บทนำ (Introduction)

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

กบเป็นสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ซึ่งในด้านการประมงจัดอยู่ในกลุ่มของสัตว์น้ำเศรษฐกิจอีกชนิดหนึ่งที่น่าสนใจเพาะเลี้ยงเพื่อบริโภคเองหรือจำหน่ายเป็นสินค้าทั้งภายในและต่างประเทศ ปัจจุบันผลผลิตที่นำมาใช้บริโภคส่วนใหญ่ยังได้จากการจับรวบรวมจากแหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งนับวันจะมีจำนวนลดลงเรื่อย ๆ

โครงการศึกษารูปแบบการเลี้ยงกบ เพื่อเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือได้ทำการเพาะเลี้ยงกบโดยใช้สายพันธุ์พ่อ-แม่กบจากฟาร์มเลี้ยงกบจังหวัดชลบุรีผลการศึกษาโดยการเลี้ยงในบ่อซีเมนต์และบ่อดินล้อมด้วยสังกะสีนั้น เลี้ยงได้สำเร็จลูกกบที่เพาะพักได้เอง เมื่อนำไปเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารเม็ดสำหรับปลาดุกปนกับปลาสด ใส้เดือนดิน และแมลง ลูกกบเจริญเติบโตดีมาก เพียงแต่ได้พบว่ากบโตมีจำนวนกบตัวผู้มากกว่ากบตัวเมีย และกบตัวผู้มีขนาดเล็กกว่ากบตัวเมีย หากได้ทำการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการใช้ฮอร์โมนเพศผสมลงไปในอาหารให้ลูกอ๊อดกินอาจจะสามารถแปลงเพศกบได้ ทั้งนี้กบเพศเมียจะมีขนาดโตกว่าและขายได้ราคาดีกว่ากบตัวผู้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของฮอร์โมน estrogen coujugated ที่มีต่อการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกอ๊อดกบนา โดยศึกษาจากลักษณะทางฮีสโตโลยีของอวัยวะสืบพันธุ์ของลูกอ๊อดกลุ่มทดลองที่ใช้ฮอร์โมนความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

จะได้รับความรู้ขั้นพื้นฐานว่าฮอร์โมนที่มีจำหน่ายในท้องตลาดที่ได้มีการนำมาใช้ในการแปลงเพศปลาได้นั้น จะสามารถนำมาใช้แปลงเพศกบได้หรือไม่ ความรู้ที่ได้รับนี้จะเกิดประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงกบต่อไปในอนาคต

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Literature reviewed)

การศึกษาวิจัยเพื่อหาวิธีการแปลงเพศสัตว์ที่เพาะเลี้ยงในน้ำ (Aquaculture) นั้นได้ประสบผลสำเร็จอย่างมากในกลุ่มปลาโดยที่ ดร. เดวิต ลิตเติล และคณะ (2535)แห่งสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย สาขาวิชาเพาะเลี้ยงได้รายงานว่า กลุ่มผู้สนใจได้ศึกษาการแปลงเพศปลานิลจากเพศเมียเป็นเพศผู้ เพราะ

เพศผู้เจริญเติบโตเร็วกว่าเพศเมียถึง 20 เปอร์เซนต์

การศึกษาปลานิลแปลงเพศนี้ เป็นการทำให้ลูกปลานิลเพศเมียกลายเป็นเพศผู้ โดยการให้อาหารที่มีฮอร์โมนเพศชาย ชื่อว่า 17 แอลฟา เทสโตสเตอโรน(17, l alpha Testosterone) ในช่วงยังเล็กเป็นเวลา 21 วัน ซึ่งจะทำให้ ระบบสืบพันธ์เพศเมียฝ่อ และหมดความสามารถในการขยายพันธุ์ส่วนในลูกปลาเพศผู้นั้นจะเป็นปกติเหมือนเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลง

มานพและคณะ(2531)ได้ศึกษาวิจัยการแปลงเพศปลาก้ดจากเพศเมียให้เป็นเพศผู้โดยใช้ฮอร์โมน ฟลูออกซีเมสเตอโรน (Fluoxymesterone) โดยมีชื่อทางการค้าว่าฮาโลเทสติน (Halotestin) ซึ่งมีสรรพคุณทางด้านเพิ่มฮอร์โมนสำหรับผู้ชาย จากการทดลองให้ลูกปลากินยาฮอร์โมนติดต่อกัน 14 วัน ผลปรากฏว่าลูกปลาสามารถเปลี่ยนลักษณะภายนอกเป็นตัวผู้ได้ทั้งหมด 100 เปอร์เซนต์

Yamamoto (1958) ได้ศึกษาวิจัยการแปลงเพศปลาหิวตะกั่ว (Medaka, Oryzias latipes) และได้กล่าวว่า Yamamoto(1953)ได้รายงานว่า ปลาตัวผู้สามรถแปลงเพศเป็นปลาตัวเมียได้โดยสมบูรณ์เมื่อให้อาหารผสมอีสโตรเจน(estro และ stibestrol)

สำหรับในกบนั้น Witschi (1929 อ้างตาม Kubo 1986) ได้รายงานว่าในกบRana temporaria จะมีสายพันธุ์ที่แตกต่างกันทางด้านการเปลี่ยนแปลงของเพศอยู่ 3 สายพันธุ์ คือ

กลุ่มเปลี่ยนแปลงไปอย่างเต็มที่ (Differentiated) กลุ่มที่ไม่เปลี่ยนแปลง (Undifferentiated) และกลุ่มที่เปลี่ยนแปลงไปครึ่งหนึ่ง (Semidifferentiated)กลุ่มที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างเต็มที่นั้นจะกระจายอยู่ทั่วไปในแถบหนาวทางด้านเหนือส่วนกลุ่มที่ไม่เปลี่ยนแปลงนั้นจะพบอยู่ตามแถบอบอุ่นและกลุ่มเปลี่ยนแปลงเพียงครึ่งหนึ่งนั้นจะกระจายอยู่บริเวณพื้นที่ระหว่างสองกลุ่ม ใน Urodels สายพันธุ์ Ambystoma maculatum Witschi (1933) ยังได้รายงานว่าพบสองสายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่เปลี่ยนแปลงอย่างเต็มที่จะอยู่บริเวณเขตหนาวส่วนสายพันธุ์ที่เจริญเปลี่ยนแปลงเพียงครึ่งหนึ่งจะพบบริเวณเขตอบอุ่นและเขายังกล่าวอีกว่า ในญี่ปุ่นได้มีผู้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเปลี่ยนแปลงทางเพศของอนูแรน (Anuran) ก้นมากมายและได้พบทั้งชนิด differentiated และ semidifferentiated.

เทคนิควิธีการในการศึกษาเกี่ยวกับ Sex differentiation นั้นมีอยู่หลายวิธีอันได้แก่ การเพิ่มอุณหภูมิ การฝังโกแนด,Parabiosis และการใช้ฮอร์โมนเพศ ในจำนวนวิธีการต่าง ๆ เหล่านี้ การใช้ฮอร์โมนเพศดูจะเป็นวิธีที่ให้ผลมากที่สุด ในการแปลงเพศเมียเป็นเพศผู้นั้นนักวิทยาศาสตร์หลาย ๆ ท่านได้ใช้ฮอร์โมน เอน

ไดรเจน และประสบผลสำเร็จในกบ Rana temporaria(Gallien,1937),R. pipien (Witschi and Crown 1937,Foote,1938), R. catesbeiana (Puckett 1940), R.sylvatica (Mintz and Witschi 1946,Mintz 1948) และ R. japonica(Kawamura and Yakota 1959) ในทางตรงกันข้าม หากจะแปลงเพศผู้ให้เป็นเพศเมียผู้ทำการทดลองก็จะใช้ฮอร์โมนเอสไตรเจนความสำเร็จที่เกิดขึ้นนั้นได้รายงานไว้ดังนี้ในยูไรเดล Ambystoma opacum(Foote, 1941) A. mexicanum(Mintz 1947)และ Pleurodeles woltl(Gallien 19506,1954) (อ้างตามKubo, 1986)

Gallien (1954 อ้างตาม Yamamoto 1958) ได้รายงานว่าเมื่อเลี้ยงตัวอ่อนระยะลาวา (lavae) ของตัวนิวท์ Pleurodeles waltlii ในสารละลายอีสไตรเจน(estradiol benzoate) พบว่า เมื่อตัวนิวท์โตขึ้นจะเป็นเพศเมียหมด Gallien (1955,1956) และ Chang and Witschi (1955) อ้างตาม Yamamoto (1958) ได้ประสบผลสำเร็จในการแปลงเพศคางคก Xenopus laevisจากเพศผู้เป็นเพศเมียโดยใช้ฮอร์โมน estradiol ผลการทดลองที่เกิดขึ้นในตัวนิวท์และคางคกเป็นการพิสูนจ์ได้ว่า การแปลงเพศจากเพศผู้เป็นเพศเมียสามารถทำได้ในสัตว์จำพวกครึ่งปกครึ่งน้ำ (Amphibia) โดยใช้ฮอร์โมนเอสไตรเจน

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง (Materials and Method)

วัสดุอุปกรณ์ ประกอบด้วย

1. บ่อผสมพันธุ์และบ่อเพาะพักลูกกบ
2. อาหารผงพลาโต
3. ฮออร์โมน estrogen conjugated ซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า Premalin เป็นยาชนิดเม็ดมีส่วนผสมของฮอร์โมน 0.625 มิลลิกรัม/เม็ด
4. น้ำยา Bouin's fixative
5. อุปกรณ์ในการทำ Paraffin method.

วิธีการดำเนินการทดลอง แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน

ขั้นตอนที่ 1 ขั้นตอนแรกนี้เป็นการเตรียมการเพาะพักลูกอ๊อดโดยการนำพ่อพันธุ์-แม่พันธุ์กบที่มีความพร้อมในการผสมพันธุ์ลงในบ่อเพาะพัก เพื่อให้กบจับคู่ผสม

พันธุ์ก้นดำเนินการตามวิธีการของสุภาพ ณ นคร และคณะ (2535)

หลังจากได้ลูกอ๊อดออกมาจำนวนหนึ่งแล้ว ให้แบ่งเลี้ยงในบ่อเพาะพักลูกอ๊อด บ่อ ๆละ 300 ตัว

บ่อที่ 1 - เลี้ยงโดยให้อาหารปกติเป็นบ่อควบคุม

บ่อที่ 2 - เลี้ยงโดยให้อาหารผสมกับ Estrogen Conjugated 5 ไมโครกรัม/อาหาร 1 กรัม

บ่อที่ 3 - เลี้ยงโดยให้อาหารผสมกับ Estrogen Conjugated 10 ไมโครกรัม/อาหาร 1 กรัม

ขั้นตอนที่ 2 วิธีการเพาะเลี้ยง

2.1 วิธีการเตรียมอาหารผสมฮอร์โมน โดยการบดยาเม็ดที่มีฮอร์โมนให้ละเอียดแล้วผสมกับอาหารในอัตราส่วนดังนี้ Estrogen Conjugated ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/อาหาร 1 กรัมใช้อาหาร 375 กรัม ต่อยา 3 เม็ด Estrogen Conjugated ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม/อาหาร 1 กรัมใช้อาหาร 375กรัมต่อยา 6 เม็ด

2.2 วิธีการให้อาหาร

ในช่วงลูกอ๊อดอายุแรกเกิดถึง 3 วัน ยังไม่ต้องมีการให้อาหารเพราะลูกอ๊อดจะอาศัยอาหารที่อยู่ในถุงไข่แดง (yolk sac) ของลูกอ๊อดเอง

อายุ 4-12 วัน ให้อาหารผงผสมกับไข่แดงบดละเอียดเสริมหลังจากอายุช่วงนี้จนถึงอายุ 45 วัน ให้เฉพาะอาหารผงโดยหยุดให้ไข่แดงบดละเอียดเสริม ทั้งนี้เวลาที่ให้อาหารคือ 9.00น. และ 16.00น. และต้องทำสะอาดบ่อทุกครั้งที่อาหารเหลือเริ่มจะเน่า

2.3 การดองน้ำยา

ทุก ๆ อายุ 7 วัน 28 วัน 35 วัน และ 42 วัน สุ่มจับลูกอ๊อดจากทุกกลุ่ม ๆ ละ 15 ตัว นำมาฆ่าและดองในน้ำยา Bouin's Fixative

2.4 การเตรียมสไลด์ถาวรโดยวิธี Parafin method

เทคนิคการเตรียมสไลด์ถาวร โดยวิธี Parafin method ได้ใช้วิธีของอำพา (2533) โดยนำลูกอ๊อดที่สุ่มจับจาก อายุต่าง ก้นจากทั้ง 3 บ่อทดลอง นำมา Fix ในน้ำยาดอง Bouin's fixative นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นก็เปลี่ยน

หอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยขอนแก่น

มาเก็บไว้ในน้ำยา 70%อัลกอฮอล์แล้วดำเนินการตามวิธี Parafin method

เนื้อเยื่อที่ฝังไว้ในพาราฟินเรียบร้อยแล้ว ถูกสุ่มมาตัดให้บางด้วยเครื่องไมโครโตม(Microtome sectioning) โดยสุ่มมากลุ่มอายุละดังนี้

กลุ่มที่ 1 5 ตัวใน 15 ตัว
กลุ่มที่ 2 8 ตัวใน 15 ตัว
กลุ่มที่ 3 7 ตัวใน 15 ตัว

และตัดเนื้อเยื่อหนา 7 ไมครอน แล้วย้อมสีด้วย Ehrlich's haematoxylin และEosin (H+E)

ผลการศึกษา (Result)

จากการอ่านผลทางฮีสโตโลยีของโกแนดของลูกอ๊อดในช่วงอายุต่าง ๆ กัน โดยเปรียบเทียบกับข้อมูลของ Foyle (1993) ที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของอวัยวะสืบพันธุ์ของปลาcoho salmon (Oncorhynchus kisutch) เป็นแนวทางในการวิเคราะห์ผล

ผลการวิเคราะห์สรุปได้ดังนี้

กลุ่มทดลอง	จำนวนสัตว์ทดลอง	ลักษณะเซลล์ที่พบตามอายุ (วัน)					
		7	14	21	28	35	42
กลุ่มควบคุม	ตัวที่ 1	-	-	-	-	-	PO
	2	-	-	-	-	PO	PO
	3	-	-	-	-	-	-
	4	G	-	-	O	O	G+PO
	5	G	-	-	O	O	G+PO
กลุ่มทดลองE_5	1	-	-	G+O	-	G+O+PO	G+O+PO
	2	-	-	O+PO	G+PO	-	-
	3	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	O+PO	PO	O+PO
	5	-	-	-	O+PO	O+PO	O+PO
	6	-	-	-	-	-	O+PO
	7	-	-	-	-	-	O+PO
	8	-	-	-	-	-	O+PO
กลุ่มทดลองE_{10}	1	-	-	O+PO	-	-	-
	2	-	-	G+O	-	G+PO	-
	3	-	-	G+O	-	O+PO	O+PO
	4	-	-	-	-	O+PO	PO
	5	-	-	-	O+PO	O+PO	PO
	6	-	-	-	PO	-	-
	7	-	-	-	O+PO	-	-

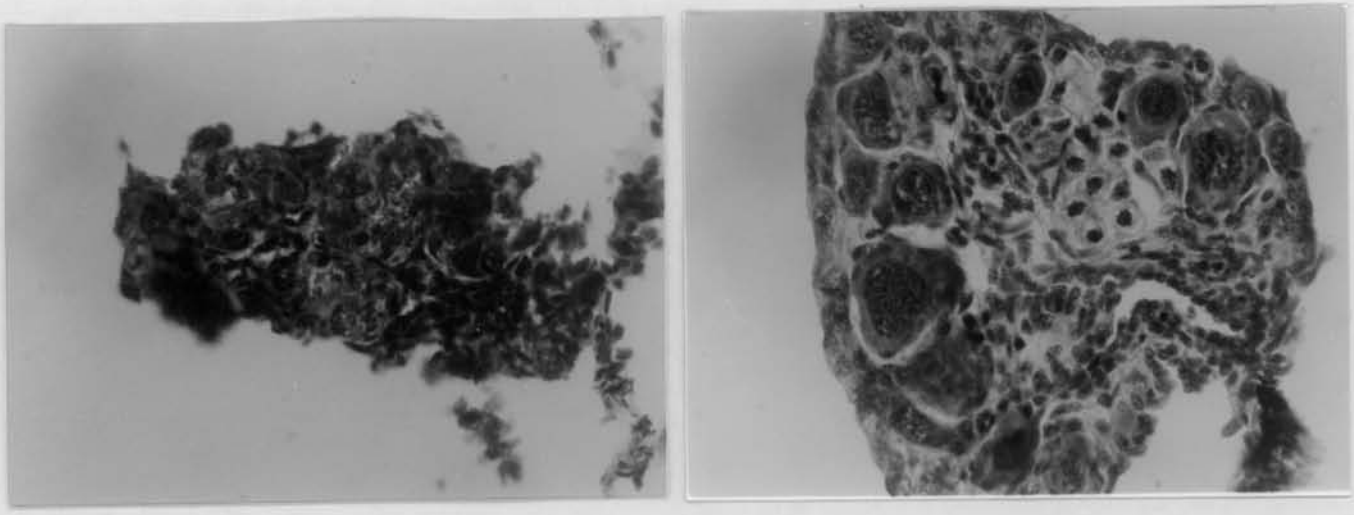
หมายเหตุ - ตรวจไม่พบ

G พบ genm cells

O พบ Oogonia

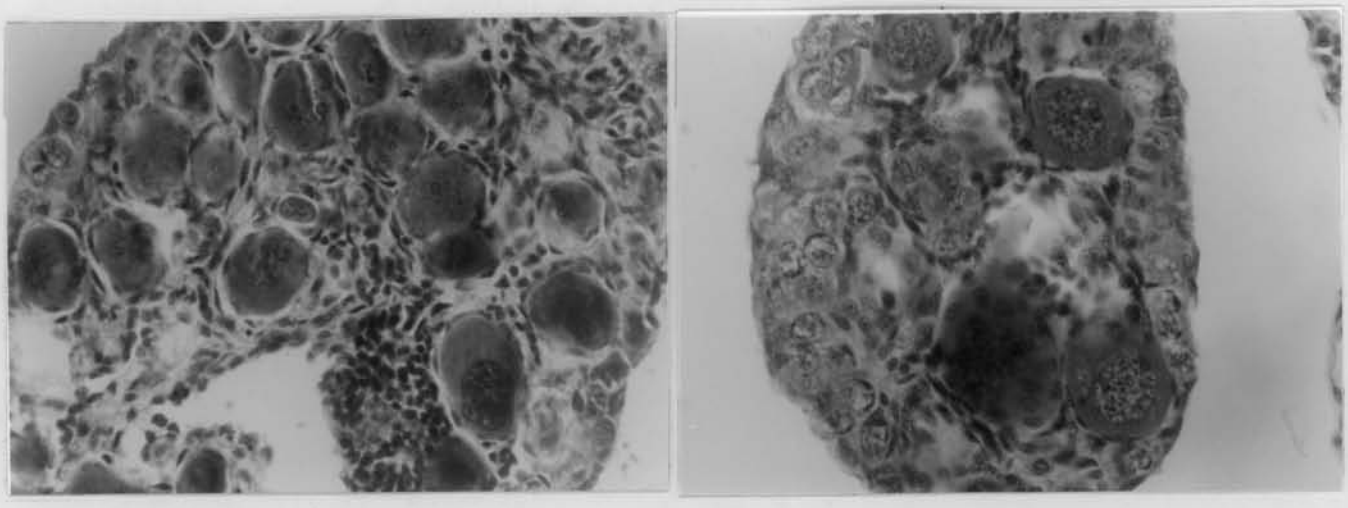
PO พบ Primary oocyte

ผลการศึกษาแสดงเป็นรูปภาพได้ดังนี้



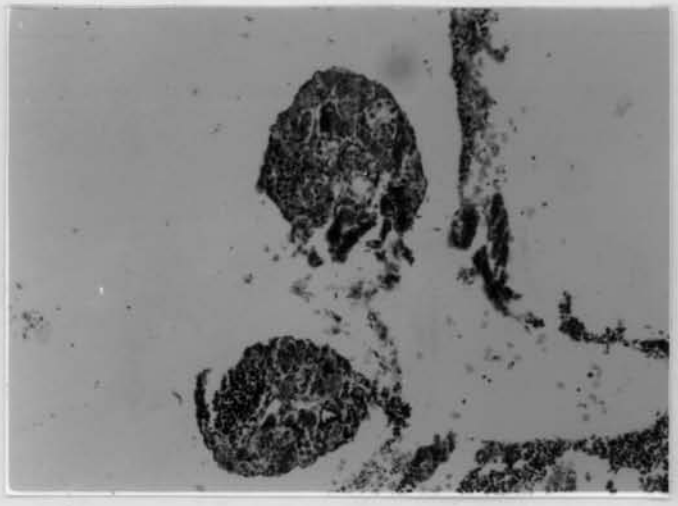
ก. อายุ 35 วัน ข. อายุ 42 วัน

ภาพที่ 1 แสดงภาพตัดขวางของอวัยวะสืบพันธุ์ลูกอ๊อดกลุ่มควบคุมกำลังขยายของภาพ 334 เท่า

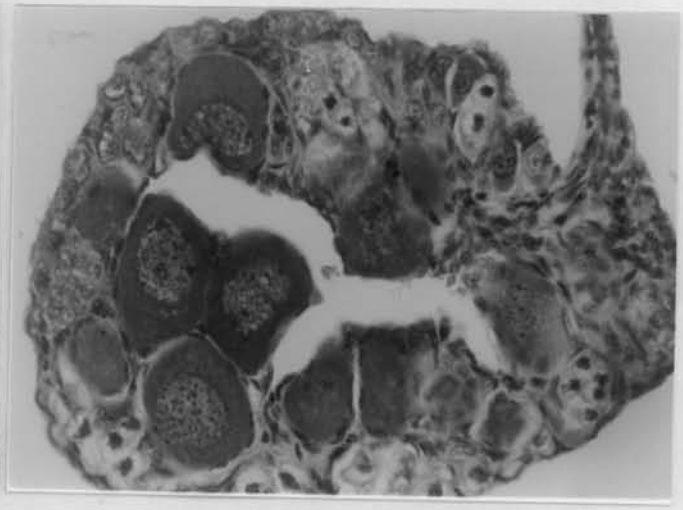


ก. อายุ 28 วัน ข. อายุ 35 วัน

ภาพที่2 แสดงภาพตัดขวางของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของลูกอ๊อดกลุ่ม E_5 กำลังขยายของภาพ 334 เท่า

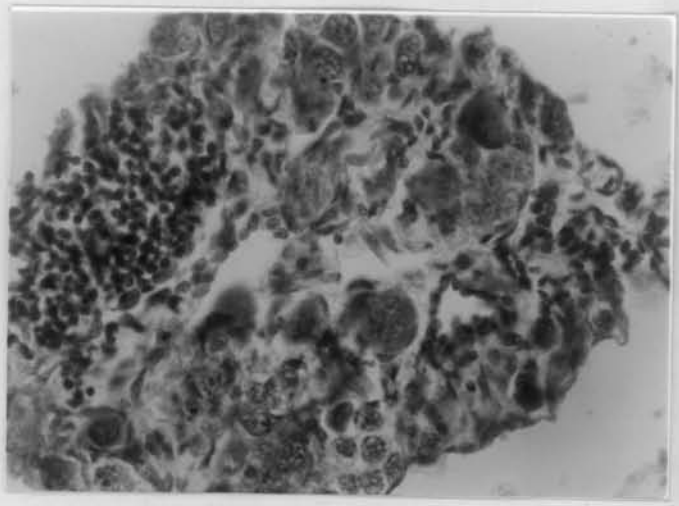


ก. กำลังขยายภาพ 167 เท่า

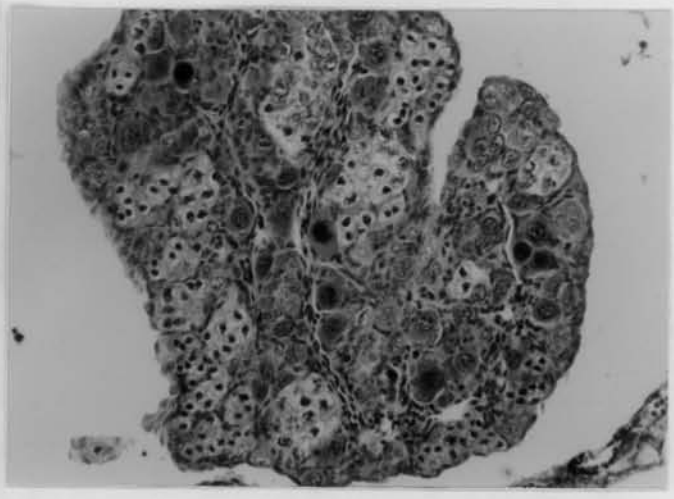


ข. กำลังขยายภาพ 334 เท่า

ภาพที่3 แสดงภาพตัดขวางของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียของลูกอ๊อดกลุ่ม E_5 อายุ 42 วัน

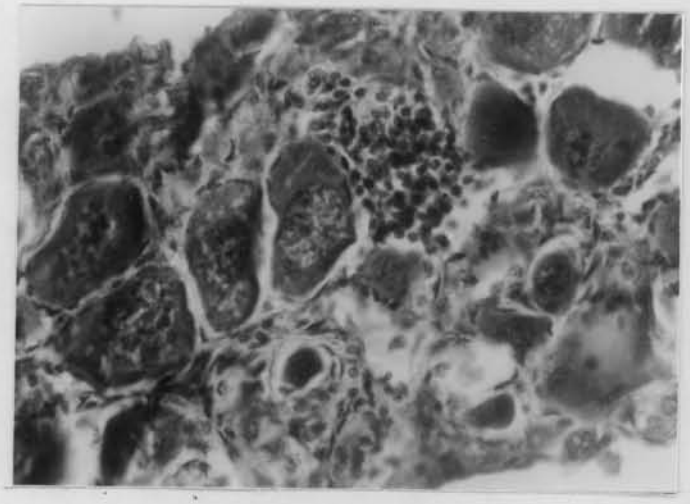


ก. อายุ 28 วัน-กำลังขยายภาพ 84 เท่า



ข. อายุ 35 วัน-กำลังขยายภาพ 334 เท่า

ภาพที่4 แสดงภาพตัดขวางของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียลูกของอ๊อดกลุ่ม E_{10}



<u>ภาพที่5</u> แสดงภาพตัดขวางของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย ของลูกอ๊อดกลุ่ม E_{10} อายุ 42 วัน กำลังขยายภาพ 334

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา (Conclusion and Discussion)

ผลการศึกษาโดยใช้ฮอร์โมน เอสไตรเจน คอนจูเกตเตดซึ่งเป็นฮอร์โมนเพศเมียผสมลงในอาหารให้ลูกอ๊อดอายุตั้งแต่ 4 วัน เป็นต้นไปจนสิ้นสุดการทดลองนั้น หากจะวิเคราะห์ผลจากการอ่านจากภาพถ่ายจากสไลด์จะพบว่ากลุ่มเซลล์เอนโดเดิร์มที่พร้อมจะเปลี่ยนแปลงไปเป็น Primordial germ cells นั้น เริ่มปรากฏตั้งแต่ลูกอ๊อดอายุ 7 วันซึ่ง Gallien (1965) กล่าวว่า sex differetiation ในกลุ่ม Amphibian นั้นกลุ่ม Primordial germ cells ซึ่งพบในระยะที่เรียกว่าIndifferent stage จะเปลี่ยนแปลงไปเป็น Testis หรือ Ovary นั้นก็ขึ้นอยู่กับ Sex-Chromosome และ sex hormones ด้วย ในกรณีที่เพิ่มฮอร์โมน เอสไตรเจน คอนจูเกตเตดลงไปในอาหารก็คาดหวังว่าจะได้ประชากรกบที่เป็นเพศเมียมากขึ้นจากการวิเคราะห์ผลโดยศึกษาจากรูปร่างของเซลล์ที่เจริญจาก Primordial germ cells เจริญไปเป็น เซลล์ oogonia และเป็น Primary oocyte พบว่ากลุ่มเซลล์ที่พบในกลุ่มควบคุมให้ผลที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่เสริมฮอร์โมนให้ ซึ่งไม่สามารถบอกได้ว่าไกแนดที่แสดงผลเป็นเพศเมียนั้นเป็นโดยธรรมชาติหรือเป็นเพราะได้รับฮอร์โมนเพิ่ม

จากการติดตามดูผลกบโตซึ่งเลี้ยงไว้ในบ่อของภาควิชาชีววิทยามีข้อมูลประกอบดังนี้

กบที่ได้รับฮอร์โมนเอสไตรเจน คอนจูเกตเตดในช่วงลูกอ๊อด และเลี้ยงต่อเป็นกบโตจะเป็นตัวเมียทั้งหมด กบที่เลี้ยงในสภาพธรรมชาติทั่ว ๆ ไป โดยไม่มีฮอร์โมนเสริมพบว่ามีกบตัวผู้มากกว่าตัวเมียในอัตราส่วนดังนี้

รุ่นที่ 1 ตัวผู้ 76 ตัว ตัวเมีย 32 ตัว

รุ่นที่ 2 ตัวผู้ 129 ตัว ตัวเมีย 66 ตัว

จากข้อมูลดังกล่าวนี้ พอจะสรุปได้ว่าในสภาพธรรมชาติจะมีประชากรกบตัวเมีย น้อยกว่าตัวผู้ แต่ถ้ามีการเสริมฮอร์โมนเพศเมียลงไปในอาหารในช่วงลูกอ๊อดคาดว่าจะสามารถเพิ่มประชากรเพศเมียกบได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามประชากรที่ใช้ในการศึกษาทั้งด้านฮีสโตโลยีและจำนวนที่เลี้ยงจากสภาพธรรมชาตินั้นน้อยเกินไป และข้อบกพร่องจากการตัดเนื้อเยื่อรวมทั้งการอ่านผล อาจจะยังคลาดเคลื่อน และจุดบกพร่องอีกจุดหนึ่งก็คือ การผสมฮอร์โมนลงไปในอาหารนั้น ก็ไม่สามารถรับประกันได้ว่าอาหารจะเข้าสู่ตัวลูกอ๊อดได้ 100 เปอร์เซนต์ ข้อบกพร่องต่าง ๆ เหล่านี้หากมีการปรับปรุง เทคนิควิธีการให้ดีขึ้นก็เป็นที่คาดหวังว่าการศึกษาการแปลงเพศของกบนานี้ ยังเป็นเรื่องน่าสนใจสำหรับวงวิชาการรวมทั้งการเพิ่มผลผลิตของกบตัวเมีย โดยเพิ่มน้ำหนักตัวกบด้วย ก็จะทำให้แนวทางนี้นำไปสู่การผลิตกบในเชิงพาณิชย์ได้ดียิ่งขึ้นอีกด้วย