

เอกสารประกอบ 3

เรื่อง

ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ และ การสร้างฮอร์โมนเพศในช่วงฤดูสืบพันธุ์ของแม่ *Leiolepis belliana*

Association between Changes
in Gonad Histology and Steroidogenesis
in the Butterfly Lizard *Leiolepis belliana*
during the Reproductive Season

รายงานผลการดำเนินงาน
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2553

โครงการวิจัยย่อย
การอนุรักษ์ความหลากหลายทางชีวภาพ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง
ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ และ
การสร้างฮอร์โมนเพศในช่วงฤดูสืบพันธุ์ของแย้ *Leiolepis belliana*

Association between Changes in Gonad Histology and
Steroidogenesis in the Butterfly Lizard *Leiolepis belliana*
during the Reproductive Season

คณะผู้ดำเนินงาน
อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ
อาจารย์ ดร. จิรราช กิตนะ
รองศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2553 คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี สวนสัตว์เปิดเขาเขียว องค์การสวนสัตว์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ศูนย์เชี่ยวชาญเฉพาะทางด้านความหลากหลายทางชีวภาพภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผู้ช่วยวิจัย อาสาสมัคร และผู้ร่วมงานทุกท่าน ที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

แยะ *Leiolepis belliana* (Order Squamata, Family Agamidae) เป็นสัตว์เลื้อยคลานที่พบกระจายทั่วไปเป็นบริเวณกว้างตั้งแต่ภาคกลาง ตะวันตก ตะวันออก และภาคใต้ ของประเทศไทย ในปัจจุบันประชากรแยะได้รับผลกระทบจากกิจกรรมของมนุษย์จนมีจำนวนลดลงมาก จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเตรียมมาตรการอนุรักษ์ทั้งด้านการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์และการจัดการที่ช่วยให้ประชากรแยะเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพในธรรมชาติ อย่างไรก็ตามมาตรการเหล่านี้ยังต้องการผลการวิจัยเกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ของแยะมารองรับ การศึกษารุ่นนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์และการสร้างฮอร์โมนเพศ ในช่วงฤดูสืบพันธุ์ของแยะ *L. belliana* โดยเก็บตัวอย่างแยะจากแหล่งที่อยู่ธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว จังหวัดชลบุรี ในระหว่างเดือนธันวาคม 2552 ถึงเดือนพฤศจิกายน 2553 แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศชนิดสเตียรอยด์ พบว่า แยะ *L. belliana* จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว มีวงรอบการสืบพันธุ์แบบเป็นรอบปี โดยมีฤดูการผลิตสืบพันธุ์เพียงช่วงเวลาเดียวในรอบปี โดยแยะเพศผู้มีค่าดัชนีความสมบูรณ์ของอวัยวะ (gonadosomatic index, GSI) สูงสุด ในเดือนธันวาคม ซึ่งเกิดขึ้นสอดคล้องกับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ และการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศชนิดสเตียรอยด์ ส่วนแยะเพศเมีย มีค่าดัชนีความสมบูรณ์ของรังไข่สูงสุด ในช่วงเดือนธันวาคม และมีการตกไข่ในช่วงเดือนธันวาคม-กุมภาพันธ์

คำสำคัญ: แยะ ค่าดัชนีความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ จุลกายวิภาคของอวัยวะ ฮอร์โมนเพศชนิดสเตียรอยด์

Abstract

Butterfly lizard *Leiolepis belliana* (Order Squamata, Family Agamidae) is a common reptile that widely distribute in every parts of Thailand. At present, butterfly lizard population is under serious threat from human activity. It is thus crucial to prepare conservation measures for captive breeding program as well as other conservation management to increase population size in nature. The current research aims to study association between gonad histology and steroidogenesis during the reproductive season of the butterfly lizard. Lizard samples were collected from a natural population of *L. belliana* living in vicinity of Khao Khiew Open Zoo, Chonburi Province during December 2009 to November 2010. Lizards were examined for reproductive morphological characters, gonad histology and steroidogenesis of sex hormones. The results showed that the natural population of *L. belliana* in this area has a distinct reproductive season. Male lizard showed the highest gonadosomatic index (GSI) in December, associating with well-defined pattern of spermatogenesis and steroidogenesis in testis. In female lizard, the highest gonadosomatic index (GSI) was also highest in December, associating with period of ovulation in December-February.

Keyword: *Leiolepis belliana*, gonadosomatic index, gonad histology, steroidogenesis

สารบัญเรื่อง

ชื่อเรื่อง

กิตติกรรมประกาศ.....	i
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	iii
สารบัญเรื่อง.....	iv
สารบัญตาราง.....	v
สารบัญรูป.....	vi
บทนำ	1
วิธีดำเนินการศึกษา	2
ผลการดำเนินงาน	4
สรุปผลการศึกษา	13
ข้อเสนอแนะ	14
เอกสารอ้างอิง.....	14

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1: ข้อมูลตัวอย่างแม่ <i>Leiolepis belliana</i> ที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ ในบริเวณ โคขروبสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 – พฤศจิกายน 2553	5
--	---

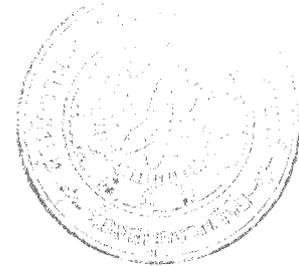
สารบัญรูป

ภาพที่ 1: ตัวอย่างแ้ <i>Leiolepis belliana</i>	3
ภาพที่ 2: การเปลี่ยนแปลงความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ (พิจารณาจากค่า gonadosomatic index) ของแ้เพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ ในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 – พฤศจิกายน 2553	7
ภาพที่ 3: การเปลี่ยนแปลงความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ (พิจารณาจากค่า gonadosomatic index) ของแ้เพศเมียจากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ ในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 – พฤศจิกายน 2553	8
ภาพที่ 4: จุลกายวิภาคของอวัยวะเพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 (ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออวัยวะเพศ ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin) กำลังขยาย 100 เท่า (เส้น bar scale มีขนาด 100 ไมโครเมตร)	9
ภาพที่ 5: จุลกายวิภาคของอวัยวะเพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 (ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออวัยวะเพศ ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin) กำลังขยาย 200 เท่า (เส้น bar scale มีขนาด 100 ไมโครเมตร)	10
ภาพที่ 6: แผนผังแสดงการสังเคราะห์สเตอรอยด์ (steroidogenic pathway) ในกรอบสีแดงแสดงเอนไซม์ 3-beta hydroxy steroid dehydrogenase (3 β -HSD) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของการสังเคราะห์	11
ภาพที่ 7: จุลกายวิภาคของอวัยวะเพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 (ก: ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออวัยวะเพศ ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin, ข: ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออวัยวะเพศเมื่อตรวจสอบหาตำแหน่งที่มีการทำงานของเอนไซม์ 3 β -HSD) กำลังขยาย 50 เท่า (เส้น bar scale มีขนาด 200 ไมโครเมตร)	12
ภาพที่ 8: จุลกายวิภาคของอวัยวะเพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 แสดงตำแหน่งที่มีการทำงานของเอนไซม์ 3 β -HSD กำลังขยาย 200 เท่า ซึ่งเป็นตำแหน่งของ Leydig cell ที่อยู่รอบท่อ seminiferous tubule (เส้น bar scale มีขนาด 50 ไมโครเมตร)	13

ชื่อเรื่อง (ภาษาไทย) : ความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ และการสร้าง
ฮอร์โมนเพศ ในช่วงฤดูสืบพันธุ์ของแย์ *Leiolepis belliana*

(ภาษาอังกฤษ) Association between Changes in Gonad Histology and
Steroidogenesis in the Butterfly Lizard *Leiolepis belliana* during the
Reproductive Season

ชื่อผู้วิจัย อาจารย์ ดร. นพดล กิตนะ
อาจารย์ ดร. จิรารักษ์ กิตนะ
รองศาสตราจารย์ ผุสดี ปริยานนท์



บทนำ: ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

แย์ (butterfly lizard) เป็นสัตว์เลื้อยคลานกลุ่มเดียวกับกิ้งก่า แต่ไม่มีหงอน (crest) เหมือนกิ้งก่า และสีผิวปรับเปลี่ยนไม่ได้เหมือนกิ้งก่า ท้องและอกมีสีส้มสด ตัวผู้จะมีพังผืดด้านข้าง และสีสดกว่าตัวเมีย อาศัยอยู่เกือบทุกภูมิภาคของประเทศ แย์ในประเทศไทยแบ่งได้เป็น 4 ชนิด คือ แย์ที่พบกระจายทั่วไปเป็นบริเวณกว้างตั้งแต่ภาคกลาง ตะวันตก ตะวันออก และภาคใต้ คือ *Leiolepis belliana* แย์ที่อาศัยในภาคตะวันออกเฉียงเหนือคือ *Leiolepis reevesii rubritaeniata* แย์ภาคเหนือมีชื่อว่า *Leiolepis ocellata* และแย์ที่พบเฉพาะในเขตจังหวัดนครศรีธรรมราชและสงขลา คือ *Leiolepis boehmei* ฤดูผสมพันธุ์ของแย์แบ่งออกเป็น 2 ช่วงในรอบปี คือ ระหว่างเดือนมกราคมถึงเดือนมีนาคม และระหว่างเดือนพฤษภาคมถึงเดือนสิงหาคม แย์ตัวเมียออกไข่ครั้งละ 4-10 ฟอง ลักษณะไข่ไม่มีเปลือกแข็งหุ้มเหมือนไข่ไก่ แต่มีเปลือกนุ่มคล้ายไข่เต่า ขนาดเล็กกว่าและลักษณะรี เมื่อลูกแย์ฟักออกจากไข่จะอาศัยร่วมอยู่กับแม่ประมาณ 1-2 สัปดาห์ จากนั้นก็จะแยกไปขุดรูอาศัยของตนเองต่อไป โดยสามารถพบลูกแย์ในช่วงระหว่างเดือนมิถุนายนถึงเดือนกรกฎาคม และเดือนพฤศจิกายนถึงเดือนธันวาคม อย่างไรก็ตามการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแย์ยังมีข้อมูลไม่มากนัก โดยเฉพาะการศึกษาเกี่ยวกับการสืบพันธุ์และรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของระดับฮอร์โมนเพศ

แม้ว่าสถานภาพของแย์ในปัจจุบันยังไม่ถือว่าเป็นสัตว์ที่ใกล้สูญพันธุ์ แต่ถ้าเปรียบเทียบปริมาณของแย์ในอดีตกับปัจจุบันก็นับว่าประชากรลดลงเป็นอย่างมาก การลดลงของประชากรสัตว์เลื้อยคลาน โดยเฉพาะ แย์ ในช่วงที่ผ่านมา อาจมาจากสาเหตุหลายอย่างด้วยกัน เช่น การบุกรุกและทำลายถิ่นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติ การถูกจับไปเป็นอาหาร มลพิษและการปนเปื้อนสารกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ รวมทั้งการเกิดภาวะโลกร้อน เป็นต้น จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเตรียมมาตรการด้านการอนุรักษ์เพื่อรองรับการลดลงของประชากรแย์ ทั้งด้านการเพาะเลี้ยงเพื่อขยายพันธุ์และการจัดการที่ช่วยให้ประชากรแย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างมีประสิทธิภาพในธรรมชาติ

ในการศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาด้านชีววิทยาการสืบพันธุ์ของแยะ โดยมุ่งศึกษาความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ และการสร้างฮอร์โมนเพศ ในช่วงฤดูสืบพันธุ์ของแยะ *Leiolepis belliana* ซึ่งเป็นกลุ่มแยะมีการจับมาเพื่อบริโภคค่อนข้างมากในแทบทุกภูมิภาคของประเทศไทย เพื่อให้ได้ข้อมูลพื้นฐานเบื้องต้นที่จะเป็นประโยชน์ในการพัฒนาไปสู่แนวทางการอนุรักษ์ ตลอดจนนำไปใช้ประโยชน์ในการจัดการด้านการเพาะเลี้ยงและการขยายพันธุ์แยะต่อไปในอนาคต

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ของแยะ *Leiolepis belliana* เพศผู้และเพศเมีย ในช่วงฤดูสืบพันธุ์
2. เพื่อศึกษาการสร้างฮอร์โมนเพศกลุ่มสเตียรอยด์ในอวัยวะสืบพันธุ์ของแยะ *Leiolepis belliana* เพศผู้และเพศเมีย ในช่วงฤดูสืบพันธุ์

พื้นที่สำรวจและเก็บตัวอย่าง

พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. เก็บตัวอย่างแยะ *Leiolepis belliana* เพศผู้ และเพศเมีย ในแหล่งที่อยู่อาศัยในธรรมชาติภายในพื้นที่โดยรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (ดำเนินการโดยเจ้าหน้าที่สวนสัตว์เปิดเขาเขียว) เริ่มตั้งแต่ต้นเดือนธันวาคม พ.ศ. 2552 ซึ่งเป็นช่วงปลายของระยะที่มีรายงานการพบระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนสูงในแยะเพศผู้ที่อยู่ในบ่อเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียว (Pariyanonth et al., 2009) จนครบรอบปี โดยได้จำนวนตัวอย่างทั้งหมดในช่วงที่ดำเนินการ (ธันวาคม 2552-พฤศจิกายน 2553) ดังนี้

เดือนธันวาคม 2552 (ต้นเดือน)	แยะเพศผู้ 5 ตัว	แยะเพศเมีย 1 ตัว
เดือนธันวาคม 2552 (ปลายเดือน)	แยะเพศผู้ 10 ตัว	แยะเพศเมีย – ตัว
เดือนกุมภาพันธ์ 2553	แยะเพศผู้ 1 ตัว	แยะเพศเมีย 3 ตัว
เดือนพฤษภาคม 2553	แยะเพศผู้ 1 ตัว	แยะเพศเมีย 4 ตัว
เดือนมิถุนายน 2553	แยะเพศผู้ 1 ตัว	แยะเพศเมีย 2 ตัว
เดือนกรกฎาคม 2553	แยะเพศผู้ 1 ตัว	แยะเพศเมีย 3 ตัว
เดือนกันยายน 2553	แยะเพศผู้ 2 ตัว	แยะเพศเมีย 5 ตัว
เดือนพฤศจิกายน 2553	แยะเพศผู้ 3 ตัว	แยะเพศเมีย – ตัว

2. นำตัวอย่างแยะที่มีขนาดความยาวจากปลายจมูกถึงรูก้น (snout-vent length, SVL) มากกว่า 90 มิลลิเมตร (ข้อมูลในตารางที่ 1) มาเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ ดังนี้
 - 2.1 วัดขนาดและน้ำหนักตัวของแยะ ดังนี้ ความยาวจากปลายจมูกถึงรูก้น (snout-vent length, SVL), ความยาวหาง (tail length, TL) และ น้ำหนักตัว (body weight, BW)
 - 2.2 ทำการุณยฆาตด้วยการฉีดยาสลบ sodium pentobarbital เข้าช่องท้องด้วยขนาด 15 เท่าของปริมาณที่ใช้สลบตามปกติ
 - 2.3 ผ่าตัดเพื่อเก็บตัวอย่าง ตับ ไต และท่อในระบบสืบพันธุ์ (epididymis หรือ ท่อนำไข่) แล้วนำมาเก็บรักษาในสารละลาย neutral buffer formalin 10% เพื่อนำมาผ่านกระบวนการมาตรฐาน (standard paraffin method) แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin ก่อนเตรียมเป็นสไลด์ถาวร (Presnell and Schreibman, 1997) เพื่อตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับจุลกายวิภาคต่อไป
 - 2.4 ผ่าตัดเพื่อเก็บตัวอย่างอวัยวะสืบพันธุ์ (อัณฑะ หรือ รังไข่) แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก จากนั้นเก็บเนื้อเยื่อบางส่วนด้วยวิธีการแช่แข็งเพื่อนำไปตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroidogenic activity) และเก็บเนื้อเยื่อส่วนที่เหลือไว้ในสารละลาย neutral buffer formalin 10% เพื่อนำมาผ่านกระบวนการมาตรฐาน แล้วย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin ก่อนเตรียมเป็นสไลด์ถาวร (Presnell and Schreibman, 1997) เพื่อนำมาตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในระดับจุลกายวิภาคต่อไป
3. วิเคราะห์ดัชนี gonadosomatic index (GSI) เพื่อตรวจสอบความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ดังนี้

$$GSI = \frac{\text{น้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์}}{\text{น้ำหนักตัว}} \times 100$$



ภาพที่ 1: ตัวอย่างแยะ *Leiolepis belliana*

4. นำตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ที่แช่แข็งมาตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน (steroidogenic activity) ด้วยเทคนิคทาง histochemistry ดังนี้
 - 4.1 นำตัวอย่างเนื้อเยื่อที่แช่แข็ง มาฝังใน tissue freezing medium แล้ววางบนแป้นสำหรับตัดเนื้อเยื่อ
 - 4.2 ตัดเนื้อเยื่อแบบ frozen section ที่อุณหภูมิ -20°C ด้วยเครื่อง cryostat ให้ได้ชิ้นเนื้อเยื่อที่มีความหนาเท่ากับ 20 ไมโครเมตร แล้วติดลงบนกระจกปิดสไลด์ที่เคลือบด้วยสาร poly-L-lysine
 - 4.3 นำชิ้นเนื้อเยื่อจุ่มใน acetone เย็น เพื่อรักษาสภาพของเอนไซม์ ก่อนล้างด้วยสารละลายฟอสเฟต
 - 4.4 นำชิ้นเนื้อเยื่อมาตรวจสอบการทำงานของเอนไซม์ 3-beta hydroxy steroid dehydrogenase ($3\beta\text{-HSD}$) โดยนำมา incubate ในสารละลายฟอสเฟตที่มีสารตั้งต้น คือ dehydro epiandrosterone (DHEA) และมี nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) และ nitroblue-tetrazolium (NBT) เป็นสารสำหรับปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดสี ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงโดยในการทำปฏิกิริยาจะเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อที่แช่ในสารละลายแบบเดียวกันที่ไม่ได้ใส่สารตั้งต้นสำหรับปฏิกิริยา (DHEA) เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (Levy, Deane and Rubin, 1959)
 - 4.5 ล้างเนื้อเยื่อด้วยสารละลายฟอสเฟต ก่อนนำมารักษาสภาพเนื้อเยื่อ แล้วนำไปผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydrate), ทำให้ชิ้นเนื้อเยื่อมีความโปร่งแสง (clear) ก่อนนำไป mount บนกระจกสไลด์ โดยใช้ DPX เป็นตัวกลาง
 - 4.6 ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเพื่อหาตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน จากบริเวณที่ปรากฏสีน้ำเงินเข้มของสาร formazan

ผลการศึกษา

1. ข้อมูลพื้นฐานวิทยาของแฉะ

จากการเก็บตัวอย่างแฉะที่มีขนาด SVL มากกว่า 90 มิลลิเมตร ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 ถึง พฤศจิกายน 2553 ได้ตัวอย่างแฉะทั้งสิ้น 42 ตัว เป็นแฉะเพศผู้ 24 ตัว และ แฉะเพศเมีย 18 ตัว โดยมีข้อมูลขนาดทางสัณฐานวิทยา และน้ำหนักตัวดังแสดงในตารางที่ 1 และมีคำอธิบายตัวอักษรย่อ ดังนี้

SVL = ความยาวจากปลายจมูกถึงรูก้น (snout-vent length)

TL = ความยาวหาง (tail length)

Total L = ความยาวทั้งตัว (total length)

Body Wt = น้ำหนักตัว (body weight)

Gonad Wt = น้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad weight)

GSI = gonadosomatic index

ตารางที่ 1: ข้อมูลตัวอย่างแม่ *Leiolepis belliana* ที่เก็บตัวอย่างจากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ ในบริเวณโดยรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 – พฤศจิกายน 2553

Number	Sex	SVL (mm)	TL (mm)	Total L (mm)	Body Wt (g)	Gonad Wt (g)	GSI (%)
เดือนธันวาคม 2552							
1	Male	119.22	237.03	356.25	41.40	0.3765	0.9094
2	Male	116.42	209.52	325.94	40.44	0.4825	1.1931
3	Male	114.28	205.30	319.58	39.02	0.3581	0.9177
4	Male	124.29	261.55	385.84	56.53	0.5722	1.0122
5	Male	123.19	256.68	379.87	54.42	0.5965	1.0961
6	Female	99.65	202.03	301.68	26.84	2.3687	8.8253
เดือนธันวาคม 2552 / มกราคม 2553							
7	Male	116.40	246.70	363.10	39.77	0.1007	0.2532
8	Male	122.51	266.12	388.63	49.90	0.1651	0.3309
9	Male	131.62	121.66	253.28	55.12	0.1262	0.2290
10	Male	109.63	238.48	348.11	37.64	0.0484	0.1286
11	Male	124.52	265.34	389.86	50.99	0.2332	0.4573
12	Male	151.19	311.84	463.03	86.65	0.2117	0.2443
13	Male	145.54	294.46	440.00	80.39	0.0866	0.1077
14	Male	104.69	221.79	326.48	30.37	0.0700	0.2305
15	Male	146.50	313.26	459.76	74.25	0.0883	0.1189
16	Male	143.90	305.76	449.66	82.79	0.0908	0.1097
เดือนกุมภาพันธ์ 2553							
18	Male	104.31	215.85	320.16	28.16	0.0171	0.0607
17	Female	107.04	222.29	329.33	28.37	0.0184	0.0649
19	Female	112.85	239.09	351.94	32.31	0.0307	0.0950
20	Female	118.32	256.73	375.05	36.81	0.0438	0.1190

ตารางที่ 1 (ต่อ):

Number	Sex	SVL (mm)	TL (mm)	Total L (mm)	Body Wt (g)	Gonad Wt (g)	GSI (%)
เดือนพฤษภาคม 2553							
21	Male	125.5	265.14	390.64	57.09	0.0754	0.1321
22	Female	120.62	251.25	371.87	44.89	0.054	0.1203
23	Female	116.45	154.05	270.5	42.67	0.0562	0.1317
24	Female	117.42	144.64	262.06	45.23	0.0595	0.1315
25	Female	119.67	238.78	358.45	47.12	0.0691	0.1466
เดือนมิถุนายน 2553							
26	Male	127.15	255.83	382.98	64.28	0.0373	0.0580
27	Female	117.51	228.55	346.06	45.57	0.0524	0.1150
28	Female	114.61	243.82	358.43	43.2	0.0388	0.0898
เดือนกรกฎาคม 2553							
29	Male	92.57	179.43	272	23.55	0.0237	0.1006
30	Female	102.49	215.31	317.8	32.7	0.0224	0.0685
31	Female	101.31	85.75	187.06	25.89	0.0417	0.1611
32	Female	106.68	211.35	318.03	33.03	0.0424	0.1284
เดือนกันยายน 2553							
33	Male	124.29	245.01	369.3	53.47	0.0674	0.1261
34	Male	118.98	170.46	289.44	38.8	0.0533	0.1374
35	Female	121.53	191.24	312.77	38.66	0.0461	0.1192
36	Female	107	214	321	23.23	0.0617	0.2656
37	Female	126	225	351	30.78	0.0498	0.1618
38	Female	123	106	229	40.18	0.065	0.1618
39	Female	118	246	364	41.07	0.0475	0.1157
เดือนพฤศจิกายน 2553							
40	Male	108.87	174.63	283.5	34.75	0.3495	1.0058
41	Male	114.32	234.52	348.84	44.75	0.3183	0.7113
42	Male	135.81	280.98	416.79	72.96	0.5066	0.6944

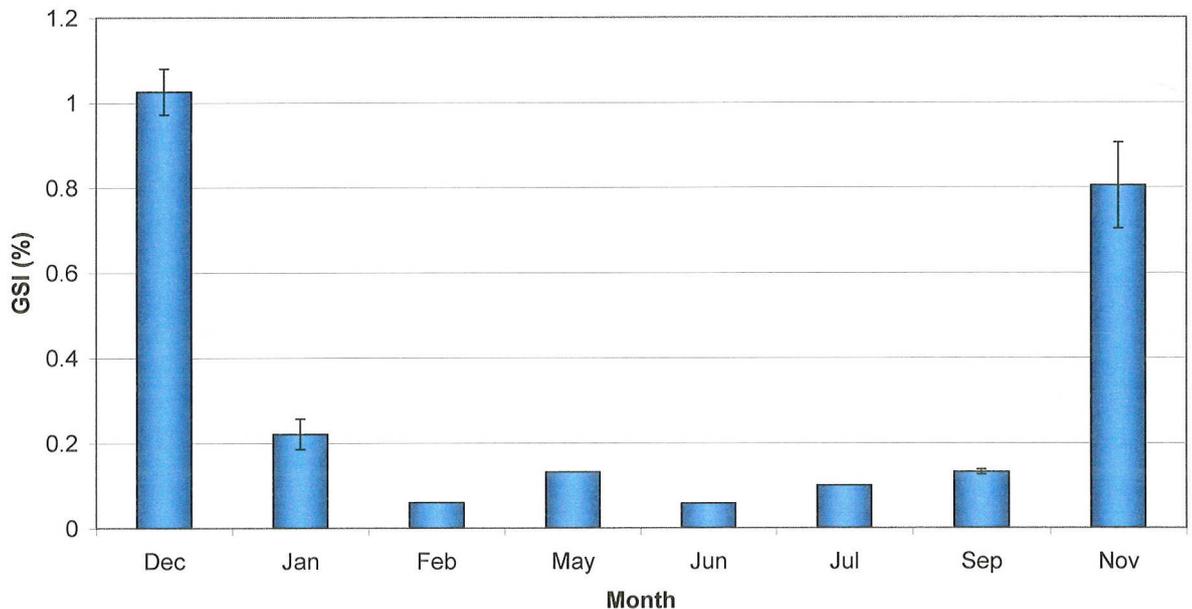
2. วงสืบพันธุ์ของแยะเมื่อพิจารณาจากค่า gonadosomatic index

เมื่อนำน้ำหนักอวัยวะสืบพันธุ์และน้ำหนักตัวมาคำนวณหาค่า gonadosomatic index (GSI) เพื่อแสดงความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ แล้วนำมาเปรียบเทียบระหว่างช่วงเวลาต่าง ๆ ในรอบปี พบว่าแยะทั้งสองเพศมีค่าดัชนี GSI ที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาในรอบปี แสดงให้เห็นว่าแยะ *L. belliana* เป็นสัตว์ที่มีวงรอบการสืบพันธุ์แบบเป็นรอบปี โดยมีช่วงเวลาที่มีอวัยวะสืบพันธุ์มีความสมบูรณ์และเหมาะต่อการสืบพันธุ์เพียงบางช่วงเวลาในรอบปี หรืออาจกล่าวได้ว่าแยะเป็นสัตว์ที่สืบพันธุ์เป็นฤดูกาล (seasonal breeder; Zug, Vitt and Caldwell, 2001)

ค่า GSI ในแยะเพศผู้มีค่าสูงในช่วงปลายปีกล่าวคือ มีค่าสูงในช่วงเดือนพฤศจิกายน และมีค่าสูงสุดที่เดือนธันวาคม แสดงให้เห็นการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ในช่วงเวลาดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Pariyanonth et al. (2009) ซึ่งพบว่าแยะเพศผู้ในบ่อเลี้ยงของสวนสัตว์เปิดเขาเขียวมีระดับฮอร์โมนเทสโทสเตอโรนสูงในช่วงเวลาดังกล่าวเช่นกัน

ในช่วงเวลาอื่นของปี แยะเพศผู้จะมีแนวโน้มการลดลงของค่า GSI อย่างต่อเนื่อง ซึ่งแสดงถึงการลดกิจกรรม (การสร้างฮอร์โมน, การสร้างเซลล์สืบพันธุ์) ของอวัยวะสืบพันธุ์ภายหลังจากหมดฤดูสืบพันธุ์ของแยะ ในพื้นที่ดังกล่าว

Male Gonado-Somatic Index



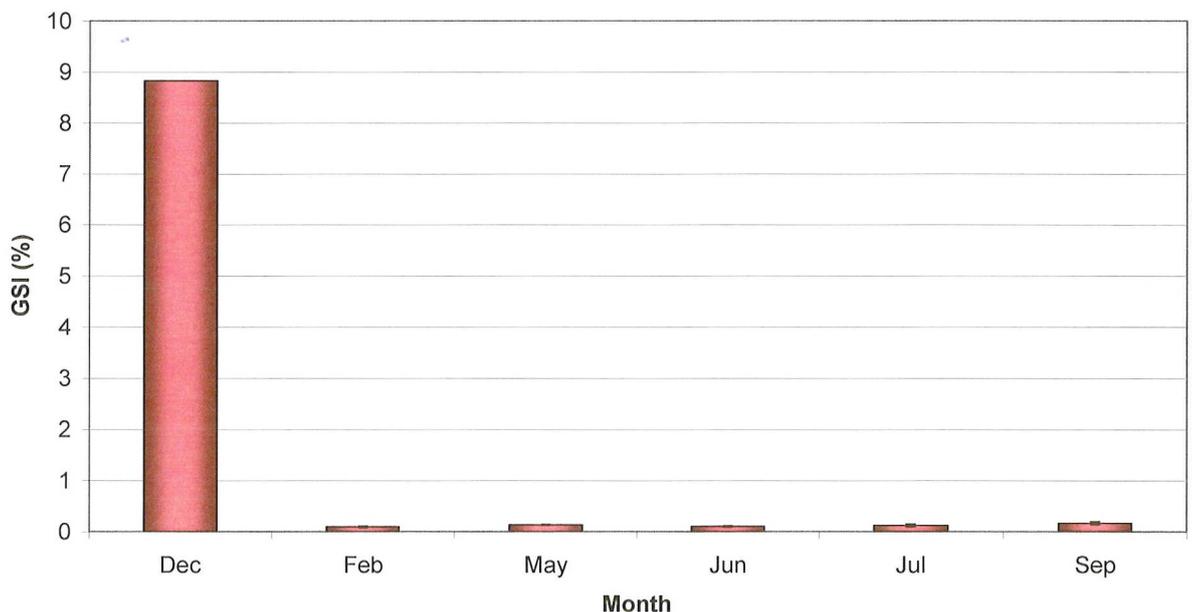
ภาพที่ 2: การเปลี่ยนแปลงความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ (พิจารณาจากค่า gonadosomatic index) ของแยะเพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ ในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 – พฤศจิกายน 2553

จากตัวอย่างแยะเพศเมียมีเก็บได้ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าแยะมีค่า GSI สูงสุดในเดือนธันวาคม เช่นกัน แสดงให้เห็นการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ในช่วงเวลาดังกล่าว และหลังจากนั้นจะมีแนวโน้มการลดลงของค่า GSI อย่างต่อเนื่องในช่วงเวลาอื่นของปี รูปแบบการเปลี่ยนแปลง GSI ของแยะ มีลักษณะใกล้เคียงกับการเปลี่ยนแปลง GSI ในรอบปีของกิ้งก่า *Calotes versicolor* ที่อาศัยในเขตร้อนเช่นกัน โดยจะพบค่า GSI สูงสุดเพียงแค่ช่วงเวลาสั้น ๆ ในรอบปี และจะมีค่า GSI ต่ำในระดับพื้นฐานในช่วงเวลาอื่น (Shanbhag and Prasad, 1993)

ข้อมูลการเปลี่ยนแปลง GSI ที่พบในช่วงเดือนธันวาคม ถึง กุมภาพันธ์ ยังแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงที่น่าสนใจ คือ ค่า GSI ของแยะเพศเมียมีค่าลดลงจากค่าสูงสุดในรอบปี (8.82% ในเดือนธันวาคม) ลงมายังค่าต่ำสุดในรอบปี ($0.09 \pm 0.01\%$ ในเดือนกุมภาพันธ์) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เด่นชัดในลักษณะนี้เป็นสัญญาณแสดงถึงการตกไข่ (ovulation) ของสัตว์ ทำให้น้ำหนักของรังไข่ลดลงอย่างมากภายหลังจากที่มีการตกไข่ (Shanbhag and Prasad, 1993)

สำหรับค่า GSI ที่ค่อนข้างต่ำในช่วงเวลาอื่นของปี แสดงถึงการลดกิจกรรม (การสร้างฮอร์โมน, การสร้างเซลล์สืบพันธุ์) ของอวัยวะสืบพันธุ์ภายหลังจากหมดฤดูสืบพันธุ์ของแยะ ในพื้นที่ดังกล่าว ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Radder, Shanbhag and Saidapur (2001) ซึ่งพบการลดลงของฮอร์โมนเพศชนิดสเตรอยด์ในพลาสมาของกิ้งก่า *Calotes versicolor* ในช่วงนอกฤดูกาลสืบพันธุ์

Female Gonado-Somatic Index

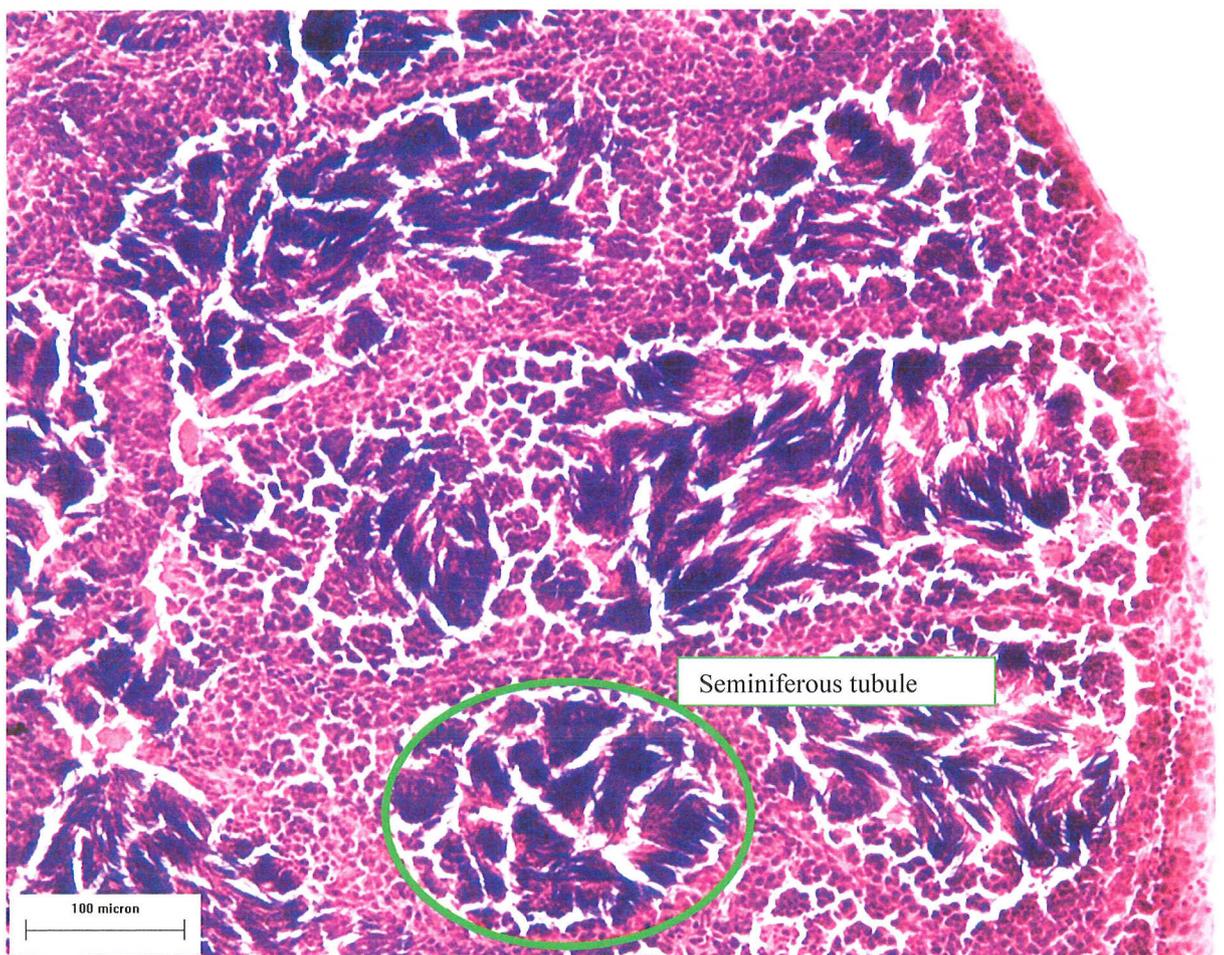


ภาพที่ 3: การเปลี่ยนแปลงความสมบูรณ์ของอวัยวะสืบพันธุ์ (พิจารณาจากค่า gonadosomatic index) ของแยะเพศเมียจากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ ในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 – พฤศจิกายน 2553

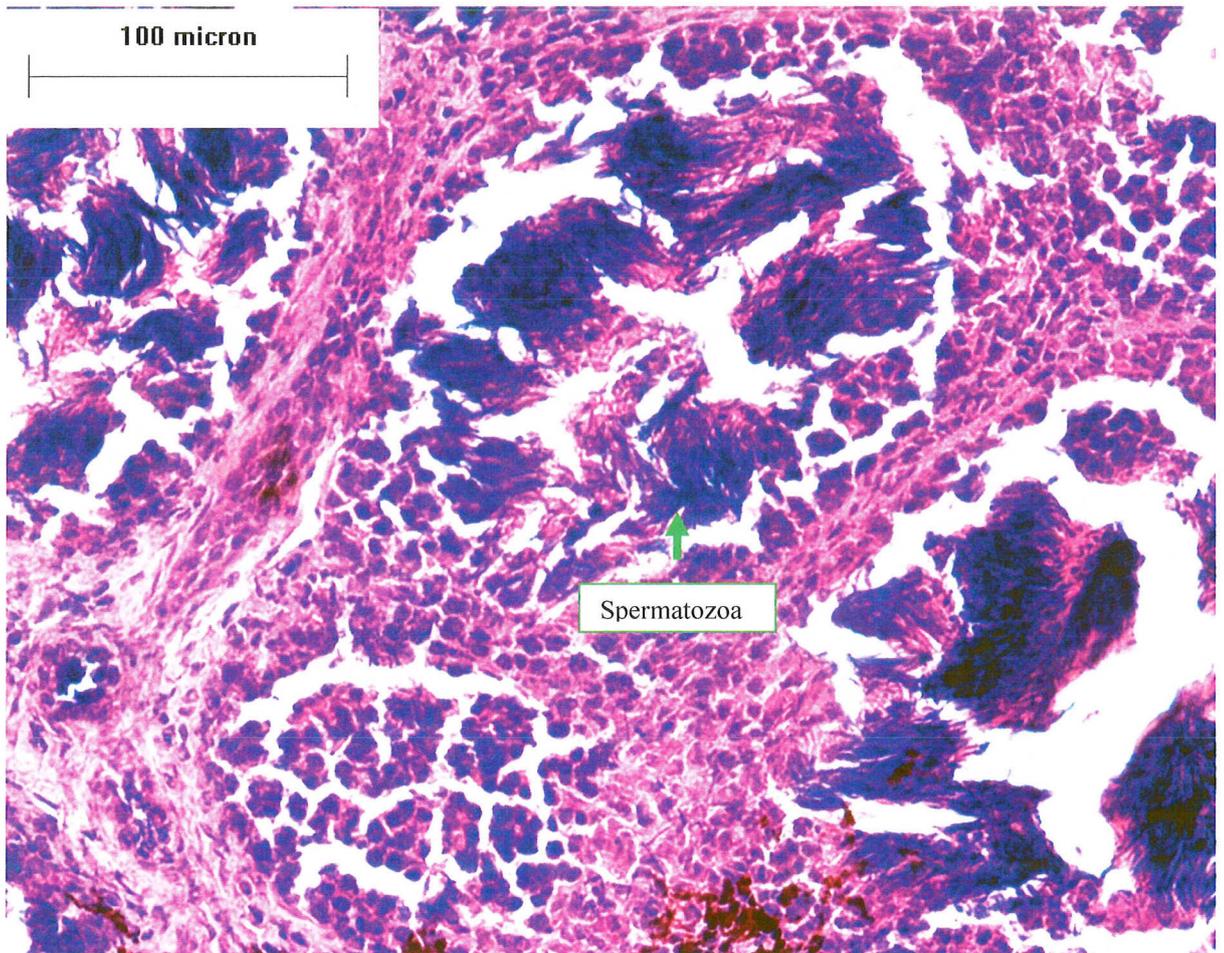
จากการเปลี่ยนแปลงของค่า GSI ที่ค่อนข้างเด่นชัด และสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดวงสืบพันธุ์ได้ชัดเจนในแฉะเพศเมีย ประกอบกับจำนวนตัวแฉะเพศเมียที่ได้มาค่อนข้างจำกัดในแต่ละช่วงเวลา ในการศึกษาครั้งนี้จึงไม่ได้นำตัวอย่างเนื้อเยื่อของรังไข่มาตรวจสอบลักษณะทางจุลกายวิภาคและการทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมน และใช้เพียงตัวอย่างแฉะผู้สำหรับการศึกษาในตอนต่อไป

3. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออัณฑะของแฉะ

เมื่อนำตัวอย่างเนื้อเยื่ออัณฑะของแฉะเพศผู้ในช่วงที่มีค่า GSI สูงสุด (ธันวาคม) มาเตรียมเป็นสไลด์ถาวร (Presnell and Schreibman, 1997) แล้วตรวจสอบลักษณะทางจุลกายวิภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าในช่วงเวลาดังกล่าวเป็นช่วงที่มีการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (active spermatogenesis) โดยพบเซลล์สืบพันธุ์ (spermatozoa) ที่สมบูรณ์อยู่ภายในท่อ seminiferous tubule เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 4-5)



ภาพที่ 4 จุลกายวิภาคของอัณฑะแฉะผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 (ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออัณฑะแฉะ ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin) กำลังขยาย 100 เท่า (เส้น bar scale มีขนาด 100 ไมโครเมตร)

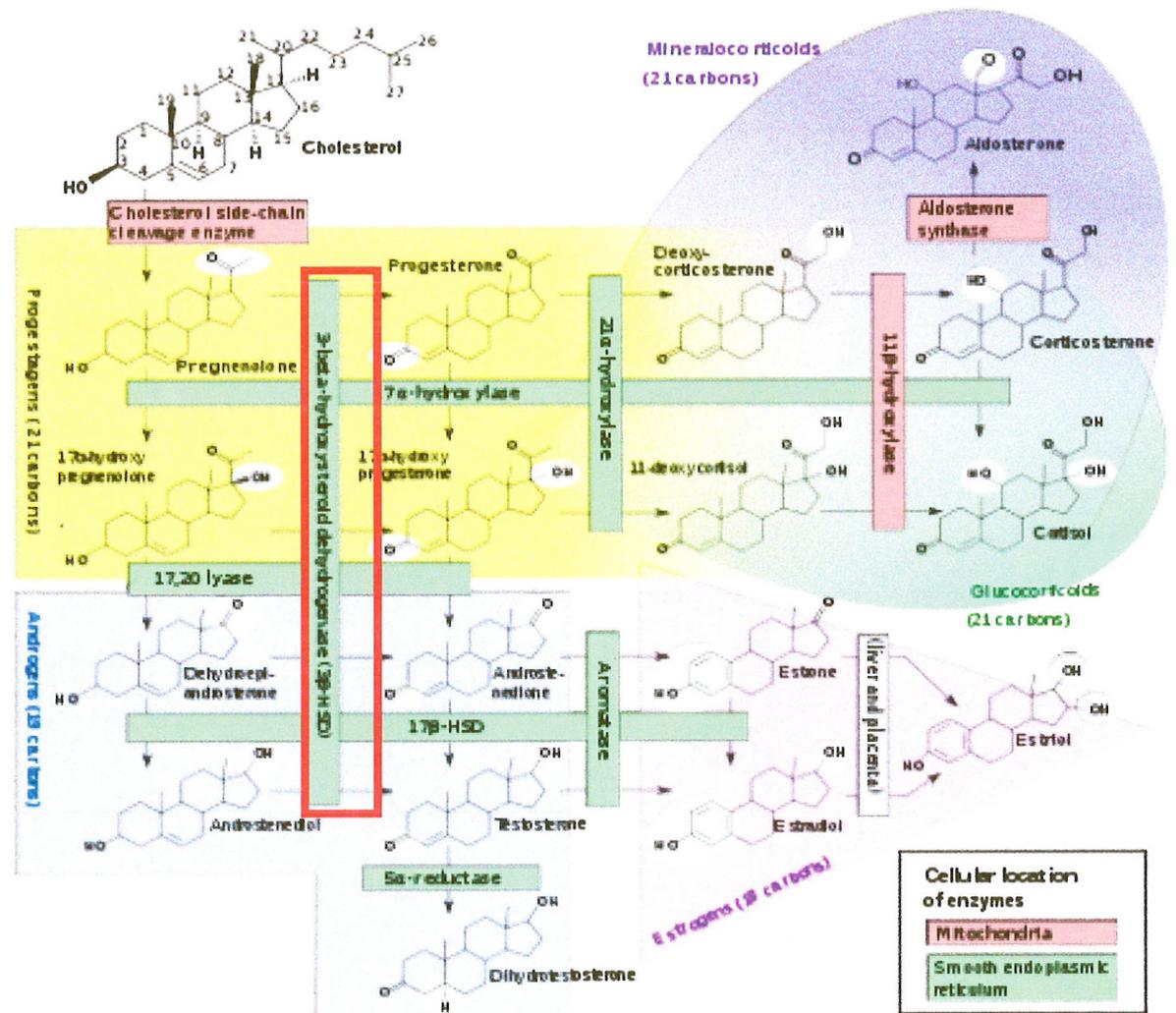


ภาพที่ 5 จุลกายวิภาคของอัณฑะแฉ้เพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 (ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออัณฑะแฉ้ ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin) กำลังขยาย 200 เท่า (เส้น bar scale มีขนาด 100 ไมโครเมตร)

เมื่อพิจารณาจากลักษณะความสมบูรณ์ของเซลล์สืบพันธุ์ที่พบในช่วงเวลาดังกล่าว ประกอบกับการพบช่วงเวลาตกไข่ของแฉ้เพศเมียในช่วงระหว่างเดือนธันวาคม-กุมภาพันธ์ จึงแสดงให้เห็นว่า ฤดูกาลสืบพันธุ์ของแฉ้ *L. belliana* ที่อาศัยในบริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียวน่าจะอยู่ในช่วงเดือนธันวาคม-กุมภาพันธ์ เช่นกัน

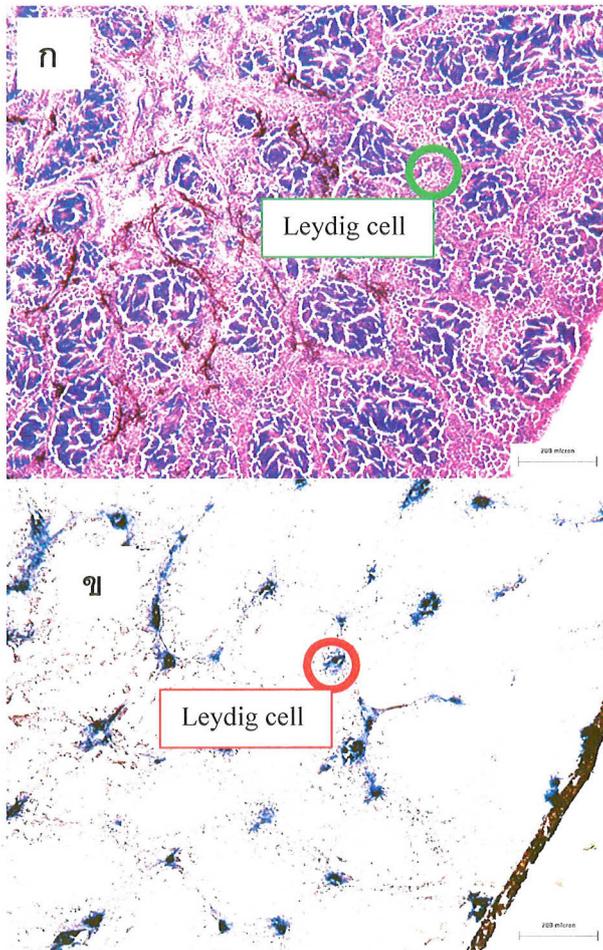
4. การทำงานของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ฮอร์โมนที่เป็นสเตียรอยด์ในอวัยวะของ
 ไฝ่

การทำงานของเอนไซม์ 3-beta hydroxy steroid dehydrogenase (3β-HSD) เป็นเอนไซม์ตั้ง
 ต้นที่สำคัญสำหรับการสร้างฮอร์โมนเพศที่เป็นสเตียรอยด์ทุกชนิด (ภาพที่ 6; Johnson and Everitt,
 2000) การพบตำแหน่งที่มีเอนไซม์ 3β-HSD ทำงานอยู่จึงแสดงให้เห็นว่าเป็นตำแหน่งที่สามารถสร้าง
 ฮอร์โมนที่เป็นสเตียรอยด์ได้ (Doddamani, 1994)

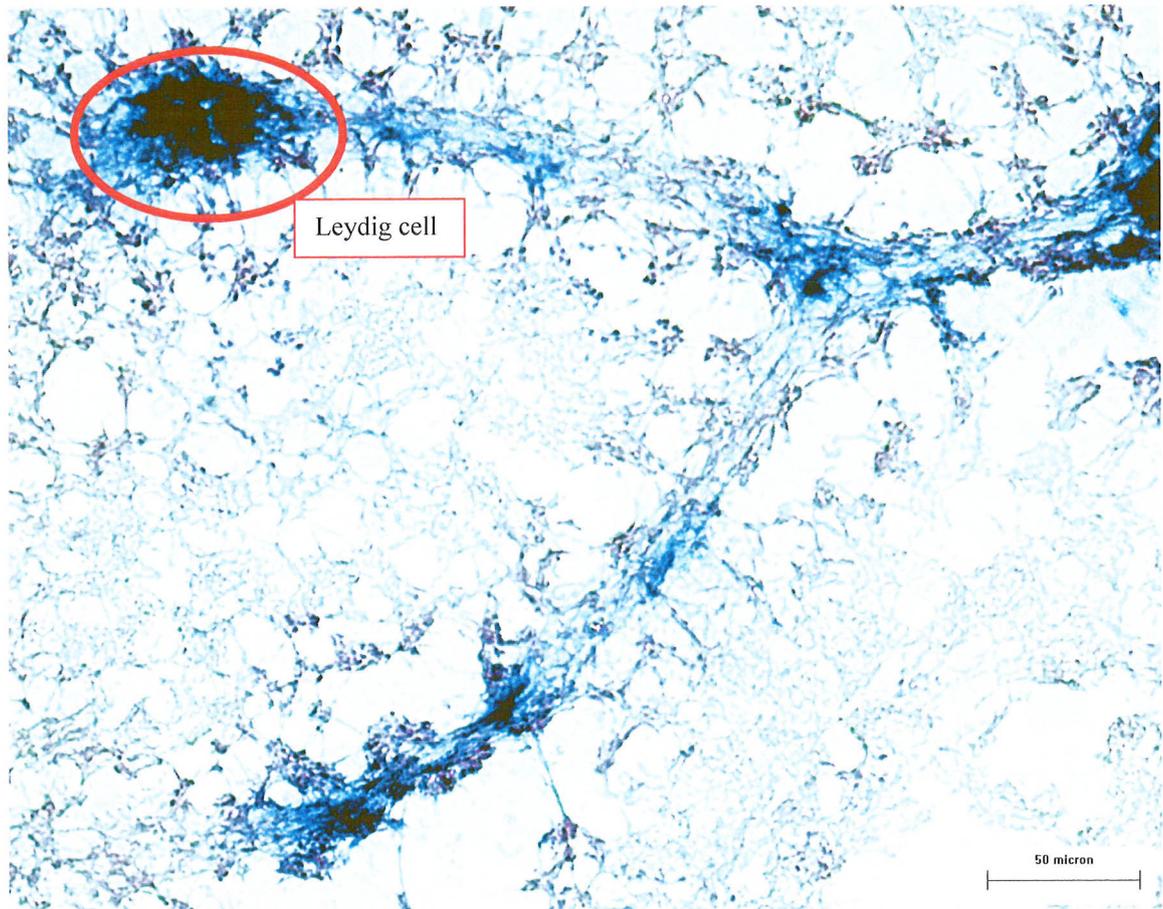


ภาพที่ 6 แผนผังแสดงการสังเคราะห์ฮอร์โมนที่เป็นสเตียรอยด์ (steroidogenic pathway) ในกรอบดี
 แสดงเอนไซม์ 3-beta hydroxy steroid dehydrogenase (3β-HSD) ซึ่งเป็นเอนไซม์หลักของการ
 สังเคราะห์

เมื่อนำตัวอย่างเนื้อเยื่ออัณฑะของแฉะเพศผู้ในช่วงที่มีค่า GSI สูงสุด (ธันวาคม) มาตรวจสอบหาบริเวณที่มีการทำงานของเอนไซม์ 3β -HSD ตามวิธีการของ Levy, Deane and Rubin (1959) พบว่าเนื้อเยื่ออัณฑะของแฉะมีการทำงานของเอนไซม์ 3β -HSD ที่ชัดเจน (ตำแหน่งที่ย้อมติดสีน้ำเงินเข้มในภาพที่ 7 ก) ในบริเวณรอบท่อ seminiferous tubule และเมื่อเปรียบเทียบกับตำแหน่งทางจุลกายวิภาคพบว่า เป็นตำแหน่งของ Leydig cells (ภาพที่ 7-8)



ภาพที่ 7 จุลกายวิภาคของอัณฑะแฉะเพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 (ก: ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออัณฑะแฉะ ย้อมด้วยสี hematoxylin และ eosin, ข: ภาพตัดขวางเนื้อเยื่ออัณฑะแฉะเมื่อตรวจสอบหาตำแหน่งที่มีการทำงานของเอนไซม์ 3β -HSD) กำลังขยาย 50 เท่า (เส้น bar scale มีขนาด 200 ไมโครเมตร)



ภาพที่ 8 จุลกายวิภาคของอัณฑะแยะเพศผู้จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ในช่วงเดือนธันวาคม 2552 แสดงตำแหน่งที่มีการทำงานของเอนไซม์ 3β -HSD กำลังขยาย 200 เท่า ซึ่งเป็นตำแหน่งของ Leydig cell ที่อยู่รอบท่อ seminiferous tubule (เส้น bar scale มีขนาด 50 ไมโครเมตร)

สรุปผลการศึกษา

จากหลักฐานทางสัตววิทยา การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อ และการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศชนิดสเตียรอยด์ สามารถให้ข้อสรุปเกี่ยวกับชีววิทยาการสืบพันธุ์ของแยะ *L. belliana* จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว ดังนี้

- แยะ *L. belliana* จากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ บริเวณรอบสวนสัตว์เปิดเขาเขียว มีวงรอบการสืบพันธุ์แบบเป็นรอบปี โดยมีฤดูกาลสืบพันธุ์เพียงช่วงเวลาเดียวในรอบปี
- แยะ *L. belliana* เพศผู้ มีความสมบูรณ์ของอัณฑะ (เมื่อพิจารณาจากค่า GSI) สูงสุด ในช่วงเดือนธันวาคม ซึ่งสอดคล้องกับการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (spermatogenesis) และการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศชนิดสเตียรอยด์ (steroidogenesis)
- แยะ *L. belliana* เพศเมีย มีความสมบูรณ์ของรังไข่ (เมื่อพิจารณาจากค่า GSI) สูงสุด ในช่วงเดือนธันวาคม และจะมีการตกไข่ (ovulation) ในช่วงเดือนธันวาคม-กุมภาพันธ์

ปัญหาและข้อเสนอแนะ

1. เนื่องจากการเก็บตัวอย่างแย้ในบางฤดูกาลทำได้ยาก จึงยังขาดตัวอย่างแย้ในบางเดือน นอกจากนี้ยังพบว่าตัวอย่างที่ได้ในแต่ละครั้งอาจมีจำนวนตัวของแต่ละเพศไม่เท่ากัน จึงจำเป็นต้องมีการเพิ่มการเก็บตัวอย่างมากขึ้นหรือมีระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่สม่ำเสมอมากขึ้น
2. จากการสังเกตพบว่าการจำแนกเพศจากลักษณะภายนอกอาจได้ข้อมูลที่คลาดเคลื่อน เนื่องจากแย้ทั้งสองเพศมีลักษณะคล้ายกันมาก โดยบางครั้งเมื่อผ่าตัดตรวจสอบอวัยวะสืบพันธุ์พบว่าได้ข้อมูลที่ไม่ตรงกับกรจำแนกเพศจากลักษณะภายนอก จึงอาจเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้การเก็บตัวอย่างได้จำนวนตัวในแต่ละเพศที่ไม่สม่ำเสมอ จึงควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อหาลักษณะที่เป็น sexual dimorphism ที่ชัดเจนของแย้ชนิดนี้

เอกสารอ้างอิง

- Doddamani, L.S. 1994. Histoenzymological studies on embryonic and posthatching development of the ovary in the tropical oviparous lizard, *Calotes versicolor*. *Journal of Morphology* 222: 1-10.
- Levy, H., Deane, H.W. and Rubin, B.L. 1959. Visualization of steroid-3 β -ol-dehydrogenase activity in tissues of intact and hypophysectomized rats. *Endocrinology* 65: 932-943.
- Pariyanonth, P., Aranyavalai, V. and Tangpraprutgul, P. 2009. Annual plasma gonadal steroid profiles in male butterfly lizard *Leiolepis belliana* in Thailand. *Abstracts, the 16th International Congress of Comparative Endocrinology, Hong Kong S.A.R., China, 22-26 June, 2009*. P60.
- Presnell, J.R. and Schreibman, M.P. 1997. *Humason's Animal Tissue Techniques*. 5th edition. The Johns Hopkins University Press.
- Radder, R.S., Shanbhag, B.A. and Saidapur, S.K. 2001. Pattern of plasma sex steroid hormone levels during the reproductive cycles of male and female tropical lizard, *Calotes versicolor*. *General and Comparative Endocrinology* 124: 285-292.
- Shanbhag, B.A. and Prasad, B.S.K. 1993. Follicular dynamics and germinal bed activity during the annual ovarian cycle of the lizard, *Calotes versicolor*. *Journal of Morphology* 216: 1-7.
- Zug, G.R., Vitt, L.J. and Caldwell, J.P. 2001. *Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles*. San Diego: Academic Press.