วิจารณ์

1. การศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของระบบประสาท

ระบบประสาทของ *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus* ประกอบด้วย 3 ganglia คือ cerebro-pleural ganglion, pedal ganglion และ visceral ganglion เช่นเดียวกับหอยสองฝาชนิดอื่นๆ โดย cerebro-pleural ganglion อยู่ใกล้ทางด้านล่างของ anterior adductor muscle และจาก cerebro-pleural ganglion จะมีเส้นประสาททอดยาวสองคู่ คู่หนึ่งเชื่อมต่อระหว่าง cerebro-pleural ganglion กับ visceral ganglion ส่วนอีกคู่หนึ่งเชื่อมต่อระหว่าง cerebro-pleural ganglion กับ pedal ganglionใน *H.*(*H.*) *bialatus* ส่วนของ pedal ganglion จะฝังตัวอยู่บริเวณอวัยวะสืบพันธุ์ใกล้กับ digestive gland ซึ่งมีตำแหน่งการฝังตัวของ ganglion สูงกว่าในหอยสองฝาชนิดอื่นที่ฝังตัวอยู่ที่ foot หรือ ใกล้ foot (Miller and Harley,1994; Anderson, 2001) เช่น *Musculium* sp. (Smith ,2001) สำหรับ ganglion ของหอยสองฝามักเป็นสีค่อนข้างเหลืองหรือสีส้มสด (White, 1937; Stefano and Aiello, 1975) เช่น Geoduck clam (*Panopea abrupta*) และ Blue mussel (*Mytilus edulus*) ส่วน *H.* (*H.*) *bialatus* มีสีค่อนข้างเหลือง สำหรับระบบประสาทของหอยฝาเดียว (gastropod) ประกอบด้วย ganglia ที่แน่ชัด เป็น cental nervous system (CNS) หรือ อาจเรียก central ganglia (Croll et al., 2001) โดยทั่วไปประกอบไปด้วยหลายๆ ganglia ได้แก่ buccal ganglion, cerebral ganglion, pedal ganglion, pleural ganglion, parietal ganglion และ visceral ganglion แต่ใน *Haliotis asinina* จะมี ganglia หลักอยู่ 3 ganglia ได้แก่ cerebral ganglion, pleuro-pedal ganglion และ visceral ganglion (Panasophonkun, 2006)

2. การศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของเหงือก

จากการศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของเหงือก *H.* (*H.*) *bialatus* พบว่าเป็นแบบ eulamellibranch เช่นเดียวกับหอยสองฝาน้ำจืดในวงศ์ Unionidae โดยใช้เหงือกทำหน้าที่กรองอาหาร แลกเปลี่ยนก๊าซ และเป็นถุงเลี้ยงตัวอ่อนเช่นเดียวกับ *Hyriopsis* (*Limnoscapha*) *myersiana* (นพรัตน์, 2549) เหงือกของ *H.* (*H.*) *bialatus* มีความยาวเกือบเท่าความยาวของลำตัว และมีขนาดใหญ่ โดยมีด้านซ้ายและด้านขวาของลำตัวหอยประกอบด้วย gill filament เกิดเป็นรูปร่างคล้ายอักษร “w” เช่นเดียวกับหอยสองฝาน้ำจืดและน้ำเค็ม (Anderson, 2001; Pechenik, 2005; Hickman *et al.,* 2006) gill filament มีการเชื่อมติดต่อกันด้วย interfilamental ciliary junction

และ interfilamental tissue junction ทำให้เกิดเป็นช่อง water canal ได้แก่ หอยสองฝาน้ำจืด *Ligumia subrostrata*, *Anodonta grandi*s, *Dreissena polymorpha* และ *Anodonta cataracta* เป็นต้น (Kay *et al*., 1990; Gardiner et al., 1991; Baker, 2000; Tankersley and Dimock, Jr, 1992) และปากทางของช่องที่เปิดสู่ช่องแมนเทิล เรียกว่า ostium แผ่นเหงือกแต่ละด้านประกอบด้วย outer demibranch และ inner demibranch เหงือกแต่ละแผ่นประกอบด้วย gill filament ที่มีลักษณะบางและยาว มีซิเลีย 3 ชนิด นอกจากนี้ยังมี interlamellar septum ทำให้เกิดการแบ่งเหงือกออกเป็น water tube นอกจากนี้ยังประกอบด้วย suprabranchial chamber และ calcified chitinous rod เมื่อดูลักษณะโครงสร้างทางจุลกายวิภาคของเหงือกพบว่า *H.* (*H.*) *bialatus* มีลักษณะโดยทั่วไปคล้ายคลึงกับ *H*.(*L.*) *myersiana* และหอยสองฝาน้ำจืดในกลุ่ม eulamellibranch (นพรัตน์, 2549; Pechenik, 2005) แต่ secondary water tube ใน *H.* (*H.*) *bialatus* จะพบมีการสืบพันธุ์ตลอดทั้งปี ในขณะที่ *H*.(*L.*) *myersiana* จะพบเฉพาะช่วงระยะเวลาสืบพันธุ์ ซึ่งหลังจากที่โกลคิเดียถูกปล่อยออกจาก marsupia แล้ว ส่วนของ secondary water tube จะหายไป เหลือแต่ primary water tube (นพรัตน์, 2549; Ortmann, 1911) outer demibranch ของ *H.* (*H.*) *bialatus* จะทำหน้าที่เป็นถุงเลี้ยงตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย โดยจะบวมพองขึ้นเริ่มตั้งแต่สีขาว, สีเหลืองอ่อน, สีเหลือง, สีน้ำตาลอ่อน จนกระทั่งเป็นสีน้ำตาลหรือสีน้ำตาลอมแดงซึ่งเป็นระยะโกลคิเดียแก่เต็มที่ (ธวัชชัยและคณะ, 2546) ซึ่งคล้ายกับ *Anadonta cataracta, Chamberlainia hainesiana* และ *H.* (*L.*) *myersian*a เป็นต้น (อรภา และคณะ, 2529; เพิ่มศักดิ์, 2540; Kovitvadhi *et al.*, 2001a*;* Tankersley and Dimock, Jr, 1992) ตำแหน่งการเกิด marsupia มีความแตกต่างกันในหอยแต่ละชนิด โดย *H.* (*H.*) *bialatus* จะเกิดเฉพาะ outer demibranch ส่วนหอยสองฝาบางชนิดพบทั้ง outer demibranch และ inner demibranch (tetragenous) เช่น *Hyriopsis* (*L.*) *desowitzi* (อุทัยวรรณ และคณะ, 2541; อรภา, 2543) ซึ่งต่างจากหอยสองฝาน้ำเค็มส่วนใหญ่มีการปฏิสนธิแบบภายนอก และตัวอ่อนมีการดำรงชีวิตแบบแพลงก์ตอนซึ่งเรียกว่า trochophore และ veliger (Tankersley and Dimock, Jr, 1992) ดังนั้นการเพาะฟักตัวอ่อนในเหงือกถือได้ว่าเป็นวิวัฒนาการที่สำคัญของการสืบพันธุ์ของหอยสองฝาน้ำจืด โดยพบในหอยสองฝาน้ำจืดวงศ์ Amblemidae, Unionidae, Margartiferae และ Sphaeridae (สุชาติ และคณะ, 2538; Tompa *et al.*, 1984; Kondo, 1987; Tankersley and Dimock, Jr, 1992)

3. การศึกษาตำแหน่งการสร้างซีโรโทนินในระบบประสาทด้วยวิธี Immunoperoxidase และ Immunofluorescence

จากการศึกษาตำแหน่งการสร้างซีโรโทนินในระบบประสาทของ *H.* (*H.*) *bialatus* ด้วยวิธี Immunoperoxidase พบว่า cerebro-pleural ganglion, pedal ganglion และ visceral ganglion ของเพศผู้และเพศเมีย มีการติดสีของซีโรโทนินในทั้งสาม ganglia คือเซลล์ประสาทบริเวณขอบของ ganglia และเส้นใยประสาทบางส่วน และเนื่องจากการศึกษาตำแหน่งของซีโรโทนินใน visceral ganglion ด้วยวิธี Immunoperoxidase พบว่ามีปริมาณของซีโรโทนินมากกว่า cerebro-pleural ganglion และ pedal ganglion ดังนั้นการศึกษาด้วยวิธี Immunofluorescence จะศึกษาเฉพาะ visceral ganglion พบว่ามีการติดทั้งที่เซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท โดยจะเห็นเส้นใยประสาทเด่นชัดกว่า ซึ่งผลการศึกษาทั้งสองวิธีสอดคล้องกับรายงานการศึกษาที่พบว่าซีโรโทนินส่วนใหญ่พบที่บริเวณขอบของ ganglia เช่น การศึกษาด้วย Immunofluorescence ของหอยสองฝาน้ำเค็ม *Venus verrucosa* มีการเรืองแสงของเซลล์ประสาทอยู่ที่ขอบของ visceral ganglion (Siniscalchi *et al*., 2004) และรวมถึงใน CNS ของ *Tritonia diomedea* มีการเรืองแสงของซีโรโทนินที่ขอบของ cerebral ganglion เช่นกัน (Fickbohm *et al*., 2001) นอกจากนี้ในหอยฝาเดียว donkey 's ear abalone (*Haliotis asinina*) ที่ศึกษาด้วย Immunoperoxidase พบการติดสีอยู่ที่ขอบของ cerebral ganglion, pleuropedal ganglion และ visceral ganglion (Panasophonkul, 2006) เช่นเดียวกับ apple snail (*Pomacea canaliculata*) มีการติดสีใน pars intercerebralis และที่ขอบของcerebral ganglion และ pedal ganglion ด้วยเช่นกัน (Fujii and Takeda, 1988) แต่ในหอยฝาเดียว (slug*) Limax marginatus* พบว่ามีการติดของซีโรโทนิน บริเวณส่วนกลางของ cerebral ganglia , visceral ganglia, right parietal ganglia และ pedal ganglia นอกจากนี้ยังพบว่า *H.* (*H.*) *bialatus* มีการส่งกระแสประสาทจาก visceral ganglion ไปยัง branchial nerve ของทั้งสองเพศ และมีรายงานสนับสนุนว่าหอยสองฝาน้ำเค็ม Blue mussel, *Mytilus edulis* ในส่วนของ visceral ganglion จะมีใยประสาทไปที่ branchial nerve ของเหงือก (Stefano and Aiello, 1975) จากข้อมูลดังกล่าวอาจเชื่อมโยงไปถึงความสัมพันธ์ระหว่าง visceral ganglion กับเหงือกซึ่งน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการปล่อยตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย

4. การย้อมด้วยสีพิเศษ ย้อมโดย Gomori's aldehyde - fuchsin staining (PAF)

ผลจากการศึกษาพบว่าเซลล์ประสาทที่ย้อมติดสีด้วยวิธี Immunoperoxidase เมื่อนำมาย้อมต่อด้วย Gomori's paraldehyde-fuchsin staining พบว่ากลุ่มเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลเป็น neurosecretory cell ทั้งสามปมประสาททั้งในเพศผู้และเพศมีย โดยมีการติดสีน้ำเงินม่วงที่ไซโตพลาสซึม โดยเป็นที่ทราบว่า neurosecretory cell คือ เซลล์ประสาทที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ในการสร้าง hormones ที่เรียกว่า neurohormone สำหรับการสังเคราะห์ neurohormone เกิดเช่นเดียวกับการสร้างโปรตีนอื่นๆ โดยผ่าน rough endoplasmic reticulum (RER) และ golgi complex จะอยู่ในรูปของถุงที่ภายในบรรจุสารที่เรียกว่า neurosecretory granules (NSG) (Maddrell and Nordmann , 1979; Brown, 1991; Reunova et al., 1997) neurohormone เป็นระบบสื่อสารภายในร่างกายทำหน้าที่ควบคุมเชื่อมโยงติดต่อประสานกับการทำงานของระบบต่างๆ ภายในร่างกาย มีลักษณะการทำงานที่ค่อนข้างช้าแต่มีผลการทำงานนาน ซึ่ง hormones เหล่านี้จะถูกนำไปสู่อวัยวะต่างๆ ทั่วร่างกายโดยอาศัยระบบไหลเวียนของเลือด (เลียงชัย และคณะ, 2525; Brown,1991; Reunova *et al*., 1997) สำหรับในหอยสองฝาน้ำเค็ม *Crenomytilus grayanus* Dunker (far east giant mussels) มีการศึกษาพบว่า neurosecretory cells บางเซลล์มีการสะสมของ lipids และ neurosecretory cells อื่นๆ จะมีการสะสมคาร์โบไฮเดรตพวก polysaccharides (Reunova *et al*., 1997) ยิ่งไปกว่านั้นใน snails มีรายงานว่า neurosecretory cells สร้าง neurohormone ประเภท growth hormones (Hickman *et al.*, 2006) จากการย้อมเฉพาะด้วย PAF อย่างเดียวโดยไม่ผ่านการย้อมด้วยวิธี Immunoperoxidase จะพบว่าเซลล์ประสาทส่วนใหญ่ของ *H.* (*H.*) *bialatus* ติดสีน้ำเงินม่วงที่ไซโตพลาสซึม มีเพียงส่วนน้อยที่ไม่ติด แสดงว่าเซลล์ประสาทส่วนใหญ่เป็นเซลล์ประสาทที่อาจจะทำหน้าที่ได้ทั้งที่เป็น neurotransmitter และ neurosecretory cells ในเซลล์ ๆ เดียวกัน ซึ่งจากการสังเกตเมื่อเปรียบเทียบการย้อมกับ brain และ ganglion ของ *Portunus pelagicus* (blue swimming crab) พบว่า neuron ของ brain มีการติดสีของ PAF เป็นบางกลุ่ม โดยติดที่กลุ่มเซลล์ที่อยู่ทางด้านนอกและด้านใน แต่มีน้อยมาก โดยที่ neuron ส่วนใหญ่ไม่ติดและ neuron ใน ganglion ของ crab ไม่มีการติดสีของ PAF เลย แต่ติดที่ gial cell เมื่อพิจารณาการจัดจำแนกของเซลล์ประสาท เช่น หอย abalone (*H. asinina*) มีการแยกกันของเซลล์ประสาทและ neurosecretory cells โดยการจัดจำแนก (classificaion of ganglion cells) ใน *H. asinina* สามารถแยกแบบของเซลล์ประสาท ได้ ดังนี้ คือ neuron 4 แบบ และ neurosecretory cells 3 แบบ (Laimek, 2000) ซึ้งให้ผลคล้ายคลึงกันกับ crab (*P. pelagicus*) สำหรับใน *H.* (*H.*) *bialatus* อาจจะยังไม่เหมาะสมที่จะจัดจำแนกในครั้งนี้ เนื่องจากมีความแตกต่างจาก crab และ abalone อยู่หลายประการ คือ ในด้านของหน้าที่ของ neuron ใน

H. (*H.*) *bialatus* อาจจะทำหน้าที่ได้ 2 แบบ ได้แก่ ทำหน้าที่สร้าง neurotransmitter และ neurohormone ในขณะที่ crab และ abalone อาจจะทำหน้าที่แยกกันอย่างชัดเจน โดย neuron ทำหน้าที่สร้าง neurotransmitter หรือ neurosecretory cells อย่างใดอย่างหนึ่ง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกันใน *P. pelagicus* และ *H. asinina* จะพบว่า *P. pelagicus* มีการแยกกลุ่มของ neuron และ neurosecretory cells ค่อนข้างที่จะชัดเจนกว่า นอกจากนี้เมื่อดูในแง่ของเส้นใยโครมาติน ซึ่งมี 2 ชนิด คือ heterochromatin และ euchromatin พบว่าใน *H.* (*H.*) *bialatus* จะมีการอัดแน่น (pack) ของเส้นใยโครมาตินมากกว่า *H. asinina* เมื่อดูด้วย H&E และ อีกประการหนึ่ง คือ ความแตกต่างของลำดับวิวัฒนาการ โดย abalone อยู่ใน Class Gastropoda แต่ *H.* (*H.*) *bialatus* อยู่ใน Class Bivalvia จากที่กล่าวมาทำให้ไม่จัดจำแนกแบบของเซลล์ประสาท

5. ผลของซีโรโทนินต่อการเกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ใน *H.* (*H.*) *bialatus* เพศเมีย

เป็นที่ทราบว่าวงชีวิตของหอยสองฝาน้ำจืดส่วนใหญ่เซลล์ไข่จะต้องรอการผสมจากอสุจิที่บริเวณ outer demibranch หรือทั้ง outer demibranch และ inner demibranch ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของหอย เช่น *H. myersiana*, *H. bialatus* และ *C. hainesiana* จะเก็บไว้ที่ outer demibranch ส่วน *H. desowitsi* จะเก็บทั้ง outer และ inner demibranch โดยการปฏิสนธิจะเกิดภายในบริเวณท่อน้ำของเหงือกและจะพัฒนาไปเป็นโกลคิเดียต่อไป (อุทัยวรรณ และคณะ, 2541; ธวัชชัย และคณะ, 2546; Smith,2001; Wisconsin , 2003) แต่ในหอยสองฝาน้ำจืดบางชนิดและหอยสองฝาน้ำเค็มส่วนใหญ่การปฏิสนธิจะเกิดขึ้นภายนอก (external fertilization) โดยไข่จะถูกปล่อยออกมาภายนอก เช่น ในหอย surf clam (*Spisula solidissima*) (Hirai *et al.*, 1988) จากการศึกษาความเข้มข้นของซีโรโทนินใน *H.* (*H.*) *bialatus* เพศเมีย พบว่าความเข้มข้นของซีโรโทนินที่มีผลต่อการเกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawning) ที่ดีสุด คือ 10^{-3}M ซึ่งมีผลทำให้ไข่พัฒนาไปเป็นโกลคิเดียระยะเวลาเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 15.0 ± 4.30 วัน เมื่อเทียบกับ 18.6±8.9 วัน ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีดฮอร์โมน แสดงให้เห็นว่าซีโรโทนินมีผลต่อการเกิดการพัฒนาของรังไข่ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับรายงานที่สนับสนุนว่าซีโรโทนินมีบทบาทต่อการเกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ใน surf clam (*S. solidissima*) ซึ่งพบว่าใช้ซีโรโทนินที่ความเข้มข้น 2×10^{-3}M ทำให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในเพศเมียอย่างมีประสิทธิภาพ คือ เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ neurotransmitter อื่นๆ ไม่กระตุ้นการเกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (Hirai *et al.*, 1988) ใน Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) ซีโรโทนินที่ความเข้มข้น

10^{-3}M และ 10^{-4}M มีผลทำให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในเพศผู้ดีกว่าในเพศเมีย (Ram *et al*., 1993) ส่วนหอยสองฝาน้ำเค็ม window-pane shell, *Placuna placenta* ที่ความเข้มข้น 2 x 10^{-3}M ทำให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์จำนวนมากถึง 1.57x10^{6} ตัว (Madrones-Ladja, 1997) ในหอย giant clams สกุล *Tridacna* sp.) ซีโรโทนินก็สามารถทำให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ทั้งเพศผู้และเพศเมีย โดยใช้ความเข้มข้นที่ 2 x 10^{-3}M (Braley, 1985) และในหอยสองฝาน้ำเค็ม *Mactra chinensis* ฮอร์โมนนี้เหนี่ยวนำให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ได้ 90-100 เปอร์เซ็นต์ ที่ความเข้มข้น 2 x 10^{-6}M – 2 x 10^{-3}M ในส่วนผลการทดลองในหอย *H.* (*H.*) *bialatus* ที่เราทำการศึกษานี้เปอร์เซ็นต์ของการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ยังมีค่าที่แปรปรวนค่อนข้างมาก ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องมาจากปัจจัยภายในของพ่อพันธุ์และแม่พันธุ์ของหอยเองที่มีความสมบูรณ์ไม่เท่ากัน โดยที่ sperm จากพ่อพันธุ์ที่สมบูรณ์อาจจะผสมกับเซลล์ไข่ของแม่พันธุ์ที่ไม่ค่อยสมบูรณ์ หรืออาจเกิดจาก sperm จากพ่อพันธุ์ที่ไม่สมบูรณ์ผสมกับเซลล์ไข่ของแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์ หรือ ทั้งสองประการรวมกัน ผลที่ได้คือการเกิด glochidia ที่มีจำนวนไม่เท่ากันในแม่หอยแต่ละตัว การเกิดโกลคิเดียที่สมบูรณ์จะเกิดได้เมื่อพ่อแม่พันธุ์สมบูรณ์ นอกจากที่กล่าวแล้วยังมีปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิและฤดูกาลที่อาจจะมีผลทำให้จำนวนการเกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์และการปล่อยตัวอ่อนระยะโกลคิเดียมีความแตกต่างกันทั้งในแง่ของจำนวนระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนาของไข่ที่ได้รับการปฏิสนธิเป็นโกลคิเดีย อีกทั้งยังขึ้นกับชนิดของหอยและอุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญ (สุชาติ และคณะ, 2538) เช่น ไข่ของหอยมุกน้ำจืด *H.* (*L.*) *myersiana* ใช้เวลา 5-9 วัน (อรภา และคณะ, 2537; อรภา, 2543) *C. hainesiana* และ *H.* (*H.*) *bialatus* ใช้เวลาพัฒนาเป็นโกลคิเดีย 6-10 วัน (อรภา และคณะ, 2537; อรภา, 2543; ธวัชชัย และคณะ, 2546) โดย *H.* (*H.*) *bialatus* มีจำนวนวันที่ใช้ในการพัฒนาจากไซโกตจนกลายเป็นโกลคิเดียเฉลี่ย 7.67± 1.30วัน (ธวัชชัย และคณะ, 2546) ในอุณหภูมิของน้ำที่มีค่าประมาณ 24-25 องศาเซลเซียล ในช่วงเดือนธันวาคมที่อุณหภูมิของน้ำมีค่าค่อนข้างต่ำ ระยะเวลาของการพัฒนาจะยาวนานประมาณ 9-10 วัน แต่ถ้าอุณหภูมิของน้ำเพิ่มสูงขึ้นระยะเวลาของการพัฒนาจะสั้นลง โดยใช้เวลาประมาณ 5-6 วัน (อรภา และคณะ, 2537; อรภา, 2543; Chatchavalvanich et al., 2006) นอกจากนี้ระยะเวลาที่ใช้ในการพัฒนาจากโกลคิเดียเป็นจูวีไนล์ในหอยสองฝาน้ำจืดแต่ละชนิดจะแตกต่างกัน ซึ่งโดยทั่วไปจะใช้เวลาประมาณ 10-20 วัน (สุชาติ และคณะ, 2538) สำหรับในการทดลองนี้เราเชื่อว่าการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์อาจเกี่ยวข้องกับ neurohormone มากกว่าจาก neurotransmitter เนื่องจากใช้วิธีการฉีดเข้าไปกระตุ้นโดยตรงที่ gonad ของหอย โดยสารที่ฉีดจะผ่านเข้าไปในส่วนของระบบไหลเวียนเลือด และมีผลโดยตรงกับ target organ ซึ่งกลไกนี้มีลักษณะคล้ายกันกับการทำงานของ neurosecretory cell คือ เซลล์ประสาทที่เปลี่ยนแปลงไปทำหน้าที่ในการสร้าง hormones ที่เรียกว่า neurohormone (Maddrell and

Nordmann , 1979; Brown,1991; Reunova et al., 1997) อีกเหตุผลหนึ่งที่น่าจะเกี่ยวข้องก็คือ ตำแหน่งของ gonad ใน *H*.(*H.*) *bialatus* และในหอยสองฝาน้ำจืดชนิดอื่นๆจะพบอยู่บริเวณ visceral mass การเกิด spawning ในธรรมชาติน่าจะอาศัยการกระตุ้นจากสารที่เป็น neurohormones เพราะไม่ปรากฏการเชื่อมโยงของเส้นใยประสาทจาก visceral ganglion มายัง acinus ที่จะเป็นทางเชื่อมต่อโดย neurotransmitter (Stefano and Aiello, 1975) และประกอบกับมีรายงานว่าซีโรโทนินทำให้เกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ โดยซีโรโทนินแสดงบทบาทของ neurohormone (Deguchi and Osanai, 1995) ดังนั้นผลจากการย้อมสีที่สามารถพบซีโรโทนินในตัวเซลล์ประสาทและการที่ไม่มีใยประสาทเชื่อมต่อ visceral ganglion กับ gonad บวกกับผลการกระตุ้นของซีโรโทนินโดยวิธีการฉีดจึงอาจจะเป็นไปได้ว่าการเกิดการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ในหอย *H*.(*H.*) *bialatus* น่าจะแสดงถึงการควบคุมระบบสืบพันธุ์ภายใต้อิทธิพลของ neurohormone มากกว่า neurotransmitter

6. ผลของซีโรโทนิน และ fluoxetine (SSRIs) ต่อการเกิดการปล่อยตัวอ่อนใน *H.* (*H.*) *bialatus* เพศเมีย

สิ่งที่น่าสังเกตจากผลการศึกษาด้วย Immunofluorescence และ Immunoperoxidase คือการพบเส้นใยประสาทเชื่อมต่อจาก visceral ganglion มายัง demibranch ทำให้เราคาดการณ์ได้ว่า visceral ganglion กับ demibranch น่าจะมีความสัมพันธ์กันโดยตรง ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการเกิดการปล่อยตัวอ่อนระยะโกลคิเดียใน *H.* (*H.*) *bialatus* เพศเมีย จากการศึกษาฉีดซีโรโทนินเข้าไปในบริเวณ demibranch โดยตรงพบว่าความเข้มข้นของซีโรโทนินต่อการปล่อยตัวอ่อนที่ดีสุด คือ 10^{-3}M ซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการปล่อยของตัวอ่อนได้ภายในระยะเวลา 2.6±2.4 ชั่วโมง โดยหอยแม่พันธุ์สามารถปล่อยตัวอ่อนระยะโกลคิเดียจาก demibranch ได้ทั้งหมด เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองที่ผ่านมาใน *Anodonta cygnia* ซึ่งให้ผลทำนองเดียวกันแต่ใช้ความเข้มข้นแตกต่าง คือ ที่ 10^{-6}M (Cunha and Machado, 2001) สำหรับจำนวนโกลคิเดียที่ถูกปล่อยออกมาที่ความเข้มข้นอื่นๆของซีโรโทนินตั้งแต่ 10^{-4}M ลงมาจนถึงกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ฉีดซีโรโทนินพบว่ามีปริมาณที่ปล่อยจำนวนโกลคิเดียน้อยลงตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากแม่หอยบางตัวปล่อยโกลคิเดียออกมาไม่หมดภายใน 24 ชั่วโมง ที่เป็นเช่นนี้อาจเกิดเนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำกว่า 10^{-3}M ซีโรโทนินมีฤทธิ์ของการกระตุ้นน้อยลงและประกอบกับการปล่อยตัวอ่อนที่เกิดขึ้นจริงในธรรมชาติ แม่หอยจะต้องใช้ระยะเวลาในการปล่อยตัวอ่อนนานเป็นวันๆ จึงส่งผลให้เกิดการปล่อยจำนวนตัวอ่อนระยะโกลคิเดียทีละน้อย ซึ่งไม่เหมาะต่อการเพาะเลี้ยงโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์ (Kovitvadhi *et al.* (2001, 2002, 2003a, 2003b) นอกจากนี้อาจมีปัจจัยอื่นๆ เช่น ความสมบูรณ์ของแม่หอยเอง เป็นต้น

ในการศึกษาของหอย *H.* (*H.*) *bialatus* อีกประเด็นหนึ่งที่น่าสนใจ คือ การให้สารซีโรโทนิน จะใช้วิธีที่แตกต่างจากการศึกษาผลของการปล่อยตัวอ่อนทั่วไปซึ่งส่วนใหญ่ทำโดยใช้วิธีละลาย แต่ในการศึกษานี้เราใช้วิธีการฉีดที่ส่วนของ outer demibranch ซึ่งพบว่าใช้ปริมาณสารน้อยกว่าวิธีละลาย แต่ให้ประสิทธิผลดีเทียบเท่าหรืออาจจะดีกว่าวิธีการละลาย เนื่องจากเป็นการกระตุ้นโดยตรงที่ demibranch ในหอยสองฝาน้ำเค็ม fingernail clam, *Sphaerium transversum* ซีโรโทนินที่ความเข้มข้น 10^{-3}M โดยใช้วิธีละลายสามารถเกิด parturition เช่นเดียวกัน (Fong and Warner, 1995) และแม้แต่หอย *Anodonta cygnea* ก็ใช้วิธีละลายเช่นเดียวกัน (Cunha and Machado, 2001) สำหรับกระบวนการปล่อยตัวอ่อนในธรรมชาติกลไกสำคัญน่าจะเกิดจากการที่มีการเชื่อมโยงกันระหว่าง visceral ganglion และเหงือก ซึ่งจากผลการทดลองของเราได้แสดงให้เห็นถึงการเชื่อมโยงกระแสประสาทจาก visceral ganglion ไปยังเหงือกของ *H*.(*H.*) *bialatus* ดังที่ได้แสดงผลการทดลองมาแล้วข้างต้นในเรื่องของ Immunofluorescence ที่ปรากฏเส้นใยประสาทวิ่งไปที่ demibranch ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Stefano and Aiello (1975) พบว่า visceral ganglion ของหอยสองฝา น้ำเค็ม Blue mussel, *M. edulis* มีการส่งใยประสาทไปตาม branchial nerve และไปที่ demibranch ของ *M. edulis* ดังนั้น visceral ganglion และ branchial nerve ของหอย *H.* (*H.*) *bialatus* จึงน่าจะมีบทบาทโดยตรงต่อการปล่อยตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย

จากการที่เซลล์ประสาทซึ่งเป็นหน่วยโครงสร้างทำหน้าที่ในการนำกระแสประสาท (nerve conduction) โดยเซลล์ประสาทจะประกอบด้วยตัวเซลล์ (cell body) และแขนงที่ออกจากตัวเซลล์ ได้แก่ dendrites และ axon ซึ่งจะมีการส่ง neurotransmitter ที่เป็นสารที่สร้างจากตัวเซลล์ประสาทหรือปลายเซลล์ประสาท และหลั่งจากปลายประสาทเพื่อนำสัญญาณประสาท (neurotransmission) ผ่านไซแนปซ์ หรือช่องว่างระหว่างเซลล์ประสาทกับเซลล์กล้ามเนื้อหรือเซลล์ประสาทกับเซลล์ประสาท (Brown, 1991; Kandel *et al.* 1991; Kandel *et al.,* 2000) จากการศึกษาทำให้ทราบว่า visceral ganglion กับ demibranch มีความสัมพันธ์กันผ่านการเชื่อมต่อโดยเส้นประสาท ซึ่งผลการศึกษาสอดคล้องกับ Stefano and Aiello (1975) รวมทั้งจากการศึกษาของ Kays *et al.* (1990) ที่ได้อธิบายถึง branchial nerves ที่อยู่บริเวณ suprabranchial ซึ่งมีแขนงส่งไปบริเวณ demibranch ด้านล่าง โดย branchial nerves เหล่านี้อาจจะมีอิทธิพลต่อการปล่อยตัวอ่อนในธรรมชาติซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นผลมาจาก neurotransmitter มากกว่า neurohormone แต่สำหรับผลของการกระตุ้นโดยการฉีดสารซีโรโทนินเข้าในตัวหอยอาจจะเป็นผลของ neurohormone เนื่องจากเป็นการกระตุ้น

ผ่านระบบไหลเวียนของเลือด หรือเป็นผลของฮอร์โมนที่กระตุ้นบนตัวรับ (receptor) ที่อยู่บนผิวของ demibranch โดยตรง หรือ อาจจะเป็นผลของการกระตุ้นของ CNS ทางอ้อมให้มีการหลั่ง neurotransmitter ไปยัง demibranch ก็เป็นไปได้เช่นกัน

สำหรับ fluoxetine ที่ใช้ทดลองกับ *H.* (*H.*) *bialatus* พบว่ามีอัตราการปล่อยตัวอ่อนค่อนข้างน้อยโดยให้ผลคล้ายกลุ่มควบคุม แต่ในหอยสองฝาน้ำจืด *Sphaerium striatinum* พบว่าไม่มีการปล่อยตัวอ่อน แต่เมื่อใช้ fluoxetine ร่วมกับซีโรโทนินสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการปล่อยตัวอ่อนได้ (Fong *et al*., 1998) จากผลการศึกษาครั้งนี้นับว่าประสบความสำเร็จระดับหนึ่ง โดยสามารถนำซีโรโทนินไปใช้ในการเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด *H.* (*H.*) *bialatus* โดยมีผลต่อการกระตุ้นให้เกิดการพัฒนาของเซลล์ไข่ที่อยู่ใน acinus และการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (spawning)ได้เร็วขึ้น อีกทั้งกระตุ้นให้เกิดการปล่อยตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย (parturition) ออกจากบริเวณเหงือกได้อย่างมีประสิทธิผลสูง ซึ่งน่าจะมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการพัฒนาขั้นตอนการเก็บตัวอ่อนระยะโกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืดไปเพาะเลี้ยงต่อในอาหารสังเคราะห์ให้มีประสิทธิภาพสูงที่สุด นอกจากนี้วิธีการศึกษาที่ได้จากหอยมุกน้ำจืดชนิดนี้น่าจะสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับหอยสองฝาน้ำจืดชนิดอื่นๆในเชิงพาณิชย์ต่อไป

สรุป

จากการศึกษาโครงสร้างกายวิภาคและจุลกายวิภาคของระบบประสาทของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis* (*Hyriopsis*) *bialatus* พบว่ามี 3 ปมประสาท คือ cerebro-pleural ganglion, pedal ganglion และ visceral ganglion โดยเซลล์ประสาทส่วนใหญ่จะอยู่บริเวณขอบของปมประสาท และ การศึกษาโครงสร้างทางกายวิภาคและจุลกายวิภาคของเหงือกเป็นแบบ eulamellibranch การหาตำแหน่งการสร้างซีโรโทนินในระบบประสาทด้วยวิธี Immunoperoxidase และ Immunofluoresence พบซีโรโทนินอยู่ภายในเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาทของ ganglia ทั้งสามของทั้งสองเพศ โดย visceral ganglion มีซีโรโทนินมากกว่า cerebro-pleural ganglion และ pedal ganglion และยังพบว่าเพศเมียมีซีโรโทนินมากกว่าเพศผู้ จากการศึกษาพบว่ามีการส่งกระแสประสาทจาก visceral ganglion ไปยัง branchial nerve และพบซีโรโทนินที่ outer demibranch มากกว่า inner demibranch ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย จากการตรวจสอบโดยการย้อม Gomori's paraldehyde-fuchsin ทำให้ทราบว่าเซลล์ประสาท ของ *H.* (*H*) *bialatus* อาจจะทำหน้าที่เป็นทั้งเซลล์ประสาท และ neurosecretory cell

ผลของซีโรโทนินต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ พบว่าความเข้มข้น 10^{-3} M สามารถทำให้หอยเพศเมียมีการพัฒนาของตัวอ่อนระยะโกลคิเดียโดยใช้เวลาเฉลี่ยน้อยที่สุด 15.0±4.3 วัน ส่วนผลของความเข้มข้นของซีโรโทนินต่อการปล่อยตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย พบว่าซีโรโทนินที่ความเข้มข้น 10^{-3} M สามารถปล่อยตัวอ่อนออกจาก outer demibranch ได้หมดเฉลี่ยภายใน 2.6 ±2.4 ชั่วโมง และ fluoxetine (selective serotonin reuptake inhibitors) ที่ความเข้มข้น 10^{-3}M ให้ผลค่อนข้างต่ำคล้ายกับกลุ่มควบคุม การศึกษาครั้งนี้ทำให้ทราบความเข้มข้นของซีโรโทนินที่เหมาะสมต่อการปล่อยตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย ซึ่งสามารถเพิ่มผลผลิตและทำให้ง่ายต่อการเพาะเลี้ยงโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์

ข้อเสนอแนะ

1. จากการศึกษาครั้งนี้นอกจากจะทราบความเข้มข้นของซีโรโทนินที่เหมาะสมต่อการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์และตัวอ่อนระยะโกลคิเดีย แต่ต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้องกับการดำรงชีวิต ได้แก่ คุณภาพของน้ำ และอาหาร เป็นต้น ซึ่งส่งผลต่อการเพิ่มผลผลิต เพื่อนำไปสู่การอนุรักษ์ และประโยชน์ในเชิงพาณิชย์

2. จากการศึกษาครั้งนี้อาจจะยังไม่สามารถบ่งชี้ว่าเซลล์ประสาทที่ติดสีของซีโรโทนินเป็นเซลล์ที่ผลิตหรือรับซีโรโทนิน ซึ่งต้องใช้วิธี *in situ* hybridization เพื่อใช้ในการตรวจสอบและยืนยันผลให้ชัดเจนยิ่งขึ้นต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

กาญจนา หาญศิริวัฒนกิจ. **กายวิภาคศาสตร์ทั่วไป**. ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

จรัลธาดา กรรณสูต. 2514. หอยสองฝาน้ำจืดในประเทศไทย, น. 59-138. ใน **รายงานประจำปี 2514 หน่วยงานอนุกรมวิธานสัตว์น้ำจืด.** กองบำรุงพันธุ์สัตว์น้ำ กรมประมง, กรุงเทพมหานคร.

ธวัชชัย จินดามงคล. 2546. **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ในวงสืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____, อุทัยวรรณ โกวิทวที, สาธิต โกวิทวที, อมรา ทองปาน และ กรรณิกา ชัชวาลวานิช. 2546. ระยะเวลาและความถี่ในการพัฒนาตัวอ่อนระยะโกลคิเดียของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900. น. 171-178. ใน **เรื่องเต็มประชุมวิชาการ ครั้งที่ 41 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (สาขาประมง).** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

นพรัตน์ สระแก้ว. 2549. **ศึกษาการพัฒนาอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha)myersiana* (Lea, 1856).** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เพิ่มศักดิ์ ยีมิน. 2540. **ขนาดและรูปร่างของชิ้นแมนเทิลที่ปลูกถ่ายต่อการเกิดไข่มุกในหอยมุกน้ำจืด.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ยุวดี วงษ์กระจ่าง, สุวรรณ ธีระวรพันธ์, วิสุดา สุวิทยาวัฒน์, เพ็ญโฉม พึ่งวิชา และ อรวรรณ เรืองสมบูรณ์. 2532. **ระบบประสาท.** ภาควิชาสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร.

เลียงชัย ลิ้มล้อมวงศ์, ภาวิณี ปิยะจตุรวัฒน์, นทีทิพย์ กฤษณามระ, บัวรอง สรัคคานนท์, วรนุช ฉัตรสุทธิพงษ์, พิพัฒน์ เจิดรังษี, ไถ้ออน ชินณเนศ, วิภา ตั้งกฤษณวินนท์ และ ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว. 2525. **คู่มือประกอบการบรรยายสรีรวิทยา.** ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร.

สาธิต โกวิทวที อุทัยวรรณ โกวิทวที และ ขนิษฐา ใช่เจริญ. 2548. การเลี้ยงหอยสองฝาน้ำจืดระยะจูวีไนล์ *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900 ด้วยระบบปิด Rearing Juveniles of the Freshwater mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900 in Closed Systems. น. 129-139. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่43** (สาขาประมง). มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

สุกัลยา ตันติวิศวรุจิ. **โครงสร้างทางจุลกายวิภาคของระบบย่อยอาหารในหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Hyriopsis) bialatus* Simpson, 1900.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุชาติ อุปถัมภ์, มาลียา เครือตราชู, เยาวลักษณ์ จิตรามวงศ์ และ ศิริวรรณ จันทเตมีย์. 2538. **สังขวิทยา.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพมหานคร.

อรภา นาคจินดา. 2543. การศึกษาเกี่ยวกับหอยมุกน้ำจืดและการเพาะเลี้ยงไข่มุกหน้ำจืดในประเทศไทย, น. 63-86. ใน **เอกสารเสวนาวิชาการเรื่อง การศึกษาวิชาการหอยปี 2000.** ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะประมง มหามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

_____, นาฏยา ทิศพิจิต และ วิจิตรา อินทร์เกลี้ยง. 2529. การศึกษาชีวประวัติบางประการของหอยมุกน้ำจืดในจังหวัดกาญจนบุรี, น. 17-28. ใน **รายงานประจำปี 2529. สถานีประมงน้ำจืดจังหวัดกาญจนบุรี.** กองประมงน้ำจืด, กรมประมง, กรุงเทพมหานคร.

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

อุทัยวรรณ โกวิทวที,นฤมล เดชะประเสริฐ และอรภา นาคจินดา. 2541. การเพาะเลี้ยงหอยมุกน้ำจืด *Hyriopsis (Limnoscapha) desowitzi* ระยะโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36 วันที่ 3 กุมภาพันธ์ 2541 (สาขาประมง).** มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

___ และ สาธิต โกวิทวที. 2545. **การรวบรวมและการจำแนกชนิดหอยสองฝาน้ำจืด วงศ์ Ambelmidae ในลุ่มน้ำมูล เพื่อการเพาะเลี้ยงโกลคิเดียในอาหารสังเคราะห์.** รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนวิจัย มก. ประจำปี 2543. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพมหานคร.

Alvarado-Alvarez, R., M.C. Gould and J.L. Stephano. 1996. Spawning, in vitro maturation, and changes in oocyte electrophysiology induced by serotonin in *Tivela stultorum*. **Biol. Bull.** 190: 322-328.

Anderson, D.T. 2001. **Invertebrate Zoology**. 2 nd ed. Oxford university press., Singapore.

Baker, S.M. 2000. Particle transport in the zebra mussel, D*reissena polymorpha* (Pallas). **Biol. Bull.** 199: 116-125**.**

Barnes, R.D. 1987. **Invertebrate Zoology**. Saunder College Publishing, United state of America.

Braley, R.D. 1985. Serotonin-induced spawning in giant clams (Bivalvia: Tridacnidae). **Aquaculture** 47: 321-325.

Brown, A.G. 1991. **Nerve cells and nervous systems.** Springer-Verlag, London.

Binhe, G. 1984. **Freshwater Pearl Culture.** Fourth Training Course for Senior Aquaculturists in Asia and the Pacific Region. Tigbauan, Iloilo, Philippines. October 14 th, 1984. 20p.

Brandt, R.A.M. 1974. The Non-Marine Aquatic Mollusca of Thailand. **Arch. Molluskenkunde** 105 (104): 1-423.

Cameron, M.L. 1959. Simplified aldehyde-fuchsin staining of neurosecretory cells. **Stain Technology** 34: 265-266**.**

Chatchavalvanich, K., P. Jindamongkon, U. Kovitvadhi, A. thongpan and S. Kovitvadhi. 2006. Histological structure of gonads in the freshwater pearl mussel, *Hyriopsis (Hyriopsis) Bialatus* Simpson, 1900. **Invertebrate Reproduction and Development,** 49:4, 245-253.

Conn, D.B. 2000. **Atlas of Invertebrate Reproduction and Development.** 2nd ed. John Wiley And Sons, Inc., United States of America.

Croll, R.P., D.Y. Boudko and M.G. hadfield. 2001. Histochemical survey of transmitters in the central ganglia of the gastropod mollusk *Phestilla sibogae.* **Cell Tissue Res.** 305: 417-432.

Cunha, E.M. and J. Machado. 2001. Parturition in Anodonta cygnea induced by selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs). **Can. J. Zool.** 79: 95-100.

Deguchi, R. and K. Osanai. 1995. Serotonin- induced meiosis reinitiation from the first prophase and from the first metaphase in oocytes of the marine bivalve *Hiatella flaccida:* respective changes in intracellular Ca^{2+} and pH. **Developmental biology** 171: 483-496.

Fickbohm, D.J., C.P. Lynn-Bullock, N. Spitzer, H.K. Caldwell and P.S. Katz. 2001. Localization and quantification of 5-hydroxytryptophan and serotonin in the central nervous systems of *Tritonia* and *Aplysis.* **The Journal of Comparative Neurology** 437: 91-105.

Fong, P.P. 1998. Zebra mussel spwaning is induced in low concentration of putative serotonin reuptake inhibitors. **Biol. Bull.** 194: 143-149.

_____ and M. Warner. 1995. Serotonin- induced parturition in the fingernail clam *Sphaerium (Musculium) Transversum* (Say). **The Journal of Experimental Zoology** 272:163-166.

_____,R. Deguchi and K. Kyozuka. 1996. Serotonergic ligands induce spawning but not oocyte maturation in the bivalve *Mactra chinensis* from central Japan. **Biol. Bull.** 191: 27-32.

_____,P.T. Huminski and L.M. D'Urso. 1998. Induction and potentiation of parturition in fingernail clams (*Sphaerium striatinum)* by selective serotonin re-uptake inhibitors (SSRI). **J. Exp. Zool.** 280: 260-264.

Fujii, K. and N. Takeda. 1988. Phylogenetic detection of serotonin immunoreactive cells in the central nervous system of invertebrates**. Comp. Biochem. Physiol.** 89C: 233-239.

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.

Heard, W.H. 1975. Sexuality and other aspects of reproductive in *Anodonta* (Pelecypoda: Unionoidae). **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.

Hickman, P.,Jr., L.S.R.A. Larson , H. Anson, D.J. Eisenhour. 2006. **Integrated principles of zoology**. 13th ed. Mc Graw-Hill, Inc., United States of America.

Hirai, S., T. Kishimoto, A.L. Kadam, H. Kanatani and S.S. Koide. 1988. Induction of spawning and oocyte maturation by 5-hydroxytryptamine in the surf clam. **J. Exp. Zool.** 245: 318-321.

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.

Hudson, R.D. and B.G. Isom. 1984. Rearing juveniles of the freshwater mussels (Unionidae) in a Laboratoty 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.

Jessop, N.M. 1995. **Zoology: The Animal Kingdom.** 2nd ed. Mc Graw-Hill, Inc., United States of America.

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.

Kandel,E.R. and J.H. Schwartz. 1985. **Principles of neural science.** 2nd ed.

_____, E.R., J.H. Schwartz and T.M. Jessell. 1991. **Principles of neural science.** 3rd ed. Elsevier Science Publishing Co., Inc., New York.

_____, E.R., J.H. Schwartz and T.M. Jessell. 2000. **Principles of neural science.** 4th ed. Mc Graw-Hill, Inc., United States of America.

Kays, W. T., H. Silverman and T. H. Dietz. 1990. Water channels and canals in the gill of the freshwater mussel, *Ligumia subrostrata:* Utrastructure and histochemistry. **J. Exp.**

Zoology 254: 256-269.

Keller, A.E. and S.G. Zam. 1990. Simplification of *in vitro* culture techniques for freshwater mussel. **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.

Kovitvadhi, S., Kovitvadhi U., Sawangwong P., Thongpan A. and Machado J. 2002. Culturing Glochidia of Freshwater Mussels in Artificial Medium and Rearing Juveniles with Selected Phytoplankton feed. **Proceedings of the 6th BRT annual Conference, Nakon Sithammarat.** pp. 252-259.

Kovitvadhi, S., Kovitvadhi U., P. Polwong and N. Kuchwattana. 2003b. **Deveopment 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.

Kovitvadhi U., N. Noparatnaraporn and J. Machado. 2001. Culture of glochidia of the freshwater pearl mussel *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856) in artificial media. **Aquaculture** 195: 61-69.

_____, Pakkong, P., Noparatnaraporn. 2003a. Study of fish specificity for the infestation with glochidia *Hyriopsis myersiana* (Lea, 1856)**. Invert. Reprod. Dev.** 44: 1-3: 53-61.

Laimek, P. 2000. **Structure and development of nerve ganglia, peripheral nervous system and special sensory organs in *Haliotis asinina* Linnaeus.** Thesis,Mahidol University.

Loosanoff, V.L. 1962. Gametogenesis and spawning of the European oyster, *Ostrea edulis* in water of Maine. **Biol. Bull.** 122: 86-95.

Maddrell, S.H.P. and J.J. Nordmann. 1979. **Neurosecretion.** John Wiley and Sons, New York.

Madrones-Ladja, J.A. 1997. Notes on the induced spawning, embryonic and larval development of the window-pane shell, *Placuna placenta* (Linnaeus, 1758), in the laboratory. **Aquaculture** 157: 137-146.

Martinez, G. and A. Rivera. 1994. Role of monoamines in the reproductive process of *Argopecten purpuratus.* **Invertebrate Reproductive and Development** 25:2, 167-174.

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. Morp.** 238: 63-70.

Meeratana, P., B. Withyachumnarnkul, P. Damrongphol, K. Wongprasert, A. Suseangtham and P. Sobhon. 2006. Serotonin induces ovarian maturation in giant freshwater prawn broodstock, *Macrobrachium rosenbergii* de Man. **Aquaculture** 260: 315-325.

Miller, S.A. and J.P. Harley. 1994. **Zoology.** 2 nd ed. Wm. C. Brown Communication, Inc., United States of America.

Morton, B. 1983. Feeding and digestive in bivalvia, pp. 65-131. In:**The Mollusca** volume 5 Physiology Part 2. Academic Press, New York.

Morton, B. 1990. The life cycle and sexual strategy of *Gafrarium pectinatum* (Bivalvia: Veneridae) in a Hong Kong mangrove. **Malac. Rev.** 23: 53-62.

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.

Ortmann, A.E. 1911. A monograph of the najades of Pennsylvania. Parts I and II. **Mem. Carnegic Mus.** 4: 279-347, pls. 86-89.

Panasophonkul, S. 2006. **Distribution and characterization of serotonin (5-HT) and it receptor in the neural and gonadal tissues and the role of 5-HT in the reproduction of *Haliotis asinina* Linnaeus**. Thesis,Mahidol University.

Pavlova , G.A. 2001. Effects of serotonin, dopamine and ergometrine on locomotion in the pulmonate mollusc *Helix lucorum*, **J. Exp. Biology** 204: 1625-1633.

Pechenik, J.A. 1996. **Biology of the Invertebrates.** 3rd ed. Times Mirror Higher Education Group, Inc., Iowa.

_____.2005. **Biology of the Invertebrates.** 5th ed. Mc Graw-Hill, Inc., United States of America.

Pennak, R.W. 1989. **Fresh-water Invertebrate of United States: Protozoa to Mollusca.** 3rd ed. John Wiley and Sons, Inc., United States of America.

Ram, J.L., G.W. Crawford, J.U. Walker, J.J. Mojares, N. Patel and P.P. Fong. 1993. Spawning in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*): activation by internal or external application of serotonin. **J. Exp. Zoology** 265: 587-598.

Reunova, O.V., G.G. Kalinina and P.A. Motavkin. 1997. Neurosecretory activity and Dynamics of the lipid content of CNS neurons in gray's mussel, a bivalve mollusk. **Neuroscience and Behavioral Physiology** 27: 524-532.

Ropes, J.W. 1968. Reproductive cycle of the surf clam, *Spisula solidissima,* in offshore New Jersey. **Biol. Bull.** 135: 349-365.

Sano, K., T. kishimoto, S. L. .Koide, H. Kanatani and S.S. Koide. 1979. Inhibition of germinal vesical breakdown and polar body formation by nocotinamide in starfish and surf clam oocytes. **Develop. Growth and Differ.** 21: 457-464.

Santhanagopalan, V. and T.P. Yoshino. 2000. Monoamines and their metabolites in freshwater snail , Biomphalaria glabrata. **Comparative Biochemistry and Physiology Part A** 125: 469-478.

Sheehan, D.C. and B.B. Hrapchak. 1980. **Theory and Practice of Histotechnology.** The C.V. Mosby Co., Toronto.

Sigma-aldrich. 2008. **Fluoxetine hydrochloride.** Available source: http: // www. sigmaldrich.com/catalog/search/Product Detail/SIGMA/F132,July 5, 2008.

Siniscalchi, A., S. Cavallini, D. Sonetti, G. Sbrenna, S. Capuano, L. Barbin, E. Turolla and R. Rossi. 2004. Serotonergic neurotransmission in the bivalve *Venus verrucosa* (Veneridae): a neurochemical and immunohistochemical study of the visceral ganglion and gonads. **Marine Biology** 144: 1205-1212**.**

Smith, D. G. 2001. **Pennak's Freshwater Invertebrates of the United States.** 4th ed. John Wiley and Sons, Inc., United States of America.

Soonthornsumrith, 2006. **Structural organization and distribution of serotonin (5-HT) in central nervous system of *Macrobrachium rosenbergii***. Thesis,Mahidol University.

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.

Squire,L.R.,F.E. Bloom, S.K. McConnell, J.L. Roberts, N.C. Spitzer and M.J. Zigmond. 2003. **Fundamental neuroscience.** 2nd ed. Academic Press, United States of America.

Stefano, G.B. and E. Aiello. 1975. Histofluorescent localization of serotonin and dopamine in the nervous system and gill of Mytilus edulis (Bivalvia). **Biol. Bull.** 148: 141-156.

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

Tompa, A.S., N.H. Vendonk and J.A.M. van den Biggelarr. 1984. **The Mollusca Vol. 7 Reproduction.** Academic Press Inc., United States of America.

Vaca A. and J. Alfaro. 2000. Ovarian maturation and spawning in the white shrimp, *Penaeus vannamei,* by serotonin injection. **Aquaculture** 182: 373-385.

White KM. 1937. Mytilus. **Liverpool Marine Biol. Committee.** Available Source: http: // www.lander.edu/rsfox/310mytilusLab.html, June 7, 2005.

Wisconsin Department of Natural Resource. 2003. **Mussel.** Available Source: http://www.dnr.state.wi.us/org/land/er/factsheets/mussels/mussels.htm, March 17, 2003.