

โครงสร้างของอวัยวะในช่วงพัฒนาขึ้นสมบูรณ์ของปลาน้ำลึกชนิด *Gavialiceps javanicus*
จากทะเลฝั่งอันดามัน ประเทศไทย

Structure of the testicular maturation in the duckbill conger, *Gavialiceps javanicus*
from Andaman sea, Thailand

ทัตประดิษฐ์ มิตรเปรียญ¹ ศิลปชัย เสนารัตน์^{1*} เจษฎ์ เกษตระทัด^{1,2} พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ³ สุรัตตา บุญสมบุญสกุล¹
เอสร่า มงคลชัยชนะ⁴ วรณีย์ จิรอังกูรสกุล⁵ และปิยากร บุญยัง⁶

Tappadit Mitparian¹, Sinlapachai Senarat^{1*}, Jes Kettratad^{1,2}, Pisit Poolprasert³, Suratta Bunsomboonsakul¹,
Ezra Mongkolchaichana⁴, Wannee Jiraungkoorskul⁵ and Piyakorn Boonyoung⁶

¹ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 ประเทศไทย

²สถาบันวิจัยทรัพยากรทางน้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330 ประเทศไทย

³สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม พิษณุโลก 65000 ประเทศไทย

⁴ภาควิชาการศึกษาทั่วไป คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีสุขภาพ มหาวิทยาลัยนวมินทราชูราช กรุงเทพฯ 10300 ประเทศไทย

⁵ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 10400 ประเทศไทย

⁶ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110 ประเทศไทย

¹Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

²Aquatic Resources Research Institute, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand

³Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University, Phitsanulok, 65000, Thailand

⁴Department of General Education, Faculty of Science and Health Technology, Navamindradhiraj University, Bangkok 10300, Thailand

⁵Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University, Bangkok 10400, Thailand

⁶Department of Anatomy, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Songkhla 90110, Thailand

Corresponding author, e-mail: senarat.s@hotmail.com

(Received: Sep 17, 2019; Revised: Nov 20, 2019; Accepted: Nov 26, 2019)

บทคัดย่อ

ข้อมูลการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลากระดุกเขี้ยวที่อาศัยอยู่ในบริเวณปากแม่น้ำและชายฝั่งมี
รายงานการวิจัยอย่างกว้างขวาง ในขณะที่ข้อมูลการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลากระดุกเขี้ยวที่อาศัยอยู่ในทะเล
ความลึกปานกลาง 600-1000 เมตร มีน้อยมากในประเทศไทย จึงมุ่งเน้นศึกษาการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์ของปลาไหล
ปากเปิดชนิด *Gavialiceps javanicus* ที่อาศัยอยู่ในทะเลอันดามันความลึกปานกลาง เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับ
การศึกษาชีววิทยาของระบบสืบพันธุ์ด้านอื่นๆ ของปลาไหลชนิดนี้ต่อไป เก็บตัวอย่างปลาไหลปากเปิดเพศผู้จากทะเลอันดามัน
ของประเทศไทย ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 จำนวน 7 ตัว ที่มีความยาวลำตัวเฉลี่ย 56.00 ± 7.88 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย
 64.00 ± 16.29 กรัม มาผ่านกระบวนการทางมิถุวิทยา ผลการวิจัยพบว่าอวัยวะของปลาไหลปากเปิดมี 2 พู แต่ละพู
ประกอบด้วยเนื้อเยื่ออวัยวะและท่อนำสุจิ ภายในเนื้อเยื่ออวัยวะมี 2 ส่วนหลัก ได้แก่ ส่วนเจอร์มินัลคอมพาร์ทเมนต์และส่วน
อินเตอร์สตีเทียมคอมพาร์ทเมนต์ ส่วนเจอร์มินัลคอมพาร์ทเมนต์ประกอบด้วยท่อสร้างอสุจิจำนวนมากภายในท่อสร้างอสุจิ
มีการเรียงตัวของเซลล์เซอร์โทลีและถุงสืบพันธุ์ที่มีการพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์อยู่ในขั้นสมบูรณ์ตั้งแต่ระยะสเปอร์มาโทโก
เนียมไปจนถึงระยะสเปอร์มาโทซูน และอวัยวะของปลาไหลปากเปิดชนิด *G. javanicus* เป็นชนิด Unrestricted lobular
type เนื่องจากพบการกระจายตัวของระยะสเปอร์มาโทโกเนียมตลอดแนวของท่อสร้างอสุจิ

คำสำคัญ : มิถุวิทยา ระบบสืบพันธุ์เพศผู้ ปลาไหลปากเปิด ประเทศไทย

Abstract

Data on spermatogenic differentiation of the estuarine and coastal teleosts have been widely reported. However, few data on spermatogenic differentiation of the mesopelagic teleosts inhabiting at 600-1,000 metre in depth is available in the present. In this study, we are interested in studying on spermatogenic differentiation of mesopelagic duckbill conger, *Gavialiceps javanicus* to be basic information for further study on other aspects of its reproductive biology. We collected seven male duckbill conger with averaged total body length of 56.00 ± 7.88 centimeters and body weight of 64.00 ± 16.29 grams from Andaman sea, Thailand in October 2018. After dissected gonads, all samples were investigated using the standard histological approaches. The results from our study showed that all *G. javanicus* were considered as the male fish, which the testes having pairs of organs showed. The arrangement of each testis composed of two main regions including interstitial and germinal compartments. Indeed, the germinal compartment composed of several seminiferous lobules, which each lobule contained in both somatic Sertoli cell and spermatogenic differentiation from spermatogonium into spermatozoa. The pattern of testis of duckbill conger, *G. javanicus*, is an unrestricted lobular type type because the occurrences of spermatogonia of this fish were widely distributed along the seminiferous lobule.

Keywords: Histology, Male reproductive system, Duckbill conger, Thailand

บทนำ

ระบบสืบพันธุ์ของปลาจัดเป็นระบบที่มีความสำคัญต่อการดำรงเผ่าพันธุ์และขยายพันธุ์ เหตุนี้จึงทำให้ระบบนี้มีรายงานการวิจัยทางวิชาการอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะกลุ่มปลากระดูกแข็งหลายชนิด ได้แก่ ปลาแบนหน้าชนิด *Secutor insidiator* (Sebastian & Inasu, 2012) ปลาแบนกระสวยชนิด *Leiognathus splendens* (Acharya & Naik, 2015) ปลาทุบ *Rastrelliger brachysoma* (Senarat *et al.*, 2018) และปลาคางคกชนิด *Allenbatrachus grunniens* (Mitparian *et al.*, 2018) ลักษณะโครงสร้างทั่วไปของอวัยวะของปลากระดูกแข็งประกอบด้วยเนื้อเยื่ออวัยวะ (Testicular tissue) และท่อนำสุจิ (Vasa efferentia) ภายในเนื้อเยื่ออวัยวะแบ่งเป็น 2 ส่วนหลัก คือ ส่วนของอินเตอร์สตีเทียมคอมพาร์ตเมนต์ และเจอร์มินัลคอมพาร์ตเมนต์ (Grier & Taylor, 1998; Senarat *et al.*, 2018) โดยส่วนของเจอร์มินัลคอมพาร์ตเมนต์มีการจัดเรียงของท่อสร้างสุจิเป็นจำนวนมาก ภายในประกอบด้วยเซลล์เซอร์โทลีและพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ ได้แก่ ระยะสเปอร์มาโทโกเนียมจนถึงระยะสเปอร์มาโทซูน (Grier, 1976; Grier, 1993; Grier, *et al.*, 1980; Grier & Taylor, 1998; Senarat *et al.*, 2018) ซึ่งเหมือนกับการรายงานในเนื้อเยื่ออวัยวะของปลาไหลชนิด *Anguilla anguilla* (Tomkiewicz & Kofoed, 2011) และปลาไหลญี่ปุ่นชนิด *A. japonica* (Miura *et al.*, 1991a, 1991b; Gong *et al.*, 2017) ข้อมูลเหล่านี้มีความสำคัญอย่างยิ่ง เนื่องจากสามารถนำไปใช้ประยุกต์สำหรับการอธิบายถึงช่วงฤดูสืบพันธุ์ หรือสรีรวิทยาการสืบพันธุ์ที่ถูกต้อง ตลอดจนเหมาะสำหรับการจัดการด้านทรัพยากรประมงและการพัฒนาระบบการเพาะเลี้ยงปลาในอนาคต

จากข้อมูลดังกล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นว่างานวิจัยส่วนใหญ่ให้ความสำคัญหรือเน้นในกลุ่มปลากระดูกแข็งในบริเวณปากแม่น้ำหรือชายฝั่งทะเล ต่างจากความเข้าใจถึงกระบวนการหรือขั้นตอนของการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ในปลาไหลปากเปิดยังมีน้อยมาก (Forsgren *et al.*, 2017) โดยเฉพาะในประเทศไทยที่ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน ในการศึกษา

ครั้งนี้ จึงสนใจศึกษาถึงโครงสร้างของอวัยวะและส่วนของเจอร์มินัลคอมพาร์ทเมนต์ปลาไหลปากเปิดชนิด *Gavialiceps javanicus* ที่จัดอยู่ในวงศ์ Anguilliformes และพบการกระจายตัวในระดับความลึกมากกว่า 600 เมตร (Karmovskaya, 1994) ด้วยเทคนิคด้านมิวชีววิทยา (Histological analysis)

วิธีดำเนินการวิจัย

การเก็บตัวอย่างปลาไหลปากเปิดชนิด *Gavialiceps javanicus* เพศผู้ และพื้นที่ศึกษา

ตัวอย่างปลาไหลปากเปิดชนิด *Gavialiceps javanicus* ที่เก็บอยู่ในน้ำยารักษาสภาพเนื้อเยื่อเดวิดสัน (Davidson's fixative) ได้รับการบริจาคจากศูนย์พัฒนาการประมงแห่งเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Southeast Asian Fisheries Development Center, SEAFDEC) จำนวน 7 ตัว ที่อาศัยอยู่ในระดับความลึกระหว่าง 600-800 เมตร ที่มีความยาวลำตัวเฉลี่ย 56.00 ± 7.88 เซนติเมตร และมีน้ำหนักเฉลี่ย 64.00 ± 16.29 กรัม ในเดือนตุลาคม พ.ศ. 2561 จากจำนวน 4 สถานีของทะเลอันดามันของประเทศไทย ได้แก่ สถานีที่ 1 (Station 1) $7^{\circ}50'20.4''N$ $96^{\circ}14'58.2''E$, สถานีที่ 2 (Station 2) $7^{\circ}49'54.1''N$ $96^{\circ}43'15.6''E$, สถานีที่ 3 (Station 3) $7^{\circ}32'22.9''N$ $96^{\circ}59'20.4''E$ และสถานีที่ 4 (Station 4) $7^{\circ}11'24.7''N$ $97^{\circ}13'57.7''E$

การศึกษาทางด้านมิวชีววิทยา

นำตัวอย่างปลาไหลปากเปิดชนิด *G. javanicus* (Fixed tissue) มาทำการผ่าตัดเปิดช่องท้องและสุ้มเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาจาก 3 บริเวณ คือ ส่วนต้น กลาง และปลาย (Blazer, 2002) หลังจากนั้นนำมาผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างสไลด์ถาวรด้วยวิธี Paraffin method ตามหลักการมาตรฐานทางด้านมิวชีววิทยา (Presnell & Schreiber, 1997; Suvarna *et al.*, 2013) แล้วนำบล็อกเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาตัดแผ่นบางด้วยความหนาประมาณ 4 ไมโครเมตร และนำมาย้อมสี Harris's Hematoxylin และ Eosin (H&E) ทำยาสีน้ำสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มาศึกษาการจัดเรียงตัวของเนื้อเยื่อและองค์ประกอบของเซลล์ เพื่อใช้สำหรับการกำหนดเพศของปลา ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา พร้อมบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพสไลด์รุ่น Leica TE2000-U

องค์ประกอบเชิงร้อยละและขนาดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้

นำสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะมาทำการประเมินองค์ประกอบเชิงร้อยละของจำนวนเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ภายในท่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ตามแนวขวาง (Cross section) จำนวน 30 ท่อ จาก 3 สไลด์ (สไลด์ละ 10 ท่อ) ที่กำลังขยาย 40 เท่า โดยใช้เกณฑ์การประเมินดังต่อไปนี้ คือ - หมายถึง ไม่มีเซลล์สืบพันธุ์ (ไม่พบเซลล์สืบพันธุ์) + หมายถึง มีเซลล์สืบพันธุ์น้อย (พบเซลล์สืบพันธุ์มากกว่าร้อยละ 0 แต่น้อยกว่าร้อยละ 25) ++ หมายถึง มีเซลล์สืบพันธุ์ปานกลาง (พบเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ร้อยละ 25 แต่น้อยกว่าร้อยละ 50) +++ หมายถึง มีเซลล์สืบพันธุ์มาก (พบเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ร้อยละ 50 แต่น้อยกว่าร้อยละ 75) ++++ หมายถึง มีเซลล์สืบพันธุ์มากที่สุด (พบเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ร้อยละ 75-100) นอกจากนี้ ยังทำการสุ่มวัดเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ระยะสเปิร์มาโทโกเนียมถึงสเปิร์มาทิด จากจำนวน 50 เซลล์ ต่อสไลด์ (ทั้งหมดจำนวน 150 เซลล์ จาก 3 สไลด์ ต่อตัวอย่าง) หลังจากนั้นนำข้อมูลที่ได้นำมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยและค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ตามลำดับ

ผลและอภิปรายผล

การระบุเพศปลาไหลปากเปิดชนิด *Gavialiceps javanicus*

จากการพิจารณาจากสไลด์เนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบว่า ปลาไหลปากเปิดชนิด *G. javanicus* ทุกตัวอย่าง แสดงโครงสร้างเป็นเนื้อเยื่ออวัยวะที่จัดอยู่ในขั้นพัฒนาขั้นสมบูรณ์ (Testicular maturation) (ภาพที่ 1A) เนื่องจากพบระยะสเปิร์มาโทซันเป็นจำนวนมาก ซึ่งให้เห็นว่าในเดือนตุลาคมที่ได้ทำการเก็บตัวอย่างของปลาไหลปากเปิดชนิด

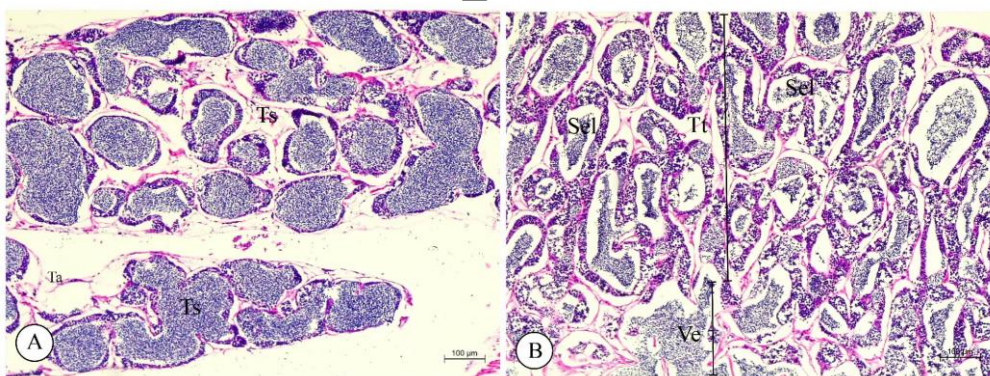
นี้อาจจัดเป็นช่วงสืบพันธุ์ (Reproductive cycle) ดังนั้น การศึกษาฤดูสืบพันธุ์หรือแหล่งวางไข่ของปลาไหลปากเปิดชนิด *G. javanicus* จึงจำเป็นต้องมีการพิจารณาในอนาคตต่อไป

โครงสร้างของของอวัยวะ

จากภาพตัดยาวขวางแสดงพบว่าโครงสร้างของอวัยวะของปลาไหลปากเปิดชนิด *G. javanicus* ถูกห่อหุ้มด้วยชั้น ทุนิกา เอลบูจินี (Tunica albuginea) บาง (ภาพที่ 1A) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและกล้ามเนื้อเรียบแทรกตัวอยู่ ภายในอวัยวะมีการจัดเรียงด้วยเนื้อเยื่ออวัยวะ (Testicular tissue) ที่บริเวณส่วนท้ายเชื่อมต่ออยู่กับท่อนำอสุจิ (Vasa efferentia) (ภาพที่ 1B) ลักษณะดังกล่าวพบได้ในอวัยวะของปลากระดุกแข็งทั่วไป (Dietrich & Krieger, 2009; Grier *et al.*, 1980; Nagahama, 1983) อาทิ ปลาทุนาชนิด *Thynnus thynnus* (Abascal, *et al.*, 2004) ปลาชนิด *Scomber japonicus* (Nyuji *et al.*, 2012) และปลาชนิด *Rachycentron canadum* (Brown-Peterson *et al.*, 2002)

โครงสร้างเนื้อเยื่ออวัยวะยังสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วนย่อย ได้แก่ ส่วนของอินเตอร์สติเทียมคอมพาร์ตเมนต์ (Interstitial compartment) และเจอร์มินัลคอมพาร์ตเมนต์ (Germinal compartment) (ภาพที่ 2-3)

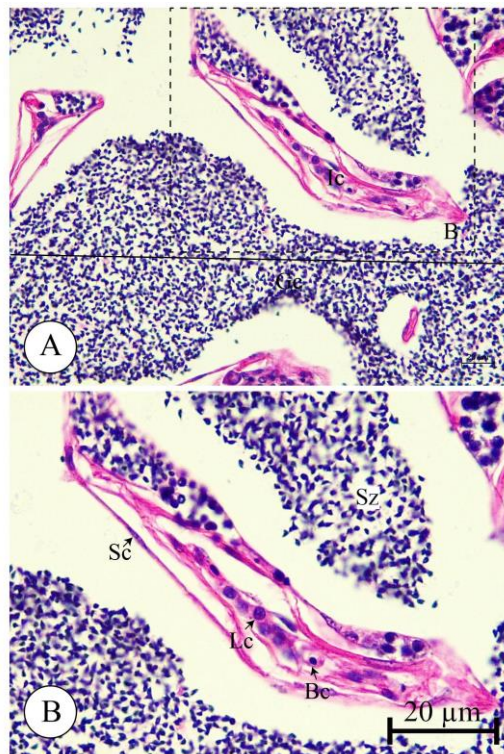
ส่วนของอินเตอร์สติเทียม คอมพาร์ตเมนต์ จัดเป็นเนื้อเยื่อส่วนที่อยู่ระหว่างท่อสร้างอสุจิ (ภาพที่ 2A) เกิดจากเนื้อเยื่อเกี่ยวพันบริเวณทุนิกา อัลบูจินี แทรกตัวเข้าไปภายในเนื้อเยื่ออวัยวะ สามารถพบหลอดเลือดฝอย (Capillary) ที่มีเซลล์เม็ดเลือด (Blood cell) อยู่ภายใน และเซลล์เลย์ดิก (Leydig cell) กระจ่ายตัวรวมกันเป็นกลุ่ม (Cluster cell) (ภาพที่ 2B) คล้ายคลึงกับการรายงานในปลากระดุกแข็งทั่วไป (Billard, 1970; Grier *et al.*, 1989) เซลล์เลย์ดิกมักอยู่รวมกันเป็นกลุ่มละ 3-4 เซลล์ เมื่อพิจารณาจากกำลังขยายสูงพบว่าแต่ละเซลล์มีนิวเคลียสกลม ขนาดใหญ่และติดสีม่วงเข้ม แต่เห็นขอบเขตของเซลล์ไม่ชัดเจน (ภาพที่ 2B) หน้าที่ของเซลล์เลย์ดิกเกี่ยวข้องกับการทำงานของเอนไซม์ 3β hydroxysteroid dehydrogenase สร้างฮอร์โมนเพศผู้ (Androgen) และ 11 คีโตเทสโทสเตอโรน (11-ketotestosterone) เพื่อควบคุมการพัฒนาและการปลดปล่อยเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้เข้าสู่ภายนอก (Cinquetti, 1994; Lo Nostro *et al.*, 2004)



ภาพที่ 1 โครงสร้างอวัยวะของปลาไหลปากเปิดชนิด *Gavialiceps javanicus* จากทะเลอันดามันของประเทศไทย A: อวัยวะ (Testis, Ts) มี 2 พู B: องค์ประกอบภายในอวัยวะประกอบด้วยเนื้อเยื่ออวัยวะ (Testicular tissue, Tt) ที่มีท่อสร้างอสุจิเป็นจำนวนมาก (Seminiferous tubules, Sel) ที่เชื่อมต่อกับท่อนำอสุจิ (Vasa efferentia, Ve)

ส่วนของเจอร์มินัลคอมพาร์ตเมนต์จัดเป็นส่วนของท่อสร้างอสุจิหรือที่เรียกว่า ท่อสร้างอสุจิเซมินิเฟอร์รัส (Seminiferous lobule) ขดตัวไปมาเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 3A) ในแต่ละท่อประกอบด้วยเซลล์เซอร์โทลี (Somatic sertoli cells) และเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Male germ cell) (ภาพที่ 3B-3G) โดยเซลล์เซอร์โทลีวางตัวอยู่ในบริเวณขอบของท่อสร้างอสุจิ (ภาพที่ 3B) หรือแนบตัวชิดอยู่กับสเปิร์มาโทโกเนียม เซลล์ชนิดนี้มีนิวเคลียสรูปร่างคล้ายสามเหลี่ยม (Triangular-like shape) และล้อมรอบด้วยไซโทพลาซึมติดสีชมพูอ่อน แต่ไม่สามารถเห็นขอบเขตเซลล์ได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 3B) คล้ายคลึง

กับการศึกษาในหลากหลายงานวิจัย (Nagahama, 1983; Billard, 1992; Dietrich & Krieger, 2009) เชื่อว่าหน้าที่ของเซลล์เซอร์โทลีเกี่ยวข้องกับกลไกการควบคุมเมแทบอลิซึม (Metabolism) (Grier, 1975; Billard, *et al.*, 1982 และการกำจัดเรซิดวลบอดี (Phagocytosis of residual body) ที่เกิดขึ้นในช่วงกระบวนการสเปิร์มโอเจเนซิส (Spermiogenesis) (Grier, 1993; Grier & Taylor, 1998; Senarat *et al.*, 2018)



ภาพที่ 2 แสดงส่วนของอินเตอร์สตีเทียลคอมพาร์ตเมนต์ (Interstitial compartment, Ic) และเจอร์มินัลคอมพาร์ตเมนต์ (Germinal compartment, Gc) ภายในเนื้อเยื่ออวัยวะของปลาไหลปากเปิดชนิด *Gavialiceps javanicus* จากทะเลอันดามันของประเทศไทย (A) B: ภาพกำลังขยายสูงแสดงอินเตอร์สตีเทียลคอมพาร์ตเมนต์ประกอบด้วยหลอดเลือดฝอยที่มีเซลล์เม็ดเลือด (Blood cell, Bc) อยู่ภายใน และเซลล์เลย์ดิก (Leydig cells, Lc) กระจายตัวร่วมกันอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (สีชมพู) หมายถึง Sc, Sertoli cell

เมื่อพิจารณาจากภาพตัดตามยาวพบการกระจายตัวของของระยะสเปิร์มาโทโกเนียมตลอดแนวของท่อสร้างอสุจิ จึงเรียกรูปแบบของอวัยวะแบบนี้ว่า Unrestricted lobular type (ภาพที่ 2B) คล้ายคลึงกับการรายงานในปลาในกลุ่ม Neoteleostes (Parenti & Grier, 2004) ต่างจากปลาในกลุ่ม atherinomorphs ที่มีรูปแบบอวัยวะเป็นแบบ Restricted lobular type ที่พบระยะสเปิร์มาโทโกเนียมเพียงแค่ส่วนปลายของท่อสร้างอสุจิเท่านั้น (The distal end of the lobule) (Grier *et al.*, 1980; Nagahama, 1983; Parenti & Grier, 2004)

สำหรับกระบวนการพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลาไหลปากเปิดชนิด *G. javanicus* สามารถจำแนกได้เป็น 5 ระยะ โดยการพิจารณาจากขนาดของเซลล์ รูปแบบหรือการกระจายตัวของเซโทเทอโรโครมาทิน และลักษณะของไซโทพลาสซึม (ภาพที่ 3) เหมือนกับปลาไหลชนิด *Anguilla anguilla* (Tomkiewicz & Kofoed, 2011) ปลาไหลญี่ปุ่นชนิด *A. japonica* (Miura *et al.*, 1991a; 1991b; Gong *et al.*, 2017) และกระดูกทั่วไป (Nóbrega *et al.*, 2009; Schulz *et al.*, 2010) อาทิ ปลาม้าลายชนิด *Danio rerio* (Schulz *et al.*, 2010) และปลาทุ๊ก *Rastrelliger brachysoma* (Senarat, *et al.*, 2018)

สเปิร์มาโทโกเนียม (Spermatogonium) จัดเป็นระยะเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่พบได้น้อยมาก (ตารางที่ 1) และจัดเรียงตัวอยู่ตามขอบของท่อสร้างอสุจิ ทั้งเป็นเซลล์เดี่ยว (Isolated cell) (ภาพที่ 3C) และอยู่ร่วมกันเป็นกลุ่มเซลล์ (Cell group) ขนาดเซลล์ของสเปิร์มาโทโกเนียมใหญ่ที่สุด 20.30 ± 0.91 ไมโครเมตร มีรูปร่างกลม นิวเคลียสขนาดใหญ่ติดสีน้ำเงินอ่อนอยู่ตรงเซลล์ และล้อมรอบด้วยไซโทพลาซึมซึ่งติดสีชมพูเข้มชัดเจน (ภาพที่ 3C)

สเปิร์มาโทไซต์ปฐมภูมิ (Primary spermatocyte) จัดเป็นเซลล์ที่พบได้ปานกลาง (พบเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ร้อยละ 25 แต่น้อยกว่าร้อยละ 50) (ตารางที่ 1) ที่มาจากการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (Mitotic division) ของระยะสเปิร์มาโทโกเนียม ทำให้เซลล์ค่อนข้างคล้ายคลึงกับระยะสเปิร์มาโทโกเนียมทั้งรูปร่างและขนาดเซลล์ 16.32 ± 0.62 ไมโครเมตร ยกเว้นเซลล์สเปิร์มาโทไซต์ปฐมภูมิมีการพัฒนาพร้อมกันทุกเซลล์ (Synchronous development) ภายในสเปิร์มาโทซิสต์ (Spermatocyst) (ภาพที่ 3D) และเริ่มสังเกตเห็นการหดตัวของเฮเทอโรโครมาตินภายในนิวเคลียสอย่างชัดเจน (ภาพที่ 3D)

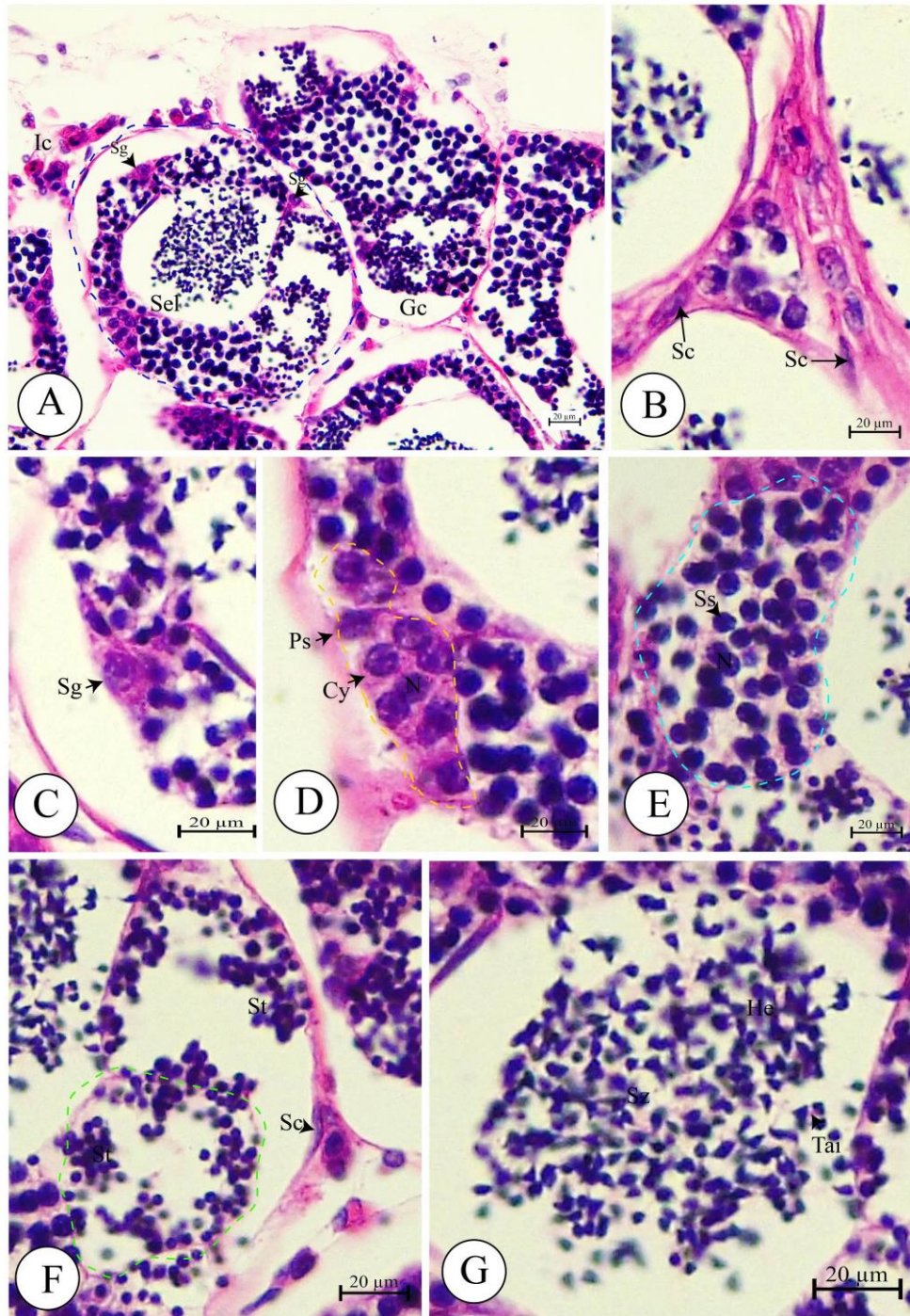
สเปิร์มาโทไซต์ทุติยภูมิ (Secondary spermatocyte) จัดเป็นเซลล์ที่พบได้ปานกลาง (พบเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ร้อยละ 25 แต่น้อยกว่าร้อยละ 50) (ตารางที่ 1) เป็นระยะเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่เกิดจากกระบวนการไมโอซิส-1 (First meiotic division) ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลงครึ่งหนึ่งที่หนึ่งของระยะสเปิร์มาโทไซต์ปฐมภูมิ 9.46 ± 1.21 ไมโครเมตร และยังคงบรรจุอยู่ในสเปิร์มาโทซิสต์ (ภาพที่ 9.12B) แต่ละเซลล์มีการหดตัวของเฮเทอโรโครมาตินแน่นขึ้นอย่างเห็นได้ชัด ต่างจากปริมาณไซโทพลาซึมกลับลดลงอย่างชัดเจน (ภาพที่ 3E)

สเปิร์มาทิด (Spermatid) จัดเป็นเซลล์ที่พบได้มาก (พบเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ร้อยละ 50 แต่น้อยกว่าร้อยละ 75) (ตารางที่ 1) เกิดจากกระบวนการไมโอซิส-2 (Second meiotic division) ของระยะสเปิร์มาโทไซต์ทุติยภูมิ ทำให้เซลล์มีขนาดเล็กลง 3.84 ± 1.09 ไมโครเมตร แม้ว่าระยะสเปิร์มาทิดยังคงพัฒนาอยู่ในสเปิร์มาโทซิสต์ แต่กลุ่มเซลล์เหล่านี้มีการเคลื่อนที่เข้าไปใกล้กับลูเมนมากขึ้น นิวเคลียสของแต่ละเซลล์มีขนาดเล็กลงและมีการหดตัวของเฮเทอโรโครมาตินเพิ่มมากขึ้น แต่มีปริมาณของไซโทพลาซึมลดลง อาจสังเกตเห็นได้เพียงแค่ออบที่ติดสีชมพูอ่อนเท่านั้น (ภาพที่ 3F)

สเปิร์มาโทซูน (Spermatozoon) หรืออสุจิ (Mature sperm) จัดเป็นเซลล์ที่พบได้มากที่สุด (พบเซลล์สืบพันธุ์ตั้งแต่ร้อยละ 75-100) ภายในอันทะ (ตารางที่ 1) ที่เกิดจากกระบวนการสเปิร์มิโอเจเนซิส (Spermiogenesis) และหลุดออกจากสเปิร์มาโทซิสต์ จึงสามารถพบกระจายตัวอยู่ในช่องว่าง สอดคล้องกับการรายงานในเนื้อเยื่ออันทะของปลาไหลชนิด *A. anguilla* (Müller, et al., 2005) และปลากระดุกแข็งหลายชนิด (Billard, 1992; Dietrich & Krieger, 2009; Nagahama, 1983) เมื่อพิจารณากาลังขยายสูงพบว่าระยะสเปิร์มาโทซูนประกอบด้วยโครงสร้างหัวที่มีนิวเคลียสรูปร่างรีและมีเฮเทอโรโครมาตินสีน้ำเงินเข้มมาก แต่ส่วนหางยาวติดสีชมพูที่ค่อนข้างจางได้ยาก ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (ภาพที่ 3G)

ตารางที่ 1 องค์ประกอบเชิงร้อยละและขนาดของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ภายในเนื้อเยื่ออันทะของปลาไหลปากเปิดชนิด *Gavialiceps javanicus* จากทะเลอันดามันของประเทศไทย

ระยะเซลล์สืบพันธุ์	สเปิร์มาโทโกเนียม	สเปิร์มาโทไซต์ปฐมภูมิ	สเปิร์มาโทไซต์ทุติยภูมิ	สเปิร์มาทิด	สเปิร์มาโทซูน
ร้อยละ	+	++	++	+++	++++
ขนาดของเซลล์สืบพันธุ์ (ไมครอน)ค่าเฉลี่ย±ค่า	20.30±0.91	16.32±0.62	9.46±1.21	3.84±1.09	-
ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน					



ภาพที่ 3 ส่วนของเจอร์มินัล คอมพาร์ตเมนต์ (Gc) ภายในเนื้อเยื่ออัณฑะของปลาไหลปากเปิดชนิด *Gavia javanica* จากทะเลอันดามันของประเทศไทย A: ท่อสร้างอสุจิ (Seminiferous lobules, Sel) ขดตัวไปมาเป็นจำนวนมาก B: เซลล์เซอร์โทลี (Somatic Sertoli cell, (Sc) ตามบริเวณขอบของท่อสร้างอสุจิ C-G: ระยะพัฒนาการของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Spermatogenic cell) ได้แก่ C: ระยะสเปิร์มาโทโกเนียม (Spermatogonium, (Sg) D: ระยะสเปิร์มาโทไซต์ปฐมภูมิ (Primary spermatocyte, (Ps) ระยะสเปิร์มาโทไซต์ทุติยภูมิ (Secondary spermatocyte, Ss) F: สเปิร์มาทิด (Spermatid, St) และ G: ระยะสเปิร์มาโทซูน (Spermatozoon, Sz) หมายถึง Cy, Cytoplasm; Gc, Germinal cyst; He, head; Ic, Interstitial compartment; N, Nucleus; Sc, Somatic sertoli cell และ Tai, tail

สรุป

จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นเป็นครั้งแรกถึงโครงสร้างด้านมิถุนวิทยาของอวัยวะและกระบวนการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของปลาไหลปากเปิดชนิด *Gavialiceps javanicus* จากทะเลอันดามันของประเทศไทย ทุกตัวอย่างปลาที่ได้รับจัดอยู่ในอันดับชั้นสมบูรณ์ที่ประกอบด้วยระยะสเปอร์มาโทซูนอยู่เป็นจำนวนมากภายในท่อสร้างอสุจิ ข้อมูลที่ได้รับในครั้งนี้สามารถนำไปใช้สำหรับการศึกษาดูสืบพันธุ์ หรือการปรับตัวทางด้านสรีรวิทยาการสืบพันธุ์ในอนาคตต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- Abascal, F. J., Megina, C., & Medina, A. (2004). Testicular development in migrant and spawning bluefin tuna (*Thunnus thynnus* (L.)) from the eastern Atlantic and Mediterranean. *Fishery Bulletin*, 102, 407-417.
- Acharya, K. V., & Naik, S. D. (2015). Reproductive biology of Polyfish, *Leiognathus splendens* (Cuvier, 1829) off Ratnagiri Coast, Maharashtra. *Global Journal of Multidisciplinary Studies*, 4, 289-400.
- Billard, R. (1970). Ultrastructure comparée de spermatozoides de quelques poissons Téléostéens. In B. Baccetti (ed.), *Comparative Spermatology* (pp. 71-79). New York: Academic Press.
- Billard, R. (1992). Reproduction in rainbow trout: sex differentiation, dynamics of gametogenesis, biology and preservation of gametes. *Aquaculture*, 100, 263-298.
- Billard, R., Richard, M., & Rombauts, R. (1982). Inhibition of spermatogenesis and vitellogenin in rainbow trout by hormonal additives in the diet. *The Progressive Fish-Culturist*, 44, 15-18.
- Blazer, V. S. (2002). Histopathological assessment of gonadal tissue in wild fishes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 26, 85-101.
- Brown-Peterson, N. J., Grier, H. J., & Overstreet, R. M. (2002). Annual changes in germinal epithelium determine male reproductive classes of the cobia. *Journal of Fish Biology*, 60, 178-202.
- Dietrich, D. R., & Krieger, H. O. (2009). *Histological Analysis of Endocrine Disruptive Effects in Small Laboratory Fish*. New Jersey: John Wiley & Sons.
- Forsgren, K. L., Jamam, H., Rarrios, A., & Paig-Tran, E. W. M. (2017). Reproductive morphology of oarfish (*Regalecus russellii*). *The Anatomical Record*, 300, 1695-1704.
- Gong, X., Wanga, D., Baoa, B., Zhanga, Q., Jiangb, X., & Liu, L. (2017). Gonadal development and silvering of the Japanese Eel (*Anguilla japonica*) in the Yangtze River during downstream migration. *Aquaculture and Fisheries*, 2, 173-178.
- Grier, H. J. (1975). Aspects of germinal cyst and sperm development in *Poecilia latipinna* (Teleostei: Poeciliidae). *Journal of Morphology*, 146, 229-250.
- Grier, H. J. (1976). Sperm development in the teleost *Oryzias latipes*. *Cell Tissue and Research*, 168, 419-431.
- Grier, H. J. (1993). Comparative organization of sertoli cells including the sertoli cell barrier. In L. D. Russel & M. D. Griswold (eds.), *The Sertoli cell* (pp. 704-739). Clearwater, Florida: Cache River Press.
- Grier, H. J., Linton, J. R., Leatherland, J. F., & de Vlaming, V. L. (1980). Structural evidence for two different testicular types in teleost fishes. *American Journal of Anatomy*, 159, 331-345.

- Grier, H. J., & Taylor, R. G. (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*, 53, 521-542.
- Grier, H. J., & Taylor, R. G. (1998). Testicular maturation and regression in the common snook. *Journal of Fish Biology*, 53, 521-542.
- Grier, H. J., van den Hurk, R., & Billard, R. (1989). Cytological identification of cell types in the testis of *Esox lucius* and *E. niger*. *Cell and Tissue Research*, 257, 491-496.
- Karmovskaya, E. S. (1994). Systematics and distribution of the eel genus *Gavialiceps* (Congridae) in the Indo-West Pacific. *Journal of Ichthyology*, 34(3), 73-89.
- Mitparian, T., Kettratad, J., & Jiraungkoorskul, W. (2018). Gametogenic maturation of *Allenbatrachus grunniens* (Linnaeus, 1758) from Pranburi Estuary, Thailand. [Abstract]. *Proceedings of National Meeting on Biodiversity Management, Thailand*, 5, 215.
- Miura, T., Yamauchi, K., Nagahama, Y., & Takahashi, H. (1991a). Induction of spermatogenesis in male Japanese eel, *Anguilla japonica*, by a single injection of human chorionic gonadotropin. *Zoological Science*, 81, 63-73.
- Miura, T., Yamauchi, K., Takahashi, H., & Nagahama, Y. (1991b). Hormonal induction of all stages of spermatogenesis in vitro in the male Japanese eel (*Anguilla japonica*). [Abstract]. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 88, 5774-5778.
- Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. In W. S. Hoar, D. J. Randall, & E. M. Donaldson (eds.), *Fish physiology: Vol.9. Reproduction, Part A, Endocrine tissues and hormones* (pp. 223-275). New York: Academic Press.
- Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., França, L. R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiol. Biochem*, 35, 197-206.
- Nyuji, M., Selvaraj, S., Kitano, H., Shiraishi, T., Yamaguchi, A., Shimizu, A., & Matsuyama, M. (2012). Immunoreactivity of gonadotrophs (FSH and LH Cells) and gonadotropin subunit gene expression in the male chub mackerel *Scomber japonicus* pituitary during the reproductive cycle. *Zoological Science*, 29, 623-629.
- Parenti, L. R., & Grier, H. J. (2004). Evolution and phylogeny of gonad morphology in bony fishes. *Integrative and Comparative Biology*, 44, 333-348.
- Presnell, J. K., & Schreiber, M. P. (1997). *Humason's Animal Tissue Techniques* (5th ed.). US: Johns Hopkins University Press.
- Schulz, R. W., de França, L. R., Lareyre, J.J., Le Gac, F., Chiarini-Garcia, H., Nobrega, R. H., & Miura, T. (2010). Spermatogenesis in fish. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 165, 390-41.
- Sebastian, H., & Inasu, N. D. (2012). Synchronized development of gonad and bioluminescent system in pugnose poly fish *Secutor insidiosus* Bloch (Leiognathidae) from Kerala coast. *Journal of the marine Biological Association of India*, 54, 5-10.



- Senarat, S., Kettretad, J., & Jiraungkoorskul, W. (2018). Testicular structure and spermatogenesis of short mackerel, *Rastrelliger brachysoma* (Bleeker, 1851) in The Upper Gulf of Thailand. *Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology*, 26(2), 30-43.
- Suvarna, K. S., Layton, C., & Bancroft, J. D. (2013). *Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques* (7th ed.). Canada: Elsevier.
- Tomkiewicz, J., Kofoed, T. M. N., & Pedersen, J. S. (2011). Assessment of Testis Development during Induced Spermatogenesis in the European Eel *Anguilla Anguilla*. *Marine and Coastal Fisheries: Dynamics, Management, and Ecosystem Science*, 3(1), 106-118.

ฉบับที่ 11 ม.ค. 64