

โครงสร้างโดยละเอียดของพัฒนาการของโอโอไซต์ในปลาการ์ตูนส้มขาว

Ultrastructure of Oocyte Development in Anemone Clownfish,

Amphiprion ocellaris (Cuvier, 1830)

อัมพร ทองกู่เกียรติกุล¹ และ มาลีญา เครือตราชู²

Amporn Thongkukiatkul¹ and Maleeya Kruatrachue²

¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

²ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

¹Biology Department, Faculty of Science, Burapha University

²Biology Department, Faculty of Science, Mahidol University

Received : 3 April 2019

Revised : 14 May 2019

Accepted : 15 May 2019

บทคัดย่อ

ศึกษาพัฒนาการของโอโอไซต์ในปลาการ์ตูนส้มขาวด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยใช้ลักษณะนิวเคลียส องค์ประกอบของไซโทพลาสซึมและชั้น zona radiata เป็นเกณฑ์ แบ่งได้เป็น 5 ระยะดังนี้ ระยะ chromatin nucleolar (OC1) ระยะ perinucleolus (OC2) ระยะ cortical alveoli and oil droplets (OC3) ระยะ vitellogenic (OC4) และ ระยะ maturation (OC5) จากศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของโอโอไซต์ระยะต่างๆ พบว่า โอโอไซต์ระยะ chromatin nucleolar (OC1) มีการเปลี่ยนแปลงภายในไซโทพลาสซึม มีการสร้าง Balbiani's body โดยมีการรวมกลุ่มของ mitochondria โอโอไซต์ระยะ perinucleolus (OC2) พบนิวคลีโอลัสหลายนิวคลีโอลัสใกล้กับเยื่อหุ้ม germinal vesicle ด้านในและพบ nuages ใกล้เยื่อหุ้ม germinal vesicle ด้านนอก โอโอไซต์ระยะ cortical alveoli และ oil droplets พบ cortical alveoli มีรูปร่างกลม และ oil droplets รูปร่างไม่แน่นอนจำนวนมากในไซโทพลาสซึม โอโอไซต์ระยะนี้มี zona radiata ล้อมรอบเป็นชั้นบางๆ โอโอไซต์ระยะ vitellogenic พบ yolk granules มีลักษณะกลมและทึบแสงอิเล็กทรอนิกส์จำนวนมากในไซโทพลาสซึม โอโอไซต์ระยะ maturation (OC5) yolk granules รวมเป็น yolk platelets และชั้น zona radiata หนามากที่สุดแบ่งเป็นชั้นนอก zona radiata externa (ZRe) และชั้นใน zona radiata interna (ZRI)

คำสำคัญ : ปลาการ์ตูนส้มขาว, โอโอไซต์, กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

*Corresponding author. E-mail : amporn@go.buu.ac.th

Abstract

Histological studied the stages of oocytes development in *Amphiprion ocellaris* was classified into 5 stages based on nuclear characteristics, cytoplasmic content and zona radiata layers; chromatin nucleolar (OC1) stage, perinucleolar stages (OC2), cortical alveoli and oil droplets (OC3) stage, vitellogenesis stage (OC4) and maturation stage (OC5). According to ultrastructural studied, oogonium was characterized by a large nucleus with a prominent nucleolus. The chromatin-nucleolar stage (OC1), there was cytoplasmic differentiation, with the formation of Balbiani's body (mitochondrial cloud). The perinucleolar stage (OC2), oocyte's nucleus contained multiple nucleoli that were located around the inner membrane of germinal vesicle envelope. Electron dense material (nuage) was usually observed close to outer membrane of germinal vesicle envelope. Cortical alveoli and oil droplets stage (OC3), oocytes were distinguished by appearance of many cortical alveoli-like vesicles and oil droplets in cytoplasm. In this stage, zona radiata was observed as a thin layer around the oocyte. In vitellogenic stage (OC4), oocytes were larger, yolk granules containing a dense homogenate material were abundant in the cytoplasm. During maturation stage (OC5), the yolk granules fused to become yolk platelets in cytoplasm and the thickness of zona radiata were greatest, and divided into zona radiata interna (ZRI) and zona radiata externa (ZRe).

Key words : *Amphiprion ocellaris*, oocyte, transmission electron microscopy

บทนำ

ปลาการ์ตูนส้มขาว (*Amphiprion ocellaris*) จัดในวงศ์ Pomacentridae พบแพร่กระจายในมหาสมุทรอินโดแปซิฟิก อาศัยตามแนวปะการังและอยู่ร่วมกับดอกไม้ทะเลแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (Litsios, 2012) ปลาการ์ตูนสามารถเปลี่ยนเพศแบบ protandrous hermaphroditism คือปลาเพศผู้สามารถเปลี่ยนเป็นเพศเมีย (Murty, 2002; Ghosh *et al.*, 2012) การค้าปลาการ์ตูนในตลาดโลกมีประมาณ 43% และ 25% มาจากการเพาะเลี้ยงซึ่งต้องจับพ่อแม่พันธุ์มาจากธรรมชาติ (Dhaneesh *et al.*, 2013; Taylor & Hellberg, 2003) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้ประชากรปลาการ์ตูนจากแหล่งธรรมชาติลดลง (Shuman, *et al.*, 2005)

ปลาการ์ตูนส้มขาวพบในน่านน้ำไทยทั้งฝั่งอันดามันและอ่าวไทย ปลาการ์ตูนส้มขาวเป็นปลาการ์ตูนชนิดหนึ่งที่นิยมเลี้ยงในตู้ปลาและพิพิธภัณฑ์สัตว์น้ำ ประชากรปลาการ์ตูนส้มขาวในธรรมชาติลดลงอย่างรวดเร็วอันเนื่องมาจากเทคโนโลยีการทำประมงที่ทันสมัยและการทำลายแหล่งที่อยู่ของปลา ปัจจุบันจึงเริ่มมีการเพาะเลี้ยงปลาการ์ตูนส้มขาวในฟาร์มมากขึ้นซึ่งจำเป็นต้องอาศัยความรู้ทางด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์โดยเฉพาะการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ในระดับจุลกายวิภาค งานวิจัยครั้งนี้นี้จึงมีประโยชน์ต่องานวิจัยด้านอื่นเช่นการศึกษาฮอร์โมนสเตอรอยด์หรือฮอร์โมนเปปไทด์ที่มีผลต่อพัฒนาการของโอโอไซต์ในปลาการ์ตูน

งานวิจัยเกี่ยวกับการศึกษากระบวนการการสร้างสืบเซลล์พันธุ์เพศเมียของปลากระดุกแข็งในระดับจุลกายวิภาค มีในปลาหลายชนิดเช่นปลา *Pseudosciaena crocea* (Ma, *et al.*, 2012) ปลา *Siniperca chuatsi* (Jiang *et al.*, 2010) และปลา *Danio rerio* (Koc, 2010) ซึ่งสามารถแบ่งกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียเป็นระยะต่างๆ เป็น 4 ระยะดังนี้ ระยะ

primary growth ระยะ cortical alveolus ระยะ vitellogenic และระยะ maturation (Barr, 1968; Higashino *et al.* 2002) ระยะ primary growth แบ่งย่อยเป็น 2 ระยะคือ ระยะ chromatin nucleolus และระยะ perinucleolus โอลิโอไซต์มีขนาดใหญ่พร้อมกับมีการเปลี่ยนแปลงภายในนิวเคลียส มีนิวคลีโอลัสจำนวนมาก โอลิโอไซต์ระยะ cortical alveolus และ alveoli เริ่มพบ cortical alveoli และ lipid droplets ในไซโทพลาสซึม (Cárdenas *et al.*, 2008) โอลิโอไซต์ระยะ vitellogenic มีการสะสม yolks ในไซโทพลาสซึม ระยะนี้ถูกควบคุมโดยฮอร์โมน gonadotropin ที่หลังจากต่อมใต้สมองส่วนหน้า โอลิโอไซต์ระยะ maturation มีนิวเคลียสขนาดใหญ่ yolk granules และ lipid droplets เริ่มรวมกันและมีขนาดใหญ่มากขึ้น (Nagahama, 1983; Yueh & Chang, 2000) ถึงแม้ว่าปลาการ์ตูนส้มขาวมีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Casadevall *et al.*, 2009; Godwin, 1994) และการศึกษาพัฒนาการของโอลิโอไซต์ของปลาการ์ตูนในระดับปริญญาวิทยามีจำนวนมากแต่การศึกษาในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนยังมีน้อยมาก (Brusle-Sicard & Reinboth, 1990; Miura *et al.*, 200; Khoo *et al.*, 2018) จึงเป็นที่มาของงานวิจัยชิ้นนี้

วิธีดำเนินการวิจัย

ซื้อปลาการ์ตูนส้มขาวจากสถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล มหาวิทยาลัยบูรพา จำนวน 10 คู่ โดยเลี้ยงไว้ในตู้ขนาด 30 × 60 × 40 เซนติเมตร ตู้ละ 1 คู่ ที่อุณหภูมิ 28 ± 1 องศาเซลเซียส โดยให้ออกซิเจนตลอดเวลา และให้อาหารสำเร็จรูปวันละหนึ่งครั้ง เมื่อปลามีอายุครบ 12 เดือน เลือกลูกปลาที่มีขนาดใหญ่ของแต่ละคู่มาชั่งน้ำหนักและวัดขนาดความยาว สลบปลาด้วย tricaine methanesulfonate (MS222, Sigma, Singapore) แล้วผ่าท้องปลาเพื่อเอา gonad สำหรับใช้ในขั้นตอนต่อไป

1. การเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

ตัดเนื้อเยื่อ gonad ให้มีขนาด 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วแช่เนื้อเยื่อในสารละลายบูแอนด์เพื่อรักษาสภาพเนื้อเยื่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ล้างสารละลายบูแอนด์ออกจากเนื้อเยื่อด้วย 70% เอทานอล นำชิ้นเนื้อเยื่อผ่านกระบวนการดึ่งน้ำออกโดยเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอล จากนั้นฝังชิ้นเนื้อเยื่อในพาราฟิน ตัดเนื้อเยื่อให้ได้เซกชันมีความหนา 5-6 ไมโครเมตร ย้อมเซกชันด้วยสีฮีมาทอกซาลินและสีอีโอซิน (H & E) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Humason (1962) เพื่อศึกษารูปร่างและโครงสร้างของโอลิโอไซต์ระยะต่างๆด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง Olympus BX50 พร้อมบันทึกภาพ

2. การเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน

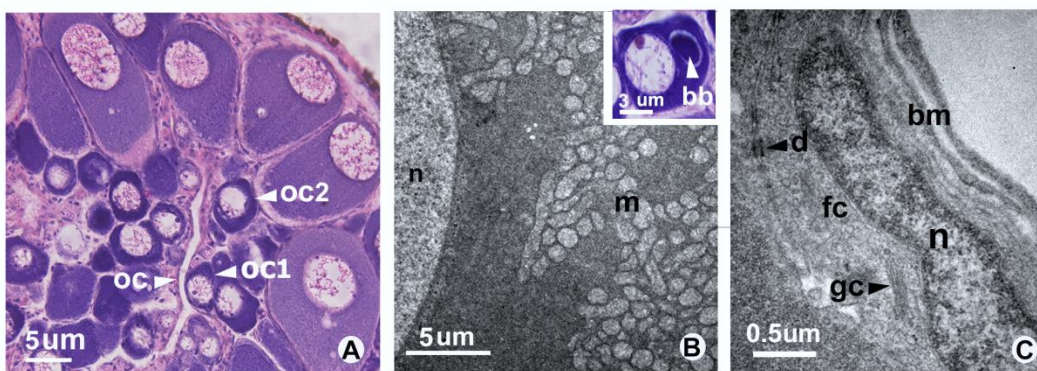
ตัดเนื้อเยื่อ gonad ให้มีขนาด 0.3 ลูกบาศก์เซนติเมตร แล้วแช่เนื้อเยื่อในสารละลาย 2% glutaraldehyde และ 4 % formaldehyde ใน 0.2 M phosphate buffer (pH7.8) ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย 0.1M PBS 3 ครั้ง จากนั้น post fixed ในสารละลาย 0.2% osmium นาน 1 ชั่วโมง ดึ่งน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยการเพิ่มความเข้มข้นของเอทานอล แล้ว ฝังเนื้อเยื่อใน spur resin ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Cárdenas *et al.* 2008 ตัดเนื้อเยื่อให้ได้ ultrathin sections บาง 70-90 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Reichert ultramicrotome ย้อม ultrathin sections ด้วยสี uranyl acetate และ lead citrate นำ ultrathin sections ที่เตรียมได้ไปศึกษาโครงสร้างของโอลิโอไซต์โดยใช้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน Philips TECHNAI 20 และบันทึกภาพ

ผลการวิจัย

ปลาการ์ตูนเพศเมียโตเต็มวัยมีโอโอไซต์ระยะต่างๆ ล้อมรอบช่องว่างภายในรังไข่ (ภาพที่ 1A) การพัฒนาของโอโอไซต์ของปลาการ์ตูนแบ่งได้เป็น 5 ระยะดังนี้ ระยะ chromatin nucleolar (OC1) ระยะ perinucleolus (OC2) ระยะ cortical alveoli and oil droplets (OC3) ระยะ vitellogenic (OC4) และ ระยะ maturation (OC5)

โอโอไซต์ระยะ chromatin-nucleolus (OC1) (ขนาด 45-56 μm)

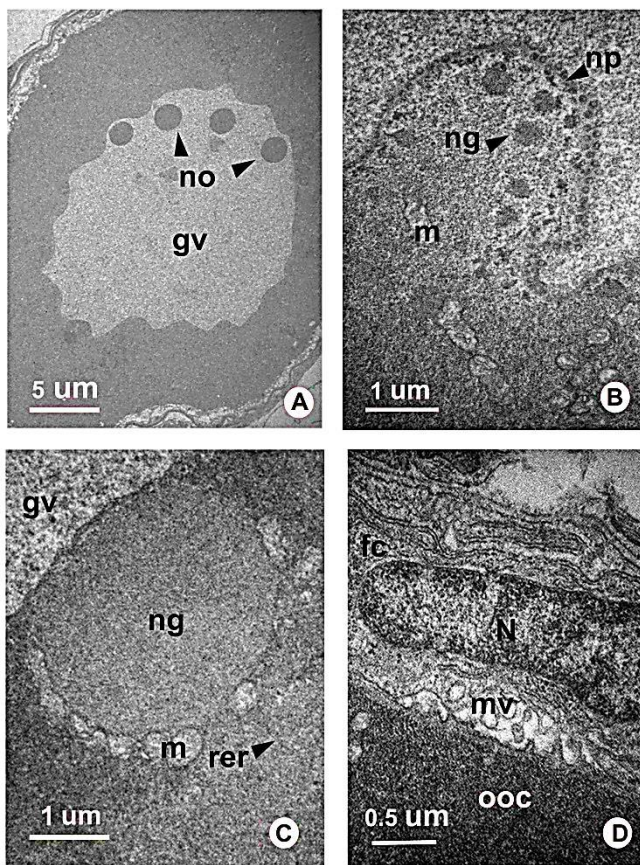
โอโอไซต์ระยะนี้มีรูปร่างคล้ายหยดน้ำและมีนิวเคลียสรูปร่างกลม (ภาพ 1A) พบ Balbiani's body หรือเรียกว่า yolk nucleus ในไซโทพลาสซึม อยู่ใกล้นิวเคลียส ย้อมติดสีน้ำเงินเข้มเมื่อย้อมด้วยสี H & E (ภาพแทรก 1B) จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า Balbiani's body ประกอบด้วย mitochondria จำนวนมากรวมกันเป็นกลุ่ม (ภาพ 1B) โอโอไซต์ระยะนี้มีเซลล์พอลลิเคิลมีรูปร่างแบนล้อมรอบ ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์พอลลิเคิลพบออร์แกเนลต่างๆ แต่ไม่มาก เซลล์พอลลิเคิลจะยึดติดกันด้วย desmosome (ภาพ 1C)



ภาพที่ 1 (A) ภาพตัดตามขวางเนื้อเยื่อรังไข่แสดงพัฒนาการของเซลล์โอโอไซต์ของปลาการ์ตูนย้อมด้วยสี H & E โอโอไซต์ระยะ chromatin nucleolus (OC1), โอโอไซต์ระยะ perinucleolar (OC2), ovarian cavity (OC)
 (B) โครงสร้างโอโอไซต์ระยะ chromatin-nucleolus ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบส่องผ่าน พบ mitochondria (m) รวมเป็นกลุ่มใกล้นิวเคลียส (n) ภาพแทรก พบ Balbiani's body (bb) ย้อมติดสีน้ำเงินเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี H & E
 (C) โครงสร้างของเซลล์พอลลิเคิล (fc) ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน เซลล์พอลลิเคิลมีรูปร่างแบน นิวเคลียส (n) มีรูปร่างยาว และเซลล์ยึดติดกันด้วย desmosome (d), basement membrane (bm), golgi complex (gc)

โอโอไซต์ระยะ perinucleolus (OC2) (ขนาด 70-76 μm)

โอโอไซต์มี germinal vesicle ขนาดใหญ่ตรงกลางเซลล์ รูปร่างไม่แน่นอนและภายใน germinal vesicle พบนิวคลีโอลัสขนาดใหญ่จำนวนมากเรียงตัวใกล้ด้านในของเยื่อหุ้ม germinal vesicle (ภาพ 2A) และพบรู (nuclear pores) จำนวนมากบริเวณเยื่อหุ้ม germinal vesicle (ภาพ 2B) ภายในไซโทพลาสซึมพบ nuages มีลักษณะก้อนกลมทึบแสงอิเล็กตรอน (nuage material) เรียงตัวใกล้เยื่อหุ้ม germinal vesicle ด้านนอก (ภาพ 2B) และพบ nuages มีขนาดใหญ่ล้อมรอบด้วย mitochondria เรียก cement material (ภาพ 2C) เซลล์พอลลิเคิลล้อมรอบโอโอไซต์มีรูปร่างแบน ยื่นไม่ใครวไรไลเข้าช่องว่าง (perivitelline space) ซึ่งพบระหว่างโอโอไซต์และ follicular epithelium (ภาพ 2D)



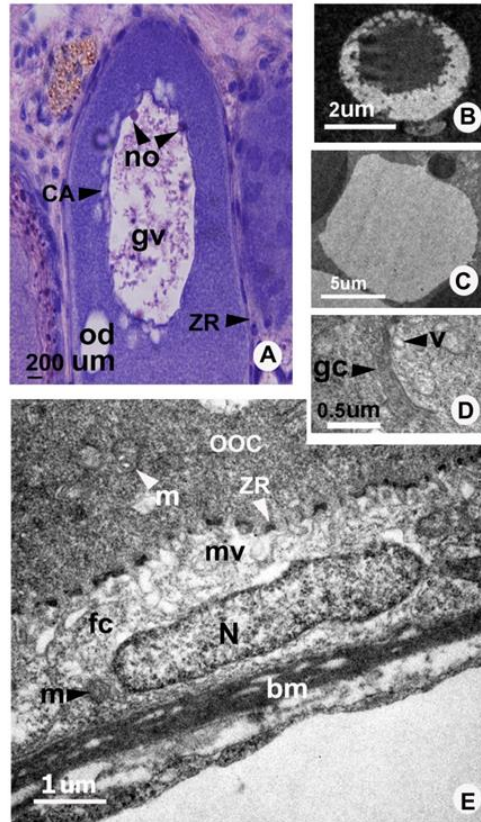
ภาพที่ 2 โครงสร้างของโอโอไซต์ระยะ perinucleolus ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

- (A) ภายใน germinal vesicle (gv) มีนิวคลีโอลัส (no) เรียงตัวใกล้เยื่อหุ้ม germinal vesicle
- (B) พบรู (np) บริเวณเยื่อหุ้ม germinal vesicle และ nuages (ng) จำนวนมากเรียงใกล้กับด้านนอกของเยื่อหุ้ม germinal vesicle และพบ mitochondria (m) จำนวนมากในไซโทพลาสซึม
- (C) พบ nuage (ng) ขนาดใหญ่ล้อมรอบด้วย mitochondria (m) และพบ rough endoplasmic reticulum (rer) ในไซโทพลาสซึม germinal vesicle (gv)
- (D) ภาพแสดงช่องว่างระหว่างโอโอไซต์ (ooc) และเซลล์ฟอลลิเคิล (fc) และมี microvilli (mv) ยื่นจากเซลล์ฟอลลิเคิล และนิวเคลียส (N) มีรูปร่างยาว

โอโอไซต์ระยะ cortical alveoli และ oil droplets (OC3) (ขนาด 153-182 μm)

โอโอไซต์ระยะนี้มี germinal vesicle ขนาดใหญ่ รูปร่างรีหรือกลม พบนิวคลีโอลัสขนาดเล็กเรียงตัวใกล้กับเยื่อหุ้มด้านในของเยื่อหุ้ม germinal vesicle และภายในไซโทพลาสซึมพบ cortical alveoli เรียงใกล้กับเยื่อหุ้มด้านนอกของ germinal vesicle โอโอไซต์ระยะนี้เริ่มมี zona radiata เป็นชั้นบางๆ ล้อมรอบ (ภาพ 3A) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า cortical alveoli มีรูปร่างกลมแบ่งเป็น 2 ส่วนคือด้านนอกใสและมีจุดเล็กๆ ส่วนด้านในติดสีดำเข้มที่บ่งชี้ถึงคอโรน (ภาพ 3B) lipid droplets มีรูปร่างไม่แน่นอน (ภาพ 3C) ขนาดใหญ่และใส นอกจากนี้ยังพบ golgi complex และ

vesicles ในไซโทพลาสซึม (ภาพ 3D) ชั้น zona radiata ที่ล้อมรอบโอโอไซต์ระยะนี้มีลักษณะเป็นแถบสีดำเข้มที่บ่งแสดงอิเล็กตรอน และมี microvilli แทรกภายในชั้น zona radiata โอโอไซต์ระยะนี้เริ่มยื่น microvilli เข้าหาเซลล์ฟอลลิเคิลมากขึ้น เซลล์ฟอลลิเคิลยังคงมีรูปร่างแบน (ภาพ 3E) มีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในระยะโอโอไซต์ระยะ perinucleolar



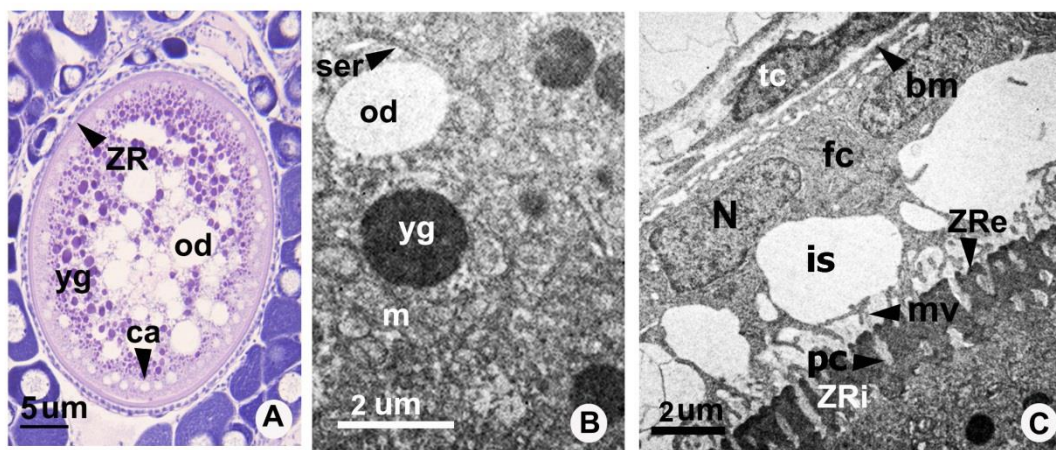
ภาพที่ 3 โอโอไซต์ระยะ cortical alveoli และ oil droplets ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

- (A) โครงสร้างโอโอไซต์ระยะ cortical alveoli และ oil droplets ย้อมด้วยสี H & E ภายในเซลล์มี germinal vesicle (gv) รูปร่างรีหรือกลม มีขนาดใหญ่ พบนิวคลีโอลัส (no) ใกล้เยื่อหุ้มด้านในของ germinal vesicle และภายในไซโทพลาสซึมพบ cortical alveoli (ca) และ oil droplet (od) โอโอไซต์ระยะนี้มี zona radiata (ZR) ล้อมรอบ
- (B) Cortical alveolus มีลักษณะกลม ภายนอกมีลักษณะใส และภายในติดสีดำเข้มที่บ่งแสดงอิเล็กตรอน
- (C) Lipid droplet มีรูปร่างไม่แน่นอน และมีลักษณะใส
- (D) พบ Golgi complex (gc) และถุง vesicle (v) ในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์
- (E) ชั้น zona radiata (ZR) ติดสีดำเข้มและมี microvilli (mv) แทรก พบ mitochondria (m) จำนวนมากในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ (OOC) เซลล์ฟอลลิเคิล (fc) มีรูปร่างแบน นิวเคลียส (N) มีรูปร่างยาว basement membrane (bm)

โอโอไซต์ระยะ vitellogenic (OC4) (ขนาด 221-223 μm)

โอโอไซต์ระยะนี้พบ yolk granules ติดสีแดง และ lipid droplets มีลักษณะใส ไม่ติดสี เมื่อย้อมด้วยสี H & E yolk granules และ lipid droplets กระจายทั่วไซโทพลาสซึม นอกจากนี้ยังพบ cortical alveoli เรียงตัวติดด้านในของเยื่อหุ้มโอโอไซต์ (ภาพ 4A) yolk granules มีลักษณะกลมทึบแสงอิเล็กตรอน (ภาพ 4B) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เมื่อโอโอไซต์มีพัฒนาการมากขึ้น ชั้น zona radiata จะหนามากขึ้น และแบ่งเป็น 2 ชั้นคือ ชั้นนอก (zona radiata externa, ZRe) มีลักษณะบาง ติดสีดำและทึบแสงอิเล็กตรอนมากกว่าชั้นใน (zona radiata interna ZRi) ทั้ง 2 ชั้นมีร่อง (pore canals, PC) จำนวนมาก ภายในแต่ละร่องพบ microvilli เซลล์พอลลิเคิลที่ล้อมรอบโอโอไซต์ระยะนี้เริ่มเปลี่ยนรูปร่างจากรูปร่างแบน เป็นรูปร่างลูกบาศก์ และยื่นไซโทพลาสซึมเข้าหาชั้น zona radiata มากขึ้น และเริ่มพบบริเวณช่องว่างระหว่างเซลล์พอลลิเคิล (intercellular space) ในโอโอไซต์ระยะนี้ (ภาพ 4C)

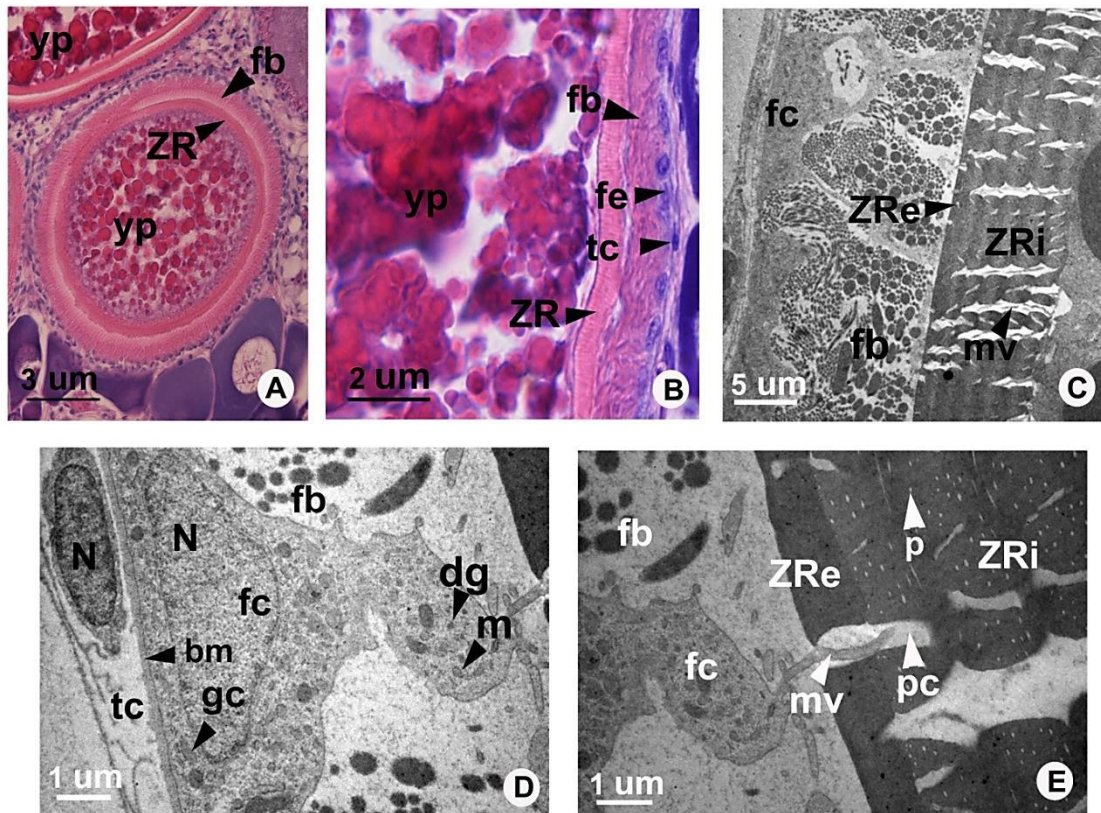


ภาพที่ 4 โอโอไซต์ระยะ vitellogenic

- (A) โอโอไซต์ระยะ vitellogenic มี yolk granule (yg) cortical alveoli (ca) และ oil droplet (od) ในไซโทพลาสซึมและโอโอไซต์ล้อมรอบด้วยชั้น zona radiata (ZR) เมื่อย้อมด้วยสี H & E
- (B) ภายในไซโทพลาสซึมมี yolk granules (yg) ลักษณะกลมทึบแสงอิเล็กตรอน และ oil droplet (od) มีรูปร่างรี ลักษณะใส นอกจากนี้ยังพบ mitochondria (m) และ smooth endoplasmic reticulum (ser) จำนวนมาก เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
- (C) zona radiata (ZR) แบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นนอก (ZRe) ติดสีดำเข้ม และชั้นใน (ZRi) ชั้น ZRi หนากว่า ZRe ระยะนี้เริ่มมี intercellular space (is) ระหว่างเซลล์พอลลิเคิล (fc), tunical cell (tc), basement membrane (bm), microvilli (mv), pore canal (pc), นิวเคลียส (N) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

โอโอไซต์ระยะ mature (OC5) (ขนาด 240-252 μm)

โอโอไซต์ระยะนี้พบ yolk granules เริ่มรวมเป็น yolk plates ติดสีแดงเข้มกระจายทั่วไซโทพลาสซึม เซลล์ระยะนี้ไม่พบ germinal vesicle เพราะถูกบังด้วย yolk plates (ภาพ 5A และ 5B) โอโอไซต์ถูกหุ้มด้วยชั้น zona radiata ชั้น follicle epithelium และชั้น theca ซึ่งเป็นชั้นนอกสุด ชั้น zona radiata มีลายตามขวาง เมื่อย้อมด้วยสี H & E (ภาพ 5B) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า ชั้น zona radiata หนามากขึ้นและแบ่งเป็นชั้นประมาณ 5 ชั้น แต่ละชั้นที่บดแสงอิเล็กตรอนไม่เท่ากัน ชั้นนอกสุด (ZRe) ติดสีดำเข้มมากที่สุด และชั้นใน (ZRi) แบ่งเป็นชั้นอีก 4 ชั้น แต่ละชั้นติดสีจางกว่าชั้น ZRe และพบรู (pores) จำนวนมากแทรกภายในชั้นเหล่านี้ (ภาพ 5E) นอกจากนี้ภายในชั้น (ZRe) และ ภายใน ZRi พบร่องซึ่งมี microvilli ที่ยื่นจากโอโอไซต์และเซลล์ฟอลลิเคิลมาบรรจบกัน (ภาพ 5C และ 5E) ภายใน intercellular space ระหว่างเซลล์ฟอลลิเคิลมีไฟบริล (fibrils) จำนวนมาก (ภาพ 5C และ 5D) เซลล์ฟอลลิเคิลมี mitochondria, Golgi complex และ electron dense granules จำนวนมากในไซโทพลาสซึม (ภาพ 5D)



ภาพที่ 5 โอโอไซต์ระยะ mature

- (A) yolk granules รวมกันเป็น yolk plate (yp) ติดสีแดง กระจายทั่วไซโทพลาสซึม ชั้น zona radiata (ZR) หนามากขึ้น และพบ fibril (fb) ย้อมติดสีแดงเมื่อย้อมด้วยสี H & E
- (B) ขยายภาพ A พบ Fibril (fb) แทรกระหว่างชั้น follicle epithelium (fe) และชั้น zona radiata (ZR) ชั้น theca พบ thecal cell (tc) มีรูปร่างแบน ภายในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์พบ yolk plate (yp) ติดสีแดงเข้ม เมื่อย้อมด้วยสี H & E
- (C) พบ fibrils (fb) ใน intercellular space ระหว่างเซลล์ฟอลลิเคิล (fc) โอโอไซต์ระยะนี้ล้อมรอบด้วยชั้น zona radiata externa (ZRe) ซึ่งเป็นชั้นนอกสุด และชั้น zona radiata interna (ZRI) แบ่งเป็นหลายชั้น และพบร่องที่มี microvilli (mv) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
- (D) follicle cell (fc) มีนิวเคลียส (N) รูปร่างไม่แน่นอน ภายในไซโทพลาสซึมมี golgi complex (gc), mitochondria (m), dense granule (dg) และพบ fibril (fb) ใน intercellular space ระหว่างเซลล์ฟอลลิเคิล thecal cell (tc), basement membrane (bm) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน
- (E) follicle cell (fc) มี microvilli (mv) เข้าไปใน pore canal (pc) และพบรู (p) จำนวนมากในชั้น zona radiata externa (ZRe), Zona radiata interna (ZRI), fibril (fb) เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

วิจารณ์ผลการวิจัย

การแบ่งโอโอไซต์ของปลาการ์ตูนส้มขาวเป็นระยะต่างๆโดยใช้ลักษณะนิวเคลียส organelles ภายในไซโทพลาสซึม และชั้นของพอลลิเคิลเป็นเกณฑ์ซึ่งคล้ายกับเกณฑ์ที่ใช้แยกระยะโอโอไซต์ของปลากระดูกแข็งชนิดอื่นๆ (Nagahama, 1983; Selman & Wallace, 1986; Tyler & Sumpter, 1996; Wallace & Selman, 1981)

ปลาการ์ตูน สกุล *Amphiprion* มีการผสมพันธุ์แบบจับคู่และสามารถเปลี่ยนเพศแบบ protandrous (Fricke & Fricke, 1977; Miura *et al.*, 2003) gonad ของปลาการ์ตูนเพศเมียโตเต็มวัยที่จับคู่ (breeder fish) มีเฉพาะ ovarian tissue ที่มี โอโอไซต์ที่มีการพัฒนาทุกระยะ gonad ของปลาการ์ตูนเพศผู้โตเต็มวัยที่จับคู่มี testicular tissue ที่มีเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ทุกระยะและ โอโอไซต์ระยะ previtellogenic แต่ในปลาการ์ตูนที่ยังไม่ผสมพันธุ์ (non-breeder fish) มีทั้ง ovarian tissue และ testicular tissue (Casadevall *et al.*, 2009; Abol-Munafi *et al.*, 2011)

โอโอไซต์ระยะ chromatin nucleolus ของปลาการ์ตูนพบ Balbiani's body ในไซโทพลาสซึม ซึ่ง Balbiani's body พบได้ในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่นแมงมุม และแมลง (Miyazaki & Bilinski, 2006) และในไซโทพลาสซึมของโอโอไซต์ของสัตว์มีกระดูกสันหลังเช่น ปลา สัตว์สะเทินบกสะเทินน้ำ และ นก (Tworzydło *et al.*, 2009) Balbiani's body ทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางในการสังเคราะห์ organelles ชนิดต่างๆในไซโทพลาสซึม (Coello & Grimm, 1990; Corriero *et al.*, 2004; Tyler & Sumpter, 1996) โอโอไซต์ระยะ perinucleolus พบนิวเคลียสโอลัสจำนวนมากแสดงว่ามีกระบวนการสังเคราะห์ RNA จำนวนมาก (Selman & Wallace, 1986; Thiry & Poncin, 2005) ภายในไซโทพลาสซึมพบ nuages ซึ่งเป็นแหล่งเก็บ RNA เพื่อเตรียมสร้างโปรตีนสำหรับใช้ในการพัฒนาของโอโอไซต์ในระยะต่อไป (Abdalla & Cruzlandim, 2004; Selman & Wallace, 1989; Kessel, 1983) โอโอไซต์ระยะนี้เริ่มมี microvilli ยื่นออกจากโอโอไซต์และเซลล์พอลลิเคิล เพื่อเพิ่มพื้นที่ในการแลกเปลี่ยนสารระหว่างโอโอไซต์และเซลล์พอลลิเคิล (Uribe *et al.*, 2012) โอโอไซต์ระยะนี้มี follicle epithelium ล้อมรอบและพบเซลล์พอลลิเคิลมีรูปร่างแบนเรียงเป็นชั้นเดียว ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการเกิด differentiation ของโอโอไซต์ (Stehr *et al.* 1983, Matsuyama *et al.* 1991)

การพัฒนาของโอโอไซต์ในระยะ secondary growth phase (ระยะย่อยย cortical alveoli และระยะ vitellogenic) โอโอไซต์เริ่มสะสม oil droplets ภายในไซโทพลาสซึม oil droplets มีสาร triacylglycols และ cholesterol เป็นองค์ประกอบ (Mourente *et al.*, 2002) ดังนั้น oli droplets จึงทำหน้าที่เกี่ยวกับการลอยตัวของไข่ภายหลังจากไข่ถูกปฏิสนธิและเป็นแหล่งพลังงานขณะตัวอ่อนกำลังเจริญเติบโต (Kayaba *et al.*, 2001) นอกจากนี้ภายในไซโทพลาสซึมยังพบ cortical alveoli มีลักษณะเป็นถุง ซึ่งภายในถุงมี metalloproteinases (Shibatta *et al.*, 2000) และ lectins (Dong *et al.*, 2004) สารเหล่านี้จะหลั่งเข้า perivitelline space ขณะที่ไข่ถูกปฏิสนธิ ทำให้ชั้น zona radiata แข็งเพื่อป้องกันการเกิด polyspermy (Selman *et al.*, 1988; Tyler & Sumpter, 1996) นอกจากนี้ zona radiata มีส่วนสำคัญในการขนส่ง vitellogenin ระหว่างการสร้าง yolk (Shabanipour & Heidari, 2004)

การสังเคราะห์ yolk เพื่อสะสมเป็นอาหารสำหรับตัวอ่อน เป็นขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการพัฒนาของโอโอไซต์ (Kayaba *et al.*, 2001) โอโอไซต์ใน secondary growth phase (ระยะย่อยย vitellogenic) ของปลาการ์ตูนส้มขาวเก็บสะสม yolk ไว้ใน yolk granule ขนาดเล็ก เมื่อโอโอไซต์โตเต็มที่ (ระยะ mature) yolk granules รวมกันเป็นก้อนมีผลทำให้ไข่ มีลักษณะโปร่งใส ซึ่งเป็นลักษณะที่คล้ายกับไข่ที่พบในปลากระดูกแข็งที่อาศัยในน้ำเค็ม (Selman & Wallace, 1989) yolk สร้างจาก

สารตั้งต้น vitellogenin ซึ่งสร้างจากตับ (Çakıcı & Üçüncü, 2007) vitellogenin เป็นสาร phospholipoglycoprotein ที่มีน้ำหนักโมเลกุลมาก เมื่อขนส่งเข้าโอโอไซต์แล้วจะถูก cleavage เป็น yolk protein ซึ่งเป็นโปรตีนขนาดเล็ก (Jalabert, 2005)

โอโอไซต์ของปลากระดูกแข็งมีชั้น zona radiata และ follicle epithelium ล้อมรอบ (Dos Santos-Silva *et al.* 2015; Santos *et al.*, 2006) ชั้น zona radiata หรือเรียกว่า chorion หรือ egg shell หรือ vitelline envelope (Corriero *et al.*, 2004) โอโอไซต์ของปลากระดูกอ่อนเริ่มมี zona radiata หุ้มในระยะ secondary oocyte growth phase (ระยะย่อย cortical alveoli และ oil droplets) ซึ่งเหมือนกับปลาชนิดอื่นๆเช่นปลา *Danio rerio* (Kaviani *et al.*, 2013) zona radiata ที่ล้อมรอบโอโอไซต์ของปลากระดูกอ่อนมีหลายตามขวางเช่นเดียวกับที่พบใน zona radiata ที่ล้อมรอบโอโอไซต์ของปลา *Danio rerio* (Kaviani *et al.*, 2013) ลายตามขวางที่พบใน zona radiata คือ pore canals เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Shabanipour & Heidari, 2004) zona radiata ที่พบในปลากระดูกแข็งส่วนมากประกอบด้วย 3 ชั้นคือ Z1, Z2 และ Z3 (Begovac & Wallace, 1987) หรือเรียกว่า zona externa, zona interna และ zona subinterna (Gills, 1990) แต่อย่างไรก็ตาม zona radiata ที่พบในปลากระดูกอ่อนมีเพียง 2 ชั้นคือ zona radiata externa (ZRe) และ zona radiata interna (ZRI) ซึ่งชั้น ZRI แบ่งเป็น 4 ชั้นย่อย จำนวนชั้นของ zona interna ไม่เท่ากันในปลาแต่ละชนิด (Lønning, 1972) ชั้น radiata externa ประกอบด้วยสาร polysaccharides (Bazzoli, 1992) ซึ่งต่างจากชั้น zona radiata interna ที่มีโปรตีน choriogenins เป็นส่วนประกอบ (Santos *et al.*, 2006; Begovac & Wallace, 1989) zona radiata มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการเกิด polyspermy ระหว่างการปฏิสนธิและป้องกันการเกิดอันตรายของตัวอ่อนที่เกิดจากแรงภายนอกไข่ (Corriero *et al.*, 2004) ชั้น zona radiata มี pore canals และภายใน pore canal มี microvilli ซึ่งทำหน้าที่ช่วยขนส่งสารเพื่อสร้าง yolk (Jiang *et al.*, 2010)

โอโอไซต์ระยะ mature มี fibrils ในช่องว่างระหว่างเซลล์พอลลิเคิล ซึ่งคล้ายกับที่พบในโอโอไซต์ของปลา *Chirostoma humboldtianum* ซึ่ง fibrils เหล่านี้น่าจะมีส่วนช่วยในการขนส่งสารระหว่างเซลล์พอลลิเคิลและโอโอไซต์ (Cárdenas *et al.* 2008; Miura *et al.*, 2003)

เซลล์พอลลิเคิลที่หุ้มโอโอไซต์มีรูปร่างและลักษณะแตกต่างขึ้นกับชนิดของปลาและระยะการพัฒนาระยะของโอโอไซต์ (Bazzoli, 1992) เซลล์พอลลิเคิลที่พบในปลากระดูกอ่อนมีรูปร่างแบนในระยะ perinucleolus และมีรูปร่างไม่แน่นอนในระยะ vitellogenic และ mature ซึ่งคล้ายกับที่พบในปลากระดูกแข็งชนิดอื่นๆ (Santos *et al.*, 2006; Corriero *et al.*, 2004; Selman & Wallace, 1986; Grau *et al.*, 1996) เซลล์พอลลิเคิลทำหน้าที่สังเคราะห์สเตียรอยด์ ฮอร์โมน (Nagahama, 1983) โปรตีน และลิพิดซึ่งเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการพัฒนาของโอโอไซต์ (Hamlett *et al.*, 1999).

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาพัฒนาการของโอโอไซต์ของปลาการ์ตูนในระดับจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านมีน้อยมากและไม่ได้ศึกษารายละเอียดโครงสร้างของโอโอไซต์ทุกระยะ จากงานวิจัยครั้งนี้พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของนิวเคลียส และ organelles ต่างๆในแต่ละระยะของโอโอไซต์ไม่เหมือนกัน นอกจากนี้ยังพบว่าโอโอไซต์ในระยะ cortical alveoli และ oil droplets เป็นระยะที่เริ่มมี zona radiata ล้อมรอบ โดย zona radiata มีการเปลี่ยนแปลงความหนาในระยะของโอโอไซต์ไม่เท่ากันและพบ pore canals แทรกระหว่างชั้น zona radiata เพื่อช่วยขนส่งสาร ซึ่งงานวิจัยครั้งนี้มีความสำคัญต่องานวิจัยในอนาคตเพื่อศึกษาปัจจัยที่ควบคุมกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียในระดับโมเลกุลของปลาการ์ตูนที่สามารถเปลี่ยนเพศแบบ protandrous ได้

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปี งบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 10/2561

เอกสารอ้างอิง

- Abdalla, F.C., & Cruz-landim ,C. (2004). Occurrence and ultrastructural characterization of “nuage” during oogenesis and early spermatogenesis of *Piaractus mesopotamicus* Holmberge, 1887 (Teleostei). *Brazilian Journal of Biology*, 64, 555-556.
- Aboi-Munafi, A.B., Norazmi- Lockman, N.H., Asma, N.A., Sarmiza, S., Abduh., M.Y. (2011). Histological study on the gonad of protandrous anemonefish (*Amphiprion ocellaris*). *Journal of Animal and Veterinary Advance*, 10, 3031-3036.
- Barr, W.A. (1968). Pattern of ovarian activity. In: E.J.W. Barrington and C.B. Jorgensen (eds.): *Perspective in Endocrinology: Hormones in the livers of Lower Vertebrates*. pp. 164-238. Academic press, New York.
- Bazzoli, N. (1992). Ovogenese em peixes teleosteos neotropicais de ´ agua ´ doce. Tese (Doutorado em Ciencias)—Instituto de Ciˆ encias Biolˆ ogicas, ´ Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 182 pp.
- Begovac, P.C., & Wallace, R. A. (1987). Ovary of the pipefish, *Syngnathus scovelli*. *Journal of Morphology*, 193, 117–133.
- Begovac, P.C., & Wallace. R.A. (1989). Major vitelline envelope proteins in pipefish oocytes originate within the follicle and are associated with Z₃ layer. *Journal of Experimental Zoology*, 251, 56-73.
- Brusle-Sicard, S., & Reinboth, R. (1990). Protandric hermaphrodite peculiarities in *Amphiprion frenatus* Brevoort(Teleostei, Pomacentridae). *Journal of Fish biology*, 36, 383-390.
- Çakıcı, Ö & Üçüncü, S, I.(2007). Oocyte Development in the Zebrafish, *Danio rerio* (Teleostei: Cyprinidae). *Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 24, 137–141.
- Cárdenas, R., Chávez, M., González, J.L., Aley, P., Espinosa, J., & Jiménez-García, L,F. (2008). Oocyte structure and ultrastructure in the Mexican silverside fish *Chirostoma humboldtianum* (Atheriniforme: Atherinopsidae). *Revista de biologia tropical*, 56,1371-1380.
- Casadevall, M., Delgado, E., Colleye ,O., Monserrat, S.B. & Parmentier, E. (2009). Histological study of the sex-change in the skunk clownfish *Amphiprion akallopisos*. *The Open Fish Science Journal*, 2, 55-58.
- Coello, Š., & Grimm A.S. (1990). Development of Balbiani's vitelline body in the oocyte of the antarctic mackerel, *Scomber scombrus* L. *Journal of Fish Biology*, 36, 265-267.

- Corriero, A., Acone, F., Desantis, S., Zubani, D., Deflorio, M., Ventriglia, G., & Bridges, C.R. (2004). Histological and immunohistochemical investigation on ovarian development and plasma estradiol levels in the swordfish (*Xiphias gladius* L.) *European Journal of Histochemistry*, 48, 413-422.
- Dhaneesh, K.V., Vinoth, R., Swagat Gosh, S., Gopi, M., Ajith Kumar, T., & Balasubramanian, T. (2013). Sundaresan, J., ed. "Hatchery Production of Marine Ornamental Fishes: An Alternate Livelihood Option for the Island Community at Lakshadweep". Climate Change and Island and Coastal Vulnerability (Capital Publishing Company), 17, 253-265.
- Dong, C. H., Yang, S. T., Yang, Z. A., Zhang, L., & Gui, J. F. (2004). A C-type lectin associated and translocated with cortical granules during oocyte maturation and egg fertilization in fish. *Developmental Biology*, 265, 341-354.
- Dos Santos-Silva, A.P., de Siqueira-Silva, D.H., Ninhaus-Silveira, A., & Verissimo-Silveira, R. (2015). Oogenesis in *Laetacara araguaiae* (Ottoni and Costa, 2009). *Zygote*, 24, 502-510.
- Fricke, H., & Fricke S. (1977). Monogamy and sex change by aggressive dominance in coral reef fish. *Nature*, 266, 830-832.
- Ghosh S., Ajith Kumar, T.T., & Balasubramanian, T. (2012). Determining the level of parental care relating fanning behavior of five species of clownfishes in captivity. *Indian Journal of Geo-Marine Sciences*, 41, 430-441.
- Gills, D.J., Mckeown, B.A., & Hay, D.E. (1990). Ultrastructural observations on the ovary and eggs, and development of eggs adhesion in pacific herring (*Clupea harengus pallasii*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47, 1495-1504.
- Godwin, J.R. (1994). Histological aspects of protandrous sex change in the anemonefish *Amphiprion melanopus*. *Journal of Zoology (London)*, 232, 199-213.
- Grau, A., Crespo, S., Riera, F., Pou S., & Sarasquete, M.C. (1996). Oogenesis in theamberjack *Seriola dumerili* Risso, 1810. A histological, histochemical and ultrastructural study of oocyte development. *Scientia Marina*, 60, 391-406.
- Hamlet, W.C., Jezior, M., & Spieler, R. (1999). Ultrastructural analysis of folliculogenesis in the ovary of the yellow spotted stingray *Urolophus jamaicensis*. *Annual Anatomy*, 181, 159-172.
- Higashino, T., Miura, T., Miura C., & Yamauchi K. (2002). Histological studies on early oogenesis in barfin flounder (*Verasper moseri*). *Zoological Science*, 19, 557-563.
- Humason, G.L. (1962). *Animal tissue technique*. San Francisco, W.H. Freeman. Jalabert, B. (2005). *In vitro* oocyte maturation and ovulation in rainbow trout (*Salmo gairdneri*), northern pike (*Esox Lucius*), and gold fish (*Carassius auratus*). *Journal of the Fisheries Research Board of Canada*, 33, 974-988.

- Jalabert, B. (2005). Particularities of reproduction and oogenesis in teleost fish compared to mammals. *Reproduction Nutrition Development*, 45, 261-279.
- Jiang, Y.Q., Zhang, T.T., & Yang, W.X. (2010). Formation of zona radiata and ultrastructural analysis of egg envelope during oogenesis of Chinese perch *Siniperca chuatsi*. *Micron*, 41, 7–14.
- Kayaba, T., Takeda, N., Adachi, S., & Yamauchi, K. (2001). Ultrastructure of the oocytes of the Japanese eel *Anguilla japonica* during artificially induced sexual maturation. *Fisheries Science*, 67, 870–879.
- Kaviani, E.F., Shabanipour N., & Mirnategh S.B. (2013). Light and electron microscope structural study of the zona radiata in the oocyte of zebrafish (*Danio rerio*). *Microscopy*, 62, 377–382.
- Kessel, R.G. (1983). Fibrogranular bodies, annulate lamellae and polyribosomes in the dragonfly oocytes. *Journal of Morphology*, 176, 171-180.
- Khoo, M.L., Das, S.K., & Ghaffar, M.A. (2018). Growth pattern, diet and reproductive biology of the clownfish *Amphiprion ocellaris* in waters of Pulau Tioman, Malaysia. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 44, 233-239
- Koç, N.D. (2010) . Electron and light microscopic investigations of follicular epithelium in vitellogenic oocyte of zebrafish (*Danio rerio*). *Journal of Fisheries Sciences*, 4, 144-151.
- Litsios, G., Sims, C.A., Wüest, R.O., Pearman, P.B., Zimmermann, N.E., & Salamin, N. (2012). Mutualism with sea anemones triggered the adaptive radiation of clownfishes. *BMC Evolutionary Biology*, 2, 212-217.
- Lønning, 1972. S. (1972). Comparative electron microscopic studies of teleostean eggs with special reference to the chorion. *Sarsia*, 49, 4 I-48.
- Ma, X.X., Zhu, J.Q., Zhou, H., & Yang, W.X. (2012) The formation of zona radiata in *Pseudosciaena crocea* revealed by light and transmission electron microscopy. *Micron* , 43, 435–444.
- Matsuyama, M., Nagahama, Y., & Matsuura, S. (1991). Observations on ovarian follicle ultrastructure in the marine teleost, *Pagrus major*, during vitellogenesis and oocyte maturation. *Aquaculture*, 92, 67-82.
- Miura, S., Komatsu, T.M.H., Higa, M., Bhandari, R., Nakamura, S. & Nakamura, M. (2003). Gonadal sex differentiation in protandrous anemone fish, *Amphiprion clarkia*. *Fish Physiology and Biochemistry*, 28, 165-166
- Miyazaki, K., & Bilinski, S.M. (2006) Ultrastructural investigation of the ovary and oogenesis in the pycnogonids *Cilunculus armatus* and *Ammothella biunguiculata* (Pycnogonida, Ammotheidae). *Invertebrate Biology*, 125, 346–353.
- Mourente, G., Megina, G., & Diaz-Salvago E. (2002). Lipids in female northern bluefin tuna (*Thunnus thynnus* L.) during sexual maturation. *Fish Physiology and Biochemistry*, 24, 351-363.
- Murty, S.V. (2002). Marine Ornamental Fish Resources of Lakshadweep. CMFRI, 72, 1-134.

- Nagahama, Y. (1983). The functional morphology of teleost gonads. In W. S. Hoar, D. J. Randall, and E. M. Donaldson (eds.), *Fish physiology*, Vol. IX, Reproduction, Part A, Endocrine tissues and hormones, pp. 223–275. Academic Press, New York, USA.
- Nakamura, M., Miura, S., Nozu, R., & Kobayashi, Y. (2015). Opposite-directional sex change in functional female protandrous anemonefish, *Amphiprion clarkii*: effect of aromatase inhibitor on the ovarian tissue. *Zoological Letters*, 1, 30-35.
- Santos, J.E., Padiha, G.E.V., Bomcompagni-Júnior O., Santos, G.B., Rizzo, E., & Bazzoli, N. (2006). Ovarian follicle growth in the catfish *Iheringichthys labrosus* (Siluriformes: Pimelodidae). *Tissue and Cell*, 38, 303–310.
- Shabanipour, N., & Heidari, B. (2004). A histological study of the zona radiata during late oocyte developmental stages in the Caspian sea mugilid, *Liza aurata* (Risso 1810). *Brazilian Journal of Morphological Science*, 21, 91-195.
- Shibatta, Y., Iwamatsu, T., Oba, Y., & Kobayashi, D., Tanaka, M., Nagahama, Y., Suzuki, N., Yoshikuni, M. (2000). Identification and cDNA cloning of alveoli, an extracellular metalloproteinase, which induces chorion hardening of medaka (*Oryzias latipes*) eggs upon fertilization. *The Journal of Biological Chemistry*, 275, 8349–8354.
- Shuman, C., Hodgson, G., & Ambrose, R. (2005). "Population impacts of collecting sea anemones and anemonefish for the marine aquarium trade in the Philippines". *Coral Reefs*, 24, 564–573.
- Selman, K., & Wallace, R. A. (1986). Gametogenesis in *Fundulus heteroclitus*. *American Zoologist*, 26, 173–192.
- Selman K., Wallace, R.A., & Barr V. (1988). Oogenesis in *Fundulus heteroclitus*. V. The relationship of yolk vesicles and cortical alveoli. *Journal Experimental Zoology*, 246, 42-56.
- Selman, K., & Wallace, R.A. (1989). Cellular aspects of oocyte growth in teleosts. *Zoological Science*, 6, 211-231.
- Stehr, C.M., & Hawkes, J.W. (1983). The development of the hexagonally structured egg envelope of the C-O sole (*Pleuronichthys coenosus*). *Journal of Morphology*, 178, 267-284.
- Taylor, M. S., & Hellberg, M.E. (2003). Genetic evidence for local retention of pelagic larvae in a Caribbean reef fish. *Science*, 299, 107–109.
- Thiry, M., & Poncin, P. (2005). Morphological changes of the nucleolus during oogenesis in oviparous teleost fish, *Barbus barbus* (L.). *Journal of Structural Biology*, 152, 1-13.
- Tworzydło, W., Kloc, M., & Bilinski, S.M. (2009). The Balbiani Body in the female germline cells of an earwig, *Opisthocosmia silvestris*. *Zoological Science*, 26, 754-757.

- Tyler, C.R., & Sumpter, J.P. (1996). Oocyte growth and development in teleosts. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 6, 287-318.
- Uribe, M. C., Grier, H. J., & Parenti, L. R. (2012). Ovarian structure and oogenesis of the oviparous goodeids *Crenichthys bailey* (Gilbert, 1893) and *Empetrichthys latos* Miller, 1948 (Teleostei, Cyprinodontiformes). *Journal of Morphology*, 273, 371–387.
- Wallace, R.A., & Selman, K. (1981). Cellular and dynamic aspects of oocyte growth in teleosts. *American Zoologist*, 21, 325-343.
- Yueh, W., & Chang, C. (2000). Morphological changes and competence of maturing oocytes in the Protandrous Black Porgy, *Acanthopagrus schlegeli*. *Zoological Studies*, 39, 114-122.