



**DEVELOPMENT OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM AND
LOCALIZATION OF EGG-LAYING HORMONE (ELH)
IN THE GONAD OF A TROPICAL ABALONE,
HALIOTIS ASININA LINNAEUS**

MALEE CHANPOO

พิมพ์หน้าปก
๑๓๐
ลิขสิทธิ์ของ ม.มหิดล

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (ANATOMY)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY**

2000

ISBN 974-663-859-9

COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY

TH
Ms45d
๑๐๐

44587 ๐๑

4036345 SCAN/M : MAJOR : ANATOMY ; M. Sc. (ANATOMY)
KEY WORDS : HALIOTIS ASININA / GAMETOGENESIS / GONAD
DEVELOPMENT / EGG-LAYING HORMONE

MALEE CHANPOO : DEVELOPMENT OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM
AND LOCALIZATION OF EGG-LAYING HORMONE (ELH) IN THE GONAD
OF A TROPICAL ABALONE, HALIOTIS ASININA LINNAEUS. THESIS
ADVISOR : CHAITIP WANICHANON, Ph.D., PRASERT SOBHON, Ph.D.,
PRAPEE SRETARUGSA, Ph.D., MALEEYA KRUATRACHUE, Ph.D. 130P. ISBN
974-663-859-9

The aims of this thesis were to classify the germ cells and study the development of gonad and localization of egg-laying hormone in *Haliotis asinina*. The gonadal histology and germ cells were studied by light microscopy using paraffin and semithin methods. Connective tissue frameworks of the gonad consist of the outer and inner gonadal capsules linked by flat sheets of connective tissue called trabeculae. Trabeculae partition the gonad into compartments and each trabecula acts as the axis on which growing germ cells are attached and proliferate to form oogenetic or spermatogenic unit. Each trabecula contains small capillaries in the center, surrounded by muscle cells, collagen fibers intermingled with fibroblasts, and a substantial number of granulated cells which have many processes. Germ cells in oogenetic unit could be classified into six stages according to their histological characteristics: oogonium and five stages of oocytes, *i.e.*, Oc₁ with intense basophilic cytoplasm, Oc₂ with light basophilic cytoplasm and lipid droplets, Oc₃ with a few yolk granules, Oc₄ with increasing number of yolk granules and thin jelly coat, Oc₅ with numerous yolk granules and fully formed jelly coat. Germ cells in spermatogenic process could be classified according to the appearance of chromatin and the presence or absence of nucleolus into thirteen stages: spermatogonium, five stages of spermatocytes, secondary spermatocyte, four stages of spermatids and two stages of spermatozoa.

Definitive gonad appears to be clearly separated from the hepatopancreas at 2 months. Gonial cells are found at 2 months; early spermatocytes, spermatids and immature spermatozoa appear at 4 months, early oocytes (Oc₁, Oc₂) are later observed at 6 to 7 months. While completely mature spermatozoa could arise in the gonad as early as 7 months; mature oocytes (Oc₄, Oc₅) occur much later at 10 to 11 months. The male animals tend to reach full sexual maturity and start normal reproductive cycle as early as 7 to 8 month, while female animals reach maturity and start reproductive cycle around 11 to 12 months.

Localization of egg-laying hormone (ELH) was performed by immunofluorescence, immunogold with silver enhancement and immunoperoxidase techniques using polyclonal antibody to recombinant abalone egg-laying hormone (aELH) of *H. rubra* as a probe. Anti-aELH exhibits strong bindings, which implies the presence of aELH, to muscle cells and granulated cells within trabeculae and capsules. The cytoplasm of immature oocytes (stages 1, 2, 3) are moderately stained, while that of mature oocytes (stages 4, 5) are only weakly stained. It is possible that, aELH may be synthesized and released by granulated cells. This hormone may act directly on muscle cells to induce their contraction, which cause the expulsion of ripe oocytes or spermatozoa from the gonad. This study will apply to increase the number of abalone.

4036345 SCAN/M : สาขาวิชา : กายวิภาคศาสตร์ ; วท. ม. (กายวิภาคศาสตร์)

มาลี จันทร์ภู : การพัฒนาระบบสืบพันธุ์และการหาตำแหน่งการกระจายของฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ในระบบสืบพันธุ์ของหอยเป่าชื่อ, *Haliotis asinina* LINNAEUS (DEVELOPMENT OF THE REPRODUCTIVE SYSTEM AND LOCALIZATION OF EGG-LAYING HORMONE (ELH) IN THE GONAD OF A TROPICAL ABALONE, *HALIOTIS ASININA* LINNAEUS) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชัยทิพย์ วณิชานนท์, Ph. D., ประเสริฐ โสภณ, Ph. D., ประพีร์ เศรษฐรักษ์, Ph. D., มาลียา เกรือตราชู, Ph. D. 130 หน้า. ISBN 974-663-859-9

หอยเป่าชื่อ หรือ หอยร้อยรู เป็นหอยทะเลที่มีเพศแยกจากกันอย่างชัดเจน จากการศึกษาจุลกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ และการผลิตเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเป่าชื่อในระดับจุลทรรศน์ธรรมดาโดยใช้วิธี paraffin และ semithin พบว่า โครงเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่ห่อหุ้มและค้ำจุนอวัยวะและรังไข่ของหอยเป่าชื่อประกอบด้วย ถุงหุ้มภายนอก ถุงหุ้มภายในที่กั้นอวัยวะกับรังไข่จาก hepatopancreas และเยื่อเกี่ยวพันที่แทรกจากถุงหุ้มเข้าไปในรังไข่และอวัยวะเป็นแผง trabeculae ภายในแผง trabeculae แต่ละอันมีหลอดเลือดขนาดเล็กล้อมรอบด้วยเซลล์กล้ามเนื้อ (muscle cell) เซลล์ขนาดเล็กที่มีนิวเคลียสรูปรางกลมหรือรี กลุ่มเซลล์เหล่านี้อาจเป็นเซลล์ fibroblast และเซลล์ที่มีแกรนูล (granulated cell) กระจายอยู่ทั่วไป ที่แผง trabeculae มีเซลล์สืบพันธุ์ขั้นต้น และชั้นปลายหุ้มอยู่รอบๆ ในรังไข่เซลล์สืบพันธุ์ประกอบด้วย 6 ชั้นคือ oogonium (Og) และ primary oocytes ชั้นที่ I, II, III, IV และ V ซึ่งมีความแตกต่างกันตามปริมาณสารติดสีต่าง หยดไขมัน (lipid droplets) ก้อนไข่แดง (yolk granules) ภายในไซโทพลาซึม และสารเคลือบเซลล์ (jelly coat) ที่แต่ละเซลล์สร้างขึ้น การจำแนกชั้นของเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเพศผู้ ทำได้โดยใช้ลักษณะของการขดตัวของโครมาติน และการปรากฏหรือการหายไปของนิวคลีโอลัส เซลล์สืบพันธุ์เพศผู้แบ่งออกเป็น 13 ชั้น คือ spermatogonium, primary spermatocytes 5 ชั้น, secondary spermatocyte, spermatids 4 ชั้น และ spermatozoa 2 ชั้น

การศึกษาการพัฒนาระบบสืบพันธุ์ในหอยอายุต่างๆกันในช่วงเวลา 1 ปี โดยเทคนิคจุลทรรศน์ธรรมดาพบว่า การพัฒนาระบบสืบพันธุ์เริ่มปรากฏว่ามี gonial cells เกิดขึ้นเมื่อหอยอายุได้ 2 เดือน เซลล์ระยะต่อมาคือ spermatocytes, spermatids และ immature spermatozoa เกิดขึ้นเมื่อหอยอายุได้ 4 เดือน ส่วน oocytes ชั้นที่ I และ II พบเมื่อหอยอายุ 6 ถึง 7 เดือน อวัยวะที่พัฒนาเต็มที่โดยพบว่ามีเซลล์ mature spermatozoa เกิดขึ้นในหอยอายุ 7 ถึง 8 เดือน ในขณะที่รังไข่เริ่มมีการพัฒนาเต็มที่โดยพบว่ามีเซลล์สืบพันธุ์ชั้นปลายคือ oocytes ชั้นที่ IV และ V ในหอยอายุ 10 ถึง 11 เดือน ดังนั้นในทางปฏิบัติหอยเพศผู้อาจจะถูกใช้เป็นตัวพ่อแม่ได้ตั้งแต่อายุ 7 เดือนขึ้นไป ส่วนเพศเมียต้องรอให้มีอายุอย่างน้อย 11 เดือนขึ้นไป

การหาการกระจายของฮอร์โมนกระตุ้นการตกไข่ (ELH) โดยใช้เทคนิค immunofluorescence, immunogold with silver enhancement และ immunoperoxidase โดยใช้แอนติบอดีต่อ ELH แสดงการติดสีเข้มที่ในเซลล์กล้ามเนื้อ และเซลล์ที่มีแกรนูล ซึ่งกระจายอยู่ในแผง trabeculae และถุงหุ้มด้านนอกและด้านใน นอกจากนี้ยังมีการติดสีเข้มในไซโทพลาซึมของเซลล์ไข่ชั้นที่ I, II และ III และติดสีจางในไข่ชั้นที่ IV และ V ดังนั้นกลุ่มเซลล์ที่มีแกรนูลนี้อาจจะทำหน้าที่สังเคราะห์ฮอร์โมนที่กระตุ้นการตกไข่ โดยฮอร์โมนชนิดนี้จะไปกระตุ้นเซลล์กล้ามเนื้อที่อยู่ในแผง trabeculae และถุงหุ้มด้านนอกและด้านใน ทำให้เกิดการหดตัวและปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกจากตัวหอย