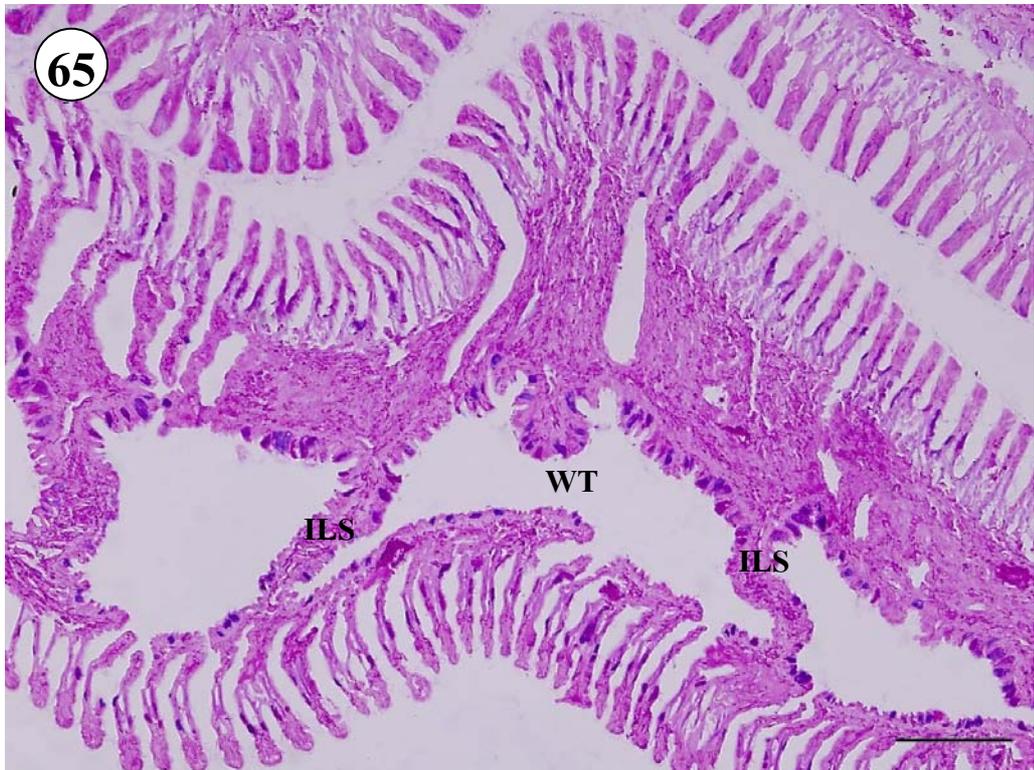
ภาพที่ 66 ภาพขยายของภาพที่ 65

AMC = acid mucopolysaccharide-producing mucocyte

MMC = mixed mucopolysaccharide-producing mucocyte

NMC = neutral mucopolysaccharide-producing mucocyte

(H&E: bar = 50 μ m)



วิจารณ์

1. การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana*

1.1 การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

หน่วยโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (acinus) เริ่มพัฒนาเมื่อหอยมีอายุ 180 วัน แต่มีจำนวนน้อยและมีขนาดเล็กมาก ภายใน acini ประกอบด้วย spermatogenic cell จำนวนน้อย นอกจากนี้โครงสร้างของท่อนำอสุจิยังไม่พัฒนา แสดงให้เห็นว่าหอยเพศผู้อายุดังกล่าวและอายุต่ำกว่านี้ยังไม่มีความสมบูรณ์ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ หรืออาจกล่าวได้ว่าหอยเพศผู้ในช่วงอายุดังกล่าวยังสืบพันธุ์ไม่ได้ อย่างไรก็ตามพบว่าเมื่อหอยมีอายุมากขึ้น อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์รวมทั้งท่อนำอสุจิจะพัฒนามากขึ้น และสมบูรณ์เป็นครั้งแรกในหอยอายุ 270 วัน แต่ที่น่าพิจารณาอย่างหนึ่งก็คือ ในหอยอายุ 210 วัน พบเซลล์เม็ดเลือดในกลุ่ม eosinophilic granular cell และเม็ดเลือดชนิดอื่นบริเวณของ acini และท่อนำอสุจิ และมีเซลล์บางส่วนอยู่ภายใน acini แทรก ระหว่าง spermatogenic cell บทบาทและหน้าที่ของเม็ดเลือดเกี่ยวข้องกับกระบวนการฟาโกไซโตซิสและการทำลายเซลล์สืบพันธุ์ที่ค้างอยู่ใน acini ในช่วงเรียกว่า reabsorbing ซึ่งเป็นช่วงหลังจากที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawning) (Saucedo *et al.*, 2002; Juhel *et al.* 2003; Delgado and Camacho, 2005) ดังนั้นอาจเป็นไปได้ว่าในช่วงอายุ 180-210 วัน มีการพัฒนา acini และท่อนำอสุจิอย่างรวดเร็วพร้อมกับการปล่อย spermatozoa เพื่อการผสมพันธุ์ แสดงให้เห็นว่าหอยเพศผู้น่าจะมีความสามารถในการผสมพันธุ์ในช่วงอายุหลัง 180 วันจนถึงก่อนช่วงอายุ 210 วัน ถ้าต้องการทราบระยะเวลาที่แน่นอนควรจะต้องเก็บตัวอย่างให้ถี่ขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว หอยอายุ 180 และ 210 วันมีอายุเจริญตรงกับเดือนกรกฎาคมและสิงหาคมตามลำดับ ซึ่งไม่อยู่ในช่วงที่มีการผสมพันธุ์เมื่อเปรียบเทียบกับการรายงานของ Nagachinta and Meejui (1998) ดังนั้นการปล่อย spermatozoa ในหอยช่วงอายุดังกล่าวจึงอาจไม่ทำให้เกิดการผสมพันธุ์ ในการศึกษาครั้งนี้ หอยอายุ 270 วันเป็นช่วงอายุที่เหมาะสมที่สุดในการเริ่มนำมาทำเป็นพ่อพันธุ์เพราะมีการพัฒนาระบบสืบพันธุ์เพศผู้อย่างสมบูรณ์ โดยพิจารณาจากจำนวนและขนาด acini ปริมาณ spermatozoa การพัฒนาท่อนำอสุจิซึ่งมีลักษณะเหมือนกับหอยตัวเต็มวัยอายุหลายปี และพบว่ามีกรลำเลียงอสุจิเพื่อปล่อยสำหรับการผสมพันธุ์ออกจากท่อ gonoduct และ terminal gonoduct อรภา (2543) รายงานว่าหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* มีช่วงเวลาในการเพาะฟักตัวอ่อนในช่วงเดือนกันยายนถึงพฤษภาคม แสดงว่าในช่วงเวลาดังกล่าวต้องมีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ นอกจากนี้ Kovitvadhi *et al.* (2001a) ได้รายงานว่

หอยมุกน้ำจืดชนิดนี้มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงเดือนตุลาคมถึงพฤษภาคม ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานข้างต้น ประกอบกับหอยอายุ 270 วันมีการเจริญอยู่ในช่วงเดือนตุลาคม (เก็บตัวอย่างหอยอายุ 1 วันถึง 360 วัน ตั้งแต่เดือนกุมภาพันธ์ 2548 ถึงเดือนมกราคม 2549) ซึ่งเป็นช่วงที่ปล่อย spermatozoa จากปัจจัยทั้ง 2 อย่างคืออายุตัวหอยเองซึ่งเป็นปัจจัยภายในและช่วงเวลาในรอบปีซึ่งเป็นปัจจัยภายนอกนี้อาจช่วยเสริมให้หอยมีการพัฒนาโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์อย่างสมบูรณ์ สิ่งที่น่าสนใจคือถ้าหากหอยซึ่งมีช่วงอายุดังกล่าวมีการเจริญอยู่ในช่วงเวลานอกฤดูกาลผสมพันธุ์ หอยจะยังมีความสมบูรณ์ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์หรือไม่ ซึ่งเป็นสิ่งที่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม นอกจากนี้ Nagachinta and Meejui (1998) ได้รายงานว่าช่วงเวลาการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* สูงที่สุดในช่วงเดือนธันวาคมถึงเดือนมกราคม ซึ่งน่าจะเป็นช่วงที่มีการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ดีที่สุด และเป็นช่วงเวลาที่ใกล้เคียงกับอายุหอยหลัง 270 วัน ดังนั้นหอยในช่วงอายุหลัง 270 วันควรจะมีการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ดีกว่าหอยอายุ 270 วัน อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงความสมบูรณ์ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในหอยอายุ 300, 330 และ 360 วัน พบว่ามีการพัฒนาโครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ครบถ้วน แต่ความสมบูรณ์กลับน้อยกว่าในหอยอายุ 270 วัน จากข้อมูลเหล่านี้อาจเป็นไปได้ว่ามีปัจจัยอื่นเข้ามาเกี่ยวข้องกับการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ปัจจัยหนึ่งซึ่งไม่ควรมองข้ามคือสภาพแวดล้อมของแหล่งที่อยู่ของหอย จากการสังเกตในขณะสุ่มเก็บตัวอย่าง พบว่าช่วงประมาณเดือนตุลาคมแหล่งน้ำที่สถานีประมงน้ำจืดนครสวรรค์ตื้นเขินและมีพืชขึ้นปกคลุม แต่หลังจากช่วงเวลาดังกล่าวมีน้ำท่วมขังจากน้ำที่หลากประจำปี (ซึ่งตรงกันกับอายุหอยหลัง 270 วัน) ทำให้เกิดการทับถมเน่าเสียของพืช และสีของน้ำค่อนข้างคล้ำ เป็นสาเหตุทำให้คุณภาพน้ำไม่เหมาะสม ซึ่งอาจส่งผลทำให้ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำลดลง และอาจทำให้สุขภาพและการเจริญของหอยไม่ดี อาจมีผลทำให้การพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยหลังอายุ 270 วัน มีน้อยกว่าหอยอายุ 270 วัน

1.2 การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

หอยเพศเมียเริ่มพัฒนาหน่วยโครงสร้างของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (acinus) เมื่ออายุ 240 วันซึ่งช้ากว่าเพศผู้ประมาณ 60 วัน พบว่าทั้ง acini และ oocyte ที่พัฒนาอยู่ภายใน acini มีจำนวนน้อย นอกจากนี้ oocyte ยังพัฒนาอยู่ในระยะต้นๆ เพราะขนาดของเซลล์เล็ก มี stalk ยึดติดกับผนังของ acini ยังไม่มี yolk granule ใน oocyte แต่มี nutritive granule เต็ม acini แสดงให้เห็นว่าหอยเพศเมียอายุดังกล่าวยังไม่มีความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์ แต่เมื่อหอยเพศเมียพัฒนาถึงช่วงอายุ

270 วัน พบว่าหอยมีโครงสร้างของระบบสืบพันธุ์ประกอบด้วย acini จำนวนมากและภายในบรรจุ oocyte ซึ่งเข้าใกล้สู่ระยะท้ายของการพัฒนา สังเกตได้จากขนาดที่ใหญ่ขึ้น และมีการสร้าง yolk granule ภายในเซลล์จำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบท่อนำไข่เพศเมียที่พัฒนามากกว่าหอยอายุ 240 วัน พบว่า outer demibranch ของหอยบางตัวเปลี่ยนแปลงเป็น marsupia ที่ภายในมีโกลกิดีเดี่ยวเปลือกสีน้ำตาลอ่อนจึงทำให้เห็น marsupia เป็นสีดังกล่าวด้วย และจัด marsupia ดังกล่าวอยู่ในระยะที่ 4 ตามการจัดลำดับขั้นของการเปลี่ยนแปลงโดยธวัชชัย (2546) แสดงว่าหอยในระยะดังกล่าวมีความสมบูรณ์ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และมีความพร้อมในการสืบพันธุ์ อนึ่งหอยเพศเมียอายุ 270 วัน มีอายุตรงกับช่วงเดือนตุลาคมซึ่งเป็นช่วงที่ปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นความสมบูรณ์ในการสืบพันธุ์อาจมาจาก 2 ปัจจัยดังที่ได้อธิบายไว้ในเรื่องการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้สำหรับการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียของหอยอายุ 300 และ 330 วัน ไม่ได้ทำการศึกษาเนื่องจากการสุ่มหอยขึ้นมาทั้งหมด 6 ตัว พบเฉพาะเพศผู้ จากการรายงานของอรภา และคณะ (2532) พบว่าอัตราส่วนระหว่างเพศผู้และเพศเมียตามธรรมชาติเป็น 1 : 0.91 อย่างไรก็ตามทำเมื่อทำการสุ่มเก็บหอยอายุ 360 วัน จำนวน 6 ตัว พบอัตราส่วนระหว่างเพศผู้และเพศเมียเป็น 5 : 1 ประกอบกับการสุ่มเก็บตัวอย่างหอยอายุ 300 และ 330 วันซึ่งไม่พบหอยเพศเมียเลย แสดงว่าอัตราส่วนเพศผู้ในหอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงอาจมีมากกว่าเพศเมีย เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของธวัชชัย (2546) พบว่าหอยอายุ 360 วัน มีจำนวน oocyte ในแต่ละ acinus น้อย และมี oocyte ซึ่งพัฒนาในระยะท้ายน้อยมาก นอกจากนี้ยังมีท่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียซึ่งมีขนาดเล็กและการพัฒนาน้อยกว่าหอยอายุ 270 วัน ไม่เกิด marsupia ซึ่งน่าจะอธิบายด้วยเหตุผลเดียวกันกับการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในช่วงอายุ 300, 330 และ 360 วัน เพราะได้ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างจากแหล่งน้ำเดียวกัน และเป็นหอยที่เจริญจากแม่พันธุ์เดียวกัน

ถึงแม้หอยที่สุ่มเก็บมาจะเลี้ยงในสถานที่เดียวกันและมีอายุเท่ากัน แต่หอยในแต่ละช่วงอายุมีขนาดที่แตกต่างกัน โดยการสังเกต พบว่ามี 3 ขนาด คือขนาดเล็ก ขนาดกลาง และขนาดใหญ่ ซึ่งแต่ละขนาดมีความแตกต่างด้านการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ปัจจัยที่ทำให้หอยมีการเจริญเติบโตไม่เท่ากันน่าจะมาจากพันธุกรรม แม้ว่าตัวอ่อนที่เกิดในแม่หอยจะมาจาก การปฏิสนธิระหว่างไข่จากแม่ตัวเดียวกัน แต่สุจิมาจากพ่อคนละตัวกัน เพราะแม่พันธุ์เริ่มแรกเป็นหอยที่เลี้ยงในธรรมชาติรวมกับหอยเพศผู้ จึงทำให้มีโอกาสที่สุจิจากเพศผู้มากกว่า 1 ตัวจะเข้าผสมกับไข่ของตัวเมีย ทำให้พันธุกรรมของลูกครอกเดียวกันมีความแตกต่างกัน และอาจส่งผลต่อความสามารถในการเจริญเติบโตและการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ต่างกัน

2. การพัฒนาเหงือกของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana*

จากการศึกษาการพัฒนาเหงือกของหอยมุกน้ำจืด พบว่าเหงือกเริ่มแรกเกิดทางด้านท้าย (posterior) ของลำตัว แล้วมีการเจริญโดยเพิ่มจำนวน gill filament ไปทางด้านหน้า (anterior) gill filament จะเพิ่มขึ้นตามอายุที่เพิ่ม ซึ่งสอดคล้องกับที่มีการรายงานในหอยชนิด *Anadara* sp., *Corbicula fluminea*, *Crassostrea gigas*, *Dreissena polymorpha*, *Mytilus edulis*, *M. galloprovincialis*, *Nucula nucleus*, *N. sulcata*, *N. tenuis*, *Unio pictorum*, *U. tumidus*, *Pisidium casertanum* (Neumann and Kappes, 2003; Cannuel and Beninger, 2006) เนื่องจากหอยมุกน้ำจืดในระยะแรกมีขนาดเล็กเกินกว่าที่จะกำหนดทิศทางการวางตำแหน่งเพื่อตัดชิ้นเนื้อได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถกำหนดระยะเวลาการตัดชิ้นเนื้อ และไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัดว่า gill filament ที่เกิดขึ้นเป็นของ inner หรือ outer demibranch อย่างไรก็ตามจากการศึกษาในหอยน้ำเค็มชนิด *C. fluminea*, *C. gigas*, *Ostrea chilensis*, *Placopecten casertanum*, *P. magellanicus*, *U. pictorum* (Chaparro et al., 2001; Neumann and Kappes, 2003; Veniot et al., 2003; Canunuel and Beninger, 2006) พบว่ามีการพัฒนา inner demibranch ก่อน Venoit et al. (2003) รายงานว่าในหอยน้ำเค็มชนิด *P. magellanicus* ที่มีขนาดลำตัวไม่เกิน 950 μm ยังไม่มีการสร้าง inner demibranch ที่สมบูรณ์ มีแต่เฉพาะแถวของ descending limb ของ gill filament เพียงหนึ่งแถวในแต่ละด้านซ้ายและขวาของลำตัว ซึ่งในหอยมุกน้ำจืดอายุ 40 วัน พบมีการสร้าง gill filament เพียงหนึ่งแถวโดยหันด้านหน้าของ gill filament ออกทางด้านข้างลำตัว (lateral) Kovitvadhi et al. (2006) ได้แสดงให้เห็นว่าหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* อายุ 40 วันสร้าง demibranch สมบูรณ์แล้ว ดังนั้นการไม่พบ demibranch ที่สมบูรณ์ในการศึกษาครั้งนี้อาจเป็นเพราะระยะเวลาการตัดไม่ผ่านแถวของ gill filament อีกด้านของ demibranch ทำให้เห็นแถว gill filament เพียงด้านเดียว พบ inner และ outer demibranch สมบูรณ์เมื่อหอยอายุ 80 วัน เนื่องจากหอยมีขนาดใหญ่ขึ้นจึงสามารถจัดวางตำแหน่งการตัดชิ้นเนื้อได้ ในหอยน้ำเค็มชนิด *C. gigas* พบว่าเริ่มสร้าง inner และ outer demibranch ครบในจิวไนล์อายุ 36 วัน ที่มีขนาดของเปลือกกว้าง 2.70 mm (Cannuel and Beninger, 2006) อย่างไรก็ตามไม่สามารถระบุได้อย่างแน่ชัดในหอยมุกน้ำจืดว่า การเกิด demibranch สมบูรณ์เป็นครั้งแรกและการเกิด demibranch สมบูรณ์ทั้งสองแผ่นพบในหอยอายุเท่าใด ผลการศึกษาครั้งนี้ไม่พบซิเลียที่ gill filament และ foot ในหอยอายุ 1 วัน แตกต่างจากรายงานของ Kovitvadhi et al. (2001a) และ Lima et al. (2006) ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าสารเคมีที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ทำให้ซิเลียถูกทำลาย เพราะซิเลียมีความเปราะบาง

เมื่อพิจารณาลักษณะทางจุลกายวิภาคของเหงือกหอยมุกน้ำจืดอายุ 240 วัน และช่วงอายุหลัง 270 วัน พบว่ามีความผิดปกติของเซลล์เกิดขึ้นกระจายทั่วไปโดยเฉพาะในช่วง 300 วันซึ่งเห็นได้ชัดเจน ความผิดปกติโดยรวมเกิดขึ้นที่ gill lamella และฐานของ gill filament กล่าวคือเซลล์และนิวเคลียสมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์ข้างเคียงประมาณ 3-4 เท่า และพบว่าบางเซลล์มีการติดสีของไซโตพลาซึมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม โดยติดสีของ eosin เข้มขึ้น แสดงว่ามีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ โดยเฉพาะโปรตีน บางเซลล์มีการแตกหักของนิวเคลียสเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ แสดงว่าเซลล์กำลังจะตาย จากเหตุการณ์ดังกล่าวนี้ประกอบกับการเน่าเสียของน้ำ น่าจะเป็นเครื่องบ่งชี้ให้ทราบว่าคุณภาพของน้ำที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในทางลบอาจมีผลต่อการเจริญสภาพ ตลอดจนการสืบพันธุ์ของหอย เพราะเหงือกเป็นอวัยวะที่มีความสำคัญในกระบวนการหายใจ การกินอาหาร และการสืบพันธุ์ในแง่เป็นบริเวณที่เพาะฟักตัวอ่อน ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าในหอยอายุ 300, 330 และ 360 วัน ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีการพัฒนาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์น้อยกว่าหอยอายุ 270 วัน

โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของ inner และ outer demibranch ในหอยเพศผู้และเพศเมีย ซึ่งยังไม่มีการพัฒนาของตัวอ่อนในเหงือกไม่มีความแตกต่างกัน แต่หลังจากการปฏิสนธิตัวอ่อนจะพัฒนาใน outer demibranch ของหอยเพศเมียเรียกว่า marsupia ซึ่งมีลักษณะทางจุลกายวิภาคแตกต่างกันกับ inner demibranch และแตกต่างกันกับ inner และ outer demibranch ของเพศผู้ โดย marsupia มีขนาดใหญ่ขึ้น รูปแบบโครงสร้างของ marsupia ในหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* มีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างหอย 2 กลุ่ม โดยกลุ่มแรกคือหอยกาน้ำจืดชนิด *Anodonta cataracta* และ *A. grandis* และกลุ่มที่สองคือหอยกาน้ำจืด *Carunculina parva texasensis* และ *Ligumia subostrata* ซึ่งมีการรายงานโดย Richard *et al.* (1991) และ Tankersley and Dimock, Jr (1992) เมื่อพิจารณาดำเนินการเพาะฟักตัวอ่อนใน brood chamber หรือ primary water tube พบว่าหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* มีการเพาะฟักตัวอ่อนในทุก brood chamber ของ outer demibranch เช่นเดียวกับหอย *A. cataracta* และ *A. grandis* ในขณะที่หอยชนิด *C. parva texasensis* และ *L. subostrata* ใช้ brood chamber ซึ่งอยู่ทางด้านท้าย (posterior) ของ outer demibranch ในการเพาะฟักตัวอ่อน สำหรับการพัฒนาของ secondary water tube ในระหว่างที่เพาะฟักตัวอ่อน พบว่าหอยชนิด *A. cataracta* และ *A. grandis* มีการพัฒนา secondary water tube บน lamellae ทั้งสองของ outer demibranch ซึ่งทำหน้าที่เป็น marsupia โดยเกิดจากการสร้าง secondary septum แบ่งท่อ water tube เดิมบางส่วนทางด้านข้าง (lateral) และด้านที่ใกล้ตรงกลาง (medial) จึงทำให้เกิด secondary water tube 2 ท่อนับ water tube เดิมซึ่งต่อมาทำหน้าที่เป็น brood chamber และเรียก

การจัดเรียงตัวดังกล่าวว่า tripartite organization พบว่าการแลกเปลี่ยนแก๊สเกิดขึ้นโดยน้ำผ่านเข้ามาทาง ostium ส่งต่อไปที่ water canal และสิ้นสุดที่ secondary water tube โดยไม่ผ่านเข้าไปยัง brood chamber ดังนั้นตัวอ่อนซึ่งอยู่ใน brood chamber จะถูกแยกไม่ให้อสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมจากภายนอก (Richard *et al.*, 1991; Tankersley and Dimock, Jr, 1992) สำหรับหอยกาบน้ำจืด *C. parva texasensis* และ *L. subostrata* ไม่มี tripartite organization และส่วนที่ทำหน้าที่แลกเปลี่ยนแก๊สคือ ส่วนหน้าของ outer demibranch ซึ่งไม่ใช้ในการเพาะฟักตัวอ่อน นอกจากนี้พบว่า brood chamber ของหอยในกลุ่มนี้ติดต่อกับสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยผ่านทาง ostium และ water canal (Richard *et al.*, 1991) ในขณะที่หอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* มีการพัฒนา secondary water tube บางช่วงของ marsupia แต่บางช่วงไม่มีการสร้าง secondary water tube และยังมีการติดต่อกันระหว่าง brood chamber กับช่องแมนเทิลโดยทาง water canal อย่างไรก็ตามไม่มี tripartite organization เพราะ secondary water tube เกิดเฉพาะบน lamella ด้านข้างเท่านั้น นอกจากนี้อัตราส่วนจำนวนท่อของ secondary water tube ต่อ 1 ท่อของ brood chamber ในหอยมุกน้ำจืดที่ศึกษามีมากกว่า 2 ต่อ 1 ในขณะที่การจัดเรียงตัวแบบ tripartite organization ในหอยชนิด *A. cataracta* และ *A. grandis* จะมีอัตราส่วนเป็น 2 ต่อ 1 การมีจำนวนท่อ secondary water tube มากในหอยมุกน้ำจืดอาจมีจุดประสงค์เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวและปริมาตรในการแลกเปลี่ยนแก๊สเพื่อชดเชยกับการที่ต้องสูญเสีย water tube ไปเป็น brood chamber และชดเชยกับการมี secondary water tube เพียงด้านเดียว ในบางบริเวณของ marsupia ซึ่งไม่มีการสร้าง secondary water tube ในหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* จะมีการติดต่อกันโดยตรงระหว่าง brood chamber กับสิ่งแวดล้อมภายนอกโดยผ่านทาง ostium และ water canal ซึ่งเป็นลักษณะที่พบในหอยชนิด *C. parva texasensis* และ *L. subostrata* แม้ว่าจะมีการเชื่อมติดต่อกันโดยตรงระหว่าง brood chamber และสิ่งแวดล้อมภายนอก แต่จากการศึกษาของ Richard *et al.* (1991) ในหอยกาบน้ำจืด *C. parva texasensis* และ *L. subostrata* พบว่าช่อง brood chamber สามารถป้องกันการผ่านเข้าไปของน้ำได้ กลไกในการควบคุมการติดต่อดังกล่าวเพื่อเป็นการป้องกันตัวอ่อนจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่ไม่เหมาะสมและแรงดันน้ำที่เข้ามาปะทะ กลไกหนึ่งที่น่าจะเป็นไปได้คือการประสานการทำงานระหว่างกล้ามเนื้อและระบบประสาท บริเวณ ostium Gainey, Jr, *et al.* (2003) ได้รายงานผลการศึกษาระดับหอยน้ำเค็มชนิด *Mercenaria mercenaria* ด้วย 5-HT พบว่าสารดังกล่าวทำให้กล้ามเนื้อที่ water tube หดตัวและ ostium ปิด นอกจากนี้ยังทำให้เส้นเลือดหดตัวด้วย และได้ผลแบบเดียวกันนี้ในหอยสกุล *Mytilus* นอกจากนี้การที่มีตัวอ่อนอยู่เต็มช่อง brood chamber ก็อาจเป็นสิ่งกีดขวางการเข้ามาของน้ำจากภายนอก จากสองหลักการนี้อาจเป็นการควบคุมและลดแรงดันน้ำจากภายนอกเพื่อป้องกันตัวอ่อน

interlamellar septum มีการยึดยาวใน marsupia พบเส้นเลือดขนาดใหญ่ที่ปลายของ interlamellar septum ซึ่งอยู่ทางด้านที่มี secondary water tube และพบมากด้านนี้ อาจอธิบายได้ว่า เส้นเลือดดังกล่าวมีการแลกเปลี่ยนแก๊สกับน้ำที่ผ่านเข้ามาทาง secondary water tube จึงพบเส้นเลือดทางด้านนี้มากกว่า พบว่ามีบาง interlamellar septum ซึ่งไม่เชื่อมระหว่าง 2 lamellae จึงทำให้เกิดช่องต่อกันระหว่าง brood chamber (perforation) พบลักษณะดังกล่าวได้ในหอยกานน้ำจืด

Corbicula matanensis, *Unio pictorum* และ *U. caffer* (Graf and Foighil, 2000; Korniuschin and Glaubrecht, 2003) ลักษณะดังกล่าวอาจจะเป็นประโยชน์ในแง่ของการเพิ่มพื้นที่ในการเพาะฟักตัวอ่อน นอกจากนี้พบว่า interlamellar septum มีการยื่น (infolding) เข้าไปใน brood chamber ซึ่งอาจมีส่วนในการเพิ่มพื้นที่ในการติดต่อกันระหว่างเนื้อเยื่อของแม่หอยและตัวอ่อนซึ่งกำลังพัฒนา Schwartz and Dimock, Jr (2001) ได้ศึกษาการติดต่อกันระหว่าง interlamellar septum และตัวอ่อนระยะ โกลคิเดียในหอยกานน้ำจืดชนิด *Pyganodon cataracta* และ *Utterbackia imbecillus* ในระดับกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) พบว่าที่ปลายด้านบนของเซลล์เยื่อบุผิวของ interlamellar septum มีไมโครวิลไลทั้งชนิดที่มีแขนง (branched) และไม่มีแขนง (unbranched) นอกจากนี้ยังมีซิเลีย โครงสร้างดังกล่าวมีการติดต่อกันกับ vitelline membrane ของตัวอ่อน และพบว่าในช่วงต้นของการเพาะฟักมีการสะสมของไกลโคเจนที่เนื้อเยื่อบริเวณ interlamellar septum และลดลงในระหว่างที่เพาะฟักตัวอ่อน ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่ามีการแลกเปลี่ยนสารอาหารในบริเวณที่มีการติดต่อกันนี้ เมื่อศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อบุผิวที่ primary water tube ของหอยมุกน้ำจืด พบว่าบางบริเวณเป็นชนิด pseudostratified columnar epithelium ที่มีซิเลียขนาดสั้นแต่ไม่พบไมโครวิลไล ดังนั้นอาจไม่มีบทบาทในการติดต่อเพื่อแลกเปลี่ยนสารอาหารระหว่างแม่กับตัวอ่อน นอกจากนี้ในหลายบริเวณบน interlamellar septum มีลักษณะเหมือนเบ้า (socket) ใ้รองรับพอดีกับ โกลคิเดียซึ่งทำให้เกิดการสัมผัสกันระหว่างเนื้อเยื่อแม่และตัวอ่อน แต่อาจเป็นไปได้ว่าเนื้อเยื่อแม่อาจได้รับแรงกดจาก โกลคิเดียที่อัดกันแน่นใน primary water tube ทำให้เกิดลักษณะที่เป็นเบ้าดังกล่าวได้ นอกจากนี้เมื่อพิจารณาโครงสร้างเปลือกของ โกลคิเดีย พบว่า โกลคิเดียของหอยบางชนิดมีรูที่ผิวด้านบนและด้านในของเปลือก เช่นในหอยกานน้ำจืดชนิด *A. woodiana* และ *A. arcaeformis flavotincta* (Kwon *et al.*, 1993) การเกิดรูดังกล่าว น่าจะมีส่วนช่วยในการส่งผ่านสารอาหารและแก๊สระหว่างแม่หอยและ โกลคิเดีย อย่างไรก็ตาม โกลคิเดียของหอยบางชนิดไม่มีรูที่เปลือก เช่นหอยน้ำจืดชนิด *Hyridella depressa* และ *Margaritifera auricularia* (Jupiter and Byrne, 1997; Araujo and Ramos, 1998) และ โกลคิเดียของหอยบางชนิดมีรูเฉพาะที่เปลือกด้านในเท่านั้น เช่นในหอยกานน้ำจืดชนิด *Unio douglasiae* (Kwon *et al.*, 1993) รูปแบบที่เปลือกไม่มีรูน่าจะเป็นอุปสรรคในการส่งผ่านสารอาหารระหว่างแม่หอยไป

ยังโกลคิเดียมโดยผ่านทางเปลือก แต่หอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* ระยะโกลคิเดียมมีเปลือกภายในที่มีรูและเปลือกด้านนอกประกอบด้วยสารอินทรีย์เส้นใยปกคลุมรูดังกล่าว ทำให้เกิดลักษณะเหมือนตะแกรง (sieve) ซึ่งอาจมีการผ่านเข้าออกของสาร (Kovitvadhhi *et al.*, 2001a) อย่างไรก็ตาม Nagachinta and Meejui (1998) ได้รายงานว่าไข่ของหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* มีขนาดเฉลี่ย 117.5 ไมโครเมตร ซึ่งใกล้เคียงกันกับไข่หอยสกุล *Corbicula* ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 80-125 ไมโครเมตร ไข่ของหอยทั้ง 2 ชนิดนี้ถือว่ามียุขขนาดใหญ่กว่าหอยในกลุ่ม Sphaeriidae ซึ่งมีปริมาณไข่แดงต่ำและได้รับอาหารจากแม่ผ่านทางผนังของ marsupia (Korniushin and Glaubrecht, 2003) นอกจากนี้ พบว่าไข่ของหอยมุกน้ำจืด *H. (H.) myersiana* มี yolk granule ปริมาณมากซึ่งน่าจะเพียงพอต่อการพัฒนาของตัวอ่อนระยะเอมบริโอรวมถึงระยะโกลคิเดียม และ yolk granule ยังพบในโกลคิเดียมที่พัฒนาใน marsupia ดังนั้นโกลคิเดียมจึงอาจไม่จำเป็นต้องใช้สารอาหารจากตัวแม่หรืออาจกล่าวได้ว่าหอยมุกน้ำจืดน่าจะมียุขแบบการได้รับสารอาหารเพื่อการพัฒนาตัวอ่อนแบบ ovoviviparous

จากการศึกษาทางมิวสิกเคมีเพื่อตรวจสอบชนิดและตำแหน่งของสาร mucopolysaccharide ที่เนื้อเยื่อเหงือกของหอยมุกน้ำจืด พบว่ามีการสร้างสารดังกล่าวใน mucocyte ที่บริเวณชั้นเยื่อหุ้มรอบ water tube, primary water tube และ gill filament แต่ไม่พบที่ secondary water tube จำนวนของ mucocyte จะเพิ่มขึ้นตามอายุหอย ในหอยเพศเมียที่มีการเพาะฟักตัวอ่อนมีจำนวนเซลล์ดังกล่าวเพิ่มขึ้นในชั้นเนื้อเยื่อหุ้มรอบ primary water tube พบว่า mucocyte ส่วนใหญ่บริเวณชั้นเนื้อเยื่อหุ้มรอบ water tube หรือ primary water tube สร้างสารพวก acid mucopolysaccharide ซึ่งคล้ายคลึงกับที่พบในหอยทะเลและหอยน้ำจืดหลายชนิด ได้แก่ *Arca zebra*, *Corbicula australis*, *Crassostrea virginica*, *Mercenaria mercenaria*, *Mya arenaria*, *Mytilus edulis*, *Placopecten magellanicus* และ *Spisula solidissima* (Byrne *et al.*, 2000; Dufour and Beninger, 2001) ในขณะที่หอย *Modiolus modiolus* มี mucocyte ที่สร้างสารพวก mixed mucopolysaccharide (Dufour and Beninger, 2001) ส่วนในหอยชนิด *Mytilus galloprovincialis* มี mucocyte สร้างสารพวก neutral mucopolysaccharide เป็นส่วนใหญ่ (Gómez-Mendikute *et al.*, 2005) สำหรับ mucocyte ที่พบบริเวณ gill filament ของหอยมุกน้ำจืดมี 2 ชนิด คือ mucocyte ชนิดที่สร้าง acid mucopolysaccharide และ mixed mucopolysaccharide คล้ายคลึงกับที่พบในหอยชนิด *Arca zebra* และ *Placopecten magellanicus* ส่วนในหอยหลายชนิด ได้แก่ *Lucinoma aequizonata*, *Parvilucina tenuisculpta*, *Spisula solidissima*, *Mya arenaria*, *Mercenaria mercenaria* และ *Cyclocardia barbarensis* พบเฉพาะ mucocyte ที่สร้างสาร acid mucopolysaccharide ชนิดเดียว

เท่านั้น ในหอยชนิด *Modiolus modiolus* พบ mucocyte ที่สร้างสาร mixed และ neutral mucopolysaccharide ส่วนในหอยชนิด *Crassostrea virginica* สร้างสารชนิด acid และ neutral mucopolysaccharide (Dufour and Beninger, 2001; Duplessis *et al.*, 2004) Byrne *et al.* (2000) ตั้งสมมติฐานว่าสารคัดหลั่งจาก mucocyte ซึ่งหมายรวมถึง mucopolysaccharide น่าจะมีบทบาทเกี่ยวข้องในการเป็นสารอาหารเลี้ยงตัวอ่อนและช่วยในการหล่อลื่น โดยเฉพาะในขณะที่ปล่อยตัวอ่อนออกจากเหงือก อย่างไรก็ตามจากการศึกษาครั้งนี้พบสารพวก acid mucopolysaccharide ที่เปลือกกรอบนอกของโกลคิเดียม แต่ไม่พบสารนี้ในเนื้อเยื่อของโกลคิเดียม acid mucopolysaccharide ดังกล่าวน่าจะมาจาก mucocyte ที่อยู่ในชั้นเนื้อเยื่อบุฝูวรอบ primary water tube ซึ่งเป็นเซลล์ส่วนมากเมื่อเปรียบเทียบกับ mucocyte ชนิดอื่น เมื่อทดสอบการติดสีด้วย PAS พบสาร neutral mucopolysaccharide เฉพาะที่ฝูวรอบนอกของเปลือกโดยมีการติดสีเล็กน้อย และยังพบการติดสีที่ mucopolysaccharide band การติดสีที่เปลือกน่าจะมาจาก mucocyte ชนิดที่สร้างสาร neutral หรือ mixed mucopolysaccharide ซึ่งมีจำนวนเซลล์น้อย และเมื่อยืนยันผลการทดลองด้วยการย้อมสี PAS-alcian blue ผลที่ได้คือที่เปลือกโกลคิเดียมมีสาร mixed mucopolysaccharide ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจาก mucocyte ชนิดต่างๆ หลังสาร mucopolysaccharide มาเคลือบที่เปลือก ส่วน mucopolysaccharide band เป็นสารพวก neutral mucopolysaccharide จากผลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าไม่มีการเคลื่อนย้ายของ mucopolysaccharide ที่สร้างจาก mucocyte ของเนื้อเยื่อแม่เข้าไปภายในโกลคิเดียมเลย ซึ่งน่าจะช่วยยืนยันว่ารูปแบบการได้รับอาหารเพื่อการพัฒนาตัวอ่อนของหอยมุกน้ำจืดเป็นแบบ ovoviviparous นอกจากนี้ Dufour and Beninger (2001) ได้ศึกษาเกี่ยวกับสารเมือกซึ่งพบในตำแหน่งเยื่อบุฝูวรอบ water tube ของหอยในกลุ่ม eulamellibranch แล้วตั้งสมมติฐานว่า acid mucopolysaccharide เป็นสารที่มีความหนืดสูง ทำให้เป็นสารหล่อลื่นที่ดี เพราะสารดังกล่าวไม่จับตัวกับน้ำง่าย จึงไม่ถูกชะล้างจากเนื้อเยื่อฝูว ดังนั้น acid mucopolysaccharide น่าจะทำหน้าที่ช่วยให้การเคลื่อนที่ของน้ำในท่อเกิดได้ดี แต่สารดังกล่าวซึ่งพบใน primary water tube เป็นปริมาณมากไม่น่าจะทำหน้าที่ช่วยในการเคลื่อนที่ของน้ำ แต่น่าจะช่วยพยุงหรือค้ำจุนโกลคิเดียมในระหว่างที่อยู่ภายในเหงือกและช่วยหล่อลื่นในระหว่างการปล่อยโกลคิเดียม และยังอาจจะมียบทบาทในการทำ ความสะอาด primary water tube หลังจากที่มีการปลดปล่อยโกลคิเดียม โดยการกำจัดอนุภาคต่างๆ ที่หลงเหลืออยู่ นอกจากนี้สารดังกล่าวยังช่วยทำให้เกิดการจับกลุ่มกันของโกลคิเดียม (conglutinate) ที่ถูกปล่อยออกจาก marsupia ซึ่งพบในหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* เช่นเดียวกับที่พบในหอย กาบน้ำจืด *Margaritifera auricularia* (Araujo and Ramos, 1998) และหอยกาบน้ำจืด *Strophitus undulatus* (Watters, 2002) การจับกลุ่มกันของโกลคิเดียมจะช่วยเพิ่มอัตราการรอดตายได้ดีกว่าการ

ปล่อยโกลคิเดียแบบกระจายเพราะช่วยเพิ่มโอกาสให้โกลคิเดียจำนวนมากจับเกาะกับสิ่งมีชีวิตเจ้าบ้าน (host) ได้พร้อมกัน (Watters, 2002)

mucocyte ซึ่งพบที่ gill filament ของหอยมุกน้ำจืดเป็นชนิดที่สร้างสาร acid และ mixed mucopolysaccharide คล้ายคลึงกับที่พบในหอยชนิด *Mytilus edulis* และ *Placopecten magellanicus* (Beninger and St-Jean, 1997) สารดังกล่าวน่าจะมีบทบาทหลักในการกินอาหารโดยวิธีการคัดเลือกอนุภาคที่แขวนลอยในน้ำ Beninger and St-Jean (1997) รวบรวมข้อมูลเกี่ยวกับบทบาทของ mucopolysaccharide ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการกินอาหารแบบ suspension-feeding และรายงานว่า เมื่อเรียงตามลำดับความหนืดของ mucopolysaccharide จากมากไปน้อย พบว่า acid > acid-dominant > mixed > neutral mucopolysaccharide และอธิบายว่า acid mucopolysaccharide ซึ่งมีความหนืดมากที่สุดและพบทางผิวหนังที่สัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรงจะทำหน้าที่ในการขนส่งและคัดแยกอนุภาคที่มากับน้ำโดยการจับเกาะกับอนุภาคดังกล่าว แต่ทิศทางการขนส่งอนุภาคจะสวนทางกับทิศทางของน้ำที่ผ่านเข้ามา

Hovingh และ Linker (1993) ได้ศึกษาตำแหน่งและชนิดของ glycosaminoglycans (mucopolysaccharide) ในหอยกานน้ำจืดชนิด *Anodonta californiensis* พบว่าที่ตำแหน่งระหว่างเซลล์ basement membrane และผิวหนังนอกของ gill filament มีสาร heparin อยู่ สารดังกล่าวจัดเป็น acid mucopolysaccharide เพราะมีหมู่ซัลเฟตหลายหมู่ (highly sulfated) และเสนอว่า heparin สามารถจับกับ Ca^{2+} จากน้ำภายนอกแล้วส่งผ่านข้ามเนื้อเยื่อผิวหนัง สะสมภายในเหงือกหอยเพื่อการพัฒนาเปลือกของโกลคิเดีย Silverman *et al.* (1987) ได้ศึกษาการเคลื่อนที่ของ ^{45}Ca โดยทดลองฉีดเข้าในหอยเพศเมียก่อนการเพาะฟักตัวอ่อนใน marsupia และพบว่าสารดังกล่าวมีการสะสมที่เหงือกและลดลงในช่วงที่มีการเพาะฟัก โดยสารไอโซโทปดังกล่าวเข้าไปอยู่ในส่วนเปลือกของโกลคิเดีย นอกจากนี้ Chevalier *et al.* (2004) รายงานว่า heparin สามารถจับเกาะกับ Ca^{2+} และการจับเกาะดังกล่าวขึ้นกับ iduronate carboxylate, N-sulfamido และ O-sulfate group ดังนั้นหากมีการสร้างสาร heparin ดังกล่าวจริงใน mucocyte ก็อาจจะมียบทบาทในการตรึง Ca^{2+} เพื่อสร้างเปลือกของโกลคิเดียและการตรึงดังกล่าวอาจเป็นการประสานร่วมกันกับ mucocyte ซึ่งพบที่ primary water tube ซึ่งควรจะได้ศึกษาในเชิงลึกต่อไป

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ยังมีคำถามบางอย่างซึ่งยังไม่สามารถหาคำตอบได้อย่างสมบูรณ์ เช่น เหงือกที่เริ่มพัฒนาขึ้นก่อนเป็น inner หรือ outer demibranch water tube และ interlamellar septum

เริ่มพัฒนาในช่วงใด การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในหอยอายุ 300 และ 330 วันเป็นอย่างไร กลไกที่แท้จริงใดซึ่งส่งผลให้เกิดความผิดปกติในระดับจุลกายวิภาคที่เหงือกในหอยบางช่วงอายุ และความผิดปกติดังกล่าวส่งผลต่อการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์หรือไม่ อย่างไร เป็นต้น ดังนั้นคำถามเหล่านี้ควรจะได้นำไปศึกษาวิเคราะห์ในเชิงลึก หรือใช้กระบวนการในการศึกษาอื่นมาประกอบ เพื่อให้ข้อมูลต่างๆ มีความสมบูรณ์ชัดเจนมากยิ่งขึ้น เช่นการใช้เทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscopy) เพื่อศึกษาลักษณะ 3 มิติของเหงือก อาจช่วยตอบคำถามได้ว่า demibranch ใดที่พัฒนาขึ้นก่อน และยังสามารถตอบคำถามได้ว่า water tube และ interlamellar septum เริ่มพัฒนาในหอยช่วงอายุใด ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ส่งผลต่อคุณภาพของน้ำที่ใช้เลี้ยงหอยก็ควรได้รับการตรวจสอบ เช่น ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (DO) แอมโมเนีย ฟอสเฟต ความกระด้างของน้ำ (hardness) ความโปร่งใสของน้ำ (transparency) pH ชนิดและปริมาณของแพลงก์ตอน เป็นต้น นอกจากนี้อาจจะตรวจสอบปริมาณสารพิษต่างๆ ตลอดจนปรสิตรื้อโรคลินแหล่งน้ำ ข้อมูลต่างๆ เหล่านี้จะช่วยให้เกิดความสมบูรณ์ในการอธิบายการพัฒนา ระบบสืบพันธุ์ในหอยมุกน้ำจืด ซึ่งท้ายที่สุดก็จะนำไปเป็นข้อมูลพื้นฐานในการเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดทั้งเพื่อการอนุรักษ์และประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้พบว่าประสบความสำเร็จในระดับหนึ่ง และยังเป็นการศึกษาที่น่า่องเกี่ยวกับการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยกาน้ำจืดซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษามาก่อน ด้วยเหตุที่ยังไม่เคยมีการรายงานเกี่ยวกับความสำเร็จในการเพาะเลี้ยงหอยกาน้ำจืดตั้งแต่ระยะ โกลคิเดียนจนถึงระยะตัวเต็มวัย แต่จากการพัฒนาการเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด *H. (L.) myersiana* โดย Kovitvadhi et al. (2001b) ซึ่งใช้อาหารสังเคราะห์ (artificial media) เพาะเลี้ยงตัวอ่อนระยะ โกลคิเดียนพัฒนาเข้าสู่ระยะจูวีไนล์และเพาะเลี้ยงต่อจนถึงอายุเต็มวัย จึงทราบช่วงอายุที่แน่นอนของหอยที่นำมาใช้ในการศึกษา แตกต่างจากการศึกษาเกี่ยวกับระบบสืบพันธุ์ในหอยกาน้ำจืดที่ผ่านมาซึ่งมักจะรายงานเป็นขนาดของลำตัวหอยเปรียบเทียบกับ การเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในรอบปี เพราะเป็นหอยซึ่งเก็บจากธรรมชาติไม่ทราบอายุที่แน่นอน แต่การศึกษาครั้งนี้สามารถทราบช่วงอายุที่เริ่มมีการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และช่วงอายุที่พัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์สมบูรณ์เป็นครั้งแรก ทำให้สามารถประเมินช่วงอายุที่แท้จริงในการคัดเลือกหอยเพื่อใช้เป็นพ่อแม่พันธุ์ในการเพาะเลี้ยง

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

โครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เริ่มพัฒนาในหอยอายุ 180 วัน แต่มี acini จำนวนน้อย แต่ละ acinus ประกอบด้วยเซลล์ซึ่งกำลังพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์และ spermatozoa จำนวนน้อย นอกจากนี้ยังไม่พบท่อนำอสุจิ การพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้มีมากขึ้นตามอายุของหอยที่เพิ่มขึ้น โดยพิจารณาจาก จำนวนและขนาดของ acini จำนวนเซลล์ซึ่งกำลังพัฒนาเป็นเซลล์สืบพันธุ์ และ spermatozoa ในแต่ละ acinus ตลอดจนการพัฒนาของท่อนำอสุจิ พบว่าเมื่อหอยเพศผู้อายุ 270 วัน มีการพัฒนาของอวัยวะดังกล่าวสมบูรณ์เป็นครั้งแรกพร้อมกับมีการลำเลียง spermatozoa เพื่อใช้ในการผสมพันธุ์

โครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเริ่มพัฒนาในหอยอายุ 240 วันซึ่งช้ากว่าเพศผู้ประมาณ 60 วัน แต่ยังไม่สมบูรณ์ ประกอบด้วย acini จำนวนน้อย ภายในมี oocyte ซึ่งกำลังพัฒนาในระยะต้น โดยพิจารณาจากขนาดเซลล์ที่เล็ก ไม่มี yolk granule มี stalk ยึดกับผนัง acini แต่โครงสร้างของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียพัฒนาสมบูรณ์เป็นครั้งแรกในหอยอายุ 270 วัน เช่นเดียวกับเพศผู้ เพราะมี oocyte ที่พัฒนาในทุกระยะ และ oocyte ที่พัฒนาในระยะท้ายของการเจริญมีมาก จำนวน oocyte มีมากและมี yolk granule สะสมอยู่มาก ท่อนำไข่พัฒนาดี นอกจากนี้ยังสามารถเพาะฟักตัวอ่อนใน marsupia ซึ่งแสดงถึงความสมบูรณ์ของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงอายุดังกล่าว

การพัฒนาเหงือก พบว่าตำแหน่งซึ่งเริ่มมีการพัฒนาของเหงือกเกิดทางด้านท้าย (posterior) ของลำตัวและพัฒนาทั้งด้านซ้ายและขวาอย่างสมมาตร มีการเพิ่มจำนวนของ gill filament ไปทางด้านหน้า ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเหงือกทั้งที่เป็น inner demibranch และ outer demibranch ไม่มีความแตกต่างทั้งในเพศผู้และเพศเมีย ยกเว้นในช่วงที่มีการเพาะฟักตัวอ่อนซึ่งใช้ outer demibranch เป็น marsupia จะมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโดยมีการสร้าง secondary water tube เพิ่มขึ้นมา และใช้ primary water tube ซึ่งเป็น water tube เดิมในการเพาะฟักตัวอ่อน มีการเพิ่มจำนวน mucocyte ซึ่งสร้างสารพวก acid mucopolysaccharide ใน primary water tube

ข้อเสนอแนะ

การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดควรคำนึงถึงปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการเจริญและสุขภาพของหอย ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ โดยเฉพาะคุณภาพของแหล่งน้ำที่ใช้เลี้ยงหอยและอาหาร การจัดการเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสมจะก่อให้เกิดความสำเร็จในการเพาะเลี้ยง อันจะนำไปสู่การอนุรักษ์ชนิดพันธุ์หอยมุกน้ำจืดซึ่งเป็นหอยประจำถิ่นของประเทศไทย และประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กัญญา สุจริตวงศานนท์, อรภา นาคจินดา และ อุทัยวรรณ โกวิทวที. 2543. การศึกษาความเป็นไปได้ในการเลี้ยงหอยมุกน้ำจืดระยะจูวีไนต์ *Chamberlaina hainesiana* ในห้องปฏิบัติการด้วยสำหรับชนิดต่างๆ. ใน รายงานวิจัย 2543. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, กรุงเทพฯ.
- จรัสธาดา วรรณสุด. 2514. หอยกาน้ำจืดในประเทศไทย, น. 59-138. ใน รายงานประจำปี 2514 หน่วยงานอนุกรมวิธานสัตว์น้ำจืด. กองบำรุงพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพฯ.
- จำนงค์ วิสุทธิแพทย์. 2527. สัตววิทยา. O.S. Printing House Co. Ltd., กรุงเทพฯ.
- ธวัชชัย จินดามงคล. 2546. โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ในวงสืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ธวัชชัย จินดามงคล, อุทัยวรรณ โกวิทวที, สาธิต โกวิทวที, อมรา ทองปาน และ วรรณิกา ชัชวาลวานิช. 2546. ระยะเวลาและความถี่ในการพัฒนาตัวอ่อนระยะโกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900. น. 171-178. ใน เรื่องเต็มประชุมวิชาการครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- บพิช จารุพันธ์ และ นันทพร จารุพันธ์. 2528. ปฏิบัติการสัตววิทยาทั่วไป. บุรพาสาส์น, กรุงเทพฯ.
- สาธิต โกวิทวที, อุทัยวรรณ โกวิทวที, ประภัศสร พลวงศ์ และ นฤภัทร กุชวัฒน์. 2546. การพัฒนาวิธีการเลี้ยงตัวอ่อนระยะโกลคิเดียและลูกหอยระยะจูวีไนต์ของหอยกาน้ำจืด *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856). ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 41.

สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตราชู, เขียวลักษณ์ จิตรามวงศ์ และ ศิริวรรณ จันทเดมิย์. 2538.

สังขวิทยา. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

อรภา นาคจินดา. 2543. การศึกษาเกี่ยวกับหอยมุกน้ำจืดและการเพาะเลี้ยงไข่มุกน้ำจืดในประเทศไทย, น. 63-86. ใน เอกสารเสวนาวิชาการเรื่อง การศึกษาวิชาการหอย ปี2000.

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

_____, สุวีณา บานเย็น และ เกรียงไกร สหัสสานนท์. 2532. การพัฒนาการและฤดูวางเซลล์สืบพันธุ์ของหอยกาน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856) บริเวณแม่น้ำแม่กลองใต้เขื่อนวชิราลงกรณ จังหวัดกาญจนบุรี, น. 360-372. ใน รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2532 . กรมประมง, หจก. ชูติมาการพิมพ์. กรุงเทพฯ.

_____, วชิระ กิตติมศักดิ์ และ เสน่หา ขุนชัย. 2537. การเพาะพันธุ์หอยมุกน้ำจืด *Chamberlainia hainesiana* (Lea, 1856). เอกสารวิชาการฉบับที่ 4/2537. กองประมงน้ำจืด กรมประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.

_____, นฤมล เดชะประเสริฐ และ อรภา นาคจินดา. 2540. การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis desowitzi* ระยะโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์. ใน รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36 (CD-ROM).

Allen, R.D. 1951. The use of *Spisula solidissima* egg in cell research. **J. Cell Comp. Physiol.** 37: 504-505.

Araujo, R. and M.A. Ramos. 1998. Description of the glochidium of *Margaritifera auricularia* (Sprengler 1793) (Bivalvia: Unionoidea). **Phil. Trans. R. Soc. Lond.** 353: 1553-1559.

Barnes, R.D. 1987. **Invertebrate Zoology**. Saunder College Publishing, USA.

Bauer, G. 1987. Reproductive strategy of the freshwater pearl mussel *Margaritifera margaritifera*. **J. Anim. Ecol.** 56: 691-704.

- Beninger, P.G. and S.D. St-Jean. 1997. The role of mucus in particle processing by suspension-feeding marine bivalves: unifying principles. **Mar. Biol.** 129: 389-397.
- Brandt, R.A.M. 1974. The Non-Marine Aquatic Mollusca of Thailand. **Arch. Molluskenkunde** 105 (104): 1-423.
- Brusca, R.C. and J.G. Brusca. 1990. **Invertebrates**. Sinauer Associates, Massachusetts.
- Byrne, M., H. Phelps, T. Church and V. Adair. 2000. Reproduction and development of *Corbicula australis* in southeast Australia. **Hydrobiologia** 418: 185-197.
- Cáceres-Marténez, J., J.A.F. Robeldo and A. Figue. 1995. Presence of *Bonamia* and its relation to age, growth rate and gonadal development of the flat oyster, *Ostrea edulis*, in the Ría de Vigo, Galicia (NW Spain). **Aquaculture** 130: 15-23.
- Cannuel, R. and P.G. Beninger. 2006. Gill development, functional and evolutionary implications in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Bivalva: Ostreidae). **Mar. Biol.** (in press).
- Chaparro, O.R., J.A Videla, and R.J. Thompson. 2001. Gill morphogenesis in the oyster *Ostrea chilensis*. **Mar. Biol.** 138: 199-207.
- _____, R.J. Thompson and J.E. Ward. 1993. *In vivo* observation of larval brooding in the Chilean oyster, *Ostrea chilensis* Philippi, 1845. **Biol. Bull.** 185: 365-372.
- Chevalier, F., R. Lucas, J. Angulo, M. Martin-Lomas and P.M. Nieto. 2004. The heparin-Ca²⁺ interaction: the influence of O-sulfation pattern on binding. **Carbohydrate Res.** 339: 975-983.

- Coe, W.R. and H.J. Turner, Jr. 1938. Development of the gonad and gametes in the soft-shell clam (*Mya arenarea*). **J. Morph.** 62: 91-111.
- Conn, D.B. 2000. **Atlas of Invertebrate Reproduction and Development**. 2nd ed. John Wiley and Sons, Inc., USA.
- Daniels, E.W., A.C. Longwell, J.M. McNiff and R.W. Wolfgang. 1973. Ultrastructure of oocytes from the American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. **Trans Am. Microsc. Soc.** 92: 337-349.
- de Jong-Brink, M., H.H. Boer and J. Joosse. 1983. Mollusca, pp. 297-355. In D.G. Adiyoidi and R.G. Aoiyoidi, eds. **Oogenesis, Oviposition, and Oosorption**. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- _____, _____, T.G. Hommes and A. Kodde. 1977. Spermatogenesis and the role of Sertoli cells in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*. **Cell Tissue Res.** 181: 37-58.
- Delgado, M. and A.J. Camacho. 2005. Histological study of the gonadal development of *Ruditapes decussates* (L.) (Mollusca: Bivalvia) and its relationship with available food. **Scientia Marina.** 69 (1): 87-97.
- Dorange, G. and M. Le Pennec. 1989a. Ultrastructural characteristics of spermatogenesis in *Pecten maximus* (Mollusca: Bivalvia). **Invert. Reprod. Dev.** 15: 109-117.
- _____ and _____. 1989b. Ultrastructural study of oogenesis and oocytic degeneration in *Pecten maximus* from the Bay of St. Brieuc. **Mar. Biol.** 103: 339-348.
- Dufour, S.C. 2005. Gill anatomy and the evolution of symbiosis in the bivalve family Thyasidae. **Biol. Bull.** 208: 200-212.

_____, and P.G. Beninger. 2001. A functional interpretation of cilia and mucocyte distributions on the abfrontal surface of bivalve gills. **Mar. Biol.** 138: 295-309.

Duplessis, M.R., S.C. Dufour, L.E. Blankenship, H. Felbeck and A.A. Yayanos. 2004. Anatomical and experimental evidence for particle feeding in *Lucinoma aequizonata* and *Parvilucina tenuisculpta* (Bivalvia: Lucinidae) from the Santa Barbara Basin. **Mar. Biol.** 145: 551-561.

Fahmy, O.G. 1949. Oogenesis in the desert snail *Eremina desertorum* with special reference to vitellogenesis. **Quart. J. Microscop. Sci.** 90: 159-181.

Fawcett, D.W. 1961. Intercellular bridges. **Exp. Cell Res. Suppl.** 8: 174-187.

Fiala-Médioni, A. and C. Métivier. 1986. Ultrastructure of the gill of the hydrothermal bivalve *Calyplogena magnifica*, with a discussion of its nutrition. **Mar. Biol.** 90: 215-222.

Franzén, Å. 1987. Ultrastructural studies of spermatozoa in three bivalve species with notes on evolution of elongated sperm nucleus in primitive spermatozoa. **Gamete Res.** 7: 199-214.

Fukuhara, S. and Y. Nagata. 1988. Frequency of the incubation of *Anodonta woodiana* in small pond. **Venus** 47(4): 271-277.

Gainey Jr, L.F., J.C. Walton and M.J. Greenberg. 2003. Branchial musculature of a venerid clam: pharmacology, distribution, and innervation. **Biol. Bull.** 204: 81-95.

Gardiner, D.B., H. Silverman, and T.H. Dietz. 1991. Musculature associated with the water canals in freshwater mussels and response to monoamines *in vitro*. **Biol. Bull.** 180: 453-465.

- Gillard, R.R.L. and J.H. Ryther. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. I *Cyclotella nana* Hustedt and *Detonula confervacea* (Cleve) Gran. **Can. J. Microbiol.** 8: 229-239.
- Gómez-Mendikute, A., M.Elizondo, P. Veneir and M.P. Cajarville. 2005. Characterization of mussel gill cells *in vivo* and *in vitro*. **Cell Tissue Res.** 321: 131-140.
- Graf, D.L. and D.O. Foighil. 2000. The evolution of brooding characters among the freshwater pearly mussels (Bivalvia: Unionidea) of North America. **J. Moll. Stud.** 66: 157-170.
- Harrison, F.W. and A.J. Kohn. 1997. **Microscopic Anatomy of Invertebrates Vol 6A Mollusca II.** Wiley-Liss, Inc., New York.
- Heard, W.H. 1975. Sexuality and other aspects of reproductive in *Anodonta* (Pelecypoda: Unionidae). **Malacologia** 15 (1): 81-103.
- Henley, W.F. 2002. **Evaluation of Diet, Gametogenesis and Hermaphroditism in Freshwater Mussels (Bivalvia: Unionidae).** Ph.D. Thesis, Virginia Polytechnic Institute and State University.
- Hodgson, A.N. and R.T.F. Bernard. 1986. Ultrastructure of the sperm and spermatogenesis of three species of Mytilidae (Mollusca, Bivalvia). **Gamete Res.** 15: 123-135.
- Hoshaw, R.W. and J.R. Rosowski. 1973. Method for microscopic algae. In Stein J.R., ed. 1973. **Handbook of Phycological Methods, Culture Methods and Growth Measurements.** The University Press, USA.
- Hovingh, P. and A. Linker. 1993. Glycosaminoglycans in *Anodonta californiensis*, a freshwater mussel. **Biol. Bull.** 185: 263-276.

- Hudson, R.D. and B.G. Isom. 1984. Rearing juveniles of the freshwater mussels (Unionidae) in a laboratory setting. **The Nautilus** 94 (4): 129-135.
- Isom, B.G. and R.G. Hudson. 1982. *In vitro* culture of parasite freshwater mussel glochidia. **The Nautilus** 96(4) : 147-151.
- _____ and _____. 1984a. Freshwater mussel and their fish hosts; physiological aspects. **J. Parasitol.** 70(2): 318-318.
- _____ and _____. 1984b. **Culture of freshwater mussel glochidia in an artificial habitat utilizing complex liquid growth media.** U.S. Patent 4.
- Jones, H.A., R.D. Simpson and C.L. Humphrey. 1986. The reproductive cycles and glochidia of fresh-water mussel (Bivalvia: Hyriidae) of the Macleay River, Northern New South Wales, Australia. **Malacologia** 27(1): 185-202.
- Jessop, N.M. 1995. **Zoology: The Animal Kingdom.** 2nd ed. Mc Graw-Hill, Inc., USA.
- Juhel, G., S.C. Culloty, R.M. O’Riordan, J. O’Connor, L. de Faoite and R. McNamara. 2003. A histological study of the gametogenic cycle of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771) in Lough Dreg, Ireland. **J. Moll. Stud.** 69: 365-373.
- Jupiter, S.D. and M. Byrne. 1997. Light and electron microscopy of the embryos and glochidia of the Australian freshwater bivalve *Hyridella depressa* (Hyriidae). **Invert. Reprod. Dev.** 32 (2): 177-186.
- Keller, A.E. and S.G. Zam. 1990. Simplification of *in vitro* culture techniques for freshwater Mussels. **Environ. Toxicol. Chem.** 9 :1291-1296.

- Kondo, T. 1987. Breeding seasons of seven species of unionid mussels (Bivalvia: Unionidae) in a small creek. **Venus** 46(4): 227-236.
- Korniushin, A.V. and M. Glaubrecht. 2003. Novel reproductive modes in freshwater clams: brooding and larval morphology in Southeast Asian taxa of *Corbicula* (Mollusca, Bivalvia, Corbiculidae). **Acta Zoologica** 84: 293-315.
- Kovitvadhi, S., U. Kovitvadhi, P. Polwong and N. Kuchwattana. 2003. Development of rearing Method for glochidia and juvenile of freshwater mussel, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856). **The 4th Kasetsart University Annual Conference**, Bangkok. pp. 195-202.
- _____, _____, and P. Sawangwong. 2006. Optimization of diet and culturing environment for larvae and juvenile freshwater pearl mussels, *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* Lea, 1856. **Aquaculture** (in accepted).
- _____, _____, P. Sawangwong, A. Thongpan and J. Machado. 2002. Culturing Glochidia of Freshwater Mussels in Artificial Medium and Rearing Juveniles with Selected Phytoplankton Feed. **Proceedings of the 6th BRT Annual Conference, Nakon Si Thammarat**. pp. 252-259.
- Kovitvadhi, U., K. Chatchavalvanich, N. Nopparatnaraporn and J. Machado. 2001a. Scanning electron microscopy of glochidia and juveniles of the freshwater mussel, *Hyriopsis myersiana*. **Invert. Reprod. Dev.** 40 (2-3): 143-151.
- _____, N. Nopparatnaraporn and J. Machado. 2001b. Culture of glochidia of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856) in artificial media. **Aquaculture** 195: 61-69.

- _____, P. Pakkong and N. Noparatnaraporn. 2003. Study of fish specificity for the infestation with glochidia *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856). **Invert. Reprod. Dev.** 44(1-3): 53-61.
- Kwon, O.K., G.M. Park, J.S. Lee and H.B. Song. 1993. Scanning electron microscope studies of the minute shell structure of glochidia of three species of unionidae (Bivalvia) from Korea. **Malacol. Rev.** 26: 63-70.
- Le Penneec, M., P.G. Beninger, G. Dorage and Y.M. Paulet. 1991. Trophic sources and path to the developing gametes of *Pecten maximus* (Bivalvia: Pectinidae). **J. Mar. Biol. Assoc. U.K.** 1: 451-463.
- Lima, P., U. Kovitvadhi, S. Kovitvadhi and J. Machado. 2006. *In vitro* culture of glochidia from the freshwater mussel *Anodonta cygnea*. **Invert. biol.** 125 (1): 34-44.
- Lodeiros, C.J. and J.H. Himmelman. 1999. Reproductive cycle of the bivalve *Lima scabra* (Pterioida: Limidae) and its association with environmental conditions. **Reproductive cycle of the bivalve *Lima scabra* (Pterioida: Limidae) and its association with environmental conditions.** Available source: <http://www.ots.duke.edu/tropibiojnl/claris/47-2/lodeios.html>, April 21, 2003.
- Longo, F.J. and E.J. Dornfeld. 1967. The fine structure of spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis*. **J. Ultrastruc. Res.** 20: 462-480.
- Loosanoff, V.L. 1962. Gametogenesis and spawning of the European oyster, *Ostrea edulis* in water of Maine. **Biol. Bull.** 122: 86-95.
- _____. 1965. Gonad development and discharge of spawn in oysters of Long Island Sound. **Biol. Bull.** 129: 546-561.

- Lubet, P., L. Albertini and I. Robin. 1986. Recherches experimentales au cours de cycles annuels sur l' action gonadotrop exercee par les ganglions cerebroides sur la gametogenese femelle chez la moule *Mytilus edulis* L. (Mollusque, bivalve). **C.R. Hebd. Seanc. Paris** 303: 575-580.
- Luna, L.G. 1968. **Manual of Histological Staining Methods of the Armed Forces Institute of Pathology**. 3rd ed. Mc. Graw-Hill, Inc., New York.
- Matos, E., L. Corral and C. Azevedo. 1998. Fine structure of spermiogenesis with special reference to the spermatid morulae of the freshwater mussel *Prisodon alatus* (Bivalvia, Unionoidea). **J. Morph.** 238: 63-70.
- McMahon, R.F. and A.E. Bogan. 2001. Molluscan: Bivalvia, pp. 331-429. *In* Thorp, J.H. and A.P. Covich, eds. **Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates**. 2nd ed. Academic Press, USA.
- Miller, S.A., and J.R. Harley. 1994. **Zoology**. 2nd ed. Wm. C. Brown Communication, Inc., USA.
- Morriconi, E., B.J. Lomovasky, J. Calvo and T. Brey. 2002. The reproductive cycle of *Eurhomalea exalbida* (Chemnitz, 1795) (Bivalvia: Veneridae) in Ushuaia Bay (50°50' S), Beagle Channel (Argentina). **Invert. Reprod. Dev.** 42: 61-68.
- Morse, M.P. and J.D. Zardus. 1997. Bivalvia, pp. 7-118. *In* F.W. Harrison and A.J. Kohn, eds. **Microscopic Anatomy of Invertebrates Volumn 6A: Mollusca II**. John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Morton, B. 1985. The reproductive strategy of the mangrove bivalve *Polymesoda (Geloina) erosa* (Bivalvia: Corbiculoidea) in Hong Kong. **Malac. Rev.** 18: 83-89.

- _____. 1990. The life cycle and sexual strategy of *Gafrarium pectinatum* (Bivalvia: Veneridae) in a Hong Kong mangrove. **Malac. Rev.** 23: 53-62.
- Motavkine, P.A. and A.A. Varaksine. 1983. **Histophysiologie du Systeme Nerveux et Regulation de le Reproduction chez les Mollusques Bivalves.** Nauka, Moscow.
- Nagachinta, A. and O. Meejui. 1998. Reproductive biology of Thai freshwater pearl mussel *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana* (Lea, 1856). **Phuket Marine Biological Center Special Publication** 18 (1): 103-106.
- Neumann, D. and Kappes, H. 2003. On the growth of bivalve initiated from a lobule-producing budding zone. **Biol. Bull.** 205: 73-82.
- Ortmann, A.E. 1911. A monograph of the naiades of Pennsylvania: Parts I and II. **Mem. Carnegie Mus.** 4: 279-347.
- Pennak, R.W. 1989. **Fresh-Water Invertebrate of the United States: Protozoa to Mollusca.** 3rd ed. John Wiley and Sons, Inc., USA.
- Pipe, R.K. 1987a. Oogenesis in the marine mussel *Mytilus edulis*: An ultrastructural study. **Mar. Biol.** 95: 405-414.
- _____. 1987b. Ultrastructure and cytochemical study on interactions between nutrient storage cells and gametogenesis in the mussel *Mytilus edulis*. **Mar. Biol.** 96: 519-528.
- Rebhun, L.I. 1962. Electron microscope studies on the vitelline membrane of the surf clam *Spisula solidissima*. **J. Ultrastruc. Res.** 6: 107-122.

- Richard, P.E., T.H. Dietz and H. Silverman. 1991. Structure of the gill during reproduction in the unionids *Anodonta grandis*, *Ligumia subostrata*, and *Carunculina parva texasensis*. **Can. J. Zool.** 69: 1744-1754.
- Rocha, E. and C. Azevedo. 1990. Ultrastructural study of the spermatogenesis of *Anodonta cygnea* L. (Bivalvia, Unionidae). **Invert. Reprod. Dev.** 18: 169-176.
- Ropes, J.W. 1968. Reproductive cycle of the surf clam, *Spisula solidissima*, in offshore New Jersey. **Biol. Bull.** 135: 349-365.
- _____ and A.P. Stickney. 1965. Reproductive cycle of *Mya arenaria* in New England. **Biol. Bull.** 128: 315-327.
- Sado, E.K. 1985. Influence of the anaesthetic quinaldine on some Tilapias. **Aquaculture** 10: 55-62.
- Sastry, A.N. 1979. Pelecypoda (excluding Ostreidae), pp. 113-292. In A.C. Giese and J.S. Pearse, eds. **Reproduction of Marine Invertebrates**. Academic Press, New York.
- Saucedo, P., C. Rodríguez-Jaramillo and M. Monteforte. 2002. Microscopic anatomy of gonadal tissue and specialized storage cells associated with oogenesis and spermatogenesis in the calafia mother-of-pearl oyster, *Pinetada mazatlanica* (Bivalvia: Pteriidae). **J. Shellfish Res.** 21(1): 145-155.
- Schwartz, M.L. and R.V. Dimock, Jr. 2001. Ultrastructural evidence for nutritional exchange between brooding unionid mussels and their glochidia larvae. **Invert. Biol.** 120 (3): 227-236.
- Sheehan, D.C. and B.B. Hrapchak. 1980. **Theory and Practice of Histotechnology**. The C.V. Mosby Co., Toronto.

Silverman, H., W.T. Kays and T.H. Dietz. 1987. Maternal calcium contribution to glochidial shells in freshwater mussels (Eulamellibranchia: Unionidae). **J. Exp. Zool.**

242: 137-146.

Smith, D.G. 1980. Sexual characteristics of *Margaritifera margaritifera* (Linnaeus) populations in Central New England. **The Veliger** 21 (3): 381-383.

_____. 2001. **Pennak's Freshwater Invertebrates of the United States.** 4th ed. John Wiley and Sons, Inc., USA.

Sousa, M., L. Corral and C. Azevedo. 1989. Ultrastructural and cytochemical study of spermiogenesis in *Scrobicularia plana* (Mollusca, Bivalvia). **Gamete Res.** 24: 393-401.

Sprung, M. 1991. Cost of reproduction: A study on metabolic requirements of the gonad and fecundity of the bivalve *Dreissena polymorpha*. **Malacologia** 33(1-2): 63-70.

Tankersley, R.A. and R.V. Dimock, Jr. 1992. Quantitative analysis of the structure and function of the freshwater mussel *Anodonta cataraeta*. **Biol. Bull.** 182: 145-154.

Tompa, A.S., N.H. Vendonk and J.A.M. van den Biggelaar. 1984. **The Mollusca Vol. 7 Reproduction.** Academic Press Inc., USA.

U.S. Fish & Wildlife Service. 2006. **Biology.** Endangered Mussel Recovery. Available Source: http://www.fws.gov/midwest/Genoa/mussel_recovery.html, April 23, 2006.

Vendonk, N.H., J.A.M. van den Biggelaar and A.S. Tompa. 1983. **The Mollusca Vol. 3 Development.** Academic Press, Inc., New York.

Veniot, A., V.M. Bricelj and P.G. Beninger. 2003. Ontogenetic changes in gill morphology and potential significance for food acquisition in the scallop *Placopecten magellanicus*.

Mar. Biol. 142: 123-131.

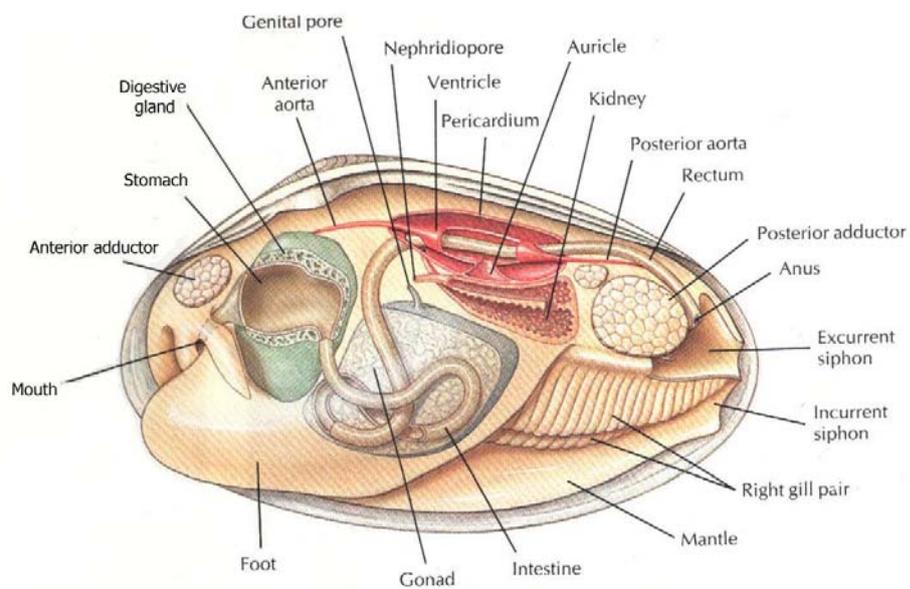
Watters, G.T. 2002. The kinetic conglutinate of the creeper freshwater mussel, *Strophitus undulates* (Say, 1817). **J. Moll. Stud.** 68: 155-158.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
(ภาพประกอบ)

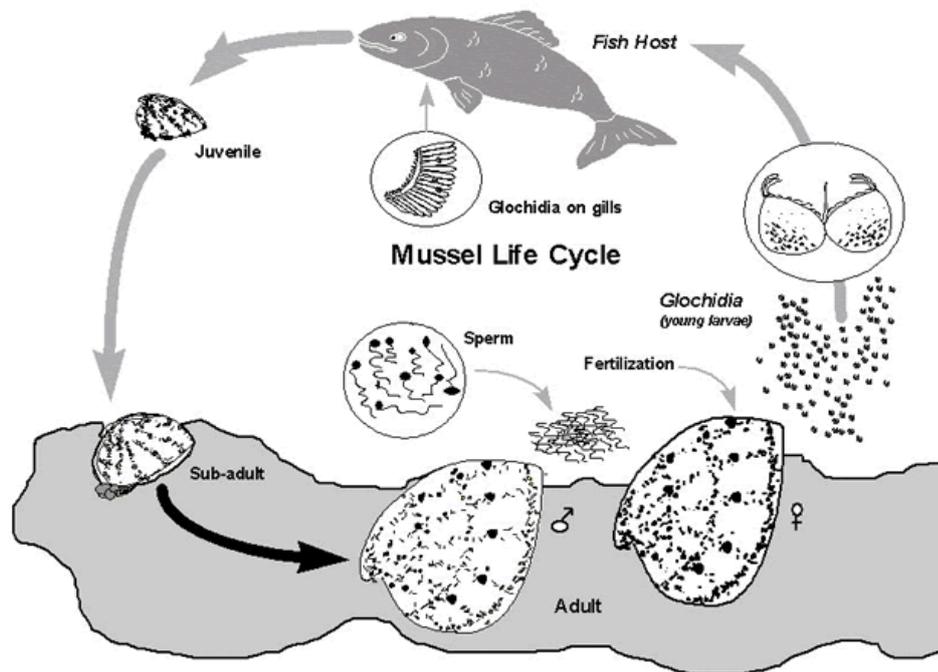


ภาพผนวก ก1 ภาพแสดงลักษณะภายนอกของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) myersiana*



ภาพผนวก ก2 แผนภาพแสดงกายวิภาคของหอยกาบ

ที่มา : Hickman and Roberts (1995)



ภาพผนวก ก3 แผนภาพแสดงวงจรชีวิตของหอยกาบน้ำจืด

ที่มา: U.S. Fish & Wildlife Service (2006)

ภาคผนวก ข
(การเตรียมสารเคมีและวิธีการย้อมสีทางพาราฟินเทคนิค)

การเตรียมสารเคมีและวิธีการย้อมสีทางพาราฟินเทคนิค

1. น้ำยาคงสภาพ 10% Buffered neutral formalin

37-40% formalin	100	ml
Distilled water	900	ml
Sodium phosphate monobasic (NaHPO ₄)	4	g
Sodium phosphate dibasic (Na ₂ HPO ₄)	6.5	g

2. สีย้อม Harris's hematoxylin และ eosin

2.1 Harris's hematoxylin

Hematoxylin crystal	5	g
Absolute ethanol	50	g
Ammonium หรือ Potassium alum	100	g
Mercuric oxide (red)	2.5	g
Distilled water	1000	ml

ต้มน้ำกลั่นในบีกเกอร์ขนาด 1,500 ml ให้เดือด เติม ammonium หรือ potassium alum คนให้ละลาย ละลายผง hematoxylin ใน absolute ethanol ในบีกเกอร์ขนาด 100 ml แล้วเติมลงในสารละลายของ ammonium หรือ potassium alum ที่กำลังเดือด คนให้เข้ากัน ต้มต่อไปอีก 30 วินาที ยกกลงแช่ในน้ำเย็นและเติม mercuric oxide ลงไปอย่างช้าๆ ทีละน้อย ไม่ควรเติมทีเดียวหมด เพราะจะกระเด็นซึ่งอาจเกิดอันตรายได้เนื่องจากเกิดปฏิกิริยารุนแรง คนสารละลายให้เข้ากันจนได้สารละลายสีม่วงน้ำเงินเข้ม ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเทใส่ขวดสีน้ำตาลเก็บไว้ได้นาน 1 สัปดาห์ แต่ถ้ามีความจำเป็นต้องรีบใช้ทันที ก็ใช้ได้เลยหลังจากที่สารละลายเย็นแล้ว สารละลายนี้เก็บไว้ได้นานประมาณ 6 เดือนในที่มืด

การตรวจว่าสารละลายหมดอายุนั้นทำได้โดยหยดสารละลาย 3-5 หยด ในน้ำประมาณ 200 ml ถ้าได้สารละลายสีน้ำตาลแสดงว่าสารละลายหมดอายุแล้วให้ทิ้ง สารละลายที่เก็บไว้ ก่อนใช้

ให้เติม glacial acetic acid 2-4 ml ลงในสารละลาย 100 ml เพื่อช่วยให้ hematoxylin เปลี่ยนเป็น hematein อย่างช้าๆ และทำให้เกิดการติดสีนิวเคลียสดีขึ้น

2.2 Eosin-phloxine solution

2.2.1 Stock eosin

Eosin Y	1	g
Distilled water	100	ml

2.2.2 Stock phloxine

Phloxine B	1	g
Distilled water	100	ml

2.2.3 Working solution

Stock eosin	100	ml
Stock phloxine	10	ml
95% ethanol	780	ml
Glacial acetic acid	4	ml

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

2.3 1% Acid alcohol

70% ethanol	100	ml
Hydrochloric acid	10	ml

2.4 0.2% Ammonium water

Tap water	1000	ml
Ammonium hydroxide 28%	2	ml

3. วิธีการย้อมสี Harris's hematoxylin-Eosin

นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

- 3.1 xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 3.2 absolute, 95% และ 70% ethanol ตามลำดับ ขั้นตอนละ 2 นาที
- 3.3 น้ำกลั่น 2 นาที
- 3.4 Harris's hematoxylin ประมาณ 10 นาที
- 3.5 ล้างในน้ำประปาที่ไหลประมาณ 5 นาที
- 3.6 differentiate ใน 1% acid alcohol โดยจุ่ม (dip) 3 ครั้ง
- 3.7 ล้างในน้ำประปาที่ไหลประมาณ 5 นาที
- 3.8 แช่ใน ammonium water solution 1 นาที
- 3.9 ล้างในน้ำประปาที่ไหลประมาณ 5 นาที
- 3.10 70% ethanol 2 นาที
- 3.11 eosin working solution 30 วินาที
- 3.12 95% และ absolute ethanol ขั้นตอนละ 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
- 3.13 xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 3.14 mount ด้วย permount

ผล: นิวเคลียสย้อมติดสีม่วงน้ำเงิน หรือน้ำเงิน
ไซโทพลาซึมย้อมติดสีชมพูถึงส้มแดง

4. สีย้อม Masson's trichome

4.1 Weigert's iron hematoxylin (ผสมก่อนใช้ในอัตราส่วนเท่ากัน)

4.1.1 สารละลาย A

hematoxylin	1	g
95% ethanol	100	ml

4.1.2 สารละลาย B

Ferric chloride aqueous solution, 30%	4	ml
Distilled water	100	ml
Hydrochloric acid, conc.	1	ml

4.2 Biebrich scarlet-acid fuchsin

1% Biebrich scarlet aqueous solution	180	ml
1% Acid fuchsin aqueous solution	20	ml
Glacial acetic acid	2	ml

4.3 2.5% Phosphomolybdic-phosphotungstic acid

Phosphomolybdic acid	5	g
Phosphotungstic acid	5	g
Distilled water	100	ml

4.4 5% Phosphotungstic acid

Phosphotungstic acid	5	g
Distilled water	100	ml

4.5 Glacial acetic acid, 1%

Glacial acetic acid	1	ml
Distilled water	100	ml

4.6 Aniline blue

Aniline blue	2	g
Glacial acetic acid	2	ml
Distilled water	100	ml

4.7 2% Light green

Light green, SF yellowish	2	g
Distilled water	98	ml
Glacial acetic acid	1	ml

5. วิธีย้อมสี Masson's trichrome

นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

5.1 xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

5.2 absolute, 95% และ 70% ethanol ขึ้นตอนละ 2 นาที

5.3 น้ำกลั่น 2 นาที

5.4 แช่ paraffin section ใน Bouin's solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 56 °C

หรือแช่ข้ามคืนที่อุณหภูมิห้องเพื่อช่วยให้การติดสีดีขึ้น ในกรณีที่คงสภาพด้วยน้ำยาคงสภาพที่มีฟอร์มอลินเป็นองค์ประกอบ

5.5 ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วล้างด้วยน้ำประปาที่เปิดให้ไหลผ่าน จนกระทั่งสีเหลืองของ Bouin's solution จางลง

5.6 ล้างด้วยน้ำกลั่น

5.7 Weigert's iron hematoxylin 10 นาที

5.8 ล้างด้วยน้ำประปาและน้ำกลั่นขึ้นละ 5 นาที

5.9 Biebrich scarlet-acid fuchsin 5 นาที

5.10 ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 นาที

5.11 phosphomolybdic-phosphotungstic acid 10-15 นาที ก่อนย้อม aniline blue
(หรือแช่ใน 5% phosphotungstic acid 15 นาที ก่อนย้อมด้วย light green)

5.12 aniline blue 5 นาที หรือ light green 1 นาที

5.13 glacial acetic acid 1 นาที

5.14 70%, 95% และ absolute ethanol ขึ้นตอนละ 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

5.15 xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

5.16 mount ด้วย permount

ผล: นิวเคลียส ติดสีดำ

collagen fiber ติดสีน้ำเงินเข้มของ aniline blue หรือสีเขียวของ light green

ไซโทพลาซึม, keratin และเซลล์กล้ามเนื้อติดสีแดง

6. สีย้อม PAS-alcian blue สำหรับ mucosubstances pH 2.5

6.1 1% Periodic solution

Periodic acid	1	g
Distilled water	100	g

6.2 Schiff reagent solution

Basic fuchsin	1	g
Distilled water	200	ml
1 N HCl	20	ml
Anhydrous sodium bisulfite or sodium metabisulfite	1	g

ละลาย basic fuchsin 1 กรัม ลงในน้ำกลั่นที่ร้อน ต้มจนเดือด จากนั้นทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิ 50 °C จึงกรองแล้วเติม HCl ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นอีกแล้วจึงเติม anhydrous sodium bisulfite หรือ sodium metabisulfite เก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงจนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลฟางข้าว จึงเปลี่ยนมาเก็บในตู้เย็น

6.3 Alcian blue solution pH 2.5

6.3.1 3% acetic acid solution

Glacial acetic acid	3	ml
Distilled water	97	ml

6.3.2 1% Alcian blue solution

Alcian blue, 8GX	1	g
3% Glacial acetic acid	100	ml

ปรับ pH จนกระทั่งได้ค่าเป็น 2.5 จากนั้นจึงกรองแล้วเติมเกลือ thymol เล็กน้อย

6.4 0.5% Sodium metabisulfite solution

Sodium metabisulfite	0.5	g
Distilled water	100	ml

7. วิธีการย้อมสี PAS-alcian blue pH 2.5

นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

- 7.1 xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 7.2 absolute, 95% ethanol และ 70% ethanol ขั้นตอนละ 2 นาที
- 7.3 น้ำกลั่น 2 นาที
- 7.4 alcian blue solution 30 นาที
- 7.5 ล้างด้วยน้ำกลั่น
- 7.6 ออกซิไดซ์ใน periodic solution 10 นาที
- 7.7 ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 5 นาที
- 7.8 sodium metabisulfite solution 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที
- 7.9 95% และ absolute ethanol ขั้นตอนละ 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที
- 7.10 xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที
- 7.11 mount ด้วย permount

ผล: polysaccharide และ mucosubstance ทุกชนิดที่มีหมู่น้ำตาล hexose หรือ deoxyhexose ที่มีหมู่ vicinal glycol ติดสีม่วงแดง (magenta) ถึงแดง โดย mucosubstance ซึ่งติดสี แดงจะรวมทั้ง neutral mucosubstance hyaluronic acid, sialomucin และ strongly sulfated mucosubstance ติดสีฟ้า

8. วิธีย้อม Alcian blue สำหรับ mucosubstance pH 2.5

8.1 3% Acetic acid solution

Glacial acetic acid	3	ml
Distilled water	97	ml

8.2 1% Alcian blue solution

Alcian blue, 8GX	1	g
Glacial acetic acid, 3%	100	ml

ปรับ pH จนได้ 2.5 กรองแล้วเติมเกลือดีไทมอล

9. วิธีการย้อมสี Alcian blue pH 2.5

นำ paraffin section ผ่านขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

9.1 xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

9.2 absolute, 95% และ 70% ethanol 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

9.3 น้ำกลั่น 2 นาที

9.4 mordant ด้วย 3% acetic acid solution 3 นาที

9.5 alcian blue solution 30 นาที

9.6 ล้างด้วยน้ำประปาไหลผ่าน 10 นาที

9.7 ล้างด้วยน้ำกลั่น

9.8 70% ethanol, 95% ethanol และ absolute ethanol ขึ้นละ 2 นาที

9.9 ปิดสไลด์ด้วย permount

ผล: weakly acidic sulfated mucosubstance, hyaluronic acid และ sialomucin ติดสีน้ำ
เข้ม

10. สีย้อม PAS

10.1 Schiff's reagent

เตรียมเช่นเดียวกับการย้อมแบบ PAS-alcian blue

10.2 Periodic acid

Periodic acid	0.5	g
Distilled water	100	ml

10.3 Sulfurous acid

10% Sodium metabisulfite	6	ml
1 N Hydrochloric acid	5	ml
Distilled water	100	ml

10.4 Harris hematoxylin

ดูจากการย้อมสี Harris's hematoxylin-eosin

11. วิธีการย้อมสี PAS

นำแผ่นเนื้อเยื่อพาราฟินผ่านขั้นตอนการย้อมสีดังนี้

11.1 xylene 2 ครั้งๆ 5 นาที

11.2 absolute, 95%, 70% ethanol และน้ำกลั่น ขั้นตอนละ 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

11.3 ออกซิไดซ์ใน 0.5%-1% aqueous periodic acid 5 นาที

11.4 น้ำกลั่น 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที

11.5 Schiff's reagent 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

11.6 น้ำประปา 10 นาทีหรือ Sulfurous acid 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที และล้างน้ำประปาอีก 5 นาที

11.7 Harris's hematoxylin 30-60 วินาทีและล้างน้ำประปาอีก 5 นาที

11.8 70% 2 นาที 95% และ absolute ethanol ขั้นตอนละ 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

11.9 xylene 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที

11.10 ปืดสไลด์ด้วย permount

ผล: นิ่วเคลือบเชื่อมติดสีม่วง

glycogen, glycoprotein, cartilage, colloid, mucin, basement membrane,
chitin, amyloid, reticular fiber, collagen fiber, matrix, fibrin และ cartilage
matrix เชื่อมติดสีม่วงแดง

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นายนพรัตน์ สระแก้ว
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 22 เมษายน 2525
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	ระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์ ปริญญาวิทยาศาสตร บัณฑิตชีววิทยา (สาขาชีววิทยา) เกียรตินิยมอันดับ 1
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานดีเด่นและรางวัลทาง วิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	ทุนโครงการ พสวท.